

BETÂNIA TEIXEIRA MOREIRA

**BIOPROSPECÇÃO DO POTENCIAL
FARMACÊUTICO DE DUAS ESPÉCIES DE
FUNGOS DO SOLO DO CERRADO
MINEIRO**

Ouro Preto – MG

Escola de Farmácia - UFOP

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

BETÂNIA TEIXEIRA MOREIRA

BIOPROSPECÇÃO DO POTENCIAL
FARMACÊUTICO DE DUAS ESPÉCIES DE
FUNGOS DO SOLO DO CERRADO
MINEIRO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof. Dr^a. Jacqueline Aparecida Takahashi, Departamento de Química, ICEX, UFMG.

Ouro Preto – MG
Escola de Farmácia - UFOP
2009

M838b

Moreira, Betânia Teixeira.

Bioprospecção do potencial farmacêutico de duas espécies de fungos do solo do cerrado mineiro [manuscrito] / Betânia Teixeira Moreira. – 2009.
xv, 125 f.: il. color., grafs., tabs.

Orientadora: Profa. Dra. Jacqueline Aparecida Takahashi.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. Programa de Pós graduação em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Fármacos e Medicamentos

1. Fungo - Metabolismo - Teses. 2. Antibióticos - Teses. 3. Fermentação - Teses. I. Universidade Federal de Ouro Preto. II. Título.

CDU: 582.282.123

Catálogo: sisbin@sisbin.ufop.br

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado essa oportunidade e ter proporcionado condições para a realização desse trabalho.

Aos meus pais Edilson e Marli e ao meu irmão Bruno pela constante fonte de amor, incentivo, dedicação e confiança.

Ao Olaf por todo amor, incentivo e por estar sempre presente na minha vida apesar da distância.

À Professora Dr^a. Jacqueline Aparecida Takahashi pela oportunidade, pela orientação, pela paciência e pelos conhecimentos transmitidos.

À Professora Dr^a. Célia Maria Correa pela amizade e pelos ensinamentos durante os anos de iniciação científica.

À Adriana de Almeida Bracarense pelo extrato do fungo *Penicillium brasilianum* cedido.

Às estagiárias Emanuele Souza e Polyana Cristina Campos pela ajuda no fracionamento cromatográfico dos extratos e preparo dos extratos do fungo *Penicillium brasilianum* e avaliação da atividade antibacteriana, respectivamente.

Aos colegas do Laboratório de Biotecnologia e Bioensaios do Departamento de Química da UFMG pela convivência alegre e ajuda prestada durante todo o período desse trabalho.

Aos meus amigos, em especial às amigas da República Hangar e ao Milton, pelo apoio e amizade.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto.

À Universidade Federal de Ouro Preto pela bolsa concedida.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	VIII
LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE ABREVIATURAS	XII
RESUMO	XIV
ABSTRACT	XV

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO.....	02
1.1 Os fungos e sua importância na descoberta de novos fármacos.....	02
1.2 O fungo <i>Clonostachys rosea f catenulata</i>	10
1.3 O fungo <i>Penicillium brasilianum</i>	12
1.4 Origem dos fungos estudados.....	16
1.5 Fármacos antibacterianos.....	18
1.6 Fármacos anticolinesterásicos.....	22

CAPÍTULO 2

2 OBJETIVO.....	26
2.1 Objetivo geral.....	26
2.2 Objetivos específicos.....	26

CAPÍTULO 3

3 PARTE EXPERIMENTAL.....	28
3.1 Equipamentos.....	28
3.2 Reagentes.....	29
3.3 Meios de cultura.....	30
3.3.1 Meio de cultura BHI.....	30
3.3.2 Solução salina.....	30
3.3.3 Meio de cultura sólido antibiótico n° 1	30
3.3.4 Meio de cultura líquido complexo.....	30
3.3.5 Meio caldo de batata dextrosado	30
3.4 Cultivo do fungo <i>Clonostachys rosea f catenulata</i>	31
3.5 Cultivo do fungo <i>Penicillium brasilianum</i>	32

3.6	Fracionamento dos extratos do fungo <i>Clonostachys rosea f catenulata</i>	33
3.6.1	Caracterização de Cr1	35
3.6.2	Caracterização de Cr3	36
3.7	Fracionamento do extrato do fungo <i>Penicillium brasilianum</i>	36
3.8	Testes de atividade biológica.....	42
3.8.1	Teste de atividade antibacteriana – Técnica de difusão em placa utilizando discos de papel (BAUER et al., 1966)	42
3.8.2	Teste de atividade antibacteriana – Determinação da concentração inibitória mínima – CIM.....	43
3.8.3	Testes de atividade anticolinesterásica – Análise qualitativa por bioautografia (GIOVANNI et al., 2008)	44
3.9	Avaliação da variação nutricional e a atividade antibacteriana dos extratos do fungo <i>Penicillium brasilianum</i>	45
CAPÍTULO 4		
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
4.1	Elucidação estrutural dos metabólitos isolados do fungo <i>Clonostachys rosea f catenulata</i>	50
4.1.1	Elucidação estrutural de Cr1	50
4.1.2	Elucidação estrutural de Cr2	51
4.1.3	Elucidação estrutural de Cr3	54
4.2	Elucidação estrutural dos metabólitos isolados do fungo <i>Penicillium brasilianum</i>	55
4.2.1	Elucidação estrutural de Pb1	55
4.2.2	Elucidação estrutural de Pb2	57
4.2.3	Elucidação estrutural de Pb3	66
4.2.4	Elucidação estrutural de Pb4	69
4.3	Testes de atividade biológica.....	71
4.3.1	Testes de atividade antibacteriana – Técnica de difusão em placa utilizando discos de papel (BAUER et al., 1966)	71

4.3.2 Testes de atividade antibacteriana – Determinação da concentração Inibitória Mínima – CIM	73
4.3.3 Teste de atividade anticolinesterásica – Análise qualitativa por bioautografia (GIOVANNI et al., 2008).....	75
4.4 Avaliação da variação nutricional e a atividade antibacteriana dos extratos do fungo <i>Penicillium brasilianum</i>	76
CAPÍTULO 5	
5 CONCLUSÃO.....	83
CAPÍTULO 6	
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85
ANEXOS	
ANEXO 1. ESPECTROS DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DO FUNGO <i>CLONOSTACHYS ROSEA F CATENULATA</i>	96
ANEXO 2. ESPECTROS DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DO FUNGO <i>PENICILLIUM BRASILIANUM</i>	107

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Massas dos extratos do fungo <i>Clonostachys rosea f catenulata</i>	31
Tabela 2 – Massa do extrato do fungo <i>Penicillium brasilianum</i>	32
Tabela 3 – Dados (frações, eluente e massa) da coluna cromatográfica do extrato do fungo <i>Clonostachys rosea f catenulata</i> (ECr1).....	33
Tabela 4 – Dados (frações, eluente e massa) da coluna cromatográfica da fração BM-07-04.....	34
Tabela 5 – Dados (frações, eluente e massa) da coluna cromatográfica da fração BM-07-07.....	34
Tabela 6 – Dados (frações, eluente e massa) da coluna cromatográfica do extrato do fungo <i>Penicillium brasilianum</i> (EPb).....	36
Tabela 7 – Dados (frações, eluente e massa) da coluna cromatográfica da fração BE-27-18.	38
Tabela 8 – Dados (frações, eluente e massa) da coluna cromatográfica da fração BG-41-16.....	39
Tabela 9 – Dados (frações, eluente e massa) da coluna cromatográfica da fração BG-42-03.....	40
Tabela 10 – Dados (frações, eluente e massa) da coluna cromatográfica da fração BE-27-19.	40
Tabela 11 – Dados (frações, eluente e massa) da coluna cromatográfica da fração BE-27-33.	41
Tabela 12 – Massas dos extratos obtidos do cultivo em arroz.	47
Tabela 13 – Massas dos extratos obtidos do cultivo em meio de cultura líquido complexo e biomassa.....	47
Tabela 14 – Massas dos extratos obtidos do cultivo em caldo batata dextrosado e biomassa.	48
Tabela 15 – Composição de ácidos graxos na fração Cr1	51
Tabela 16 – Comparação dos dados de RMN de ^{13}C e de ^1H (CDCl_3) da substância Cr2 com os dados da literatura para o ergosterol (CDCl_3).	52
Tabela 17 – Composição de ácidos graxos na fração Cr3	55
Tabela 18 – Dados de RMN de ^{13}C (D_2O) da substância Pb1 em comparação com os dados da literatura para o manitol (D_2O).....	56

Tabela 19 – Dados de RMN de ^1H , de ^{13}C , ^1H - ^1H COSY e HMBC para a substância Pb2 .	59
Tabela 20 – Dados de RMN de ^{13}C e de ^1H (CDCl_3) da substância Pb2 em comparação com os dados da literatura para a austina (CDCl_3).	61
Tabela 21 – Dados de RMN de ^{13}C e de ^1H (CDCl_3) da substância Pb3 em comparação com os dados da literatura para a dehidroaustina (CDCl_3).	67
Tabela 22 – Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C (CDCl_3) da substância Pb4 em comparação com os dados da literatura para o ácido penicílico (CDCl_3).	70
Tabela 23 – Halos de inibição do crescimento bacteriano (em cm) para os extratos e substância pura obtidos do fungo <i>Clonostachys rosea f catenulata</i> .	72
Tabela 24 – Halos de inibição do crescimento bacteriano (em cm) para o extrato e substâncias puras obtidos do fungo <i>Penicillium brasilianum</i> .	73
Tabela 25 – Valores da concentração inibitória mínima para o extrato e substâncias puras obtidos do fungo <i>Penicillium brasilianum</i> .	74
Tabela 256 – Halos de inibição do crescimento bacteriano (em cm) para os extratos Ar30-2, Mc30I-2, PDB15A-2 e PDB30I-2 obtidos do fungo <i>Penicillium brasilianum</i> .	78
Tabela 267 – Halos de inibição do crescimento bacteriano (em cm) contra a bactéria <i>Listeria monocytogenes</i> dos extratos obtidos do fungo <i>Penicillium brasilianum</i> .	80
Tabela 278 – Halos de inibição do crescimento bacteriano (em cm) contra a bactéria <i>Escherichia coli</i> dos extratos obtidos do fungo <i>Penicillium brasilianum</i> .	81

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fotografias do fungo <i>Clonostachys rosea f catenulata</i> em ágar malte. A: colônia jovem em placa de petri; B: colônia adulta com esporos em tubo de ensaio	10
Figura 2 – Microfotografias do fungo <i>Clonostachys rosea f catenulata</i> . A: conidióforos secundários; B: fiálide de conidiósporos secundários; C: conidióforos primários; D: conídios de conidióforos secundários	11
Figura 3 – Microfotografias de fungos do gênero <i>Penicillium</i> . A: conidióforos; B: conídeos; C: fiálides	13
Figura 4 – Fotografias do fungo <i>Penicillium brasilianum</i> . A: meio de cultura CYA; B: meio de cultura MEA.....	14
Figura 5 – Fórmula estrutural de antibacterianos de origem natural	19
Figura 6 – Fórmula estrutural de antibacterianos de origem sintética	20
Figura 7 – Distribuição dos antibióticos de acordo com a sua origem.....	21
Figura 8 – Fragmentos propostos para Pb2 estabelecidos com base nas correlações dos mapas de contornos ¹ HX ¹ H COSY e HMBC.....	58
Figura 9 – Correlações espaciais para Pb2 baseadas no mapa de contornos NOESY.....	62
Figura 10 – Esquema de biossíntese dos meroterpenos pertencentes à classe da austina	63
Figura 11 – Estruturas químicas de meroterpenos isolados de fungos	64
Figura 12 – Estruturas químicas de meroterpenos da classe da austina.....	65
Figura 13 – Comparação entre as estruturas químicas da austina e da dehidroaustina	68
Figura 14 – Estruturas de equilíbrio químico do ácido penicílico. I: Forma lactol; II: Forma ceto-ácida	71
Figura 15 – Fotografias do teste de atividade antibacteriana em placas utilizando discos de papel. A: <i>Staphylococcus aureus</i> ; B: <i>Listeria monocytogenes</i> ; C: <i>Bacillus cereus</i> ; ECr1: extrato do fungo <i>Clonostachys rosea f catenula</i> ; Cr2: ergosterol; CP: cloranfenicol.....	72

Figura 16 – Fotografias do teste de atividade antibacteriana em placas utilizando discos de papel. A: *Escherichia coli*; B: *Listeria monocytogenes*; C: *Staphylococcus aureus*; EPb: extrato do fungo *Penicillium brasilianum*; Pb2: austina; Pb3: dehidroaustina; Pb4: ácido penicílico; CP: cloranfenicol 73

Figura 17 – Cromatoplasmas do teste de atividade anticolinesterásica. A: placa após a eluição; B: placa após a aplicação dos reagentes; C: placa após 2 horas; D: placa após 6,5 horas; Pb1: manitol; EPb: extrato bruto do fungo *Penicillium brasilianum*; Pb2: austina; Pb3: dehidroaustina; Pb4: ácido penicílico; CP: controle positivo (huperzina A) 75

Figura 188 – Gráfico comparativo das massas dos extratos do fungo *Penicillium brasilianum* obtidos em condições diversas77

Figura 19 – Gráficos dos valores de biomassa fúngica e respectivos extratos obtidos na condição inerte no meio de cultura líquido complexo e no caldo de batata dextrosado 77

Figura 190 – Gráficos dos valores de biomassa fúngica e respectivos extratos obtidos na condição com agitação no meio de cultura líquido complexo e no caldo de batata dextrosado 78

LISTA DE ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de etila
BHI	Brain Heart Infusion
^{13}C	Carbono-13
CCD	Cromatografia em camada delgada
CCS	Cromatografia em coluna de sílica
CDCl_3	Clorofórmio
CG	Cromatografia gasosa
cm	Centímetros
cm^{-1}	Centímetro inverso
COSY	Correlation Spectroscopy
CYA	Ágar Czapek Yeast
d	Dupleto
dd	Duplo dupleto
D	Dimensão
dt	Duplo tripleto
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
^1H	Hidrogênio-1
Hz	Hertz
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Coherence
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
J	Constante de acoplamento (em Hertz)
m	Multiplete
MEA	Ágar extrato de malte
MeOH	Metanol
MHz	Megahertz
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
ppm	Partes por milhão
q	Quarteto
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN de ^{13}C	Ressonância Magnética Nuclear de carbono-13
RMN de ^1H	Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio-1

s	Simpleto
sl	Simpleto largo
sp	Espécie
t	Tripleto
UFC	Unidades formadoras de colônia
δ	Deslocamento químico em partes por milhão

RESUMO

Produtos naturais são definidos como metabólitos secundários ou derivados produzidos por organismos em resposta a um estímulo externo como mudanças nutricionais, infecções e competições. Os fungos são conhecidos como produtores de uma grande variedade de metabólitos secundários e, apesar de muitas vezes ser desconhecido o papel dessas substâncias nesses organismos, esses compostos apresentam grande importância na medicina, na indústria e na agricultura. Muitas substâncias produzidas por fungos, ou seus derivados químicos, são utilizadas no tratamento de doenças pelo homem. Como exemplo pode-se citar os antibióticos β -lactâmicos penicilinas e cefalosporinas, os antifúngicos da classe das equinocandinas, as estatinas, substâncias redutoras do colesterol sanguíneo e o imunossupressor ciclosporina A.

Nesse trabalho, foi realizado o estudo de bioprospecção de metabólitos secundários dos fungos filamentosos *Clonostachys rosea f catenulata* e *Penicillium brasilianum*, isolados de solo do cerrado mineiro. Do extrato do fungo *Clonostachys rosea f catenulata* foram isolados uma mistura de triacilgliceróis, o ergosterol e uma mistura de ácidos graxos livres. Já do extrato do fungo *Penicillium brasilianum* foram isolados o poliol manitol, os meroterpenos austina e dehidroaustina e o ácido penicílico.

Os extratos obtidos e as substâncias isoladas foram submetidos aos testes de atividade antibacteriana e anticolinesterásica. Apesar de os extratos terem apresentado atividade antibacteriana, das substâncias puras isoladas, somente o ácido penicílico foi ativo contra os microrganismos testados. Em relação ao teste de atividade anticolinesterásica, o ácido penicílico foi também a única substância ativa.

Com o objetivo de avaliar a melhor condição de obtenção de substâncias com atividade antibacteriana, foi realizado para o fungo *Penicillium brasilianum*, um estudo de variação nutricional e das condições de fermentação. O fungo foi cultivado em três diferentes meios de cultura (meio de cultura líquido complexo, caldo batata dextrosado e arroz) e em duas condições diferentes de cultivo (com e sem agitação). Os extratos obtidos foram submetidos ao teste de atividade antibacteriana, sendo que, entre todas as condições testadas, o cultivo em caldo de batata dextrosado mostrou-se o mais promissor.

ABSTRACT

Natural products are defined as secondary metabolites or derived products, produced by organisms in response to external stimuli such as nutritional changes, infections and competitions. Fungi are well known as producers of a great variety of secondary metabolites. These compounds present great importance in the medicine, industry and agriculture, although the role of these substances in these organisms is not completely known. Substances produced by fungi, or their chemical derivatives, are normally used in the therapeutic by mankind. For example, the β -lactam antibiotics penicillins and cephalosporins, the antifungal compounds of the candins group, the statins, substances that effectively low serum cholesterol levels and the immunosuppressive agent cyclosporin A.

In this work, bioprospection of secondary metabolites of the filamentous fungi *Clonostachys rosea f catenulata* and *Penicillium brasilianum* isolated from the Cerrado soil of Minas Gerais state was studied. From the extract of the fungus *Clonostachys rosea f catenulata* were isolated a mixture of triacylglycerols, ergosterol and a mixture of fatty acids. From the extract of the fungus *Penicillium brasilianum* there were isolated the polyol mannitol, the meroterpens austin and dehidroaustin and penicillic acid.

The extracts and isolated substances were tested for the antibacterial activity and for acetylcholinesterase inhibition. Although the extracts have shown antibacterial activity, from the isolated pure substances, only the penicillic acid was active against the tested microorganisms. Considering the acetylcholinesterase inhibition activity, penicillic acid was also the only active substance.

A study of varying nutritional and fermentation conditions was carried out for the fungus *Penicillium brasilianum* with the objective of evaluating the best condition for producing substances with antibacterial activity. The fungus was grown in three different culture media (complex liquid medium, potato dextrose broth and rice) and in two different conditions of cultivation (with and without agitation). The extracts were tested for the antibacterial activity assay. Among all the conditions tested, the culture in potato dextrose broth revealed the most promising one.

CAPÍTULO 1

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. OS FUNGOS E SUA IMPORTÂNCIA NA DESCOBERTA DE NOVOS FÁRMACOS

Os fungos são classificados como organismos eucariontes, heterotróficos, que se alimentam por absorção de nutrientes de fontes externas (GAMS; HOEKSTRA; APTROOT, 1998). Os fungos constituem-se de um vasto grupo de organismos e estudos relativamente recentes revelaram que o número de espécies fúngicas conhecidas até então era de 72065 (BRIDGE; SPOONER, 2001). Estimativas sugerem que o número de espécies fúngicas diferentes existentes seja de 1,5 milhões, sendo que menos de 5% foram descritas (PINTO et al., 2002), o que implica que mais de um milhão de espécies fúngicas ainda podem ser descobertas. Os fungos podem apresentar-se como espécies unicelulares ou multicelulares formadas por filamentos denominados hifas que podem crescer formando uma massa filamentosa chamada de micélio (BRIDGE; SPOONER, 2001). Esses organismos estão amplamente distribuídos na natureza, podendo ser encontrados em diferentes habitats como, por exemplo, no solo, na água, em regiões tropicais, no Ártico e ainda como parasitas de plantas, peixes, insetos e animais (FEOFILOVA, 2001).

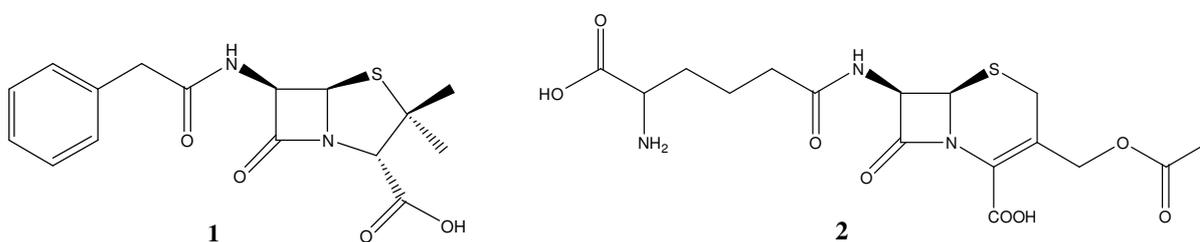
Os fungos são conhecidos como produtores de uma grande variedade de metabólitos secundários e, apesar de muitas vezes ser desconhecido o papel dessas substâncias nesses organismos, esses compostos apresentam grande importância na medicina, na indústria e na agricultura. Metabólitos secundários ou derivados, produzidos por organismos em resposta a um estímulo externo como mudanças nutricionais, infecções e competições, são denominados produtos naturais (STROHL, 2000).

Muitos produtos naturais isolados das mais diversas fontes como, por exemplo, plantas, fungos, bactérias, protozoários, insetos ou animais apresentam-se como produtos biologicamente ativos (STROHL, 2000) e tradicionalmente tem-se constituído como a maior fonte de novos fármacos (VIEGAS Jr.; BOLZANI; BARREIRO, 2006). Atualmente a descoberta de novas substâncias bioativas é baseada, em grande parte, na pesquisa por micromoléculas com habilidade de ativar ou inibir sítios macromoleculares específicos. Nesse contexto, os produtos naturais constituem-se de um grupo de estruturas privilegiadas, selecionadas pela pressão

da evolução para interagir com uma grande variedade de proteínas e outros alvos biológicos com uma finalidade específica. Assim, por apresentarem uma ampla diversidade estrutural e serem extremamente específicas nas suas atividades biológicas (VILLAS BÔAS; GADELHA, 2007), essas substâncias podem tornar-se fármacos efetivos em uma variedade grande de indicações terapêuticas (KOEHN; CARTER, 2005). Segundo Newman; Cragg (2007), cerca de 50% dos fármacos introduzidos no mercado nos últimos 20 anos são derivados direta ou indiretamente de produtos naturais.

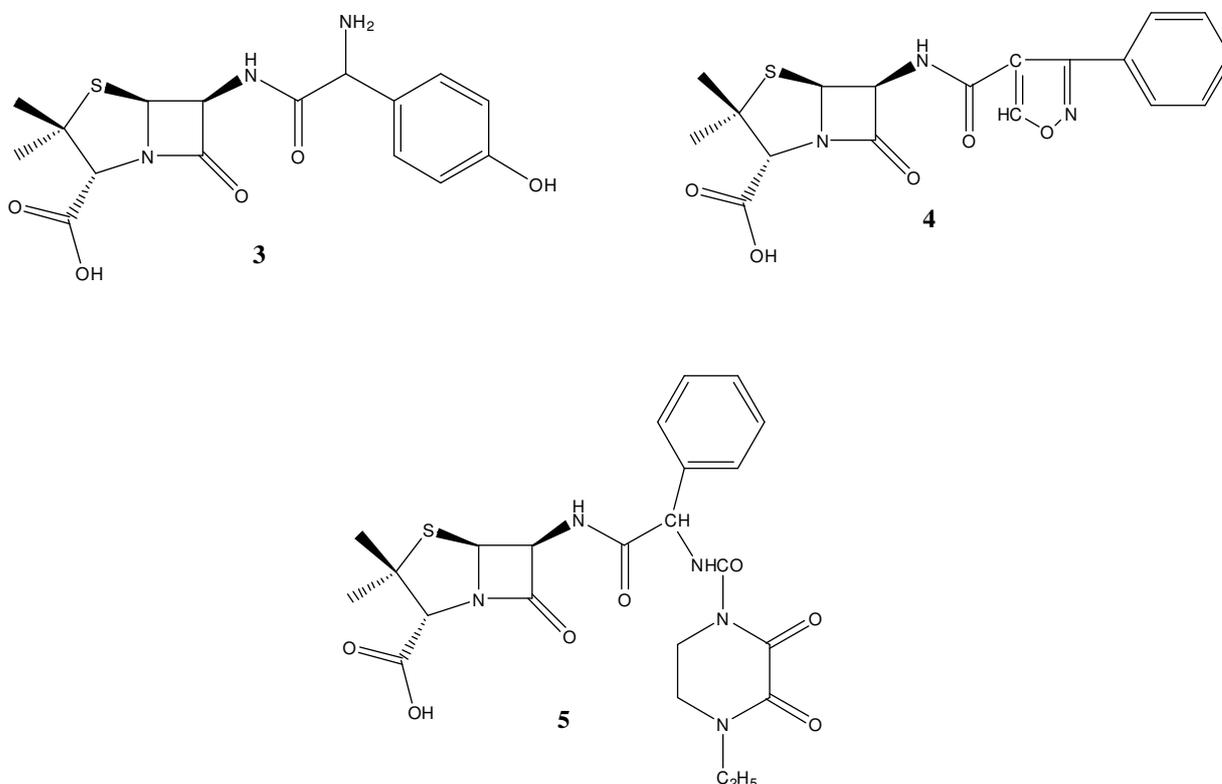
Historicamente, entre todos os organismos estudados, actinomicetos e fungos têm-se apresentado como os organismos mais importantes na produção de metabólitos secundários (GUNATILAKA, 2006). A pesquisa por metabólitos secundários de fungos data de 1870, quando pigmentos sintetizados por cogumelos atraíram a curiosidade de químicos orgânicos (HOFFMEISTER; KELLER, 2007). Entretanto, foi a descoberta ao acaso da penicilina, em 1928 pelo pesquisador Alexander Fleming, que impulsionou a pesquisa por produtos naturais a partir de fungos filamentosos.

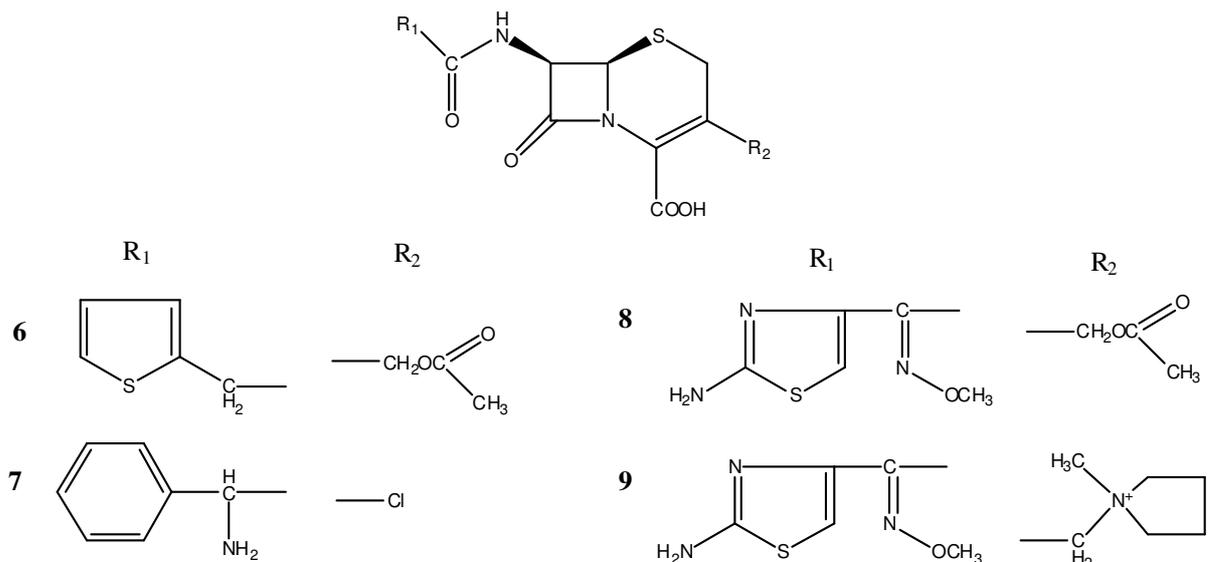
A penicilina G (1), isolada do fungo *Penicillium crysogenum*, foi introduzida no mercado em 1940 como o primeiro fármaco antibacteriano e, devido ao grande sucesso terapêutico, estimulou a pesquisa por novos compostos de origem natural para o tratamento de infecções bacterianas (SINGH; BARRETT, 2006). Em 1955, pesquisadores notaram a presença de outra classe de antibiótico β -lactâmico nos extratos do fungo *Cephalosporium acremonium*, sendo esse novo composto denominado de cefalosporina C (2).



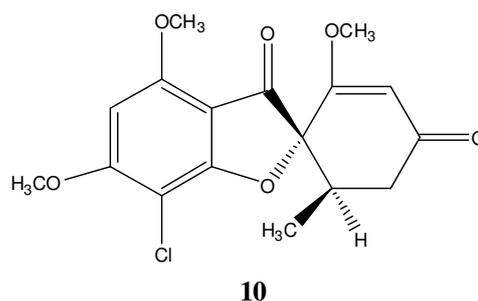
As penicilinas apresentam em sua estrutura básica um anel tiazolidina ligado a um anel β -lactâmico ao qual se liga uma cadeia lateral. O núcleo constitui o principal requisito estrutural para a atividade biológica e a cadeia lateral determina as características antibacterianas e farmacológicas de cada uma das penicilinas. Diferentes tipos de penicilinas podem ser produzidos de acordo com a composição

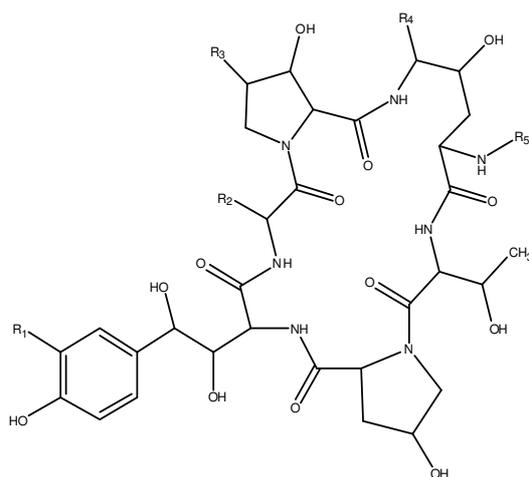
do meio de cultura, da cepa do fungo e das condições de fermentação. As penicilinas também podem ser produzidas utilizando-se o ácido 6-aminopenicilâmico (6-APA) que, através de reações químicas com diferentes cadeias laterais, resultou no desenvolvimento das penicilinas semi-sintéticas com amplo espectro de ação e melhores atividades farmacocinéticas. Como exemplo, pode-se citar a amoxicilina (**3**), com amplo espectro de ação, a oxacilina (**4**), resistente à penicilinase e a piperacilina (**5**), ativa contra *Pseudomonas* (DEMAIN, 1999). As cefalosporinas também possuem na sua estrutura básica um anel β -lactâmico, porém este apresenta-se ligado ao anel diidrotiazina e, devido à presença ácido 7-aminocefalosporânico (7-ACA), as cefalosporinas apresentaram a propriedade de serem mais estáveis às β -lactamases. A desvantagem da cefalosporina C era a sua baixa potência, o que levou ao desenvolvimento de derivados semi-sintéticos mais ativos que são classificados em primeira, segunda, terceira e quarta geração, dependendo do espectro de ação e da resistência à degradação enzimática. Alguns exemplos são a cefalotina (**6**) pertencente à primeira geração, o cefaclor (**7**) pertencente à segunda geração, a cefotaxima (**8**) e a cefepima (**9**), pertencentes à terceira e à quarta gerações, respectivamente (DEMAIN, 1999).





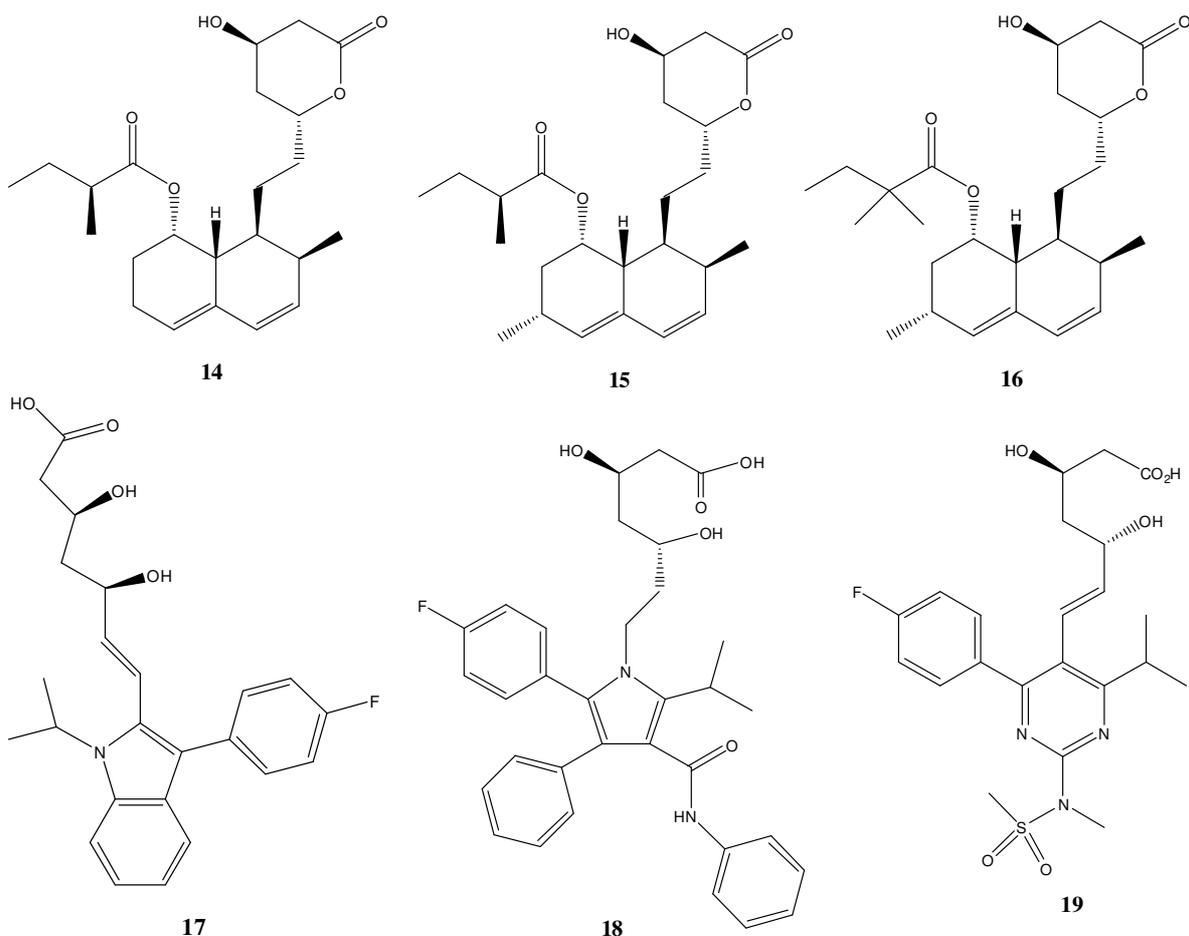
Fungos filamentosos também produzem metabólitos secundários com atividade antifúngica. Um dos metabólitos mais ativos é a griseofulvina (**10**) produzida pelo fungo *Penicillium griseofulvum*. A griseofulvina mostrou-se ativa no tratamento de micoses, fato que levou ao desenvolvimento de um antibiótico de uso oral para o tratamento de doenças micóticas da pele, dos cabelos e das unhas causadas por *Microsporum*, *Trichophyton* ou *Epidermophyton* (MOSS, 2002). Outro exemplo de fármacos com atividade antifúngica derivados de metabólitos secundários de fungos são os antibióticos da classe das equinocandinas como, por exemplo, a caspofungina (**11**) e a micafungina (**12**). Fármacos dessa classe são derivados semi-sintéticos da Pneumocandina B₀ (**13**) que, por sua vez, é um produto de fermentação do fungo *Glarea lozoyensis* (ABRUZZO et al., 2000). Essas substâncias representam uma nova classe de antibióticos que inibem a síntese de β-D-glucano na parede celular do fungo e são utilizadas no tratamento de aspergilose invasiva em pacientes que são intolerantes ou não respondem às terapias convencionais (BOWMAN et al., 2002).



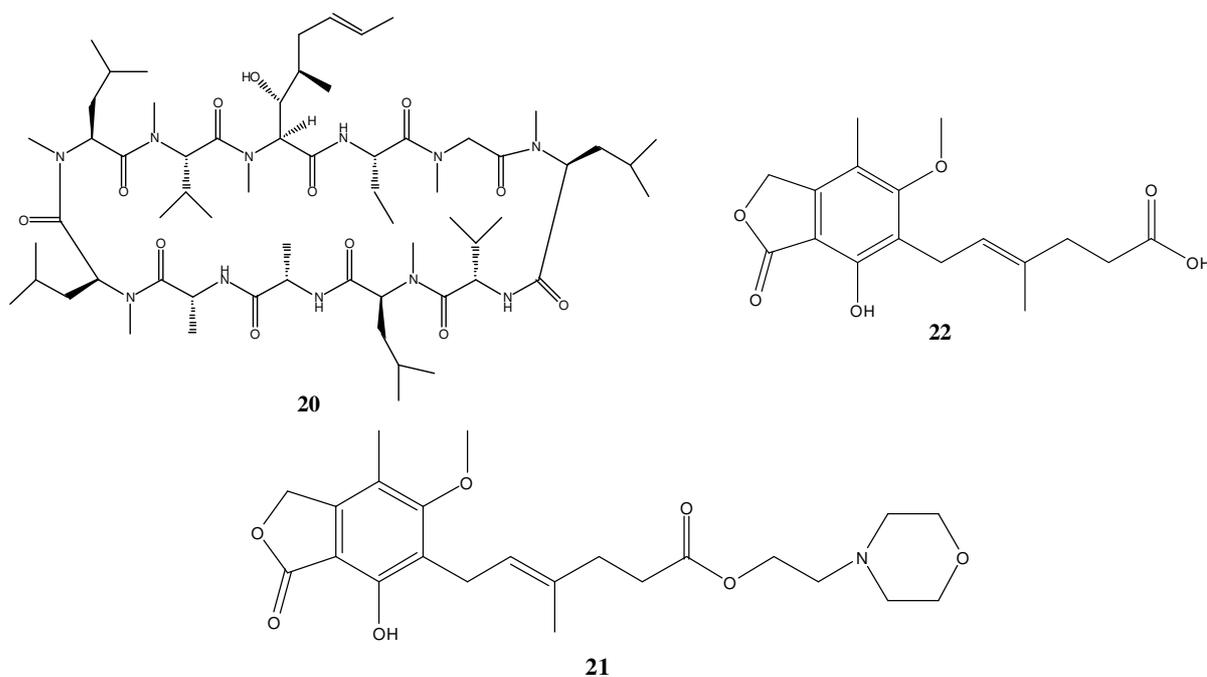


	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
11	H	NH ₂ (CH ₂) ₂ CHOH	H	NH(CH ₂) ₂ NH ₂	
13	H	NH ₂ (CO)CH ₂ CHOH	H	OH	
12	HOSO ₃	NH ₂ (CO)CH ₂ CHOH	CH ₃	OH	

Outro exemplo da contribuição recente de fungos no desenvolvimento de novos fármacos são as estatinas. As estatinas representam uma classe de fármacos que diminuem os níveis sanguíneos de colesterol e são amplamente prescritos para o tratamento da hipercolesterolemia, sendo atualmente os fármacos mais bem tolerados e efetivos para este fim (WEITZ-SCHMIDT, 2002). Estatinas naturais podem ser obtidas de diferentes espécies de fungos filamentosos. A mesvatatina (**14**) foi inicialmente isolada do fungo *Penicillium brevicompactum*, sendo posteriormente obtida do fungo *Penicillium citrinum* (VIEGAS Jr.; BOLZANI; BARREIRO, 2006) e a lovastatina (**15**) é principalmente produzida pelo fungo *Aspergillus terreus* (MANZONI; ROLLINI, 2002). Estudos posteriores de otimização da lovastatina levaram à sinvastatina (**16**), análogo sintético que ingressou no mercado na década de 70 como o primeiro fármaco anticolesterolêmico semi-sintético, atuando como inibidor da enzima HMG-CoA redutase e representando, portanto, autêntica inovação terapêutica para controle do colesterol plasmático (VIEGAS Jr.; BOLZANI; BARREIRO, 2006). Atualmente existem no mercado também estatinas de origem sintética como a fluvastatina (**17**), a atorvastatina (**18**) e a rosuvastatina (**19**) (VIEGAS Jr.; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

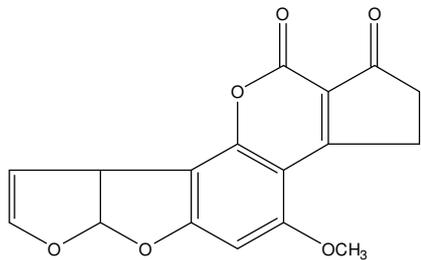


Outra substância obtida como produto de fermentação de fungos com grande relevância como medicamento é a ciclosporina A (**20**). A ciclosporina A é um polipeptídeo cíclico produzido pelo fungo *Tolypocladium inflatum* e é utilizada no tratamento de pacientes submetidos a transplantes de coração, fígado e rins devido à sua atividade imunossupressora associada à inibição da síntese de interleucina 2 (IL-2) (MOSS, 2002). Outro fármaco com atividade imunossupressora introduzido no mercado recentemente é o micofenolato de mofetila (**21**), éster 2-morfolinoetílico do metabólito fúngico ácido micofenólico (**22**). O ácido micofenólico foi isolado em 1896 de culturas do fungo *Penicillium* sp., mas foi somente 1982 que a sua atividade imunossupressora foi reconhecida (ALLISON, 2000). O micofenolato de mofetila é um pró-fármaco que é metabolizado rapidamente em ácido micofenólico. O ácido micofenólico age inibindo a enzima desidrogenase do monofosfato de inosina e, conseqüentemente, a síntese *de novo* de DNA (Ácido desoxirribonucléico) (MOURAD et al., 2001). Esse fármaco é atualmente utilizado em diversos países na profilaxia da rejeição dos transplantes (ALLISON, 2000).

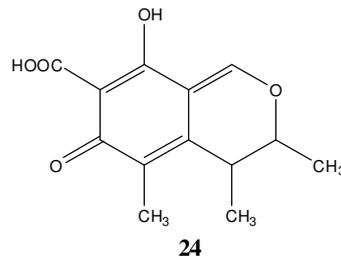


Entretanto, os fungos são responsáveis também pela produção de substâncias altamente tóxicas para os mamíferos conhecidas como micotoxinas, sendo algumas consideradas carcinogênicas potentes (PINTO et al., 2002). Existem cerca de 400 compostos classificados como micotoxinas. Todas as micotoxinas são produtos naturais produzidas como metabólitos secundários por fungos filamentosos e são classificadas em grupos de acordo com suas características químicas e origem biossintética (BENNETT; KLICH, 2003). Exemplos de micotoxinas de grande importância na agroeconomia e na saúde humana incluem as aflatoxinas (**23**), a citrinina (**24**), as ocratoxinas (**25**), as fumosinas (**26**), a patulina (**27**) e os alcalóides do esporão do centeio (alcalóides do ergot) (**28**) (HUSSEIN; BRASEL, 2001; BENNETT; KLICH, 2003). As micotoxinas são produzidas principalmente por espécies de fungos do gênero *Penicillium*, *Aspergillus* e *Fusarium*.

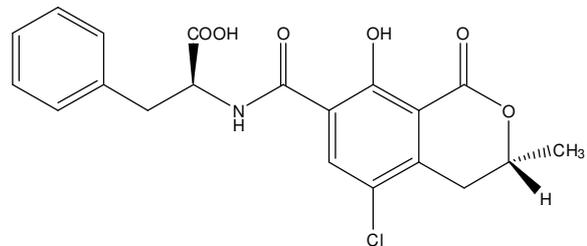
A doença causada pela exposição às micotoxinas é conhecida como micotoxicose. As micotoxicoses podem ser classificadas em crônicas ou agudas e os sintomas dependem do tipo de micotoxina, da duração da exposição, da idade, da saúde e do sexo do indivíduo (BENNETT; KLICH, 2003). Essas substâncias são encontradas principalmente em grãos e cereais e podem ser produzidas por fungos saprófitas durante a estocagem desses alimentos ou por fungos endófitos durante o crescimento do vegetal (HUSSEIN; BRASEL, 2001). Segundo Hussein; Brasel (2001), as micotoxinas são responsáveis por milhões de dólares anuais em gastos com saúde humana, saúde animal e produtos agrícolas em todo o mundo.



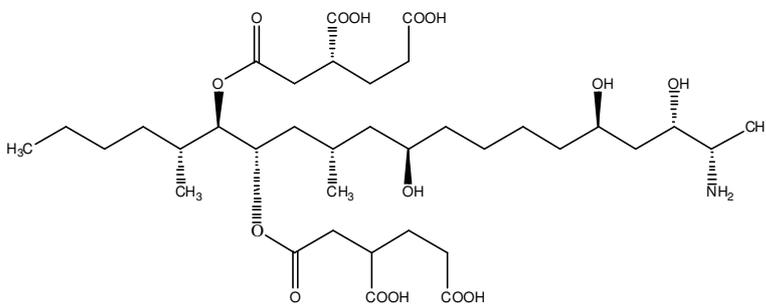
23 Aflatoxina B1



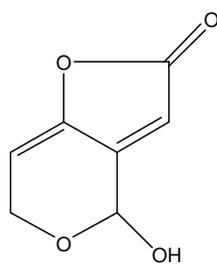
24



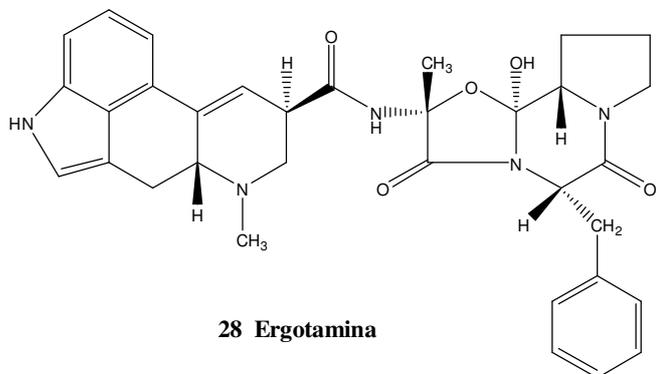
25 Ochratoxina A



26 Fumonisina B1

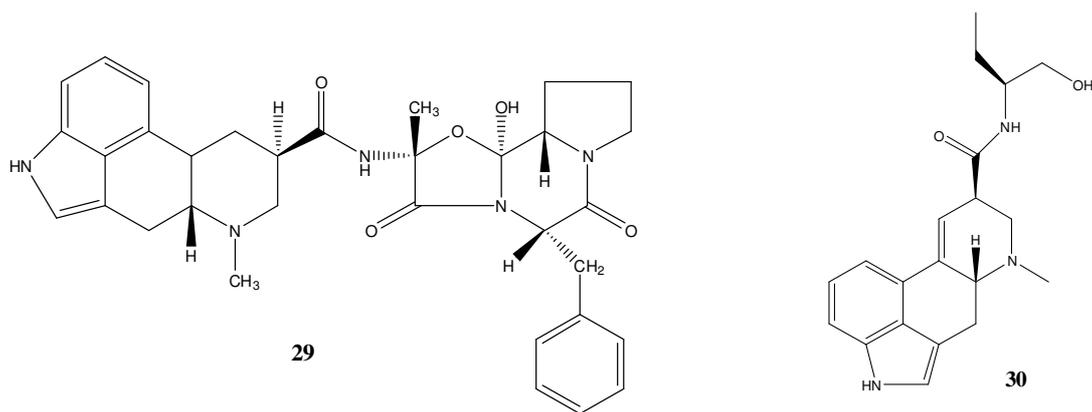


27



28 Ergotamina

Apesar da toxicidade apresentada por essas substâncias, algumas micotoxinas possuem propriedades farmacológicas valiosas e são utilizadas pelo homem na medicina. Como exemplos podem-se citar a diidroergotamina (**29**) e metilergonovina (**30**). A observação de que os alcalóides do esporão do centeio, produzidos pelo fungo *Claviceps purpurea*, induziam contrações da musculatura lisa levou ao desenvolvimento desses derivados semi-sintéticos utilizados no tratamento da enxaqueca e no controle de hemorragias pós-parto, respectivamente (MOSS, 2002).



1.2. O FUNGO *CLONOSTACHYS ROSEA F CATENULATA*

O fungo *Clonostachys rosea f catenula* é uma espécie de fungo filamentososo pertencente ao filo Ascomycota e ao gênero *Clonostachys* (SCHROERS, 2001). Essa espécie foi, durante muitos anos, denominada como *Gliocladium catenulatum*, sendo a nova denominação adotada a partir de 1999 (SCHROERS et al., 1999). Macroscopicamente apresenta-se como colônias brancas pulverulentas que se tornam escuras devido à formação de esporos de coloração verde-escura (WONG et al., 1993), conforme apresentado na **Figura 1**. O fungo é considerado anomorfo de *Bionectria*, isto é, apresenta somente a fase assexuada de reprodução que é caracterizada pela formação de conídios a partir dos conidióforos. A **Figura 2** apresenta microfotografias do fungo *Clonostachys rosea f catenulata* que é caracterizado pela formação de dois diferentes tipos de conidióforos, denominados de conidióforos primário (verticilado) e secundário (penicilado).

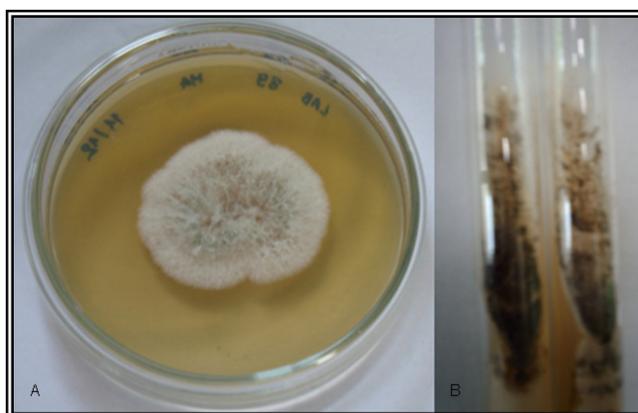


Figura 20 – Fotografias do fungo *Clonostachys rosea f catenulata* em ágar malte. A: colônia jovem em placa de Petri; B: colônia adulta com esporos em tubo de ensaio.

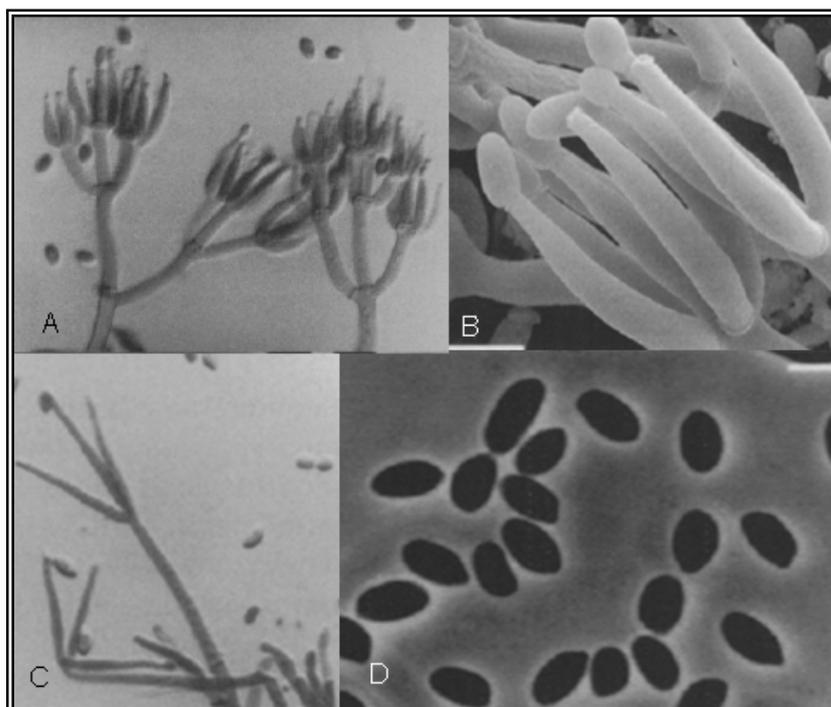
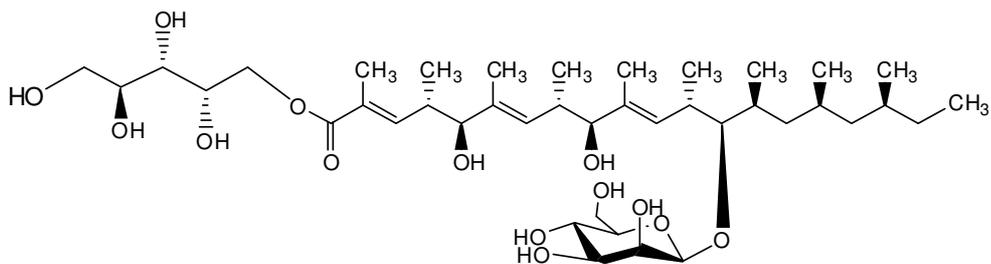


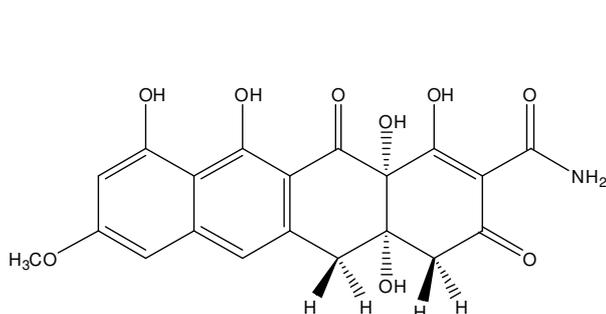
Figura 21 – Microfotografias do fungo *Clonostachys rosea f. catenulata*. A: conidióforos secundários; B: fiálide de conidiósporos secundários; C: conidióforos primários; D: conídios de conidióforos secundários.
 Fonte: OKUDA et al., 2000.

Fungos do gênero *Clonostachys* são comumente utilizados como agentes de biocontrole contra fungos patogênicos de plantas (PUNJA; UTKHEDE, 2003). O fungo *Clonostachys rosea f. catenulata* é comercializado atualmente nas formulações Prestop WP e Prestop Mix (CHATTERTON; JAYARAMAN; PUNJA, 2008). O modo de ação desses fungos no controle de patógenos e doenças ainda não é totalmente conhecido e alguns autores acreditam que essa ação ocorra através da interação de diferentes fatores como a produção de enzimas hidrolíticas e de metabólitos com atividade antibiótica, a competição por nutrientes e substratos, a indução de mecanismos de defesa pelo hospedeiro e por parasitismo do patógeno (PUNJA; UTKHEDE, 2003).

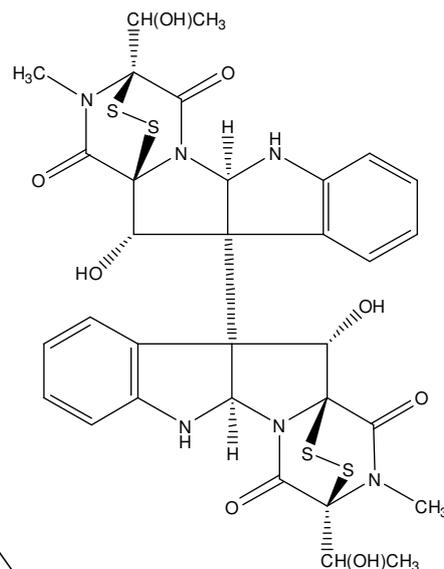
Diferentes classes de metabólitos secundários já foram isoladas dessa espécie. Kohno et al. (1999) relataram o isolamento de antibióticos policetídeos TMC-151 A – F (31) que também apresentou atividade contra algumas linhagens de células tumorais. Em 1993, Wong et al. relataram o isolamento de antrotainina (32), substância pertencente à classe das tetraciclinas com atividade inibidora da Substância P e, em 1999, Joshi; Gloer; Wicklow isolaram novas substâncias com atividade antibacteriana denominadas verticinas D, E e F (33) e também um politerpenóide denominado glisoprenina F (34).



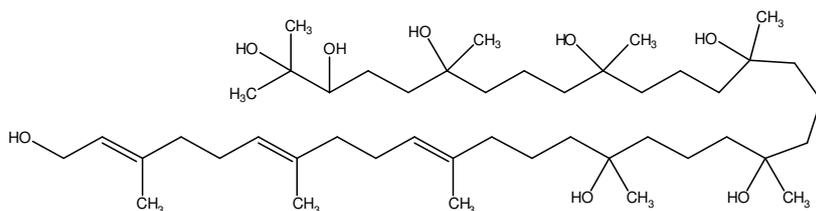
31 TCM-151 D



32



33 Verticina D



34

1.3. O FUNGO *PENICILLIUM BRASILIANUM*

O fungo *Penicillium brasilianum* Batista é uma espécie de fungo filamentosso pertencente ao filo Ascomycota e ao gênero *Penicillium*. O gênero *Penicillium*, de distribuição cosmopolita, compreende mais de 225 espécies predominantes em alimentos, no solo e no ar, sendo encontrado inclusive em ambientes polares (SONJAK; FRISVAD; GUNDE-CIMERMAN, 2006). Espécies desse gênero apresentam grande diversidade em relação à morfologia e aos metabólitos secundários produzidos. A **Figura 3** apresenta microfotografias de conidióforos, fiáldes e conídios característicos de espécies pertencentes ao gênero *Penicillium*.

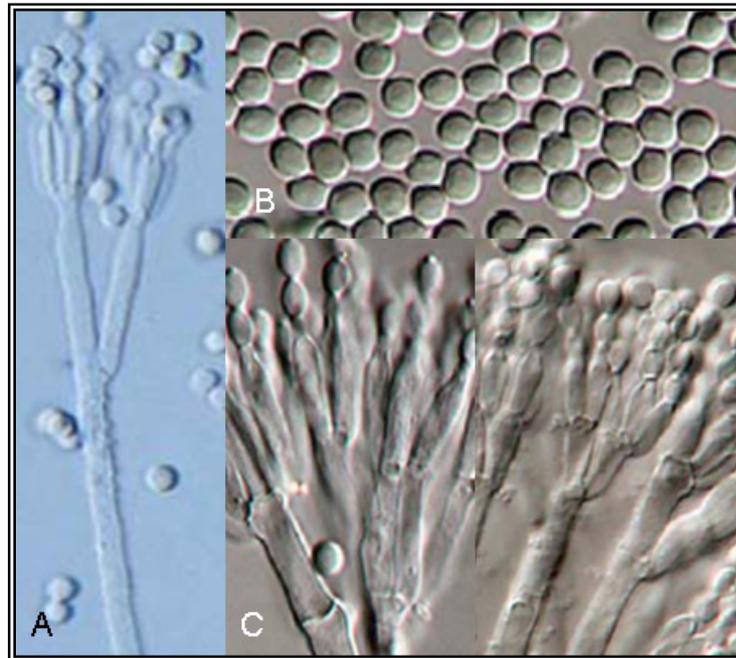


Figura 22 – Microfotografias de fungos do gênero *Penicillium*. A: conidióforos; B: conídeos; C: fiálides.

Fonte: FRISVAD; SAMSON, 2000; SONJAK et al., 2007.

O fungo *Penicillium brasilianum* é comumente isolado de amostras de solo (TUTHILL; FRISVAD; CHRISTENSEN, 2001), sendo também relatado seu isolamento de amostras coletadas na região do Ártico (SONJAK; FRISVAD; GUNDE–CIMERMAN, 2006). A **Figura 4** apresenta fotografias do fungo *Penicillium brasilianum* em diferentes meios de culturas utilizados na identificação da espécie. Algumas espécies do gênero *Penicillium*, incluindo a espécie *Penicillium brasilianum*, foram, durante anos, erroneamente classificadas como *Penicillium simplicissimum*. Entretanto, Tuthill; Frisvad; Christensen (2001), após análise morfológica, na seqüência de DNA e dos metabólitos secundários, concluíram que as duas espécies devem ser consideradas como distintas.

Diferentes espécies do gênero *Penicillium* produzem diversas micotoxinas e metabólitos secundários que são específicos para cada espécie e, normalmente, são utilizados nos estudos de identificação e classificação das mesmas (SONJAK et al., 2007). Considerando o fungo *Penicillium brasilianum*, o perfil de metabólitos secundários produzidos inclui as seguintes substâncias: ácido penicílico (**35**), paraherquamidas (**36**), viridicatumtoxina (**37**), verrucologen (**38**) e fumitremorgina A e B (**39**) (TUTHIL; FRISVAD; CHRISTENSEN, 2001; SONJAK; FRISVAD; GUNDE–CIMERMAN, 2006).

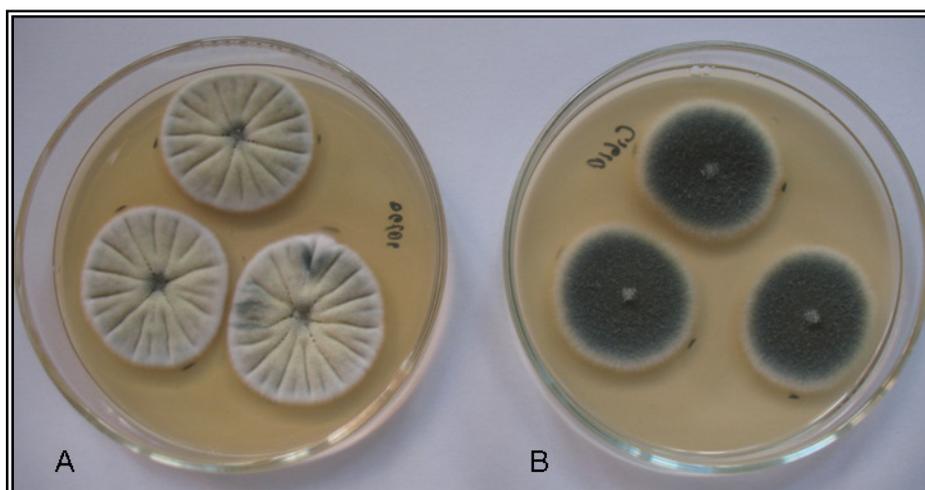
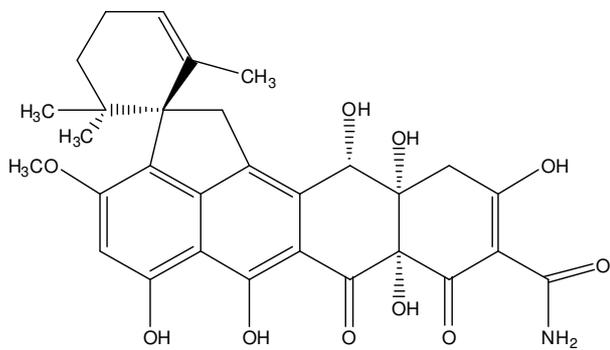


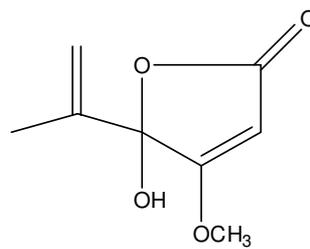
Figura 23 – Fotografias do fungo *Penicillium brasiliense*. A: meio de cultura CYA; B: meio de cultura MEA.

O ácido penicílico (**35**) apresenta atividade antibacteriana, antiviral, antitumoral, citotóxica, carcinogênica e antifúngica (FRISVAD et al., 2004; KANG; KIM, 2004). As paraherquamidas (**36**) apresentam atividade antiparasitária e inseticida (STOCKING et al., 2001; LÓPEZ-GRESA et al., 2006; BLANCHFLOWER et al., 1991). Verrucologen (**38**) e as fumitremorginas (**39**) apresentam atividade citotóxica *in vitro* contra células tumorais do carcinoma de Ehrlich (AFIYATULLOV et al., 2004). São ainda relatadas para a fumitremorgina A (**39**), atividades convulsiva e hipertensa, bradicardia e arritmia em um estudo realizado em coelhos (NISHIYAMA; KUGA, 1986).

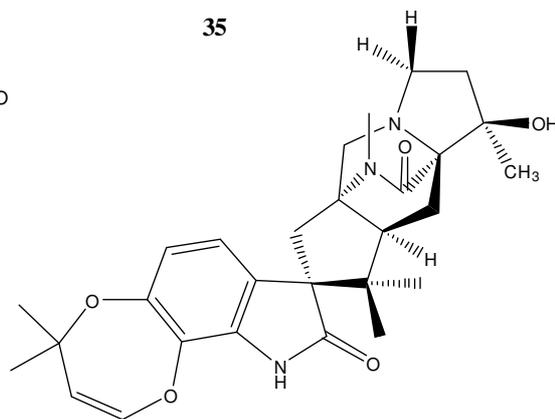
Recentemente, foi relatado o isolamento de novas substâncias dessa espécie denominadas brasiliamidas A e B (**40**) (FUJITA et al., 2002) e brasiliamidas C, D e E (**41**) (FUJITA; HAYASHI, 2004). Essas substâncias, classificadas como micotoxinas tremorgênicas, foram isoladas a partir da fermentação do fungo em okara e apresentam atividade convulsiva contra larvas do bicho-da-seda (FUJITA et al., 2002; FUJITA; HAYASHI, 2004).



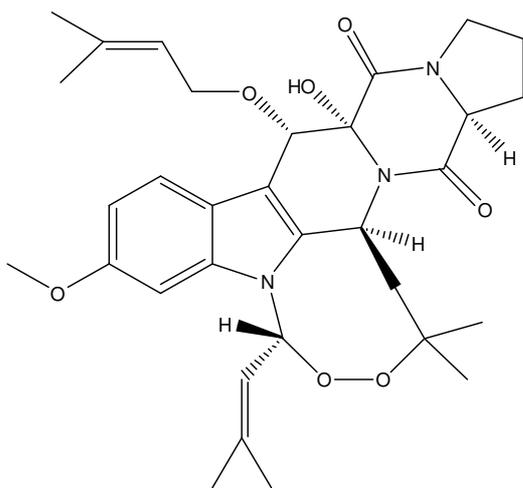
37



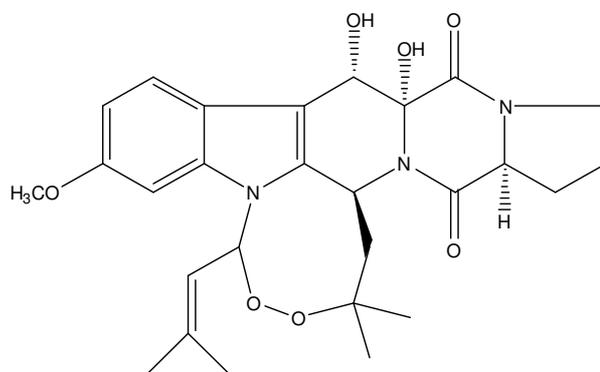
35



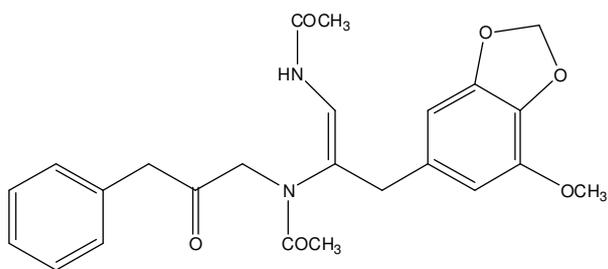
36 Paraherquamida A



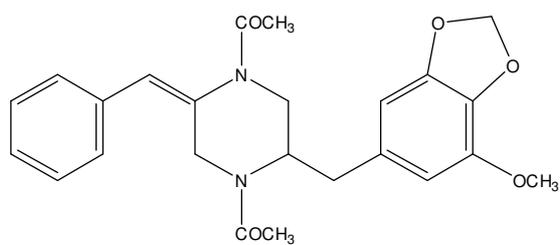
39 Fumitremorgina A



38



40 Brasiliamida A



41 Brasiliamida C

1.4. ORIGEM DOS FUNGOS ESTUDADOS

As espécies fúngicas estudadas foram obtidas a partir de uma coleta de amostras de solo e material vegetal realizada por alguns integrantes do Laboratório de Biotecnologia e Bioensaios do Departamento de Química da UFMG no Parque Nacional da Serra do Cipó (MG). Desse trabalho foram isoladas cerca de 150 espécies de fungos que são mantidas na Coleção Micológica do Laboratório de Biotecnologia – Departamento de Química (UFMG). Os fungos *Clonostachys rosea f catenulata* e *Penicillium brasilianum*, escolhidos para o estudo, foram identificados pelo aluno de doutorado Lucas Magalhães de Abreu (TAKAHASHI et al., 2008).

Os fungos podem ser classificados de acordo com o local no qual são isolados e também com relação que mantém com o seu hospedeiro. Dessa maneira os fungos podem ser classificados como endófitos, fitopatogênicos, rizosféricos, leveduriformes, de solo e isolados de organismos marinhos (TAKAHASHI; LUCAS, 2008).

Segundo Daniel (2004), o solo constitui-se em um complexo habitat que pode conter mais que 10 bilhões de microrganismos pertencentes a milhares de espécies. Sendo assim, a diversidade genética do metagenoma do solo é uma fonte rica e inexplorada de novas enzimas e compostos bioativos. Microrganismos isolados de solo são a fonte mais comum de antibióticos e outros agentes medicinais quando comparado com qualquer outra fonte de organismos. Mas, apesar de muito familiar e utilizado, o solo é um dos habitats menos conhecidos da Terra (HANDELSMAN et al., 1998).

O solo de cerrado, devido à sua composição mineral e aos longos períodos de escassez de chuvas, apresenta-se como um habitat inóspito para a sobrevivência de microrganismos. Sendo assim, os microrganismos isolados de solo do cerrado podem desenvolver uma biossíntese modificada quando comparados com outros da mesma espécie isolados de diferentes fontes.

Segundo Myers et al. (2000), o Brasil é considerado um dos países com maior biodiversidade do mundo, com grande número de espécies vegetais e animais. Nesse contexto, duas extensas áreas de importante biodiversidade se destacam: a mata atlântica, na região costeira e o cerrado, na região central do país (BASSO et al., 2005). Em relação ao cerrado, estima-se que existam 160.000 espécies de plantas, animais e fungos, sendo a maioria endêmica a esse bioma (QUIRINO et al., 2009).

O cerrado ocupava originalmente 23% do território nacional (dois milhões de km²), estando localizado basicamente no Planalto Central Brasileiro. É considerado o mais brasileiro dos biomas sul-americanos, pois, excetuando-se algumas pequenas áreas na Bolívia e no Paraguai, ele está totalmente inserido no território nacional (NETO; MORAIS, 2003). É caracterizado pela vegetação rasteira quase contínua, interrompida por arbustos e árvores em proporções variáveis, no qual o principal padrão de crescimento está estreitamente associado à alternância sazonal de verões úmidos e invernos secos (CASTRO et al., 2008). O cerrado é apontado como grande detentor de diversidade biológica, apresentando uma enorme variedade de animais, plantas e microrganismos, fato que coloca o Brasil em uma posição estratégica para o desenvolvimento racional e sustentável de novos metabólitos de valor terapêutico (BASSO et al., 2005).

Apesar da sua importância, o bioma do cerrado tem sido o foco de poucos estudos sobre a sua diversidade biológica e pouca informação é disponível sobre a contribuição da diversidade microbiana fúngica no funcionamento do ecossistema do solo (CASTRO et al., 2008). O desconhecimento de sua riqueza e possibilidades se agrava quando estudos mostram que cerca de 40% do bioma já tenha sido devastado e o cerrado possua somente 1,5% de sua extensão protegida por lei, sendo atualmente a vegetação em maior risco no país (NETO; MORAIS, 2003). Nos últimos 35 anos, grande parte da expansão original do cerrado foi tomada pela agricultura e, se, a atual taxa de perda se mantiver, o ecossistema estará totalmente perdido em 2030 (MARRIS, 2005).

Considerando os dados mencionados acima e a grande biodiversidade presente no País, torna-se necessária a realização de estudos que relatem a diversidade biológica e química dos biomas brasileiros além da conscientização, por parte da população brasileira, da necessidade de preservação desses ecossistemas.

1.5. FÁRMACOS ANTIBACTERIANOS

Infecções bacterianas correspondem à segunda causa de mortes em todo o mundo e a terceira causa de morte nos países desenvolvidos (PROJAN, 2003). O microrganismo *Staphylococcus aureus* é a maior causa de infecções hospitalares e tem se tornado de difícil tratamento devido ao aumento da resistência aos antibióticos (BROWN; WRIGHT, 2005). Segundo Couto et al. (2001), infecção é a principal causa de mortalidade em pacientes submetidos a transplantes cardíacos, mesmo com a utilização de modernos antimicrobianos.

Antibióticos são definidos como substâncias produzidas por diversas espécies de microrganismos (bactérias, fungos e actinomicetos) que possuem a capacidade de inibir o crescimento de outros microrganismos ou mesmo destruí-los em soluções diluídas. Atualmente, o conceito de antibiótico foi expandido para se tornar mais inclusivo, pois diversas substâncias de origem sintética como, por exemplo, as sulfonamidas (**42**) e as quinolonas (**43**), derivados miméticos de produtos naturais, além de metabólitos secundários de plantas têm apresentado atividade antimicrobiana (TAKAHASHI; LUCAS, 2008). Os antibióticos podem ser classificados de acordo com a estrutura química e o mecanismo de ação (HARDMAN; LIMBIRD, 2003).

Considerando o mecanismo de ação, os fármacos antibacterianos podem ser classificados nas seguintes categorias (HARDMAN; LIMBIRD, 2003):

- Fármacos inibidores da síntese da parede celular bacteriana: antibióticos β -lactâmicos (penicilinas **1**, cefalosporinas **2** e carbapenéns **44**) e vancomicina (**45**);
- Fármacos que afetam a função das subunidades ribossômicas 30S e 50S, causando inibição reversível da síntese de proteínas: cloranfenicol (**46**), tetraciclina (**47**) e eritromicina (**48**);
- Fármacos que se ligam à subunidade ribossômica 30S, levando à morte celular: aminoglicosídeos (estreptomicina **49**);
- Fármacos que afetam o metabolismo dos ácidos nucleicos: quinolonas (**43**);
- Fármacos antimetabólitos que bloqueiam enzimas essenciais no metabolismo do folato: trimetoprim e sulfonamidas (**42**).

De acordo com a origem, os antibacterianos podem ser classificados como de origem natural e de origem sintética. As principais classes de antibacterianos de origem natural são: antibióticos β -lactâmicos (penicilinas **1**, cefalosporinas **2** e carbapenéns **44**), fenilpropanóides (cloranfenicol **46**), poliketóides (tetraciclina **47**), aminoglicosídeos (estreptomicina **49**), macrolídeos (eritromicina **48**) e glicopeptídeos (vancomicina **45**). Em relação aos antibióticos de origem sintética, as principais classes são: sulfonamidas (**42**), quinolonas (**43**) e oxazolidinona (linezolida **50**) (SINGH; BARRETT, 2006).

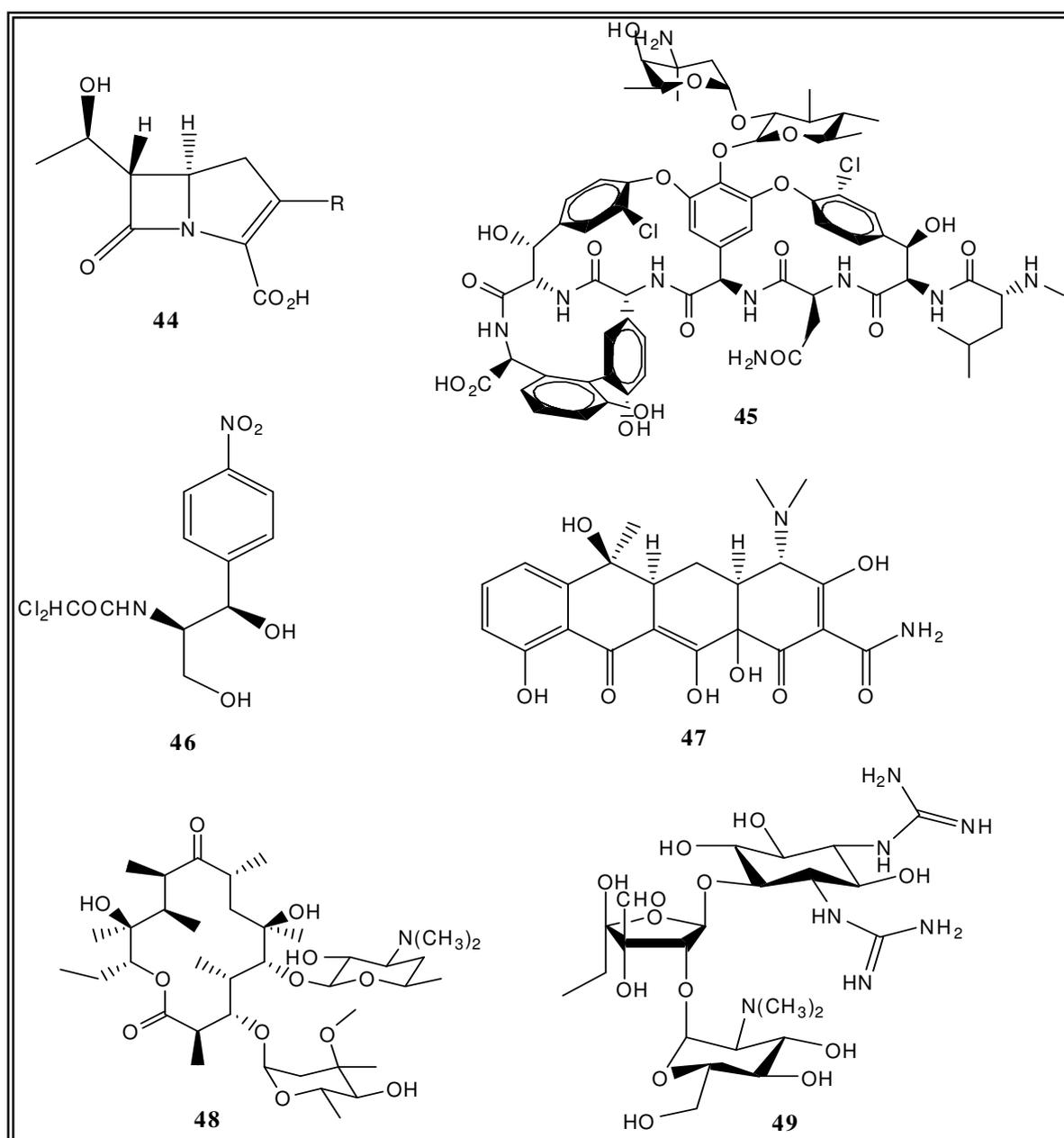


Figura 24 – Fórmula estrutural de antibacterianos de origem natural.

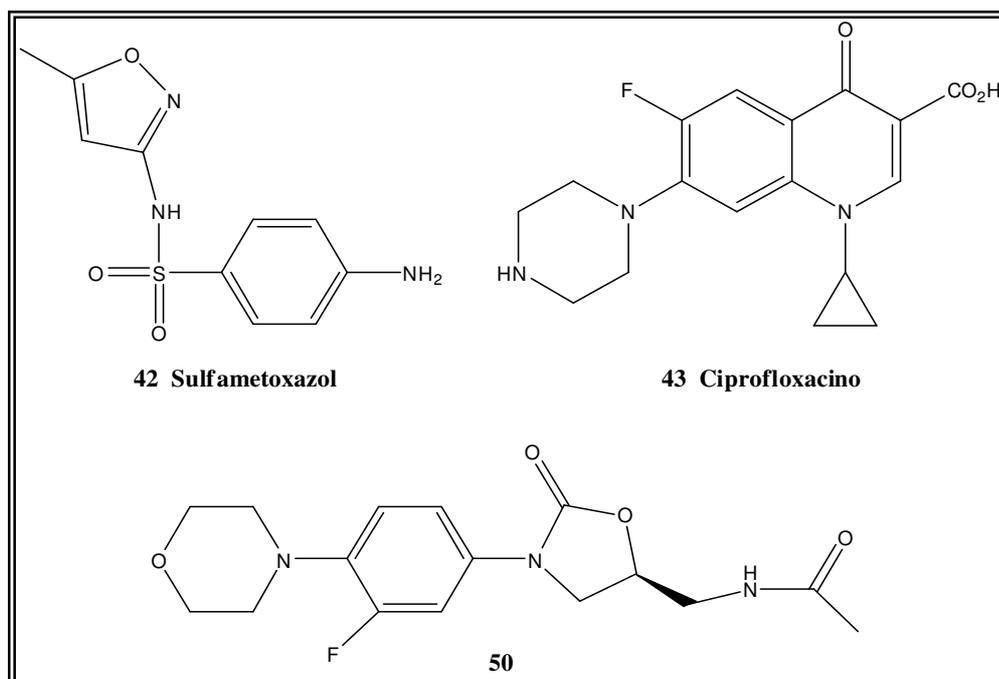


Figura 25 – Fórmula estrutural de antibacterianos de origem sintética.

Segundo Brown; Wright (2005), os fármacos existentes para o tratamento de doenças infecciosas são insuficientes para protegerem a população por um longo período de tempo devido à resistência microbiana e às novas infecções emergentes como, por exemplo, a AIDS (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida), a febre hemorrágica de Ebola, a Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG) e a gripe aviária que causaram grande impacto sobre a saúde humana e animal, bem como sobre a economia internacional. O fenômeno da resistência bacteriana a diversos antibióticos impõe sérias limitações às opções para o tratamento de infecções bacterianas, representando uma ameaça para a saúde pública (SILVEIRA et al., 2006).

A bioprospecção de produtos naturais, inclusive fúngicos, é uma poderosa aliada no processo de descoberta de novos antibióticos (TAKAHASHI; LUCAS, 2008). Segundo Newman; Cragg (2007) entre fármacos antibacterianos aprovados para o tratamento de infecções em humanos no período de 1981–2006, 81% correspondem a produtos naturais e derivados.

Segundo Bérdy (2005), as principais fontes de antibióticos são os streptomicetos, os actinomicetos raros, os fungos e as bactérias. As bactérias são responsáveis pela produção de 17% dos metabólitos microbianos conhecidos, enquanto que espécies pertencentes à ordem actinomycetales produzem mais de

10000 compostos bioativos, sendo 7600 produzidos por estreptomicetos e 2500 produzidos pelos chamados actinomicetos raros, representando o maior grupo produtor de metabólitos microbianos (45%). Em relação aos fungos, espécies pertencentes à classe dos ascomicetos são as mais significativas. O número de produtos fúngicos bioativos conhecidos é cerca de 8600 (38% de todos os produtos microbianos), sendo observado um aumento no número de antibióticos produzidos por esses microrganismos nos últimos anos, conforme pode-se observar na **Figura 7**.

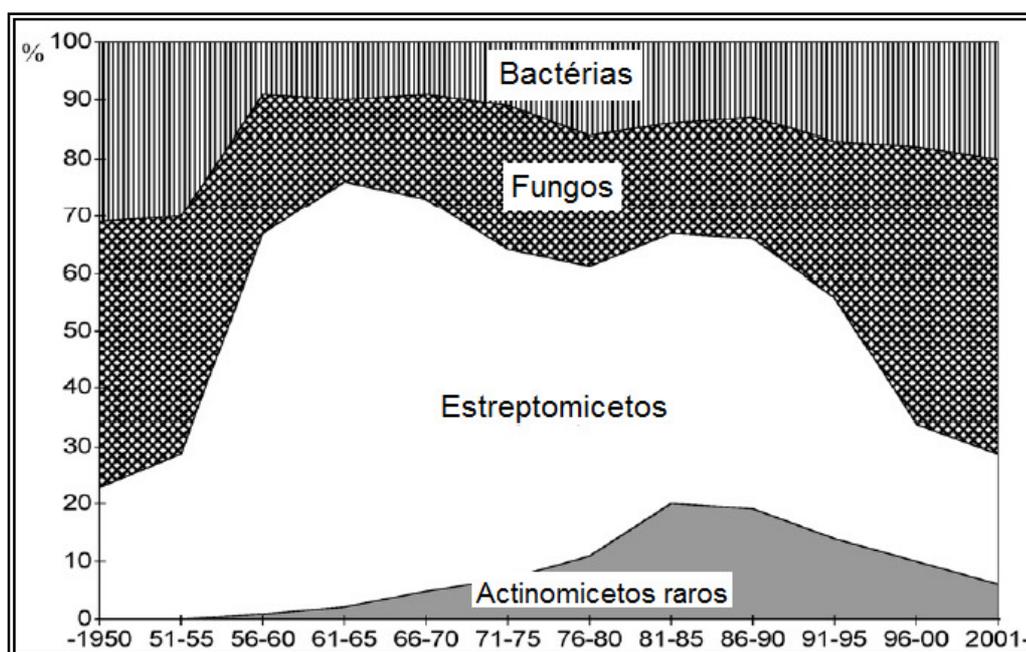


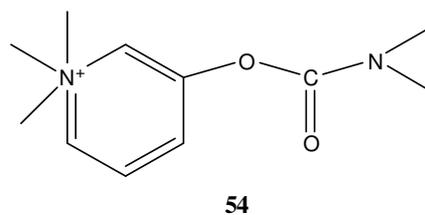
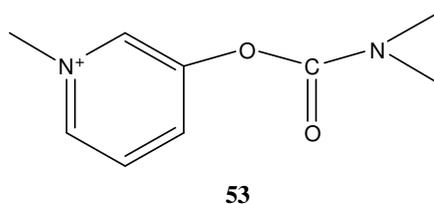
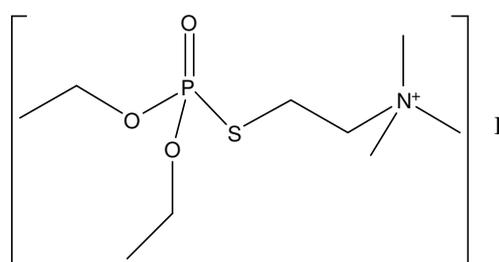
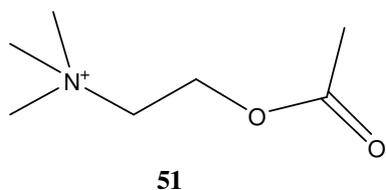
Figura 26 – Distribuição dos antibióticos de acordo com a sua origem.
Fonte: BÉRDY, 2005.

Segundo Bérdy (2005), o aumento no número de substâncias com atividade antibacteriana nos últimos anos não significou uma melhora na qualidade do tratamento dessas infecções, sendo necessária a descoberta de novas substâncias pertencentes a classes químicas diferentes e que apresentem novos mecanismos de ação. Além disso, o descobrimento de novos antibióticos potentes e mais seguros representa não apenas o avanço para uma melhor qualidade de vida, mas também a participação em um mercado em crescimento que movimenta cerca de 25 bilhões de dólares (SILVEIRA et al., 2006).

1.6. FÁRMACOS ANTICOLINESTARÁSICOS

A acetilcolina (**51**) é o neurotransmissor endógeno das sinapses e junções neuroefetoras colinérgicas dos sistemas nervosos central e periférico. A enzima acetilcolinesterase (AChE) catalisa a hidrólise da ligação éster da acetilcolina (ACh) e, dessa maneira, bloqueia a transmissão do impulso nervoso mediado pela acetilcolina através da sinapse colinérgica (HARDMAN; LIMBIRD, 2003).

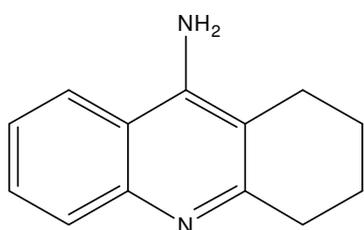
Os fármacos que inibem a acetilcolinesterase são denominados agentes anticolinesterásicos (anti-ChE). Esses fármacos determinam o acúmulo de acetilcolina nas proximidades das terminações nervosas colinérgicas e, assim, são potencialmente capazes de exercer efeitos equivalentes à estimulação excessiva dos receptores colinérgicos nos sistemas nervosos central e periférico (HARDMAN; LIMBIRD, 2003). Inibidores da enzima acetilcolinesterase são utilizados no tratamento do glaucoma, como por exemplo, o ecotiofato (iodeto de dietoxifosfiniltiocolina **52**) e da miastenia gravis, como por exemplo, a piridostigmina (**53**) e a neostigmina (**54**) (HARDMAN; LIMBIRD, 2003). Já os inibidores da acetilcolinesterase que atravessam a barreira hematoencefálica apresentam cerca de 50% de eficácia no tratamento dos sintomas da doença de Alzheimer (HARDMAN; LIMBIRD, 2003).



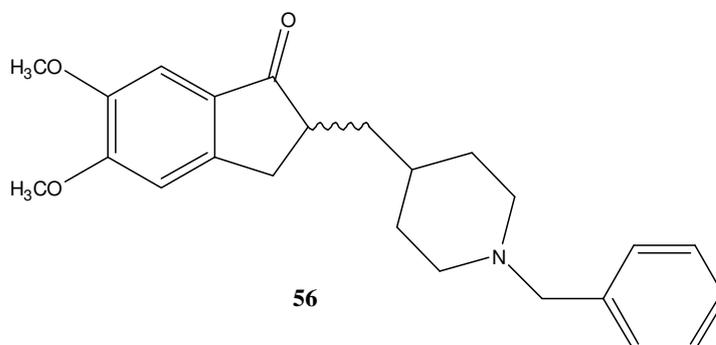
A doença de Alzheimer é uma doença neurodegenerativa, progressiva, cujos principais sintomas incluem perda de memória, déficit na linguagem, depressão, problemas de comportamento, alterações de humor e psicose (BARBOSA-FILHO et al., 2006). Doença de Alzheimer constitui-se em uma das formas mais comuns de demência, afetando aproximadamente 10% da população mundial acima de 65 anos (RACCHI et al., 2004).

Neuroquimicamente, a doença de Alzheimer é caracterizada por um déficit consistente na neurotransmissão colinérgica (RACCHI et al., 2004). Dessa maneira, a acetilcolinesterase apresenta um papel crítico nessa patologia e a terapia de reposição com agentes colinomiméticos parecem melhorar os déficits cognitivos e de memória, característicos da doença (LISTON, 2004).

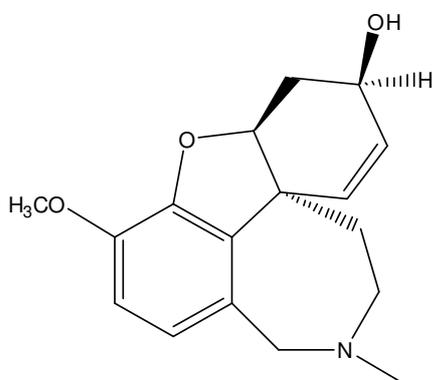
O primeiro agente anticolinesterásico introduzido no mercado para o tratamento da doença de Alzheimer foi a tacrina (**55**) em 1993. Em seguida, outros inibidores da acetilcolinesterase como donezepil (**56**), galantamina (**57**) e rivastigmina (**58**) foram aprovados para o tratamento sintomático de pacientes com doença de Alzheimer média a moderada (RACCHI et al., 2004).



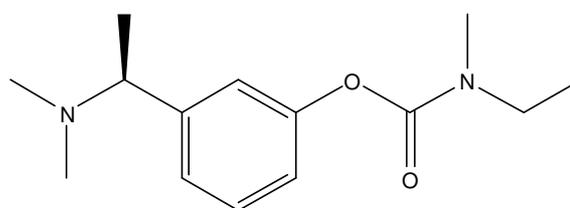
55



56

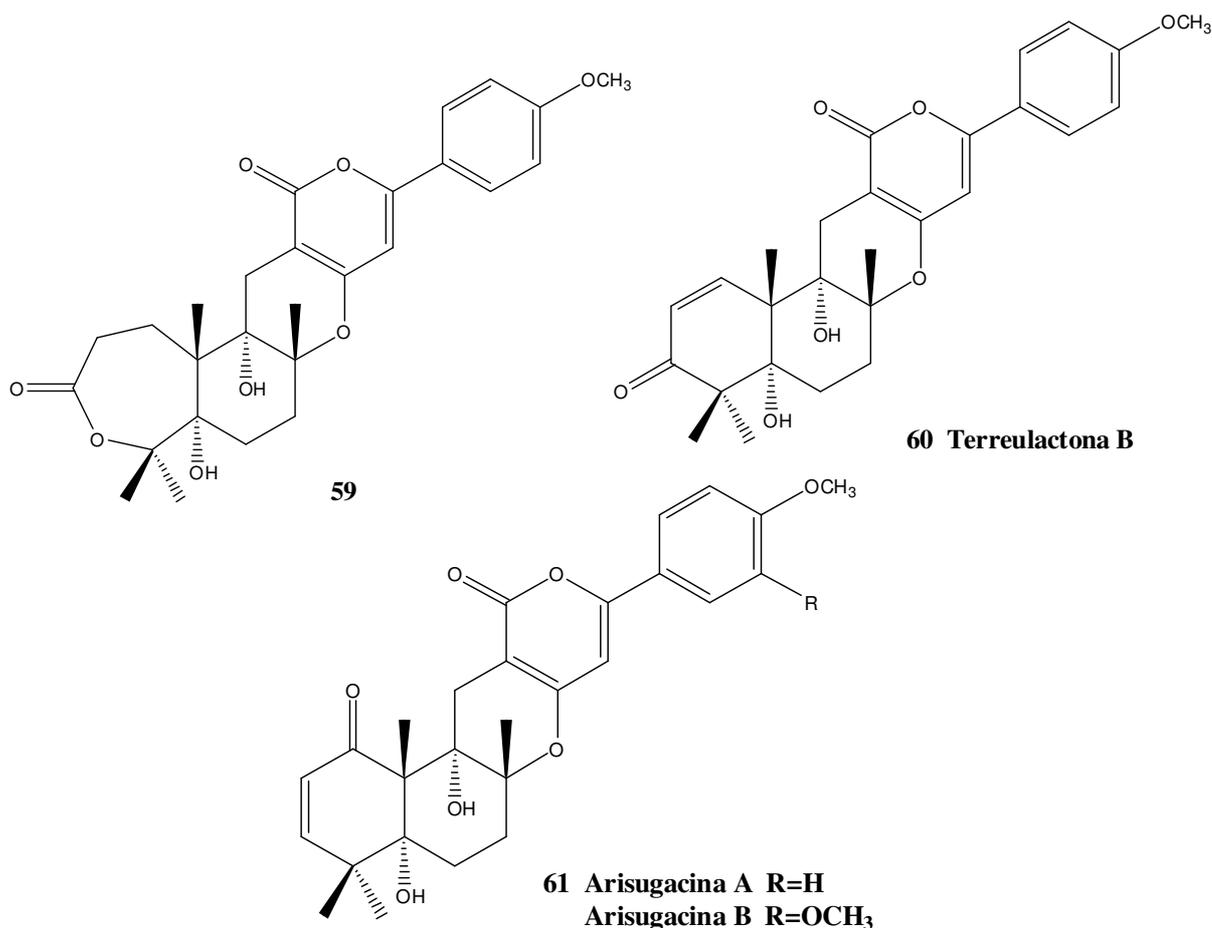


57



58

Diversas substâncias pertencentes a diferentes classes de produtos naturais apresentam a capacidade de inibir a enzima acetilcolinesterase. Em relação a compostos isolados de fungos, podem-se citar os meroterpenos isoterreulactonas A (59) e terreulactonas A–D (60) isoladas do fungo *Aspergillus terreus* e os meroterpenos arisugacinas A e B (61) isolados de fungos do gênero *Penicillium* (HOUGHTON; REN; HOWES, 2006).



Atualmente, vários inibidores da acetilcolinesterase estão sendo investigados para o tratamento da doença de Alzheimer ((BARBOSA-FILHO et al., 2006). Os inibidores da acetilcolinesterase constituem-se na única classe de compostos que até o momento mostrou-se eficaz no tratamento dos sintomas cognitivos e funcionais dessa doença (LISTON et al., 2004). A possibilidade de aplicação dos inibidores da acetilcolinesterase como fármacos no tratamento dos sintomas da fase inicial da doença de Alzheimer tem estimulado a pesquisa em busca de produtos naturais que apresentem essa atividade nos últimos anos (HOUGHTON; REN; HOWES, 2006).

CAPÍTULO 2

Objetivo

2. OBJETIVO

2.1. OBJETIVO GERAL

- Realizar o estudo de bioprospecção de metabólitos secundários dos fungos filamentosos *Clonostachys rosea f catenutala* e *Penicillium brasilianum*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Cultivar os fungos para a obtenção dos extratos brutos;
- Submeter os extratos brutos a técnicas de cromatografia para o isolamento de constituintes químicos;
- Elucidar a estrutura das substâncias isoladas utilizando-se técnicas espectrométricas;
- Testar a atividade antibacteriana e anticolinesterásica das substâncias isoladas;
- Avaliar o efeito da variação nutricional na atividade antibacteriana dos extratos do fungo *Penicillium brasilianum*.

CAPÍTULO 3

Parte Experimental

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. EQUIPAMENTOS

- Agitador de tubos Phoenix, modelo AP 56, série 10359;
- Autoclave vertical Fanen, modelo 415/3, série J03610;
- Balança analítica Quimis, modelo Q-ILA2104, 210 g/0,1 mg;
- Balança eletrônica Digimed KN1000C, classe de exatidão II, série 04G6;
- Banho Büchi waterbath B-480;
- Banho de ultra-som UltraCleaner 800^a com aquecimento;
- Bomba de pressão Quimis, modelo Q-355B1, série 806377;
- Bomba de vácuo Tecnal TE-0581;
- Capela de fluxo laminar VECO, modelo JLF 912, série FL 5799;
- Chapa de aquecimento Laboratory Stirrer, modelo PC-320, série 440893;
- Colunas de vidros com diâmetro entre 1,5 e 7,0 cm e comprimentos entre 35,0 e 50,0 cm.
- Cromatógrafo Varian CP-3380, coluna DB-WAX (30 m x 0,25 mm d.i.; J&W Scientific) J&W Scientific e detector de ionização de chamas (Departamento de Química – UFMG);
- Espectrômetro BRUKER AVANCE DRX/400 e DRX/200 (Departamento de Química, UFMG);
- Estufa de secagem Fanen Ltda, modelo 002 CB;
- Estufa para meio de cultura Quimis Q-316.12, série 807.131;
- Estufa para placa cromatográfica Quimis G-317 8122;
- Mesa agitadora Tecnal, modelo TE-421;
- Microondas Máster Cooking CCE M-500;
- Micropipeta automática Digipet de 5-50 μ L, série 05012635;
- Micropipeta automática Finnpiquette Colour 4027, Lab systems de 200-1000 μ L, série E19971;
- Micropipeta automática Kacil de 100 μ L, série 0037201;
- Placas cromatográficas de sílica-gel Merck;
- Placas de vidros com espessura de 0,25 mm.
- Ponto de fusão Gehaka, modelo PF 1000, série 0530/06001020;
- Rotavapor Büchi Waterbath, modelo B-480;

- Rotavapor Fisaton, modelo 802, série 531782;
- Termômetro Incoterm, série 313675.

3.2. REAGENTES

- Ágar bacteriológico (Biobrás S.A., lote: 1045564C);
- Ágar batata dextrosado (Biobrás S.A., lote: 1191737A);
- Caldo de batata dextrosado (BD, lote: 6255266);
- Caldo infusão de cérebro e coração – BHI (Biobrás diagnósticos, lote: 1125610A);
- Cloranfenicol (Sigma-Aldrich, lote: 48H057025);
- Cloreto de sódio (Cromoline Química final, lote: 11534/07);
- Cuba saturada com iodo sublimado;
- D-Glicose (Synth, lote: 42768);
- Discos com cloranfenicol (30 µg/disco) (Laborclin – Produtos para Laboratórios Ltda. lote: 51010022);
- Extrato de malte (Acumedia, lote: 02-02-YH);
- Fast Blue B Salt (Sigma–Aldrich, lote: 58096LJA);
- Fosfato de potássio dibásico P.A. (Synth, lote: 95707);
- Huperzina A (Biomol, lote: P9203g);
- Meio antibiótico n°1 (Difco, lote: 3014488);
- 1–Naftil acetato (Sigma–Aldrich, lote: 056K5306);
- Peptona bacteriológica (Acumedia, lote: 100.633 C);
- Reagente de Dragendorff (Wagner e Blandt, 1996);
- Reagente de Vanilina-ácido sulfúrico (1g de vanilina dissolvida em 100 mL de solução metanol:água:ácido sulfúrico concentrado nas proporções de 45:45:10)
- Sílica gel (Vetec 70-230 Mesh, lote: 960597) para CCS;
- Sílica gel (Sigma 230-400 Mesh, lote: 10k3497) para CCS;
- Sílica gel 60 G (Vetec, lote: 0507764) para CCD;
- Solventes P.A.: acetato de etila, dimetilsulfóxido, hexano, álcool metílico, diclorometano, acetona, éter etílico, clorofórmio, álcool etílico das marcas Synth, CRQ, Quimex, Nuclear, Dinâmica e Merck;
- Sulfato de magnésio heptaidratado (Synth, lote: 100550);

- Tampão Tris pH 8 (Sigma–Aldrich).

3.3. MEIOS DE CULTURA

3.3.1. MEIO DE CULTURA BHI

BHI (Brain heart infusion) 37,0 g/L

Água destilada qsp

3.3.2. SOLUÇÃO SALINA

NaCl 9,0 g/L

MgSO₄.7H₂O 0,5 g/L

Água destilada qsp

3.3.3. MEIO DE CULTURA SÓLIDO ANTIBIÓTICO N° 1

Meio antibiótico n° 1 30,5 g/L

Água destilada qsp

3.3.4. MEIO DE CULTURA LÍQUIDO COMPLEXO

Glicose 20 g/L

Peptona 5 g/L

KH₂PO₄ 1 g/L

MgSO₄.7H₂O 0,5 g/L

NaCl 5 g/L

Água destilada qsp

3.3.5. MEIO CALDO BATATA DEXTROSADO

Caldo de batata dextrosado 24 g/L

Água destilada qsp

3.4. CULTIVO DO FUNGO *CLONOSTACHYS ROSEA F CATENULATA*

Todo o procedimento de obtenção do pré-inóculo e inóculo do fungo foi realizado em capela de fluxo laminar próximo ao bico de Bünsen. Os materiais e reagentes utilizados foram previamente autoclavados a 120°C durante 15 minutos.

- Preparo do pré-inóculo: com o auxílio de um alça de platina, foi realizada a raspagem do microrganismo presente em tubo de ensaio. O microrganismo foi, em seguida, inoculado em erlenmeyer contendo 200 mL de meio de cultura líquido complexo. Fez-se a homogeneização do meio. O fungo foi cultivado durante cinco dias sob agitação à temperatura ambiente.

- Inoculação do fungo: após o crescimento do fungo, o mesmo foi inoculado em erlenmeyers contendo meio de cultura líquido complexo. Em seguida, realizou-se a homogeneização do meio com o microrganismo. O fungo foi cultivado durante 40 dias, sem agitação, à temperatura ambiente.

- Preparo do extrato fúngico: após o período de 40 dias, os meios de cultura foram filtrados com auxílio de funil e gaze, separando-se o filtrado do micélio. O micélio foi extraído com acetado de etila com auxílio do ultrasson durante 15 minutos. Em seguida, realizou-se a filtração do micélio e a concentração do extrato em rotavapor a vácuo. O extrato obtido foi transferido para um frasco limpo previamente pesado, sendo denominado ECr1. O filtrado foi também extraído com acetato de etila utilizando-se funil de separação. O procedimento foi repetido 3 vezes. O extrato orgânico obtido foi concentrado em rotavapor a vácuo e transferido para um frasco limpo e previamente pesado denominado ECr2. Os extratos, quando analisados por CCD em sílica utilizando-se eluentes de diferentes polaridades, apresentaram um perfil de eluição diferente e por essa razão não foram combinados. As massas dos extratos obtidos encontram-se na **Tabela 1**.

Tabela 28 – Massas dos extratos do fungo *Clonostachys rosea f catenulata*.

Extrato	Código do extrato	Meio de cultura (L)	Massa do extrato (mg)
Extrato do micélio	ECr1	7,5	804,2
Extrato do filtrado (meio)	ECr2		264,0

3.5. CULTIVO DO FUNGO *PENICILLIUM BRASILIANUM*

O extrato do fungo *Penicillium brasilianum* foi anteriormente preparado pela aluna Adriana de Almeida Bracarense. O extrato do fungo foi obtido conforme o procedimento descrito a seguir. Todo o procedimento de obtenção do inóculo do fungo foi realizado em capela de fluxo laminar próximo ao bico de bunsen. Os materiais e reagentes utilizados foram previamente autoclavados a 120°C durante 15 minutos.

- Preparo do pré-inóculo: com o auxílio de um alça de platina, foi realizada a raspagem do microrganismo presente em tubo de ensaio. O microrganismo foi, em seguida, inoculado em erlenmeyer contendo 200 mL de meio de cultura líquido complexo. Fez-se a homogeneização do meio. O fungo foi cultivado durante cinco dias sob agitação à temperatura ambiente.

- Inoculação do fungo: após o crescimento do fungo, o mesmo foi inoculado em erlenmeyers contendo meio de cultura líquido complexo. Em seguida, realizou-se a homogeneização do meio com o microrganismo. O fungo foi cultivado durante 25 dias, sem agitação, à temperatura ambiente.

- Preparo do extrato fúngico: no vigésimo quinto dia, os meios de cultura foram filtrados a vácuo, separando-se o filtrado do micélio. O filtrado foi extraído com acetato de etila utilizando-se funil de separação. O procedimento foi repetido 3 vezes. O extrato orgânico foi secado com sulfato de sódio anidro e, em seguida, concentrado em rotavapor a vácuo. O micélio foi também extraído com acetato de etila durante três dias. Em seguida, realizou-se a filtração do micélio e a concentração do extrato em rotavapor a vácuo. O extrato obtido do micélio foi combinado com o extrato obtido do filtrado e transferido para um frasco limpo e previamente pesado denominado EPb. A quantidade de extrato obtida encontra-se na **Tabela 2**.

Tabela 29 – Massa do extrato do fungo *Penicillium brasilianum*.

Extrato	Código do extrato	Meio de cultura (L)	Massa do extrato (g)
Extrato do micélio + meio	EPb	6,0	17

3.6. FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS DO FUNGO *CLONOSTACHYS ROSEA F CATENULATA*

O extrato do micélio do fungo *Clonostachys rosea f catenulata* (ECr1, 748 mg) foi fracionado empregando uma combinação de técnicas cromatográficas. Inicialmente esse material foi fracionado em CCS utilizando-se n-hexano, acetato de etila e metanol em polaridades crescentes. Foram coletadas 179 frações de 100 mL que foram combinadas em 21 grupos de acordo com a revelação para o reagente de vanilina-ácido sulfúrico. As frações obtidas, massa e eluentes estão apresentados na

Tabela 3.

Tabela 30 – Dados (frações, eluente e massa) da coluna cromatográfica do extrato do fungo *Clonostachys rosea f catenulata* (ECr1).

Código	Frações	Eluente	Massa (mg)
	1 – 14	Hexano 100%	Frações descartadas
BM-07-01	15 – 16	Hexano/AcOEt 95:05	19,38
BM-07-02	17 – 18	Hexano/AcOEt 95:05	347,35
BM-07-03	19 – 31	Hexano/AcOEt 95:05 Hexano/AcOEt 90:10	8,92
BM-07-04	32 – 35	Hexano/AcOEt 90:10	21,35
BM-07-05	36 – 40	Hexano/AcOEt 90:10	19,80
BM-07-06	41 – 45	Hexano/AcOEt 80:20	22,68
BM-07-07	46 – 51	Hexano/AcOEt 80:20 Hexano/AcOEt 70:30	22,76
BM-07-08	52 – 55	Hexano/AcOEt 70:30	17,44
BM-07-09	56 – 77	Hexano/AcOEt 70:30 Hexano/AcOEt 60:40	20,27
BM-07-10	78 – 87	Hexano/AcOEt 60:40	8,95
BM-07-11	88 – 97	Hexano/AcOEt 50:50	14,22
BM-07-12	98 – 123	Hexano/AcOEt 30:70 Hexano/AcOEt 10:90	15,34
BM-07-13	124 – 141	AcOEt 100%	17,03
BM-07-14	142 – 145	AcOEt/MeOH 95:05 AcOEt/MeOH 90:10 AcOEt/MeOH 80:20	18,27
BM-07-15	146 – 152	AcOEt/MeOH 80:20	13,05
BM-07-16	153 – 155	AcOEt/MeOH 80:20	20,36
BM-07-17	156 – 159	AcOEt/MeOH 80:20	9,92
BM-07-18	160 – 163	AcOEt/MeOH 70:30	18,95
BM-07-19	164 – 168	AcOEt/MeOH 70:30 AcOEt/MeOH 50:50	24,48
BM-07-20	169 – 176	AcOEt/MeOH 50:50 AcOEt/MeOH 20:80	45,52

A fração BM-07-02 (**Cr1**, 347,35 mg), caracterizada como um óleo amarelo, apresentou-se como uma mancha única quando analisada por CCD e revelada com vapores de iodo e foi enviada para a obtenção dos espectros de RMN de ^1H , de ^{13}C e DEPT.

A fração BM-07-04 (21,35 mg) foi fracionada por CCS "flash". Foi utilizada como fase móvel a mistura hexano/AcOEt 75:25. Foram coletadas 15 frações de 5 mL que foram agrupadas em 5 subgrupos após revelação com vapores de iodo. A fração BM-09-03 (**Cr2**, 16,14 mg) apresentou-se como um sólido branco que, após a análise por CCD e determinação da faixa de fusão, foi enviada para obtenção dos espectros de RMN de 1D e 2D. Os dados da coluna cromatográfica da fração BM-07-04 encontram-se na **Tabela 4**.

Tabela 31 – Dados (frações, eluente e massa) da coluna cromatográfica da fração BM-07-04.

Código	Frações	Eluente	Massa (mg)
	1 – 4	Hexano/AcOEt 75:25	Frações descartadas
BM-09-01	5 – 6	Hexano/AcOEt 75:25	2,61
BM-09-02	7	Hexano/AcOEt 75:25	0,8
BM-09-03	8 – 13	Hexano/AcOEt 75:25	16,14
BM-09-04	14 – 15	Hexano/AcOEt 75:25	0,9

A fração BM-07-07 (22,76 mg) foi fracionada por CCS utilizando-se os eluentes hexano, acetato de etila e metanol em polaridades crescentes. Foram obtidas 36 frações de 10 mL que foram, após revelação com reagente de vanilina-ácido sulfúrico, agrupadas em 5 subgrupos. Os dados do fracionamento de BM-07-07 estão apresentados na **Tabela 5**. A fração BM-11-03 (**Cr3**, 8 mg), isolada como sólido incolor, foi enviada para obtenção dos espectros de RMN de ^1H , de ^{13}C e DEPT após a análise da por CCD.

Tabela 32 – Dados (frações, eluente e massa) da coluna cromatográfica da fração BM-07-07.

Código	Frações	Eluente	Massa (mg)
BM-11-01	1 – 4	Hexano 100%	2,33
BM-11-02	5 – 14	Hexano/AcOEt 80:20	4,83

BM-11-03	15 – 22	Hexano/AcOEt 80:20	8,00
		Hexano/AcOEt 50:50	
BM-11-04	23 – 28	Hexano/AcOEt 50:50	1,53
		AcOEt 100%	
BM-11-05	29 – 36	AcOEt 100%	4,07
		MeOH 100%	

Outras frações obtidas do fracionamento do extrato ECr1 e o extrato obtido do meio de cultura do fungo *Clonostachys rosea f catenulata* (ECr2) foram submetidas a técnicas cromatográficas de fracionamento. Algumas substâncias puras foram isoladas, mas infelizmente não foi possível obter quantidades suficientes para a realização dos espectros de RMN de 1D e 2D que pudessem caracterizar essas substâncias.

3.6.1. CARACTERIZAÇÃO DE Cr1

A análise dos espectros de RMN de ^1H , de ^{13}C e DEPT (**Anexos 1.1.1, 1.1.2 e 1.1.3**, págs. 96 e 97) da fração **Cr1** revelou que a mesma era constituída por uma mistura de triacilgliceróis. Para a caracterização dos ácidos graxos presentes na mistura foram realizadas reações químicas para a obtenção de derivados que pudessem ser analisados por CG.

Inicialmente realizou-se a hidrólise seguida da reação de metilação. A reação de hidrólise foi realizada adicionando-se 100 μL de uma solução 3,5 mol/L de NaOH em etanol/água 1:1 em um frasco contendo 10 mg da amostra. O frasco foi aquecido por 2 minutos em microondas (potência 2) e, em seguida, foram adicionados 300 μL de água. A fração aquosa foi então acidificada com 100 μL de HCl concentrado e particionada com acetato de etila (600 μL , 300 μL e 300 μL). Para a reação de metilação foram adicionados 100 μL de uma solução de BF_3 em metanol (14% p/v) em um tubo Eppendorf contendo 1 mg de amostra. O tubo foi fechado e colocado em banho-maria a 80 $^\circ\text{C}$ por 10 minutos. Os ésteres metílicos formados foram diluídos em MeOH na concentração final de 100 ppm. Em seguida, foram retirados 1 μL de amostra e injetados em um cromatógrafo a gás, contendo nitrogênio como gás de arraste. As temperaturas utilizadas na análise foram: temperatura da coluna: 100 $^\circ\text{C}$ - 1 minuto, 7 $^\circ\text{C}$ / minuto até 240 $^\circ\text{C}$; temperatura do injetor: 260 $^\circ\text{C}$; Split 1/100; detector FID a 260 $^\circ\text{C}$. O resultado obtido foi comparado com uma mistura de

padrões de ácidos graxos livres (PADRÃO SUPELCO37) injetada nas mesmas condições.

3.6.2. CARACTERIZAÇÃO DE Cr3

O perfil apresentado pelos espectros de RMN de ^1H , de ^{13}C e DEPT (**Anexos 1.3.1, 1.3.2 e 1.3.3**, págs. 105 e 106) da fração **Cr3** mostrou que a mesma era constituída por uma mistura de ácidos graxos livres. Para a caracterização dos ácidos graxos presentes na mistura, foi realizada uma reação de metilação conforme o procedimento descrito no item 3.6.1.

3.7. FRACIONAMENTO DO EXTRATO DO FUNGO *PENICILLIUM BRASILIANUM*

O extrato do fungo *Penicillium brasilianum* (EPb, 12 g) foi submetido a técnicas cromatográficas para obtenção de substâncias puras. O extrato foi inicialmente fracionado utilizando-se CCS eluída com polaridades crescentes de hexano, acetato de etila e metanol. Foram coletadas 190 frações de 125 mL que foram combinadas, após análise por CCD, em 46 grupos de acordo com revelação com o reagente de vanilina-ácido sulfúrico. As frações, massas e eluentes estão apresentados na **Tabela 6**.

Tabela 33 – Dados (frações, eluente e massa) da coluna cromatográfica do extrato do fungo *Penicillium brasilianum* (EPb).

Código	Frações	Eluente	Massa (mg)
BE-27-01	1 – 19	Hexano 100%	31,09
BE-27-02	20 – 23	Hexano/AcOEt 90:10	4,37
BE-27-03	24	Hexano/AcOEt 90:10	9,71
BE-27-04	25 – 27	Hexano/AcOEt 90:10	204,87
BE-27-05	28 – 30	Hexano/AcOEt 90:10	28,56
BE-27-06	31 – 35	Hexano/AcOEt 80:20	100,40
BE-27-07	36 – 38	Hexano/AcOEt 80:20	88,06
BE-27-08	39 – 51	Hexano/AcOEt 80:20 Hexano/AcOEt 70:30	176,55
BE-27-09	52	Hexano/AcOEt 70:30	9,38
BE-27-10	53 – 58	Hexano/AcOEt 70:30	70,89
BE-27-11	59 – 62	Hexano/AcOEt 70:30	61,17
BE-27-12	63	Hexano/AcOEt 70:30	7,20
BE-27-13	64 – 66	Hexano/AcOEt 70:30	36,73
BE-27-14	67 – 70	Hexano/AcOEt 70:30	50,43

BE-27-15	71 – 73	Hexano/AcOEt 50:50	18,31
BE-27-16	74 – 75	Hexano/AcOEt 50:50	53,42
BE-27-17	76 – 79	Hexano/AcOEt 50:50	80,12
BE-27-18	80 – 86	Hexano/AcOEt 50:50	687,90
BE-27-19	87 – 95	Hexano/AcOEt 50:50 Hexano/AcOEt 20:80	419,28
BE-27-20	96 – 102	Hexano/AcOEt 20:80 AcOEt 100%	284,31
BE-27-21	103 – 104	AcOEt 100%	55,13
BE-27-22	105 – 112	AcOEt 100%	145,07
BE-27-23	113	AcOEt/MeOH 95:05	11,23
BE-27-24	114 – 118	AcOEt/MeOH 95:05	85,05
BE-27-25	119 – 121	AcOEt/MeOH 95:05	188,25
BE-27-26	122	AcOEt/MeOH 95:05	31,32
BE-27-27	123 – 126	AcOEt/MeOH 95:05	136,76
BE-27-28	127 – 128	AcOEt/MeOH 95:05 AcOEt/MeOH 85:15	39,84
BE-27-29	129 – 130	AcOEt/MeOH 85:15	30,59
BE-27-30	131 – 134	AcOEt/MeOH 85:15	56,48
BE-27-31	135	AcOEt/MeOH 85:15	42,22
BE-27-32	136 – 138	AcOEt/MeOH 85:15	465,35
BE-27-33	139 – 149	AcOEt/MeOH 85:15 AcOEt/MeOH 70:30	633,90
BE-27-34	150 – 151	AcOEt/MeOH 70:30	180,26
BE-27-35	152 – 155	AcOEt/MeOH 70:30 AcOEt/MeOH 50:50	234,47
BE-27-36	156 – 158	AcOEt/MeOH 50:50	231,70
BE-27-37	159 – 160	AcOEt/MeOH 50:50	86,55
BE-27-38	161 – 168	AcOEt/MeOH 50:50	1831,79
BE-27-39	169 – 173	AcOEt/MeOH 30:70	531,20
BE-27-40	174 – 175	AcOEt/MeOH 30:70	207,81
BE-27-41	176 – 178	AcOEt/MeOH 30:70 MeOH 100%	201,34
BE-27-42	179 – 180	MeOH 100%	179,91
BE-27-43	181 – 183	MeOH 100%	217,94
BE-27-44	184 – 185	MeOH 100%	525,03
BE-27-45	186 – 188	MeOH 100%	330,55
BE-27-46	189 – 190	MeOH 100%	257,64

Durante o fracionamento do extrato do fungo *Penicillium brasilianum*, um sólido cristalino incolor precipitou, em grande quantidade, das frações 157 – 164, logo após estas serem eluídas da coluna mãe. As frações foram filtradas antes da concentração no rotavapor a vácuo e os cristais obtidos foram recristalizados em metanol. O precipitado branco obtido foi analisado em CCD e apresentou, quando revelado com reagente de vanilina-ácido sulfúrico, uma mancha única de coloração

rosa clara. A fração (**Pb1**, 56 mg) foi, após determinação da faixa de fusão, enviada para obtenção dos espectros de RMN de ^1H , de ^{13}C e DEPT.

A fração BE-27-18 (687,90 mg) foi fracionada por CCS utilizando-se os eluentes hexano, diclorometano e metanol em polaridades crescentes. Foram coletadas 158 frações de 50 mL que foram, em seguida, combinadas em 26 subgrupos de acordo com o perfil de eluição em CCD de sílica e revelação com reagente de vanilina-ácido sulfúrico. Os dados da coluna cromatográfica da fração BE-27-18 encontram-se na **Tabela 7**. A fração BG-41-16 (345 mg), obtida do fracionamento de BE-27-18, foi submetida ao fracionamento em CC de alumina utilizando-se como eluente misturas dos solventes hexano, acetato de etila e metanol em polaridades crescentes. Foram coletadas 109 frações de 15 mL que foram agrupadas em 13 subgrupos de acordo com revelação em vapores de iodo quando analisadas em CCD. As frações, massas e eluentes estão apresentados na **Tabela 8**. A fração BG-42-03 (67,70 mg), quando analisada em CCD de sílica, eluente hexano, clorofórmio e acetato de etila nas proporções 48:26:26, mostrou-se impura e foi submetida a um novo fracionamento. A fração BG-42-03 foi purificada por CCS "flash", utilizando-se como eluente a mistura hexano, clorofórmio e acetato de etila nas proporções 48:26:26. Foram coletadas 37 frações que foram combinadas em 6 subgrupos após a análise das mesmas em CCD de sílica utilizando-se como revelador o reagente de vanilina-ácido sulfúrico. Os dados do fracionamento de BG-42-03 estão apresentados na **Tabela 9**. A fração BM-43-04 (**Pb2**, 34 mg), quando analisada em CCD utilizando-se como revelador o reagente de vanilina-ácido sulfúrico, apresentou-se como uma mancha única de coloração azul escura. A fração BM-43-04, caracterizada como um sólido branco, foi enviada para obtenção dos espectros de RMN de 1D e 2D, após a determinação da faixa de fusão.

Tabela 34 – Dados (frações, eluente e massa) da coluna cromatográfica da fração BE-27-18.

Código	Frações	Eluente	Massa (mg)
BG-41-01	1 – 6	Hexano 100%	3,01
BG-41-01	7 – 10	Hexano/CH ₂ Cl ₂ 90:10	3,70
BG-41-03	11 – 13	Hexano/CH ₂ Cl ₂ 90:10	3,26
BG-41-04	14 – 20	Hexano/CH ₂ Cl ₂ 90:10	3,81
BG-41-05	21 – 26	Hexano/CH ₂ Cl ₂ 80:20	3,84
BG-41-06	27 – 28	Hexano/CH ₂ Cl ₂ 80:20	2,98
BG-41-07	29 – 33	Hexano/CH ₂ Cl ₂ 70:30	15,67
BG-41-08	34 – 43	Hexano/CH ₂ Cl ₂ 55:45	10,39

Hexano/CH ₂ Cl ₂ 40:60			
BG-41-09	44 – 45	Hexano/CH ₂ Cl ₂ 40:60	2,01
BG-41-10	46 – 47	Hexano/CH ₂ Cl ₂ 40:60	3,55
BG-41-11	48 – 57	Hexano/CH ₂ Cl ₂ 40:60	6,10
		Hexano/CH ₂ Cl ₂ 30:70	
BG-41-12	58 – 62	Hexano/CH ₂ Cl ₂ 30:70	4,77
		Hexano/CH ₂ Cl ₂ 15:85	
BG-41-13	63 – 69	Hexano/CH ₂ Cl ₂ 15:85	6,29
BG-41-14	70 – 74	Hexano/CH ₂ Cl ₂ 05:95	3,42
BG-41-15	75 – 85	Hexano/CH ₂ Cl ₂ 05:95	5,46
		CH ₂ Cl ₂ /MeOH 98:02	
BG-41-16	86 – 88	CH ₂ Cl ₂ /MeOH 98:02	345,0
BG-41-17	89 – 90	CH ₂ Cl ₂ /MeOH 98:02	22,44
BG-41-18	91 – 93	CH ₂ Cl ₂ /MeOH 98:02	5,51
BG-41-19	94 – 100	CH ₂ Cl ₂ /MeOH 98:02	31,89
		CH ₂ Cl ₂ /MeOH 95:05	
BG-41-20	101 – 103	CH ₂ Cl ₂ /MeOH 95:05	7,32
		CH ₂ Cl ₂ /MeOH 80:20	
BG-41-21	104 – 105	CH ₂ Cl ₂ /MeOH 80:20	4,30
BG-41-22	106 – 109	CH ₂ Cl ₂ /MeOH 80:20	20,11
BG-41-23	110 – 115	CH ₂ Cl ₂ /MeOH 80:20	13,23
BG-41-24	116 – 131	CH ₂ Cl ₂ /MeOH 80:20	19,50
BG-41-25	132 – 140	CH ₂ Cl ₂ /MeOH 80:20	15,00
BG-41-26	141 – 158	CH ₂ Cl ₂ /MeOH 80:20	38,41
		MeOH 100%	

Tabela 35 – Dados (frações, eluente e massa) da coluna cromatográfica da fração BG-41-16.

Código	Frações	Eluente	Massa (mg)
BG-42-01	1 – 13	Hexano/AcOEt 70:30	3,08
BG-42-02	14 – 21	Hexano/AcOEt 50:50	2,89
BG-42-03	22 – 33	Hexano/AcOEt 50:50	67,70
BG-42-04	34 – 41	Hexano/AcOEt 50:50	27,26
BG-42-05	42 – 44	Hexano/AcOEt 50:50	8,38
BG-42-06	45 – 49	Hexano/AcOEt 50:50	8,44
BG-42-07	50 – 64	Hexano/AcOEt 50:50	7,89
		Hexano/AcOEt 30:70	
BG-42-08	65 – 73	Hexano/AcOEt 30:70	6,05
BG-42-09	74 – 88	AcOEt 100%	3,52
		AcOEt/MeOH 95:5	
BG-42-10	89 – 96	AcOEt/MeOH 95:5	3,10
BG-42-11	97 – 98	AcOEt/MeOH 95:5	0,76
BG-42-12	99 – 103	AcOEt/MeOH 95:5	21,22
		AcOEt/MeOH 70:30	
BG-42-13	104 – 109	AcOEt/MeOH 70:30	6,92
		MeOH 100%	

Tabela 36 – Dados (frações, eluente e massa) da coluna cromatográfica da fração BG-42-03.

Código	Frações	Eluente	Massa (mg)
	1	Hexano/CHCl ₃ /AcOEt 48:26:26	Fração descartada
BM-43-01	2 – 5	Hexano/CHCl ₃ /AcOEt 48:26:26	6,17
BM-43-02	6 – 11	Hexano/CHCl ₃ /AcOEt 48:26:26	17,53
BM-43-03	12	Hexano/CHCl ₃ /AcOEt 48:26:26	4,29
BM-43-04	13 – 24	Hexano/CHCl ₃ /AcOEt 48:26:26	34,29
BM-43-05	25 – 28	Hexano/CHCl ₃ /AcOEt 48:26:26	2,43
BM-43-06	29 – 37	Hexano/CHCl ₃ /AcOEt 48:26:26	1,22

Uma amostra da fração BE-27-19 (346,3 mg) foi fracionada por CC de alumina, sendo utilizadas como fase móvel misturas dos solventes hexano, acetato de etila e metanol em polaridades crescentes. Foram coletadas 130 frações de 25 mL que foram agrupadas em 23 subgrupos após revelação em vapor de iodo. Os grupos de frações obtidos estão apresentados na **Tabela 10**. A fração BE-37-09 (**Pb3**, 9,0 mg) quando analisada em CCD utilizando-se como revelador o reagente de vanilina-ácido sulfúrico, apresentou-se como uma mancha única de coloração azul escura. A fração BE-37-09, caracterizada como um sólido branco, foi enviada para obtenção dos espectros de RMN de 1D e 2D, após a determinação da faixa de fusão.

Tabela 37 – Dados (frações, eluente e massa) da coluna cromatográfica da fração BE-27-19.

Código	Frações	Eluente	Massa (mg)
BE-37-01	1 – 4	Hexano 100%	2,04
		Hexano/AcOEt 75:25	
BE-37-02	5 – 11	Hexano/AcOEt 75:25	4,10
		Hexano/AcOEt 60:40	
BE-37-03	12 – 13	Hexano/AcOEt 60:40	13,78
BE-37-04	14 – 16	Hexano/AcOEt 60:40	12,26
BE-37-05	17 – 20	Hexano/AcOEt 60:40	8,00
		Hexano/AcOEt 60:40	
BE-37-06	21 – 22	Hexano/AcOEt 60:40	3,25
		Hexano/AcOEt 40:60	
BE-37-07	23 – 24	Hexano/AcOEt 40:60	1,38
BE-37-08	25 – 26	Hexano/AcOEt 40:60	1,40
BE-37-09	27 – 29	Hexano/AcOEt 40:60	9,00
BE-37-10	30 – 31	Hexano/AcOEt 40:60	3,33
BE-37-11	32 – 36	Hexano/AcOEt 40:60	11,09
BE-37-12	37	Hexano/AcOEt 40:60	1,16
BE-37-13	38 – 39	Hexano/AcOEt 40:60	3,00
		Hexano/AcOEt 40:60	
BE-37-14	40 – 53	Hexano/AcOEt 20:80	4,68

BE-37-15	54 – 58	Hexano/AcOEt 20:80	2,68
BE-37-16	59 – 68	Hexano/AcOEt 20:80 Hexano/AcOEt 10:90	3,23
BE-37-17	69 – 77	AcOEt 100% AcOEt/MeOH 90:10	3,40
BE-37-18	78 – 85	AcOEt/MeOH 80:20 AcOEt/MeOH 70:30	7,62
BE-37-19	86 – 90	AcOEt/MeOH 70:30	0,68
BE-37-20	91 – 95	AcOEt/MeOH 70:30 AcOEt/MeOH 50:50	3,50
BE-37-21	96 – 101	AcOEt/MeOH 50:50	4,18
BE-37-22	102 – 115	AcOEt/MeOH 50:50 MeOH 100%	9,84
BE-37-23	116 – 130	MeOH 100%	13,96

A fração BE-27-33 (633,90 mg) foi submetida à CCS utilizando-se os eluentes hexano, acetato de etila e metanol em polaridades crescentes. Foram coletadas 75 frações de 100 mL. As frações foram concentradas no rotavapor e analisadas por CCD. Após revelação com o reagente de vanilina-ácido sulfúrico, as frações foram combinadas em 12 subgrupos. Os dados da coluna cromatográfica da fração BE-27-33 encontram-se na **Tabela 11**. A fração BM-38-04 (**Pb4**, 12,56 mg), isolada como sólido branco, e após análise por CCD e determinação da faixa de fusão, foi enviada para obtenção dos espectros de RMN de ^1H , de ^{13}C e DEPT.

Tabela 38 – Dados (frações, eluente e massa) da coluna cromatográfica da fração BE-27-33.

Código	Frações	Eluente	Massa (mg)
BM-38-01	1 – 2	Hexano 100%	1,38
BM-38-02	3	Hexano/AcOEt 75:25	16,53
BM-38-03	4 – 5	Hexano/AcOEt 75:25 Hexano/AcOEt 50:50	9,48
BM-38-04	6 – 7	Hexano/AcOEt 50:50	12,56
BM-38-05	8 – 11	Hexano/AcOEt 25:75	4,92
BM-38-06	12 – 18	Hexano/AcOEt 25:75 AcOEt 100%	6,91
BM-38-07	19 – 25	AcOEt 100% AcOEt/MeOH 90:10	3,23
BM-38-08	26 – 30	AcOEt/MeOH 90:10	11,85
BM-38-09	31 – 42	AcOEt/MeOH 90:10	79,72
BM-38-10	43 – 54	AcOEt/MeOH 50:50	52,36
BM-38-11	55 – 64	AcOEt/MeOH 50:50 AcOEt/MeOH 30:70	53,09
BM-38-12	65 – 75	AcOEt/MeOH 30:70 MeOH 100%	17,21

Outras frações obtidas do fracionamento do extrato EPb foram submetidas a técnicas cromatográficas de fracionamento, mas infelizmente não foi possível o isolamento de substâncias puras. Entretanto, na fração BE-27-05 foi detectada, através da análise em CCD utilizando-se padrões, a presença do esterol ergosterol. A fração BE-27-38, que apresentou o maior rendimento em massa, foi avaliada por CCD e constatou-se que a mesma era composta majoritariamente pela substância caracterizada como **Pb1**.

3.8. TESTES DE ATIVIDADE BIOLÓGICA

3.8.1. TESTE DE ATIVIDADE ANTIBACTERIANA – TÉCNICA DE DIFUSÃO EM PLACA UTILIZANDO DISCOS DE PAPEL (BAUER et al., 1966)

Para a realização do teste de atividade antibacteriana foram utilizados as bactérias Gram positivas *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 e *Bacillus cereus* ATCC 1177 e as bactérias Gram negativas *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Citrobacter freundii* ATCC 8090. Discos de papel contendo 30 µg de cloranfenicol foram utilizados como controle positivo e como controle negativo foram utilizados discos de papel contendo o solvente usado na dissolução das amostras.

Todo o procedimento foi realizado em capela de fluxo laminar próximo ao bico de Bünsen. Os materiais e reagentes utilizados foram previamente autoclavados a 120 °C durante 15 minutos.

- Preparo do pré-inóculo bacteriano: as bactérias estocadas em tubos de ensaio foram raspadas com o auxílio de uma alça de platina e inoculadas em tubos de ensaio pequenos contendo 2,0 mL de meio de cultura BHI. Em seguida, os tubos foram incubados em estufa a 37 °C durante 8–18 horas.

- Preparo do inóculo bacteriano: com o auxílio de uma micropipeta, 500 µL do pré-inóculo bacteriano foram transferidos para tubos de ensaio contendo 4,5 mL de solução salina estéril. Os tubos foram homogeneizados e a concentração foi ajustada comparando-se com o tubo 0,5 da escala de McFarland de turbidez padrão (10^8 UFC/mL).

- Preparo dos discos: a amostra a ser analisada foi dissolvida em solvente orgânico volátil na concentração final de 2 mg/mL. Em seguida, volumes de 10 µL da

solução foram aplicados em discos de papel esterilizados até a concentração final de 100 µg de amostra por disco.

Com o auxílio de uma micropipeta, foram transferidos 500 µL do inóculo bacteriano para tubos de ensaio contendo 7,5 mL de meio de cultura antibiótico. Em seguida, os tubos foram agitados no vórtex e o meio de cultura foi transferido para placas de Petri previamente esterilizadas. Após a solidificação do meio semi-sólido, foram colocados, com o auxílio de uma pinça estéril, os discos de papel contendo 100 µg da amostra, o controle positivo e o negativo. As placas de Petri foram incubadas em estufa a 37 °C. Após 24 horas foi realizada a primeira leitura do teste medindo-se o diâmetro dos halos de inibição e após 48 horas foi realizada uma nova leitura para a determinação de cepas resistentes.

3.8.2. TESTE DE ATIVIDADE ANTIBACTERIANA – DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA – CIM

Para a realização do teste de atividade antibacteriana foram utilizados as bactérias Gram positivas *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 e *Bacillus cereus* ATCC 1177 e as bactérias Gram negativas *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Citrobacter freundii* ATCC 8090 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. O antibiótico cloranfenicol foi utilizado como controle positivo.

Todo o procedimento foi realizado em capela de fluxo laminar próximo ao bico de Bünsen. Os materiais e reagentes utilizados foram previamente autoclavados a 120 °C durante 15 minutos.

- Preparo do pré-inóculo bacteriano: as bactérias estocadas em tubos de ensaio foram raspadas com o auxílio de uma alça de platina e inoculadas em tubos de ensaio pequenos contendo 2,0 mL de meio de cultura BHI. Em seguida, os tubos foram incubados em estufa a 37 °C durante 8–18 horas.

- Preparo do inóculo bacteriano: com o auxílio de uma micropipeta, 500 µL do pré-inóculo bacteriano foram transferidos para tubos de ensaio contendo 4,5 mL de solução salina estéril. Os tubos foram homogeneizados e a concentração foi ajustada comparando-se com o tubo 0,5 da escala de McFarland de turbidez padrão

(10^8 UFC/mL). Porções de 10 μ L do inóculo bacteriano foram aplicadas nos tubos de ensaio contendo as amostras.

- Preparo das amostras: as amostras foram solubilizadas em DMSO na concentração de 20,48 mg/mL para os extratos brutos e 5,12 mg/mL para as substâncias puras. O antibiótico cloranfenicol foi preparado seguindo o mesmo procedimento, sendo que a concentração foi de 1,28 mg/mL.

Para cada bactéria foram utilizados 10 tubos de ensaio. Com o auxílio de uma micropipeta, foram adicionados, em cada tubo de ensaio, 1,0 mL de meio de cultura BHI, com exceção do primeiro tubo, onde foram adicionados 1,8 mL de meio. Em seguida, 200 μ L de cada amostra foram aplicados no primeiro tubo de cada série de diluição bacterina. Após agitação no vortex, 1,0 mL da solução contida no primeiro tubo foi transferida para o segundo. O procedimento foi repetido para todos os tubos até o décimo, onde 1,0 mL da solução foi desprezada. Após a etapa de diluição da amostra, foram aplicados 10 μ L do inóculo bacteriano em cada tubo de ensaio. O controle negativo foi realizado utilizando-se somente o meio de cultura e o inóculo bacteriano. Os tubos foram incubados em estufa a 37 °C por 18 horas. A concentração inibitória mínima foi considerada a menor concentração que inibiu visivelmente o crescimento bacteriano.

3.8.3. TESTE DE ATIVIDADE ANTICOLINESTERÁSICA – ANÁLISE QUALITATIVA POR BIOAUTOGRAFIA (GIOVANNI et al., 2008)

- Preparo das amostras: os extratos e substâncias puras analisadas foram diluídas em solvente orgânico na concentração de 1,0 mg/mL. O controle positivo utilizado foi a huperzina A (0,001 μ g).

- Preparo das soluções reagentes: a enzima acetilcolinesterase foi solubilizada em tampão tris 0,1 M pH 8 na concentração final de 5 U/mL, seguida da adição de 0,05 mg de albumina (0,1 mg/mL). A solução reveladora foi preparada ao misturar, nas proporções de 1:4, as soluções de 1-naftil (2,5 mg/mL) e de Fast Blue B Salt (40 mg/mL).

As cromatoplasmas de sílica gel foram previamente eluídas com acetona. Em seguida, 5,0 μ L de amostra foram aplicados nas cromatoplasmas, com o auxílio de uma micropipeta. As cromatoplasmas foram eluídas utilizando-se a mistura de

solventes hexano/AcOEt 1:1. Após a evaporação do solvente, foi realizada a aplicação do controle positivo, seguida da borrifação da solução contendo a enzima. As cromatoplasmas foram incubadas por 20 minutos a 37°C em estufa de atmosfera úmida. Em seguida, as mesmas foram retiradas da estufa e borrifadas com a solução preparada de 1-naftil e Fast Blue B Salt e observadas por algumas horas. O resultado positivo (inibição da enzima) foi observado pelo aparecimento de manchas brancas.

3.9. AVALIAÇÃO DA VARIAÇÃO NUTRICIONAL E A ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS EXTRATOS DO FUNGO *PENICILLIUM BRASILIANUM*

Para a realização desse experimento o fungo *Penicillium brasilianum* foi cultivado em pequena escala em três diferentes meios de cultura: meio de cultura líquido complexo, caldo batata dextrosado e arroz. Os experimentos foram realizados em duplicata, sendo utilizadas duas condições de cultivo: cultivo com agitação (em mesas agitadoras) e cultivo sem agitação.

Todo o procedimento de obtenção do pré-inóculo e inóculo do fungo foi realizado em capela de fluxo laminar próximo ao bico de Bünsen. Os materiais e reagentes utilizados foram previamente autoclavados a 120 °C durante 15 minutos, com exceção para o meio de arroz que foi autoclavado a 120 °C durante 20 minutos por duas vezes.

- Preparo do pré-inóculo: com o auxílio de um alça de platina, foi realizada a raspagem do microrganismo presente em tubo de ensaio. O microrganismo foi, em seguida, inoculado em erlenmeyer contendo meio de cultura líquido complexo. Fez-se a homogeneização do meio. O fungo foi cultivado por cinco dias sob agitação à temperatura ambiente.

- Cultivo em arroz: após o crescimento do fungo, o mesmo foi inoculado em erlenmeyers de 250 mL contendo 10 g de arroz (marca Prato Fino) e 150 mL de água destilada previamente autoclavados. Os frascos foram mantidos à temperatura ambiente para o crescimento do fungo e foram extraídos nos seguintes tempos: 0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 dias. A biomassa fúngica e o meio de cultivo foram extraídos com acetato de etila com auxílio do ultrassom durante 15 minutos, sendo o procedimento repetido três vezes. O solvente orgânico foi filtrado e concentrado no rotavapor a

vácuo e os extratos obtidos foram transferidos para frascos previamente pesados e rotulados. As massas dos extratos obtidos encontram-se na **Tabela 12**.

- Cultivo em meio de cultura líquido complexo: após o crescimento do fungo, o mesmo foi inoculado em erlenmeyers de 250 mL contendo 200 mL de meio de cultura líquido complexo esterilizado para o crescimento com agitação e em frascos para cultivo de células contendo 100 mL de meio de cultura líquido complexo esterilizado para o crescimento sem agitação. Os frascos foram mantidos à temperatura ambiente para o crescimento do fungo e foram extraídos nos seguintes tempos: 0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 dias. A biomassa fúngica e o meio de cultivo foram extraídos com acetato de etila com auxílio do ultrassom durante 15 minutos, sendo o procedimento repetido três vezes. O solvente orgânico foi filtrado e concentrado no rotavapor a vácuo. Os extratos obtidos foram transferidos para frascos previamente pesados e rotulados. A biomassa fúngica foi coletada e pesada. As massas dos extratos obtidos e da biomassa fúngica encontram-se na **Tabela 13**.

- Cultivo em caldo batata dextrosado: após o crescimento do fungo, o mesmo foi inoculado em erlenmeyers de 250 mL contendo 200 mL de caldo de batata dextrosado esterilizado para o crescimento com agitação e em frascos para cultivo de células contendo 100 mL de caldo de batata dextrosado esterilizado para o crescimento sem agitação. Os frascos foram mantidos à temperatura ambiente para o crescimento do fungo e foram extraídos nos seguintes tempos: 0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 dias. A biomassa fúngica e o meio de cultivo foram extraídos com acetato de etila com auxílio do ultrassom durante 15 minutos, sendo o procedimento repetido três vezes. O solvente orgânico foi filtrado e concentrado no rotavapor a vácuo. Os extratos obtidos foram transferidos para frascos previamente pesados e rotulados. A biomassa fúngica foi coletada e pesada. As massas dos extratos obtidos e da biomassa fúngica encontram-se na **Tabela 14**.

Os extratos obtidos foram analisados para a atividade antibacteriana através da técnica de difusão em placa utilizando-se discos de papel.

Tabela 39 – Massas dos extratos obtidos do cultivo em arroz.

Código	Massa (mg)
Ar00-1	0,75
Ar00-2	1,57
Ar05-1	8,11
Ar05-2	14,41
Ar10-1	19,77
Ar10-2	20,10
Ar15-1	48,90
Ar15-2	36,55
Ar20-1	38,91
Ar20-2	39,29
Ar25-1	34,56
Ar25-2	19,15
Ar30-1	31,03
Ar30-2	37,18

Tabela 40 – Massas dos extratos obtidos do cultivo em meio de cultura líquido complexo e biomassas.

Código	Massa (mg)		Código	Massa (mg)	
	Extrato	Biomassa		Extrato	Biomassa
Mc00A-1	19,17	-	Mc00I-1	49,69	-
Mc00A-2	29,48	-	Mc00I-2	45,41	-
Mc05A-1	35,12	404,72	Mc05I-1	93,24	21,84
Mc05A-2	39,76	453,80	Mc05I-2	97,09	28,25
Mc10A-1	19,96	2270,41	Mc10I-1	54,13	36,84
Mc10A-2	45,06	596,70	Mc10I-2	79,09	40,21
Mc15A-1	28,40	1912,49	Mc15I-1	124,23	1281,59
Mc15A-2	38,01	1773,19	Mc15I-2	115,17	1315,98
Mc20A-1	17,43	1719,32	Mc20I-1	98,15	1276,65
Mc20A-2	35,82	1756,98	Mc20I-2	109,62	1315,90
Mc25A-1	32,56	1749,97	Mc25I-1	114,80	1224,72
Mc25A-2	38,64	1730,98	Mc25I-2	71,22	1358,56
Mc30A-1	60,81	1399,62	Mc30I-1	156,52	1278,79
Mc30A-2	64,83	1424,25	Mc30I-2	154,51	1308,97

Tabela 41 – Massas dos extratos obtidos do cultivo em caldo batata dextrosado e bioamassas.

Código	Massa (mg)		Código	Massa (mg)	
	Extrato	Biomassa		Extrato	Biomassa
PDB00A-1	34,27	-	PDB00I-1	22,13	-
PDB00A-2	17,24	-	PDB00I-2	14,85	-
PDB05A-1	51,90	37,01	PDB05I-1	40,83	336,71
PDB05A-2	38,85	29,94	PDB05I-2	55,53	511,20
PDB10A-1	52,65	139,17	PDB10I-1	58,32	433,29
PDB10A-2	23,10	30,90	PDB10I-2	77,11	397,58
PDB15A-1	66,86	735,88	PDB15I-1	148,52	457,85
PDB15A-2	83,39	737,14	PDB15I-2	182,50	448,82
PDB20A-1	43,19	621,08	PDB20I-1	28,14	454,97
PDB20A-2	106,12	594,02	PDB20I-2	46,99	453,21
PDB25A-1	20,29	652,68	PDB25I-1	106,32	454,97
PDB25A-2	36,95	691,47	PDB25I-2	47,81	454,82
PDB30A-1	52,38	704,30	PDB30I-1	102,97	430,60
PDB30A-2	51,20	662,80	PDB30I-2	125,05	421,08

CAPÍTULO 4

Resultados e Discussão

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DOS METABÓLITOS ISOLADOS DO FUNGO *CLONOSTACHYS ROSEA F CATENULATA*

4.1.1. ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE **Cr1**

O espectro de RMN de ^1H (**Anexo 1.1.1**, pág. 96) de **Cr1** apresentou um padrão característico de triacilgliceróis evidenciado pelos sinais em δ 4,13 ppm (dd, $J = 11,8$ e $6,0$ Hz) e δ 4,29 ppm (dd, $J = 11,9$ e $4,4$ Hz) atribuíveis aos hidrogênios dos grupos CH_2O - (CHAVES et al., 2004; ZHANG; MILLS; NAIR, 2002) e em δ 1,28 – 1,29 ppm (m) atribuíveis aos hidrogênios dos grupos metilênicos. Nos espectros de RMN de ^{13}C (**Anexo 1.1.2**, pág. 96) e DEPT (**Anexo 1.1.3**, pág. 97) foram observados em δ 173,4 ppm e δ 172,8 ppm deslocamentos característicos aos carbonos de carbonilas, em δ 68,8 ppm e δ 62,0 ppm deslocamentos característicos aos carbonos oxigenados e, em δ 14,0 ppm, um sinal característico de grupos metilas terminais. Também foram observados deslocamentos na região entre δ 127,8 – δ 130,2 ppm correspondentes a carbonos olefínicos e entre δ 22,5 – δ 34,1 ppm, correspondentes aos carbonos metilênicos.

A identificação dos ácidos graxos presentes na mistura de triacilgliceróis foi realizada por CG. A fração foi hidrolisada seguida por metilação para a obtenção de derivados voláteis. A análise do cromatograma obtido (**Anexo 1.1.4**, pág. 97) em comparação com o espectro de padrões de ésteres de ácidos graxos revelou que a fração **Cr1** era composta por uma mistura de triacilgliceróis formados principalmente pelos ácidos mirístico ($\text{C}_{14:0}$), palmítico ($\text{C}_{16:0}$), esteárico ($\text{C}_{18:0}$), oléico ($\text{C}_{18:1}^{\Delta 9}$ cis) e linoléico ($\text{C}_{18:2}^{\Delta 9, 12}$). A **Tabela 15** apresenta a composição dos ácidos graxos e sua porcentagem na fração **Cr1**.

Tabela 42 – Composição de ácidos graxos na fração **Cr1**.

Ácidos graxos	% de ácidos graxos em Cr1 (Triacilglicerol)
C _{14:0} (ác. mirístico)	0,52
C _{16:0} (ác. palmítico)	36,75
C _{18:0} (ác. esteárico)	9,49
C _{18:1} ^{Δ⁹} cis (ác. oléico)	24,35
C _{18:2} ^{Δ^{9,12}} (ác. linoléico)	23,57
NI	5,32

NI: ácidos graxos não identificados na fração **Cr1** (triacilglicerol).

Os triacilgliceróis constituem-se na mais importante forma de armazenamento de energia e ácidos graxos em células eucarióticas, correspondendo à classe de lipídeos mais comumente isolada de fungos (SORGER; DAUM, 2002).

Analisando o cromatograma obtido (**Anexo 1.1.4**, pág. 97) pôde-se observar que o ácido palmítico constitui-se no componente majoritário da mistura (cerca de 40%). Já em relação aos ácidos graxos insaturados, foi observada uma equivalência entre as proporções dos ácidos oléico e linoléico que apresentaram cerca de 24% cada na composição da mistura.

Não foram encontrados relatos na literatura sobre a composição de lipídeos do fungo *Clonostachys rosea f catenulata*. Viccini (2004) relatou a composição de ácidos graxos em uma mistura de triacilgliceróis isolada do fungo *Clonostachys rosea*, espécie morfológicamente semelhante ao fungo *Clonostachys rosea f catenulata*, cultivado em extrato de batata. Os ácidos graxos relatos foram os ácidos palmítico (C_{16:0}), heptadecenóico (C_{17:2}) e (C_{17:2}^{Δ^{9,12}}), esteárico (C_{18:0}), eláidico (C_{18:1}^{Δ⁹} trans), oléico (C_{18:1}^{Δ⁹} cis), linoléico (C_{18:2}^{Δ^{9,12}}), linolênico (C_{18:2}^{Δ^{9,12,15}}), araquídico (C_{20:0}) e docosanóico (C_{22:0}), sendo que o ácido eláidico (C_{18:1}^{Δ⁹} trans) foi o mais abundante na mistura (cerca de 44% do total).

4.1.2. ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE **Cr2**

A substância **Cr2** foi isolada como um sólido branco com faixa de fusão ente 150°C - 155°C. Os espectros de RMN de ¹H, de ¹³C e DEPT desta substância são mostrados nos **Anexos 1.2.1, 1.2.2 e 1.2.3** (Págs. 98 e 99). No espectro de RMN de ¹H foram observados três sinais na região de deslocamento de hidrogênios ligados a carbonos insaturados entre δ 5,1 e δ 5,5 ppm com integração para quatro

hidrogênios e um sinal em δ 3,5 – 3,6 ppm, com integração para um hidrogênio, característico de hidrogênio ligado a carbono ligado a heteroátomo.

Na região entre δ 1,18 e δ 2,45 ppm foram observados vários sinais sobrepostos correspondentes a hidrogênios de grupos metínicos e metilênicos e seis sinais na região de deslocamento de hidrogênios de grupos metilas foram observados (entre δ 0,56 e δ 0,98 ppm), com integração para 18 hidrogênios. Nos espectros de RMN de ^{13}C e DEPT foram observados 29 sinais, sendo que 25 correspondem a carbonos hidrogenados e quatro a carbonos quaternários.

Os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C da substância **Cr2** apresentaram um perfil característico dos esteróides (BROSS-WALCH et al., 2005) e a comparação dos dados de deslocamento químico com os da literatura confirmou que a substância correspondia ao ergosterol. Os dados de RMN de ^1H e de ^{13}C da substância **Cr2**, em comparação com os dados da literatura para o ergosterol, estão apresentados na **Tabela 16**.

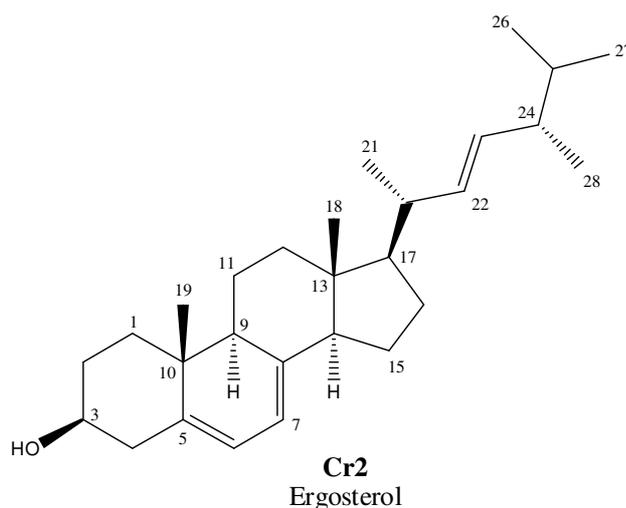


Tabela 43 – Comparação dos dados de RMN de ^{13}C e de ^1H (CDCl_3) da substância **Cr2** com os dados da literatura para o ergosterol (CDCl_3).

Carbono	Ergosterol		Literatura (ZHANG; MILLS; NAIR, 2002)	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	37,38		38,3	
2	31,01		31,9	
3	69,47		70,4	
4	39,80		40,8	
5	140,35		141,4	
6	118,59	5,5 (m, 1H)	119,6	5,55 (dd, 1H, $J = 5,7$ e $2,4$ Hz)
7	115,29	5,3 (m, 1H)	116,3	5,36 (dd, 1H, $J = 5,7$ e $2,7$ Hz)

8	138,78		139,8	
9	45,26		46,2	
10	36,03		37,0	
11	20,12		21,0	
12	38,09		39,1	
13	41,83		42,8	
14	53,56		54,5	
15	21,99		23,0	
16	27,27		28,3	
17	54,75		55,7	
18	11,04	0,56 (s, 3H)	12,0	0,61 (s, 3H)
19	15,28	0,88 (s, 3H)	16,3	0,92 (s, 3H)
20	39,40	2,02	40,4	
21	20,09	0,96 (d, 3H, $J = 6,6$ Hz)	20,0	1,01 (d, 3H, $J = 6,6$ Hz)
22	134,56		135,6	
23	130,99	5,10 – 5,14 (m, 2H)	132,0	5,17 (m, 2H)
24	41,82		42,8	
25	32,09		33,1	
26*	18,94	0,77 (d, 3H, $J = 2,8$ Hz)	19,6	0,81 (d, 3H, $J = 4,5$ Hz)
27*	18,64	0,74 (d, 3H, $J = 3,0$ Hz)	19,6	0,80 (d, 3H, $J = 4,8$ Hz)
28	16,59	0,84 (d, 3H, $J = 6,0$ Hz)	17,6	0,89 (d, 3H, $J = 6,9$ Hz)

* as atribuições podem estar trocadas.

A análise do mapa de contornos HMQC (**Anexos 1.2.5 – 1.2.9**, págs. 101, 102 e 103) de **Cr2** estabeleceu as correlações entre carbonos e hidrogênios que são apresentadas na **Tabela 16**. Os valores dos deslocamentos químicos observados para os hidrogênios de **Cr2** estão de acordo com os valores observados na literatura para a parte aglicona (ergosterol) do β -D-glicosídeo de ergosterol (PARK et al., 2005). Através da análise do mapa de contornos HMBC (**Anexos 1.2.10, 1.2.11 e 1.2.12**, págs. 103 e 104) pôde-se estabelecer as correlações entre H6 x C10, H22/23 x C20 e C24, H21 x C17, C20 e C22, H19 x C1, C8, C9 e C10, H28 x C23, C24 e C25, H18 x C12, C13, C14 e C17 e H26/27 x C24 e C25, dados que confirmam a estrutura proposta. A análise do mapa de contornos ^1H - ^1H COSY (**Anexo 1.2.4**, pág. 100) permitiu estabelecer as correlações entre os hidrogênios H6 x H7, H3 x H4, H23 x H24, H20 x H22, H17 x H20, H20 x H21, H24 x H28, H25 x H26 e H25 x H27. O sinal de carbono em δ 28,69 ppm não apresentou correlações com os hidrogênios e demais carbonos, sendo relacionado a grupos metilênicos de compostos graxos, presentes como impureza.

Os esteróides são lipídeos estruturais presentes na membrana plasmática da maioria das células eucarióticas, sendo que, na maioria dos fungos, o ergosterol é o esterol mais abundante. O ergosterol pode também ser encontrado em outros

organismos como em algumas leveduras, microalgas e alguns protozoários (ZHAO; LINA; BROOKES, 2005). O ergosterol é o alvo de fármacos antifúngicos como, por exemplo, a anfotericina B que, através da ligação com esse esterol, forma poros na membrana, permitindo o extravasamento de moléculas e os antifúngicos azólicos, que agem inibindo a enzima 14- α -desmetilase e, conseqüentemente, a biossíntese do ergosterol (TKACZ; DIDOMENICO, 2001).

Em relação à atividade biológica, o ergosterol apresenta atividade antitumoral relacionada à inibição direta da indução da angiogênese por tumores sólidos, devido à inibição da neovascularização, atividade antioxidante e antiinflamatória (TAKAKU; KIMURA; OKUDA, 2001; ZHANG; MILLS; NAIR, 2002).

4.1.3. ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE **Cr3**

Os espectros de RMN de ^1H (**Anexo 1.3.1**, pág. 105), de ^{13}C e DEPT (**Anexos 1.3.2 e 1.3.3**, págs. 105 e 106) de **Cr3** apresentaram o padrão característico de ácidos graxos livres. No espectro de RMN de ^{13}C pôde-se observar, em δ 179,4 ppm, o sinal correspondente a carbonos de carbonila, em δ 130,0 e δ 129,7 ppm, deslocamentos característicos de carbonos olefínicos, na região entre δ 22,7 e δ 33,9 ppm sinais equivalentes aos carbonos metilênicos e, em δ 14,1 ppm, um deslocamento característico dos grupos metilas terminais.

A identificação dos ácidos graxos presentes na fração foi realizada por CG, sendo necessária a metilação dos ácidos graxos livres para a obtenção de derivados voláteis. A análise do cromatograma obtido (**Anexo 1.3.4**, pág. 106) em comparação com o cromatograma de padrões de ésteres de ácidos graxos revelou que a fração **Cr3** é composta principalmente por uma mistura dos ácidos mirístico ($\text{C}_{14:0}$), palmítico ($\text{C}_{16:0}$), esteárico ($\text{C}_{18:0}$), oléico ($\text{C}_{18:1}^{\Delta 9 \text{ cis}}$) e linoléico ($\text{C}_{18:2}^{\Delta 9, 12}$). A **Tabela 17** apresenta a composição dos ácidos graxos e sua porcentagem na fração **Cr3**.

Tabela 44 – Composição de ácidos graxos na fração **Cr3**.

Ácidos graxos	% de ácidos graxos em Cr3 (ácidos graxos livres)
C _{14:0} (ác. mirístico)	0,72
C _{16:0} (ác. palmítico)	64,21
C _{18:0} (ác. esteárico)	3,59
C _{18:1} ^{Δ⁹} cis (ác. oléico)	22,71
C _{18:2} ^{Δ^{9,12}} (ác. linoléico)	5,95
NI	2,82

NI: ácidos graxos não identificados na fração **Cr3** (ácidos graxos livres).

A análise do cromatograma obtido revelou a mesma composição dos ácidos graxos livres quando comparado com a dos ácidos graxos presentes na mistura de triacilglicerol. O ácido palmítico constitui-se no componente majoritário da mistura representando mais de 60% dos ácidos graxos presentes. Em relação aos ácidos graxos insaturados, o ácido oléico representa cerca de 23% da mistura de ácidos graxos livres seguido do ácido linoléico com cerca de 10%. Segundo Ruess et al. (2002), os ácidos graxos mais comumente produzidos por fungos são os ácidos palmítico (C_{16:0}), esteárico (C_{18:0}), oléico (C_{18:1}^{Δ⁹} cis) e linoléico (C_{18:2}^{Δ^{9,12}}), sendo representativos em todas as espécies. Não foram encontrados relatos na literatura sobre a composição de lipídeos do fungo *Clonostachys rosea f catenulata*.

4.2. ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DOS METABÓLITOS ISOLADOS DO FUNGO *PENICILLIUM BRASILIANUM*

4.2.1. ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE **Pb1**

A substância **Pb1** foi isolada como um sólido branco com faixa de fusão entre 162 °C – 164 °C (rec. metanol). O espectro de RMN de ¹H (**Anexo 2.1.2**, pág. 107) mostrou sinais na região entre δ 3,6 – 3,8 ppm com integração para quatro hidrogênios. A análise dos espectros de RNM de ¹³C e DEPT (**Anexo 2.1.3**, pág. 108) revelou apenas três sinais de carbonos, sendo um destes referente a carbono metilênico; o espectro no infravermelho (**Anexo 2.1.1**, pág. 107) apresentou uma banda larga em 3300 cm⁻¹, característica de grupos hidroxilas (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005). Com base nesses dados foi proposta, para essa substância, a estrutura de um polioliol simétrico com seis átomos de carbono e a comparação com dados da literatura (ICHIMURA; KOHATA; GOTO, 2000;

HAGIWARA et al., 2005) confirmou que esse metabólito correspondia ao manitol. Os dados de RMN de ^{13}C da substância **Pb1** em comparação com os dados da literatura estão apresentados na **Tabela 18**.

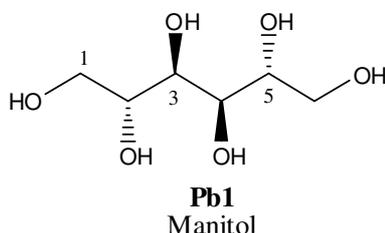


Tabela 45 – Dados de RMN de ^{13}C (D_2O) da substância **Pb1** em comparação com os dados da literatura para o manitol (D_2O).

Carbono	Manitol	Literatura (HAGIWARA et al., 2005)
	δ_{C}	δ_{C}
1 e 6	63,20	63,58
2 e 5	70,83	71,19
3 e 4	69,27	69,63

Polióis acíclicos como o manitol, o eritról, o arabitól, o inositol, o gliceról e o hertitol são compostos normalmente produzidos por fungos pertencentes aos Filos Ascomycota e Basidiomycota (FEOFILOVA, 2001). A real função biológica desses polióis ainda não é conhecida, mas alguns autores sugerem que esses compostos desempenham uma função de reserva de energia e fonte de carbono, além da função protetora similar à do dissacarídeo trealose, que é responsável pela germinação de esporos quando o fungo encontra-se em condições de estresse (SOLOMON; WATERS; OLIVER, 2007; FEOFILOVA, 2001). Segundo Feofilova (2001), a síntese de polióis pode ser utilizada para caracterizar fungos de diferentes espécies como um marcador quimiotaxonômico, similar ao sistema utilizado na classificação sistemática de plantas superiores.

O manitol foi isolado, pela primeira vez como metabólito fúngico, em 1811 pelo pesquisador Henri Braconnot e é geralmente o mais abundante dos carboidratos solúveis encontrado em fungos (SOLOMON; WATERS; OLIVER, 2007). O manitol apresenta diferentes aplicações, sendo utilizado para os mais diversos fins. Na indústria farmacêutica é utilizado como excipientes em comprimidos, na medicina como diurético osmótico e na indústria alimentícia como edulcorante na

fabricação de produtos dietéticos (DE OLIVEIRA; FERREIRA; DE SOUZA, 2009). Recentemente foi relatado que o manitol apresenta atividade de inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA) e atividade anti-hipertensiva (HAGIWARA et al., 2005).

4.2.2. ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE **Pb2**

A substância **Pb2** foi isolada como um sólido branco com faixa de fusão entre 296°C – 300°C. O espectro no infravermelho (**Anexo 2.2.1**, pág. 109) apresentou uma banda fraca em 3487 cm⁻¹ indicativa de grupo hidroxila, bandas fracas de absorção em 2991 e 2946 cm⁻¹ correspondente a grupos metilas e metilênicos de compostos alifáticos e bandas fortes de absorção em 1773 cm⁻¹, em 1745 cm⁻¹ e em 1704 cm⁻¹ características de grupos carbonilas de éster e de lactonas. Foram observadas em 1226 e 1209 cm⁻¹ bandas fortes de absorção do grupo –C(=O)–O– de lactonas (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005).

No espectro de RMN de ¹H (**Anexo 2.2.2**, pág. 110) foram encontrados sete sinais característicos de grupos metilas entre δ 1,19 e 2,02 ppm, sendo seis simpletos e um duplete ($J = 6,4$ Hz) todos com integração para três hidrogênios. Na região entre δ 5,48 e 6,65 ppm foram observados cinco sinais, sendo quatro referentes a hidrogênios ligados a carbonos insaturados. Foram observados também um sinal em δ 3,14 ppm (td, $J = 14$ e 3,2 Hz), um sinal em δ 3,60 ppm (s) e um sinal em δ 4,41 ppm (q, $J = 6,4$ Hz) todos com integração para um hidrogênio cada. No espectro de RMN de ¹³C (**Anexo 2.2.3**, pág. 111) e DEPT (**Anexo 2.2.4**, pág. 111) foram observados 27 sinais, sendo que 14 correspondem a carbonos hidrogenados e 13 correspondem a carbonos quaternários. Quatro sinais de grupos carbonilas foram observados na região entre δ 163,48 e 170,65 ppm e sete sinais de grupos metilas foram observados na região entre δ 11,22 e 25,82 ppm. Sinais de três grupos metilênicos foram observados em δ 26,40, δ 26,86 e δ 117,89 ppm e quatro sinais de grupos metínicos foram observados em δ 74,55, δ 78,62, δ 120,06 e δ 146,58 ppm.

Na tentativa de elucidação estrutural da substância, os carbonos foram numerados em ordem decrescente de deslocamento químico e, através do mapa de contornos HMQC (**Anexos 2.2.6 e 2.2.7**, págs. 113 e 114), foram obtidas as correlações entre carbonos e hidrogênios que participam da mesma ligação química. A análise do mapa de contornos ¹H-¹H COSY (**Anexos 2.2.5**, pág. 112) permitiu

correlacionar os hidrogênios acoplados e a análise do mapa de contornos HMBC (**Anexos 2.2.8, 2.2.9 e 2.2.10**, págs. 115, 116 e 117) permitiu estabelecer a conectividade entre os carbonos da molécula e as correlações entre os carbonos tetrassubstituídos e hidrogênios próximos. Os dados obtidos da numeração dos carbonos e hidrogênios e as correlações estão representados na **Tabela 19**.

A análise dos dados da **Tabela 19** permitiu a montagem de quatro fragmentos da molécula apresentados na **Figura 8**.

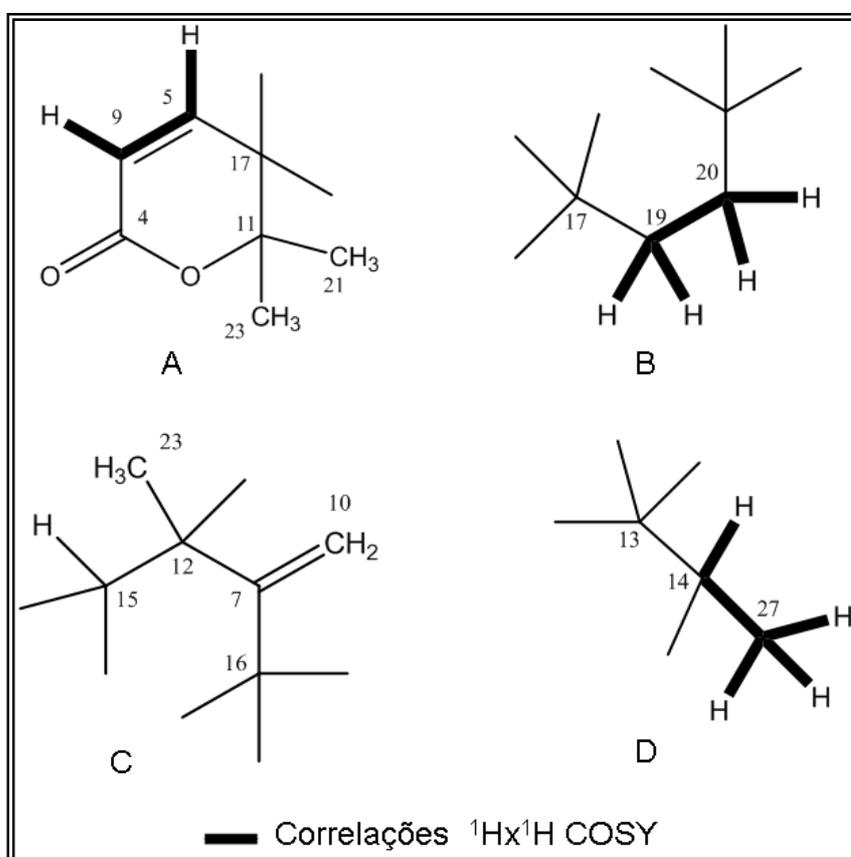


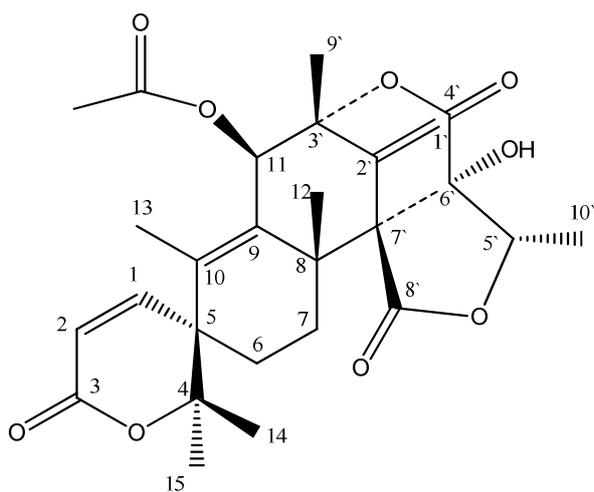
Figura 27 – Fragmentos propostos para **Pb2** estabelecidos com base nas correlações dos mapas de contornos $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ COSY e HMBC.

Tabela 46 – Dados de RMN de ^1H , de ^{13}C , ^1H - ^1H COSY e HMBC para a substância **Pb2**.

N° Carbono	Tipo	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	COSY	HMBC
1	C=O	170,65			
2	C=O	169,98			
3	C=O	168,26			
4	C=O	163,48			
5	CH	146,29	6,64 (d, $J = 10$ Hz)	6,09 (d, $J = 10$ Hz)	H5 x C4, C11, C17, C19
6	C	143,65			
7	C	137,36			
8	C	132,45			
9	CH	120,03	6,09 (d, $J = 10$ Hz)	6,64 (d, $J = 10$ Hz)	H9 x C4, C17
10	CH ₂	117,85	5,72 (d, $J = 1,2$ Hz) 5,49 (d, $J = 1,2$ Hz)	5,49 (d, $J = 1,2$ Hz) 5,72 (d, $J = 1,2$ Hz)	H10 x C12, C16
11	C	85,34			
12	C	83,99			
13	C	80,46			
14	CH	78,58	4,4 (q, $J = 6,4$ Hz)	1,29 (d, $J = 6$ Hz)	H14 x C13
15	CH	74,51	6,03 (s)		H15 x C3, C6, C7, C8, C12, C18
16	C	62,68			
17	C	46,44			
18	C	41,95			
19	CH ₂	26,82	1,59 1,56	3,14 3,14	
20	CH ₂	26,36	3,14 (td, $J = 14$ e $3,2$ Hz) 1,67	1,56, 1,59 e 1,67 3,14	H20a x C17, C18, C19, C22
21	CH ₃	25,78	1,38 (s)		H21 x C11, C17, C23
22	CH ₃	23,37	1,54 (s)		H22 x C8, C16, C18, C20
23	CH ₃	22,22	1,19 (s)		H23 x C11, C17, C21
24	CH ₃	20,43	2,02 (s)		H24 x C3
25	CH ₃	20,01	1,62 (s)		H25 x C7, C12, C15
26	CH ₃	15,23	1,87 (s)		H26 x C6, C8, C17
27	CH ₃	11,18	1,29 (d, $J = 6$ Hz)	4,4 (q, $J = 6,4$ Hz)	H27 x C13, C14
	OH		3,60 (s)		H(OH) x C1, C13, C16

O fragmento A corresponde a uma δ -lactona α,β insaturada e apresenta correlação com o fragmento B observada no mapa de contornos HMBC. O fragmento C mostra a presença de uma ligação dupla exocíclica na molécula correspondente ao carbono metileno C10, confirmado pelo acoplamento geminal entre os hidrogênios em δ 5,72 e δ 5,49 ppm, ambos dupletos com constante de acoplamento igual a 1,2 Hz. Os hidrogênios do grupo metila C27 apresentaram-se como um duplete com constante de acoplamento igual a 6 Hz. A análise do mapa de contornos $^1\text{H}\times^1\text{H}$ COSY mostrou a correlação entre os hidrogênios da metila C27 com o hidrogênio do grupo metínico C14 que apresentou-se como um quarteto com constante de acoplamento igual a 6,4 Hz. Esses dados, juntamente com as informações obtidas do mapa de contornos HMBC, possibilitaram a montagem do fragmento D.

Análise mais detalhada do espectro de RMN de ^{13}C e DEPT mostrou a presença de seis carbonos olefínicos, indicando a existência de três ligações duplas, sendo uma delas do grupo metileno terminal (fragmento C). Foi observada também a presença de mais seis carbonos quaternários, além das quatro carbonilas. As poucas correlações observadas no mapa de contornos $^1\text{H}\times^1\text{H}$ COSY e as correlações observadas no mapa de contornos HMBC revelaram a complexidade estrutural da **Pb2**, sugerindo uma estrutura policíclica. A pesquisa por dados da literatura de estruturas que continham o anel de uma δ -lactona α,β insaturada (fragmento A) já isoladas de fungos, levou às estruturas de meroterpenos relacionados isolados de *Penicillium* sp. por Santos; Rodrigues-Filho (2003b) e a comparação dos dados espectrais dessas substâncias possibilitou a elucidação estrutural da **Pb2** como sendo o meroterpenóide austina. A **Tabela 20** apresenta os dados de RMN de ^1H e de ^{13}C de **Pb2** em comparação com dados da literatura (HAYASHI et al., 1994) com a nova numeração para os carbonos de acordo com a adotada para os meroterpenos.



Pb2
Austina

Tabela 47 – Dados de RMN de ^{13}C e de ^1H (CDCl_3) da substância **Pb2** em comparação com os dados da literatura para a austina (CDCl_3).

Carbono	Austina		Literatura (HAYASHI et al., 1994)	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	146,2	6,64 (d, $J = 10$ Hz)	146,6	6,63 (d, $J = 9,9$ Hz)
2	120,0	6,09 (d, $J = 10$ Hz)	120,3	6,08 (d, $J = 9,9$ Hz)
3	163,4		163,8	
4	85,3		85,6	
5	46,4		46,7	
6	26,8	α : 1,59 β : 1,56 α : 3,14 (td, $J = 14$ e 3,2 Hz) β : 1,67	27,0	α : * β : * α : 3,13 (td, $J = 13,9$ e 3,8 Hz) β : *
7	26,3		26,6	
8	41,9		42,2	
9	132,4		132,7	
10	143,6		143,9	
11	74,5	6,03 (s)	74,7	6,01 (s)
12	23,3	1,54 (s)	23,6	1,18 (s)
13	15,2	1,87 (s)	15,5	1,85 (s)
14	25,7	1,38 (s)	22,5	1,52 (s)
15	22,2	1,19 (s)	26,0	1,36 (s)
1'	117,8	5,72 (d, $J = 1,2$ Hz) 5,49 (d, $J = 1,2$ Hz)	118,1	5,47 (d, $J = 1,2$ Hz) 5,71 (d, $J = 2,1$ Hz)
2'	137,3		137,6	
3'	83,9		84,2	
4'	170,6		170,2	
5'	78,5	4,43 (q, $J = 6,4$ Hz)	78,8	4,41 (q, $J = 6,4$ Hz)
6'	80,4		80,7	
7'	62,6		62,9	
8'	169,9		170,9	
9'	20,0	1,62 (s)	20,3	1,60 (s)
10'	11,1	1,29 (d, $J = 6,0$ Hz)	11,4	1,28 (d, $J = 6,4$ Hz)
11- CH_3CO	168,2		168,5	

11-CH ₃ CO	20,4	2,02 (s)	20,7	2,03 (s)
6'-OH		3,60 (s)		3,63 (s)

* Dados não fornecidos pelo autor

Devido à grande complexidade estrutural dessa classe de metabólitos, a elucidação estrutural dos compostos isolados foi realizada, na sua maioria, através da análise por cristalografia de Raio X (SANTOS; RODRIGUES-FILHO, 2003b) e, por isso, os valores de deslocamentos químicos de alguns carbonos apresentam contradições entre os autores. Hayashi et al. (1994) apresenta os valores mais concordantes com os observados para a austina experimentalmente. Entretanto, a atribuição dos deslocamentos químicos para as metilas C14 e C15 não estão de acordo com o observado no mapa de contornos NOESY para **Pb2**. No mapa de contornos NOESY (**Anexos 2.2.11 e 2.2.12**, págs. 118 e 119) foram observadas as correlações espaciais entre os hidrogênios H1 x H2, H1 x H7 α , H5' x H10', OH x H10' e H13 x H15 como mostrado **Figura 9**. Esses dados estão de acordo com as correlações observadas no mapa de contornos NOESY para os meroterpenos isolados por Santos; Rodrigues-Filho (2003b). Com base nesses dados foi adotada a configuração β para o grupo metila C14 e a configuração α para o grupo metila C15, discordando com a atribuição proposta para esses carbonos por Hayashi et al. (1994).

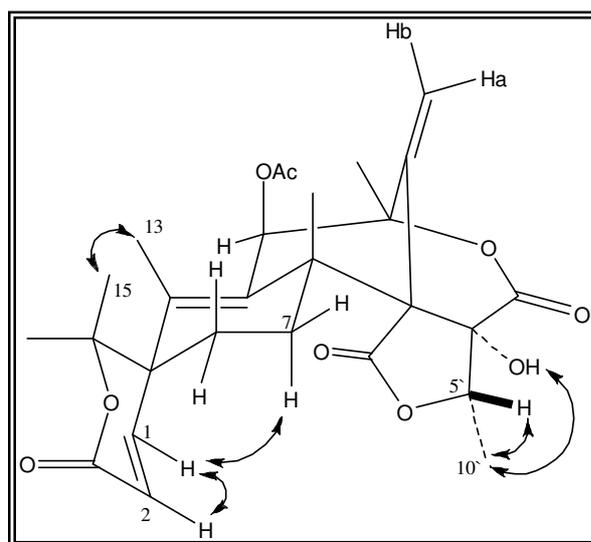


Figura 28 – Correlações espaciais para **Pb2** baseadas no mapa de contornos NOESY.

A austina é uma micotoxina pertencente à classe dos meroterpenos. Meroterpenos são definidos como metabólitos secundários que possuem origem biossintética mista, sendo parcialmente derivados de terpenos. Entretanto, alguns autores definem a classe como um grupo mais limitado de origem biossintética mista policetídeo-terpenóide (SHIOMI et al., 1999). Segundo Santos; Rodrigues-Filho (2002), a formação dos meroterpenos pertencentes à classe da austina ocorre a partir da C-alkilação do ácido 3,5-dimetil orselínico (**51**) pelo pirofosfato de farnesila (**52**), seguida de reações de alquilação e ciclização com a formação do composto 1,3-dicetona (**53**), que é o intermediário na formação dos compostos pertencentes à essa classe (**Figura 10**).

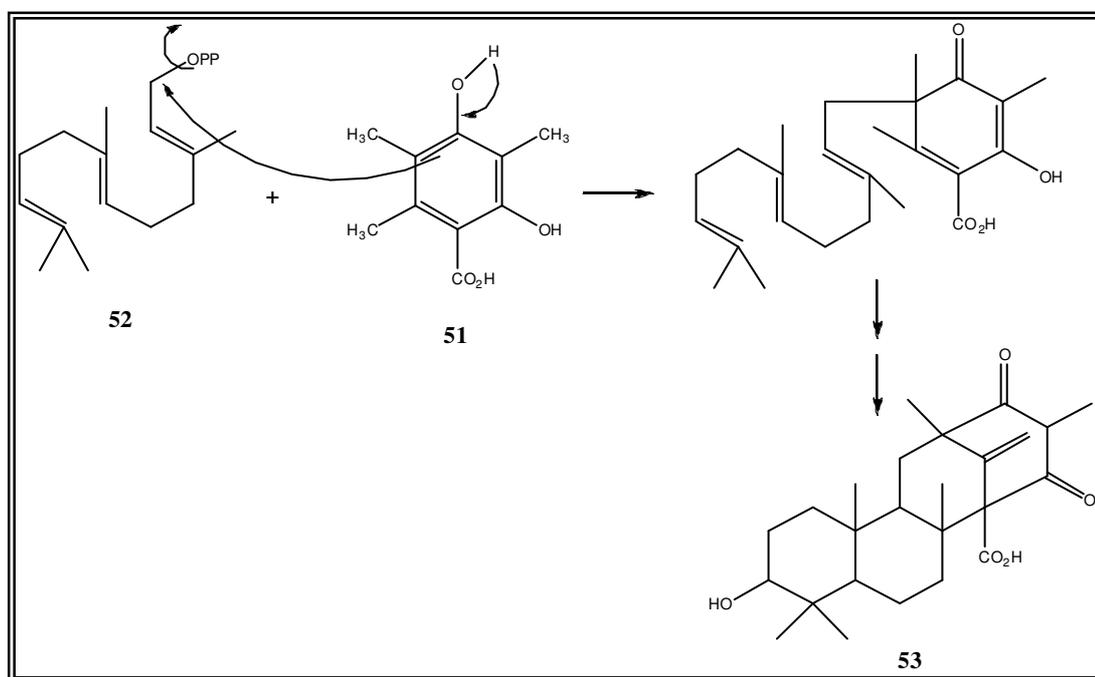


Figura 29 – Esquema de biossintese dos meroterpenos pertencentes à classe da austina.

Fonte: SANTOS; RODRIGUES-FILHO, 2002.

Metabólitos secundários pertencentes à classe dos meroterpenos já foram isolados de plantas, invertebrados marinhos e microrganismos (CUETO et al., 2006). Entretanto, nos últimos anos, essas substâncias foram isoladas de uma grande variedade de espécies fúngicas e organismos marinhos (SANTOS; RODRIGUES-FILHO, 2003a). Como exemplos de meroterpenos isolados de fungos, podem-se citar as tropolactonas (**54**) isoladas do fungo *Aspergillus* sp., as miniolutelidas (**55**) isoladas do fungo *Penicillium minioluteum*, as penisimplicinas (**56**) isoladas do fungo

Penicillium simplicissimum e as citreohibridonas (**57**) isoladas do fungo *Penicillium citreo-viride* (KOSEMURA, 2003; CUETO et al., 2006; LIDA et al., 2008; KOMAI et al., 2005). Alguns meroterpenos isolados de fungos apresentam atividade biológica como, por exemplo, os piriropenos (**58**) isolados do fungo *Aspergillus fumigatus* que apresentam atividade inibidora da enzima colesterol aciltransferase, as arisugacinas (**59**) isoladas do fungo *Penicillium* sp. com atividade inibidora da enzima acetilcolinesterase e as andrastinas (**60**) isoladas do fungo *Penicillium* sp. que possuem a capacidade de inibir a farnesiltransferase protéica (SHIOMI et al., 1999). As estruturas dessas substâncias são apresentadas na **Figura 11**.

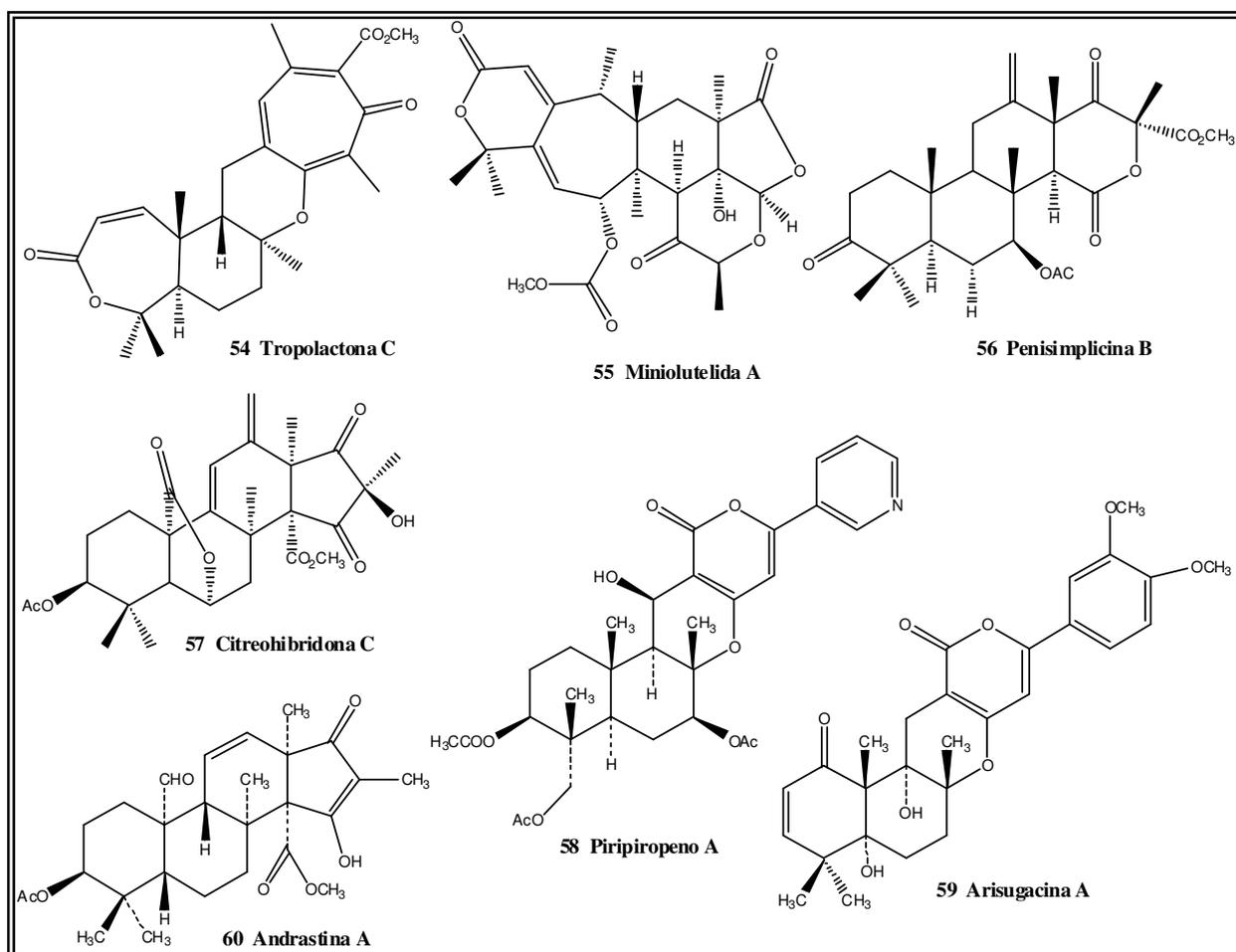


Figura 30 – Estruturas químicas de meroterpenos isolados de fungos.

Recentemente foi relatado o isolamento de meroterpenos pertencentes à classe da austina de um fungo endófito *Penicillium* sp. cultivado em meio arroz. Foram isolados os meroterpenos preaustinoíde A (**61**) e B (**62**), 7- β -acetoxidehidroaustina (**63**), neoaustina (**64**), dehidroaustina (**65**), austinoneol (**66**), preaustinoíde A1 (**67**), A2 (**68**) e B1 (**69**). As substâncias preaustinoíde A (**61**), preaustinoíde B (**62**), acetoxidehidroaustina (**63**) e neoaustina (**64**) apresentaram atividade antibacteriana contra os microrganismos *Escherichia coli*, *Bacillus* sp e *Pseudomonas aureginosa* (SANTOS; RODRIGUES-FILHO, 2002, 2003a, 2003b). As estruturas químicas desses meroterpenos são apresentadas na **Figura 12**.

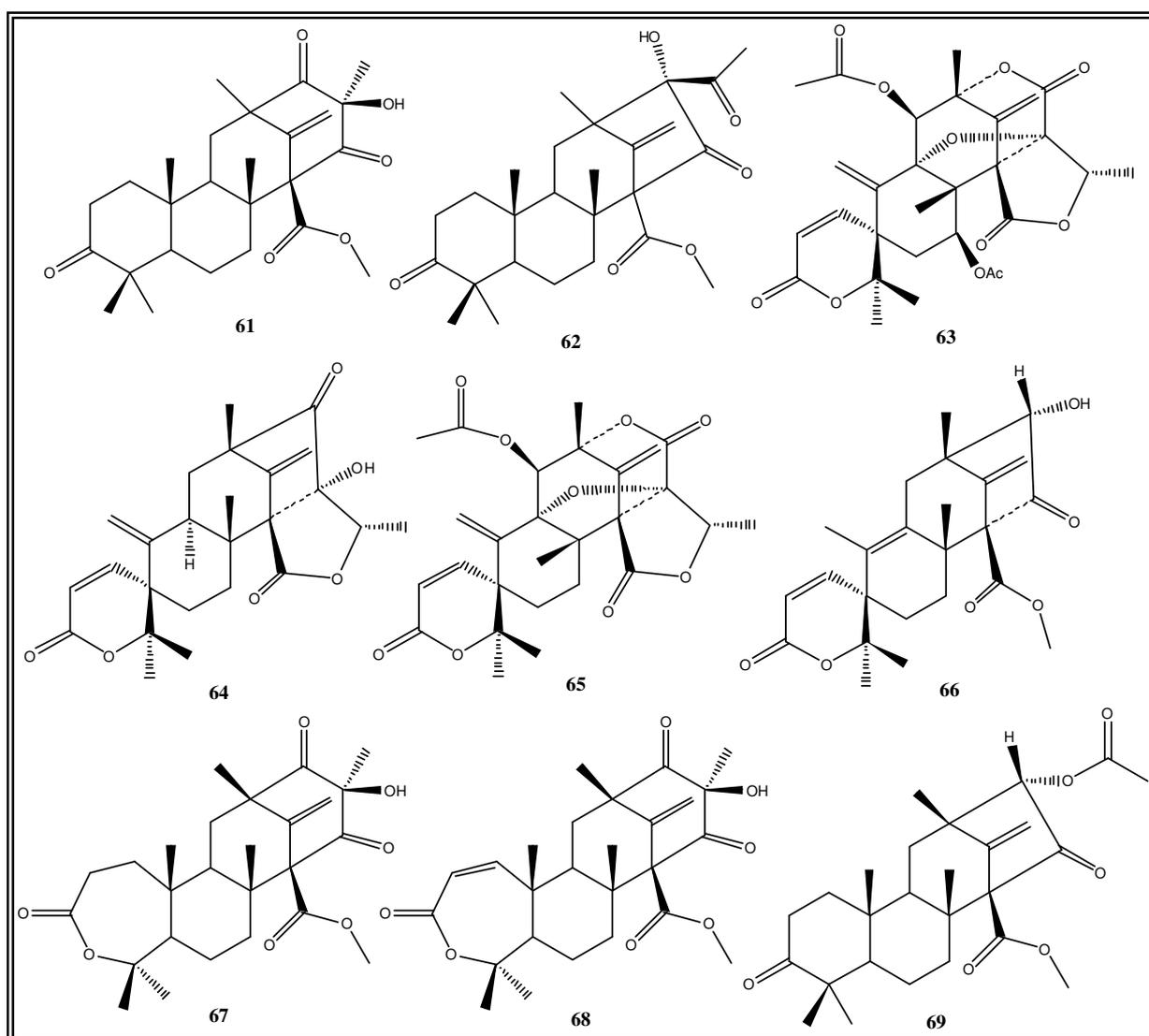


Figura 31 – Estruturas químicas de meroterpenos da classe da austina.

A austina foi isolada pela primeira vez em 1976 por Chexal et al. de culturas do fungo *Aspergillus ustus* e, devido à grande complexidade estrutural e à pequena quantidade de material isolada, a elucidação estrutural da mesma foi realizada por cristalografia de Raio X (CHEXAL et al., 1976). Posteriormente, Simpson et al. (1982) relataram dados de RMN de ^1H e de ^{13}C para a austina e outros três meroterpenos. Em 1994, Hayashi et al. isolaram a austina e outros cinco meroterpenos de culturas do fungo *Penicillium* sp. e testaram a atividade convulsiva dessas substâncias contra larvas do bicho-da-seda, sendo que o meroterpeno austina não se mostrou ativo. Apesar de ser relatado o isolamento dessa substância de espécies do gênero *Penicillium*, não existe relato para o isolamento da austina do fungo *Penicillium brasilianum* e de suas atividades biológicas.

4.2.3. ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE **Pb3**

A substância **Pb3** foi isolada como um sólido branco de faixa de fusão entre 281 °C – 284 °C. Os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C para essa substância apresentaram grande similaridade com os espectros obtidos para a austina (**Pb2**). Foram observados, no espectro de RMN de ^1H (**Anexo 2.3.1**, pág. 120), seis sinais na região entre δ 1,30 e 2,03 ppm característicos de hidrogênios de grupos metilas. O sinal da metila em δ 1,65 ppm aparece como um duplete resultante do acoplamento com um hidrogênio bastante desblindado em δ 5,29 ppm (q), ambos com constante de acoplamento igual a 6,8 Hz. Na região entre δ 5,63 e 6,85 ppm foram observados sinais para outros sete hidrogênios. Nos espectros de RMN de ^{13}C e DEPT (**Anexos 2.3.2 e 2.3.3**, pág. 121) foram observados 27 sinais, sendo que 13 correspondem a carbonos quaternários e 14 correspondem a carbonos hidrogenados. Dentre os carbonos hidrogenados, quatro correspondem a carbonos metínicos, quatro correspondem a carbonos metilênicos e seis correspondem a carbonos de grupos metilas. Foram observados também quatro sinais de carbonos de carbonila na região entre δ 163,46 e 169,19 ppm. A comparação dos dados espectrais de **Pb3** com dados da literatura possibilitou a elucidação estrutural da substância como sendo o meroterpeno dehidroaustina (**Tabela 21**).

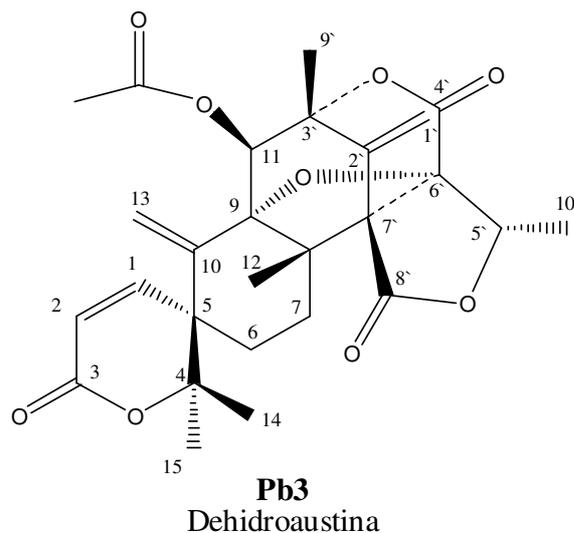


Tabela 48 – Dados de RMN de ^{13}C e de ^1H (CDCl_3) da substância **Pb3** em comparação com os dados da literatura para a dehidroaustina (CDCl_3).

Carbono	Dehidroaustina		Literatura (SANTOS; RODRIGUES-FILHO, 2003b)	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	151,1	6,82 (d, $J = 9,8$ Hz)	151,0	6,83 (d, $J = 10$ Hz)
2	116,6	5,89 (d, $J = 9,4$ Hz)	115,9	5,89 (d, $J = 10$ Hz)
3	163,4		163,0	
4	86,1		86,2	
5	44,1		44,2	
6	27,0	*	26,9	1,72 (m) 1,78 (dd, $J = 14$ e 4 Hz) 2,13 (dd, $J = 14$ e 4 Hz) 1,37 (m)
7	26,5	*	27,0	
8	50,4		50,7	
9	90,5		90,6	
10	139,3		139,1	
11	74,1	5,74 (s)	74,1	5,74 (s)
12	17,1	1,31 (s)	17,1	1,31 (s)
13	125,6	6,14 (d, $J = 1,8$ Hz)	125,6	6,14 (d, $J = 2$ Hz)
14	25,8	5,74 (s)	25,7	5,74 (d, $J = 2$ Hz)
15	23,8	1,50 (s)	23,8	1,50 (s)
1`	114,9	1,43 (s)	114,9	1,43 (s)
2`	137,3	5,87 (s)	137,4	5,87 (sl)
3`	82,6	5,65 (s)	82,8	5,65 (sl)
4`	167,5		170,7	
5`	76,4	5,29 (q, $J = 6,8$ Hz)	76,5	5,29 (q, $J = 7$ Hz)
6`	84,9		85,1	
7`	64,3		64,5	
8`	169,1		168,8	
9`	19,1	1,57 (s)	19,1	1,57 (s)
10`	13,5	1,65 (d, $J = 6,8$ Hz)	13,5	1,65 (d, $J = 7$ Hz)

11-CH ₃ CO	168,5		168,8	
11-CH ₃ CO	20,7	2,03 (s)	20,8	2,03 (s)

* Não foi possível estabelecer os valores de deslocamento químico desses hidrogênios.

A dehidroaustina apresenta, em comparação com a austina, uma segunda ligação dupla exocíclica e a formação do éter cíclico entre o oxigênio da hidroxila em C6` e o carbono C9, sendo, portanto, um derivado da austina (**Figura 13**). Os valores de deslocamento químico dos carbonos observados experimentalmente estão de acordo com os dados relatados na literatura (SANTOS; RODRIGUES-FILHO, 2003b). Entretanto, a presente atribuição para os carbonos metilênicos C6 e C7 (deslocamentos químicos δ 27,0 e δ 26,5 ppm respectivamente), está mais de acordo com a atribuição de Hayashi et al. (1994) para a dehidroaustina e com os dados observados para a austina. Na austina, a hidroxila ligada ao carbono C6` está muito próxima do hidrogênio 7 α . Esse efeito leva à desblindagem do hidrogênio 7 α que aparece mais para a esquerda no espectro de RMN de ¹H. A formação do anel entre C9–O–C6` na dehidroaustina altera a conformação do anel D da molécula, impedindo a interação entre o hidrogênio 7 α e a hidroxila e, por isso, o hidrogênio apresenta um deslocamento químico mais próximo do TMS (Tetrametil-silano) (SIMPSON et al., 1982). Esse efeito pode ser observado comparando-se os espectros de RMN de ¹H da austina (**Anexo 2.2.2**, pág. 110) e da dehidroaustina (**Anexo 2.3.1**, pág. 120).

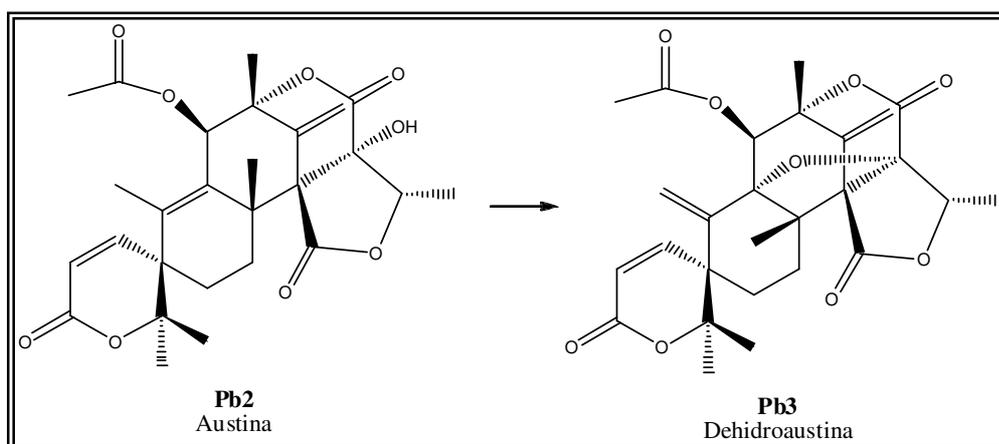
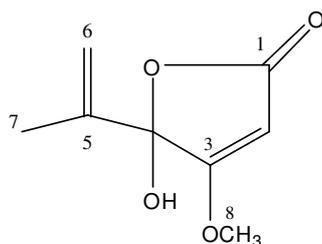


Figura 32 – Comparação entre as estruturas químicas da austina e da dehidroaustina.

O isolamento da dehidroaustina foi inicialmente relatado de espécies fúngicas do gênero *Aspergillus* sp. (HAYASHI et al., 1994). Entretanto, esse metabólito foi isolado de diferentes espécies do gênero *Penicillium* sp. (HAYASHI et al., 1994; SANTOS; RODRIGUES-FILHO 2003b; SIMPSON et al., 1982). A dehidroaustina foi submetida aos testes de atividade antibacteriana e teste de atividade convulsiva contra larvas do bicho-da-seda, mas não se mostrou ativa em nenhum dos testes (HAYASHI et al., 1994; SANTOS; RODRIGUES-FILHO, 2003b). No trabalho realizado por Santos (2003) a dehidroaustina apresentou atividade larvacida contra *Aedes aegyptii* (CL₅₀ = 5 ppm) mostrando-se como uma substância bastante promissora para ser utilizada como inseticida natural.

4.2.4. ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE **Pb4**

A substância **Pb4** foi isolada como um sólido branco com faixa de fusão entre 81 °C – 84 °C. O espectro de RMN de ¹H (**Anexo 2.4.1**, pág. 124) apresentou deslocamentos químicos correspondentes a grupo metila em δ 1,76 ppm, um simpleto em δ 3,92 ppm correspondente a grupo metoxila, dois sinais em δ 5,13 e 5,19 ppm relativos aos hidrogênios de grupo metilênico vinílico e em δ 5,47 ppm, um simpleto de grupo metínico. Nos espectros de RMN de ¹³C (**Anexo 2.4.2**, pág. 124) e DEPT (**Anexo 2.4.3**, pág. 125) foram observados oito sinais, sendo que quatro correspondem a carbonos hidrogenados e quatro correspondem a carbonos quaternários. Foi observado um deslocamento em δ 171,5 ppm correspondente a carbono de carbonila, além de deslocamentos em δ 89,2, δ 116,4 e δ 139,4 ppm, correspondentes a carbonos olefínicos, um deslocamento em δ 59,9 ppm, correspondente a carbono de grupo metoxila e um deslocamento em δ 17,3 ppm, correspondente a carbono de grupo metila. A comparação dos dados de RMN de ¹H e de ¹³C de **Pb4** com dados da literatura (**Tabela 22**) revelou que a substância tratava-se do ácido penicílico.



Pb4
Ácido penicílico

Tabela 49 – Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C (CDCl_3) da substância **Pb4** em comparação com os dados da literatura para o ácido penicílico (CDCl_3).

Carbono	Ácido Penicílico		Literatura (KANG; KIM, 2004)	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	171,56		172,08	
2	89,23	5,47 (s)	89,54	5,13 (s)
3	179,44		179,67	
4	103,10		103,56	
5	139,44		139,66	
6	116,40	5,13 e 5,19 (s)	116,74	5,17 e 5,47 (s)
7	17,39	1,76 (s)	17,54	1,75 (s)
8	59,97	3,9 (s)	60,14	3,9 (s)

O ácido penicílico, uma micotoxina produzida por fungos do gênero *Penicillium* e *Aspergillus* (BACON et al., 1973), foi isolado pela primeira vez do fungo *Penicillium puberulum* pelos pesquisadores Alsberg e Black em 1913 (MURNAGHAN, 1946). No nosso grupo de pesquisa, o ácido penicílico foi anteriormente isolado desse fungo e estudado pela aluna de mestrado Adriana de Almeida Bracarense, que avaliou a atividade antibacteriana e antifúngica desse metabólito e seus derivados sintéticos (BRACARENSE, 2008).

O ácido penicílico é uma γ - lactona α,β insaturada cuja forma lactol (I) apresenta-se em equilíbrio tautomérico com a forma ceto-ácida (II), como representado na **Figura 14** (MURNAGHAN, 1964). Algumas atividades biológicas já foram relatadas na literatura para essa substância como, por exemplo, atividade antibiótica, antiviral, antitumoral, citotóxica e carcinogênica (FRISVAD et al., 2004). Murnaghan (1946) estudou a toxicidade do ácido penicílico em ratos via subcutânea, intravenosa e oral e Kang; Kim (2004) relataram a atividade antifúngica *in vitro* do ácido penicílico contra *Phytophthora spp.*

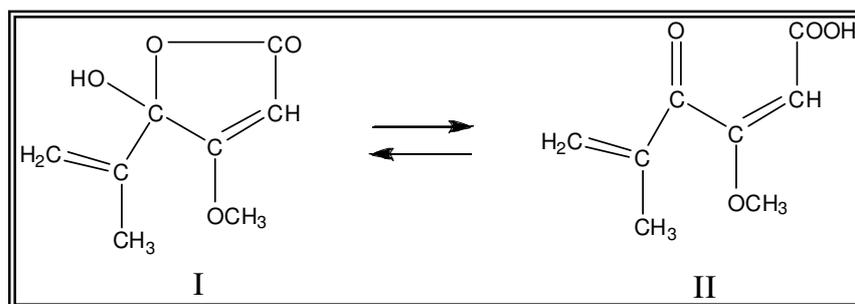


Figura 33 – Estruturas de equilíbrio químico do ácido penicílico.
I: Forma lactol; II: Forma ceto-ácida.

4.3. TESTES DE ATIVIDADE BIOLÓGICA

4.3.1. TESTE DE ATIVIDADE ANTIBACTERIANA – TÉCNICA DE DIFUSÃO EM PLACA UTILIZANDO DISCOS DE PAPEL (BAUER et al., 1966)

Os extratos e as substâncias puras obtidas do cultivo dos fungos *Clonostachys rosea f catenulata* e *Penicillium brasilianum* foram analisadas no teste de atividade antibacteriana utilizando-se as bactérias Gram positivas *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Bacillus cereus* e as bactérias Gram negativas *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* e *Citrobacter freundii*.

Para o fungo *Clonostachys rosea f catenulata* foram testados o extrato obtido do micélio (ECr1), o extrato obtido do meio de cultura (ECr2) e a substância pura ergosterol. Os resultados obtidos no teste são apresentados na **Tabela 23**.

Os extratos ECr1 e ECr2 apresentaram atividade seletiva ao inibirem somente o crescimento das bactérias Gram positivas. O extrato ECr1 apresentou atividade contra as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Bacillus cereus*, enquanto que o extrato ECr2 foi ativo somente contra as bactérias *Listeria monocytogenes* e *Bacillus cereus*. Considerando a bactéria *Staphylococcus aureus*, o halo de inibição apresentado pelo extrato ECr1 foi menor que o halo apresentado pelo controle positivo (cloranfenicol). Entretanto, pode-se perceber que o halo correspondente ao extrato apresenta-se mais claro do que o halo correspondente ao cloranfenicol, conforme observado na **Figura 15**. Esse fato indica a existência de cepas resistentes ao antibiótico controle e que o extrato testado possui substâncias capazes de inibirem o crescimento das bactérias resistentes. A substância pura ergosterol não apresentou atividade antibacteriana. A **Figura 15** apresenta algumas

fotografias do teste de atividade antibacteriana para os extratos do fungo *Clonostachys rosea f catenulata*.

Tabela 50 – Halos de inibição do crescimento bacteriano (em cm) para os extratos e substância pura obtidos do fungo *Clonostachys rosea f catenulata*.

Bactérias	Extrato/ Substância pura				
	ECr1 (100 µg)	ECr2 (100 µg)	Ergosterol (100 µg)	CP (30µg)	CN
<i>S. aureus</i>	1,1	0,0	0,0	1,7	0,0
<i>L. monocytogenes</i>	1,2	1,0	0,0	2,3	0,0
<i>B. cereus</i>	1,1	1,3	0,0	2,8	0,0
<i>S. typhimurium</i>	0,0	0,0	0,0	2,5	0,0
<i>E. coli</i>	0,0	0,0	0,0	1,5	0,0
<i>C. freundii</i>	0,0	0,0	0,0	2,0	0,0

CP: controle positivo (cloranfenicol); CN: controle negativo

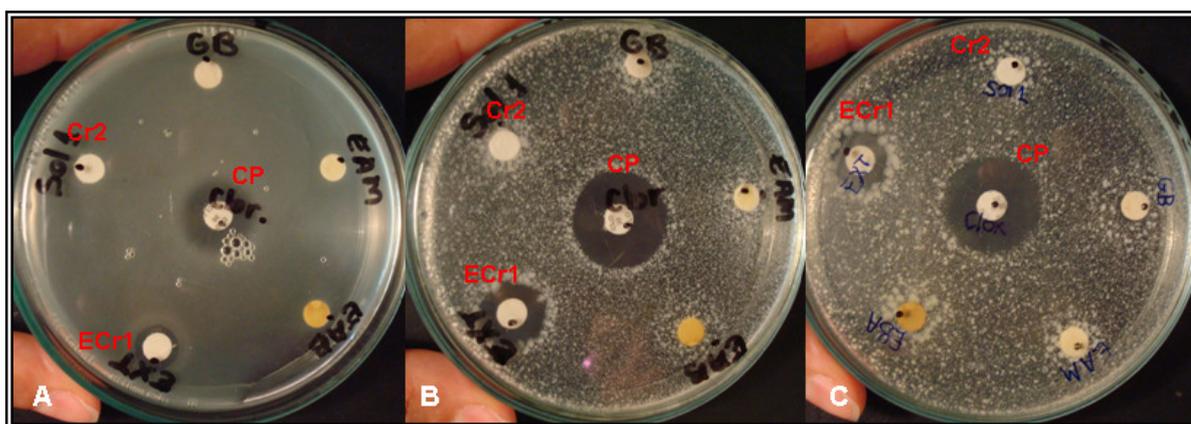


Figura 34 – Fotografias do teste de atividade antibacteriana em placas utilizando discos de papel. A: *Staphylococcus aureus*; B: *Listeria monocytogenes*; C: *Bacillus cereus*; ECr1: extrato do fungo *Clonostachys rosea f catenula*; Cr2: ergosterol; CP: cloranfenicol.

Para o fungo *Penicillium brasilianum* foram testados o extrato (EPb) e as substâncias puras austina, dehidroausitna e ácido penicílico. O resultado observado no teste é apresentado na **Tabela 24**.

O extrato EPb apresentou pequena atividade somente contra a bactéria Gram positiva *Staphylococcus aureus*. O ácido penicílico apresentou atividade antibacteriana contra todos os microrganismos testados, atividade já relatada na literatura (FRISVAD et al., 2004). As substâncias puras austina e dehidroaustina não apresentaram atividade antibacteriana. Apesar de o extrato conter o ácido penicílico, ele apresentou-se inativo contra a maioria das bactérias testadas na concentração

utilizada (100 µg/disco). A ausência de atividade do extrato pode ser justificada pela pequena concentração da substância ativa no extrato bruto (**Figura 16**).

Tabela 51 – Halos de inibição do crescimento bacteriano (em cm) para o extrato e substâncias puras obtidos do fungo *Penicillium brasilianum*.

Bactérias	Extrato/ Substâncias puras					
	EPb (100 µg)	Austina (100 µg)	Dehidroaustina (100 µg)	Ácido Penicílico (100 µg)	CP (30 µg)	CN
<i>S. aureus</i>	0,8	0,0	0,0	1,8	2,4	0,0
<i>L. monocytogenes</i>	0,0	0,0	0,0	2,6	2,8	0,0
<i>B. cereus</i>	0,0	0,0	0,0	1,5	1,7	0,0
<i>S. typhimurium</i>	0,0	0,0	0,0	1,5	2,8	0,0
<i>E. coli</i>	0,0	0,0	0,0	1,5	1,3	0,0
<i>C. freundii</i>	0,0	0,0	0,0	1,6	2,3	0,0

CP: controle positivo (cloranfenicol); CN: controle negativo

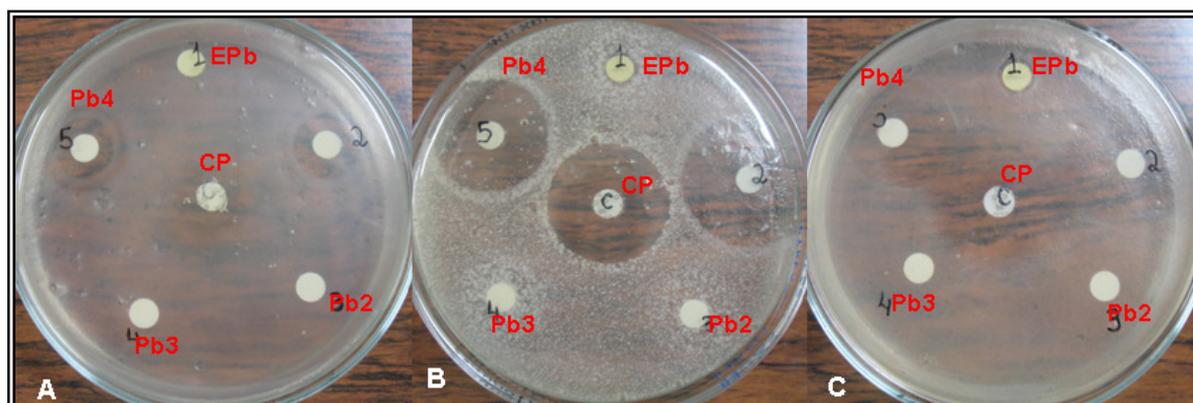


Figura 35 – Fotografias do teste de atividade antibacteriana em placas utilizando discos de papel. A: *Escherichia coli*; B: *Listeria monocytogenes*; C: *Staphylococcus aureus*; EPb: extrato do fungo *Penicillium brasilianum*; Pb2: austina; Pb3: dehidroaustina; Pb4: ácido penicílico; CP: cloranfenicol.

4.3.2. TESTE DE ATIVIDADE ANTIBACTERIANA – DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA – CIM

O extrato e algumas substâncias puras obtidas do cultivo do fungo *Penicillium brasilianum* foram analisadas no teste de atividade antibacteriana utilizado-se as bactérias Gram positivas *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Bacillus cereus* e as bactérias Gram negativas *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii* e *Pseudomonas aeruginosa*.

O extrato apresentou atividade inibitória mínima na concentração de 2 mg/mL contra todos os microrganismos testados. A substância pura ácido penicílico apresentou atividade inibitória mínima na concentração de 512 µg/mL contra as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa* e na concentração de 256 µg/mL contra as bactérias *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* e *Citrobacter freundii*, atividade já descrita na literatura (FRISVAD et al., 2004).

A substância pura austina não apresentou atividade antibacteriana na concentração testada (a partir de 512 µg/mL). Não existem relatos na literatura de atividades biológicas para essa substância. A substância pura dehidroaustina não foi submetida ao teste de atividade antibacteriana devido à pequena quantidade de material obtida. Entretanto, no trabalho realizado por Santos; Rodrigues-Filho, 2003b, a dehidroaustina foi submetida ao teste de atividade antibacteriana para a determinação da concentração inibitória mínima contra as bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus* sp. e não se mostrou ativa contra nenhum dos microrganismos testados.

A atividade antibacteriana apresentada pelo extrato é, provavelmente, devido à presença da micotoxina ácido penicílico. A **Tabela 25** apresenta os valores da concentração inibitória mínima para o extrato e substâncias puras obtidos do fungo *Penicillium brasilianum*.

Tabela 52 – Valores da concentração inibitória mínima para o extrato e substâncias puras obtidos do fungo *Penicillium brasilianum*.

Bactérias	Extrato/ Substâncias puras			
	EPb	Austina	Ácido Penicílico	Cloranfenicol
<i>S. aureus</i>	2 mg/mL	0,0	512 µg/mL	4 µg/mL
<i>L. monocytogenes</i>	2 mg/mL	0,0	256 µg/mL	8 µg/mL
<i>B. cereus</i>	2 mg/mL	0,0	256 µg/mL	8 µg/mL
<i>S. typhimurium</i>	2 mg/mL	0,0	512 µg/mL	8 µg/mL
<i>E. coli</i>	2 mg/mL	0,0	256 µg/mL	8 µg/mL
<i>C. freundii</i>	2 mg/mL	0,0	256 µg/mL	4 µg/mL
<i>P. aeruginosa</i>	2 mg/mL	0,0	512 µg/mL	8 µg/mL

4.3.3. TESTE DE ATIVIDADE ANTICOLINESTERÁSICA – ANÁLISE QUALITATIVA POR BIOAUTOGRAFIA (GIOVANNI et al., 2008)

O extrato e as substâncias puras obtidas do cultivo do fungo *Penicillium brasilianum* foram analisadas no teste de atividade anticolinesterásica. A atividade de inibição da enzima acetilcolinesterase é avaliada a partir da formação de manchas brancas. Entre as substâncias puras testadas, somente o ácido penicílico apresentou atividade (mancha branca), sendo esta ainda não relatada na literatura. O extrato não apresentou atividade devido, provavelmente, à pequena concentração do ácido penicílico no extrato bruto. A cromatoplaça correspondente ao teste é apresentada na **Figura 17**.

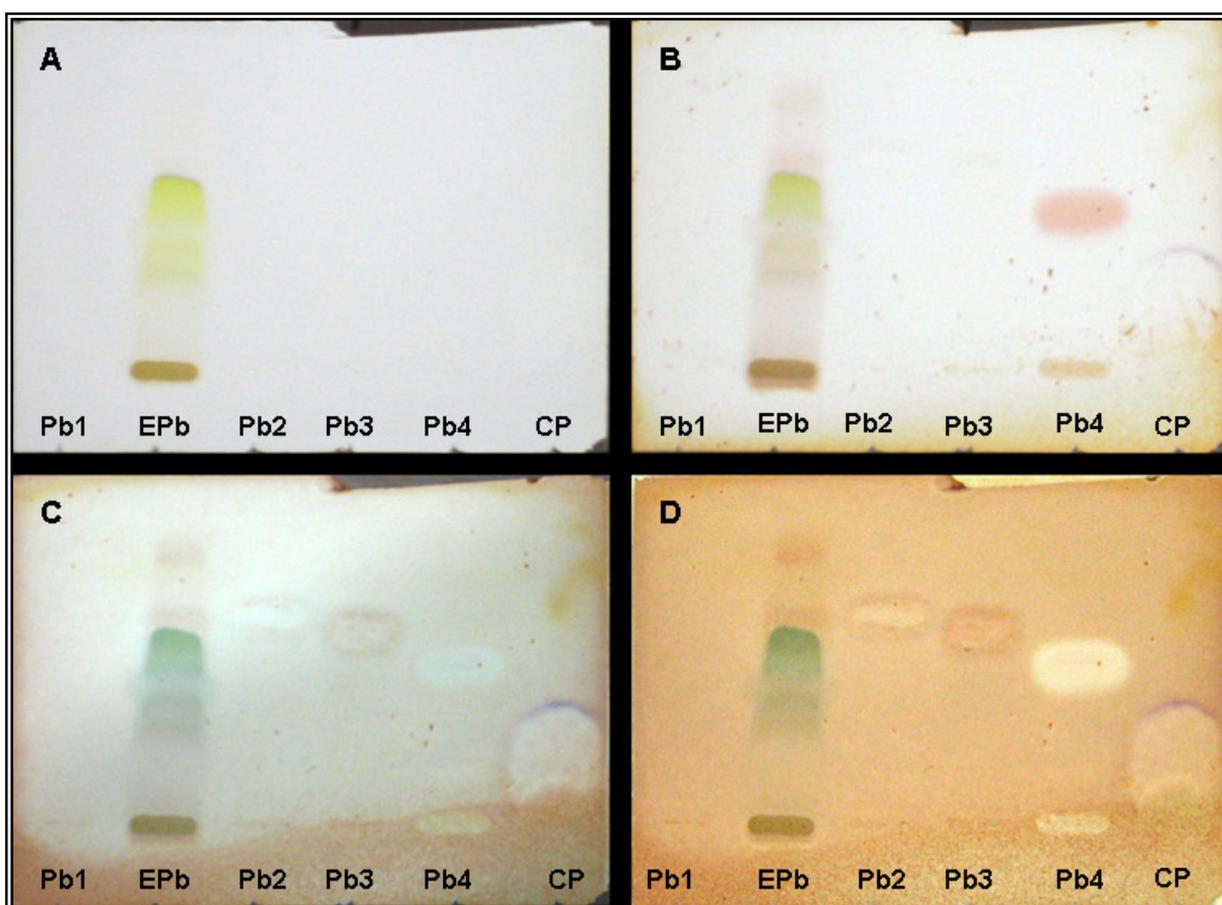


Figura 36 – Cromatoplaças do teste de atividade anticolinesterásica. A: placa após a eluição; B: Placa após a aplicação dos reagentes; C: Placa após 2 horas; D: placa após 6,5 horas; Pb1: manitol, EPb: extrato bruto do fungo *Penicillium brasilianum*; Pb2: austina; Pb3: dehidroaustina; Pb4: ácido penicílico; CP: controle positivo (huperzina A).

4.4. AVALIAÇÃO DA VARIAÇÃO NUTRICIONAL E A ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS EXTRATOS DO FUNGO *PENICILLIUM BRASILIANUM*

O fungo *Penicillium brasilianum* foi cultivado em diferentes meios de cultura e condições de cultivo com o objetivo de avaliar a melhor condição para a obtenção de substâncias com atividade antibacteriana, já que a produção de metabólitos secundários depende não somente da capacidade biossintética do organismo como também das condições de fermentação (TAKAHASHI; LUCAS, 2008).

A **Figura 18** apresenta os gráficos com os valores de extratos fúngicos obtidos nos diferentes meios de cultura e condições de cultivo. Como o volume de meio de cultura utilizado foi diferente para cada condição, os valores de extratos obtidos foram corrigidos para 100 mL de meio de cultura para a construção do gráfico. Como observado na **Figura 18**, os extratos obtidos da condição com agitação apresentaram um maior rendimento em relação aos outros extratos.

A **Figura 19** apresenta gráficos da quantidade de biomassa fúngica e da massa dos extratos obtidos na condição inerte (no meio de cultura líquido complexo e no caldo de batata dextrosado). Os gráficos da quantidade de biomassa fúngica e da massa dos respectivos extratos obtidos na condição com agitação (no meio de cultura líquido complexo e no caldo de batata dextrosado) estão apresentados na **Figura 20**.

Em relação à condição de cultivo inerte, pôde-se observar que o meio de cultura líquido complexo apresentou um maior rendimento em relação à biomassa fúngica produzida quando comparado ao caldo de batata dextrosado. O mesmo fato foi observado na condição de cultivo com agitação.

Segundo Takahashi; Lucas (2008), a biossíntese de metabólitos secundários é ativada, geralmente, na fase final do crescimento logarítmico ou na fase estacionária de fermentação, quando ocorre a diminuição na divisão celular e produção de biomassa. Esse fato pode ser observado no aumento, na maioria das condições, na massa dos extratos no tempo de 15 dias, quando o crescimento fúngico atingiu a fase estacionária (**Figuras 18, 19 e 20**).

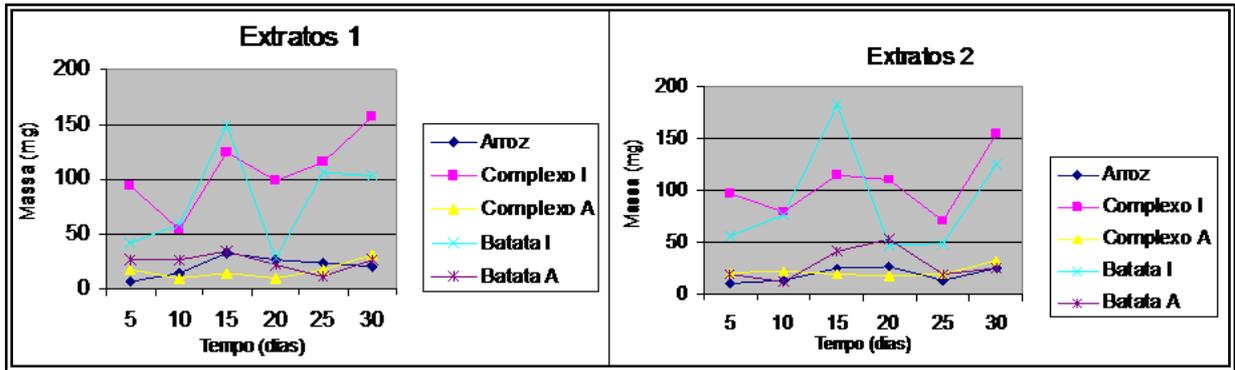


Figura 37 - Gráfico comparativo das massas dos extratos do fungo *Penicillium brasilianum* obtidos em condições diversas.

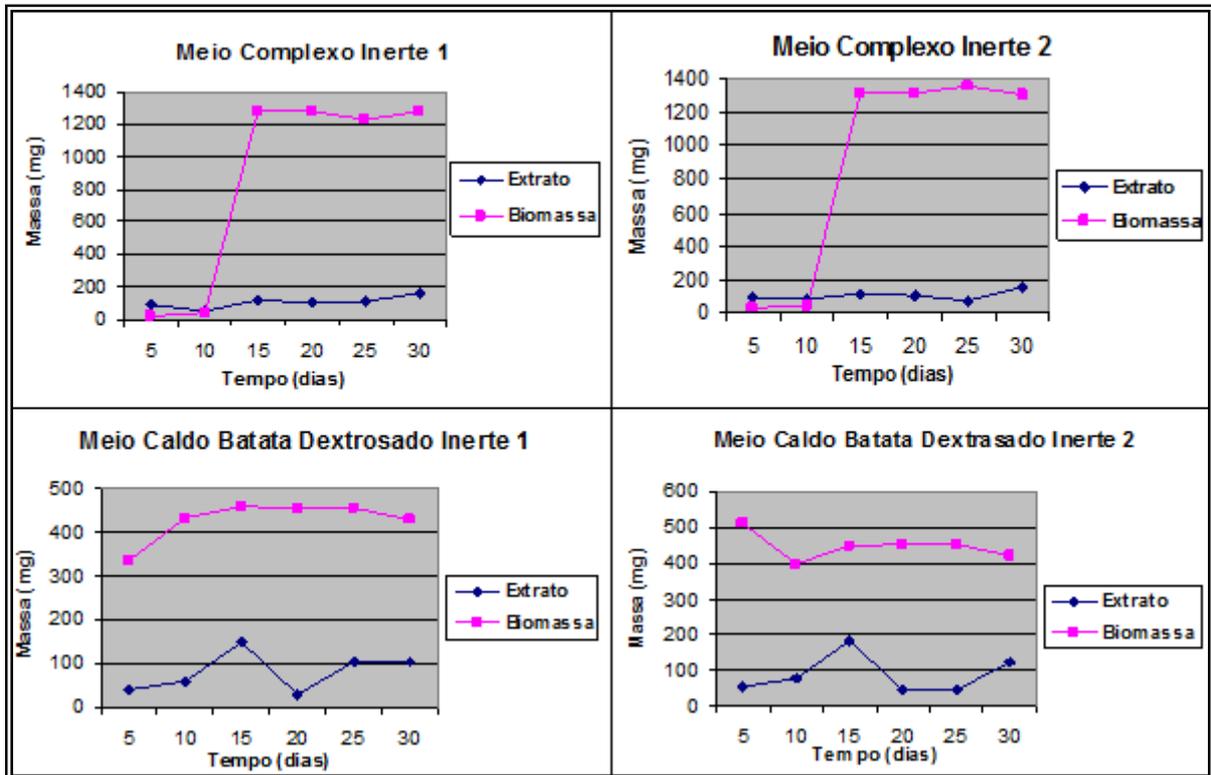


Figura 38 – Gráficos dos valores de biomassa fúngica e respectivos extratos obtidos na condição inerte no meio de cultura líquido complexo e no caldo de batata dextrado.

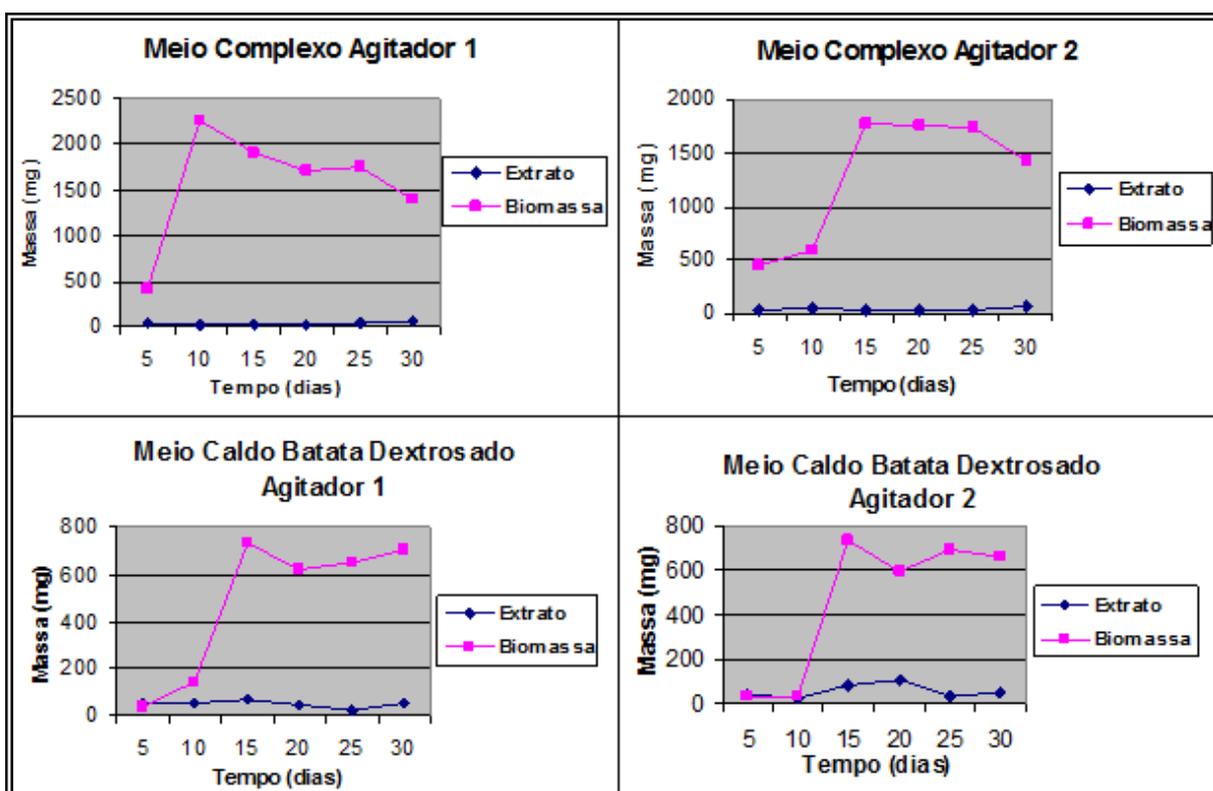


Figura 39 – Gráficos dos valores de biomassa fúngica e respectivos extratos obtidos na condição com agitação no meio de cultura líquido complexo e no caldo de batata dextrosado.

Alguns extratos foram submetidos a um teste preliminar de atividade antibacteriana contra as bactérias Gram positivas *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Bacillus cereus* e as bactérias Gram negativas *Escherichia coli* e *Citrobacter freundii*. O resultado do teste é apresentado na **Tabela 26**.

Tabela 53 – Halos de inibição do crescimento bacteriano (em cm) para os extratos Ar30-2, Mc30I-2, PDB15A-2 e PDB30I-2 obtidos do fungo *Penicillium brasilianum*.

Bactérias	Extrato/ Substâncias puras					CN
	Ar30-2 (100 µg)	Mc30I-2 (100 µg)	PDB15A-2 (100 µg)	PDB30I-2 (100 µg)	CP (30 µg)	
<i>S. aureus</i>	1,6	1,2	1,9	1,0	1,9	0,0
<i>L. monocytogenes</i>	1,0	0,9	1,8	1,0	2,5	0,0
<i>B. cereus</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	2,1	0,0
<i>E. coli</i>	0,0	0,0	1,2	0,8	1,3	0,0
<i>C. freundii</i>	0,0	0,0	1,4	1,1	2,2	0,0

Ar30-2: cultivo em meio arroz (30 dias); Mc30I-2: cultivo em meio líquido complexo na condição inerte (30 dias); PDB15A-2: cultivo em caldo batata dextrosado na condição com agitação (15 dias); PDB30I-2: cultivo em caldo batata dextrosado na condição inerte (30 dias); CP: controle positivo (cloranfenicol); CN: controle negativo.

A análise dos dados apresentados na **Tabela 26** mostrou que os extratos obtidos do caldo de batata dextrosado apresentaram atividade contra todas as bactérias testadas com exceção da bactéria *Bacillus cereus*. Já os extratos obtidos do cultivo em arroz e do meio de cultura líquido complexo apresentaram atividade somente contra os microrganismos *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*.

Em seguida, duas bactérias foram escolhidas para a realização do teste de atividade antibacteriana utilizando-se todos os extratos. A **Tabela 27** apresenta os resultados do teste para a bactéria *Listeria monocytogenes* e a **Tabela 28** apresenta os resultados contra a bactéria *Escherichia coli*.

Analisando os resultados apresentados nas **Tabelas 27 e 28** pôde-se observar que os extratos obtidos do cultivo em caldo de batata dextrosado apresentaram-se mais ativos que os demais extratos (halos de inibição maiores). Considerando-se as condições de cultivo inerte e com agitação, não foi observada diferença significativa em relação à atividade biológica dos extratos.

Apesar de os extratos obtidos do meio de cultura líquido complexo terem apresentado um maior rendimento em relação à massa obtida, eles não se mostraram mais ativos no teste de atividade antibacteriana do que os extratos obtidos do caldo de batata dextrosado.

Nesse contexto, pode-se considerar que, em relação à atividade antibacteriana, a melhor condição de preparo do extrato do fungo *Penicillium brasilianum* seria o cultivo em caldo batata dextrosado.

Tabela 54 – Halos de inibição do crescimento bacteriano (em cm) contra a bactéria *Listeria monocytogenes* dos extratos obtidos do fungo *Penicillium brasilianum*.

Meio arroz		Meio de cultura líquido complexo				Caldo batata dextrosado			
		Agitação		Inerte		Agitação		Inerte	
Extrato	Halo (cm)	Extrato	Halo (cm)	Extrato	Halo (cm)	Extrato	Halo (cm)	Extrato	Halo (cm)
Ar00-1	0,0	Mc00A-1	0,0	Mc00I-1	0,0	PDB00A-1	0,0	PDB00I-1	0,0
Ar00-2	0,0	Mc00A-2	0,0	Mc00I-2	0,0	PDB00A-2	0,0	PDB00I-2	0,0
Ar05-1	0,8	Mc05A-1	0,0	Mc05I-1	0,0	PDB05A-1	1,1	PDB05I-1	1,3
Ar05-2	0,9	Mc05A-2	0,0	Mc05I-2	0,0	PDB05A-2	1,1	PDB05I-2	1,1
Ar10-1	0,8	Mc10A-1	0,0	Mc10I-1	1,4	PDB10A-1	1,8	PDB10I-1	1,3
Ar10-2	0,8	Mc10A-2	0,8	Mc10I-2	1,2	PDB10A-2	1,6	PDB10I-2	1,4
Ar15-1	1,0	Mc15A-1	1,2	Mc15I-1	1,6	PDB15A-1	1,7	PDB15I-1	1,1
Ar15-2	0,8	Mc15A-2	0,9	Mc15I-2	1,6	PDB15A-2	1,8	PDB15I-2	0,9
Ar20-1	0,9	Mc20A-1	0,8	Mc20I-1	0,9	PDB20A-1	2,5	PDB20I-1	1,8
Ar20-2	1,1	Mc20A-2	0,8	Mc20I-2	1,0	PDB20A-2	1,5	PDB20I-2	1,8
Ar25-1	1,1	Mc25A-1	0	Mc25I-1	0,8	PDB25A-1	1,6	PDB25I-1	1,8
Ar25-2	1,3	Mc25A-2	0	Mc25I-2	1,0	PDB25A-2	1,1	PDB25I-2	1,8
Ar30-1	1,1	Mc30A-1	0,9	Mc30I-1	0,8	PDB30A-1	1,1	PDB30I-1	2,1
Ar30-2	1,0	Mc30A-2	1,0	Mc30I-2	1,1	PDB30A-2	2,3	PDB30I-2	1,3
CP	2,3	CP	2,8	CP	2,5	CP	2,3	CP	2,1
CN	0,0	CN	0,0	CN	0,0	CN	0,0	CN	0,0

CP: controle positivo (cloranfenicol); CN: controle negativo

Tabela 55 – Halos de inibição do crescimento bacteriano (em cm) contra a bactéria *Escherichia coli* dos extratos obtidos do fungo *Penicillium brasilianum*.

Meio arroz		Meio de cultura líquido complexo				Caldo batata dextrosado			
		Agitação		Inerte		Agitação		Inerte	
Extrato	Halo (cm)	Extrato	Halo (cm)	Extrato	Halo (cm)	Extrato	Halo (cm)	Extrato	Halo (cm)
Ar00-1	0,0	Mc00A-1	0,0	Mc00I-1	0,0	PDB00A-1	0,0	PDB00I-1	0,0
Ar00-2	0,0	Mc00A-2	0,0	Mc00I-2	0,0	PDB00A-2	0,0	PDB00I-2	0,0
Ar05-1	0,0	Mc05A-1	0,0	Mc05I-1	0,0	PDB05A-1	1,1	PDB05I-1	0,0
Ar05-2	0,0	Mc05A-2	1,3	Mc05I-2	0,0	PDB05A-2	1,0	PDB05I-2	1,1
Ar10-1	0,0	Mc10A-1	0,0	Mc10I-1	0,0	PDB10A-1	0,0	PDB10I-1	1,4
Ar10-2	0,0	Mc10A-2	0,0	Mc10I-2	0,0	PDB10A-2	0,0	PDB10I-2	1,0
Ar15-1	0,0	Mc15A-1	0,0	Mc15I-1	1,4	PDB15A-1	1,3	PDB15I-1	0,0
Ar15-2	0,0	Mc15A-2	0,0	Mc15I-2	1,4	PDB15A-2	1,3	PDB15I-2	0,0
Ar20-1	0,0	Mc20A-1	0,0	Mc20I-1	0,0	PDB20A-1	0,0	PDB20I-1	1,4
Ar20-2	0,0	Mc20A-2	0,0	Mc20I-2	0,0	PDB20A-2	1,2	PDB20I-2	1,4
Ar25-1	0,0	Mc25A-1	0,0	Mc25I-1	0,0	PDB25A-1	1,0	PDB25I-1	1,3
Ar25-2	0,0	Mc25A-2	0,0	Mc25I-2	1,0	PDB25A-2	1,0	PDB25I-2	0,0
Ar30-1	0,0	Mc30A-1	0,0	Mc30I-1	0,0	PDB30A-1	1,4	PDB30I-1	0,0
Ar30-2	0,0	Mc30A-2	0,0	Mc30I-2	0,0	PDB30A-2	1,4	PDB30I-2	0,0
CP	1,4	CP	1,3	CP	1,5	CP	1,5	CP	1,4
CN	0,0	CN	0,0	CN	0,0	CN	0,0	CN	0,0

CP: controle positivo (cloranfenicol); CN: controle negativo

CAPÍTULO 5

Conclusão

CONCLUSÃO

Nesse trabalho foi realizado o estudo de bioprospeccção de metabólitos secundários dos fungos filamentosos *Clonostachys rosea f catenulata* e *Penicillium brasilianum*.

Os extratos do fungo *Clonostachys rosea f catenulata* apresentaram atividade antibacteriana seletiva, sendo ativos somente contra as bactérias Gram positivas. Do fracionamento cromatográfico desses extratos foram isolados uma mistura de triacilgliceróis, o ergosterol e uma mistura de ácidos graxos livres, que não apresentaram atividade antibacteriana. Essas substâncias correspondem a diferentes classes de lipídeos produzidas por fungos, sendo o ergosterol o esteróide mais abundante da membrana celular de fungos.

O extrato do fungo *Penicillium brasilianum* apresentou atividade antibacteriana no teste de determinação da concentração inibitória mínima contra todos os microrganismos testados. Do fracionamento cromatográfico desse extrato foram isolados o poliol manitol, os meroterpenos austina e dehidroaustina e o ácido penicílico. O manitol corresponde ao carboidrato mais comumente isolado de fungos e os meroterpenos da classe da austina são metabólitos secundários produzidos por espécies de fungos do gênero *Penicillium* e *Aspergillus*. As substâncias purificadas foram submetidas ao teste de atividade antibacteriana. Os meroterpenos austina e dehidroaustina não apresentaram atividade antibacteriana. Já o ácido penicílico apresentou atividade contra todos os microrganismos testados, atividade já relatada na literatura. O extrato e substâncias puras obtidos do fungo *Penicillium brasilianum* também foram submetidos ao teste de atividade anticolinesterárica, sendo que somente o ácido penicílico apresentou-se ativo. Apesar de já relatado na literatura o isolamento da austina, essa substância apresenta-se muito promissora na área farmacêutica devido à carência de atividades biológicas descritas para a mesma.

O fungo *Penicillium brasilianum* foi submetido à avaliação da variação nutricional e atividade antibacteriana dos extratos obtidos. Das condições analisadas, o cultivo em caldo batata dextrosado mostrou-se o mais promissor para a obtenção de substâncias com atividade antibacteriana. Em relação à quantidade de extrato produzida, a condição com agitação apresentou maior rendimento tanto para o meio de cultura líquido complexo quanto para o caldo de batata dextrosado. Já em relação à produção de biomassa, o meio de cultura líquido complexo apresentou-se como o mais promissor.

CAPÍTULO 6

Referências Bibliográficas

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRUZZO, G. K.; GILL, C. J.; FLATTERY, A. M.; KONG, L.; LEIGHTON, C.; SMITH, J. G.; PIKOUNIS, V. B.; BARTIZAL, K.; ROSEN, H. Efficacy of the echinocandin caspofungin against disseminated aspergillosis and candidiasis in cyclophosphamide-induced immunosuppressed mice. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 9, p. 2310 – 2318, 2000.

AFIYATULLOV, S. S.; KALINOVSKII, A. I.; PIVKIN, M. V.; DMITRENOK, P. S.; KUZNETSOVA, T. A. Fumitremorgins from the marine isolate of the fungus *Aspergillus fumigatus*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 40, n. 6, p. 615 – 617, 2004.

ALLISON, A. C. Immunosuppressive drugs: the first 50 years and a glance forward. **Immunopharmacology**, v. 47, p. 63 – 83, 2000.

BACON, C. W.; SWEENEY, J. G.; ROBBINS, J. D.; BURDICK, D. Production of penicillic acid and ochratoxin A on poultry feed by *Aspergillus ochraceus*: temperature and moisture requirements. **Applied Microbiology**, v. 26, n. 2, p. 155 – 160, 1973.

BARBOSA-FILHO, J. M.; MEDEIROS, K. C. P.; DINIZ, M. F. F. M.; BATISTA, L. M.; ATHAYDE-FILHO, P. F.; SILVA, M. S.; DA-CUNHA, E. V. L.; ALMEIDA, J. R. G. S.; QUINTAS-JÚNIOR, L. J. Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 2, p. 258 – 285, 2006.

BASSO, L. A.; SILVA, L. H. P.; FETT-NETO, A. G.; JUNIOR, W. F. A.; MOREIRA, I. S.; PALMA, M. S.; CALIXTO, J. B.; FILHO, S. A.; SANTOS, R. R.; SOARES, M. B. P.; SANTOS, D. S. The use of biodiversity as source of new chemical entities against defined molecular targets for treatment of malaria, tuberculosis, and T-cell mediated diseases – A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 6, p. 575 – 606, 2005.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIES, J. C.; THURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disc method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, p. 493, 1966.

BENNETT, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n. 3, p. 497 – 516, 2003.

BÉRDY, J. Bioactive microbial metabolites. **The Journal of Antibiotics**, v. 58, n. 1, p. 1 – 26, 2005.

BLANCHFLOWER, S. E.; BANKS, R. M.; EVERETT, J. R.; MANGER, B. R.; READING, C. New paraherquamide antibiotics with anthelmintic activity. **The Journal of Antibiotics**, v. 44, n. 5, p. 492 – 497, 1991.

BOWMAN, J. C.; HICKS, P. S.; KURTZ, M. B.; ROSEN, H.; SCHMATZ, D. M.; LIBERATOR, P. A.; DOUGLAS, C. M. The antifungal echinocandin caspofungin acetate kills growing cells of *Aspergillus fumigatus* *in vitro*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 9, p. 3001 – 3012, 2002.

BRACARENSE, A. A. P. **Isolamento, preparo de derivados e bioprospecção da atividade biológica de metabólitos de fungos filamentosos**. 2008. 130f. (Dissertação de mestrado em química – química orgânica) – Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

BRIDGE, P.; SPOONER, B. Soil fungi: diversity and detection. **Plant and Soil**, v. 232, p. 147 – 154, 2001.

BROSS–WALCH, N.; KÜHN, T.; MOSKAU, D.; ZERBE, O. Strategies and tools for structure determination of natural products using modern methods of NMR spectroscopy. **Chemistry and Biodiversity**, v. 2, p. 147 – 177, 2005.

BROWN, E. D.; WRIGHT, G. D. New targets and screening approaches in antimicrobial drug discovery. **Chemical Reviews**, v. 105, n. 2, p. 759 – 774, 2005.

CASTRO, A. P., QUIRINO, B. F.; PAPPAS–JR, G.; KUROKAWA, A. S.; NETO, E. L.; KRÜGER, R. H. Diversity of soil fungal communities of Cerrado and its closely surrounding agriculture fields. **Archives of Microbiology**, v. 190, p. 129 – 139, 2008.

CHATTERTON, S.; JAYARAMAN, J.; PUNJA, Z. K. Colonization of cucumber plants by the biocontrol fungus *Clonostachys rosea* f. *catenulata*. **Biological Control**, v. 46, p. 267 – 278, 2008.

CHAVES, M. H.; BARBOSA, A. S.; NETO, J. M. M.; AUED–PIMENTEL, S.; LAGO, J. H. G. Caracterização química do óleo da amêndoa de *Sterculia striata* St. Hil. et Naud. **Química Nova**, v. 27, n. 3, p. 404 – 408, 2004.

CHEXAL, K. K.; SPRINGER, J. P.; CLARDY, J.; COLE, R. J.; KIRKSEY, J. W.; DORNER, J. W.; CUTLER, H. G.; STRAWTER, B. J. Austin, a novel polyisoprenoid mycotoxin from *Aspergillus ustus*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 98, n. 21, p. 6748 – 6750, 1976.

COUTO, W. J.; BRANCO, J. N. R.; ALMEIDA, D.; CARVALHO, A. C.; VICK, R.; TELES, C. A.; AGUIAR, L. F.; BUFFOLO, E. Transplante cardíaco e infecção. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, v. 16, n. 2, p. 141 – 151, 2001.

CUETO, M.; MACMILLAN, J. B.; JENSEN, P. R.; FENICAL, W. Tropolactones A – D, four meroterpenoids from a marine-derived fungus of the genus *Aspergillus*. **Phytochemistry**, v. 67, p. 1826 – 1831, 2006.

DANIEL, R. The soil metagenome – a rich resource for the discovery of novel natural products. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 15, p. 199 – 204, 2004.

DE OLIVEIRA, P. S. M.; FERREIRA, V. F.; DE SOUZA, M. V. N. Utilização do D-manitol em síntese orgânica. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 441 – 452, 2009.

DEMAIN, A. L. Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 52, p. 455 – 463, 1999.

FEOFILOVA, E. P. The kingdom fungi: heterogeneity of physiological and biochemical properties and relationships with plants, animals, and prokaryotes (Review). **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 37, n. 2, p. 124 – 137, 2001.

FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium* – A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. **Studies in Mycology**, v. 49, p. 1 – 174, 2004.

FRISVAD, J. C.; SMEDSGAARD, J.; LARSEN, T. O.; SAMSON, R. A. Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*. **Studies in Mycology**, v. 49, p. 201 – 241, 2004.

FUJITA, T.; MAKISHIMA, D.; AKIYAMA, K.; HAYASHI, H. New convulsive compounds, brasiliamides A and B, from *Penicillium brasilianum* Batista JV-379. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 66, n. 8, p. 1697 – 1705, 2002.

FUJITA, T.; HAYASHI, H. New brasiliamide congeners, brasiliamides C, D and E, from *Penicillium brasilianum* Batista JV-379. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 68, n. 4, p. 820 – 826, 2004.

GAMS, W.; HOEKSTRA, E. S.; APTROOT, A. **CBS Course of mycology**. 4. ed. Holanda: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 1998. 165p.

GIOVANNI, S. D.; BORLOZ, A.; URBAIN, A.; MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K.; CARRUPT, P. A.; REIST, M. *In vitro* screening assays to identify natural or synthetic acetylcholinesterase inhibitors: Thin layer chromatography *versus* microplate methods. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 33, p. 109 – 119, 2008.

GUNATILAKA, A. A. L. Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 3, p. 509 – 526, 2006.

HAGIWARA, S.; TAKAHASHI, M.; SHEN, Y.; KAIHOU, S.; TOMIYAMA, T.; YAZAWA, M.; TAMAI, Y.; SIN, Y.; KAZUSAKA, A.; TERAZAWA, M. A phytochemical in the Edible Tamogi-take mushroom (*Pleurotus cornucopiae*), D-mannitol, inhibits ACE activity and lowers the blood pressure of spontaneously hypertensive rats. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v. 69, n. 8, p. 1603 – 1605, 2005.

HANDELSMAN, J.; RONDON, M. R.; BRADY, S. F.; CLARDY, J.; GOODMAN, R. M. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. **Chemistry and Biology**, v. 5, n. 10, p. 245 – 249, 1998.

HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. (ED.). **Goodman e Gilman as bases farmacológicas da terapêutica**. 10 ed. Rio de Janeiro: Mac Graw-Hill, 2003. 1647p.

HAYASHI, H.; MUKAIHARA, M.; MURAO, S.; ARAI, M.; LEE, A. Y.; CLARDY, J. Acetoxhydroaustin, a new bioactive compound, and related compound neo-austin from *Penicillium* sp. MG-11. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 58, n. 2, p. 334 – 338, 1994.

HOFFMEISTER, D.; KELLER, N. P. Natural products of filamentous fungi: enzymes, genes, and their regulation. **Natural Product Reports**, v. 24, p. 393 – 416, 2007.

HOUGHTON, P. J.; RENA, A. Y.; HOWESB, M. J. Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. **Natural Product Reports**, v. 23, p. 181 – 199, 2006.

HUSSEIN, H. S.; BRASEL, J. M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, v. 167, p. 101 – 134, 2001.

ICHIMURA, K.; KOHATA, K.; GOTO, R. Soluble carbohydrates in *Delphinium* and their influence on sepal abscission in cut flowers. **Physiologia Plantarum**, v. 108, p. 307 – 313, 2000.

JOSHI, B. K.; GLOER, J. B.; WICKLOW, D. T. New verticillin and glisoprenin analogues from *Gliocladium catenulatum*, a mycoparasite of *Aspergillus flavus* Sclerotia. **Journal of Natural Products**, v. 62, n. 5, p. 730 – 733, 1999.

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

KOEHN, F. E.; CARTER, G. T. The evolving role of natural products in drug discovery. **Nature Reviews**, v. 4, p. 206 – 220, 2005.

KOHNO, J.; NISHIO, M.; SAKURAI, M.; KAWANO, K.; HIRAMATSU, H.; KAMEDA, N.; KISHI, N.; YAMASHITA, T.; OKUDA, T.; KOMATSUBARA, S. Isolation and structure determination of TMC-151s: novel polyketide antibiotics from *Gliocladium catenulatum* Gilman & Abbott TC 1280. **Tetrahedron**, v. 55, p. 7771 – 7786, 1999.

KOMAI, S.; HOSOE, T.; ITABASHI, T.; NOZAWA, K.; OKADA, K.; TAKAKI, G. M. C.; YAGUCHI, T.; TAKIZAWA, K.; FUKUSHIMA, K.; KAWAI, K-I. Two new meroterpenoids, penisimplicin A and B, isolated from *Penicillium simplicissimum*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 53, n. 9, p. 1114 – 1117, 2005.

KOSEMURA, S. Meroterpenoids from *Penicillium citreo-viride* B. IFO 4692 and 6200 hybrid. **Tetrahedron**, v. 59, p. 5055 – 5072, 2003.

LIDA, M.; OOI, T.; KITO, K.; YOSHIDA, S.; KANO, K.; SHIZURI, Y.; KUSUMI, T. Three new polyketide-terpenoid hybrids from *Penicillium* sp. **Organic Letters**, v. 10, n. 5, p. 845 – 848, 2008.

LISTON, D. R.; NIELSEN, J. A.; VILLALOBOS, A.; CHAPIN, D.; JONES, S. B.; HUBBARD, S. T.; SHALABY, I. A.; RAMIREZ, A.; NASON, D.; WHITE, W. F. Pharmacology of selective acetylcholinesterase inhibitors: implications for use in Alzheimer's disease. **European Journal of Pharmacology**, v. 486, p. 9 – 17, 2004.

LÓPEZ-GRESA, M. P.; GONZÁLEZ, M. C.; CIAVATTA, L.; AYALA, I.; MOYA, P.; PRIMO, J. Insecticidal activity of paraherquamides, including paraherquamide H and paraherquamide I, two new alkaloids isolated from *Penicillium cluniae*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 8, p. 2921 – 2925, 2006.

MANZONI, M.; ROLLINI, M. Biosynthesis and biotechnological production of statins by filamentous fungi and application of these cholesterol-lowering drugs. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 58, p. 555 – 564, 2002.

MARRIS, E. The forgotten ecosystem. **Nature**, v. 437, n.13, p. 944 – 945, 2005.

MOSS, M. O. Fungal metabolites. **Encyclopedia of Life Sciences**. John Wiley & Sons, Ltd.: Chichester, 2002. Disponível em:
< <http://www.els.net/doi10.1038/npg.els.0000360>>. Acesso em: 28/04/2009.

MOURAD, M.; MALAISE, J.; EDDOUR, D. C.; MEYER, M.; KÖNIG, J.; SCHEPERS, R.; SQUIFFLET, J. P.; WALLEMACQ, P. Correlation of mycophenolic acid pharmacokinetic parameters with side effects in kidney transplant patients treated with mycophenolate mofetil. **Clinical Chemistry**, v. 47, N. 1, p. 88 – 94, 2001.

MURNAGHAN, M. F. The pharmacology of penicillic acid. **Journal of Pharmacology**, v. 88, p. 119 – 132, 1946.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; FONSECA, G. A. B.; KENT, J. Biodiversity Hotspots for Conservation Priorities. **Nature**, v. 403, p. 853 – 858, 2000.

NETO, G. G.; MORAIS, R. G. Recursos medicinais de espécies do cerrado de mato grosso: um estudo bibliográfico. **Acta Botânica Brasilica**, v. 17, n. 4, p. 561 – 584, 2003.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v.70, n. 3, p. 461 – 477, 2007.

NISHIYAMA, M.; KUGA, T.; Pharmacological effects of the tremorgenic mycotoxin fumitremorgin A. **Japanese Journal of Pharmacology**, v. 40, p. 481 – 489, 1986.

OKUDA, T.; KOHNO, J.; KISHI, N.; ASAI, Y.; NISHIO, M.; KOMATSUBARA, S. Production of TMC–151, TMC–154 and TMC–171, a new class of antibiotics, is specific to "*Gliocladium roseum*" group. **Mycoscience**, v. 41, p. 239 – 253, 2000.

PARK, C.; BENNION, B.; FRANÇOIS I. E. J. A.; FERKET, K. K. A.; CAMMUE, B. P. A.; THEVISSSEN, K.; LEVERY, S. B. Characterization of neutral glycolipids of the model filamentous fungus, *Neurospora crassa*: Altered expression in plant defensin-resistant mutants. **Journal of Lipids Research**, v. 46, p. 759 – 768, 2005.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, n. 1, p. 45 – 61, 2002.

PROJAN, S. J. Why is big Pharma getting out of antibacterial drug discovery? **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, p. 427 – 430, 2003.

PUNJA, Z. K.; UTKHEDE, R. S. Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. **TRENDS in Biotechnology**, v. 21, n. 9, p. 400 – 407, 2003.

QUIRINO, B. F.; PAPPASA, G. J.; TAGLIAFERROA, A. C.; COLLEVATTIA, R. G.; NETO, E. L.; SILVA, M. R. S. S.; BUSTAMANTE, M. M. C.; KRÜGER, R. H. Molecular phylogenetic diversity of bacteria associated with soil of the savanna-like Cerrado vegetation. **Microbiological Research**, v. 164, p. 59 – 70, 2009.

RACCHI, M.; MAZZUCHELLI, M.; PORRELLO, E.; LANNI, C.; GOVONI, S. Acetylcholinesterase inhibitors: novel activities of old molecules. **Pharmacological Research**, v. 50, p. 441 – 451, 2004.

RUESS, L.; HÄGGBLUM, M. M.; ZAPATA, E. J. G.; DIGHTON, J. Fatty acids of fungi and nematodes – possible biomarkers in the soil food chain? **Soil Biology and Biochemistry**, v. 34, p. 745 – 556, 2002.

SANTOS, R. M. G. **Metabolismo secundário dos fungos *Penicillium* sp. e *Fusarium moniliforme* isolados como endofíticos de *Melia azedarach* (Meliaceae)**. 2003. 432f. (Dissertação de doutorado em ciências – química orgânica) – Departamento de Química, Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, 2003.

SANTOS, R. M. G.; RODRIGUES-FILHO, E. Meroterpenes from *Penicillium* sp found in association with *Melia azedarach*. **Phytochemistry**, v. 61, p. 907 – 912, 2002.

SANTOS, R. M. G.; RODRIGUES-FILHO, E. Further meroterpenes produced by *Penicillium* sp., an endophyte obtained from *Melia azedarach*. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 58, p. 663 – 669, 2003a.

SANTOS, R. M. G.; RODRIGUES-FILHO, E. Structures of meroterpenes produced by *Penicillium* sp, an endophytic fungus found associated with *Melia azedarach*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 5, p. 722 – 727, 2003b.

SCHROERS, H. J. A monograph of *Bionectria* (Ascomyctoa, Hypocreales, Bionectriaceae) and its *Clonostachys* anamorphs. **Studies in Mycology**, v. 46, p. 1 – 214, 2001.

SCHROERS, H. J.; SAMUELS, G. J.; SEIFERT, K. A.; GAMS, W. Classification of the mycoparasite *Glioclasidium roseum* in *Clonostachys* as *C. rosea*, its relationships to *Bionectria ochroleuca* and notes on other *Gliocladium*-like fungi. **Mycologia**, v. 90, p. 365 – 385, 1999.

SHIOMI, K.; TOMODA, H.; OTOGURO, K.; OMURA, S. Meroterpenoids with various biological activities produced by fungi. **Pure and Applied Chemistry**, v. 71, n. 6, p. 1059 – 1064, 1999.

SILVEIRA, G. P.; NOME, F.; GESSER, J. C.; SÁ, M. M.; TEREZI, H. Estratégias utilizadas no combate à resistência bacteriana. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 844 – 855, 2006.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**. 7ed. New York: John Wiley & Sons, 2005. 550p.

SIMPSON, T. J.; STENZEL, D. J.; BARTLETT, A. J.; O'BRIEN, E.; HOLKER, J. S. E. Studies on fungal metabolites. Part 3. ¹³C NMR spectral and structural studies on austin and new related meroterpenoids from *Aspergillus ustus*, *Aspergillus varicolor*, and *Penicillium diversum*. **Journal of Chemical Society Perkin Transactions I**, p. 2687 – 2692, 1982.

SINGH, S. B.; BARRETT, J. F. Empirical antibacterial drug discovery – Foundation in natural products. **Biochemical Pharmacology**, v. 71, p. 1006 – 1015, 2006.

SOLOMON, P. S.; WATERS, O. D. C.; OLIVER, R. P. Decoding the mannitol enigma in filamentous fungi. **TRENDS in Microbiology**, v. 15, n. 6, p. 257 – 262, 2007.

SONJAK, S.; FRISVAD, J. C.; GUNDE-CIMERMAN, N. *Penicillium* mycobiota in Arctic subglacial ice. **Microbial Ecology**, v. 52, p. 207 – 216, 2006.

SONJAK, S.; URSIC, V.; FRISVAD, J. C.; GUNDE-CIMERMAN, N. *Penicillium svalbardense*, a new species from Arctic glacial ice. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 92, p. 43 – 51, 2007.

SORGER, D.; DAUM, G. Synthesis of triacylglycerols by the Acyl-Coenzyme A: Diacyl-Glycerol Acyltransferase Dga1p in lipid particles of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 2, p. 519 – 524, 2002.

STOCKING, E. M.; SANZ-CERVERA, J. F.; UNKEFER, C. J.; WILLIAMS, R. M. Studies on the biosynthesis of paraherquamide. Construction of the amino acid framework. **Tetrahedron**, v. 57, p. 5303 – 5320, 2001.

STROHL, W. R. The role of natural products in a modern drug discovery program. **Drug Discovery Today**, v. 5, n. 2, p. 39 – 41, 2000.

TAKAHASHI, J. A.; LUCAS, E. M. F. Ocorrência e diversidade estrutural de metabólitos fúngicos com atividade antibiótica. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1807 – 1813, 2008.

TAKAHASHI, J. A.; MONTEIRO DE CASTRO, M. C.; SOUZA G.G.; LUCAS, E. M. F.; BRACARENSE, A. A. P.; ABREU, L. M.; MARRIEL, I. E.; OLIVEIRA, M. S.; FLOREANO, M. B.; OLIVEIRA, T. S. Isolation and screening of fungal species isolated from Brazilian cerrado soil for antibacterial activity against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus pyogenes* and *Listeria monocytogenes*. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 18, p. 198 – 204, 2008.

TAKAKU, T.; KIMURA, Y.; OKUDA, H. Isolation of an antitumor compound from *Agaricus blazei* Murill and its mechanism of action. **The Journal of Nutrition**, v. 131, p. 1409 – 1413, 2001.

TKACZ, J. S.; DIDOMENICO, B. Antifungals: what's in the pipeline. **Current Opinion in Microbiology**, v. 4, p. 540 – 545, 2001.

TUTHILL, D. E.; FRISVAD, J. C.; CHRISTENSEN, M. Systematics of *Penicillium simplicissimum* based on rDNA sequences, morphology and secondary metabolites. **Mycologia**, v. 93, n. 2, p. 298 – 308, 2001.

VICCINI, G. **Otimização da produção de esporos do fungo *Clonostachys rosea* – um biopesticida para a cultura do morangueiro**. 2004. 132f. (Dissertação de mestrado em ciências – bioquímica) – Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2004.

VIEGAS Jr., C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326 – 337, 2006.

VILLAS BÔAS, G. K.; GADELHA, C. A. G. Oportunidades na indústria de medicamentos e a lógica do desenvolvimento local baseado nos biomas brasileiros: bases para a discussão de uma política nacional. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 23, n. 6, p. 1463 – 1471, 2007.

WEITZ-SCHMIDT, G. Statins as anti-inflammatory agents. **TRENDS in Pharmacological Sciences**, v. 23, n. 10, p. 482 – 487, 2002.

WONG, S. M.; KULLNIG, R.; DEDINAS, J.; APPELL, K. C.; KYDD, G. C.; GILLUM, A. M.; COOPER, R. Anthrotainin, an inhibitor of substance P binding produced by *Gliocladium catenulatum*. **Journal of Antibiotics**, v. 46, n. 2, p. 214 – 221, 1993.

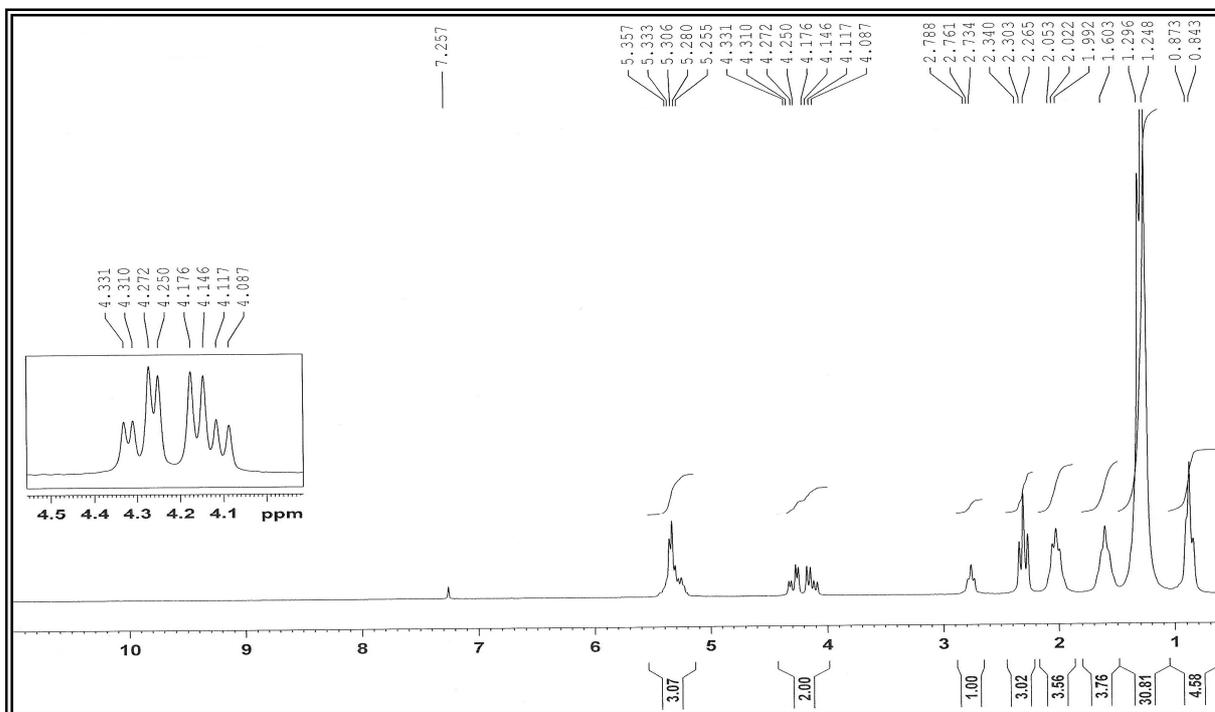
ZHANG, Y.; MILLS, G. L.; NAIR, M. G. Cyclooxygenase inhibitory and antioxidant compounds from the mycelia of the edible mushroom *Grifola frondosa*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 26, p. 7581 – 7585, 2002.

ZHAO X. R.; LINA, Q.; BROOKES, P. C. Does soil ergosterol concentration provide a reliable estimate of soil fungal biomass? **Soil Biology and Biochemistry**, v. 37, p. 311 – 317, 2005.

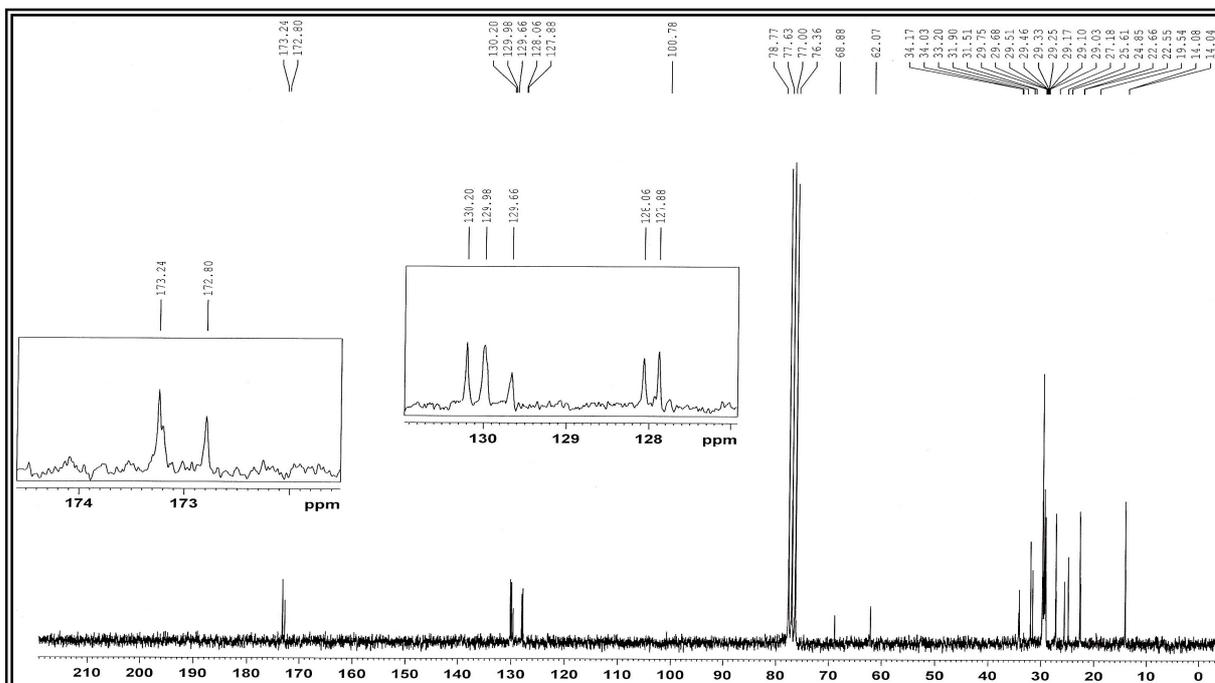
Anexos

ANEXO 1. ESPECTROS DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DO FUNGO *CLONOSTACHYS ROSEA F CATENULATA*

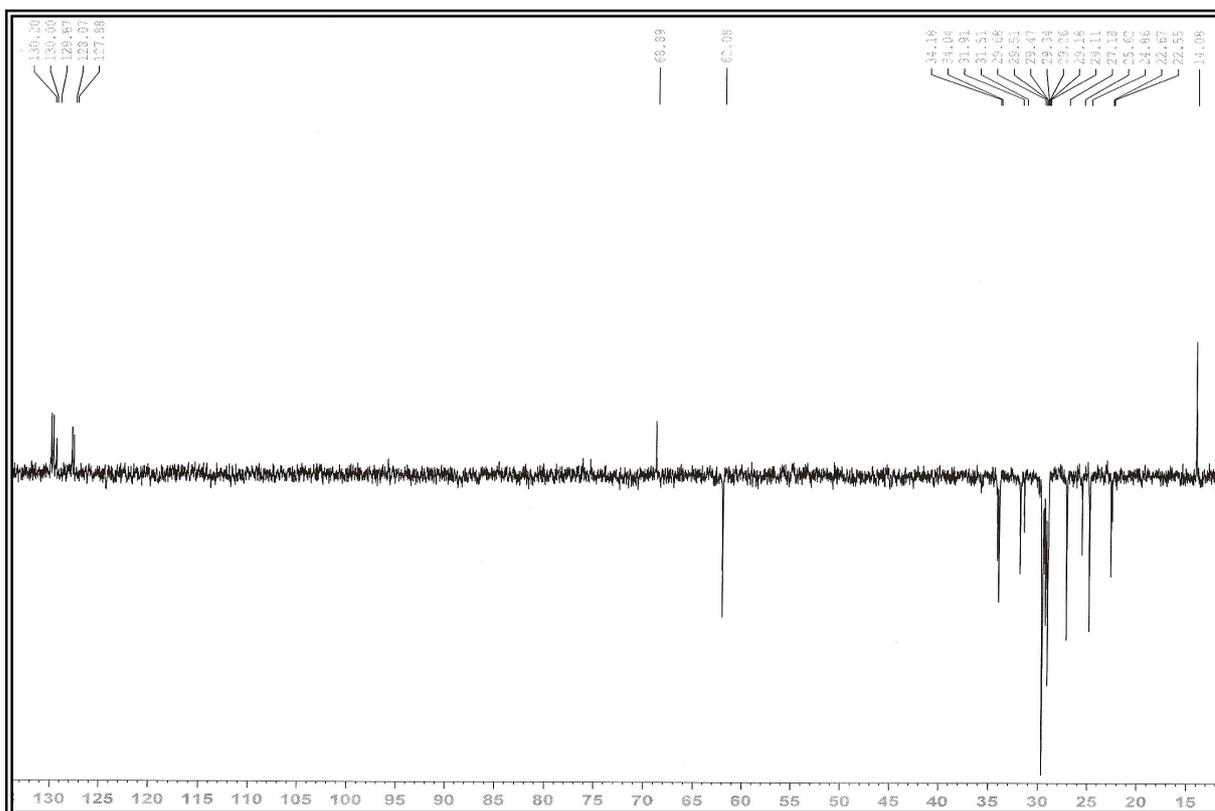
1.1 – Cr1 (Mistura de triacilgliceróis)



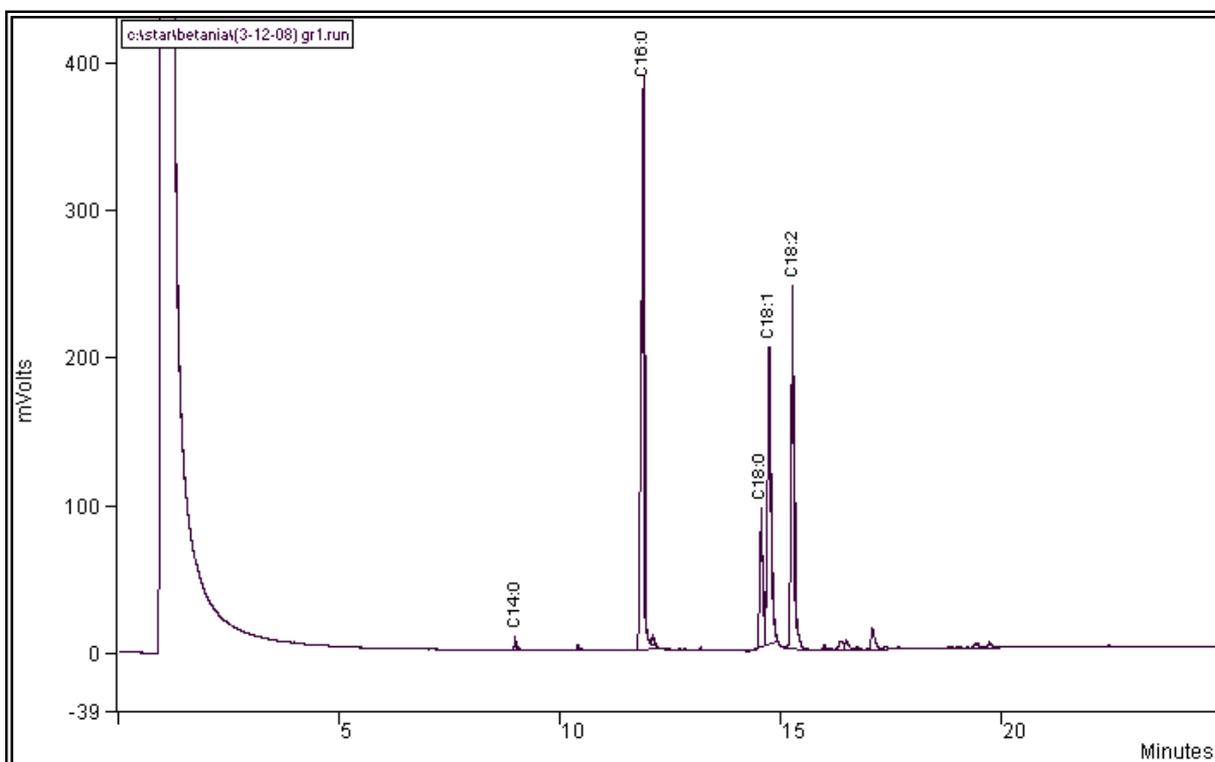
Anexo 1.1.1 – Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3 , δ) de Cr1.



Anexo 1.1.2 – Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , δ) de Cr1.

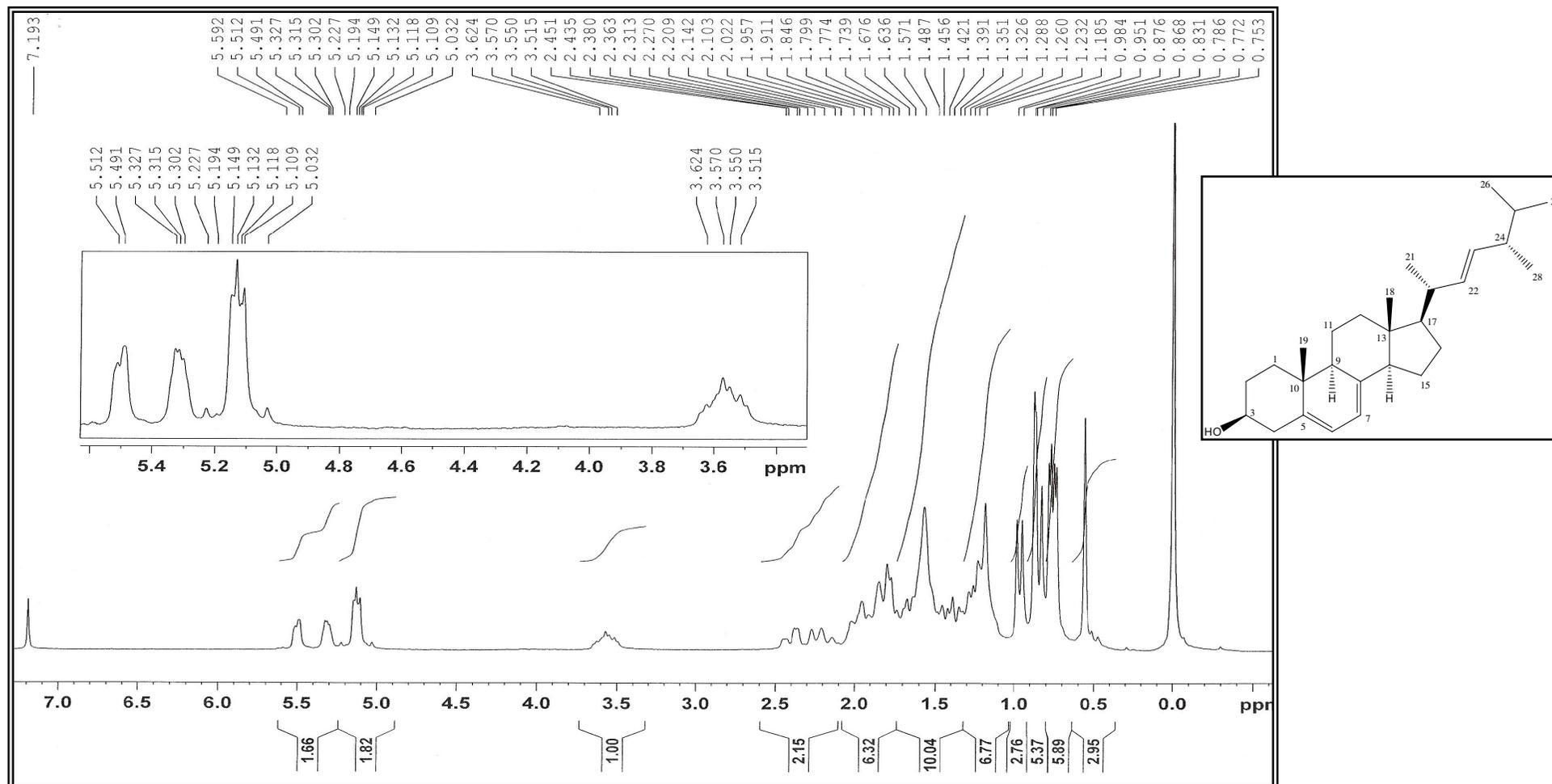


Anexo 1.1.3 – Espectro de DEPT (50 MHz, CDCl_3 , δ) de Cr1.

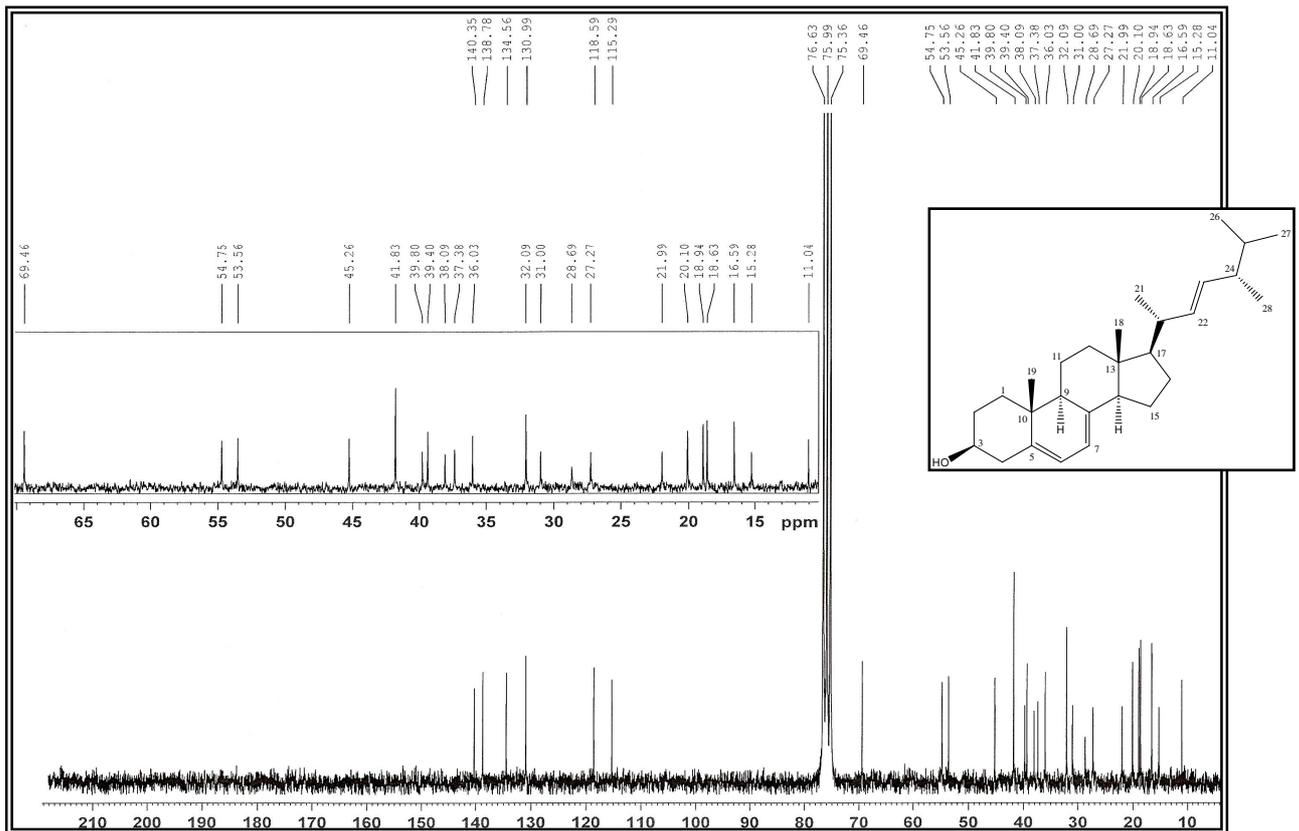


Anexo 1.1.4 – Cromatograma de Cr1 obtido por CG em comparação com padrões de ésteres de ácidos graxos.

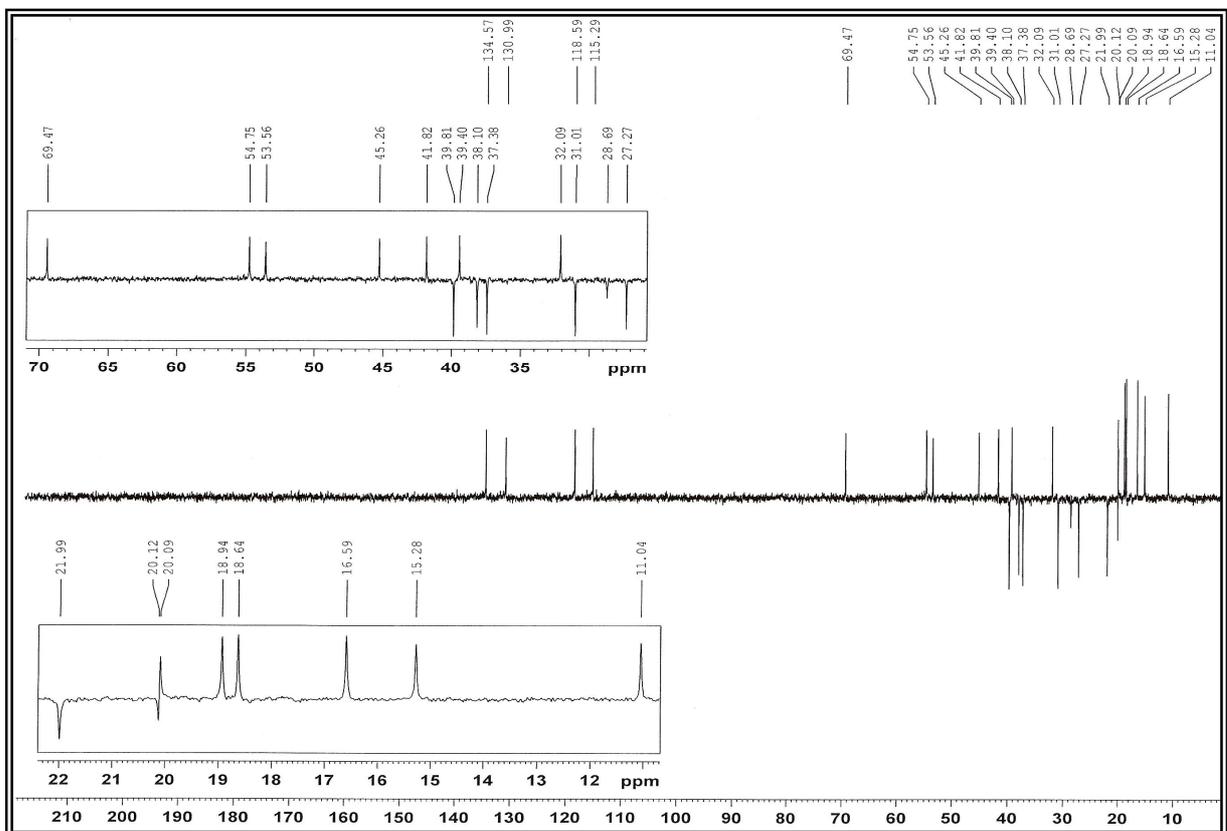
1.2. Cr2 (Ergosterol)



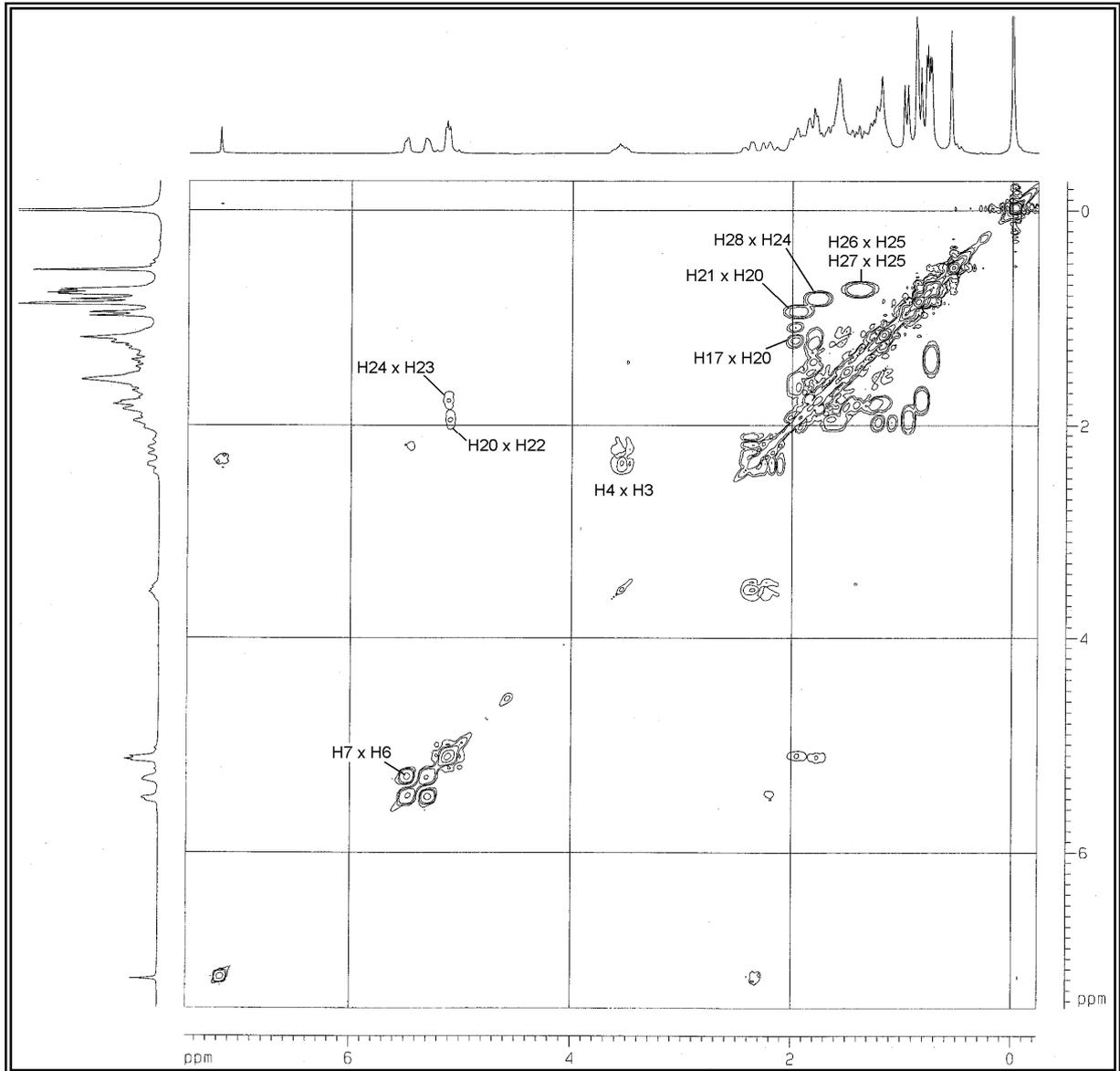
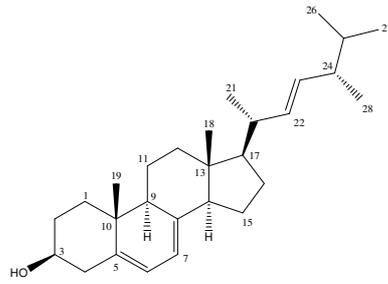
Anexo 1.2.1 – Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3 , δ) de Cr2.



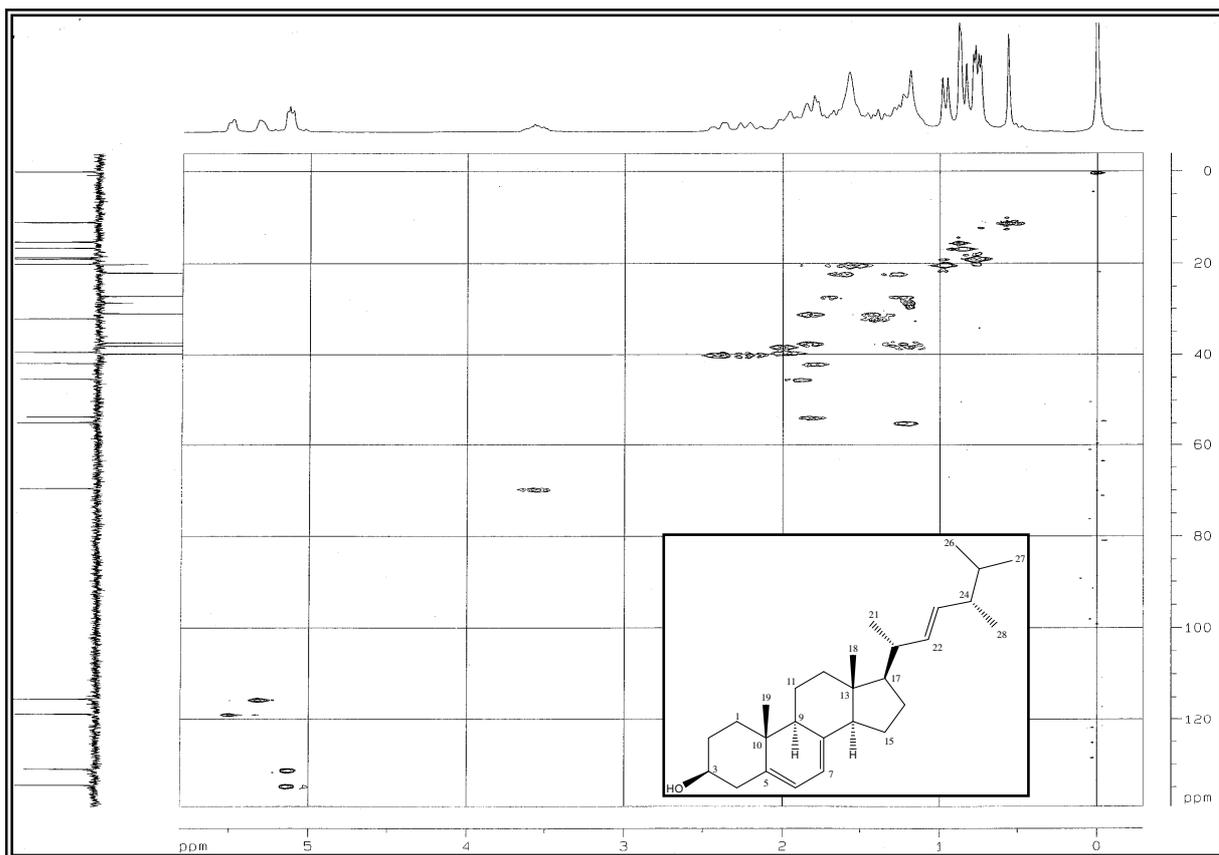
Anexo 1.2.2 – Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , δ) de Cr2.



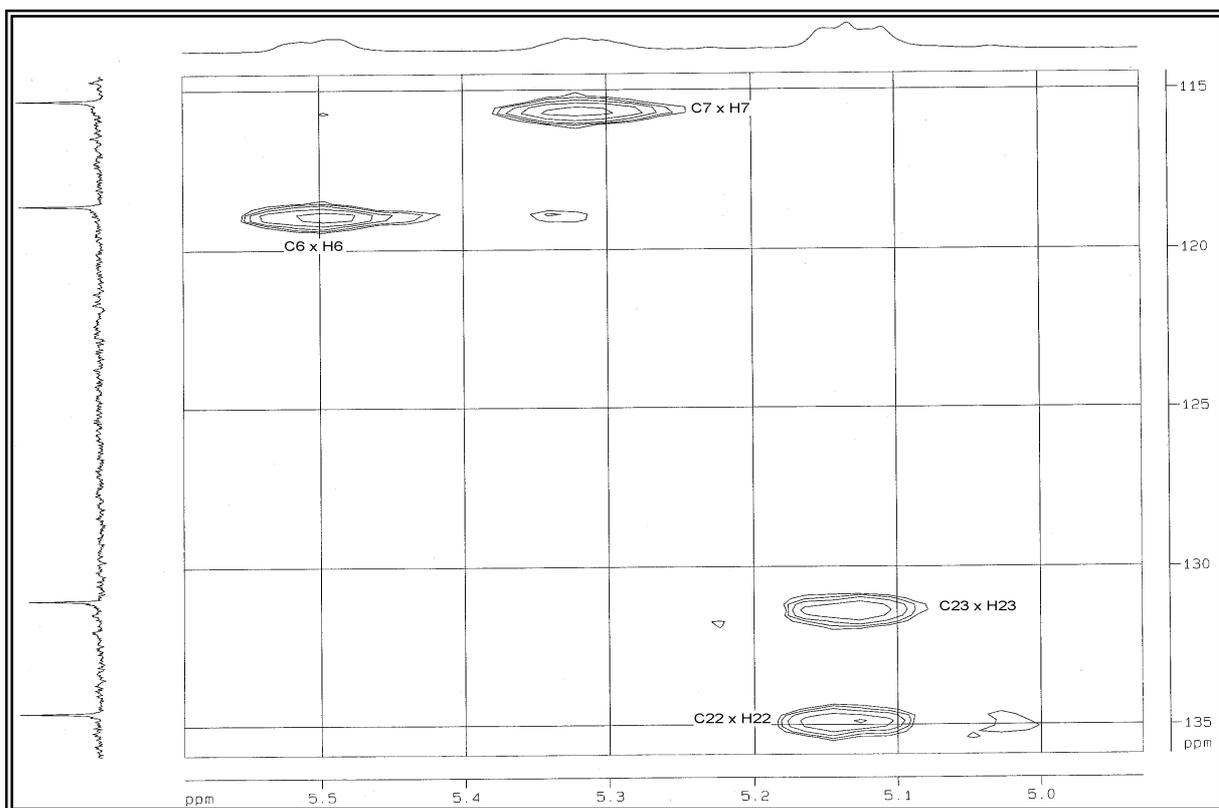
Anexo 1.2.3 – Sub-espectro de DEPT (50 MHz, CDCl_3 , δ) de Cr2.



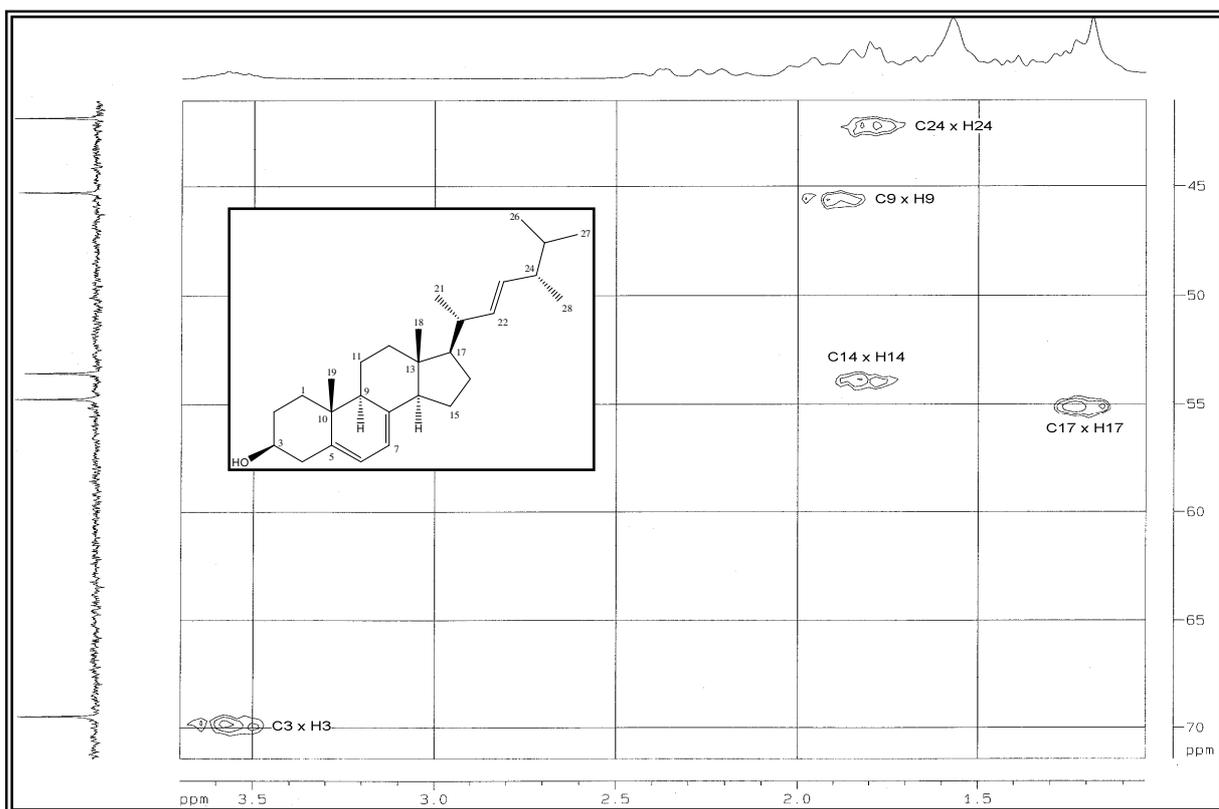
Anexo 1.2.4 – Mapa de contornos H-H COSY de Cr2.



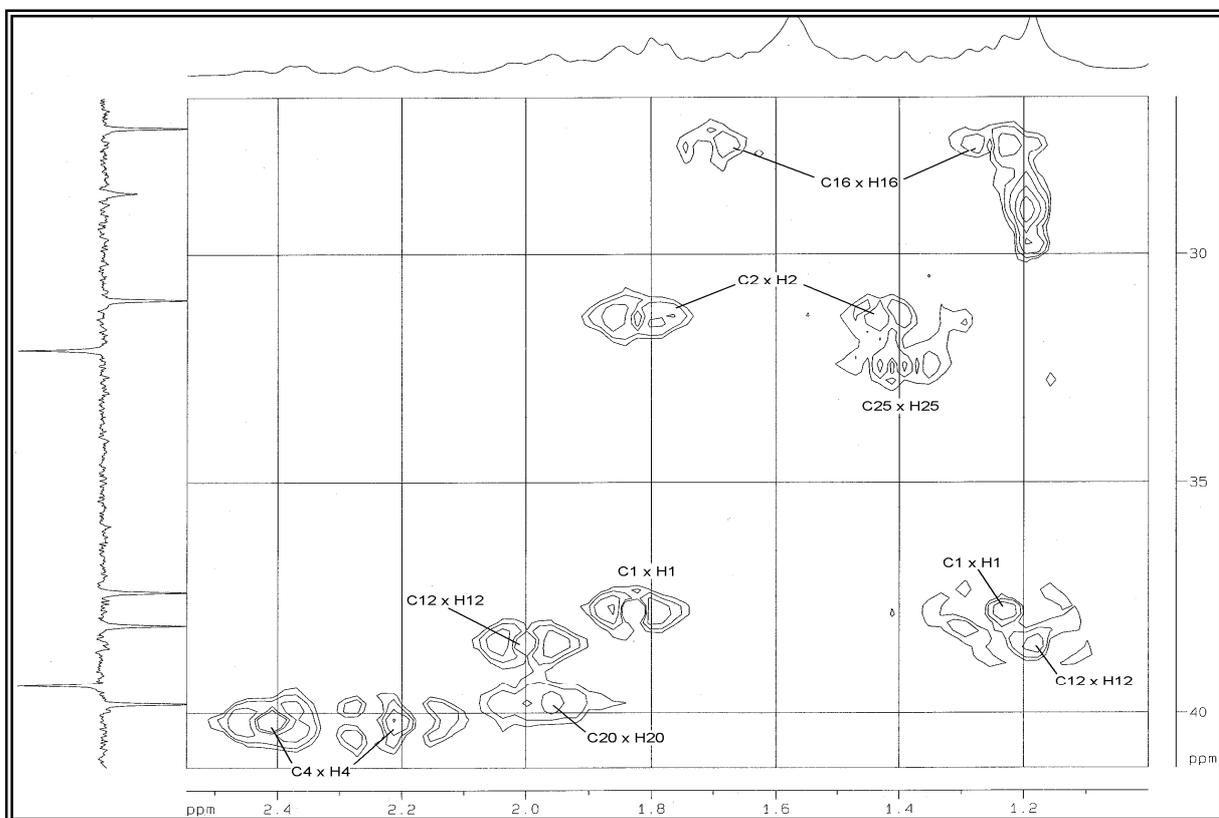
Anexo 1.2.5 – Mapa de contornos HMQC de Cr2.



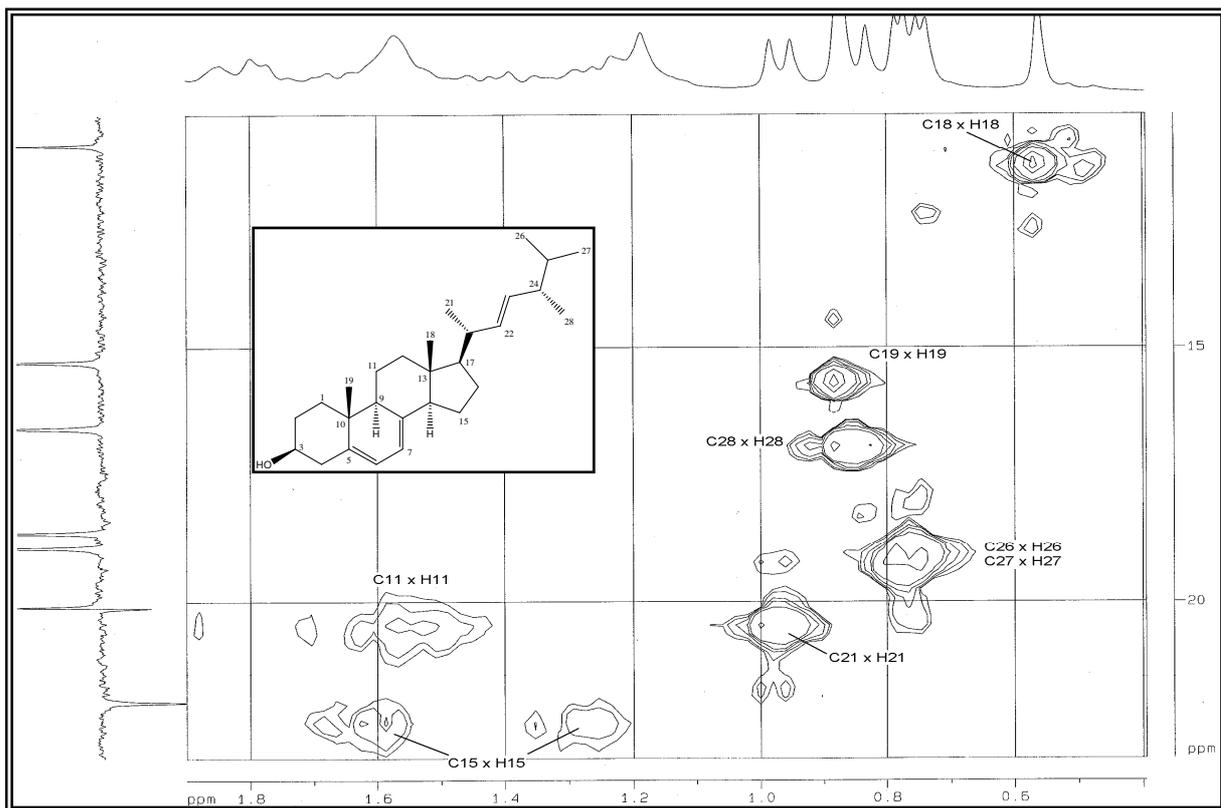
Anexo 1.2.6 – Expansão do mapa de contornos HMQC de Cr2.



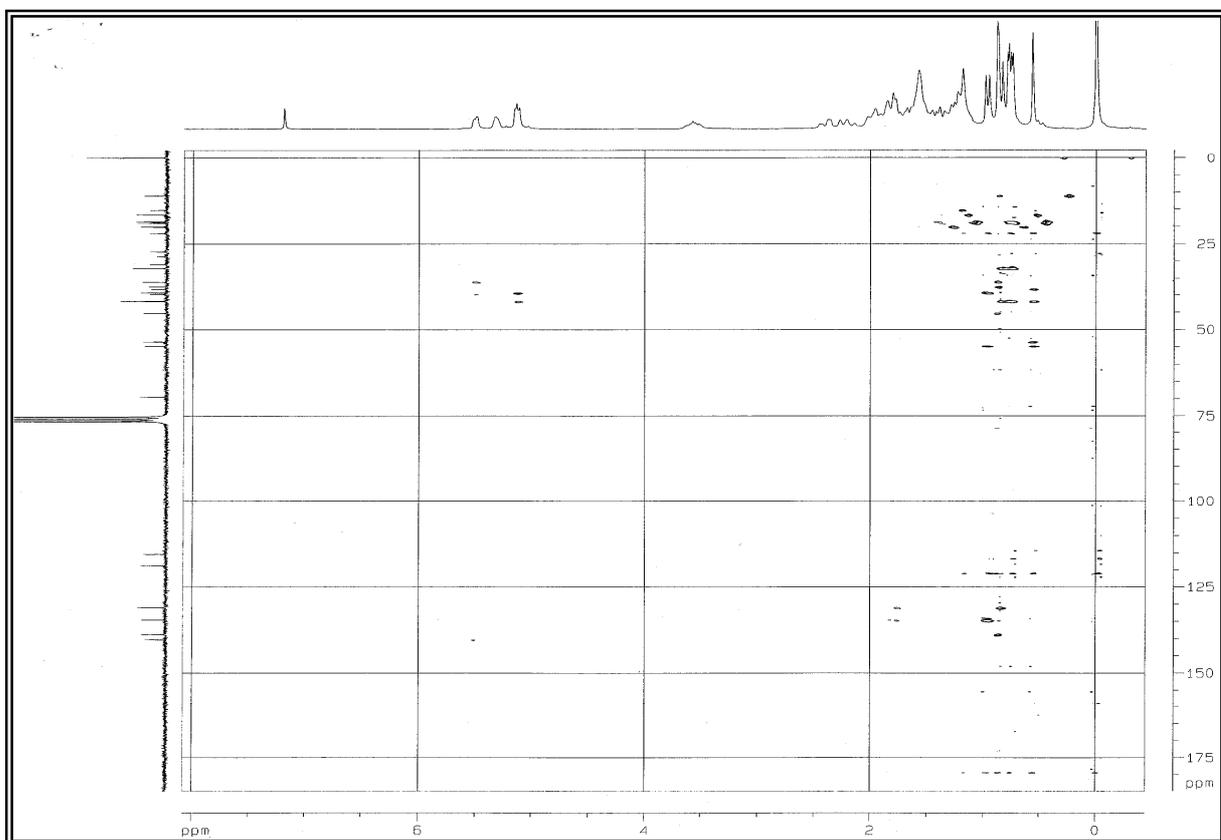
Anexo 1.2 7 – Expansão do mapa de contornos HMQC de Cr2.



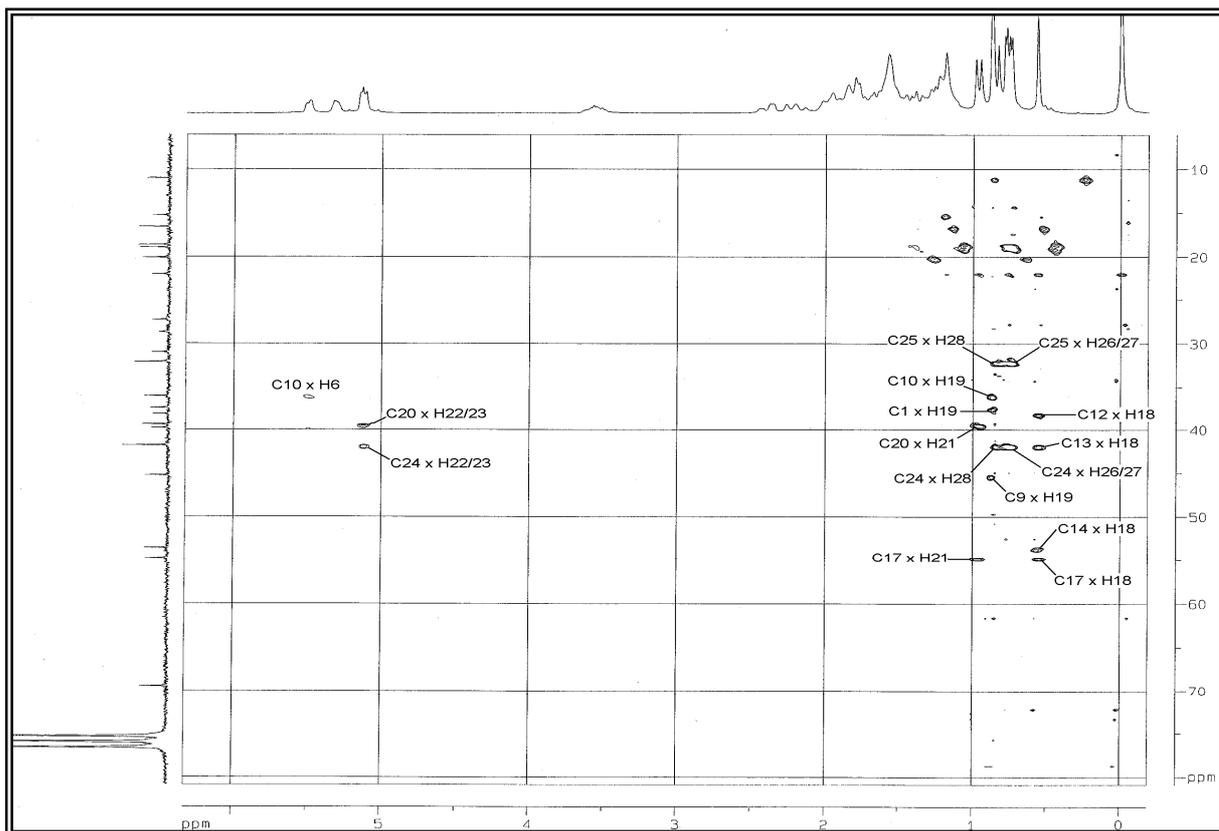
Anexo 1.2 8 – Expansão do mapa de contornos HMQC de Cr2.



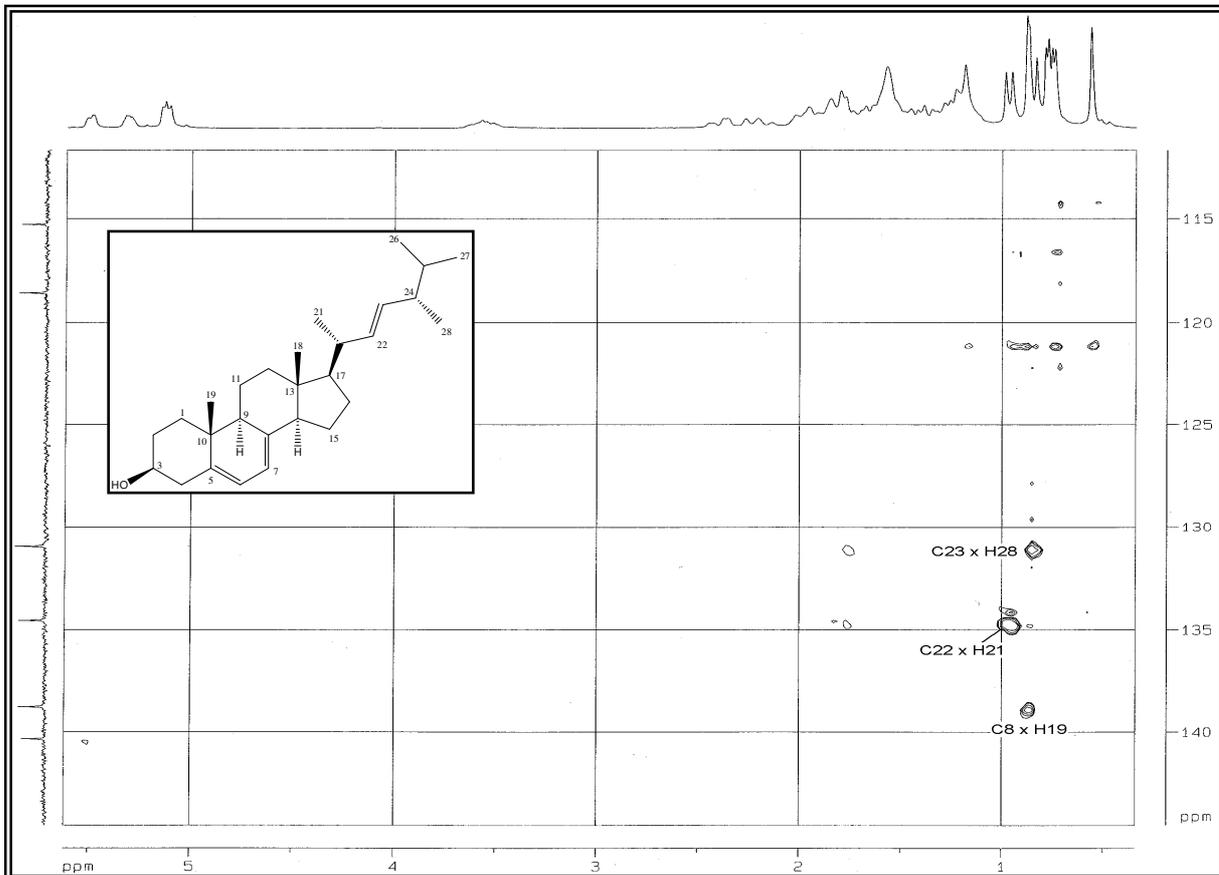
Anexo 1.2.9 – Expansão do mapa de contornos HMQC de Cr2.



Anexo 1.2.10 – Mapa de contornos HMBC de Cr2.

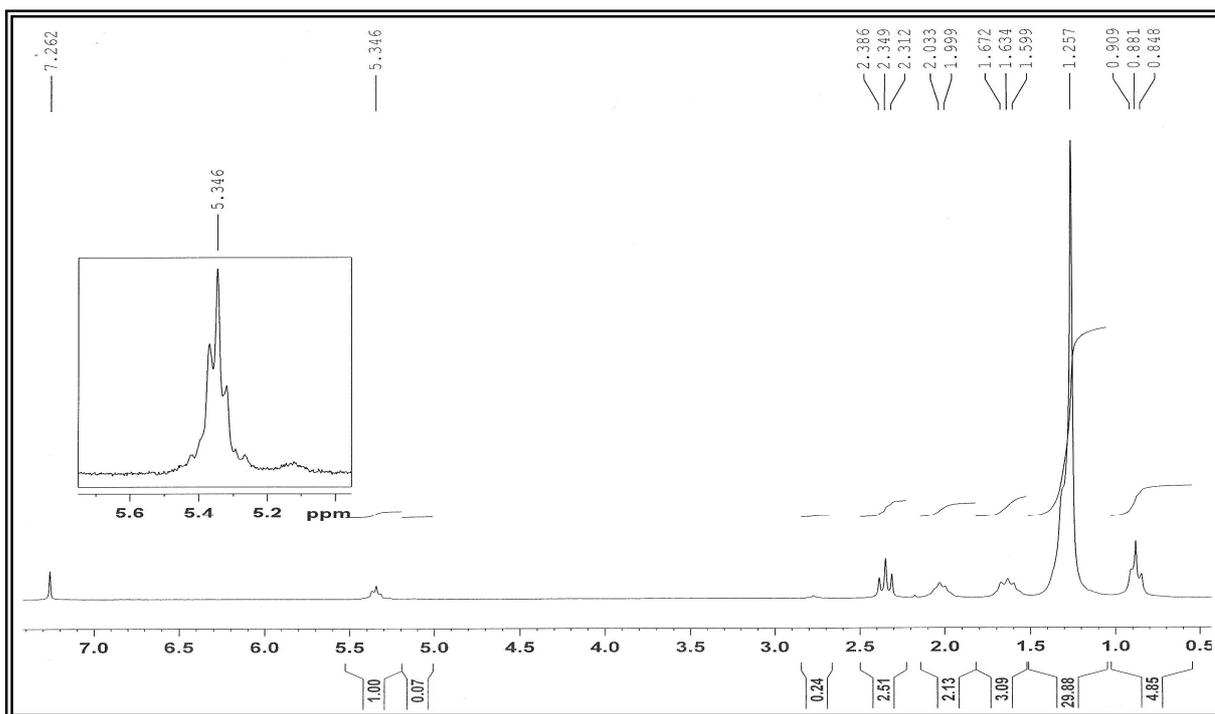


Anexo 1.2.11 – Expansão do mapa de contornos HMBC de **Cr2**.

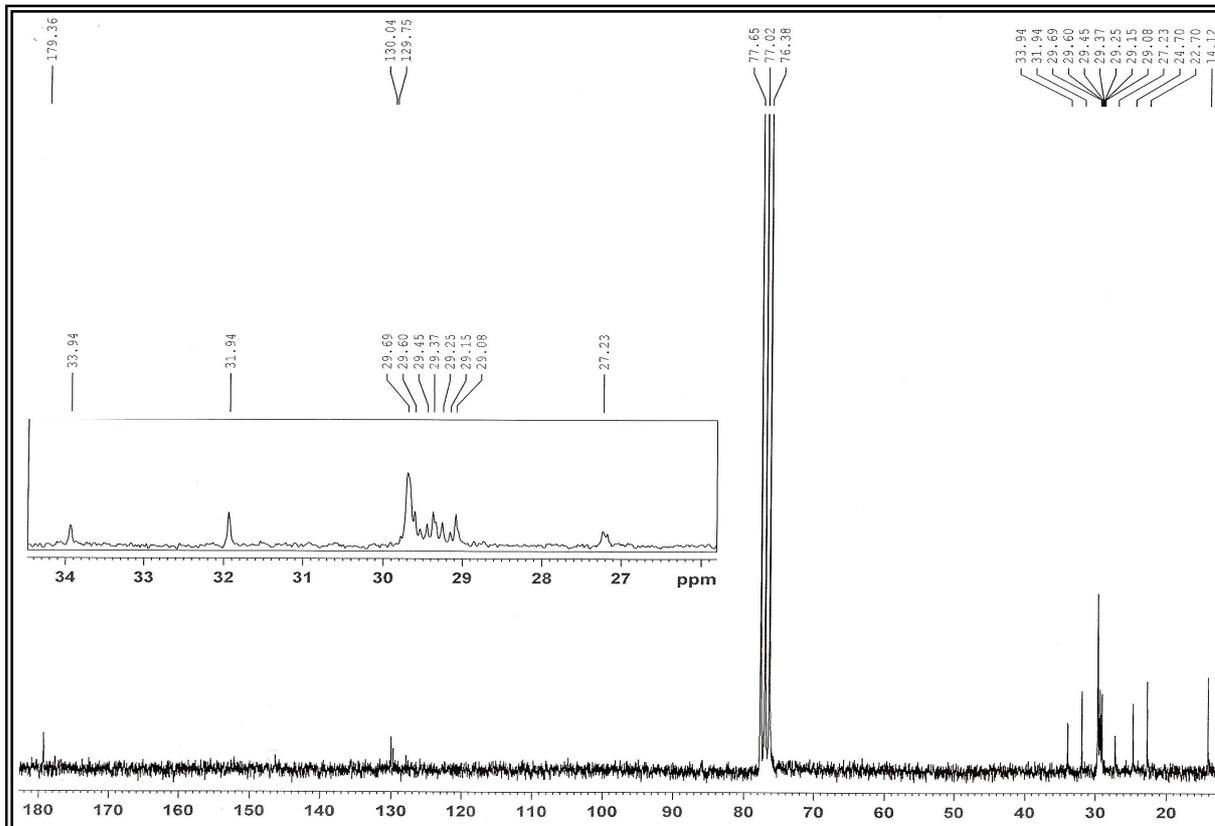


Anexo 1.2.12 – Expansão do mapa de contornos HMBC de **Cr2**.

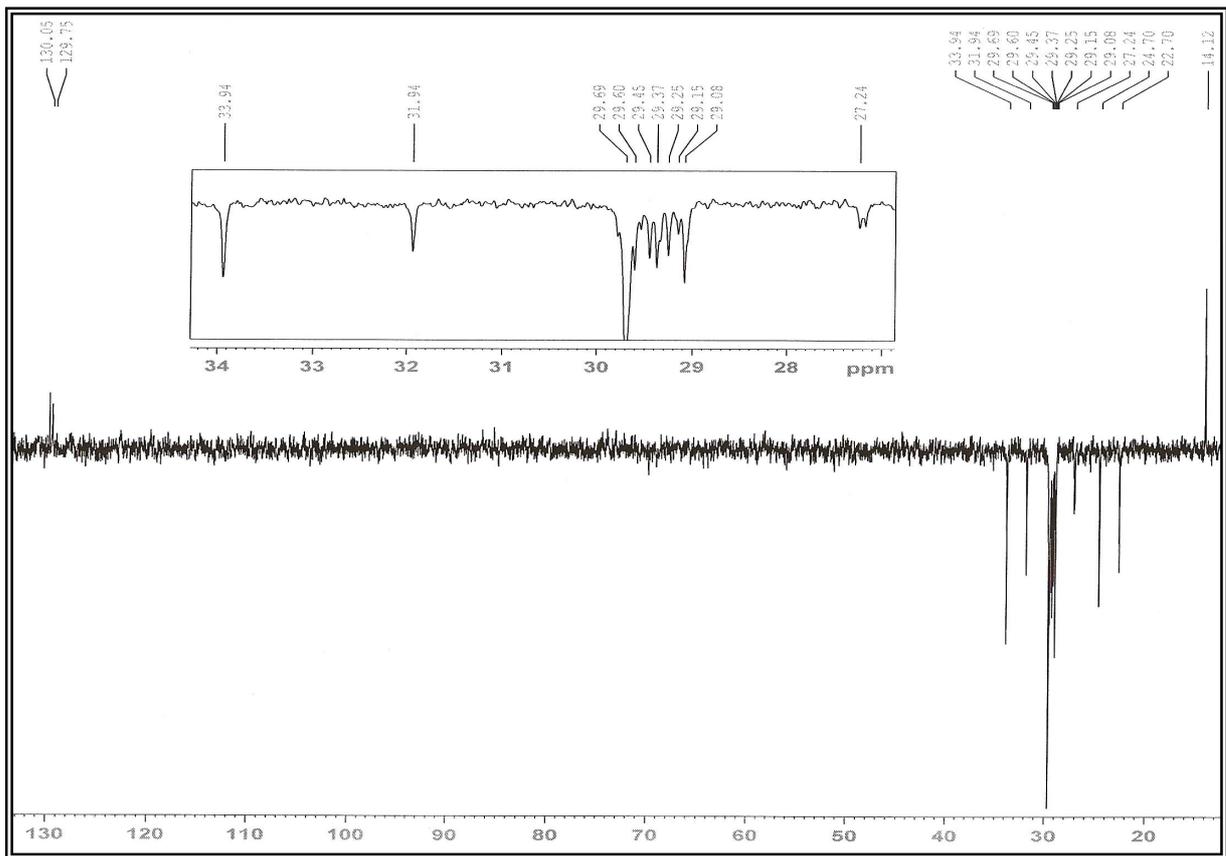
1.3. Cr3 (Mistura de ácidos graxos)



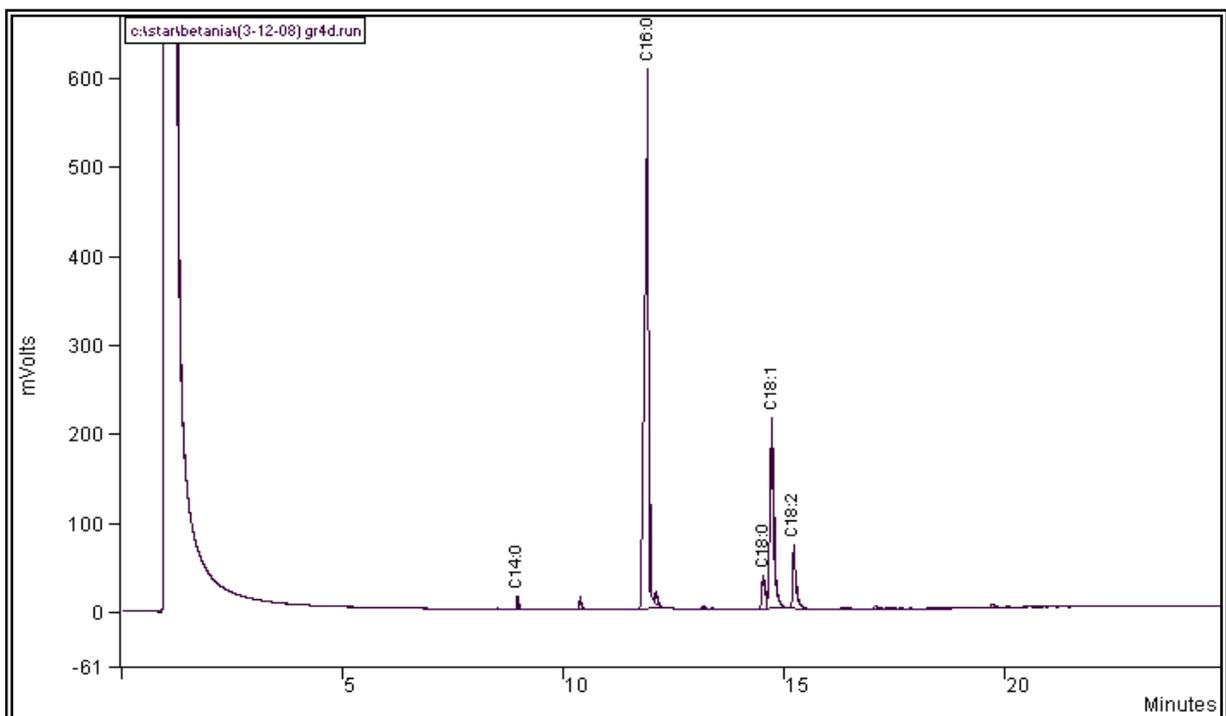
Anexo 1.3.1 – Espectro de RMN de ^1H (200MHz, CDCl_3 , δ) de Cr3.



Anexo 1.3.2 – Espectro de RMN de ^{13}C (50MHz, CDCl_3 , δ) de Cr3.



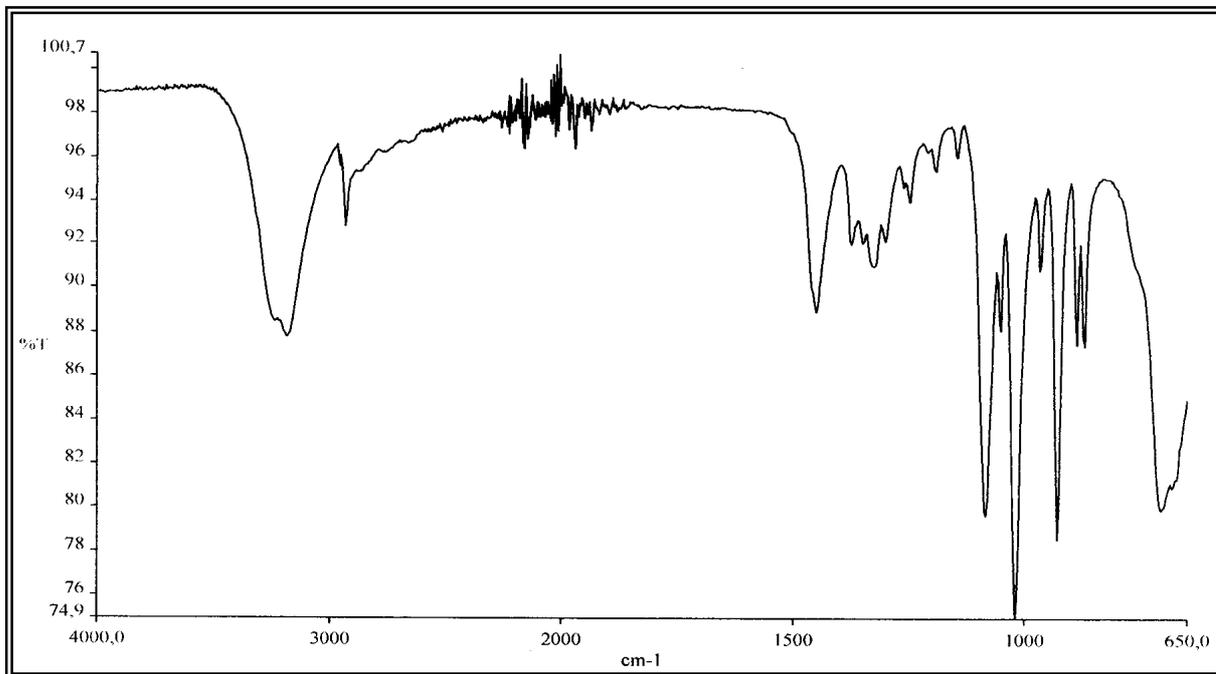
Anexo 1.3.3 – Sub-espectro de DEPT (50 MHz, CDCl₃, δ) de Cr3.



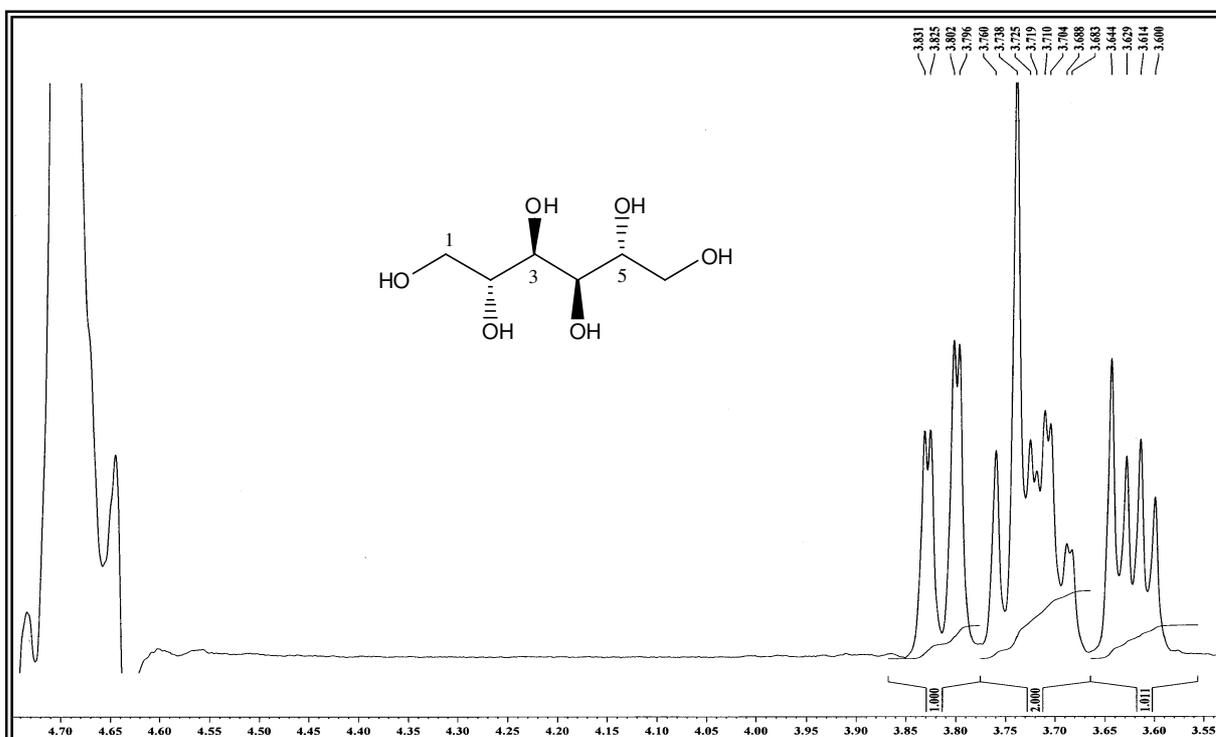
Anexo 1.3.4 – Cromatograma de Cr3 obtido por CG em comparação com padrões de ésteres de ácidos graxos.

ANEXO 2. ESPECTROS DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DO FUNGO *PENICILLIUM BRASILIANUM*

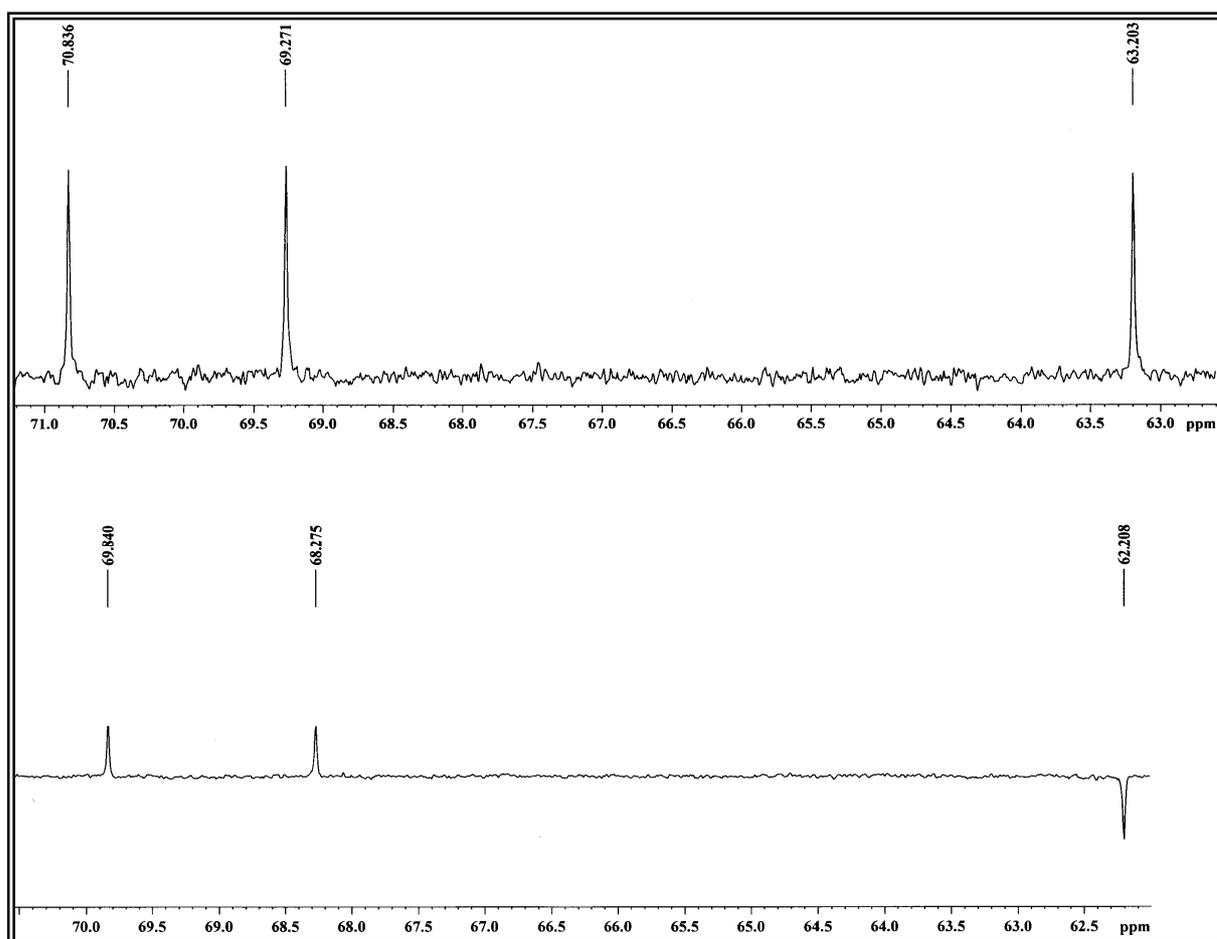
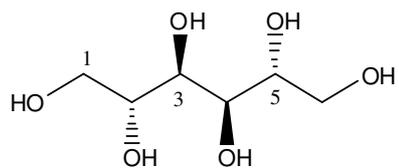
2.1. Pb1 (Manitol)



Anexo 2.1.1 – Espectro de absorção no infravermelho de **Pb1**.

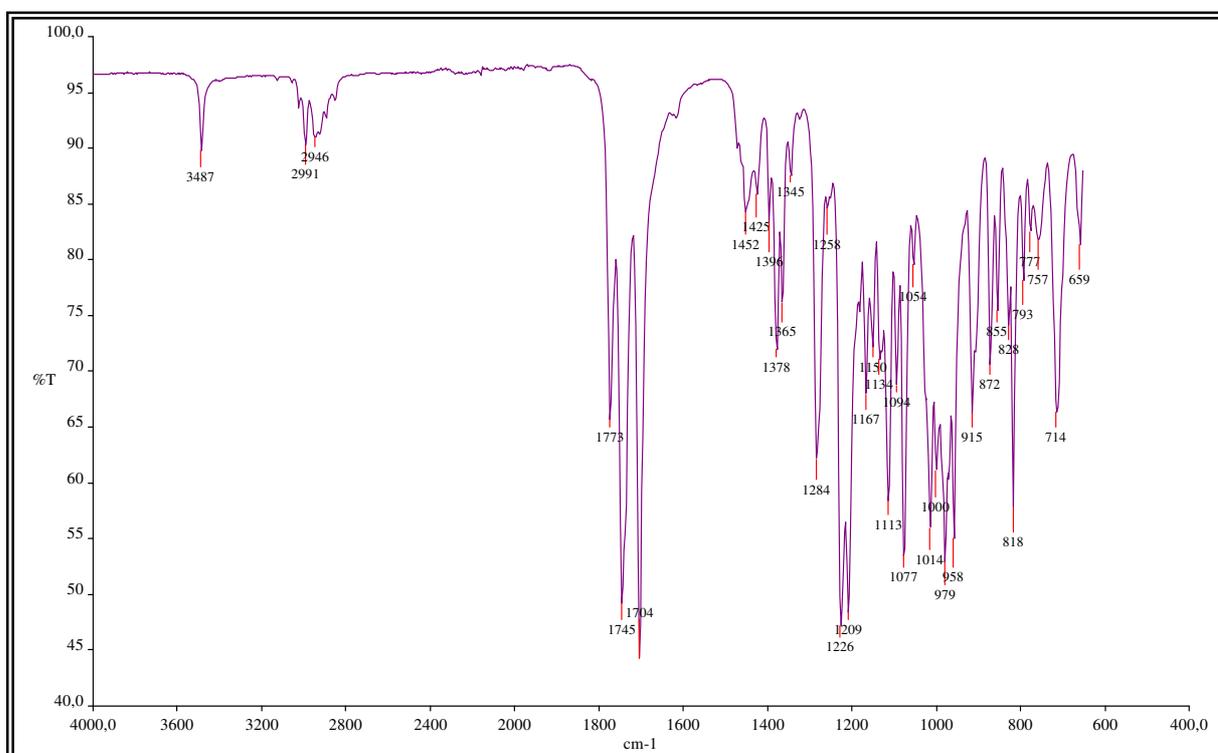
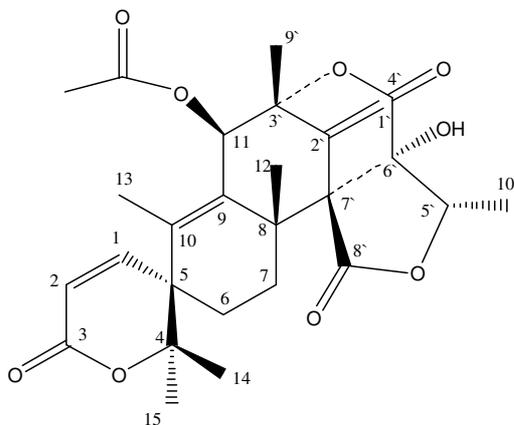


Anexo 2.1 2 – Espectro de RMN de ^1H (400MHz, D_2O , δ) de **Pb1**.

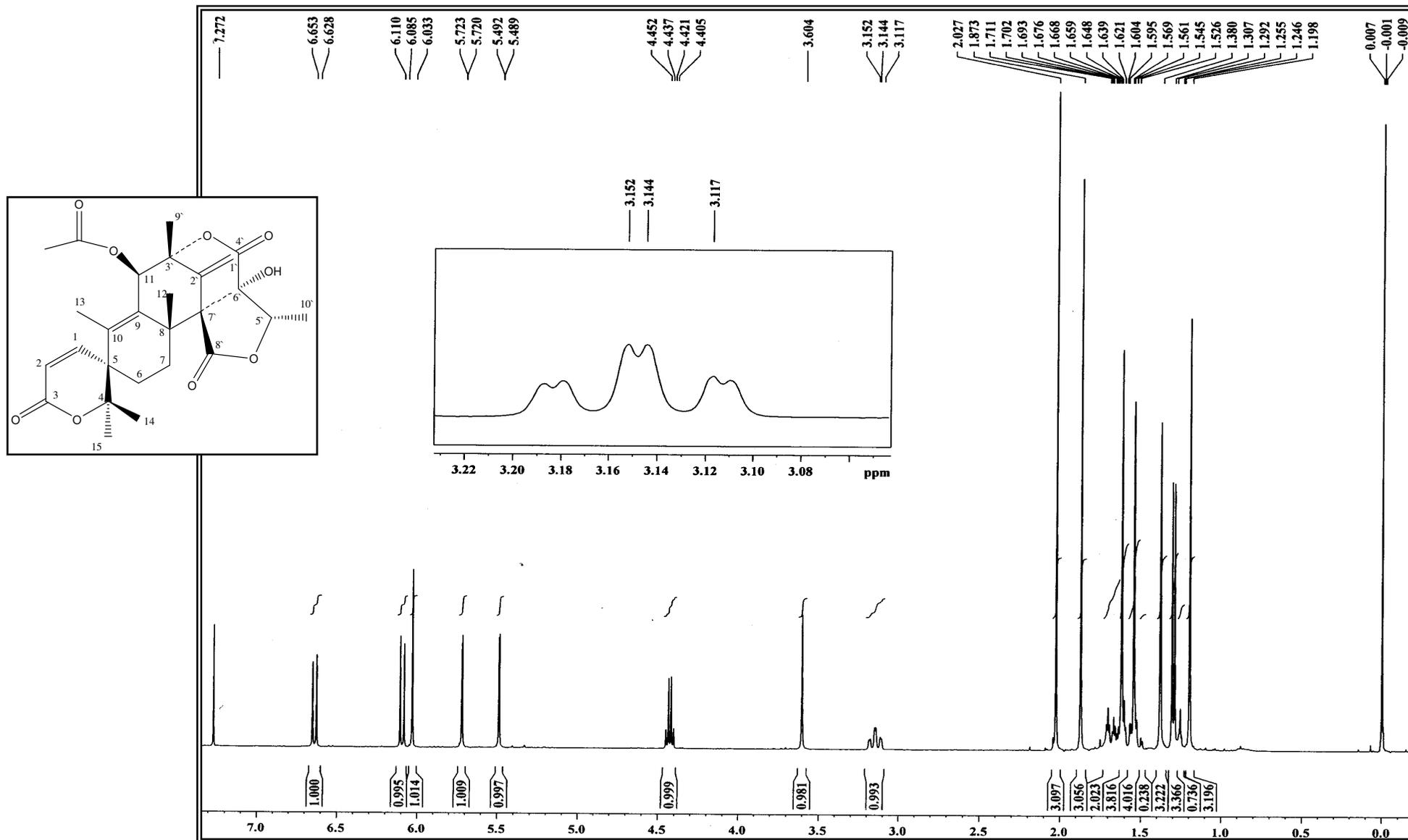


Anexo 2.1.3 – Espectro de RMN de ^{13}C e sub-espectro de DEPT (100MHz, D_2O , δ) de Pb1.

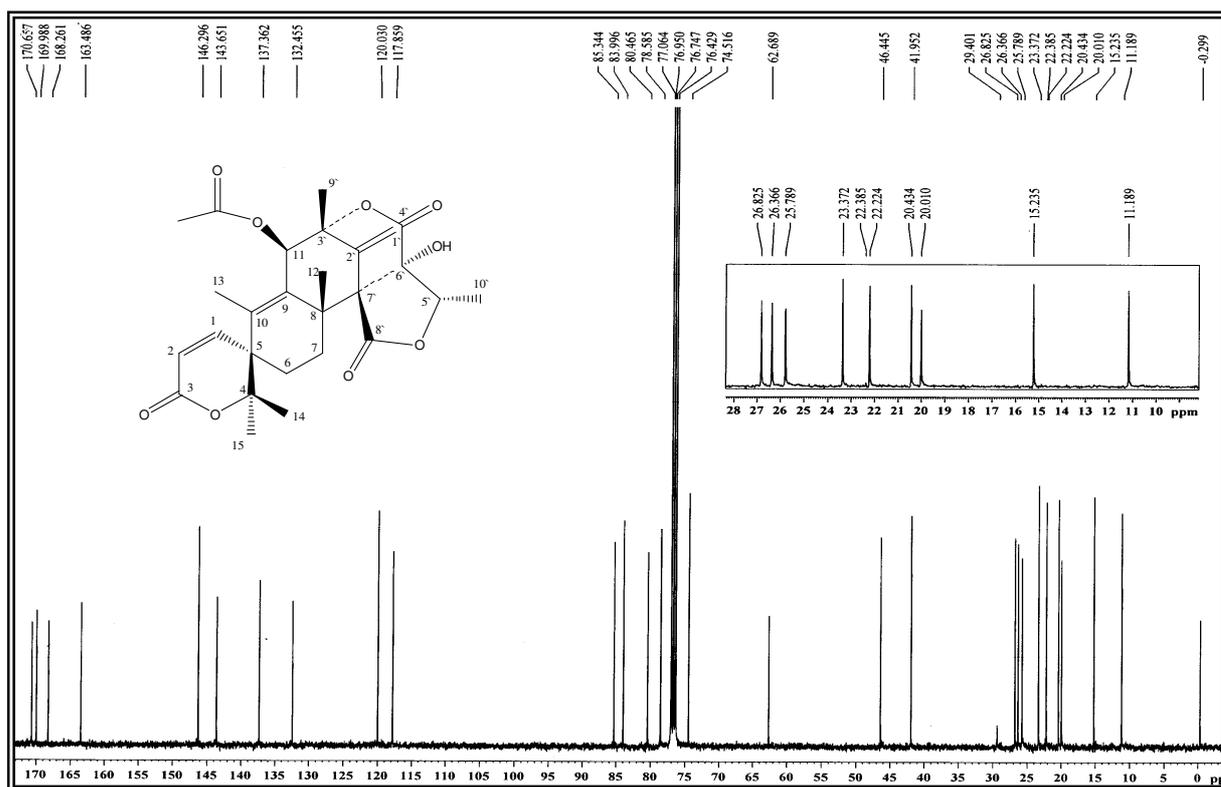
2.2. Pb2 (Austina)



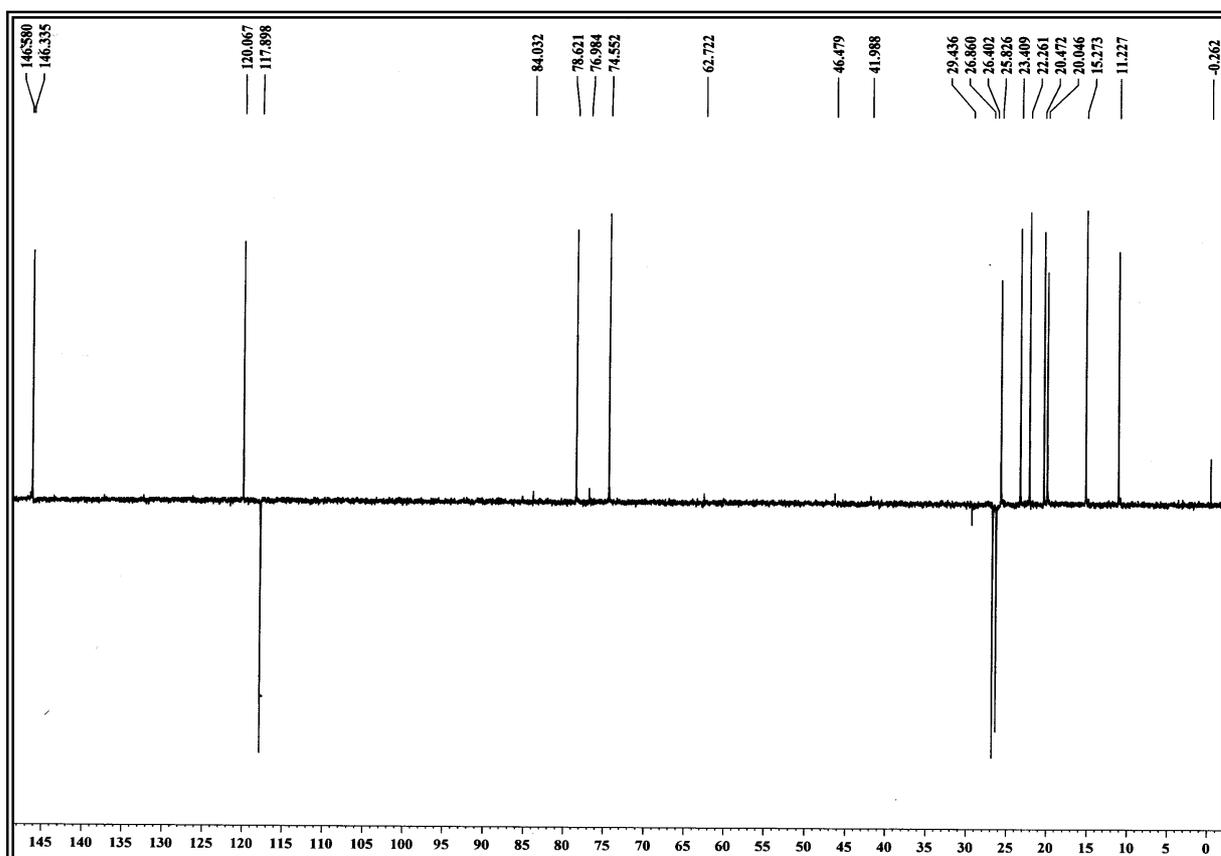
Anexo 2.2.1 – Espectro de absorção no infravermelho de **Pb2**.



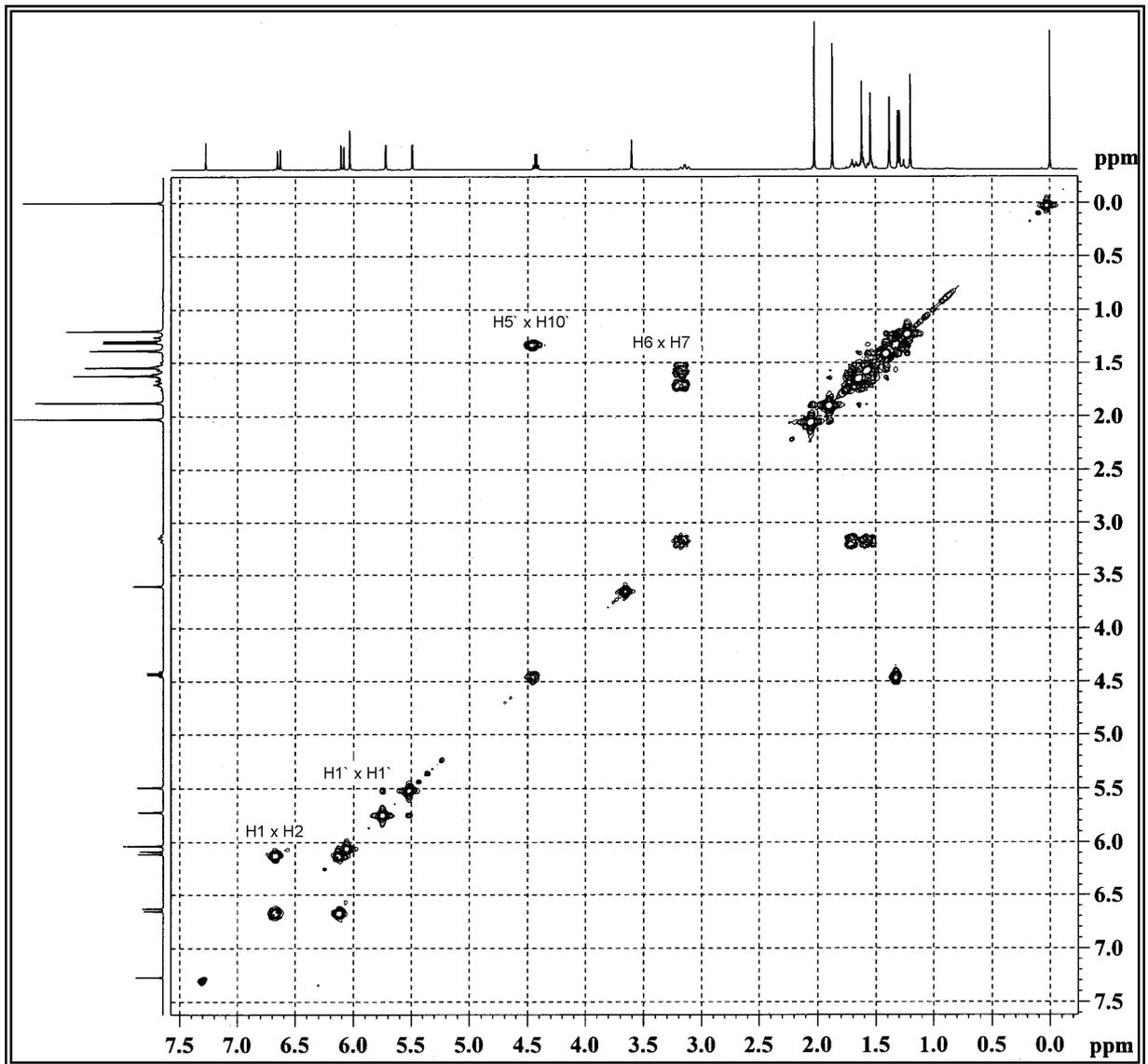
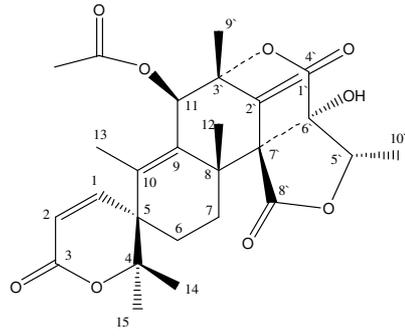
Anexo 2.2.2 – Espectro de RMN de ^1H (400MHz, CDCl_3 , δ) de **Pb2**.



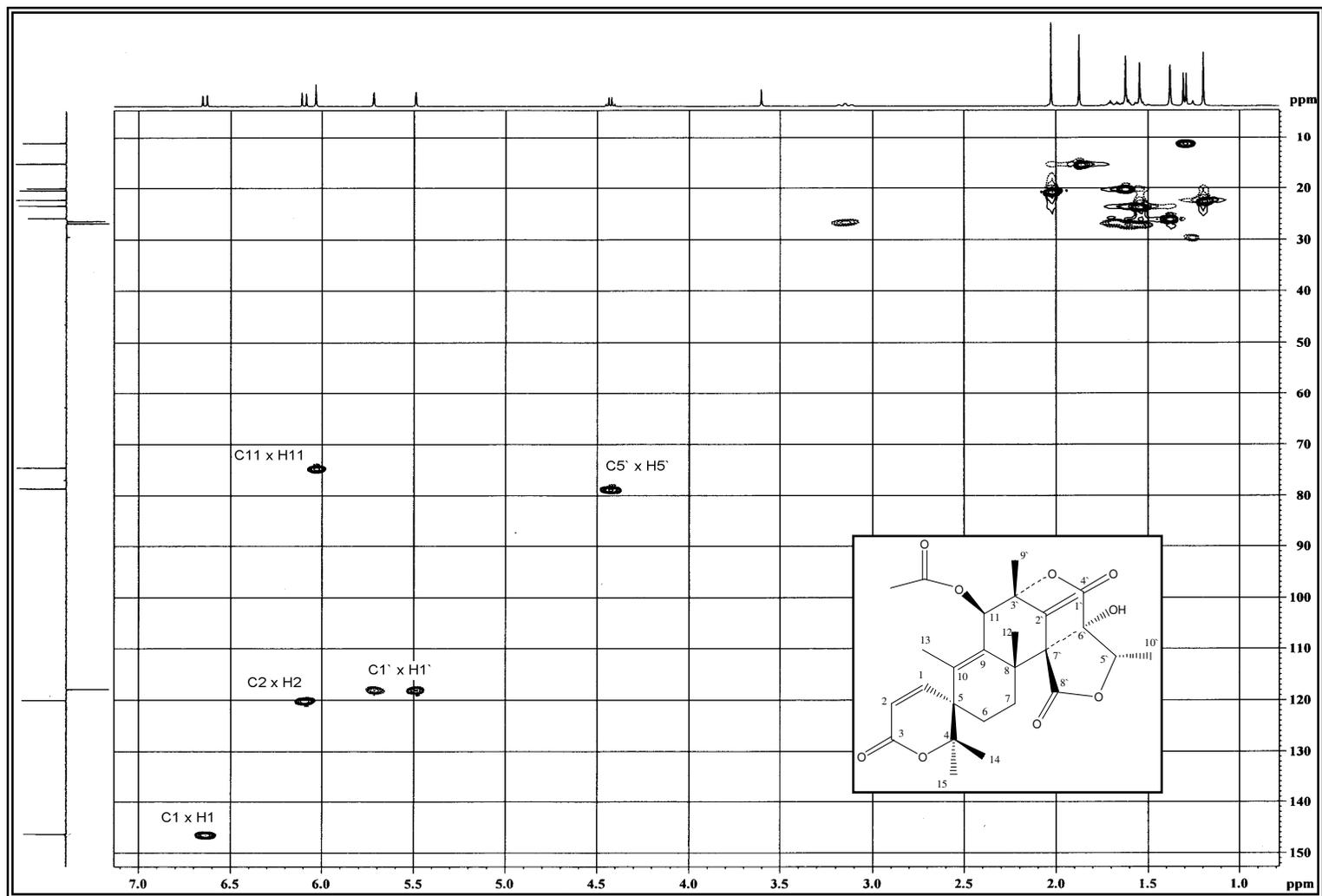
Anexo 2.2.3 – Espectro de RMN de ^{13}C (100MHz, CDCl_3 , δ) de **Pb2**.



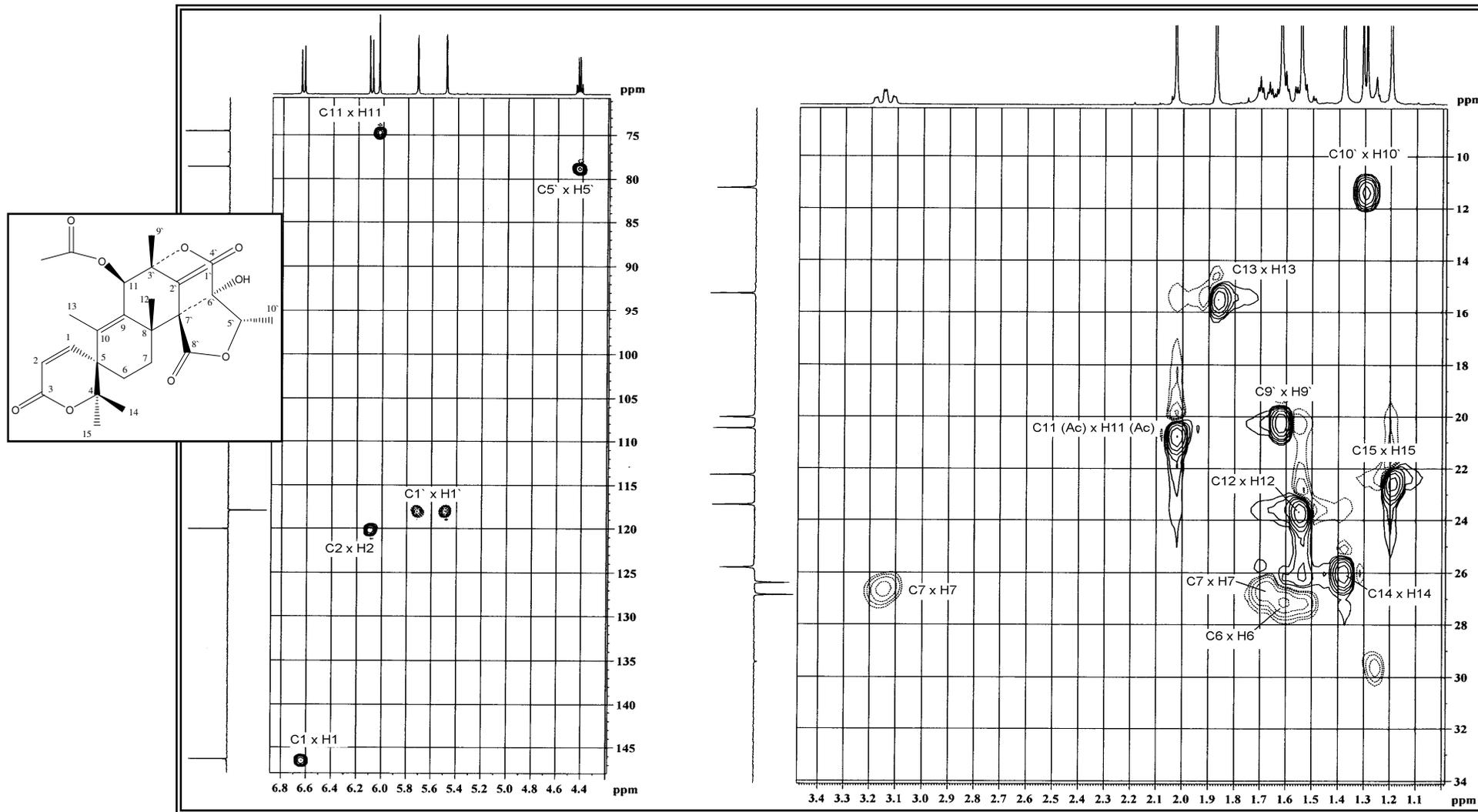
Anexo 2.2.4 – Sub-espectro de DEPT (100MHz, CDCl_3 , δ) de **Pb2**.



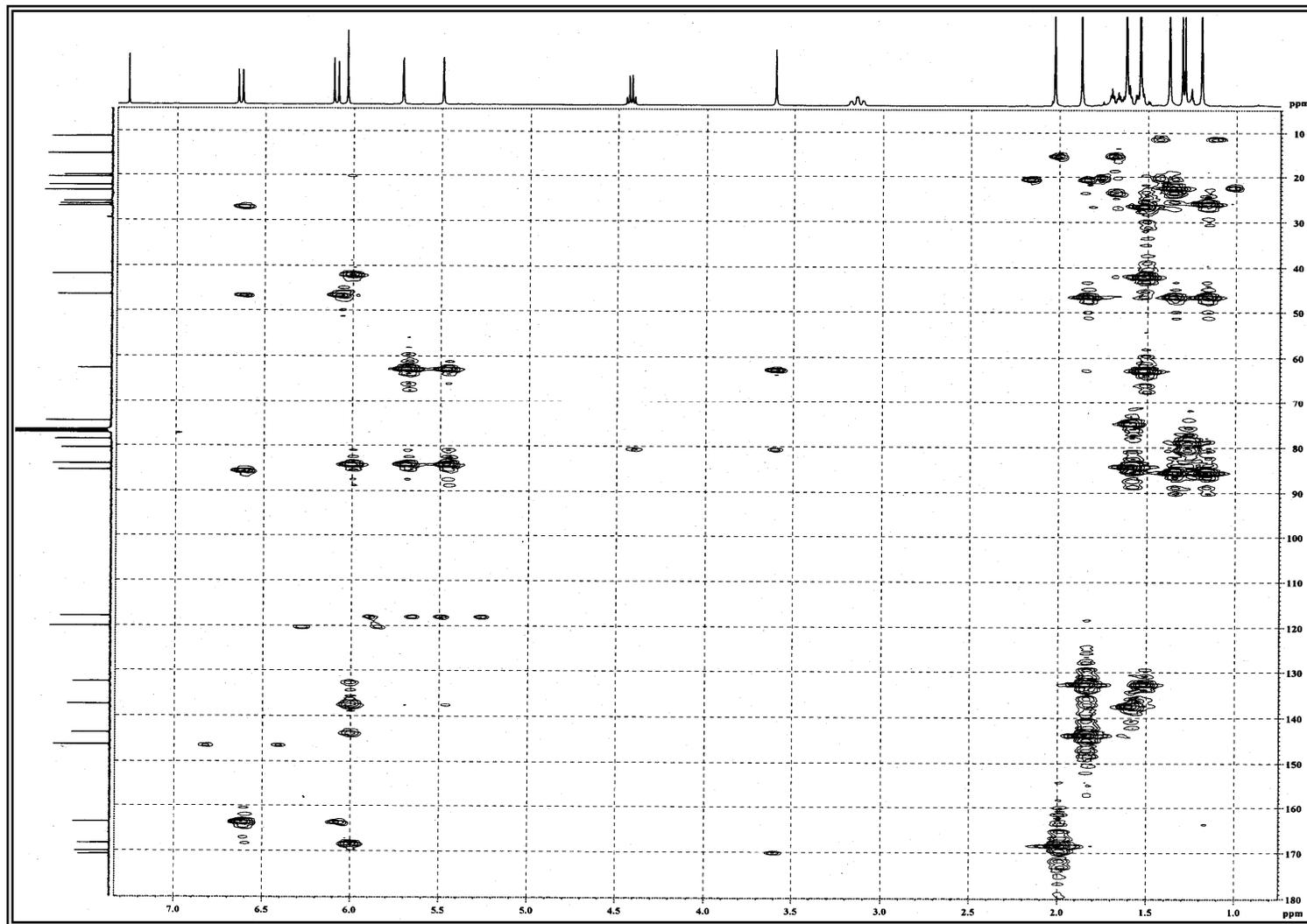
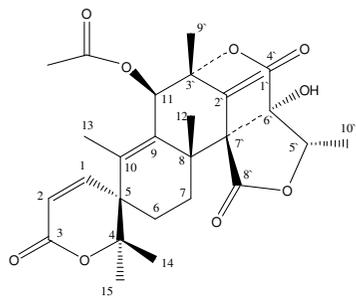
Anexo 2.2.5 – Mapa de contornos H-H COSY de Pb2.



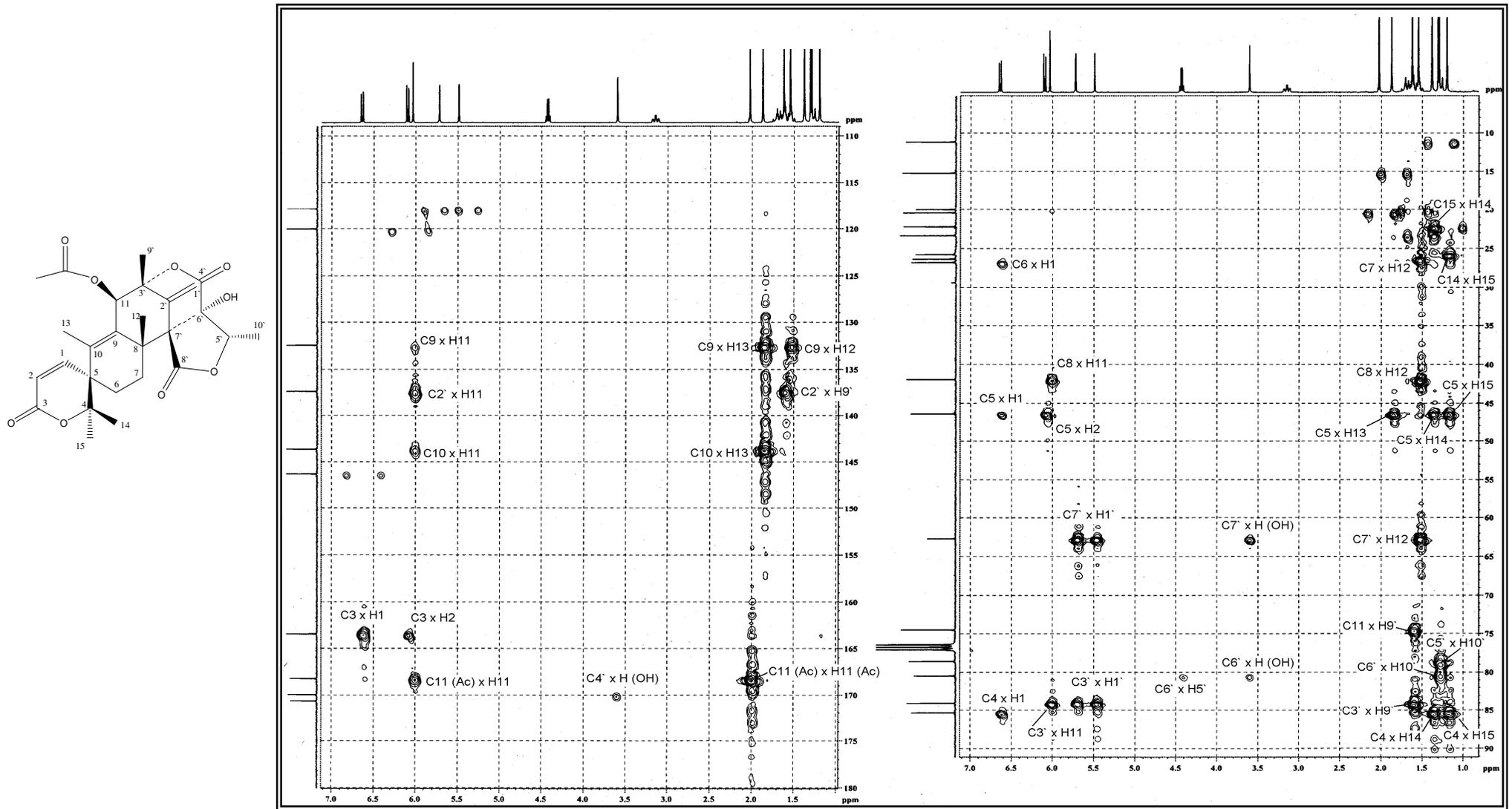
Anexo 2.2.6 – Mapa de contornos HMQC de Pb2.



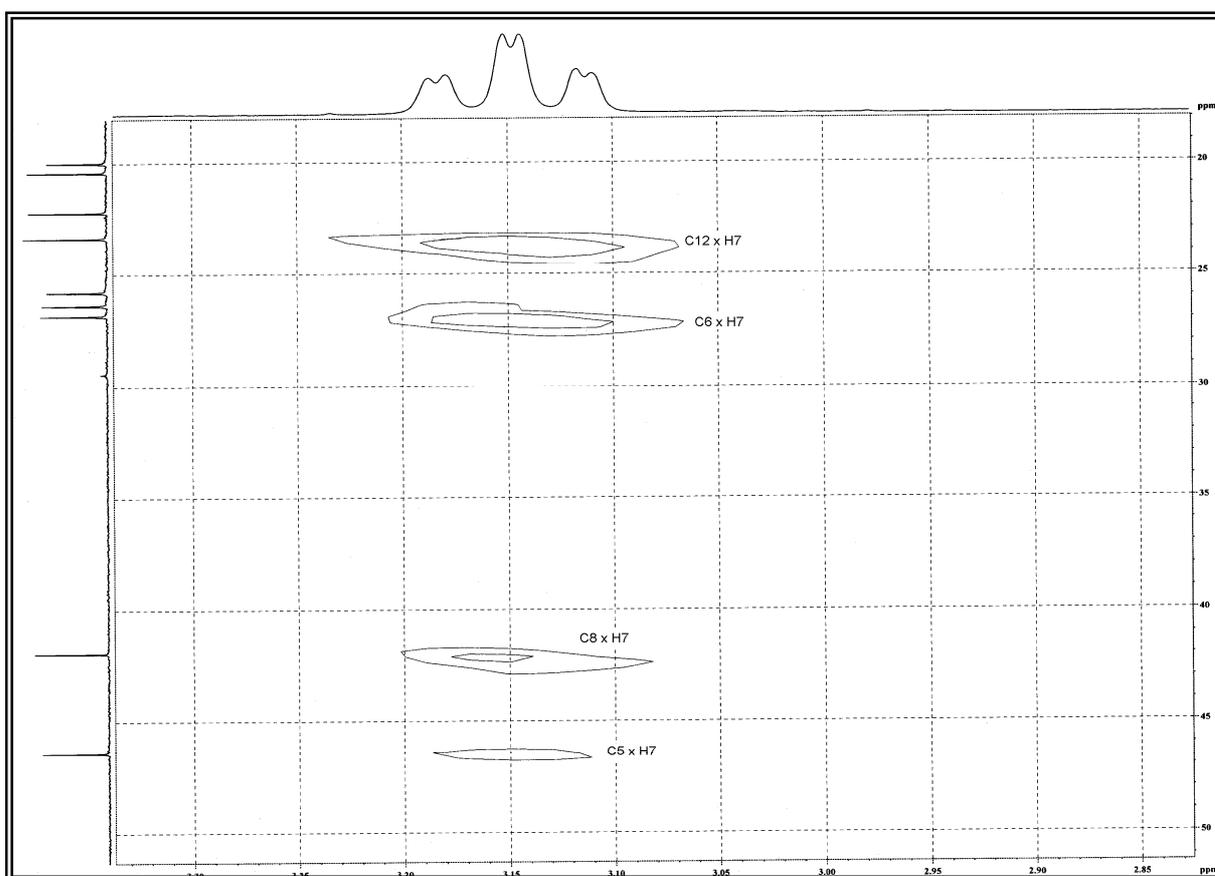
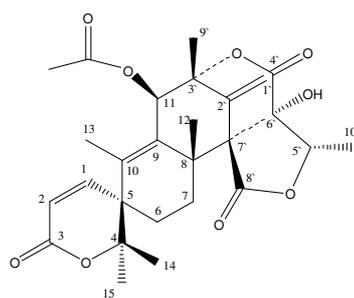
Anexo 2.2.7 – Expansões do mapa de contornos HMQC de **Pb2**.



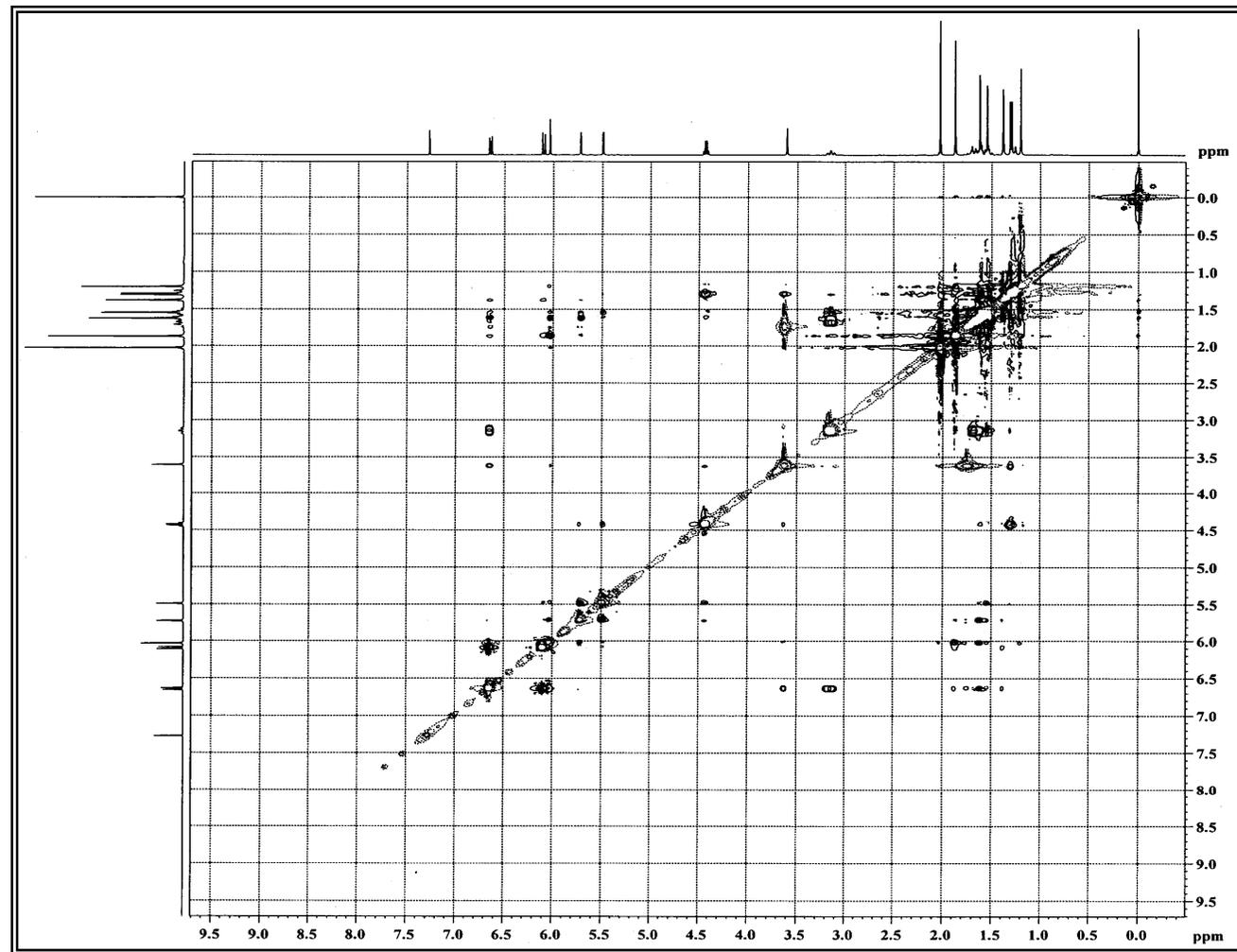
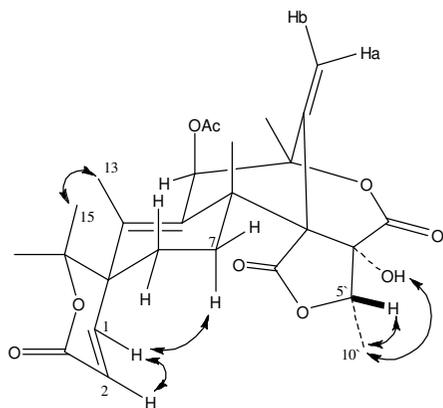
Anexo 2.2.8 – Mapa de contornos HMBC de Pb2.



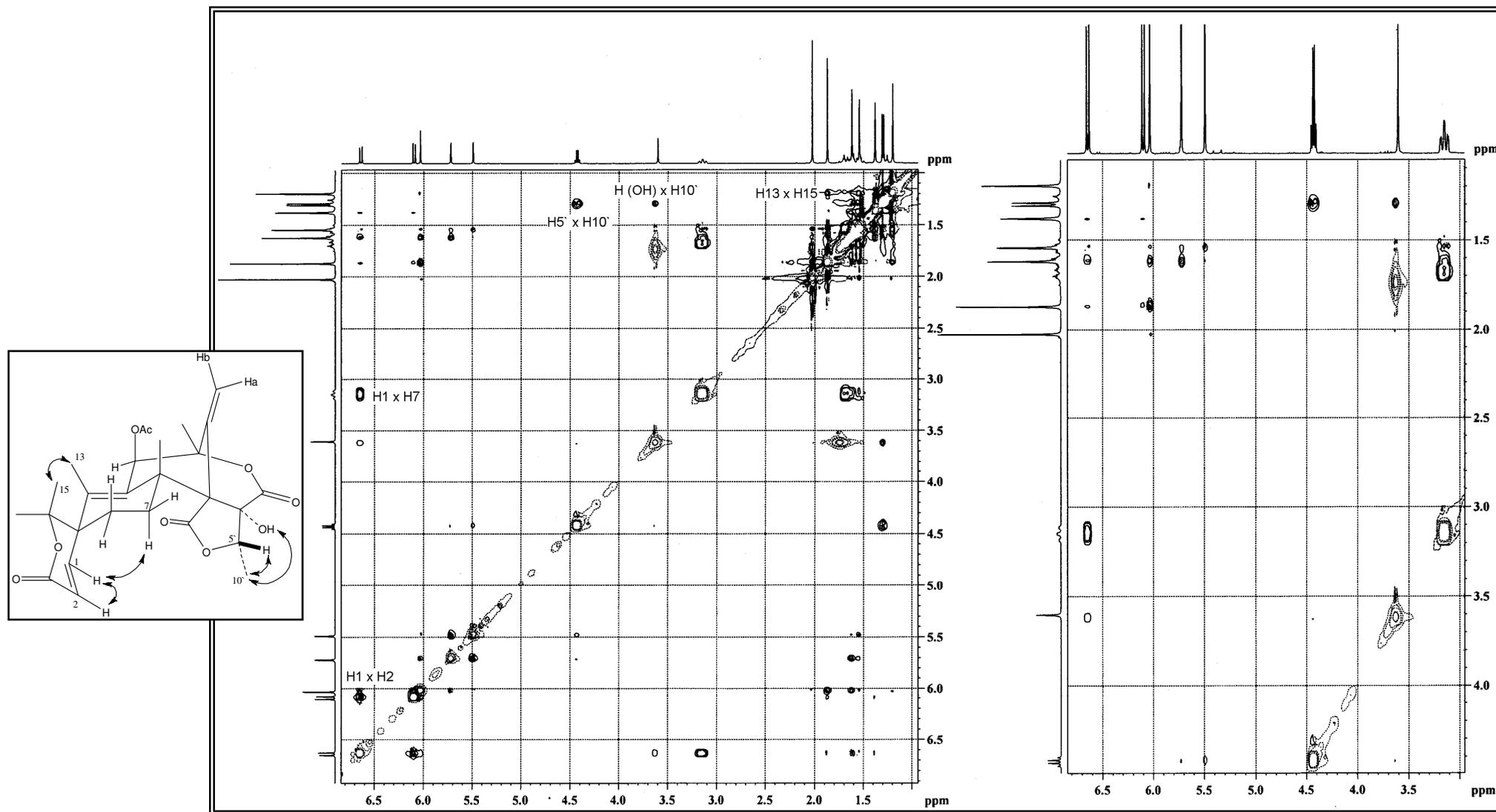
Anexo 2.2.9 – Expansões do mapa de contornos HMBC de Pb2.



Anexo 2.2.10 – Expansão do mapa de contornos HMBC de **Pb2**.

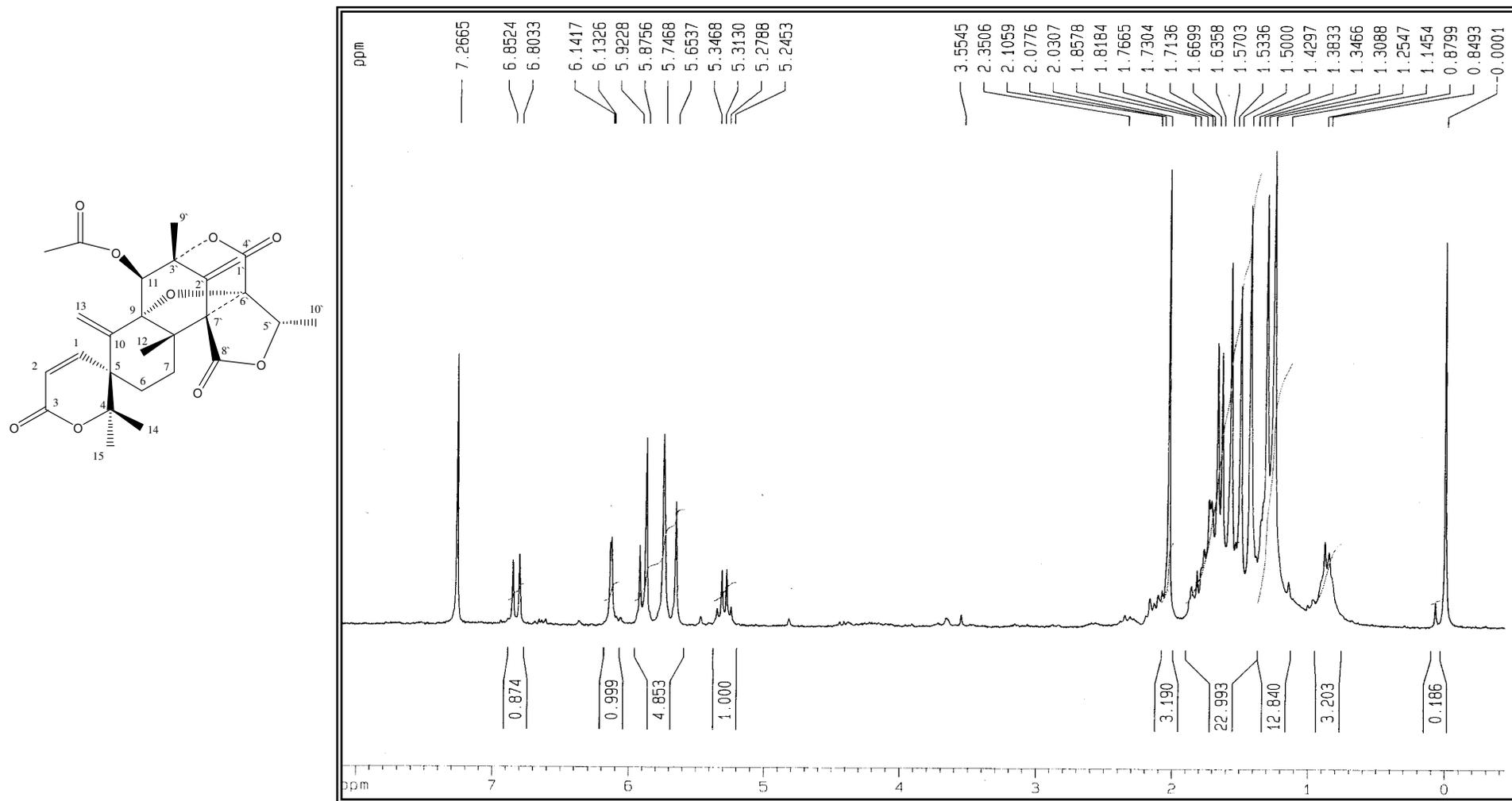


Anexo 2.2.11 – Mapa de contornos NOESY de Pb2.

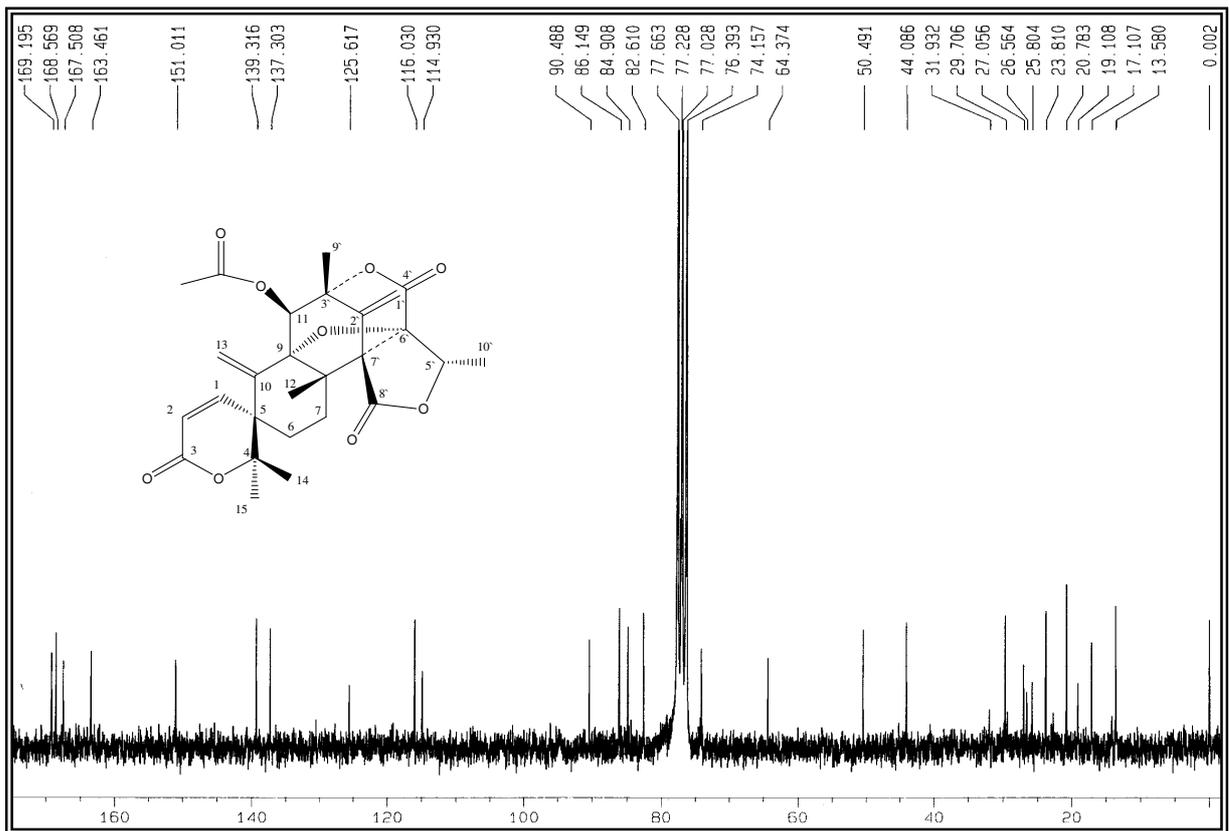


Anexo 2.2.12 – Expansões do mapa de contornos NOESY de **Pb2**.

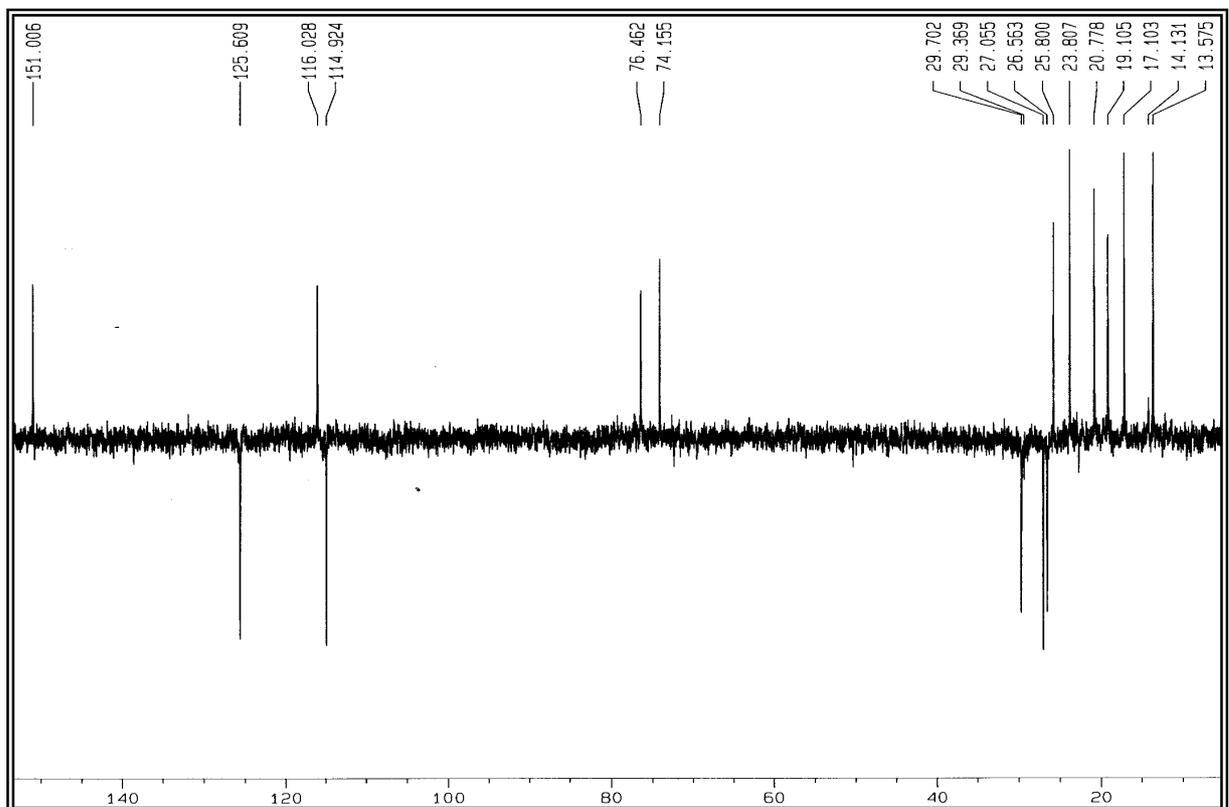
2.3. Pb3 (Dehidroaustina)



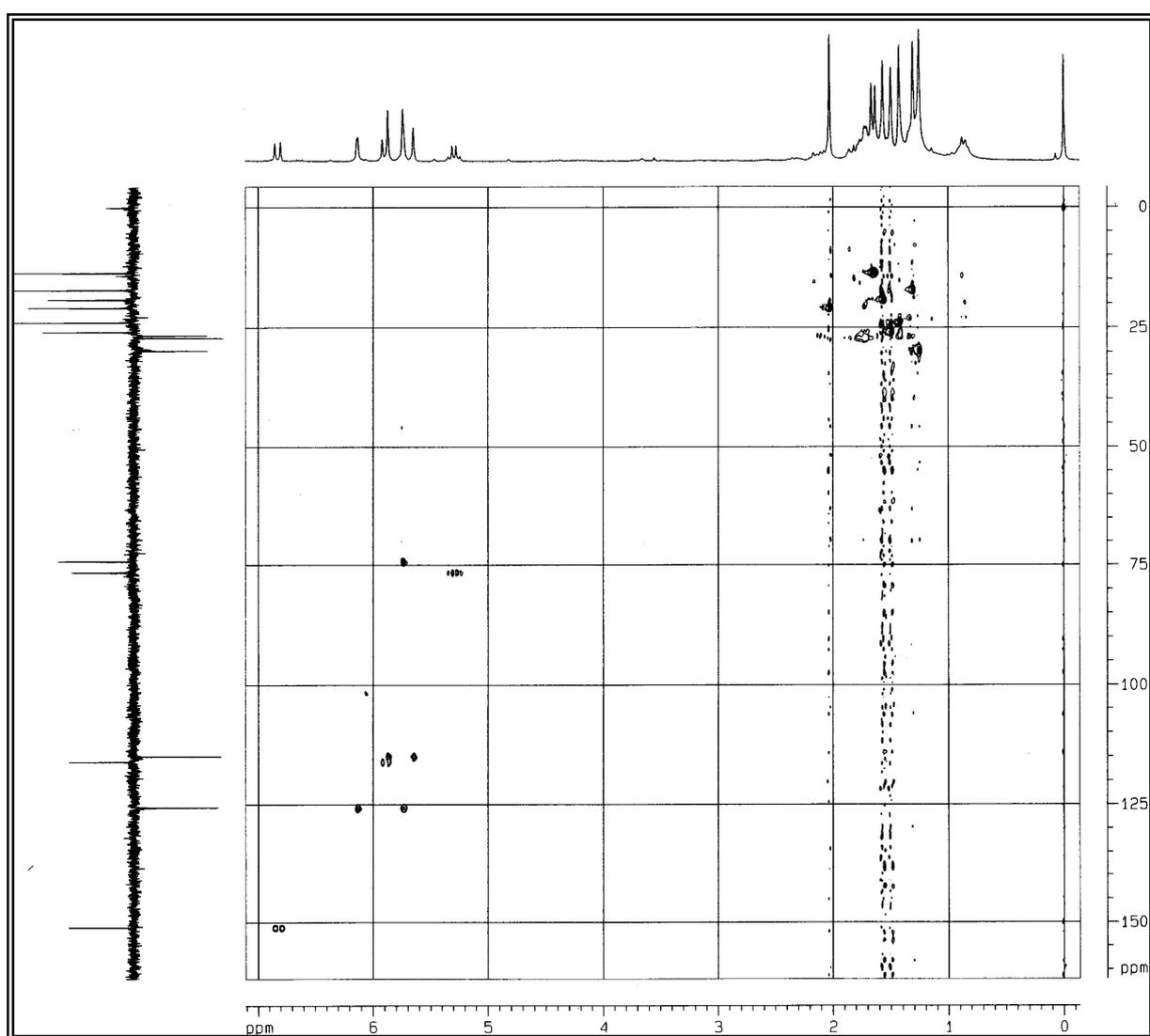
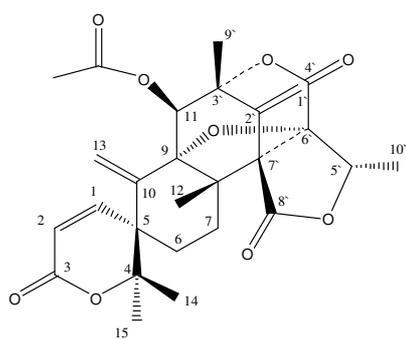
Anexo 2.3.1 – Espectro de RMN de ¹H (200MHz, CDCl₃, δ) de Pb3.



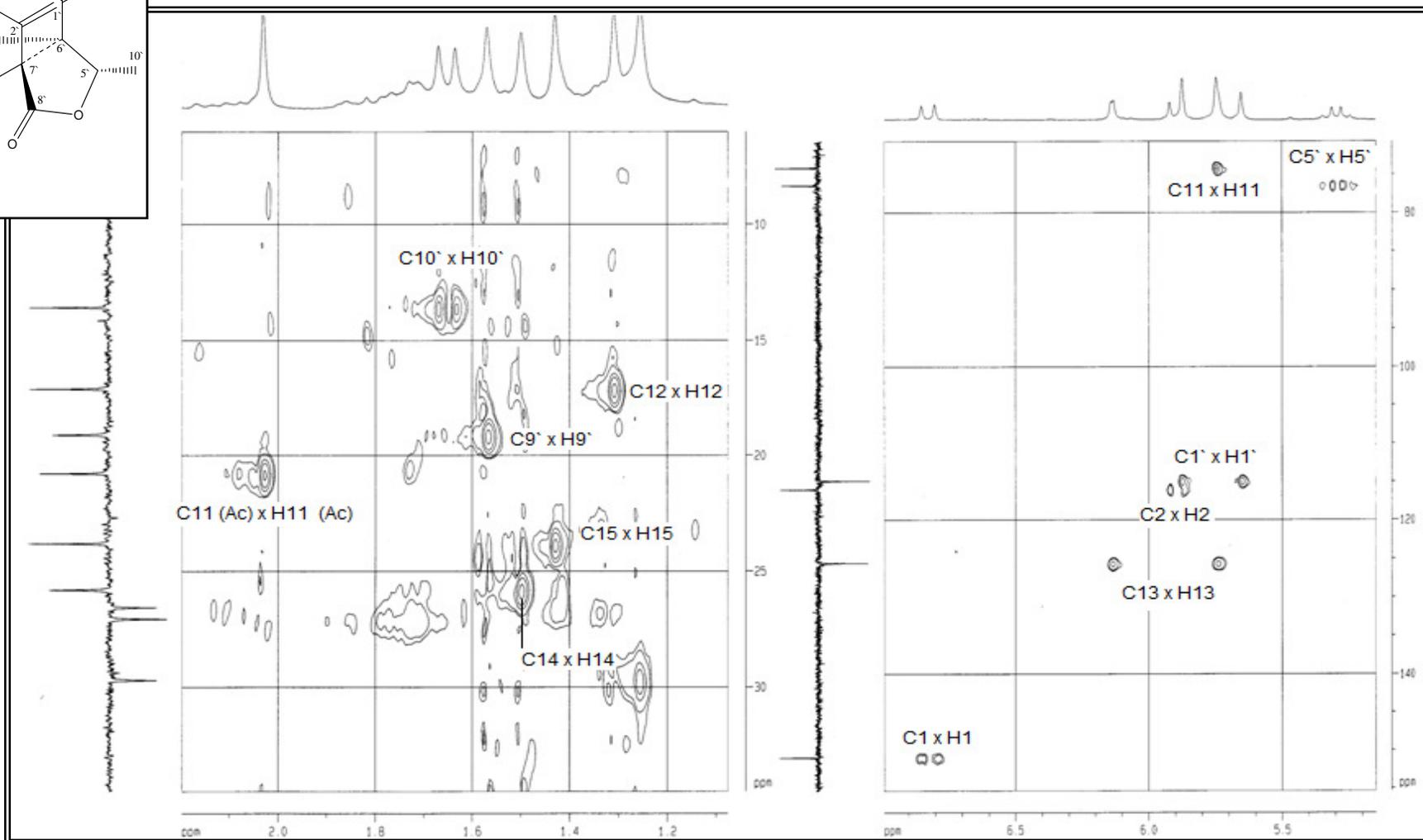
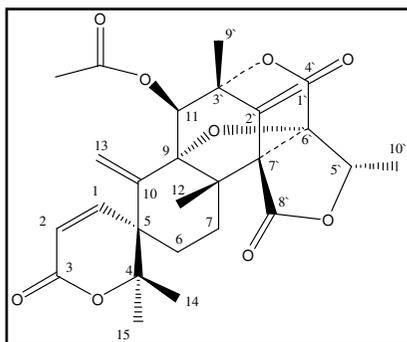
Anexo 2.3.2 – Espectro de RMN de ^{13}C (50MHz, CDCl_3 , δ) de **Pb3**.



Anexo 2.3.3 – Sub-espectro de DEPT (50MHz, CDCl_3 , δ) de **Pb3**.

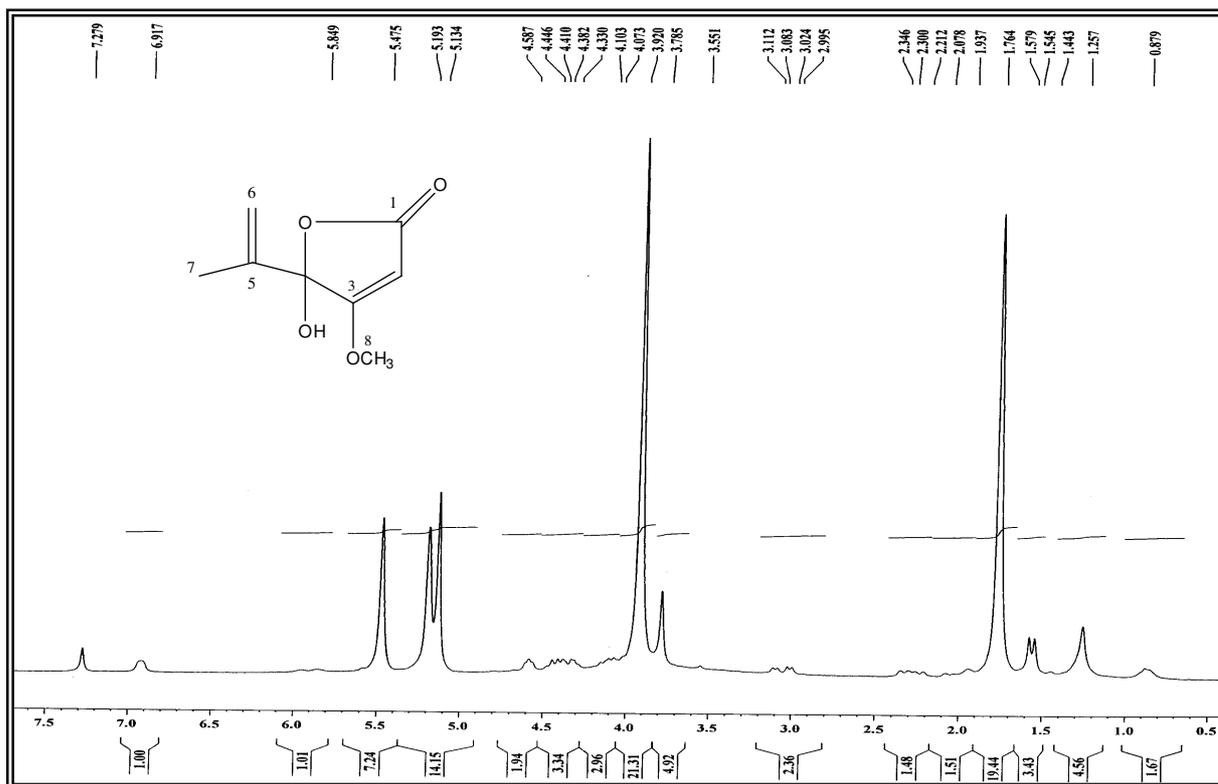


Anexo 2.3.4 – Mapa de contornos HMQC de Pb3.

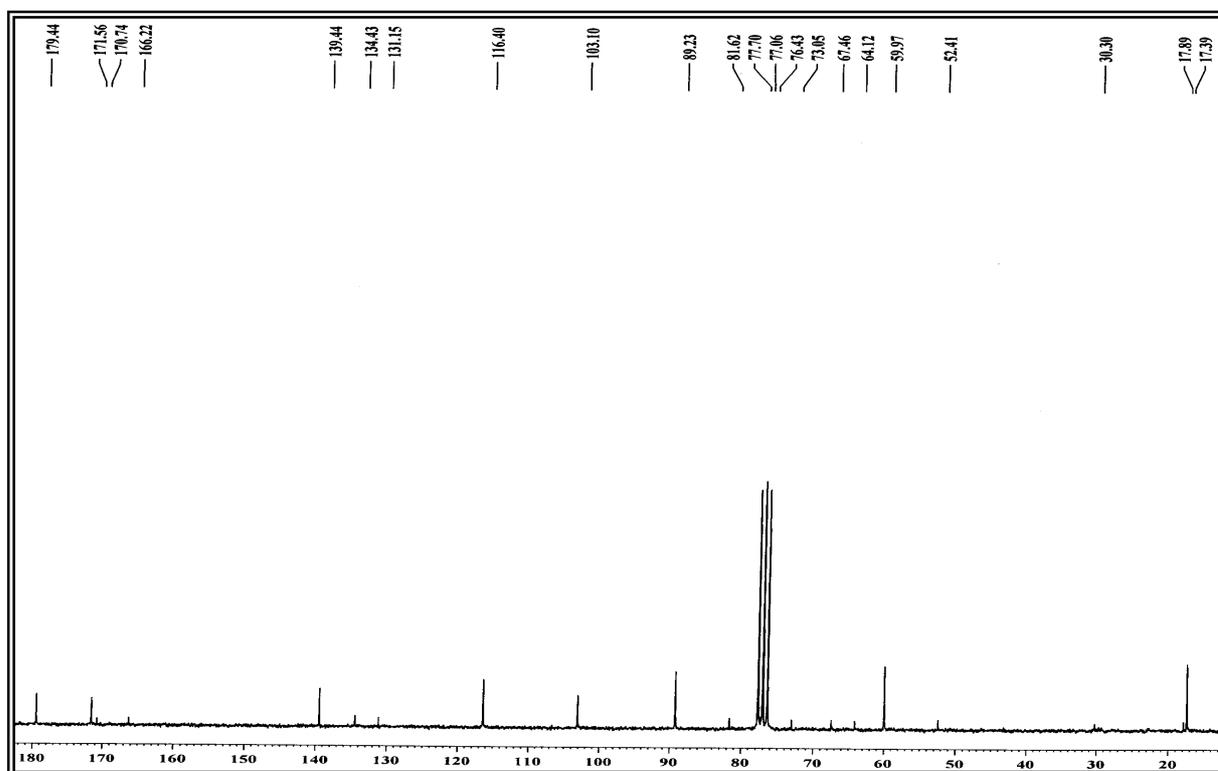


Anexo 2.3.5 – Expansões do mapa de contornos HMQC de Pb3.

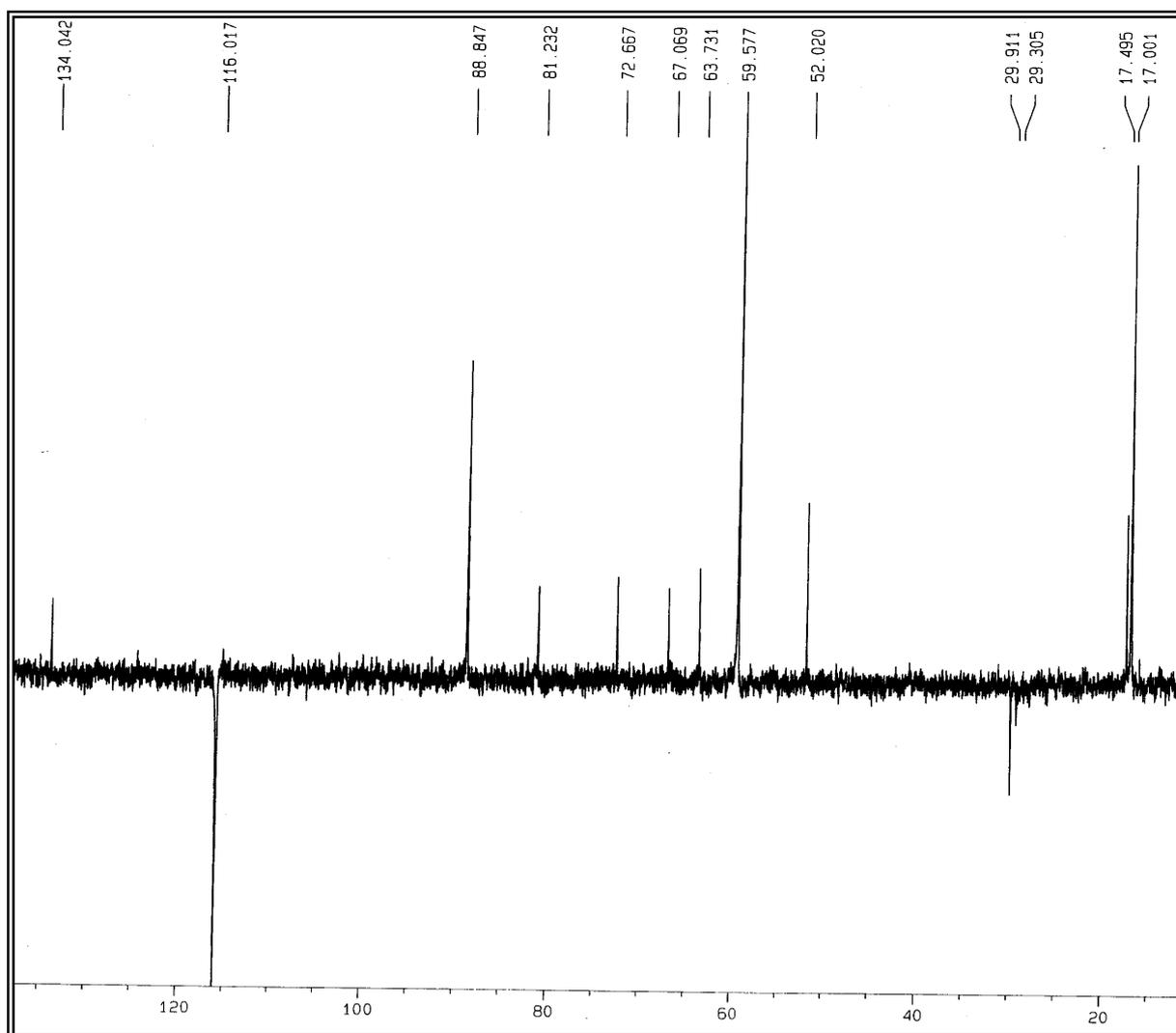
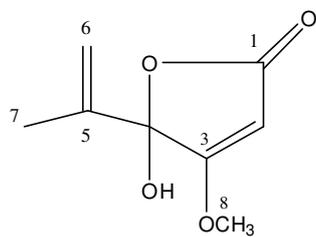
2.4. Pb4 (Ácido penicílico)



Anexo 2.4.1 – Espectro de RMN de ¹H (200MHz, CDCl₃, δ) de Pb4.



Anexo 2.4.2 – Espectro de RMN de ¹³C (50MHz, CDCl₃, δ) de Pb4.



Anexo 2.4.3 – Sub-espectro de DEPT (50MHz, CDCl_3 , δ) de Pb4.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)