



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**ESTUDO QUÍMICO DE UMA LINHAGEM DE *Purpureocillium*
lilacinum COM POTENCIAIS LARVICIDA E ANTIPLASMÓDICO**

FAGNER FERREIRA DA COSTA

MESTRADO

MANAUS/AM

Setembro/2022

FAGNER FERREIRA DA COSTA

ESTUDO QUÍMICO DE UMA LINHAGEM DE *Purpureocillium lilacinum* COM POTENCIAIS LARVICIDA E ANTIPLASMÓDICO

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em química da Universidade Federal do Amazonas, exigida para o título de mestre em Química, com ênfase na Linha de Pesquisa Produtos Naturais

Orientador: Prof. Dr. Afonso Duarte Leão de Souza

Co-orientadora: Prof.^a Dra. Antonia Queiroz Lima de Souza

MANAUS/AM
Setembro/2022

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

C837e Costa, Fagner Ferreira da
Estudo químico de uma linhagem de *Purpureocillium lilacinum*
com potenciais larvicida e antiplasmódico / Fagner Ferreira da
Costa . 2022
119 f.: il.; 31 cm.

Orientador: Afonso Duarte Leão de Souza
Coorientadora: Antonia Queiroz Lima de Souza
Dissertação (Mestrado em Química de Prod. Naturais) -
Universidade Federal do Amazonas.

1. *Purpureocillium lilacinum*. 2. Leucinostatinas. 3. Larvicida. 4.
Antiplasmódico. I. Souza, Afonso Duarte Leão de. II. Universidade
Federal do Amazonas III. Título

*Estudo químico de uma linhagem de Purpureocillium
lilacinum com potenciais larvicida e antiplasmódico*

FAGNER FERREIRA DA COSTA

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal do Amazonas como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre (a) em Química.

Aprovada em, 30 de setembro de 2022.



AFONSO DUARTE LEÃO DE SOUZA (PPGQ/UFAM)

Presidente/Orientador



MARIA LÚCIA BELÉM PINHEIRO (PPGQ/UFAM)

Membro Interno



ANDREY MOACIR DO ROSÁRIO MARINHO (UFPA)

Membro Externo

Universidade Federal do Amazonas
Manaus, 30 de setembro de 2022.

AGRADECIMENTOS

À Deus, que por caminhos tortuosos mostrou que é possível se alcançar os sonhos mais impossíveis.

Ao meu orientador Dr. Afonso Duarte Leão de Souza, por todos os ensinamentos prestados ao longo destes anos, pela paciência, compreensão e por todo auxílio fornecido, serei eternamente grato.

À minha orientadora Dr^a. Antonia Queiroz Lima de Souza, que me introduziu na microbiologia com paciência e dedicação, por todos os ensinamentos fornecidos e auxílio nos momentos de necessidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos fornecida, vital para o andamento deste projeto.

À Universidade Federal do Amazonas, por fornecer o mestrado em química através do Programa de Pós-graduação em Química, dando oportunidade para a qualificação de inúmeros profissionais na região norte.

À Central Analítica da Universidade Federal do Amazonas, por fornecer a infraestrutura necessária para muitos dos experimentos realizados.

Às professoras Dr^a. Rita de Cássia Saraiva Nunomura e Dr^a. Priscila Ferreira Aquino, pelas contribuições prestadas durante o exame de qualificação.

À toda equipe do Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massas (LABCEM), em especial a meu amigo Dr. Felipe Moura e minha amiga Me. Ingrity Suelen Costa Sá, por todos ensaios realizados, pelos ensinamentos e conselhos fornecidos e pela amizade ao longo destes anos.

À equipe do Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear (NMRLAB), em especial ao Me. Kidney Neves e ao Dr. Marcos Machado, por todos os ensaios realizados.

À equipe do Laboratório de Malária e Dengue do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), em especial ao Dr. Ricardo de Melo Katak, ao Me. Juan Campos de Oliveira, a Me. Vernilce Alves Muniz e a Dr^a. Rosemary Aparecida Roque, por todos os ensaios larvicidas empreendidos.

À toda equipe do Laboratório de Diagnóstico e Controle de Doenças Infecciosas na Amazônia (DCDIA) do instituto de Pesquisas Leônidas e Maria Deane (ILMD), em especial a Dr^a. Patrícia Puccineli Orlandi, a Dr^a. Elizângela Farias da Silva e a Me. Ivanildes dos Santos Bastos, pela realização dos ensaios antiplasmódicos e de citotoxicidade.

À toda equipe do Laboratório de Bioensaios e Microrganismos da Amazônia (LabMICRA), em especial a Sarah, Rosângela, Richelly, Douglas, Breno, Fátima, Rafael, Elison, Marta, Gabriel e Thalita, por toda ajuda com os ensaios microbiológicos, pelo carinho, pela amizade e por todas nossas conversas.

Aos meus pais, Maria Auxiliadora Ferreira da Costa e Francisco Alves da Costa Neto, pela instrução e por todo apoio prestado nas horas mais difíceis, o qual foi fundamental para que fosse possível chegar até aqui.

À minha irmã Mírian Ferreira da Costa, pela amizade e apoio com meu filho, nos incontáveis dias que precisei realizar meus experimentos.

À Rayanne Azevedo de Souza, minha companheira amada, por toda sua paciência nos momentos difíceis e pela presença acalentadora e importantíssima na minha vida.

Ao meu querido filho Enzo Pereira da Costa, cujo sorriso tem o poder de acalmar a mais terrível das preocupações.

RESUMO

A espécie *Purpureocillium lilacinum* é uma das linhagens mais promissoras de fungos como fonte de agentes bioativos e útil para controle biológico de nematódeos. Já foi identificada sua ação contra diversos tipos de organismos incluindo bactérias, fungos, plantas e insetos. Desta forma, este projeto teve por objetivo o estudo químico e biológico de uma linhagem de *Purpureocillium lilacinum*, com intuito de extrair e identificar substâncias que tenham atividade antiplasmódica e/ou larvicida por meio de estudo bioguiado. A espécie foi cultivada em meio BDL, sendo feita a extração por partição do meio líquido com acetato de etila e isopraponol em uma proporção de 9:1, após 21 dias de cultivo. O extrato obtido foi fracionado em cromatografia de coluna aberta de C₁₈ e as frações resultantes submetidas a ensaios larvicidas contra o vetor *Aedes albopictus* e ensaios antiplasmódicos contra o protozoário *Plasmodium falciparum*, sendo as amostras com resultados positivos analisadas por espectrometria de massas e RMN. Estas frações foram então refracionadas em coluna aberta e CLAE, resultando em frações ricas em leucinostatinas e outra contendo o isômero configuracional do ácido pinélico. As amostras contendo as leucinostatinas apresentaram elevada atividade larvicida e antiplasmódica, bem como alta citotoxicidade contra linhagens de fibroblastos MRC5.

Palavras-chave: *Purpureocillium lilacinum*, leucinostatinas, larvicida, antiplasmódico

ABSTRACT

The *Purpureocillium lilacinum* species is one of the most promising fungi strain at the source of bioactivity agent and is useful for biological control of nematodes. Has already been identified its action against several microorganisms, including bacterium, fungi, plants and insects. Thus, this project aimed the chemical and biological study of a *Purpureocillium lilacinum* strain, intending to extract and identify compounds that had antiplasmodial and/or larvicidal activity through bioguided study. The species was cultivated in PDY medium, and the extraction was carried out by partitioning the liquid medium with ethyl acetate and isopropanol in a 9:1 ratio, after 21 days of cultivation. The obtained extract was fractionated in C18 open-column chromatography and the resulting fractions were submitted to larvicidal assays against the *Aedes albopictus* vector and antiplasmodial assays against the protozoan *Plasmodium falciparum*, and the samples with positive results were analyzed by mass spectrometry and NMR. These fractions were then refracted in an open-column and HPLC, resulting in fractions rich in leucinostatins and another containing the configurational isomer of pinelic acid. Leucinostatin-containing samples showed high larvicidal and antiplasmodial activity, as well as high cytotoxicity against MRC5 fibroblast lineages

Keywords: *Purpureocillium lilacinum*, leucinostatins, larvicidal, antiplasmodial

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Metabólitos secundários já isolados de <i>P. lilacinum</i> . (1) Paecilomida, (2) fomapirona C, (3) ácido kójico, (4) purpureona, (5) fomaligol A, (6) acremonidina A, (7) cremoxantona C, (8) cerebrosídeo A.....	9
Figura 2: Ciclo de vida do plasmódio (Fonte: visualhunt.com, data de acesso em: 5 de agosto de 2021)	15
Figura 3: Acima, cromatograma obtido por CLAE-EM da purificação da fração Pe4R , onde foram usados filtros para identificação dos íons de interesse na amostra. Abaixo, espectro de massa das frações Pe4R1 e Pe4R2.....	32
Figura 4: Cromatograma (acima) obtido do fracionamento da fração Pe4S . Os espectros de massas das frações Pe4S10 (A) e Pe4S11 (B) estão disponíveis na parte inferior da figura	34
Figura 5: Espectro de RMN de ¹ H da subfração Pe3C4, em CD ₃ OD e 500 MHz	Erro! Indicador não definido.
Figura 6: Espectro de RMN ¹³ C e RMN ¹³ C DEPT-135 da fração Pe3C4, em CD ₃ OD e 125 MHz	Erro! Indicador não definido.
Figura 7: Fragmento proposto para a fração Pe3C4 e suas correlações, observadas nos mapas de contornos HMBC (setas vermelhas) e COSY (ligações em azul).....	39
Figura 8: Fragmentos propostos para a fração Pe3C4 , com base nos mapas de contorno COSY (ligações em azul) e HMBC (setas vermelhas)	40
Figura 9: Molécula proposta para a fração Pe3C4	40
Figura 10: Fragmentação do íon <i>m/z</i> 329 [M-H] ⁻ em fonte ESI	41
Figura 11: Comparação da configuração da dupla ligação entre a estrutura proposta e o ácido pinélico.....	42
Figura 12: Mapa de contornos de HSQC da fração Pe3C4 em CDCl ₃	44
Figura 13: Mapa de contornos HMBC em CDCl ₃ , evidenciando os acoplamentos encontrados da fração Pe3C4	45

Figura 14: Mapa de contornos COSY da fração Pe3C4 , com destaque para os acoplamentos encontrados	46
Figura 15: Espectro de massas da fração Pe4S11 , obtido em fonte APCI, no modo positivo	47
Figura 16: MS2 do íon 1218,8 [M+H] ⁺ , fonte APCI	47
Figura 17: Espectro de massa (MS3) da fração Pe4S11 , obtido em ESI e modo positivo.....	48
Figura 18: Principais fragmentos formados durante a fragmentação de peptídeos	49
Figura 19: Proposta de fragmentação da leucinostatina A correspondente aos íons tipo b. Adaptado de Isogai et al. (1992).	50
Figura 20: Propostas de fragmentação para a leucinostatina A, com destaque para os mecanismos de A) perda de água, B) perda da butanona e C1) e C2) perda da N,N-dimetilamina.....	51
Figura 21: Fragmentação do íon m/z 1200,8 [M+H] ⁺	52
Figura 22: Proposta de fragmentação para a leucinostatina A2. Adaptado de Isogai et al (1994)	52
Figura 23: Fragmentação do íon m/z 1118,7 [M+H] ⁺	53
Figura 24: Proposta de fragmentação para a leucinostatina D. Adaptado de Isogai et al. (1994).....	53
Figura 25: Ampliações do espectro de RMN de ¹ H da fração Pe4S11 em CDCl ₃ (500 MHz). A) região dos hidrogênios metílicos e metilênicos, B) hidrogênios metilênicos e metínicos, C) hidrogênios metínicos e D) hidrogênios olefínicos e ligados a N peptídico.....	55
Figura 26: Ampliações do espectro de RMN de ¹³ C da fração Pe4S11 em CDCl ₃ (125 MHz). A) Região dos carbonos metílicos e metilênicos, B) carbonos metilênicos, C) carbonos metilênicos e metínicos e D) carbonos olefínicos, acílicos e carbonílico.....	56

Figura 27: Ampliações do espectro de DEPT-135 em CDCl ₃ da fração Pe4S11 , evidenciando a região A) de carbonos metílicos, B) carbonos metílicos e metilênicos, C) carbonos metínicos e D) carbonos olefínicos.....	57
Figura 28: Acima: ampliação do mapa de correlações de COSY em CDCl ₃ , evidenciando os hidrogênios se correlacionam com grupos NH e NH ₂ . Abaixo: as correlações observadas em destaque.....	59
Figura 29: Acima: ampliação do mapa de correlações TOCSY para a fração Pe4S11 em CDCl ₃ , evidenciando as correlações entre grupos NH e NH ₂ com seus respectivos sistemas de <i>spin</i> . Abaixo: as correlações observadas em destaque. 60	60
Figura 30: Acima: ampliação do espectro de HMBC em CDCl ₃ da fração Pe4S11 , evidenciando as correlações referentes ao resíduo AHMOD. A) Correlações entre os hidrogênios metínicos, metilênicos e metílicos com os respectivos grupos, B) correlações com o carbono carbonílico e C) correlações do grupo NH com os hidrogênios das vizinhanças. Abaixo: as correlações observadas em destaque..	62
Figura 31: Correlações observadas no espectro de COSY para a fração Pe4S11 acerca do resíduo AHMOD	64
Figura 32: Correlações observadas no espectro de TOCSY para a fração Pe4S11 em CDCl ₃ , destacando as correlações dos hidrogênios olefínicos	65
Figura 33: Correlações encontradas no espectro de COSY (A) e TOCSY (B) da fração Pe4S11 , com destaque para as interações entre os hidrogênios que compõem o aminoácido metilprolina	66
Figura 34: Correlações no HMBC para a fração Pe4S11 , com destaque nas interações encontradas para os três resíduos de ácido α-aminobutírico	67
Figura 35: Ampliações no espectro de ROESY em CDCl ₃ para a fração Pe4S11	68
Figura 36: Proposta estrutural para a leucinostatina A	76
Figura 37: Espectro de massas da fração Pe4S10, obtido em fonte ESI, no modo positivo.....	77

Figura 38: Fragmentação dos íons [M+H] ⁺ m/z 1205 (L-B), 1187 (L-B2), 1135 (L-H) e 1105 (L-F), com suas respectivas perdas identificadas	78
Figura 39: Estrutura e proposta de fragmentação para os íons m/z 1205 (L-B) e 1187 (L-B2).....	79
Figura 40: Estrutura e proposta de fragmentação para os íons m/z 1135 (L-H) e 1105 (L-F)	79
Figura 41: Atividade larvicida do extrato bruto Pe e subfrações Pe2 , Pe3 e Pe4 contra larvas em terceiro estágio de <i>A. albopictus</i>	81
Figura 42: Aparência das larvas de <i>A. albopictus</i> : (A) larva controle e (B) após administração dos extratos larvicidas.....	82
Figura 43: Atividade larvicida observada nas frações bioativas.....	82
Figura 44: Atividade larvicida das frações onde foram identificadas leucinostatinas	83
Figura 45: Viabilidade celular das frações testadas contra linhagens de fibroblastos MRC5	85
Figura 46: Espectro de massas da fração Pe3C4, modo negativo	97
Figura 47: Espectro de MS2 da fração Pe4S10	97
Figura 48: Mapa de correlação ¹ H- ¹ H no espectro de COSY da fração Pe4S11 em CDCl ₃	98
Figura 49: Espectro de HSCQ para a fração Pe4S11	99
Figura 50: Mapa de correlação de HMBC da fração Pe4S11 em CDCl ₃	100
Figura 51: Mapa de correlação TOCSY em CDCl ₃ para a fração Pe4S11	101
Figura 52: Mapa de correlação ROESY para a fração Pe4S11	102
Figura 53: Espectro de massas <i>full scan</i> da fração Pe1B	103
Figura 54: Espectro de massas <i>full scan</i> da fração Pe2B	103
Fluxograma 1: Fluxograma da metodologia para o estudo bioguiado de <i>P. lilacinum</i>	18

Fluxograma 2: Fracionamento do extrato bruto e das frações subsequentes.....	23
Fluxograma 3: Fracionamento das frações com resultados positivos nos testes larvicidas.....	24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Metabólitos secundários isolados da espécie <i>P. lilacinum</i> que apresentaram atividade biológica.....	8
Tabela 2: Diferenças estruturais das leucinostatinas já descritas na literatura	10
Tabela 3: Classificação de citotoxicidade	30
Tabela 4: Massa das frações onde foi identificada mortalidade das larvas de <i>A. albopictus</i> acima de 50%	31
Tabela 5: Dados de RMN da fração Pe3C4 (500, 125 MHz)	36
Tabela 6: Comparativo dos dados de RMN da estrutura proposta com o ácido pinélico.....	42
Tabela 7: Dados de RMN da fração Pe4S11 (500, 125 MHz)	69
Tabela 8: Dados de fragmentação das leucinostatinas encontradas neste trabalho	80
Tabela 9: Viabilidades para as frações testadas para linhagens de fibroblasto MRC5.....	85
Tabela 10: Valores CI_{50} e classificação de atividade antiplasmódica.....	86

SUMÁRIO

Sumário

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS	4
2.1.	OBJETIVO GERAL	4
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1.	REINO FUNGI	5
3.1.1.	Fungos endofíticos	6
3.2.	<i>Purpureocillium lilacinum</i>	7
3.2.1.	Leucinostatinas.....	10
3.3.	VETORES E AGENTES PATOGÊNICOS.....	12
3.3.1.	Malária.....	12
3.3.2.	Arboviroses causadas por <i>Aedes albopictus</i>	15
4	MATERIAL E MÉTODOS	18
4.1.	OBTENÇÃO DOS EXTRATOS	19
4.1.1.	Preparo do meio	19
4.1.2.	Seleção e reativação da linhagem	19
4.1.3.	Cultivo em escala ampliada	20
4.1.4.	Obtenção dos metabólitos secundários	20
4.2.	FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS PROMISSORES.....	21
4.2.1.	Cromatografia em camada delgada (CCD).....	21
4.2.2.	Fracionamento bioguiado dos extratos	21
4.3.	IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS OBTIDAS.....	25

4.4.	ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIPLASMÓDICA	25
4.4.1.	Cultura de Plasmodium falciparum FCR-3.....	26
4.4.2.	Preparo dos extratos e da droga de controle	26
4.4.3.	Avaliação da Atividade Antiplasmódica <i>in vitro</i>	26
4.4.4.	Coloração de tampão fosfato-salino com brometo de etídio	27
4.4.5.	Verificação da inibição de crescimento por citometria de fluxo	27
4.5.	ENSAIOS LARVICIDAS	28
4.6.	ENSAIOS DE CITOTOXIDADE <i>IN VITRO</i>	29
4.7.	ANÁLISE DE DADOS	30
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1.	RESULTADO DO FRACIONAMENTO BIOMONITORADO	31
5.2.	CARACTERIZAÇÃO E ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL	35
5.2.1.	Caracterização da amostra Pe3C4 por RMN e espectrometria de massas 35	
5.2.2.	Caracterização dos compostos presentes nas frações Pe4S11 por espectrometria de massas.....	47
5.2.3.	Caracterização dos compostos presentes nas frações Pe4S10 por espectrometria de massas.....	77
5.3.	ATIVIDADE LARVICIDA	80
5.4.	ANÁLISE DOS ENSAIOS DE CITOTOXIDADE	84
6	CONCLUSÃO.....	87
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	88
	ANEXOS.....	97

1 INTRODUÇÃO

Os produtos naturais são utilizados desde os primórdios da humanidade. Sua obtenção e aplicação foram sendo aperfeiçoados com o passar do tempo. Com os avanços introduzidos desde o início do século passado, houve um salto no desenvolvimento de várias áreas da ciência, em particular para a produção e descoberta de novos fármacos oriundos de vegetais e outras fontes naturais (YUAN et al., 2016)

Em relação às possíveis fontes para obtenção de fármacos em potencial, o Brasil se destaca, haja vista que é o detentor da maior biodiversidade do mundo. Isto se deve à enorme variedade de biomas presentes, repercutindo diretamente na abundância da fauna e da flora do país. Estima-se que o Brasil possua 10% de todas as espécies do mundo em seu território (VALENCIA e CHAMBERGO, 2013).

Dentre as fontes mais interessantes para a busca de novos fármacos, têm-se os fungos. Estes são organismos multicelulares, eucariotos e detentores de uma das maiores diversidades de espécies no planeta. Os fungos podem estar associados a uma matriz vegetal, sem causar doenças ou algum sintoma macroscópico característico ao seu hospedeiro. Tais organismos são classificados como endofíticos e o resultado da interação fungo-planta pode muitas vezes ser benéfica para ambos, tendo em vista que o fungo pode prover proteção contra patógenos invasores e melhorar a retenção e o escoamento de nutrientes (MANE, PAARAKH e VEDAMURTHY, 2018).

No geral, os fungos são capazes de produzir uma ampla variedade de compostos químicos, diferentes em complexidade e efeitos, potencialmente interessantes em diversas aplicações. Tais substâncias são produzidas durante o metabolismo secundário destes organismos, e muitas vezes são responsáveis pelos efeitos tóxicos e farmacológicos observados. Assim, dentre os compostos isolados de fungos têm-se antibióticos, anticancerígenos, antifúngicos e antiparasitários (KHARWAR et al., 2011; KUMAR e KAUSHIK, 2013; YUADAV e SINGH, 2011).

Nesse contexto, a pesquisa de novas substâncias capazes de combater determinadas doenças infecciosas é de extrema importância, pois ainda são um grande problema para a saúde pública. Estima-se que 50 a 75% das causas de morte em hospitais são ocasionadas por agentes microbianos patogênicos. Em parte, esse número elevado se deve ao aumento da resistência dos microrganismos perante o uso desenfreado das drogas de primeira linha (CHITEMERERE e MUKANGANYAMA, 2014).

As doenças negligenciadas merecem atenção nesse ponto. São doenças que prevalecem em clima tropical e subtropical, abrangendo 149 países e afetando aproximadamente 1 bilhão de pessoas em todo planeta. Apesar dos números alarmantes, apenas 13 dos mais de 1400 novos fármacos aprovados entre os anos de 1975 e 1999 focavam sua ação no combate destas doenças (COHEN, STURGEON e COHEN, 2014).

Dentre as principais doenças negligenciadas, a malária é umas das doenças parasitárias mais importantes. Em 2018, a malária afetou cerca 228 milhões de pessoas, com a maioria dos casos registrados na África. Deste montante, aproximadamente 405 mil mortes foram registradas, grande parte sendo de crianças, as quais são mais vulneráveis a doença (WORLD MALARIA REPORT, 2020).

A dengue é outra enfermidade que se disseminou pelos trópicos de maneira alarmante nos últimos anos. É uma doença transmitida por mosquitos do gênero *Aedes*, em especial pelas espécies *A. aegypti* e *A. albopictus*. Estima-se que 3,9 bilhões de pessoas estejam com risco de infecção por dengue no mundo (WHO, 2021). Além da dengue, estes vetores podem transmitir outras arboviroses como o vírus Zika e a febre Chikungunya, outros males que tornam a situação ainda mais preocupante. Uma das formas de se reduzir a disseminação destas arboviroses é por meio do controle das populações de mosquitos, através da descoberta de novos agentes que possam ser utilizados para interromper o ciclo epidemiológico em algum ponto essencial, como durante o crescimento das larvas (ZARA et al., 2016).

Em vista disso, o estudo químico e biológico de uma linhagem de *Purpureocillium lilacinum* justifica-se pelo potencial desta espécie para a produção de substâncias com atividade antiplasmódica e/ou larvicida, fundamentais para o combate ao parasita da malária e ao mosquito *A. albopictus*, vetor da dengue e arboviroses relacionadas.

2 OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Estudar química e biologicamente uma linhagem de *Purpureocillium lilacinum* em busca de uma nova fonte de substâncias com atividades larvicida e antiplasmódica.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Obter extrato, frações e metabólitos do meio cultivado por uma linhagem de *Purpureocillium lilacinum*, com potencial contra larvas de *Aedes albopictus*;

Identificar metabólitos produzidos pelo fungo, priorizando as frações ativas do extrato;

Avaliar as frações e metabólitos obtidos do extrato em ensaios larvicidas, antiplasmódicos e de citotoxicidade.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. REINO FUNGI

O reino Fungi é detentor de uma vasta biodiversidade. Hawksworth e Lücking (2017) estimaram que existam entre 2,2 a 3,8 milhões de espécies, enquanto o mesmo estudo aponta um total de 120 mil espécies completamente catalogadas até então, isto é, algo entre 3% e 6%. Estes organismos estão distribuídos em sete filos, sendo encontrados como cogumelos, leveduras, mofos, políporos, dentre outros (TAKAHASHI et al., 2017).

De maneira geral, os fungos são organismos eucariotos, com um ou mais núcleos, alguns possuidores de flagelos, enquanto outros constituem corpos filamentosos, com paredes celulares formadas de carboidratos, sendo homo ou heterocarióticos, haploides, dicarióticos ou diploides. A obtenção de energia destes organismos se dá por meio da absorção de nutrientes contendo carbono sendo, portanto, quimio-heterotróficos. Algumas espécies de fungos se agrupam por meio de hifas, as quais são ramos microscópicos que se entrelaçam e formam estruturas que podem ser vistas a olho nu, chamadas de micélios (TORTORA, FUNKE e CASE, 2019).

Os fungos residem em diversos habitats na natureza, de modo que são transportados de muitas formas, seja por meio de agentes na água e no ar, como também através de seres vivos, como insetos e animais. A biodiversidade dos fungos é claramente observada na grande variabilidade nas características biológicas e químicas, com rotas metabólicas específicas e enzimas únicas. Devido a estas propriedades, estes organismos são utilizados na produção de medicamentos, na indústria alimentícia, bem como em nichos menos conhecidos, como na remoção sustentável de poluentes em áreas contaminadas (TAKAHASHI et al., 2017).

Dentre os produtos naturais já isolados de fungos, a descoberta da penicilina em 1929 por Alexander Fleming, a partir do fungo *Penicillium chrysogenum*, foi um marco histórico e ponto de partida para a intensificação na busca de produtos naturais com capacidade bioativa em microrganismos

(CUNHA, FONSECA e CALADO, 2019). A penicilina foi amplamente utilizada durante a segunda guerra mundial, salvando milhares de vidas e revolucionando a ciência e a medicina da época. Outro exemplo importante de produto natural de origem fúngica é a ciclosporina A, obtida através da fermentação das espécies *Trichoderma polysporum* e *Cylindrocarpon lucidum*, sendo muito utilizada no transplante de órgãos devido a sua atividade imunossupressora, reduzindo a chance de ocorrer rejeição durante este procedimento (PATOCKA et al., 2020).

3.1.1. Fungos endofíticos

Os fungos endofíticos são caracterizados por organismos que habitam plantas sem causarem efeitos negativos iminentes ao seu hospedeiro (BACON e WHITE, 2000; MANE, PAARAKH e VEDAMURTHY, 2018). Estes fungos têm sido amplamente estudados principalmente por dois motivos: como um grupo ecológico para ampliar o número de espécies fúngicas conhecidas e como fonte de moléculas bioativas (SURYANARAYANAN, 2013). São seres bastante diversificados, de modo que podem habitar em plantas de regiões tropicais e desérticas, como também podem ser encontrados em tecidos vegetais de plantas do Ártico (CHAPLA, BIASETTO e ARAUJO, 2013). Nas zonas tropicais, é onde normalmente encontra-se uma maior diversidade de fungos endofíticos, em coerência com também a maior biodiversidade de plantas hospedeiras. Contudo, alguns estudos sugerem que o ambiente seja mais determinante que o organismo hospedeiro nas comunidades endofíticas (SURYANARAYANAN, 2013). Assim, é possível encontrar em uma única espécie hospedeira centenas de fungos endofíticos (NASIRUDDIN et al., 2020).

A interação simbiótica entre o fungo endofítico e o seu hospedeiro pode resultar em proteção contra possíveis patógenos e pragas, bem como na melhora do crescimento vegetal e o seu enraizamento, enquanto a planta fornece abrigo e alimento ao organismo endofítico (MUSSI-DIAS et al., 2012; UZMA et al., 2019). Desta forma, é interessante ressaltar que a proteção fornecida para a planta advém das substâncias químicas secretadas pelo fungo, que é capaz de produzir compostos com atividades antibióticas, antiparasitárias, imunossupressoras e

anticâncer (GOUDA et al., 2016; SINGH, 2019). Devido a estas interações com o hospedeiro e o meio no qual está inserido, os fungos endofíticos possuem uma gama de produtos naturais com grande potencial a ser explorada. A capacidade biossintética destes microrganismos pode ainda ser modificada pela transferência horizontal de genes entre a planta hospedeira e o fungo endofítico (SURYANARAYANAN, 2013), de modo que a grande diversidade de metabólitos secundários produzidos por estes organismos está distribuída em várias classes, como em alcaloides, esteroides, terpenos, quinonas, fenilpropanoides, isocumarinas, lignanas, ácidos fenólicos, peptabólitos, dentre outros (CHAPLA, BIASETTO e ARAUJO, 2013).

3.2. *Purpureocillium lilacinum*

De acordo com Index fulgorum (2022), a espécie *Purpureocillium lilacinum*, antigamente conhecida por *Paecilomyces lilacinus*, é pertencente ao reino Fungi, divisão Ascomycota, subdivisão Pezizomycotina, classe Sordariomycetes, subclasse Hypocreomycetidae, ordem Hypocreales e família Ophiocordycipitaceae. O nome do gênero advém dos conídios púrpuras produzidos por estas espécies.

Esta espécie pode ser encontrada em diversos ecossistemas, sendo onipresente nos solos e se adequando como saprófita em diferentes habitats, que incluem florestas, campos agrícolas, desertos e em sistemas estuarinos de sedimentação (PRASAD, VARSHNEY e ADHOLEYA, 2015).

De maneira geral, diversos metabólitos bioativos já foram identificados nos extratos oriundos do fungo *P. lilacinum*. Abdel-Wareth et al. (2019) observou uma elevada atividade antioxidante presente no extrato de acetona obtido desta espécie, bem como uma inibição considerável contra linhagens de células tumorais HepG2. Além disso, o mesmo extrato apresentou atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*.

Dentre os metabólitos produzidos por esta espécie, são produtores de peptabióticos conhecidos por leucinostatinas, anteriormente chamadas de

paelotoxinas, substâncias consideradas importantes agentes de controle biológico, em especial para as espécies de interesse econômico do gênero *Meloidogyne*, nematoides reconhecidos por parasitar diversas culturas agrícolas, como plantações de café, soja, algodão, entre outras (SIDIQUI e MAHMOOD, 1996; MARTÉZ et al., 1996; SANTIAGO et al., 2006; GIRI et al., 2022). A Tabela 1 contém alguns dos metabólitos secundários já identificados e isolados de linhagens de *P. lilacinum* que apresentaram alguma atividade biológica. A Figura 1 apresenta a estrutura química de alguns destes compostos, onde observa-se a grande diversidade de substâncias que esta espécie é capaz de produzir.

Tabela 1: Metabólitos secundários isolados da espécie *P. lilacinum* que apresentaram atividade biológica

Metabólito secundário	Atividade biológica	Referência
Paecilomida	Inibição enzimática	Teles e Takahashi, 2013
Fomapirona C	Antibacteriano	Chen et al., 2020
Leucinostatina A	Antifúngico, antibacteriano, antitumoral, nematicida	Fukushima et al., 1983; Mikami et al., 1989; Kawada et al., 2010
Leucinostatina B	Antifúngico, antibacteriano, antitumoral, nematicida	Fukushima et al., 1983 Mikami et al., 1989; Kawada et al., 2010
Leucinostatina D	Antifúngico, antibacteriano, fitotóxico	Rossi, Tuttobello e Ricci, 1987
Cerebrosídeo A	Nematicida	Zhang et al., 2010;
Cerebrosídeo C	Antifúngico	Wicklow et al., 1998
Cerebrosídeo D	Antifúngico	Wicklow et al., 1998
Fomaligol A	Antibacteriano e citotóxico	Elbandy et al., 2009; Yang et al., 2011
Purpureona	Anti-Leishmania e antibacteriano	Lenta et al., 2016
Ácido Kójico	Antibacteriano	Elbandy et al., 2009; Song et al., 2019
Acremoxantona C	Citotoxicidade moderada	Ayers et al., 2012; Madariaga-mazon et al., 2013;
Acremonidina A	Atividade antibacteriana moderada	Isaka et al., 2009; Madariaga-mazon et al., 2013;

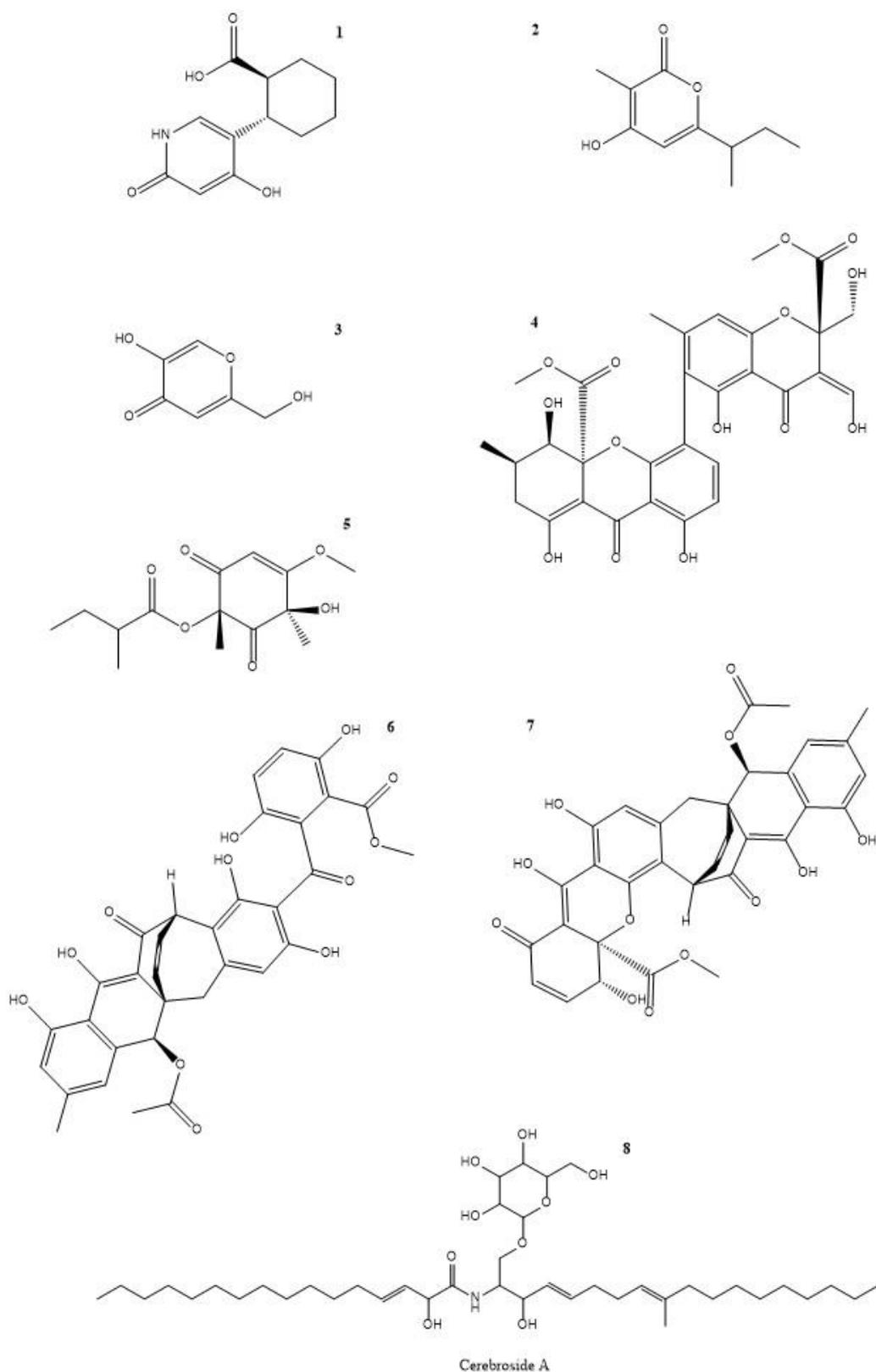


Figura 1: Metabólitos secundários já isolados de *P. lilacinum*. (1) Paecilomida, (2) fomapirona C, (3) ácido kójico, (4) purpureona, (5) fomaligol A, (6) acremonidina A, (7) acremoxantona C, (8) cerebrosídeo A

3.2.1. Leucinostatinas

As leucinostatinas estão na classe dos peptabióticos, os quais possuem resíduos de aminoácidos de origem não protéica em sua composição, como a *cis*-4-metil-L-prolina, a hidroxileucina e o ácido α -aminobutírico, bem como uma acilação característica na porção N-terminal da molécula (DEGENKOLB e BRUCKNER, 2008). São formadas tipicamente por nove aminoácidos, que estão dispostos em uma sequência linear, preferencialmente em uma conformação α -helicoidal devido às interações dos resíduos de ácido α -aminobutírico (CERRINI et al., 1989; MARTINEZ e MORAES, 2015).

Estes peptabióticos são oriundos do metabolismo secundário de fungos, conforme já observado em algumas espécies do gênero *Penicillium* (ARAI et al, 1972; FUKUSHIMA et al., 1983) e do gênero *Purpureocillium* (ISOGAI, 1992; MARTINEZ e MORAES, 2015). A Tabela 2 fornece as principais diferenças estruturais das leucinostatinas já identificadas.

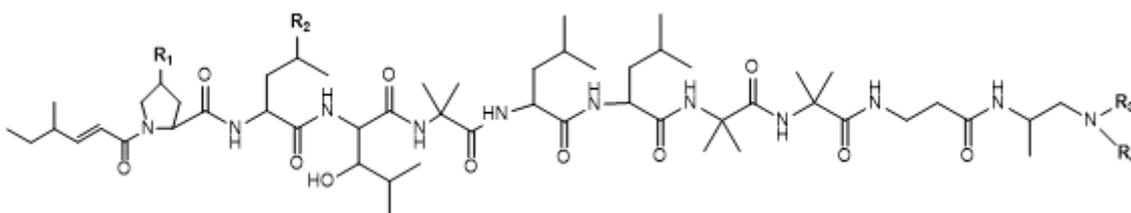


Tabela 2: Diferenças estruturais das leucinostatinas já descritas na literatura

Leucinostatina	M	R1	R2	R3, R4
A	1218	CH ₃	CH ₃ CH ₂ COCH ₂ CH(OH)	CH ₃ , CH ₃
A2	1200	CH ₃	CH ₃ CH ₂ COCH=CH	CH ₃ , CH ₃
B	1204	CH ₃	CH ₃ CH ₂ COCH ₂ (OH)CH	H, CH ₃
B2	1186	CH ₃	CH ₃ CH ₂ COCH=CH	H, CH ₃
C	1090	CH ₃	H	H, H
D	1118	H	H	CH ₃ , CH ₃
F	1104	CH ₃	H	H, CH ₃
H	1134	CH ₃	Me	H, H, (O)
K	1234	CH ₃	CH ₃ CH ₂ COCH ₂ (OH)CH	CH ₃ , CH ₃ , (O)
L	1190	H	CH ₃ CH ₂ COCH ₂ (OH)CH	H, CH ₃
N	1120	CH ₃	OH	H, CH ₃

O	1314	CH ₃	(C ₁₁ H ₁₇ O ₃)	CH ₃ , CH ₃
Q	1300	CH ₃	(C ₁₁ H ₁₇ O ₃)	H, CH ₃
R	1202	CH ₃	CH ₃ CH ₂ COCH ₂ CH ₂	CH ₃ , CH ₃
S	1204	CH ₃	CH ₃ CH ₂ CH(OH)CH ₂ CH ₂	CH ₃ , CH ₃
T	1090	H	H	H, CH ₃
U	1219	CH ₃	CH ₃ CH ₂ COCH ₂ (OCH ₃)CH	H, CH ₃
V	1188	CH ₃	CH ₃ CH ₂ COCH ₂ CH ₂	H, CH ₃
W	1286	CH ₃	(C ₁₀ H ₁₅ O ₃)	H, CH ₃
I	1104	H	CH ₃	CH ₃ , CH ₃
II	1120	H	H	H, CH ₃
III	1190	H	CH ₃ CH ₂ CH(OH)CH ₂ CH ₂	CH ₃ , CH ₃
IV	1190	CH ₃	CH ₃ CH ₂ CH(OH)CH ₂ CH ₂	H, CH ₃
V	1204	H	CH ₃ CH ₂ COCH ₂ (OH)CH	CH ₃ , CH ₃

Fonte: Adaptado de Isogai et al. (1992) e Martinez e Moraes (2015)

As leucinostatinas exibem atividade nematicida, antibacteriana, antimicótica e fitotóxica, cujo mecanismo de ação está fundamentado na inibição da produção do ATP mitocondrial (PARK et al., 2004; SHIMA et al., 1990).

A ação contra bactérias gram positivas e vários fungos já foi identificada em ensaios clínicos realizados com o peptabiótico leucinostatina D, com uma concentração mínima inibitória de 6 µg/mL para cepas de *Staphylococcus* e de 10 µg/mL para o fungo *Candida albicans*, por exemplo (ROSSI, TUTTOBELLO e RICCI, 1987).

Park e colaboradores (2004) verificaram a ação nematicida em uma fração contendo um conjunto de leucinostatinas distintas, onde a exposição a 100 ppm resultou na morte de 77% de *Caenorhabditis elegans* juvenis de segundo estágio em apenas 2 horas, e 100% de mortalidade em 24 horas.

A inibição do crescimento de células cancerígenas da próstata foi atribuída a leucinostatina A, por meio do impedimento da interação de células estromais da próstata com estas células tumorais (KAWADA et al., 2010). O estroma prostático é composto por um complexo de células do mesênquima multipotentes, de modo que são capazes de secretar uma ampla variedade de compostos imunomoduladores, citocinas, proteínas antiapoptóticas e fatores de crescimento

(LEVESQUE e NELSON, 2017). Strobel, Torczynski e Bollon (1997) verificaram a atividade inibitória da leucinostatina A para outras linhagens de células humanas cancerígenas, obtendo resultados promissores para duas linhagens de células mamárias tumorais, células de melanoma e algumas linhagens leucêmicas.

3.3. VETORES E AGENTES PATOGÊNICOS

3.3.1. Malária

A malária é uma doença parasitária transmitida por mosquitos do gênero *Anopheles*, cujo agentes patogênicos são protozoários do gênero *Plasmodium*. A maioria dos casos são ocasionados por *Pl. falciparum* ou *Pl. vivax*, apesar de também poderem ser causados por *Pl. malariae* e *Pl. ovale* (WHITE et al., 2014).

Os sintomas relacionados a malária dependem da espécie de plasmódio que está causando as enfermidades ao hospedeiro. Assim, o período de incubação para o *Pl. falciparum* é de 9 a 14 dias, para o *Pl. vivax* é entre 12 a 17 dias, para o *Pl. ovale* é entre 16 a 18 dias e para o *Pl. malariae* é de 18 a 40 dias (NEVES et al., 2016).

Os primeiros sintomas observados em pacientes com malária são mal-estar, dor de cabeça, fadiga, dores musculares, náusea, hipotensão postural, desconforto abdominal seguido de febres irregulares (WHITE et al., 2014). Ao final da esquizogonia, as hemácias são rompidas pelo plasmódio, de modo que este processo, conhecido por ataque paroxístico agudo, é acompanhado por sudorese e calafrio, que persiste por um intervalo de 15 a 60 minutos. Esta fase é seguida por uma febre que pode alcançar 41 °C ou temperaturas ainda mais elevadas, a qual passa após um período de 2 a 6 horas, acompanhada de fraqueza e sudorese intensa. O paciente então se sente melhor, até o próximo acesso malárico, que depende dos ciclos eritrocíticos de cada espécie de plasmódio (PANIKER e GHOSH, 2018). Assim, a espécie *Pl. falciparum* é responsável por uma febre terçã maligna, em intervalos de 36 a 48 horas, enquanto *Pl. vivax* e *Pl. ovale* infligem ao paciente uma febre terçã benigna, em intervalos de 48 horas. Já a espécie *Pl. malariae* é responsável

pela febre quartã, com intervalos de 72 horas (NEVES, MELO, et al., 2016; REY, 2007). Casos de convulsão são observados especificamente para malária oriunda de espécies de *Pl. falciparum* e podem evoluir para coma, estado conhecido por malária cerebral. Alguns pacientes também apresentam anemia e baço palpável após alguns dias do início da infecção. Em crianças, se observa um aumento no tamanho do fígado, enquanto em adultos pode ocorrer icterícia. A mortalidade aumenta quando a proporção de eritrócitos infectados excede 2% (WHITE et al., 2014).

Em 2019, estima-se que ocorreram 229 milhões de casos de malária no mundo, onde 94% destes casos ocorreram em região africana. Outras regiões de alta incidência de casos estão nas regiões sul e leste da Ásia e na região mediterrânea oriental. São estimadas 409 mil mortes ocasionadas por malária no mundo em 2019, sendo o grupo mais vulnerável as crianças menores de cinco anos (WORLD MALARIA REPORT, 2020).

No Brasil, os casos de malária se concentram principalmente nos sete estados da região amazônica, no Mato Grosso e no Maranhão. No ano de 2020, foram registrados 145.188 ocorrências de malária, onde foram notificados 44 óbitos da doença, um aumento de 18,9% em relação ao ano anterior (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021).

3.3.1.1. Ciclo evolutivo de *Plasmodium* spp.

O plasmódio atualmente está classificado como pertencente ao gênero *Plasmodium*, da família *Plasmodiidae*, da ordem *Haemosporida*, da classe *Aconoidasida* e do filo *Apicomplexa* (PANIKER e GHOSH, 2018). Existem cerca de 100 espécies de plasmódios capazes de infectar diversos tipos de vertebrados, dos quais apenas 4 causam enfermidades no ser humano (REY, 2007).

Os protozoários são transmitidos por mosquitos do gênero *Anopheles*, o qual inclui 465 espécies formalmente reconhecidas, contudo apenas 70 destas espécies são responsáveis por transmitir os protozoários aos seres humanos (SINKA et al., 2012).

O ciclo biológico do plasmódio é apresentado na Figura 2. Ele começa quando uma fêmea do gênero *Anopheles* se alimenta do sangue de um ser humano e insere o protozoário na forma de esporozoítos, que percorrem a corrente sanguínea até alcançarem o fígado, onde penetram nos hepatócitos. Nestas células, o plasmódio inicia o processo de diferenciação em trofozoítos pré-eritrocíticos, os quais realizam reprodução assexuada do tipo esquizogonia, originando milhares de merozoítos que acabam por romper os hepatócitos. Assim, estes merozoítos são liberados na circulação, podendo infectar os eritrócitos. O crescimento do parasita dentro dos eritrócitos consome o conteúdo dos glóbulos vermelhos, muda as condições da membrana para facilitar a incorporação de novos nutrientes por meio de novas proteínas derivadas do parasita. Este novo maquinário permite que o parasita se reproduza de modo que sua população cresça entre 6 a 20 vezes por ciclo. Alguns merozoítos sofrem um processo de diferenciação, e se tornam gametócitos, ainda dentro das hemácias. Durante o repasto sanguíneo, a fêmea do inseto *Anopheles* ingere algumas hemácias contendo estes gametócitos, que são levadas até o seu estômago. Lá, os gametócitos sofrem diferenciação em gametas masculinos e femininos, ocorrendo, por conseguinte, a fecundação. O zigoto formado aloja-se no estômago do inseto *Anopheles* na forma de um cisto, e sofre esporogonia, de maneira que são formadas células haploides deste processo de meiose. Estas células se multiplicam inúmeras vezes dando origem a muitos esporozoítos, que rompem o cisto e penetram na glândula salivar do inseto, que ao picar um indivíduo saudável, reinicia o ciclo (REY, 2007; WHITE et al., 2014; NEVES et al., 2016).

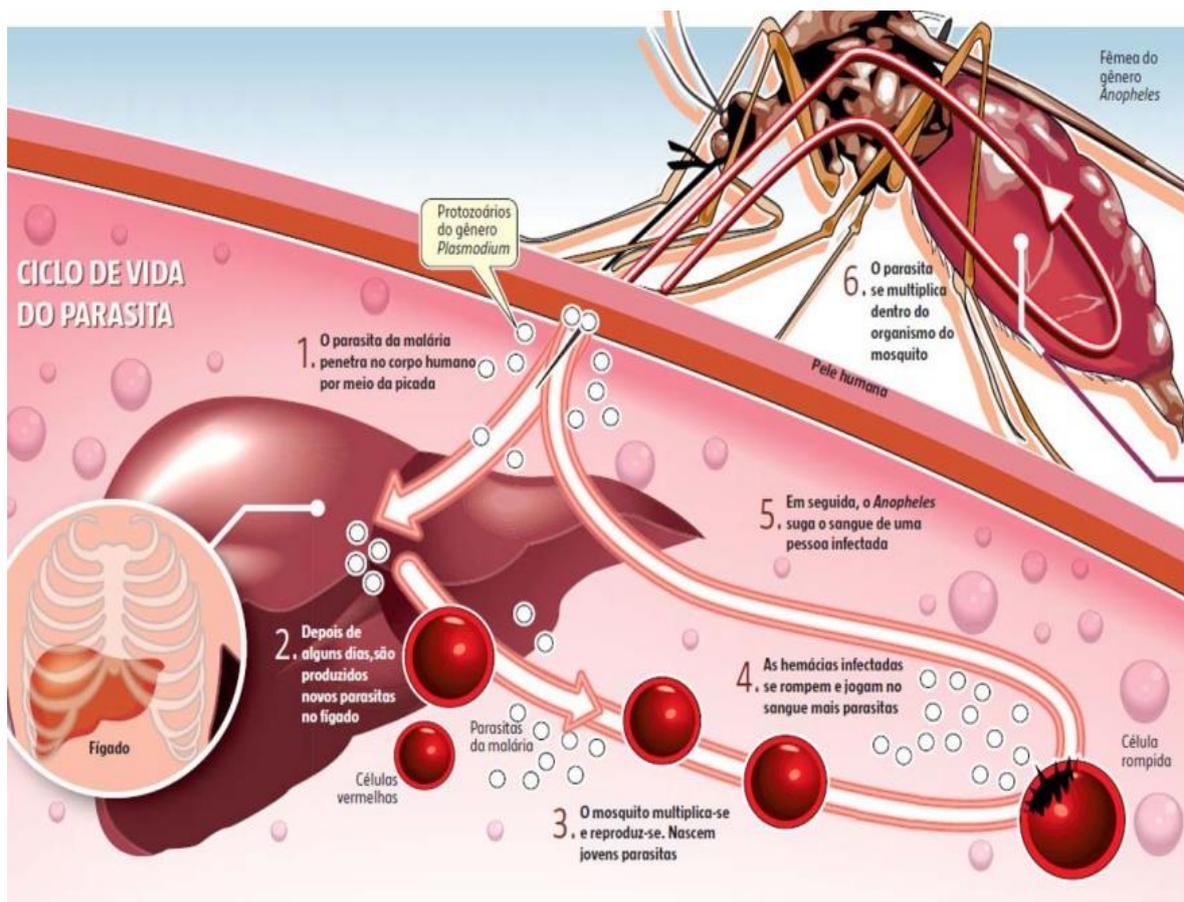


Figura 2: Ciclo de vida do plasmódio (Fonte: visualhunt.com, data de acesso em: 5 de agosto de 2021)

3.3.2. Arboviroses causadas por *Aedes albopictus*

O mosquito *Aedes albopictus* é uma espécie antropofílica, porém pode se alimentar também de outros animais, tais como roedores, aves, bovinos e cães (NEVES, 2016). Tem atividade diurna, de maneira que se alimenta, copula e põe seus ovos por este período do dia. Estes ovos podem ser diretamente depositados sobre a água ou na parede de criadouros favoráveis a proliferação da espécie, tais como: latas, fendas no chão, pneus e árvores. Seu ecossistema pode ser bem variado, sendo capaz de ser localizado em ambientes rurais, silvestres e urbanos (NEVES, 2016). Essa praticidade acaba tornando a espécie um vetor de arboviroses conhecidas, como o vírus da dengue (LIEW e CURTIS, 2004), o vírus Zika (CHOUIN-CARNEIRO et al., 2020) e a febre chikungunya (VALLE, PIMENTA e AGUIAR, 2016).

O processo se inicia quando a fêmea é infectada ao se alimentar do sangue de um hospedeiro que já está com o vírus, podendo desta forma inocular este material em outros seres vivos em sua próxima ingestão de sangue. Este vetor é menos eficiente que a espécie *Aedes aegypti* em transmitir arboviroses no ser humano. Um dos motivos é pelo fato do mosquito *A. albopictus* se alimentar normalmente de apenas um único ser vivo, podendo inclusive ser de outra espécie, enquanto o mosquito *A. aegypti* se alimenta do sangue de muitas pessoas antes de conseguir o suficiente para atender suas necessidades (REZZA, 2012).

3.3.2.1. Zika

O vírus Zika está agrupado no gênero Flavivírus e é um vírus cujo material genético é constituído de RNA, cujo genoma é formado por uma cadeia simples no sentido positivo. Os principais sintomas da doença são: febre, dor de cabeça e exantema maculopapular pruriginoso. Em alguns casos, o vírus Zika pode estar associado com doenças mais graves, como a síndrome de Guillain-Barré (LUZ, SANTOS e VIEIRA, 2015) e o nascimento de crianças com microcefalia (GARCIA, 2018).

No Brasil, foram notificados 327 casos possíveis do vírus Zika no ano de 2021, uma queda substancial quando comparada ao ano de 2016, onde foram registrados 91.387 casos prováveis da doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016, 2021). Um dos motivos aparentes para esta subnotificação pode estar relacionado com o menor registro ou mesmo atraso nas notificações dos casos de vírus zika, em decorrência da pandemia de COVID-19 que mobilizou grande parte das equipes de saúde para o enfrentamento da doença.

3.3.2.2. Dengue

A dengue é uma das doenças virais transmitidas por artrópodes mais sérias conhecidas na atualidade, onde se estima ocorrerem aproximadamente 105 milhões de novos casos por ano, distribuídos em 120 países (CATTARINO et al., 2020). Os principais sintomas associados a doença podem variar de uma

febre relativamente simples ou moderada até o caso de doença hemorrágica severa ou fatal (YADAV, PRABHUDESAI e UMEKAR, 2020).

No Brasil, foram registrados 72.093 casos prováveis em 2021, com uma redução de 75% dos casos em comparação com o ano anterior, queda também relacionada diretamente a subnotificação dos casos em virtude da pandemia de COVID-19 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021).

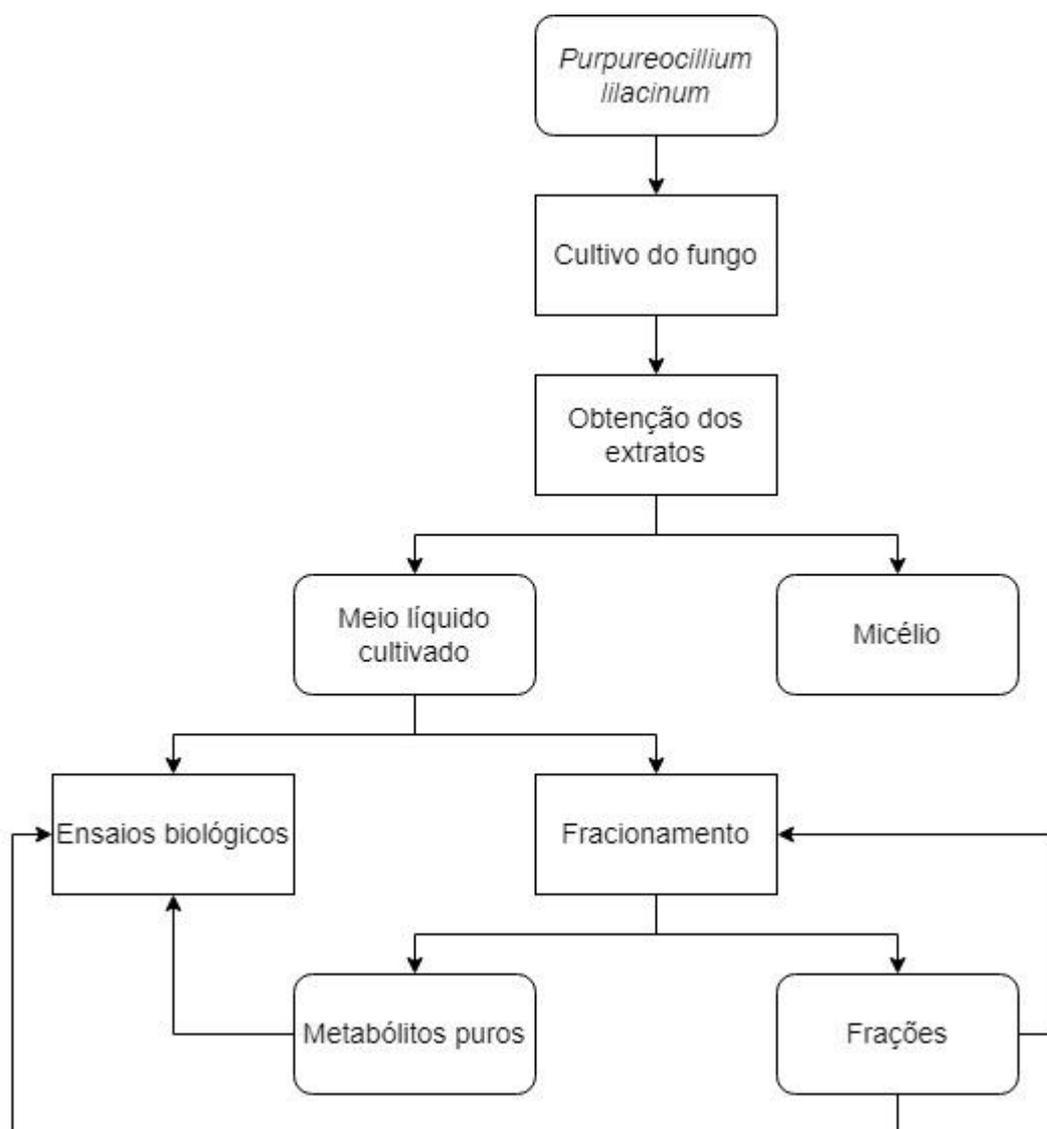
3.3.2.3. Chikungunya

Chikungunya é um arbovírus também disseminado por mosquitos do gênero *Aedes*. Os principais sintomas relacionados com esta doença são bem semelhantes a dengue, com febre e irritação cutânea sendo os primeiros sinais aparentes. Contudo, diferentemente da dengue, a febre chikungunya pode causar artrite e dores fortes nas juntas ou nos músculos mesmo após a febre passar, persistindo muitas vezes por meses. Nos casos mais graves, a doença pode evoluir para complicações mais severas, como poliartrite e síndrome de Guillain-Barré (VU, JUNGKIND e LABEAUD, 2017; WIELANEK, et al., 2007). A síndrome de Guillain-Barré é uma polirradiculoneuropatia responsável pelo enfraquecimento dos membros, com consequente perda motora (SHAHORIZAILA, LEHMANN e KUWABARA, 2021)

Em 2021, foram notificados 5.193 casos prováveis de chikungunya no país, um valor também bem abaixo do que foi relatado nos últimos anos. Por exemplo, quando comparado com o ano de 2016, onde foram registrados 38.332 casos prováveis da doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016, 2021).

4 MATERIAL E MÉTODOS

O Fluxograma 1 apresenta a metodologia empregada para o cultivo e o fracionamento bioguiado da linhagem de *Purpureocillium lilacinum* (DgC3 2.2) que foi estudada neste trabalho.



Fluxograma 1: Fluxograma da metodologia para o estudo bioguiado de *P. lilacinum*

4.1. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

4.1.1. Preparo do meio

A linhagem foi cultivada em meio líquido BDL, o qual corresponde a caldo obtido de 200 g de batata misturado com 20 g de dextrose e 2 g de extrato de levedura para cada litro de meio. O preparo se deu da seguinte forma: as batatas foram primeiramente cozidas e o caldo filtrado; ao filtrado foram adicionados a dextrose e o extrato de levedura; foi adicionada água destilada até completar um litro. Após homogeneização, o meio foi distribuído em frascos Erlenmeyer de 1 L, colocando-se 300 mL por frasco. Os frascos foram vedados e esterilizados a 120 °C por 15 minutos em autoclave. Para o preparo do meio BDL ágar, o procedimento foi o mesmo, apenas acrescentando-se 15 g de ágar bacteriológico ao preparo antes de autoclavar.

4.1.2. Seleção e reativação da linhagem

O fungo *P. lilacinum* foi selecionado devido ao seu bom potencial antiplasmódico, observado em estudos prévios realizados pela equipe do grupo GEMMA (REZENDE, 2020). O projeto está cadastrado na plataforma SISGEN sob o número AC2C1DD. A reativação dos esporos e o seu cultivo foram realizados no Laboratório de Bioensaios e de Microrganismos da Amazônia (LABMICRA – Central Analítica – CAM). A suspensão de esporos foi obtida da amostra preservada em glicerol. Foram transferidos 10 µL desta amostra preservada para placas de meio BDL ágar, com aplicação em ponto central. Após 8 dias de crescimento, os esporos foram coletados com haste metálica e suspensos em uma solução de 20% de glicerol previamente autoclavada. A suspensão de esporos foi armazenada em um refrigerador, a uma temperatura de aproximadamente 0°C por um período de 24 horas, até o cultivo em escala ampliada.

4.1.3. Cultivo em escala ampliada

O fungo foi cultivado em 100 frascos Erlenmeyers de 1 L, contendo 300 mL do meio BDL cada, preparado conforme o item 4.1.1, anotando-se o pH inicial, em cultivo estático, a 26 °C, no escuro, por um período de aproximadamente 21 dias. Foi feito o acompanhamento do nível de glicose, proteína, pH e nitrito a cada três dias, retirando-se alíquotas de amostras aleatórias e gotejando o material em tiras reagentes da marca Uriclin ©, com o objetivo de verificar o momento ideal para interromper o cultivo e seguir para a extração dos metabólitos.

4.1.4. Obtenção dos metabólitos secundários

Após o crescimento da linhagem, o meio cultivado foi filtrado, separando-o do micélio. A extração do micélio foi realizada empregando-se etanol grau HPLC, onde o solvente foi adicionado a matriz fúngica até cobri-lo completamente. O material foi deixado em repouso, no escuro, a uma temperatura de 26°C, trocando-se o solvente extrator a cada 24 horas. Ao término de cada período, o solvente foi filtrado com auxílio de um funil de Büchner e tocas cirúrgicas, para evitar a passagem de grânulos para a fase líquida. O procedimento de extração do micélio foi realizado 3 vezes.

Ao meio cultivado foi adicionada uma mistura de acetato de etila/2-propanol (9:1), o suficiente para encobrir o meio e evitar novo crescimento do fungo até o momento da partição. Esta extração líquido-líquido foi feita empregando-se a mesma mistura de solventes da seguinte maneira: 400 mL de meio cultivado foram transferidos para um funil de decantação de 2 L, sendo em seguida adicionados 1200 mL de solvente. Após agitação vigorosa, deixou-se o funil em repouso até a formação de fases distintas. O meio foi coletado em um frasco adequado e ao solvente foram adicionados outros 400 mL de meio aquoso, repetindo-se a fase de agitação e coleta do meio. Este procedimento foi realizado mais uma vez, de modo que cada fração do meio cultivado foi particionada três vezes no total. Ao final, o solvente foi coletado em um frasco âmbar.

O material resultante da partição foi concentrado em evaporador rotatório a uma temperatura de aproximadamente 30°C. Os extratos foram identificados e

o solvente residual foi removido empregando-se corrente direta de nitrogênio sobre a amostra. Por fim, os extratos foram pesados e armazenados em refrigerador, a uma temperatura de 0°C, para posteriores análises microbiológicas. Para se evitar desperdício, os solventes coletados e concentrado em evaporador rotativo foram reaproveitados durante toda a extração, apenas acrescentando-se mais acetato de etila para completar o volume quando necessário.

4.2. FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS PROMISSORES

4.2.1. Cromatografia em camada delgada (CCD)

Os extratos foram primeiramente avaliados qualitativamente por meio de Cromatografia em Camada Delgada (CCD), utilizando cromatofolhas de alumínio com sílica gel 60 e fator de fluorescência F_{254} (MERCK®), com 0,25 mm de espessura. Após eluição e secagem das amostras, o material foi analisado em câmara UV (254 nm) e aplicando-se solução reveladora H_2SO_4 5% em EtOH. Para revelação, as placas foram aquecidas em chapa aquecedora a aproximadamente 100°C.

4.2.2. Fracionamento bioguiado dos extratos

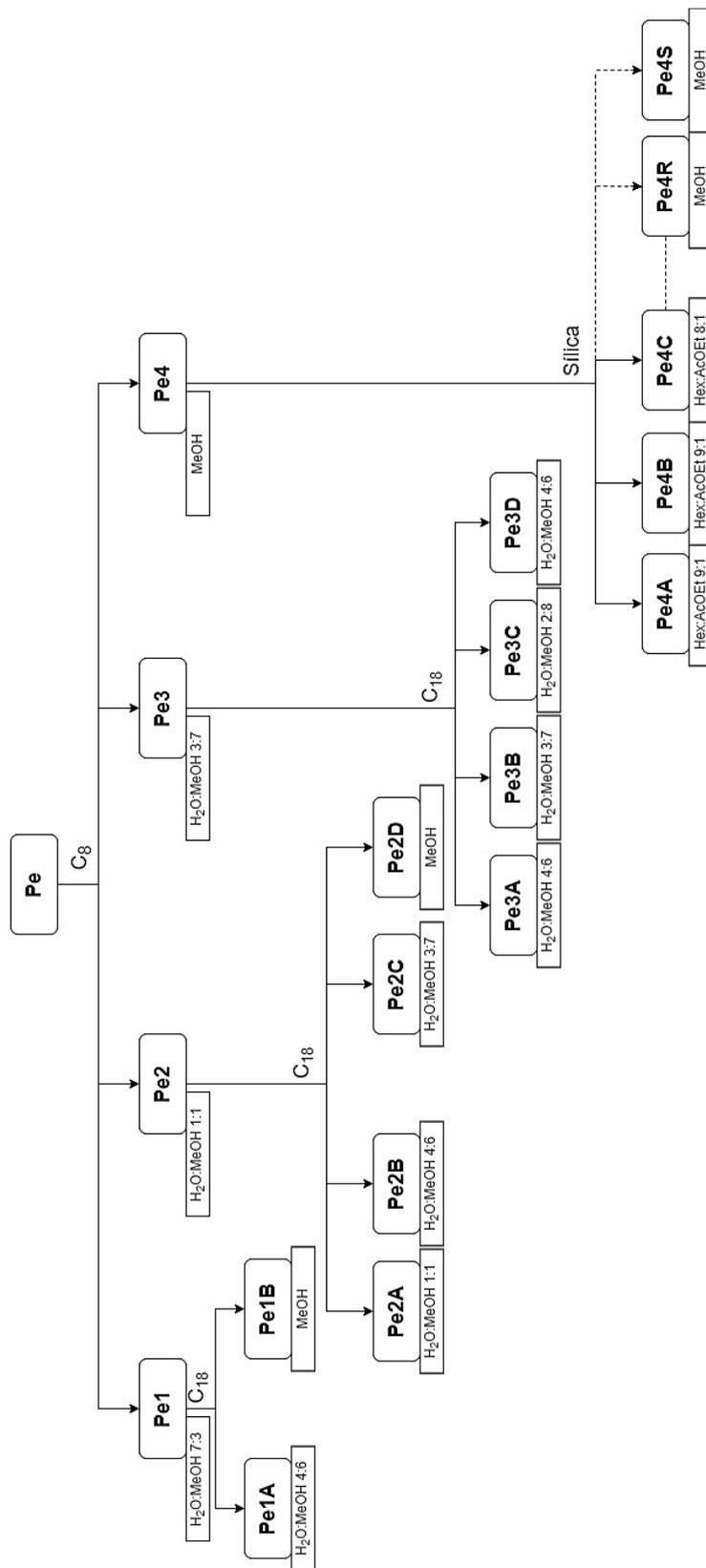
Após avaliação dos resultados advindos dos testes preliminares em CCD, foi realizado o primeiro fracionamento do extrato bruto, identificado como **Pe**, realizado em colunas C_8 (14 cm de altura e 2,0 cm de diâmetro interno, Phenomenex®). A coluna foi condicionada com $H_2O:MeOH$ (7:3), eluindo 30 mL deste sistema de solventes três vezes. A amostra a ser fracionada foi em seguida incorporada em sílica gel 60 (0,063 a 0,2 mm; MERCK®) para posteriormente ser adicionada ao topo da coluna. Em seguida, foi adicionado 200 mL do primeiro sistema de solventes sobre a coluna, sendo formado por $H_2O:MeOH$ (7:3), cujo produto foi coletado em um frasco previamente pesado e identificado como **Pe1**. Seguiu-se a obtenção de mais três frações adicionando-se solventes, todos com

200 mL, em aumento sucessivo da força de eluição: H₂O:MeOH (1:1) (fração **Pe2**), H₂O:MeOH (3:7) (fração **Pe3**) e MeOH (fração **Pe4**) (Fluxograma 2).

A água presente nas frações **Pe1**, **Pe2** e **Pe3** foi removida na mesma coluna utilizada para o fracionamento. Primeiramente, estas amostras tiveram seu volume dobrado com água MiliQ. Em seguida, foi adicionada a fração **Pe1** lentamente sobre o topo da coluna, permitindo que os metabólitos interagissem com a fase sólida. Após isso, removeu-se toda a mistura aquoso presente com auxílio de uma bomba de vácuo. Por fim, os metabólitos retidos na coluna foram coletados com MeOH e este solvente foi removido das frações em evaporador rotatório e posteriormente com jato direcionado de corrente de N₂. Este procedimento foi repetido para as frações **Pe2** e **Pe3**.

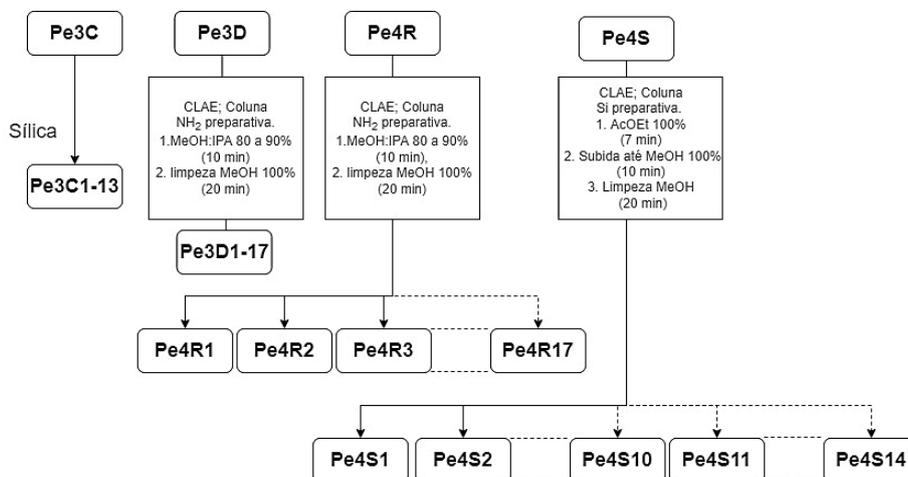
As frações obtidas foram submetidas a novos testes em CCD e aos ensaios larvicidas para identificar as frações com potencial biológico. Análises por Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas (LC-MS) também foram realizadas para um entendimento maior da natureza destas frações. Assim, para as frações **Pe1**, **Pe2** e **Pe3** foi feito um estudo explorativo em coluna CLAE C₁₈ semi-preparativa Phenomenex® (150 x 4,6 mm, 5 µm). Com base nos dados cromatográficos e dos espectros de massas gerados, foram realizados novos fracionamentos destas frações em colunas abertas de C₁₈, com 5 cm de altura e 1,1 cm de diâmetro interno. O resultado deste fracionamento pode ser visualizado no Fluxograma 2.

O fracionamento da fração **Pe4** foi realizado levando em consideração o estudo exploratório em coluna cromatográfica C₁₈ ônix monolítica Phenomenex® (25 x 4,6 mm) e em placas de CCD em fase normal e fase reversa, onde verificou-se um melhor comportamento em fase normal para esta amostra. O fracionamento foi realizado em coluna aberta de sílica Sorbent® (5,0 x 1,5 cm, 5-15 µm) (Fluxograma 2).



Fluxograma 2: Fracionamento do extrato bruto e das frações subsequentes.

Novamente, foram realizados ensaios larvicidas nas frações recém-obtidas do fracionamento descrito anteriormente. As frações com resultados positivos foram analisadas de maneira análoga ao caso anterior, verificando o melhor sistema cromatográfico possível para isolamento de uma ou mais substâncias. O fracionamento da fração **Pe3C** foi realizado em coluna incorporada por sílica Sorbent® (5,0 cm x 1,1 cm, 5-15 µm), empregando-se na eluição AcOEt (**Pe3C1-2**), AcOEt:MeOH 8:2 (**Pe3C3-4**), AcOEt:MeOH 6:4 (**Pe3C4-5**), AcOEt:MeOH 4:6 (**Pe3C6-7**), AcOEt:MeOH 2:8 (**Pe3C8-9**) e MeOH (**Pe3C10-13**). As frações **Pe3D** e **Pe4R** foram fracionadas por CLAE-EM, em coluna amino preparativa Luna 5u® (250 x 10.0 mm, 5 µm), empregando-se em ambos os casos a eluição gradiente com MeOH:IPA 8:2, até atingir a concentração de 90% de metanol. Em seguida foi feita a limpeza da coluna com MeOH por um período de 20 min. A fração **Pe4S** também foi fracionada por CLAE-EM, contudo foi utilizada coluna preparativa de sílica Ascentis® (250 x 10.0 mm, 5 µm), onde foi realizada inicialmente a eluição isocrática com AcOEt, por um período de 7 minutos. Após uma fase gradiente de 10 minutos com a substituição progressiva do solvente AcOEt por MeOH, fez-se uma segunda eluição isocrática, desta vez empregando-se MeOH. A metodologia empregada nestes testes está resumida no Fluxograma 3.



Fluxograma 3: Fracionamento das frações com resultados positivos nos testes larvicidas

4.3. IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS OBTIDAS

Para elucidação estrutural das substâncias presentes no extrato, foram obtidos os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C 1D e 2D, bem como os espectros de massas. Os experimentos de RMN foram realizados no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear – NMRLAB, enquanto os ensaios de espectrometria de massas ocorreram no Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massas (LABCEM), ambos da Central Analítica - CAM.

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C foram obtidos por meio de RMN da marca Bruker Avance III HD, operando a 11,75 Teslas e nas frequências de 500,13 e 125,76 MHz para os núcleos de hidrogênio e carbono, respectivamente. Foram utilizados clorofórmio deuterado (CDCl_3) e metanol deuterado (CD_3OD) como solventes para estas análises. O padrão interno foi tetrametilsilano (TMS). Os espectros bidimensionais de Heteronuclear Single Quantum Coherence (HSQC), Correlated spectroscopy (COSY), Heteronuclear Multiple Bond Coherence (HMBC), Total Correlation spectroscopy (TOCSY), Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy (NOESY) e Rotating frame Overhauser Effect Spectroscopy (ROESY) também foram obtidos para o estudo mais aprofundado acerca da estrutura de determinadas moléculas.

Os espectros de massas foram obtidos em aparelho *ion trap* LCQ Fleet™, da Thermo Scientific. Para análise de *full scan*, as frações foram previamente solubilizadas em solventes afins e então injetadas no espectrômetro de massas por inserção direta, com o auxílio de uma seringa infusora, operando em modo positivo e negativo.

4.4. ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIPLASMÓDICA

Os ensaios de atividade antiplasmódica foram efetuadas em colaboração com o Instituto de Pesquisas Leônidas e Maria Deane – ILM (FIOCRUZ- Amazonas), na Subunidade de Bioensaios Biotecnológicos – AM e na Subunidade de Citometria de Fluxo – AM. Foram utilizadas cepas FCR-3 de *Pl.*

falciparum, empregando citometria de fluxo para a análise da atividade dos extratos, de acordo com Ljungström et al. (2008).

4.4.1. Cultura de Plasmodium falciparum FCR-3

O cultivo das cepas foi realizado em meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) incompleto, com a adição de 10% de soro humano e eritrócitos humanos normais A+, com uma temperatura de incubação de 37°C. O meio RPMI incompleto foi realizado com 10,4 g de RPMI, 40 mg de gentamicina, 2 g de glicose, 5,94 g de HEPES e 50 mg de hipoxantina, em um pH de 6,8. Já o meio completo, foram adicionados 5 mL de soro humano AB+, após pré-tratamento em banho-maria a uma temperatura de 56 °C por um período de 30 minutos, 44 mL de meio incompleto RPMI e 1 mL de NaHCO₃ 10% (LJUNGSTRÖM et al., 2008)

4.4.2. Preparo dos extratos e da droga de controle

Para preparo da solução estoque, 1 mg de cada extrato e da droga controle quinina foram diluídos em 50 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) e 50 µL de meio completo, homogeneizados com o auxílio de agitador do tipo vórtex. Foram transferidos 4 µL desta solução estoque para 196 µL do meio completo, para formação do segundo estoque, em uma proporção de 1:50.

4.4.3. Avaliação da Atividade Antiplasmódica *in vitro*

Em primeiro lugar, preparou-se uma solução parasitária em um tubo Falcon, constituída de 100 µL de hemácias sadias, 100 µL de eritrócitos parasitados, 10 µL de gentamicina com a adição de meio RPMI até completar 10 mL, de modo a obter-se uma suspensão de *P. falciparum* FCR-3 com 3 a 5% de parasitemia e 2% de hematócrito.

Os ensaios antiplasmódicos ocorreram em triplicata e foram utilizadas placas constituídas de 96 poços, com 100 µL de volume por poço. Primeiramente, foram adicionados 50 µL de meio RPMI nos poços. Em seguida, foram adicionados 50 µL da solução de segundo estoque de cada extrato, bem como da

droga controle quinina, em cada respectivo poço. Após esta etapa, foram realizadas as diluições seriadas nos poços consecutivos, de modo a se obter as concentrações de análise entre 0,39 a 50 µg/mL.

Foram adicionados 50 µL da suspensão parasitária nos respectivos poços contendo a droga controle e os extratos, nos poços contendo o controle do reagente, que consiste em DMSO a 0,5%, e nos poços em triplicata do controle positivo, os quais são formados pelo meio de cultura com o parasita. O controle negativo foi composto apenas por hemácias sadias a 2% no meio de cultura, também em triplicata. Por fim, as placas foram incubadas em uma temperatura de 37°C, por um período de 72 horas, com uma atmosfera de baixa concentração dos gases oxigênio e dióxido de carbono, por meio da técnica de microaerofilia tradicional de queima de vela em dessecador.

4.4.4. Coloração de tampão fosfato-salino com brometo de etídio

Ao final do período de incubação de 72 horas, as placas foram retiradas do dessecador e então centrifugadas por 10 min, a 37°C e 13000 RPM. O sobrenadante formado nesta etapa foi descartado, e então adicionou-se 50 µL de uma solução formada por brometo de etídio e tampão fosfato-salino (PBS) na concentração de 3,2 µL/mL, em cada poço. Para evitar a exposição a luz, as placas foram vendadas com papel alumínio por 30 minutos, de modo que o sobrenadante formado foi devidamente descartado. Posteriormente, foi realizada a lavagem com 200 µL de PBS, seguidas de centrifugação e remoção do sobrenadante, etapa que foi realizada duas vezes. Ao final da lavagem, adicionou-se 150 µL PBS em todos os poços e as placas foram levadas para leitura em citometria de fluxo.

4.4.5. Verificação da inibição de crescimento por citometria de fluxo

As análises foram realizadas em um citômetro de fluxo FACSCanto II (BD) para verificar o grau de parasitemia. Para análise das amostras, utilizou-se o software Getting Started with BD FACSDiva™. Este procedimento está baseado na interação do brometo de etídio com o DNA, de modo que o primeiro é

detectado por meio da sua fluorescência, onde o computador pode selecionar a área onde estão os eritrócitos e verificar a presença ou não do protozoário dentro destas células.

Para o cálculo da inibição do crescimento parasitário, foi utilizada a seguinte equação:

$$(\%) \text{ inibição} = 100 - \frac{(\%)Fa - (\%)Fes}{(\%)Fc - (\%)Fes}$$

Onde:

(%)Fa = Fluorescência da amostra;

(%)Fes = Fluorescência dos eritrócitos sadios

(%)Fc = Fluorescência do controle do parasita

4.5. ENSAIOS LARVICIDAS

Para o ensaio larvicida do extrato bruto, foram pesados 5 mg da amostra e dissolvidos em 100 µL de DMSO e 20 mL de água destilada, com a adição de 1 mg de ração para alimentação das larvas em copos plásticos de 50 mL. Os ensaios das frações foram realizados nas mesmas condições, com exceção de que foram utilizados apenas 2 mg. Em seguida, foram selecionadas 10 larvas de *Ae. albopictus* em seu 3º estágio, sendo então transferidas ao meio. Estes ensaios foram realizados em triplicata. Para controle negativo, foi utilizado 100 µL de solvente DMSO em 20 mL de água destilada. A atividade foi aferida pela porcentagem de mortalidade das larvas nos intervalos de 24, 48 e 72 horas de incubação, em uma temperatura de 28°C.

A porcentagem de mortalidade foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Mortalidade}(\%) = \left(\frac{LM}{LT} \right) * 100$$

Onde:

LM = Larvas mortas;

LT = Larvas totais

4.6. ENSAIOS DE CITOTOXIDADE *IN VITRO*

Os testes de citotoxicidade foram realizados no instituto Leônidas e Maria Deane (FIOCRUZ – AM), em parceria com a Rede de Plataformas Tecnológicas Fiocruz, na subunidade de Bioensaios de Compostos Biotecnológicos. Os ensaios foram realizados de acordo com a metodologia Alamar Blue, conforme proposto por Ahmed et. al (1994). Foram utilizadas linhagens de fibroblasto MRC5, sendo cultivadas em *Dullbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (FBS) e antibiótico penicilina (50 µg/mL). Os testes foram realizados em triplicata.

As células foram plaqueadas na concentração de $1,0 \times 10^4$ células/poço em placas de 96 poços. Após 24 horas de incubação e aderência em estufa a 5% de CO₂ e uma temperatura de 37 °C, as células foram tratadas com as frações, previamente solubilizados em DMSO e testados nas concentrações de 50, 25, 12,5 e 6,25 µg/mL. Em seguida, as placas foram mantidas em incubadora por um período de 72 horas, nas mesmas condições relatadas acima. Foi utilizado Doxorubicina (DOX) como controle da droga, sendo testado nas mesmas concentrações que as amostras, enquanto o controle negativo foi feito apenas com o meio de cultura. O controle positivo foi apenas o crescimento celular.

Após este período de incubação, foram adicionados 10 µL de resazurina 0,4% em cada poço. Ao término do período de metabolização de 2 horas deste composto, foi realizada a leitura de fluorescência. A fluorescência foi monitorada em leitor de microplaca (GloMax® Explorer). A porcentagem de viabilidade celular foi calculada conforme a seguinte equação:

$$(\%)Viabilidade = \left(\frac{Ft}{Fb} \right) \times 100$$

Onde:

Ft = Fluorescência da célula + meio + amostra + resazurina

Fb = Fluorescência da célula + meio + resazurina

4.7. ANÁLISE DE DADOS

Os espectros de massas e RMN foram processados utilizando o *software* Thermo Xcalibur™ v. 2.07 e Topspin™ Acadêmico v. 4.1.3, respectivamente.

Os dados obtidos dos testes de citotoxicidade foram analisados de acordo com o desvio padrão (σ) da porcentagem de inibição do crescimento celular utilizando o *software* GraphPad Prism v.8. A Tabela 3 apresenta uma classificação para a toxicidade das frações analisadas de acordo com a viabilidade celular determinada (SLETTEN e DAHL, 1999; LÖNROTH e DAHL, 2003).

Tabela 3: Classificação de citotoxicidade

Classificação	Viabilidade Celular (%)
Atóxico	> 90
Levemente citotóxico	> 60 a < 90
Moderadamente citotóxico	> 30 a < 60
Severamente citotóxico	<30

Fonte: Sletten e Dahl (1999); Lönroth e Dahl (2003)

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. RESULTADO DO FRACIONAMENTO BIOMONITORADO

O extrato bruto proveniente do meio aquoso cultivado, após extração líquido-líquido por partição, rendeu 1,8618 g. Tendo apresentado atividade larvicida previamente, foi selecionado para o fracionamento bioguiado. O extrato do micélio, por sua vez não apresentou atividade nos ensaios biológicos previamente realizados, sendo desta forma direcionada a atenção apenas ao extrato do meio aquoso.

Como se pode observar na Tabela 4, além do extrato bruto (**Pe**), diversas frações e subfrações causaram mortalidade significativa das larvas *A. albopictus*. A atividade larvicida restringiu-se às frações **Pe3 e 4**, eluídas por último no fracionamento do extrato em C8 (Seção 4.2.2), revelando substâncias com relativa hidrofobicidade.

Tabela 4: Massa das frações onde foi identificada mortalidade das larvas de *A. albopictus* acima de 50%

Amostra	Fase estacionária	Eluente	Massa (g)
Pe	--	--	1,1300
Pe3	C ₈	H ₂ O:MeOH 3:7	0,1866
Pe3C	C ₁₈	H ₂ O:MeOH 2:8	0,0626
Pe3D	C ₁₈	MeOH	0,0808
Pe4	C ₈	MeOH	0,4015
Pe4R	Sílica	MeOH	0,0640
Pe4R1	NH ₂	IPA:MeOH 8:2	0,0415
Pe4S	Sílica	MeOH	0,0542
Pe4S10	Sílica	MeOH	0,0048
Pe4S11	Sílica	MeOH	0,0133

A tentativa de purificar as substâncias presentes na subfração **Pe4R** por fracionamento por CLAE de 64 mg da amostra (Seção 4.2) resultou em duas frações (**Pe4R1**, 14,5 mg e **Pe4R2**, 8,4 mg) que causaram 100% de mortalidade nos ensaios larvicida. Nos respectivos espectros de massas foram observados íons de m/z nas faixas 1000 e 1400, indicando a presença de peptídeos nestas frações.

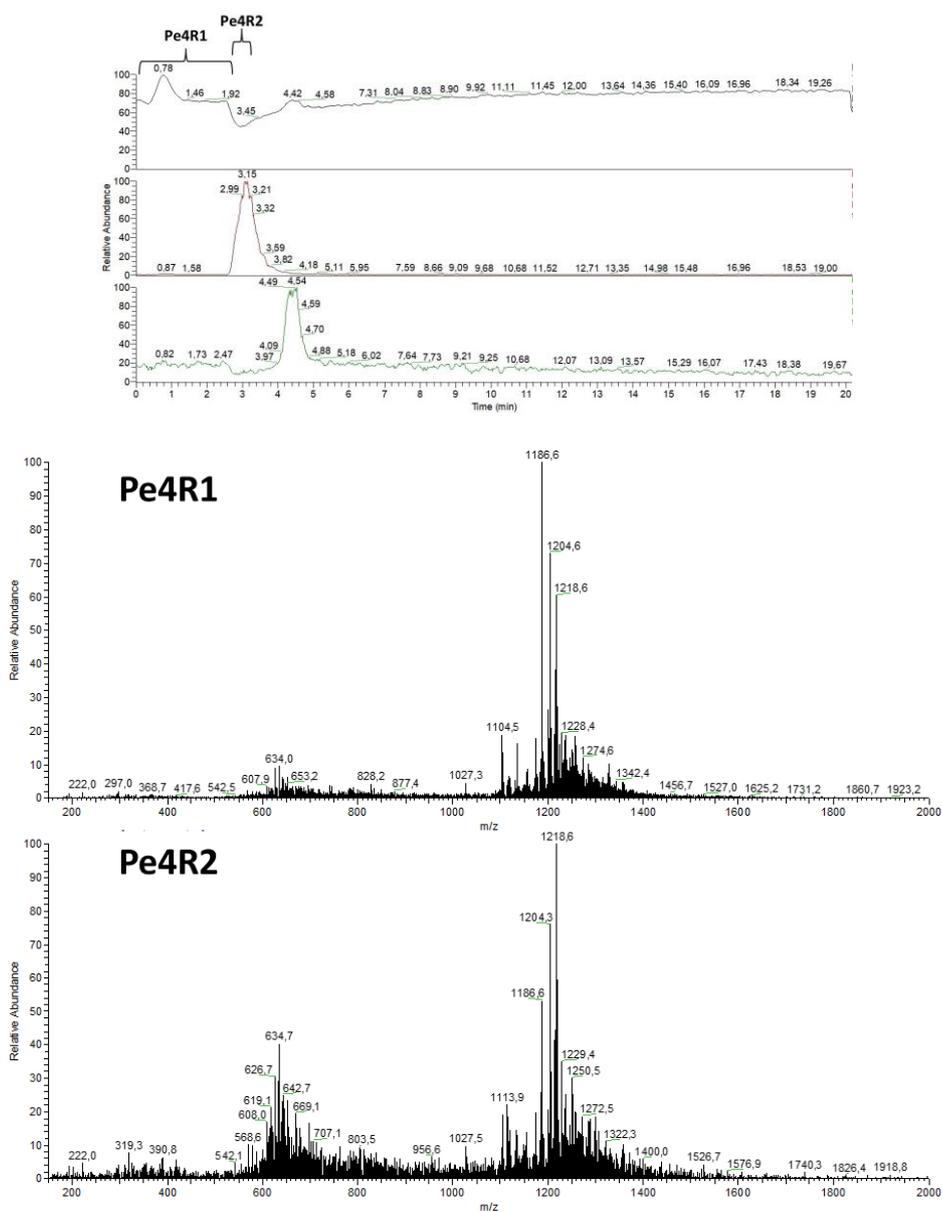


Figura 3: Acima, cromatograma obtido por CLAE-EM da purificação da fração **Pe4R**, onde foram usados filtros para identificação dos íons de interesse na amostra. Abaixo, espectro de massa das frações Pe4R1 e Pe4R2

De forma semelhante, o fracionamento por CLAE de uma amostra (54,2 mg) da subfração **Pe4S** (Seção 4.2.) resultou nas frações **Pe4S10** (Figura 4- sinal **10**, 4,8 mg) e **Pe4S11** (Figura 4- sinal **11**, 13,3 mg), que também causaram 100% de mortalidade nos ensaios larvicidas. Os dados das análises por RMN e espectrometria de massas dessas frações serão discutidos adiante.

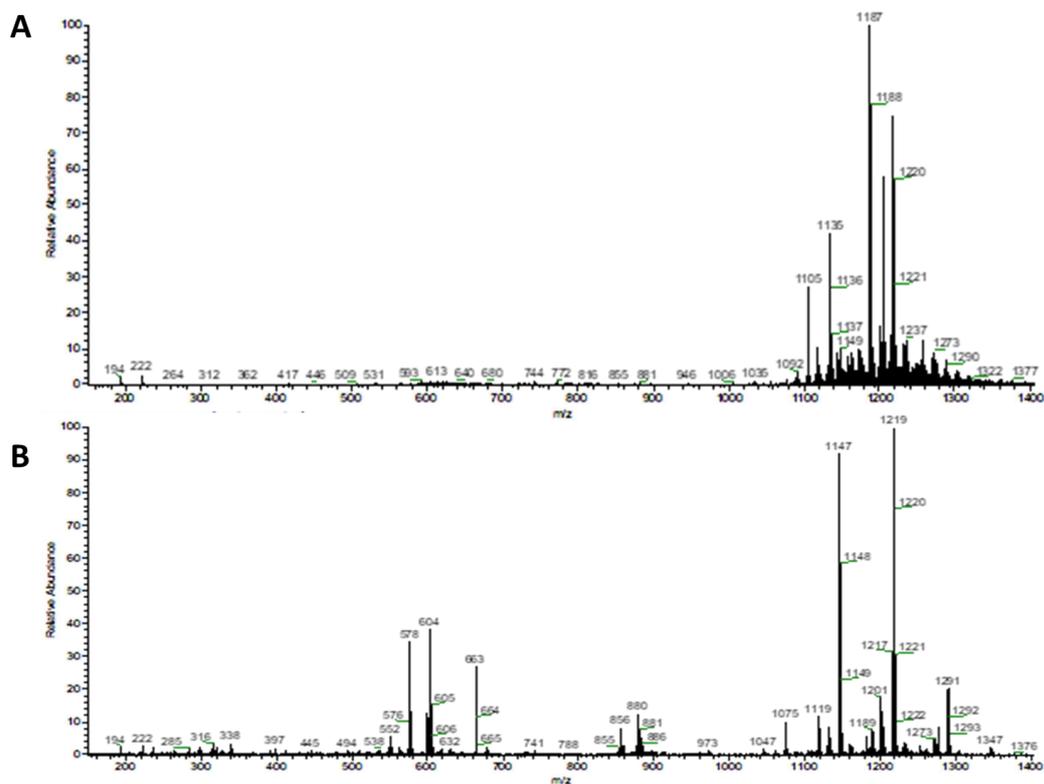
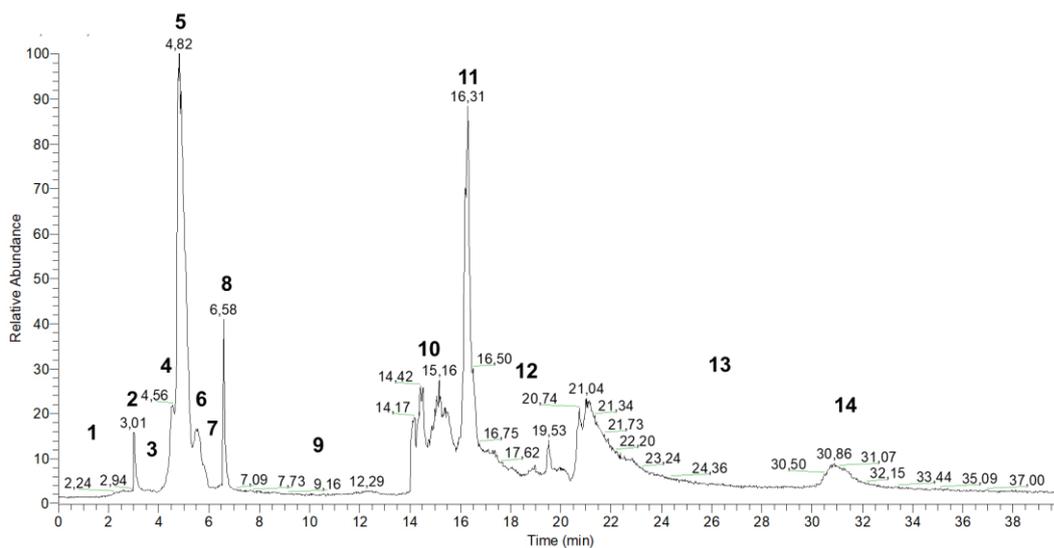


Figura 4: Cromatograma (acima) obtido do fracionamento da fração **Pe4S**. Os espectros de massas das frações **Pe4S10** (A) e **Pe4S11** (B) estão disponíveis na parte inferior da figura

5.2. CARACTERIZAÇÃO E ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL

5.2.1. Caracterização da amostra **Pe3C4** por RMN e espectrometria de massas

A amostra **Pe3C4** não apresentou atividade larvicida, mas contém uma das substâncias identificadas neste trabalho. O espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 500 MHz) desta fração pode ser visualizado na Figura 5. Os dados referentes a este espectro e aos espectros de RMN de ^{13}C e DEPT-135, foram compilados na **Erro! Fonte de referência não encontrada..** No espectro de RMN de ^1H podem ser observados sinais de dois hidrogênios olefínicos em δ_{H} 5,71 (t, $J=5,2$ Hz), um grupo metila em δ_{H} 0,91 ppm (t, $J=7,0$ Hz), três hidrogênios metínicos carbinólicos em δ_{H} 3,48 (m), 3,93 (t, $J=5,0$ Hz) e 4,05 (q, $J=6,0$ Hz) e vários grupos metilênicos, parte deles sobrepostos em δ_{H} 1,34(m) e o restante em δ_{H} 1,54 (m), 1,60 (m) e 2,27 (t, $J=7,3$ Hz).

A Figura 6 apresenta o espectro de RMN de ^{13}C (CD_3OD , 125 MHz) juntamente com o espectro de DEPT-135, contendo dezoito sinais, através dos quais, em uma análise envolvendo também os espectros de RMN de ^1H (Figura 5) e HSQC (Figura 12), é possível assinalar: catorze carbonos sp^3 , incluindo um grupo metila em δ_{C} 14,4, onze grupos metilênicos em δ_{C} 23,7, 26,1, 26,2, 26,9, 30,2, 30,4, 30,6, 33,0, 33,5, 35,1 e 38,3 e três carbonos metínicos carbinólicos em δ_{C} 73,1, 75,8 e 76,5. Os carbonos mais desblindados são hibridizados sp^2 , dois olefínicos em δ_{C} 130,9 e 136,5 e um quaternário em δ_{C} 177,9. Esses dados de RMN de ^1H e ^{13}C , juntamente com o pico observado em m/z 329 ($[\text{M} - \text{H}]^-$) no espectro de massas no modo negativo, são coerentes com a presença na amostra **Pe3C4** de um ácido graxo de massa molecular de 330 u, fórmula molecular $\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_5$ e cadeia monoinsaturada e triplamente hidroxilada.

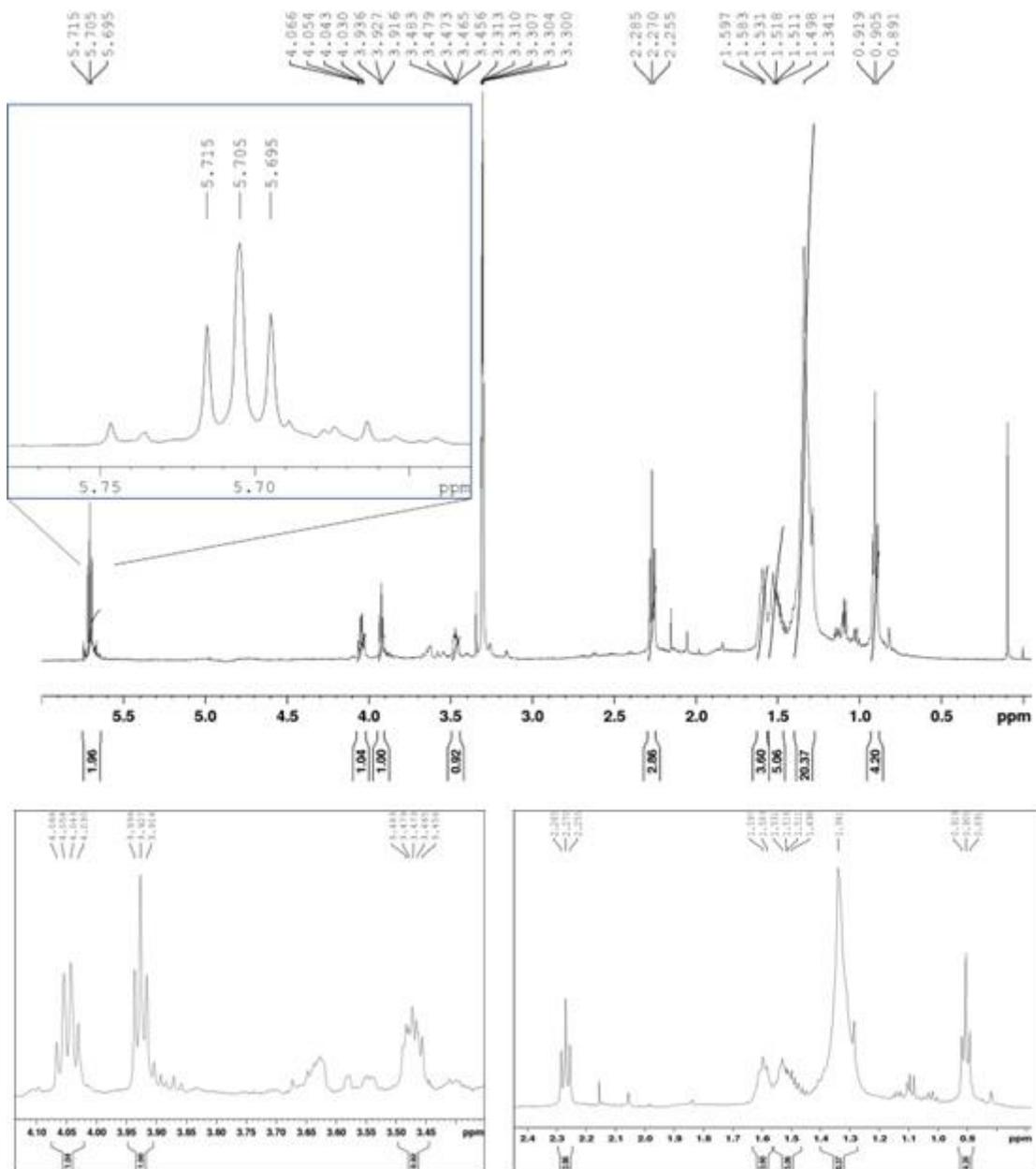


Figura 5: Espectro de RMN H^1 da subfração **Pe3C4**, em CD_3OD e 500 MHz

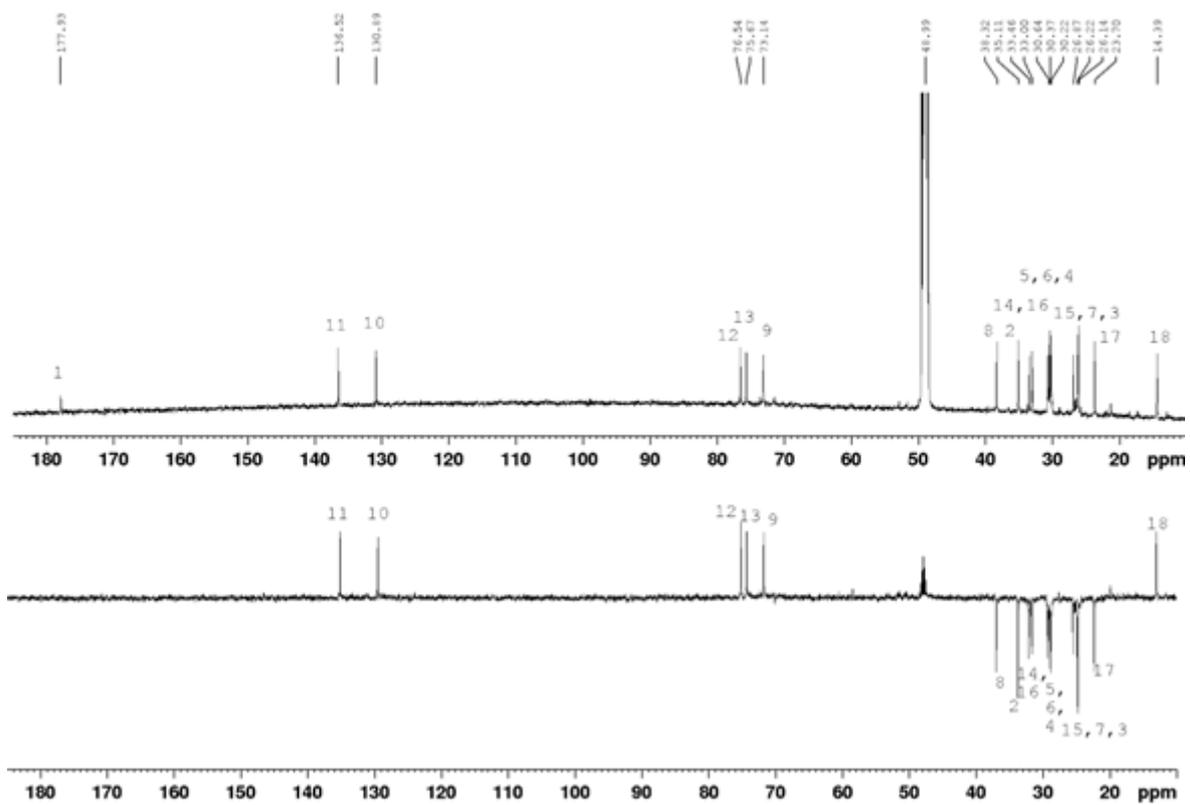


Figura 6: Espectro de RMN C^{13} e DEPT-135 C^{13} para a subfração **Pe3C4**, em CD_3OD e 125 MHz

Tabela 5: Dados de RMN da fração Pe3C4 (500, 125 MHz)

Numeração	¹ H (J em Hz)	¹³ C (DEPT-135)	COSY	HMBC
1	--	177,9 (-)	-	-
2	2,27 (t, 7,3)	35,1 (CH ₂)	3	1,3,4
3	1,61 (m)	26,1 (CH ₂)	2, 4	1, 4, 2
4	1,34 (m)	30,2 (CH ₂)	3	-
5	1,34 (m)	30,6 (CH ₂)	-	-
6	1,34 (m)	30,4 (CH ₂)	-	-
7	1,34 (m)	26,2 (CH ₂)	-	-
8	1,54 (m)	38,3 (CH ₂)	7, 9	7
9	4,05 (q, 6,0)	73,1 (CH)	8, 10	7, 8, 10, 11
10	5,72 (t, 5,2)	130,9 (CH)	9	8, 9, 11, 12
11	5,70 (t, 5,2)	136,5 (CH)	12	8, 9, 10, 12
12	3,93 (t, 5,0)	76,5 (CH)	11, 13	10, 11, 13, 14
13	3,48 (m)	75,7 (CH)	12, 14	14, 15
14	1,55 (m) 1,40 (m)	33,5 (CH ₂)	13	16
15	1,34 (m)	26,9 (CH ₂)	-	-
16	1,34 (m)	33,0 (CH ₂)	-	-
17	1,34(m)	23,7 (CH ₂)	18	18
18	0,91 (t, 7,0)	14,4 (CH ₃)	17	16, 17

No mapa de contornos HMBC (Figura 13) de **Pe3C4** é possível constatar a relação de vizinhança entre os carbonos olefínicos em δ_C 130,9 e δ_C 136,5. Como os hidrogênios destes carbonos possuem deslocamentos químicos muito próximos, essa correlação vicinal não fica clara no mapa de contornos COSY (Figura 14). Contudo, verifica-se na Figura 14 que este par de hidrogênios é vizinho aos hidrogênios metínicos em δ_H 4,05 e δ_H 3,93, ambos desblindados por grupos hidroxila. Observa-se ainda a relação vicinal entre os hidrogênios do sinal em δ_H 4,05 com os do multipletto em δ_H 1,53, bem como é possível sugerir a vizinhança entre os hidrogênios metínicos em δ_H 3,93 e δ_H 3,48. Este sinal tem ainda correlação com multipletos em torno de δ_H 1,55 e 1,40. Os hidrogênios em δ_H 1,53, por sua vez, possuem correlação vicinal com hidrogênios metilênicos em δ_H 1,34. Correlações verificadas no mapa de contornos HMBC (Figura 13) corroboram com esta análise, podendo-se sugerir o primeiro fragmento desta molécula, conforme observado na Figura 7. Além das correlações com os carbonos da dupla ligação, destaquem-se no HMBC as correlações dos hidrogênios carbinólicos com carbonos metilênicos, pois sinalizam uma continuidade linear da cadeia em ambas as direções. Assim, o hidrogênio em δ_H 4,05 correlaciona-se com carbonos em δ_H 38,3 e 26,2 enquanto, do outro lado, os hidrogênios em δ_H 3,93 e 3,48 correlacionam-se com o carbono em δ_H 33,5, sendo que o hidrogênio em δ_H 3,48 também se correlaciona com o carbono em δ_C 26,9.

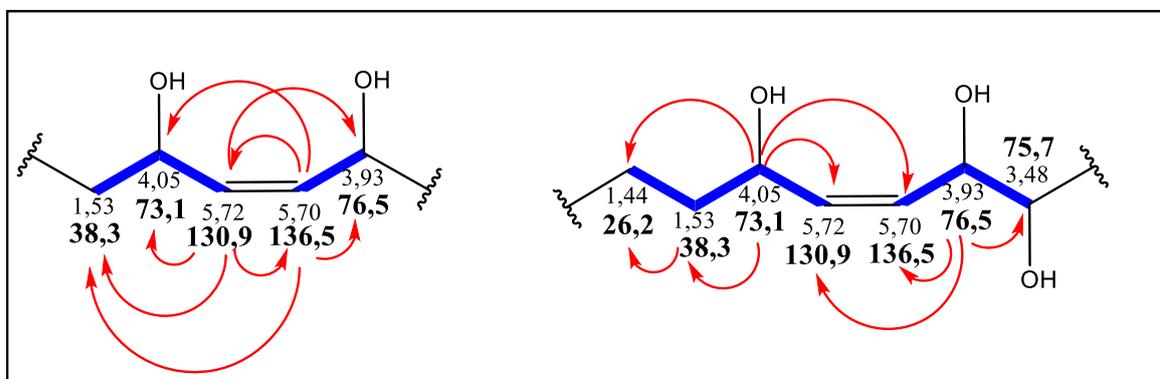


Figura 7: Fragmento proposto para a fração **Pe3C4** e suas correlações, observadas nos mapas de contornos HMBC (setas vermelhas) e COSY (ligações em azul).

Em um dos extremos da molécula, os hidrogênios metílicos em δ_H 0,91, ligados ao carbono sp^3 em δ_C 14,4, possui uma relação vicinal com os hidrogênios metilênicos em δ_H 1,34 (COSY, Figura 14) e se correlaciona no HMBC com os carbonos metilênicos em δ_C 23,7 e 33,0. Na outra extremidade da molécula, o carbono de C=O em δ_C 177,9, típico do grupo carboxila, e a ausência de sinal típico de ligação C-O de éster, confirmam a natureza de ácido graxo de **Pe3C4**. Os hidrogênios em δ_H 2,28 e 1,60, que têm correlação vicinal (COSY), correlacionam com o carbono acílico do ácido, com o carbono um do outro e com um sinal de carbono metilênico em δ_C 30,2. Esses dados sobre as partes terminais da molécula são compatíveis com as estruturas parciais apresentadas na Figura 8.

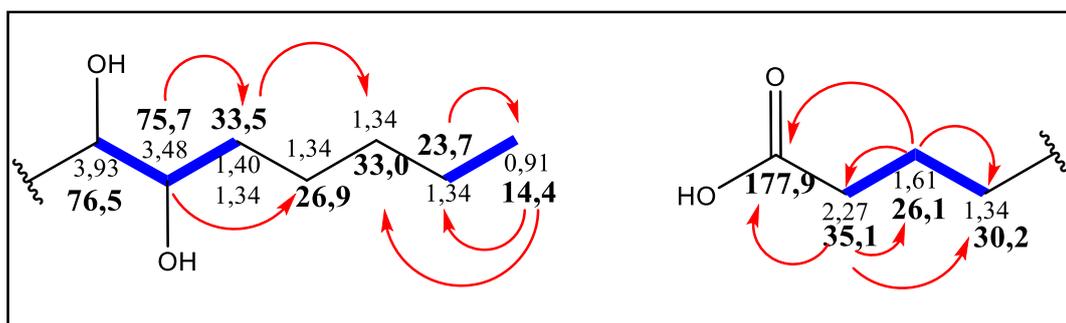


Figura 8: Fragmentos propostos para a fração **Pe3C4**, com base nos mapas de contorno COSY (ligações em azul) e HMBC (setas vermelhas)

Os dados de RMN da amostra **Pe3C4** e a massa molecular de 330 u são compatíveis com a proposta estrutural apresentada na Figura 9.

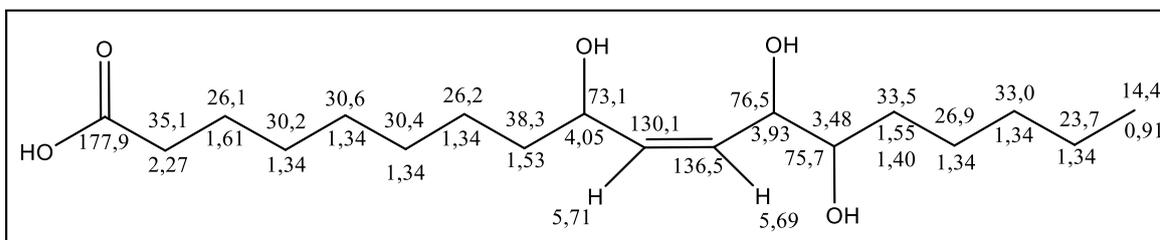


Figura 9: Molécula proposta para a fração **Pe3C4**

Para confirmar a posição da dupla ligação e respectivas hidroxilas foi considerada a fragmentação observada no espectro de MS2 (Figura 10). Observa-se no respectivo espectro duas perdas consecutivas de água em m/z 311 [M-H-18]⁻ e 293 [M-H-36]⁻, bem como a perda de fragmentos característicos em 229 [M-H-100]⁻, 211 [M-H-118]⁻ e 171 [M-H-158]⁻. Estes dados coincidem com o padrão de fragmentação encontrado na literatura para o ácido pinélico, corroborando com a estrutura proposta neste trabalho (WOJTANOWSKI e MROCZEK, 2018; NADEEM et al., 2020).

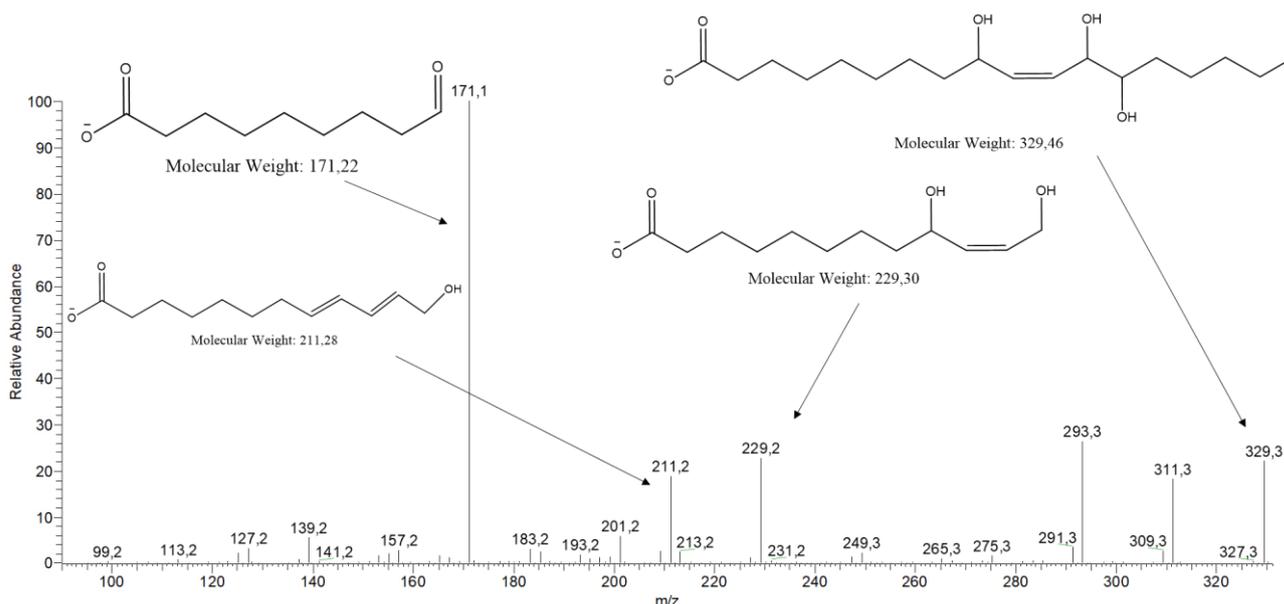


Figura 10: Fragmentação do íon m/z 329 [M-H]⁻ em fonte ESI

Para determinar a configuração da única dupla carbono-carbono do ácido, observou-se inicialmente que o pico central do aparente tripleto em δ_H 5,71 é mais largo que os picos laterais, indicando uma possível sobreposição de dois tripletos ou dois duplos dupletos com os picos centrais quase coalescendo. Fez-se uma medida cuidadosa e observou-se que a distância do pico central do aparente tripleto é cerca de 5,3 Hz para o pico à esquerda e 5,1 Hz para o pico à direita. Isto indica uma constante de acoplamento em torno de 5,2 Hz entre os dois hidrogênios olefínicos, valor compatível com dupla ligação em configuração *Z* ou *cis*.

Portanto, todos os dados espectroscópicos são compatíveis com o ácido (*Z*)-9,12,13-trihidroioctadec-10-enoico, isômero (*E*) do ácido pinélico (Choi et al, 2012). Como se pode observar na Tabela 6 os dados de RMN de **Pe3C4** e do ácido pinélico são muito semelhantes, mudando apenas nos valores relativos a vizinhança da dupla carbono-carbono, dada a diferença de configuração *EZ*.

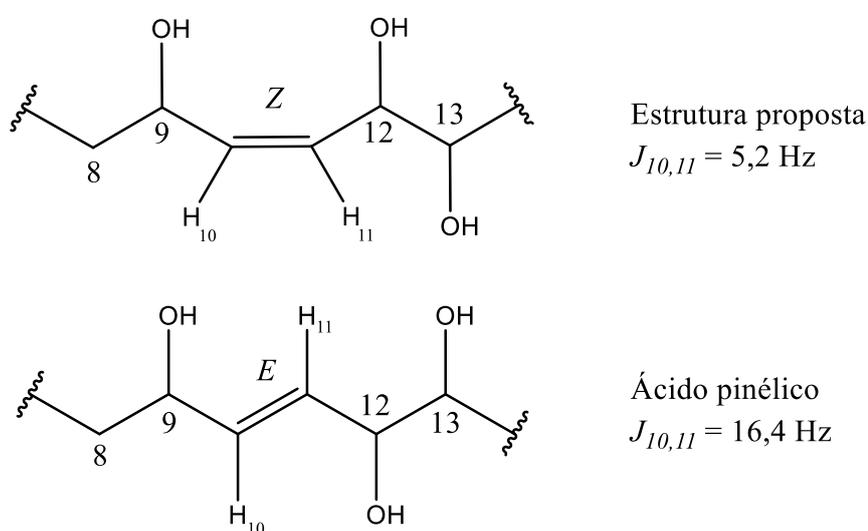


Figura 11: Comparação da configuração da dupla ligação entre a estrutura proposta e o ácido pinélico

Tabela 6: Comparativo dos dados de RMN da estrutura proposta com o ácido pinélico

Numeração	^1H (J em Hz)	$^1\text{H}^*$ (J em Hz)	^{13}C	$^{13}\text{C}^*$
1	--	-	177,9	176.7
2	2,27 (t, 7,3)	2.27 (t, 7.6)	35,1	33.9
3	1,61 (m)	1.51-1.61 (s)	26,1	25.1
4	1,34 (m)	1.21-1.41 (s)	30,2	29.2-29.5
5	1,34 (m)	1.21-1.41 (s)	30,6	29.2-29.5
6	1,34 (m)	1.21-1.41 (s)	30,4	29.2-29.5
7	1,34 (m)	1.21-1.41 (s)	26,2	25.5

8	1,54 (m)	1.51-1.61	38,3	37.3
9	4,05 (q, 6,0)	4.03 (m)	73,1	72.0
10	5,72 (t, 5,2)	5.71 (dd, 16.4, 4.6)	130,9	130.1
11	5,70 (t, 5,2)	5.69 dd (16.4, 4.2)	136,5	135.5
12	3,93 (t, 5,0)	3.90 (m)	76,5	75.5
13	3,48 (m)	3.41 (m)	75,7	74.8
14	1,55 (m) 1,40 (m)	1.21-1.41 (s)	33,5	32.5
15	1,34 (m)	1.21-1.41 (s)	26,9	25.6
16	1,34 (m)	1.21-1.41 (s)	33,0	32.1
17	1,34 (m)	1.21-1.41 (s)	23,7	22.1
18	0,91 (t, 7,0)	0.91 (t, 6.3)	14,4	13.4

* Comparativo com os dados obtidos por Choi et al, (2012)

A atividade antialérgica do ácido pinélico foi relatada após investigação dos componentes bioativos do fitoterápico japonês Sho-seiryu-to (SST), um produto derivado dos tubérculos de *Pinellia ternata*, onde verificou-se a redução de anticorpos IgE anti-OVA em ratos após administração oral deste ácido graxo polihidroxiado (NAGAI et al., 2004). Um estudo do extrato metanólico das cascas da raiz e do tronco de *Ulmus davidiana* var. *japonica*, Choi et al. (2012) verificou a ação anti-inflamatória do ácido pinélico, relatando a inibição da produção de prostaglandina D₂ com valores de IC₅₀ de 40,8 µM.

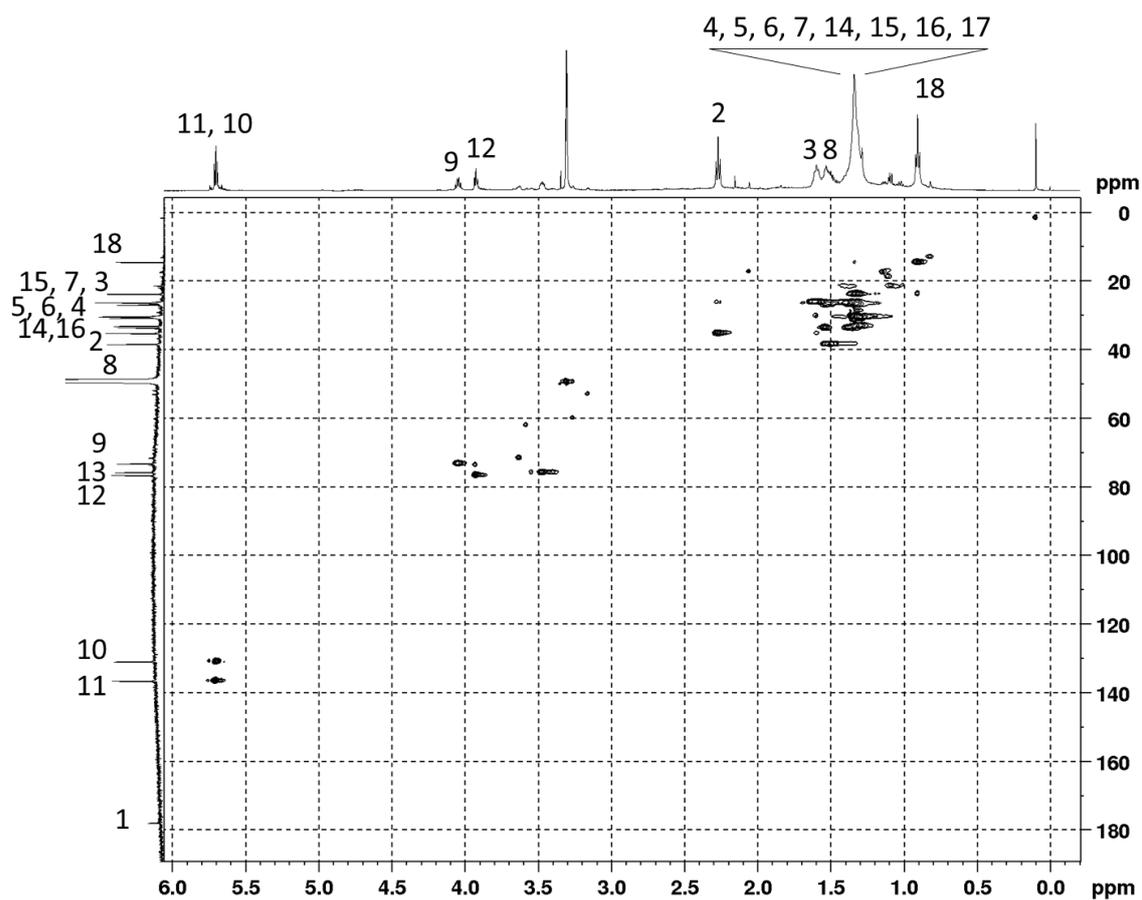


Figura 12: Mapa de contornos de HSQC da fração **Pe3C4** em CDCl_3

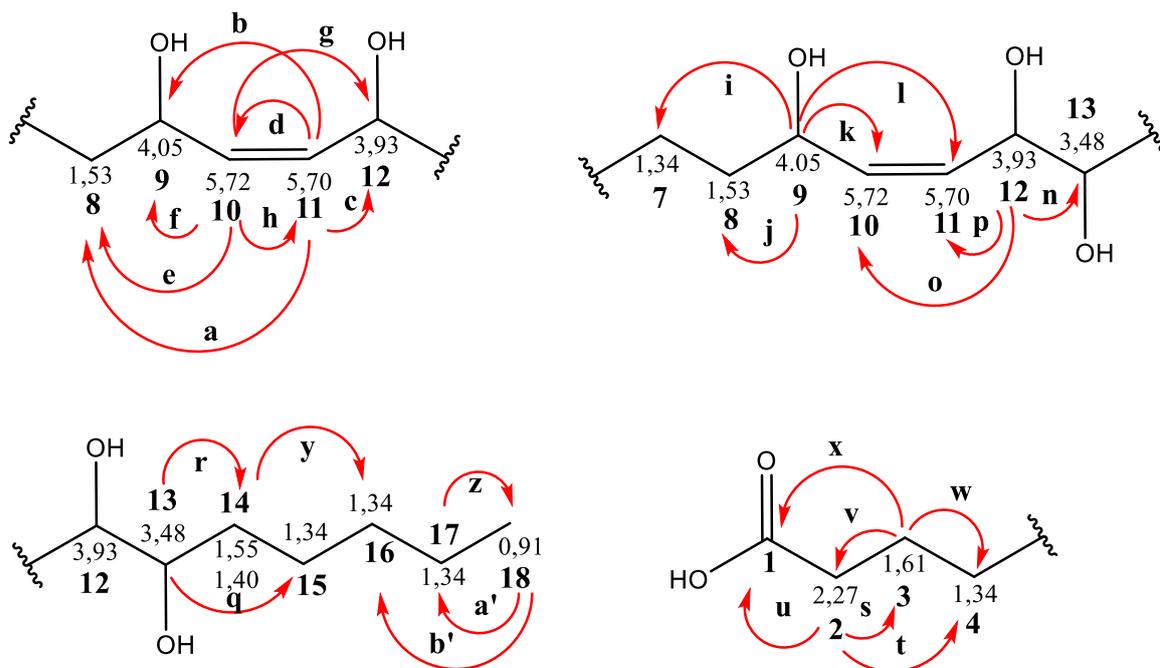
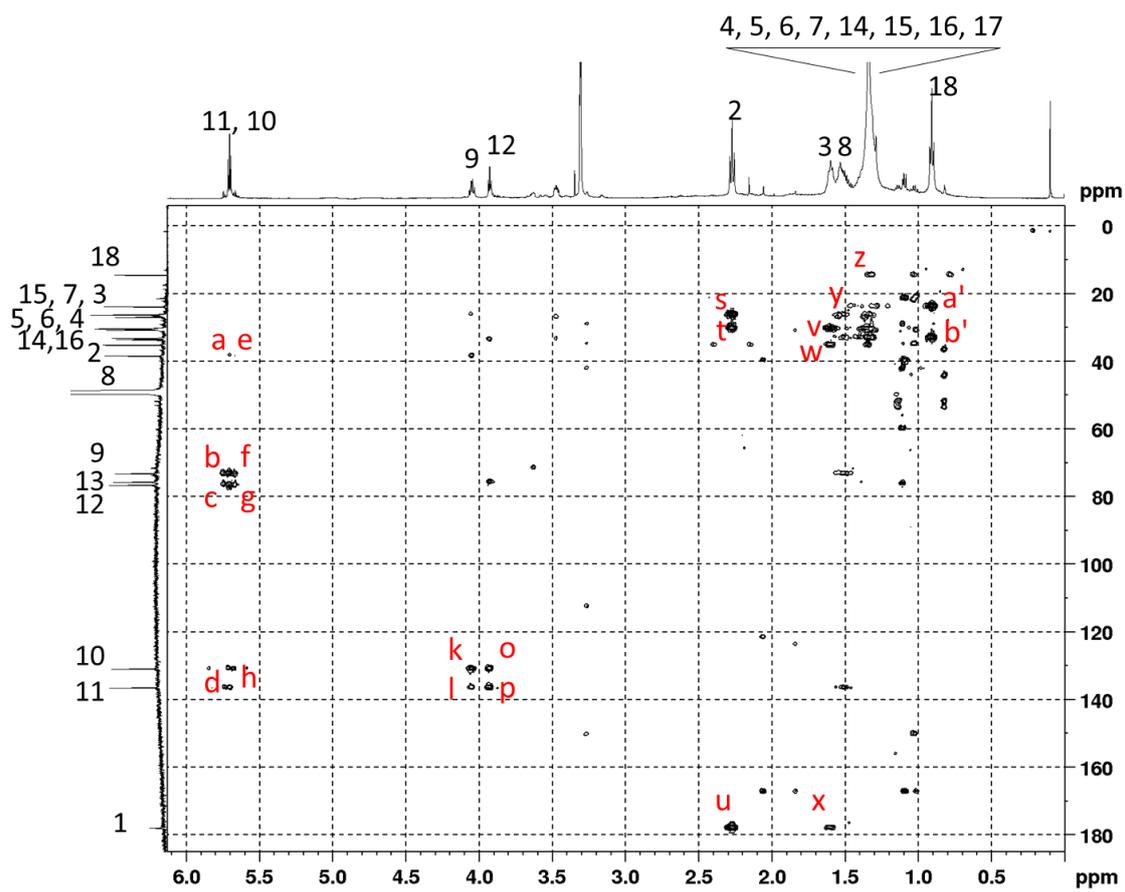


Figura 13: Mapa de contornos HMBC em CDCl_3 , evidenciando os acoplamentos encontrados da fração **Pe3C4**

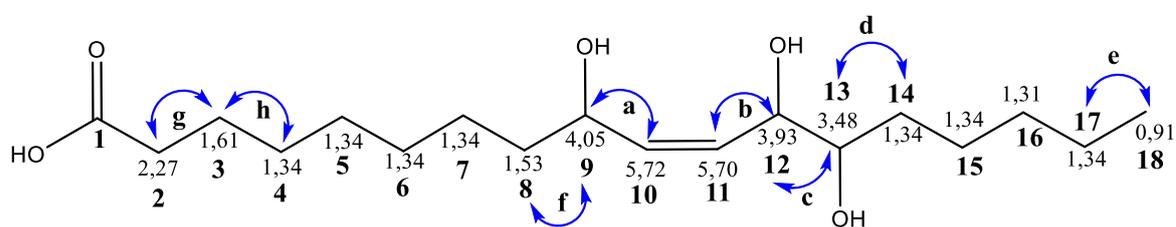
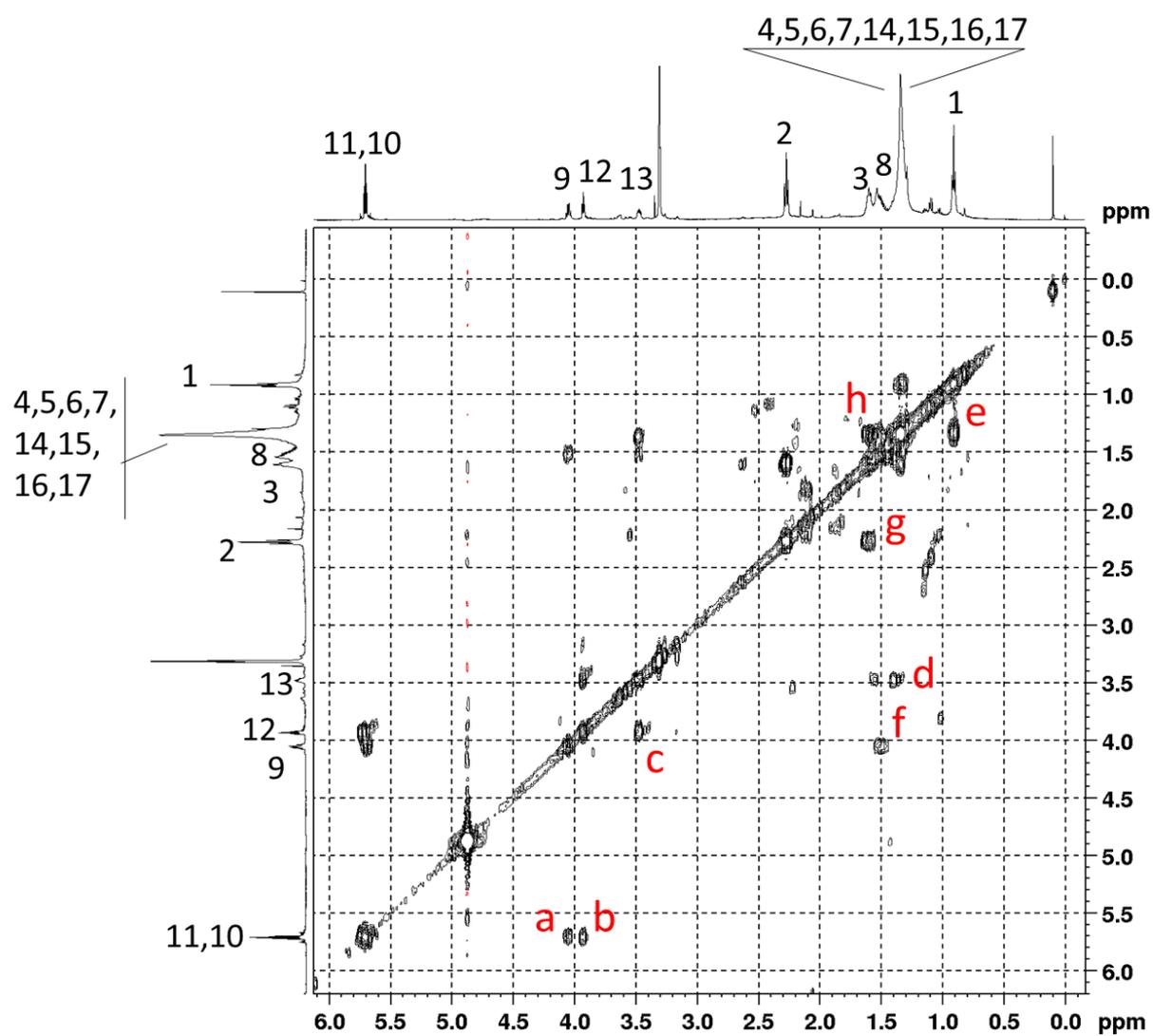


Figura 14: Mapa de contornos COSY da fração **Pe3C4**, com destaque para os acoplamentos encontrados

5.2.2. Caracterização dos compostos presentes nas frações **Pe4S11** por espectrometria de massas

A Figura 15 apresenta o espectro de massas obtido da inserção direta da fração **Pe4S11**. Verifica-se a existência de vários íons de massa elevada, entre m/z 1100 e 1400, sugerindo que a amostra pode conter sequências homólogas de peptídeos.

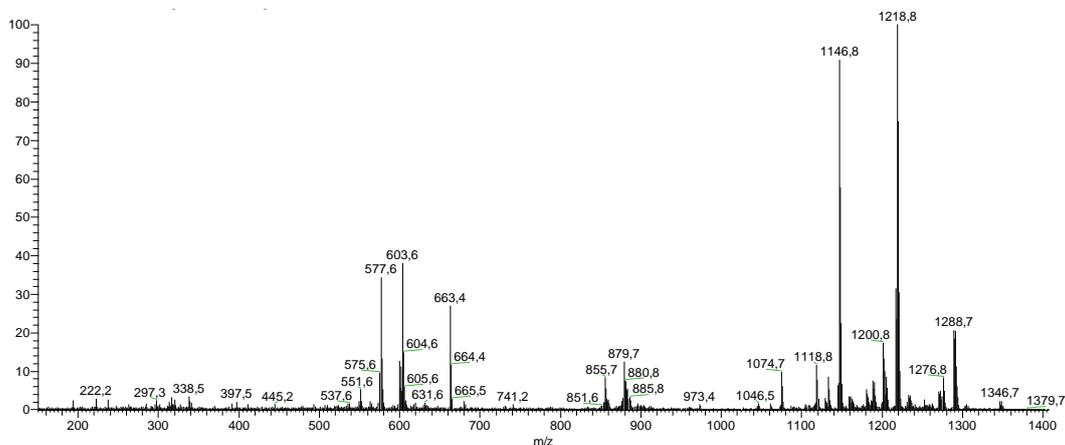


Figura 15: Espectro de massas da fração **Pe4S11**, obtido em fonte APCI, no modo positivo

Para caracterização destes compostos, foi realizada a fragmentação dos íons majoritários observados no espectro de massas, sendo possível verificar a presença de peptabólitos descritos na literatura. A Figura 16 apresenta o espectro de MS/MS do íon m/z 1218,8 $[M+H]^+$.

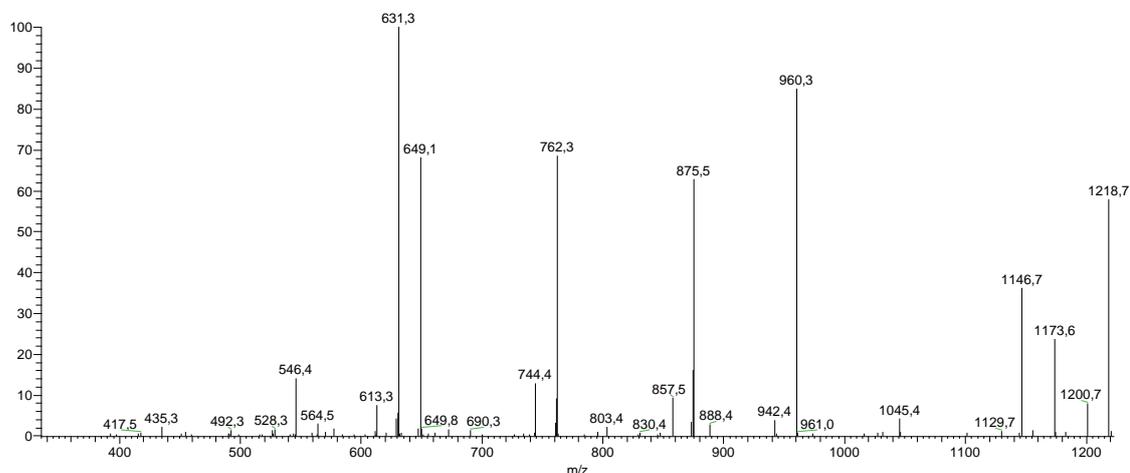


Figura 16: MS2 do íon 1218,8 $[M+H]^+$, fonte APCI

Os fragmentos obtidos em m/z 1218,8, 1045,4, 960,3, 875,5, 762,3, 649,1, 631,3, 564,5, 546,4 e 435,3 são compatíveis com a fragmentação do peptabólito leucinostatina A, conforme verificado por Isogai e colaboradores (1992). Os íons de menor relação massa-carga não foram cobertos na análise da Figura 16, devido ao espectrômetro de massas usado ser do tipo *ion trap*. Para se obter uma varredura mais completa, foi realizada um terceiro ciclo de fragmentação (MS3) para o sinal m/z 546, conforme pode ser visualizado na Figura 17, onde os íons m/z 435,3, 222,1 e 194,1 também coincidem com os dados apresentados por Isogai et al. (1992), o que reforça a sugestão apresentada para a leucinostatina A.

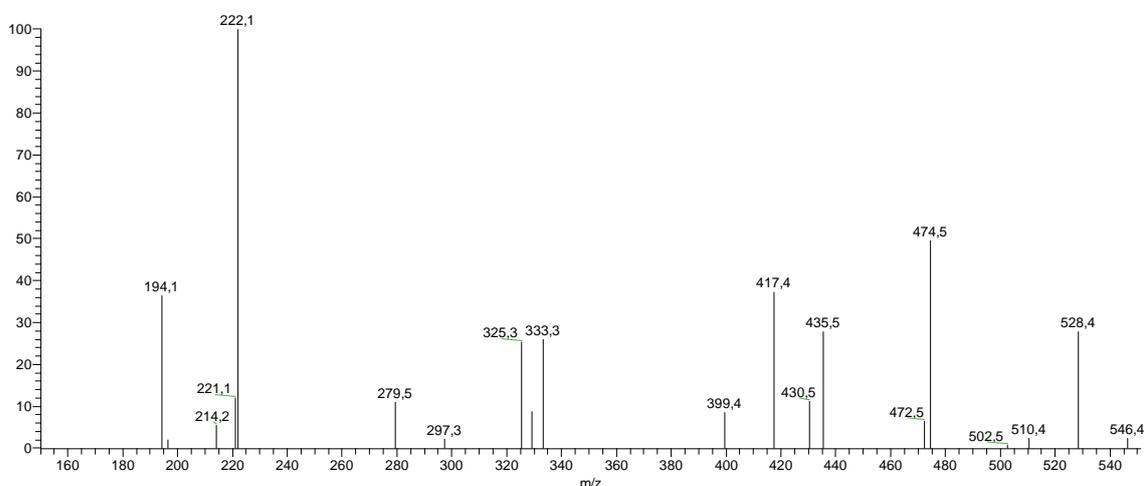


Figura 17: Espectro de massa (MS3) da fração **Pe4S11**, obtido em ESI e modo positivo

Quando se trata da fragmentação de peptídeos, é importante estar atento às possibilidades de fragmentos típicos, os quais são genericamente de três tipos: $C\alpha-C=O$, $N-C=O$ ou $N-C\alpha$, onde $C\alpha$ pertence a um dos dois aminoácidos conectados pela ligação peptídica $N-C=O$ (Figura 18). Desta forma, deste rompimento podem ser formados seis diferentes fragmentos: a_n , b_n e c_n (quando a carga positiva se mantém no terminal amino) e x_n , y_n e z_n (quando a carga positiva

fica no terminal carboxila). O subscrito n indica o número de aminoácidos presentes na cadeia peptídica (HOFFMANN e STROOBANT, 2007).

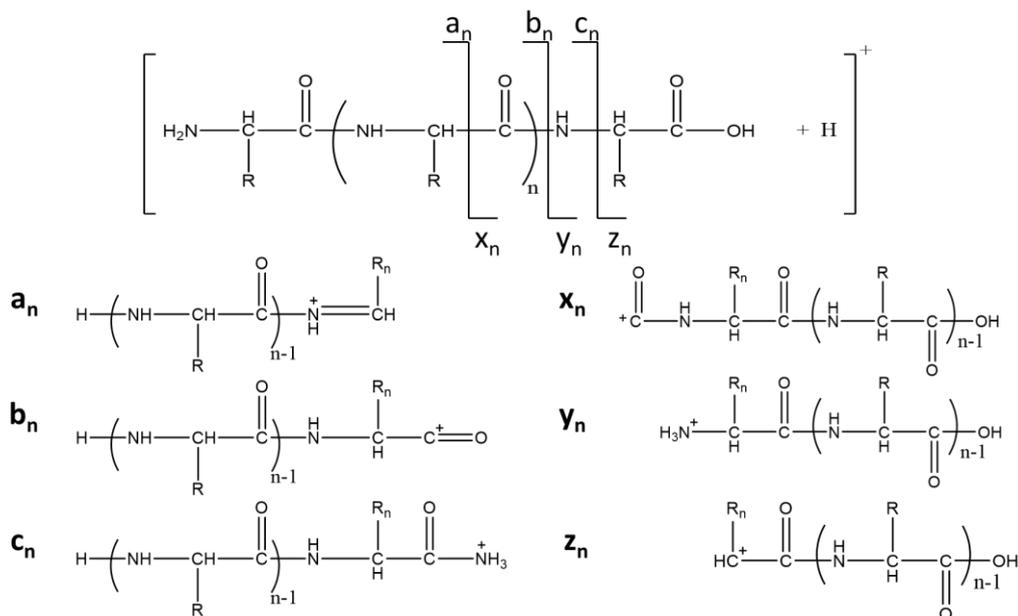


Figura 18: Principais fragmentos formados durante a fragmentação de peptídeos

A Figura 19 apresenta uma proposta de fragmentação para a leucinostatina A (L-A) (Isogai et al., 1992). Na figura, as unidades que compõem L-A também foram identificadas na parte inferior com as siglas correspondentes. Entre os íons fragmentos (b , y , x , v e z) citados por esses autores, apenas os íons do tipo b resultam em picos significativos. Paralelos a estes há duas séries de íons secundários correspondentes a perdas de água ($b - 18$) e a perdas de butanona ($b - 72$). Essas perdas são inteiramente compatíveis com a estrutura da leucinostatina A, em que as perdas de água são oriundas da unidade HYLEu, as quais resultam em uma dupla conjugada com a respectiva carbonila peptídica (Figura 20A). A perda da butanona por sua vez corresponde à unidade AHMOD, propícia para fragmentação de McLafferty (Figura 20a e Figura 20b). Exceto para as perdas de água dos fragmentos em m/z 649 e 564 que resultam em fragmentos mais intensos que os respectivos íons tipo b , todos os outros fragmentos secundários, de perda de água ou butanona, são menos intensos, revelando a tendência das quebras tipo b como as que formam os fragmentos

mais estáveis. Finalmente, o íon fragmento em m/z 1173,7 ($[M+H-45]^+$) é coerente com a perda da N,N-dimetilamina da unidade terminal DMPD (Figura 20C1 e Figura 20C2).

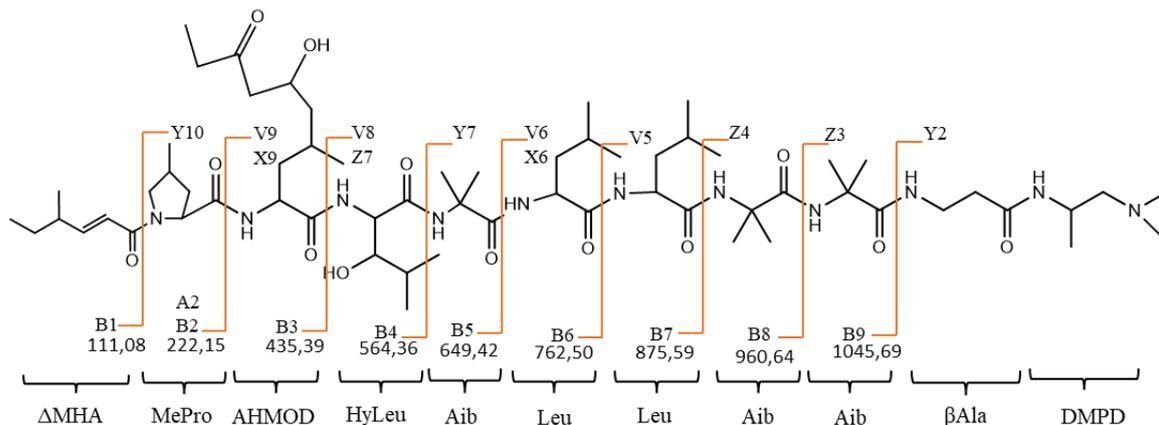


Figura 19: Proposta de fragmentação da leucinostatina A correspondente aos íons tipo b. Adaptado de Isogai et al. (1992).

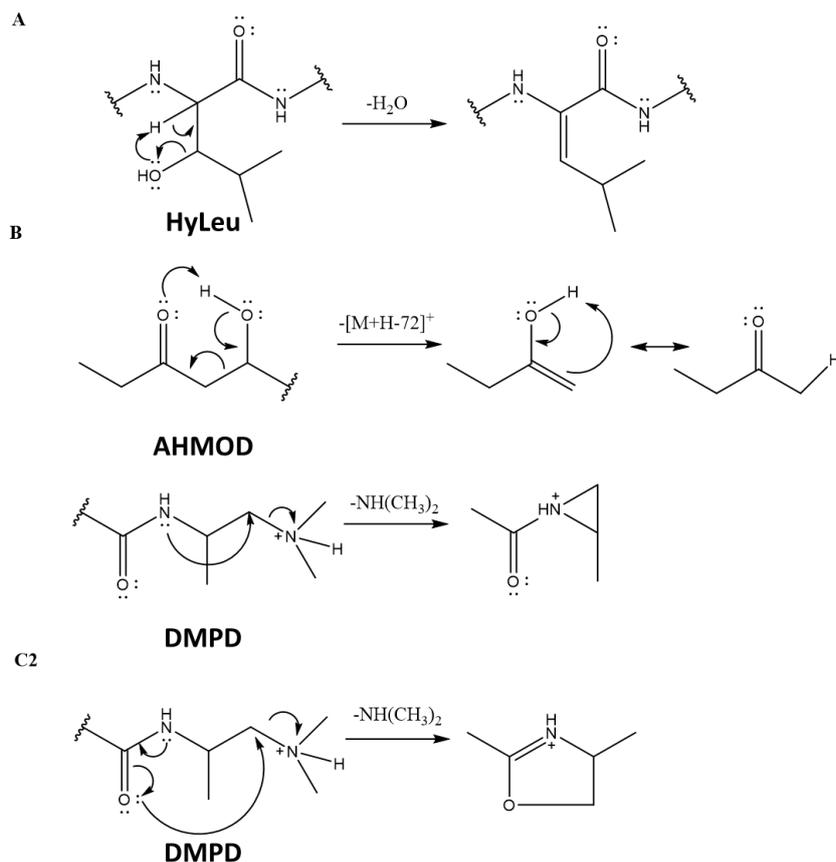


Figura 20: Propostas de fragmentação para a leucinostatina A, com destaque para os mecanismos de A) perda de água, B) perda da butanona e C1) e C2) perda da N,N-dimetilamina

Foram observados indícios de outras leucinostatinas presentes na fração **Pe4S11**, tanto pelos íons $[M+H]^+$ previamente relatados por outros pesquisadores (ROSSI, TUTTOBELLO e RICCI, 1987; ISOGAI et al., 1992; MARTINEZ E MORAES, 2015), como pela análise das respectivas fragmentações. Assim, a Figura 21 apresenta o espectro de MS2 do íon m/z 1200,8 ($[M+H]^+$). De forma análoga ao caso anterior, o espectro de MS3 permitiu que fosse visualizada uma sequência mais complementar, em que os íons m/z 1027,5, 942,4, 857,4, 744,3, 631,3, 613,3, 528,3, 417,3 222,1 e 194,2 são característicos da fragmentação tipo b da substância leucinostatina A2 (L-A2) (ISOGAI et al, 1992). A Figura 22 por sua vez fornece uma proposta para a fragmentação desse peptabólito. Note-se no espectro da que os íons secundários são menos importantes neste peptídeo, exceto as perdas de água do íon em m/z 631 que resulta no pico majoritário em

m/z 613. Observe-se nas Figura 19 e Figura 22 que a leucinostatina A2 é um derivado da L-A, onde um processo de desidratação na unidade AHMOD resultou em uma cetona α,β -insaturada.

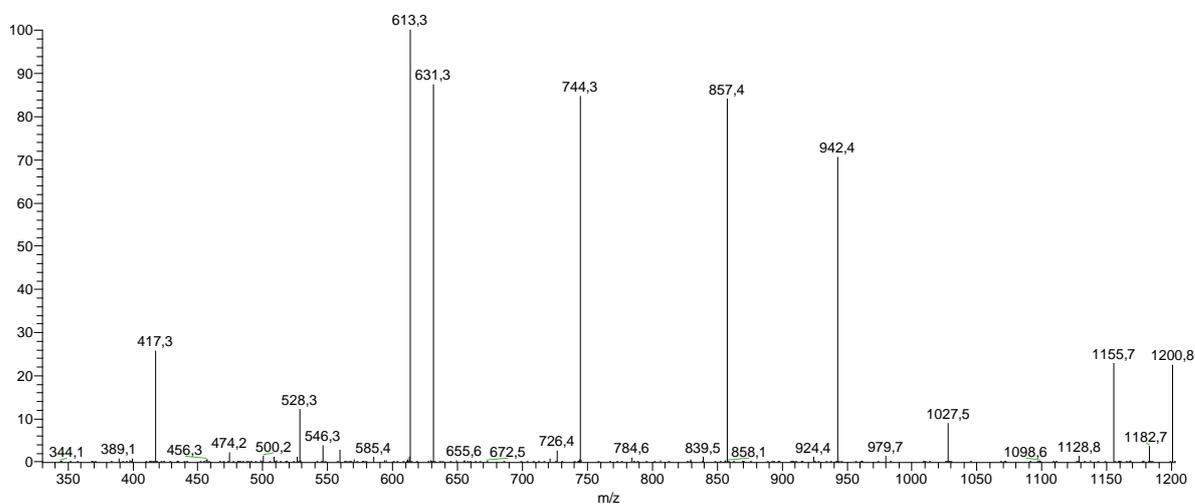


Figura 21: Fragmentação do íon m/z 1200,8 $[M+H]^+$

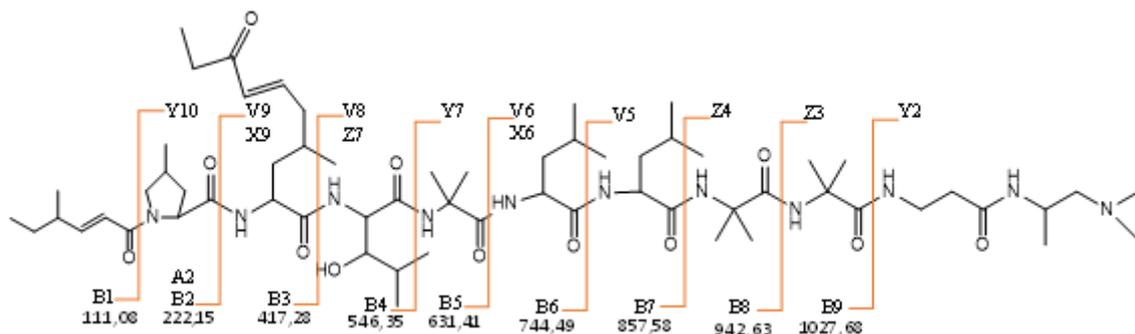


Figura 22: Proposta de fragmentação para a leucinostatina A2. Adaptado de Isogai et al (1994)

O mesmo procedimento foi realizado para o íon m/z 1118,7 $[M+H]^+$, cujo espectro de massas pode ser visto na Figura 23. Os íons em m/z 945,4, 860,4, 775,4, 662,3, 549,3, 531,3, 446,2, 335,1, 222,1 e 194,3 coincidem com a fragmentação do peptabólito leucinostatina D (ISOGAI, 1994, MARTINEZ, 2009).

A proposta de fragmentação está incluída na Figura 24, conforme descrito por Isogai e colaboradores (1994).

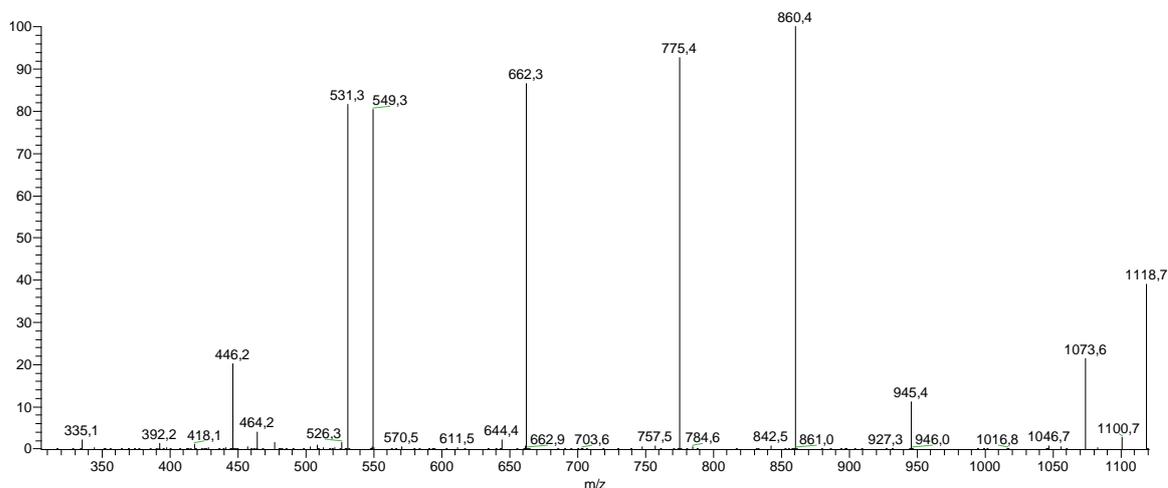


Figura 23: Fragmentação do íon m/z 1118,7 [M+H]⁺

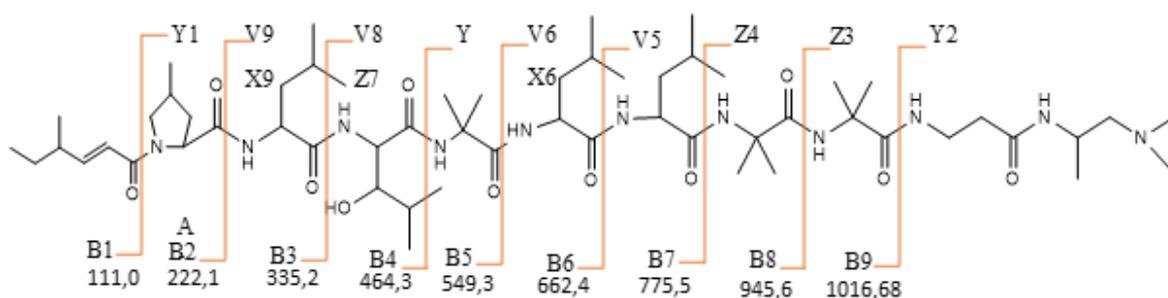


Figura 24: Proposta de fragmentação para a leucinostatina D. Adaptado de Isogai et al. (1994)

5.2.2.1. Análise dos espectros de RMN da fração **Pe4S11**

Após verificação da presença de leucinostatinas na fração **Pe4S11** através dos dados de fragmentação obtidos por espectrometria de massas, os espectros de RMN de 1D e 2D foram adquiridos com o intuito de confirmar a presença de uma ou mais destas substâncias na amostra supracitada. No espectro de RMN de ¹H em CDCl₃ (Figura 25) é possível ver sinais entre δ_H 3,94

e 4,21, característicos de hidrogênios metínicos de carbonos ligados a nitrogênios de ligações peptídicas, que são corroboradas pela presença de sinais na faixa de δ_H 7,32-9,30, típicos de hidrogênios ligados a esses nitrogênios. Outros sinais apontam a presença de hidrogênios metílicos (δ_H 0,88-1,44) e outros hidrogênios alifáticos (δ_H 1,23-2,64). Dois sinais em δ_H 5,02 (s) e 5,48 (d, $J=8,5$ Hz) apresentam bandas largas características de hidrogênios de hidroxilas. Por fim, observa-se dois sinais de hidrogênios oleofínicos em δ_H 6,35 (dd, $J=0,9$ e $15,4$ Hz) e 6,69 (dd, $J=7,3$ e $15,4$ Hz) (Tabela 7).

Corroborando com os dados de RMN de 1H , no espectro de RMN de ^{13}C (Figura 26) observa-se a presença de sinais entre δ_C 55,1 e 60,9, típicos de grupos metínicos α -carbonílicos ligados a nitrogênios de ligações peptídicas. Além disso, são observados dez sinais referentes a grupos acílicos (peptídicos, neste caso) entre δ_C 167,7 e 178,0, além de um sinal carbonílico em δ_C 212,4. Confrontando o espectro de RMN de ^{13}C com o DEPT-135 (Figura 27), foi possível identificar vinte sinais de carbonos metílicos (δ_C 7,7-46,8), doze sinais de carbonos metilênicos (δ_C 25,0-63,0), três sinais de carbonos quaternários sp^3 em δ_C 56,2, 56,6 e 56,8, doze sinais de carbonos metínicos (δ_C 25,7-60,9), dois sinais de carbonos metínicos hidroxilados entre δ_C 63,7 e 75,1, dois sinais de carbonos hibridizados sp^2 em δ_C 121,4 e 151,1, típicos de duplas conjugadas com carbonilas, e os onze sinais de grupos acílicos e carbonílico acima citados (Tabela 7).

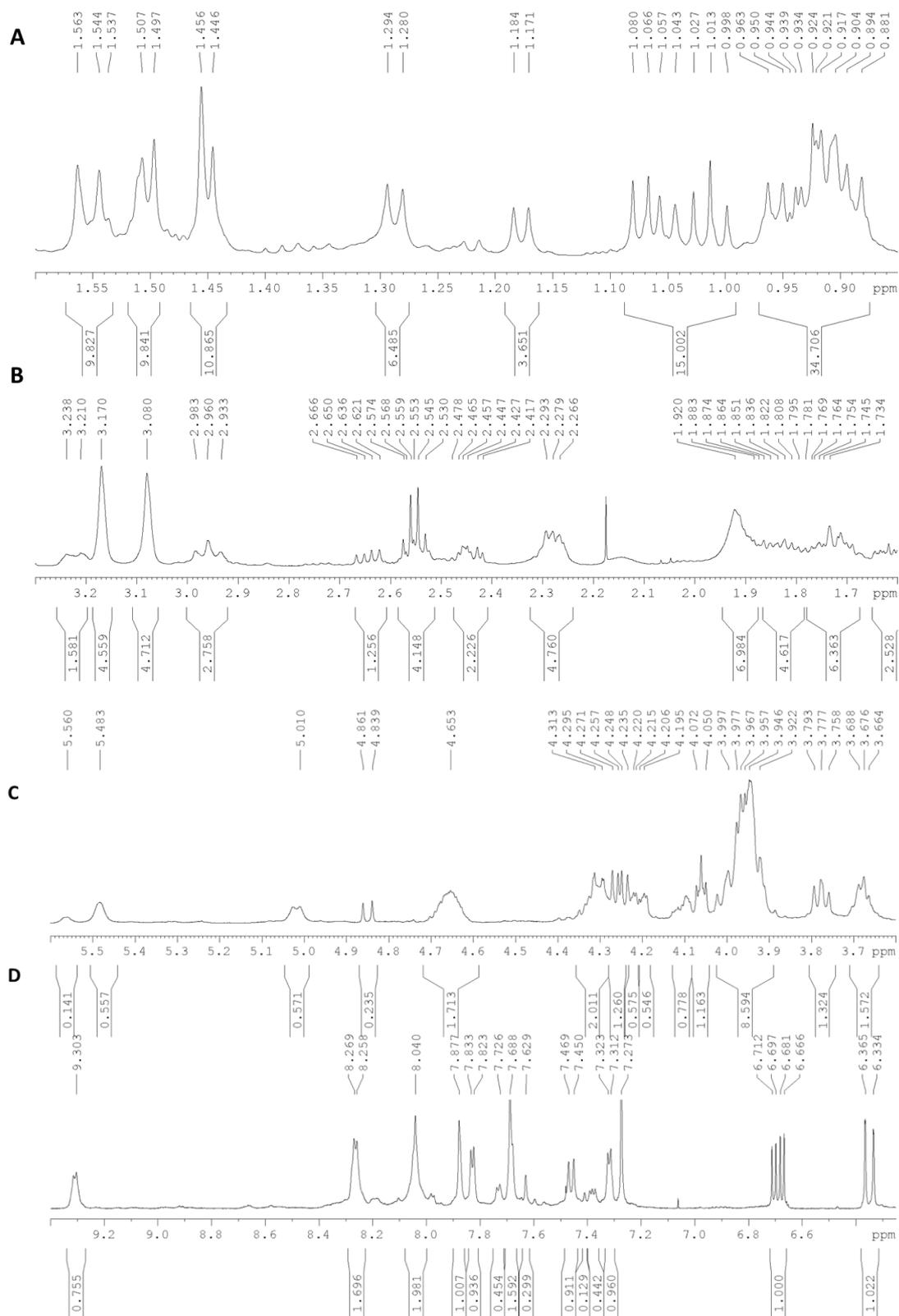


Figura 25: Ampliações do espectro de RMN de ^1H da fração **Pe4S11** em CDCl_3 (500 MHz). A) região dos hidrogênios metílicos e metilênicos, B) hidrogênios metilênicos e metínicos, C) hidrogênios metínicos e D) hidrogênios olefínicos e ligados a N peptídico.

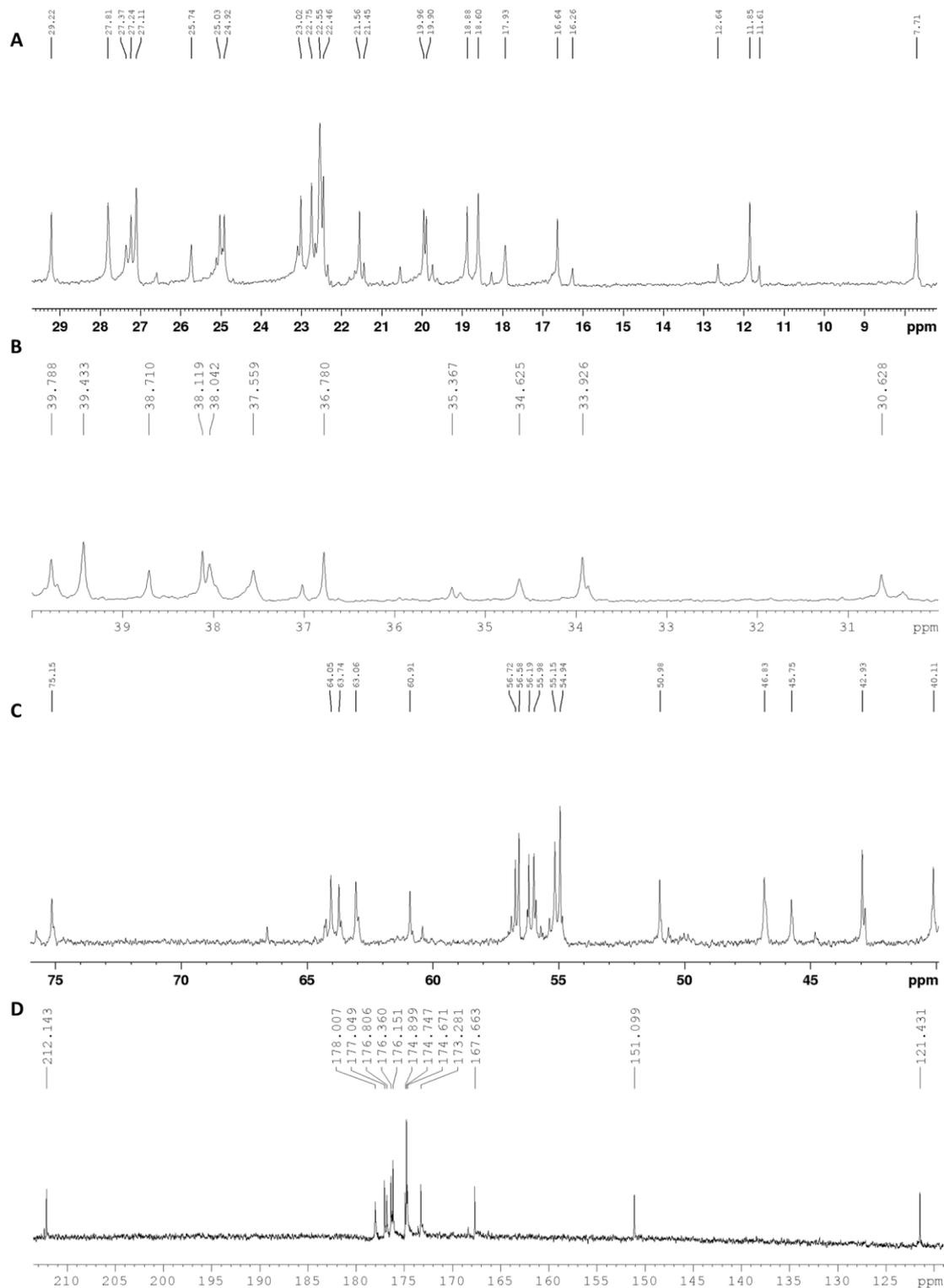


Figura 26: Ampliações do espectro de RMN de ^{13}C da fração **Pe4S11** em CDCl_3 (125 MHz). A) Região dos carbonos metílicos e metilênicos, B) carbonos metilênicos, C) carbonos metilênicos e metínicos e D) carbonos olefínicos, acílicos e carbonílico.

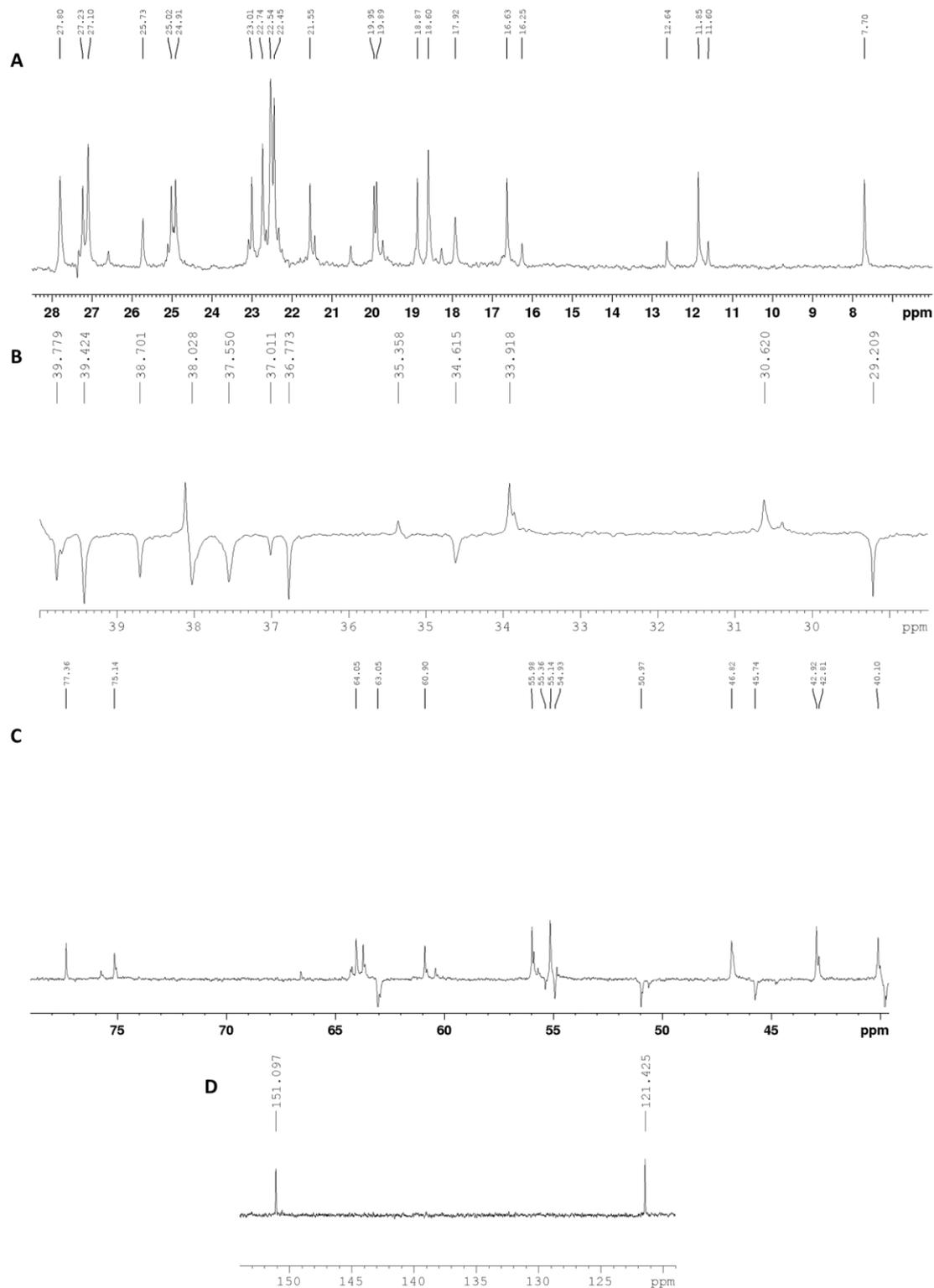


Figura 27: Ampliações do espectro de DEPT-135 em CDCl_3 da fração **Pe4S11**, evidenciando a região A) de carbonos metílicos, B) carbonos metílicos e metilênicos, C) carbonos metínicos e D) carbonos olefínicos.

Para elucidação estrutural da fração **Pe4S11**, foram utilizados os espectros bidimensionais COSY (Figura 48), HSQC (Figura 49), HMBC (Figura 50), TOCSY (Figura 51) e ROESY (Figura 52). Estes dois últimos são importantes na análise de esqueletos peptídicos, pois fornecem detalhes acerca das correlações das unidades monoméricas e de suas interações, respectivamente. Mais especificamente, com o mapa de correlação TOCSY é possível verificar os acoplamentos que ocorrem em um mesmo sistema de spin de hidrogênios, enquanto o espectro de ROESY apresenta as correlações espaciais entre hidrogênios de diferentes aminoácidos que estejam próximos. Embora se tenha obtido o NOESY, dados o tamanho e massa desses peptídeos, o mesmo não apresentou as correlações espaciais de forma tão completa quanto o ROESY (SILVERSTEIN et al., 2015).

Com o auxílio do COSY (Figura 28), foram identificadas as unidades de aminoácidos e outros resíduos com hidrogênios α -metínicos ou hidrogênios metilênicos que se correlacionam com grupos NH e NH₂ na estrutura. Da análise dos espectros de TOCSY (Figura 29), foi possível coletar informações adicionais das correlações desses hidrogênios ligados a nitrogênio para caracterização das respectivas unidades peptídicas, a saber: duas unidades de leucina (Leu1 e Leu2), uma hidroxileucina (HyLeu), uma β -Alanina (β -Ala) e um N¹,N¹-dimetilpropano-1,2-diamina (DMPD). Com relação a este último resíduo, observa-se um nitrogênio quaternário (DMPD-1NH), um comportamento tipicamente observado em espectros dessa classe de peptídeos obtidos em CDCl₃ (RADIC et al., 1987). O resíduo 2-amino-6-hidroxi-4-metil-8-oxodecanoico (AHMOD) foi identificado pelas correlações observadas no HMBC (Figura 30), sendo confirmado na análise do COSY e TOCSY (Tabela 7, Figura 48).

Dentre as três leucinostatinas identificadas provisoriamente na fração **Pe4S11** por espectrometria de massas, a leucinostatina A é a única que possui em sua composição um resíduo AHMOD. A ausência de sinais de RMN que caracterizem a modificação das demais leucinostatinas nesta terceira unidade da sequência peptídica, sinaliza que a L-A seja o composto majoritário na amostra.

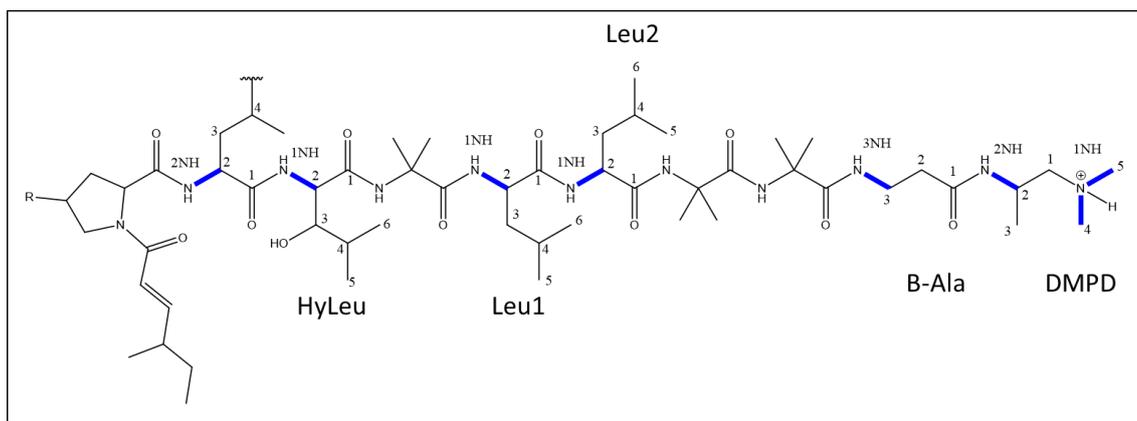
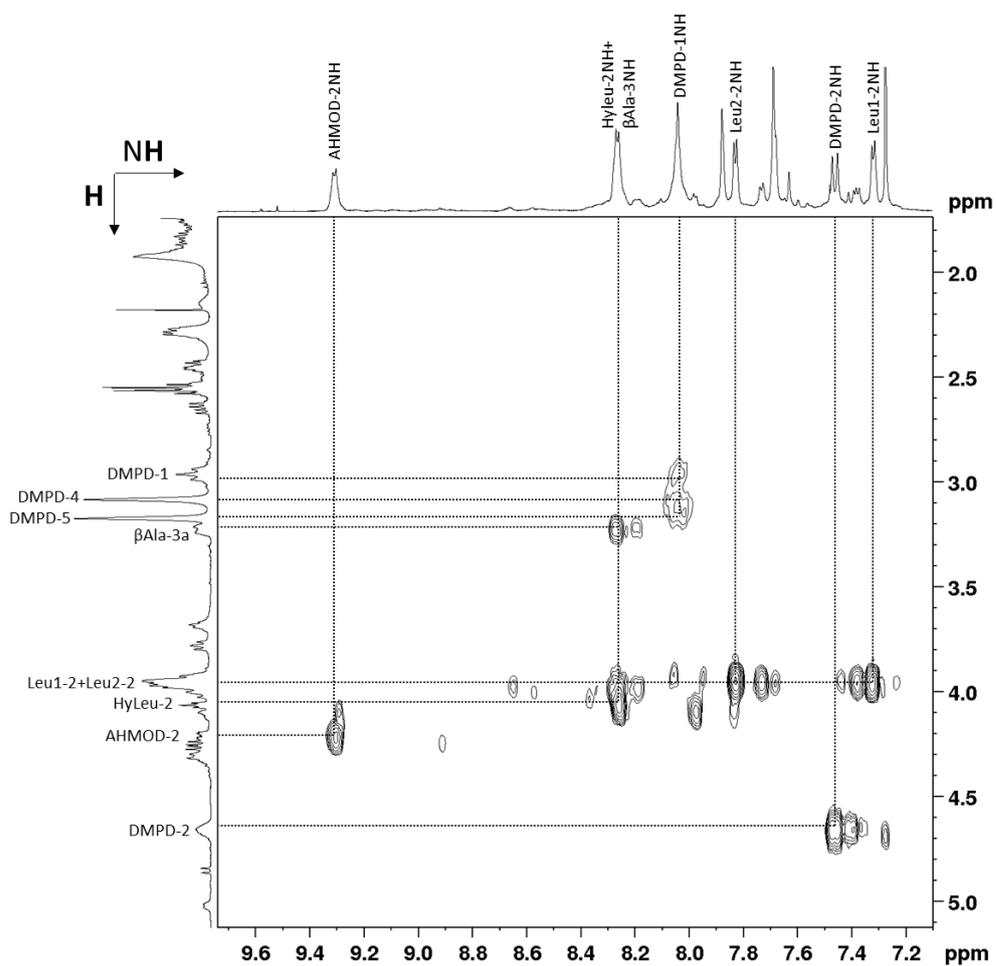


Figura 28: Acima: ampliação do mapa de correlações de COSY em CDCl_3 , evidenciando os hidrogênios se correlacionam com grupos NH e NH_2 . Abaixo: as correlações observadas em destaque.

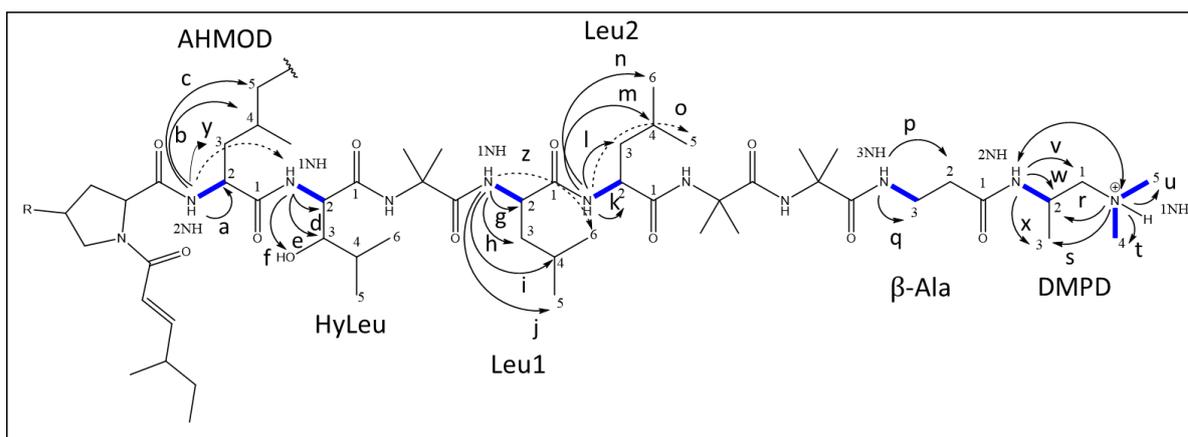
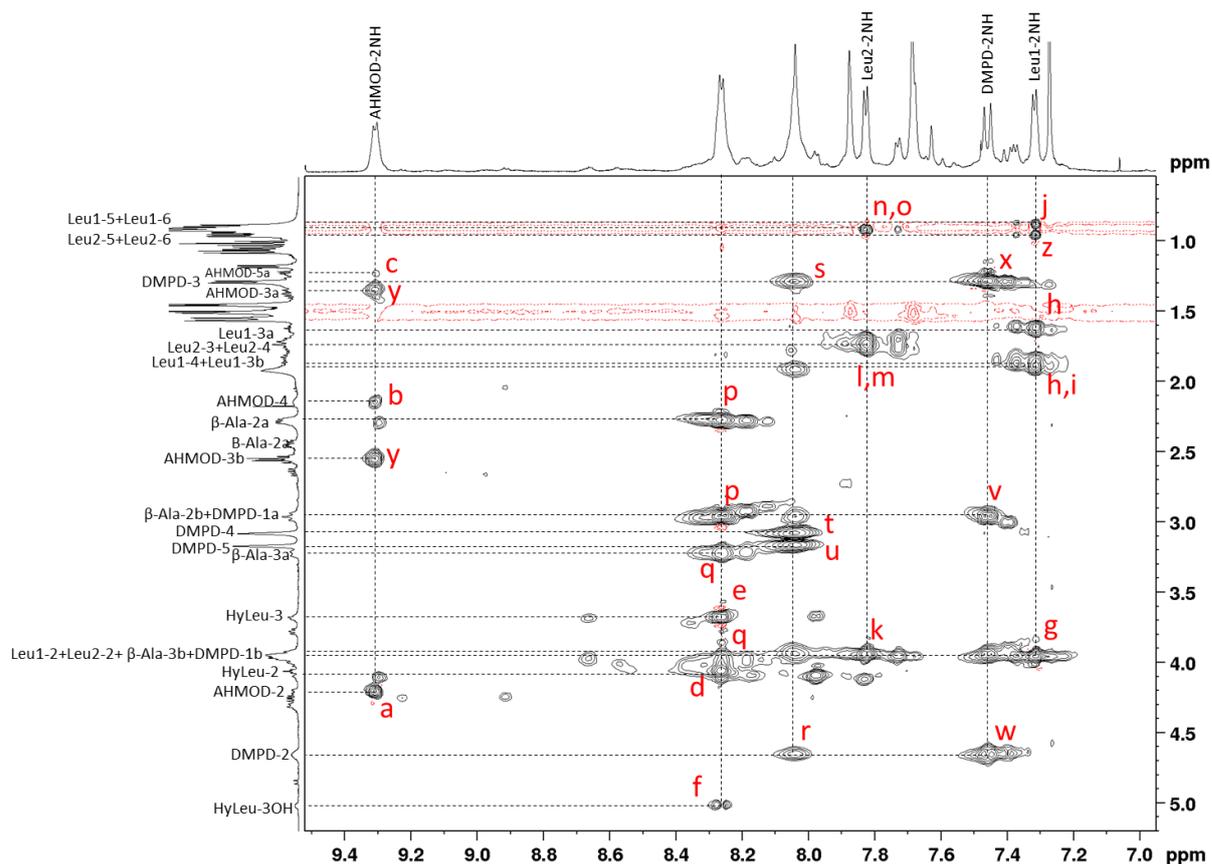


Figura 29: Acima: ampliação do mapa de correlações TOCSY para a fração **Pe4S11** em CDCl_3 , evidenciando as correlações entre grupos NH e NH_2 com seus respectivos sistemas de *spin*. Abaixo: as correlações observadas em destaque.

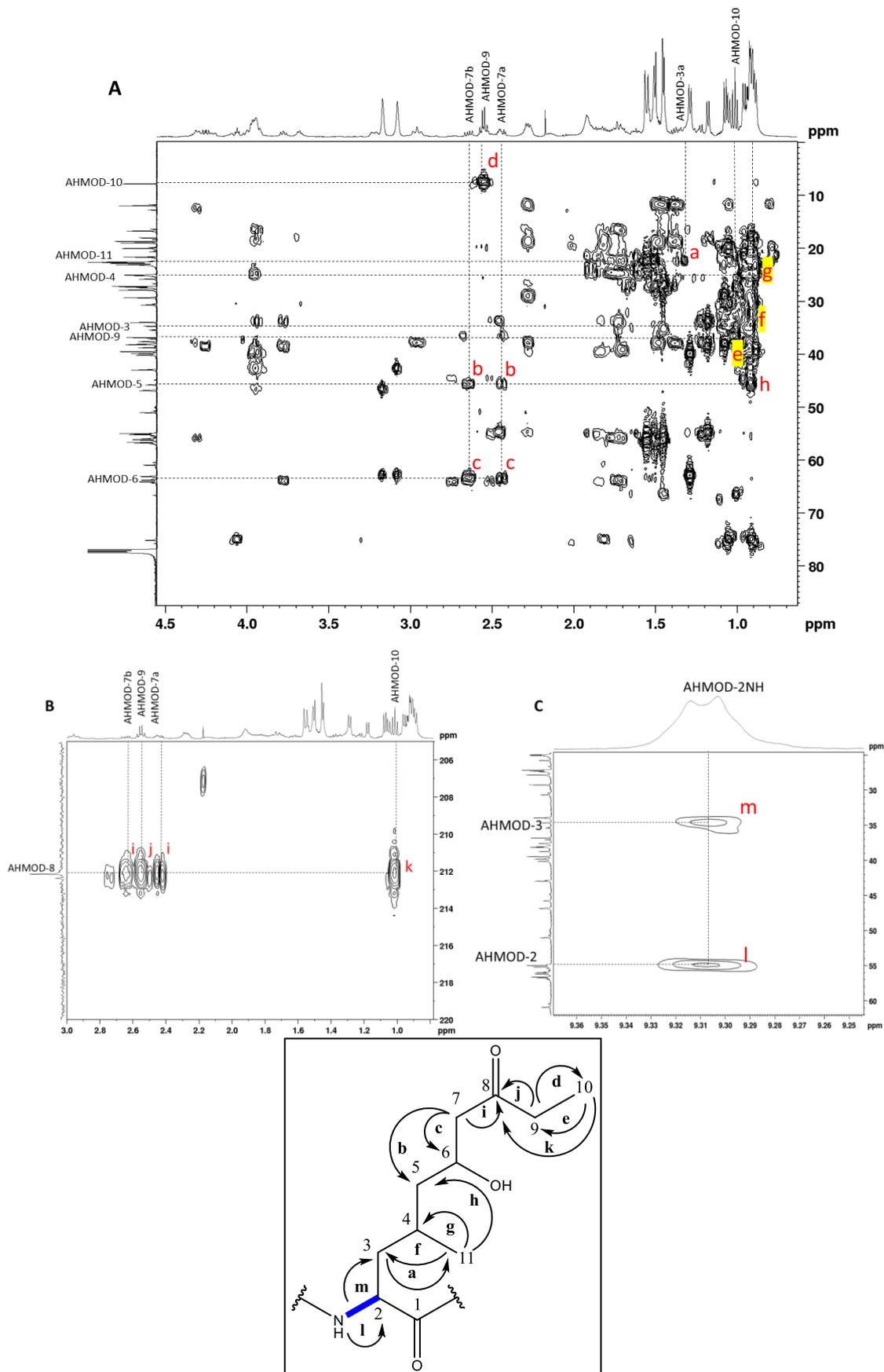


Figura 30: Acima: ampliação do espectro de HMBC em CDCl_3 da fração **Pe4S11**, evidenciando as correlações referentes ao resíduo AHMOD. A) Correlações entre os hidrogênios metínicos, metilênicos e metílicos com os respectivos grupos, B) correlações com o carbono carbonílico e C) correlações do grupo NH com os hidrogênios das vizinhanças. Abaixo: as correlações observadas em destaque.

O resíduo ΔMHA foi confirmado por meio dos hidrogênios olefínicos em δ_{H} 6,35 (dd, $J=0,9, 15,4$) e 6,69 (dd, $J=7,3, 15,4$) e pelas correlações dos hidrogênios que compõem esta unidade no mapa de correlações COSY (Figura 31). O sistema de correlações desses hidrogênios foi confirmado pela análise adicional do espectro de TOCSY (Figura 32), principalmente pelas correlações entre os sinais de hidrogênio olefínicos com os hidrogênios restantes do sistema, as quais ocorrem em uma região sem sobreposições.

De forma semelhante, na análise empreendida para determinação do último resíduo ΔMHA , a estrutura da metil-prolina (MePro) foi primeiramente constatada através das correlações observadas no espectro de COSY, partindo do hidrogênio metínico em δ_{H} 4,25 (dd, $J=6,8, 11,1$). As correlações observadas no TOCSY (Figura 33) foram fundamentais para assegurar que todos os hidrogênios analisados pertenciam a mesma unidade.

Os três resíduos de ácido α -aminobutírico (Aib) foram caracterizados com o auxílio dos espectros de HMBC (Figura 34), partindo das correlações de longa distância entre os hidrogênios do grupo NH com os carbonos metílicos, quaternários e carbonílicos das estruturas. Nota-se ainda na Figura 34 a correlação entre o resíduo Aib1 com o grupo carbonílico do aminoácido HyLeu. Devido a sobreposição dos sinais, por possuírem ambientes químicos semelhantes, o espectro de HSQC (Figura 49) foi fundamental na atribuição correta de cada metila.

A posição de cada Aib, bem como do restante das unidades que compõem a leucinostatina A, foi estabelecida por meio das correlações de longa distância observadas no espectro de ROESY entre hidrogênios ligados a nitrogênios ou carbonos pertencentes a unidades monoméricas diferentes (Figura 35).

Os dados de RMN contendo as informações coletadas dos espectros uni e bidimensionais estão disponíveis na Tabela 7, e confirmam a identificação da L-A realizada previamente por espectrometria de massas na seção 5.2.2, levando em consideração que este era o composto majoritário da fração **Pe4S11** (Figura 15). A Figura 36 apresenta a proposta estrutural para a L-A, com todas as atribuições estabelecidas.

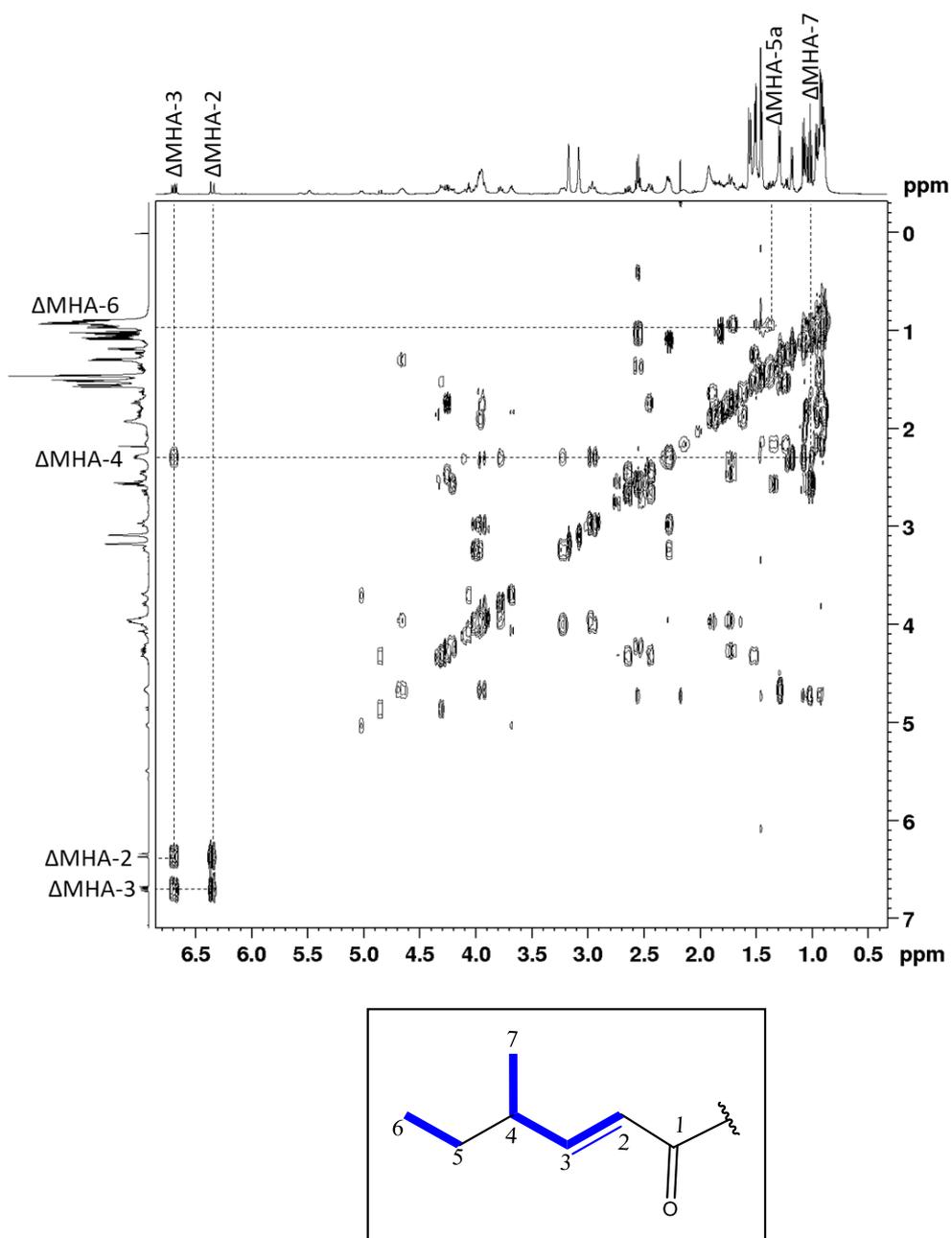


Figura 31: Correlações observadas no espectro de COSY para a fração **Pe4S11** acerca do resíduo AHMOD

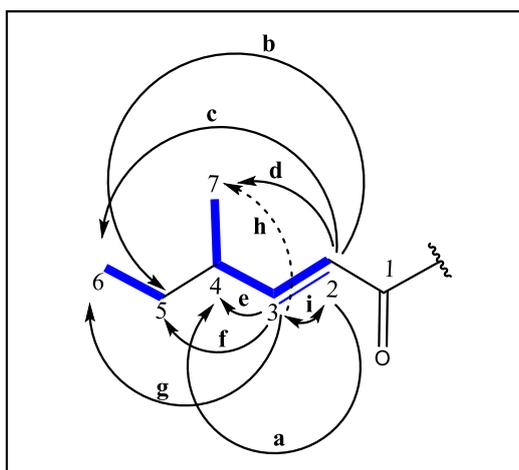
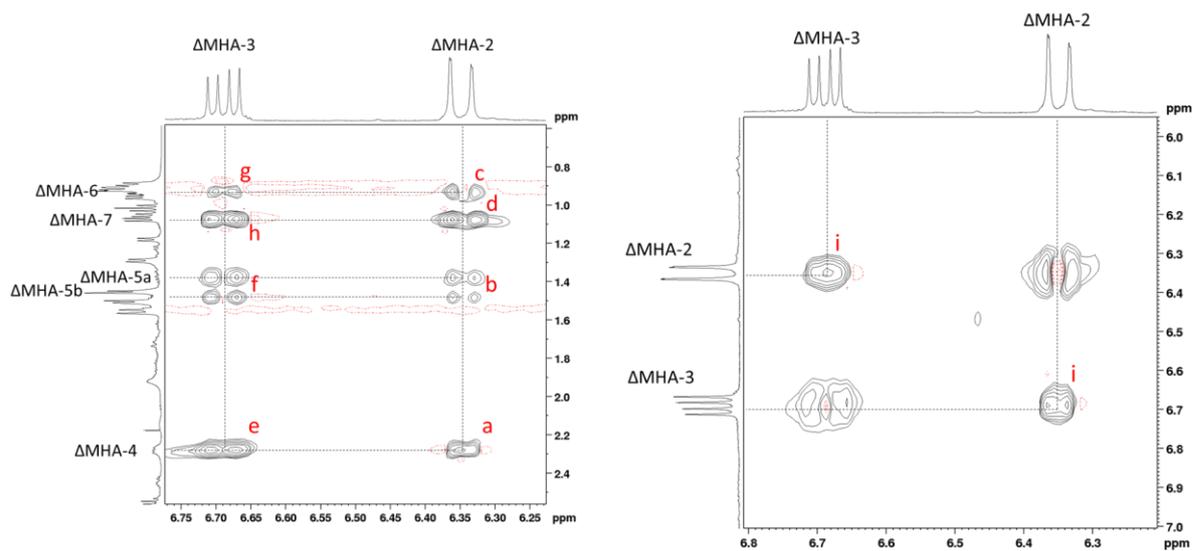


Figura 32: Correlações observadas no espectro de TOCSY para a fração **Pe4S11** em CDCl_3 , destacando as correlações dos hidrogênios olefínicos

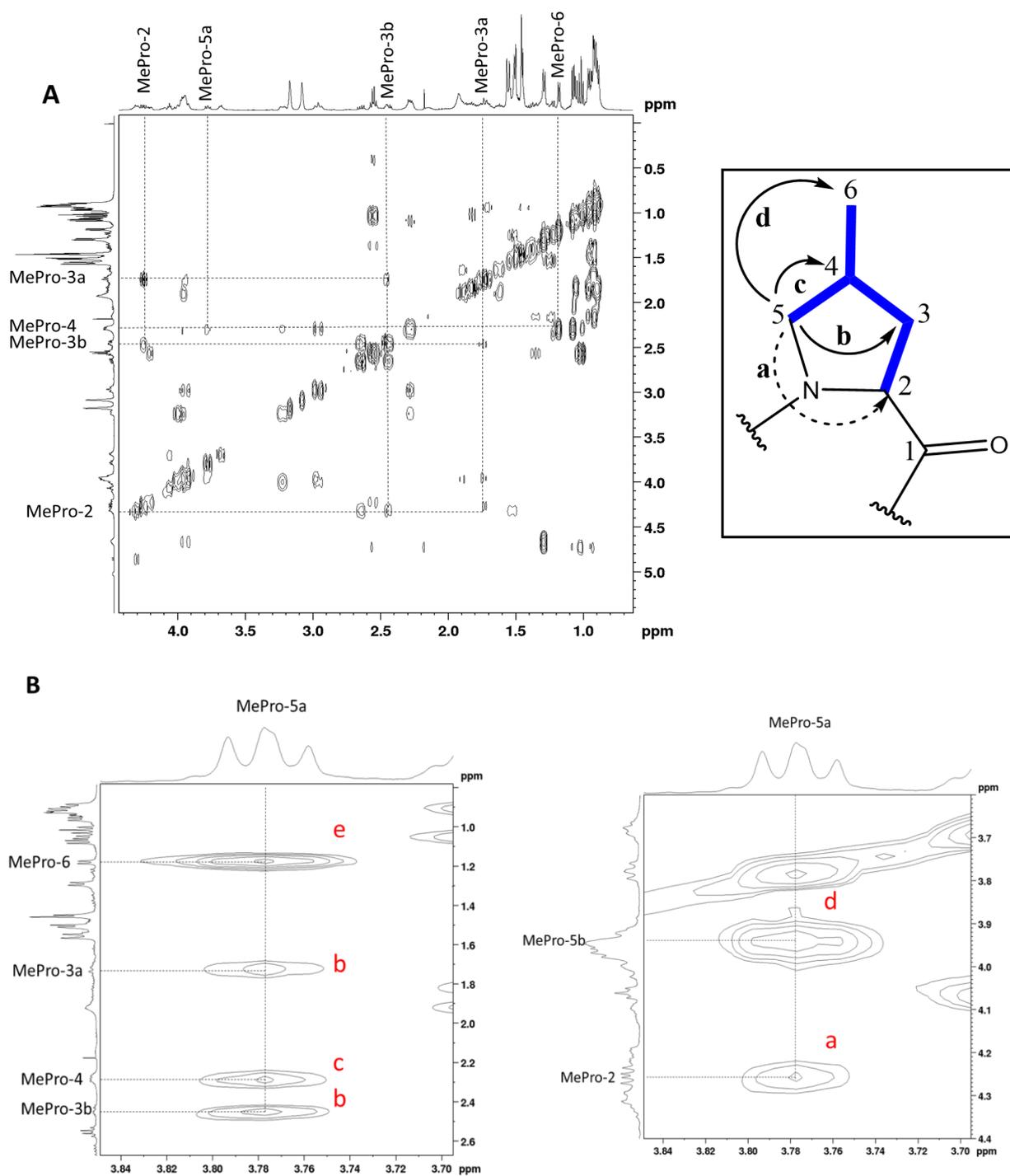


Figura 33: Correlações encontradas no espectro de COSY (A) e TOCSY (B) da fração **Pe4S11**, com destaque para as interações entre os hidrogênios que compõem o aminoácido metilprolina

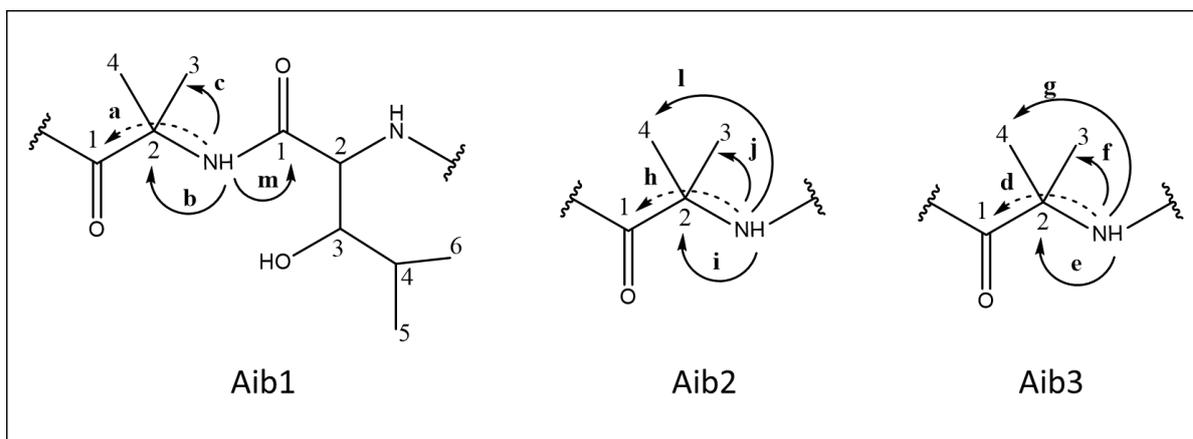
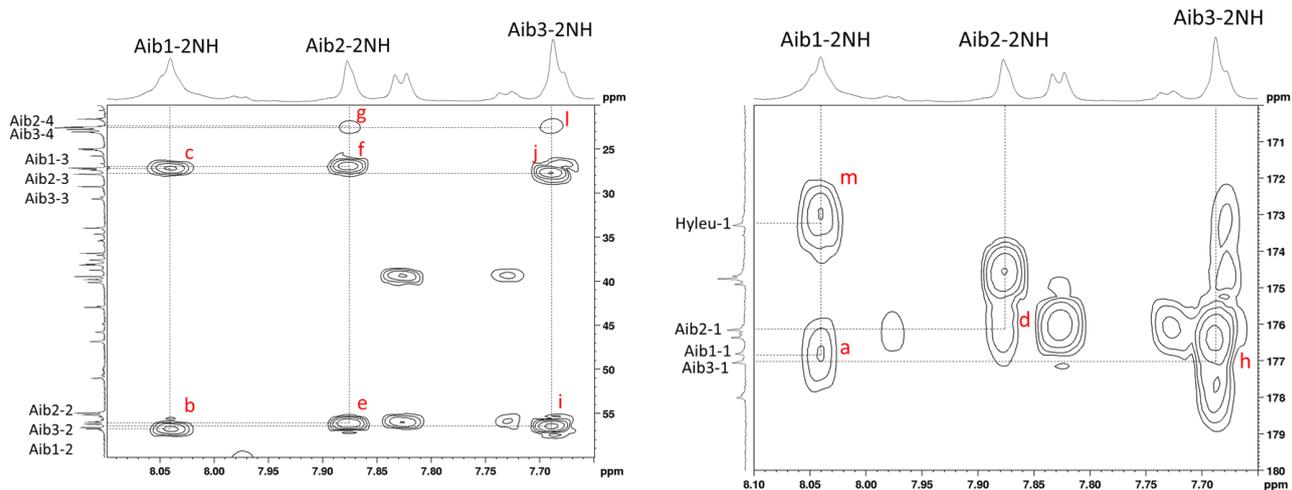


Figura 34: Correlações no HMBC para a fração **Pe4S11**, com destaque nas interações encontradas para os três resíduos de ácido α -aminobutírico

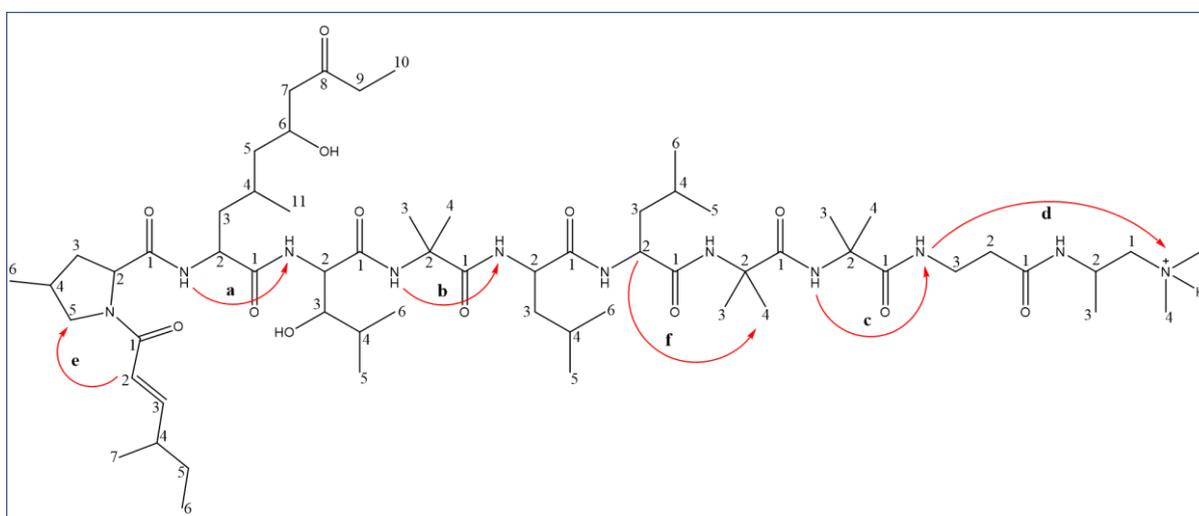
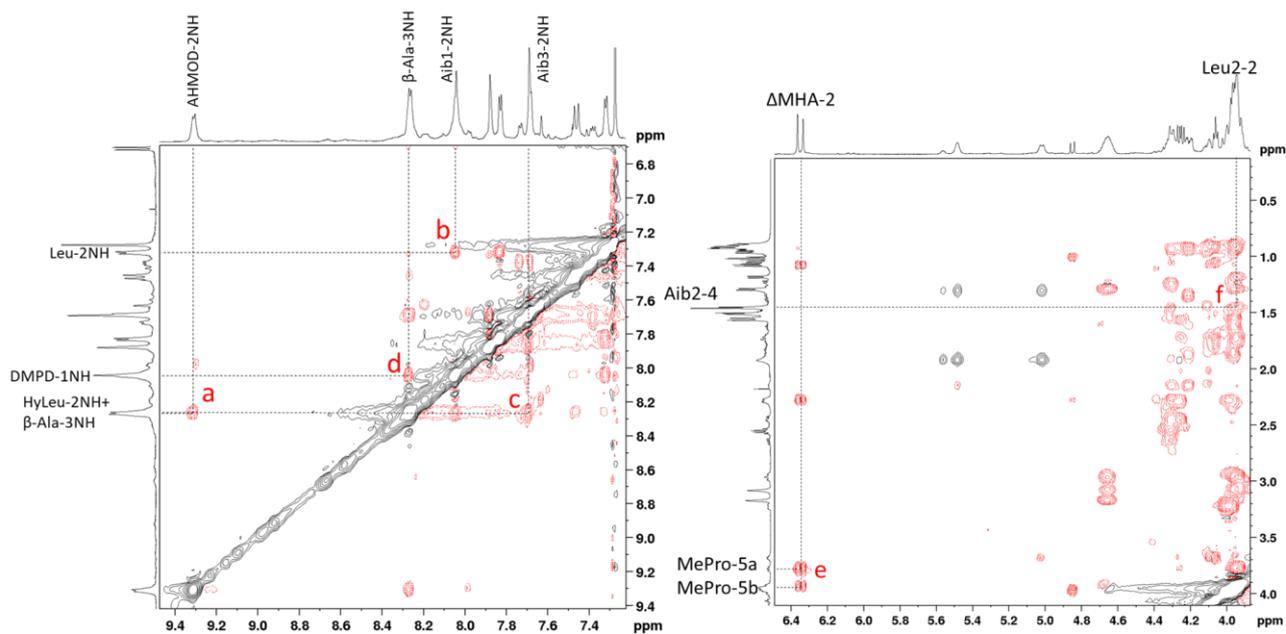


Figura 35: Ampliações no espectro de ROESY em CDCl_3 para a fração **Pe4S11**.

Tabela 7: Dados de RMN da fração **Pe4S11** (500, 125 MHz)

Resíduo	Pos.	δ_c (HSQC), DEPT-135	δ_H , multiplicidade (J, Hz)	COSY	HMBC	ROESY	TOCSY
ΔMHA	1	167,7, C	-	-	-	-	-
	2	121,4, CH	6,35, dd (0,9, 15,4)	3, 4fr	1, 4, 5fr, 7fr	3, 4, 6fr, 7, MePro-5a/b	3, 4, 5afr/bfr, 6fr, 7
	3	151,1, CH	6,69, dd (7,3, 15,4)	2, 4	1, 2fr, 4, 5, 7	2, 4, 5bfr, 6fr, 7, HyLeu-3fr, HyLeu-4fr	2, 4, 5afr/bfr, 6fr, 7
	4	38,1, CH	2,28, m	7	2, 3, 5, 6, 7	2, 3, 5a, 6, 7	2, 3, 5a/b, 6, 7
	5a	29,2, CH ₂	1,37, m	5b, 6	3, 4, 6, 7	3, 4, 5b	2fr, 3fr, 4, 7
	5b		1,47, m	5a, 6	3, 4, 6, 7	2, 3fr, 5a, 7fr	2fr, 3fr, 4, 7
	6	11,9, CH ₃	0,92, t (6,5)	5a/b	4, 5	2fr, 3fr, 4	2fr, 3fr, 4, 7
	7	18,9, CH ₃	1,07, d (6,7)	4	3, 4, 5	2, 3, 4, 5bfr	2, 3, 4, 5a/b, 6
MePro	1	174,8, C	-	-	-	-	-
	2	63,9, CH	4,25, dd (6,8, 11,1)	3a/b	1, 3	3b, 4	3, 4, 5a/b, 6

	3a	38,7, CH ₂	1,73, m	2, 3b, 4	1, 2, 4, 6	3b, 5b, 6	2, 3b, 4, 5a/b, 6
	3b		2,46, m	2, 3a, 4	2, 4, 5	2, 3a, 6, Hyleu-2	2, 3a, 4, 5a/b, 6
	4	33,9, CH	2,28, m	3a/b, 5a/b, 6	5fr, 6fr	2, 5a	2, 3a/b, 5, 6
	5a	54,9, CH ₂	3,78, dd (7,9, 9,6)	4, 5b	2, 3, 4fr, AHMOD-1fr	4, 5b, 6, ΔMHA-2	2, 3a/b, 4, 5a/b, 6
	5b	-	3,94, m	4, 5a	4, 6	3a, 5a, 6, ΔMHA-2, AHMOD-2NH	2, 3b, 5a, 6
	6	16,6, CH ₃	1,18, d (6,5)	4	3a, 4, 5	3a/b, 5a/b	2, 3a/b, 5a, 6
AHMOD	1	176,7, C		xxx	xxx	-	-
	2	55.1, CH	4.21, m	3a/b, 2NH	-	2NH, 3a, 4, 11, Leu1-2NHfr	2NH, 3a/b, 4, 5a/b, 11
	2NH	-	9,30, d (5,5)	2	Mepro-1, 2, 3	2, 3b, 4, Mepro-5b, HyLeu-2NH	2, 3a/b, 4, 5a, HyLeu-2NHfr
	3a	34.6, CH ₂	1,35, m	2, 3b, 4	11fr	2, 3b	2, 2NH, 3b, 4, 5b, 11

3b	-	2,55, m	2, 3a, 4	-	2NH, 3a, 4, HyLeu-2NH	2, 2NH, 3a, 4, 5b, 11
4	25,7, CH	2,14, m	3a/b, 5a/b, 11	-	2, 2NH, 3b, 5b, 6, 11	2, 2NH, 3a/b, 5a/b, 6, 7a/b, 11
5a	45.7, CH ₂	1,23, m	4, 5b, 6	11	5b, 6, 7a/b	2, 2NH, 4, 6, 7a/b, 11fr, 6OH
5b	-	1,52, m	4, 5a, 6	-	4, 5a, 7a/b	2, 6, 3a/b, 4, 7a/b, 11fr, 6OH
6	63.7, CH	4.31	5a/b, 7a/b, 6OH	-	4, 5a, 6OH, 9, 11	4, 5a/b, 6OH, 7a/b
6OH	-	5,48, s	6	-	6	5a/b, 6, 7a/b
7a	51,0, CH ₂	2,44, dd (4,9, 14,9, 1H)	6, 7b	5fr, 6, 8	5a/b, 6, 7b	5a/b, 6, 7b, 11fr, 6OH
7b	-	2,64, dd (7,9, 14,9, 1H)	6, 7a	5fr, 6, 8	5a/b, 6, 7a	5a/b, 6, 7a, 11fr, 6OH
8	212.4, C	-	-	-	-	-
9	36.8, CH ₂	2.55, q (7,2)	10	8, 10	6, 10	10
10	7.7, CH ₃	1.01, t (7,2)	9	8, 9	9	9

	11	22,5, CH ₃	0,91, m	4	3, 4, 5	-	-
HyLeu	1	173,3, C	-	-	-	-	-
	2	60,9, CH	4,06, t (5,6)	2NH, 3	1, 3, 4fr, AHMOD-1fr	2NH, 3, 4, 5, 6, MePro-3a, Aib-2NHfr, Leu-2NH	2NH, 3, 3OH, 4, 5, 6
	2NH	-	8,27, d (5,4)	2	2, 3, AHMOD-1	2, 3, 4, 3OH, AHMOD-2NH, AHMOD-3b, Aib-2NH	2, 3, 3OH
	3	75,1, CH	3,69, m	2, 3OH, 4	4fr	2, 2NH, 3, 4, 5, 6, 3OHfr, Aib-2NH, ΔMHA-3fr	2, 2NH, 3OH, 4, 5, 6
	3OH		5,02, d (8,5)	3	nd	2NH, 3fr	2, 2NH, 3, 4, 5, 6
	4	30,5, CH	1,81, m	3, 5, 6	3, 5, 6	2, 2NH, 3, ΔMHA-3fr	2, 3, 5, 6
	5	17,9, CH ₃	1,05, d (6,7)	4	3, 4, 6	2, 3	2, 3, 3OH, 4, 6
	6	19,7, CH ₃	0,91, m	4	3, 4, 5	2, 3	2, 3, 3OH, 4, 5
Aib1	1	177,0, C	-	-	-	-	-
	2	56,8, C	-	-	-	-	-
	2NH	-	8,04, s	-	1, 2, 3, HyLeu-1	3, 4, HyLeu-3, HyLeu-2NH, HyLeu-2, Leu1-2NH	

	3	27,1, CH ₃	1,50, s	-	1, 2, 4	nd	-
	4	22,5, CH ₃	1,44, s	-	1, 2, 3	nd	-
Leu1	1	176,2, C	-	-	-	-	-
	2	55,2, CH	3,96, m	2NH, 3a/b	1, 3	2NH, 3a/b, 4, Aib3-3, Aib3-2NH	2NH, 3a/b, 4
	2NH	-	7,32, d (5,3)	2	2, 3, Aib1-1	2, 3b, 4, AHMOD-2fr, Aib1-NH, Aib3-3, Leu2-NH	2, 3a/b, 4, 5, 6
	3a	39,8, CH ₂	1,62, m	2, 3b	1, 2, 4, 5, 6	2	2, 2NH
	3b		1,89, m	2, 3a	1, 2, 4, 5, 6	2, 2NH	2, 2NH
	4	25,0, CH	1,86, m	-	-	2, 2NH	2, 2NH
	5	21,5, CH ₃	0,88, d (6,5)	-	3	-	2NH
	6	23,2, CH ₃	0,95, d (6,4)	-	3	-	2NH
Leu2	1	174,8, C	-	-	-	-	-
	2	56,0, CH	3,94, m	2NH, 3a/b	1, 3	2NH, 3a, 6, Aib2-4, Aib2-2NH	2NH, 3, 4
	2NH	-	7,82, d (5,3)	2	2, 3, Leu-1	2, 3a, 4, 6, Leu1-2NH, HyLeu-2	2, 3, 4, 5, 6
	3	39,4, CH ₂	1,73, m	2	1, 2, 4, 5, 6	2	2, 2NH

	4	24,9, CH	1,74, m	-	-	2	2, 2NH
	5	21,5, CH ₃	0,91, m	-	-	2	2, 2NH
	6	23,2, CH ₃	0,92, m	-	-	2, 2NH	2, 2NH
Aib2	1	176,4, C	-	-	-	-	-
	2	56,2, C	-	-	-	--	
	2NH	-	7,88, s	-	-	1, 2, 3, Leu2-1	3, 4, Leu2-3, Leu2-2, AiB3-2NH
	3	27,1, CH ₃	1,51, s	-	1, 2, 4	2NH	-
	4	22,4, CH ₃	1,45, s	-	1, 2, 3	2NH	-
Aib3	1	177,9, C	-	-	-	-	-
	2	56,6, C	-	-	-	-	-
	2NH	-	7,68, s	-	1, 2, 3, Aib2-1	3, 4, Leu1-2, Aib2-2NH, β-Ala-3NH	-
	3	27,8, CH ₃	1,54, s	-	1, 2, 4	2NH, β-Ala-3NH	-
	4	22,5, CH ₃	1,46, s	-	1, 2, 3	2NH, DMPD-(2NHfr, 3fr, 4, 5)	-

β-Ala	1	174,7, C	-	-	-	-	-
	2a	37,5, CH ₂	2,28, m	2b, 3a/b	1, 3	-	2b, 3a/b, 3NH
	2b	-	2,96, t (12)	2a, 3a/b	1, 3	3NH	2b, 3a/b, 3NH
	3a	38,0, CH ₂	3,22, m	2a/b, 3b,3NH	1, 2, AiB3-1	3NH	2a/b, 3b, 3NH
	3b	-	3,99 m	2a/b, 3a, 3NH	1, 2, AiB3-1	-	2a/b, 3a, 3NH
	3NH	-	8,26, d (5,2)	3a/b	AiB3-1	Aib3-3, 2b, 3a, Aib3-2NH, DPD-1NH	2a/b, 3a/b
DMPD	1a	63,0, CH ₂	2,97, t (12)	1b, 1NH, 2	-	1b, 2, 2NH, 3, 4, 5	1b, 2, 2NH, 3, 4, 5, 1NHfr
	1b	-	3,94, m	1a, 2	2, 3	1a, 2fr, 3, 4, 5	1a, 2, 2NH, 3, 4, 5, 1NHfr
	1NH	-	8,04, m	1a, 4, 5	-	β -Ala-3NH	1a/b, 2, 2NHfr, 3, 4, 5
	2	40,1, CH	4,66, m	1a/b, 3, 2NH	1, 3	1a, 3, 4, 5, 2NH	1a/b, 1NH, 2NHfr, 3, 4, 5fr

	2NH	-	7,46 (d)	2	2, β -Ala-1	1a/b, 2, 3, Aib3-4fr	1a/b, 1NHfr, 2, 3
	3	18,6, CH ₃	1,29, d (6,7)	2	1, 2	1a/b, 2, 2NHfr, Aib3-4fr	1a/b, 2, 2NH, 4, 5, 1NHfr
	4	46,8, CH ₃	3,08, s	1NH	1, 5	1a/b, 1NH, 2, 5, Aib3-4	1a/b, 2, 3, 5, 1NHfr
	5	42,9, CH ₃	3,17, s	1NH	1,4	1a/b, 1NH, 2, 4, Aib3-4	1a/b, 2, 3, 4, 1NHfr

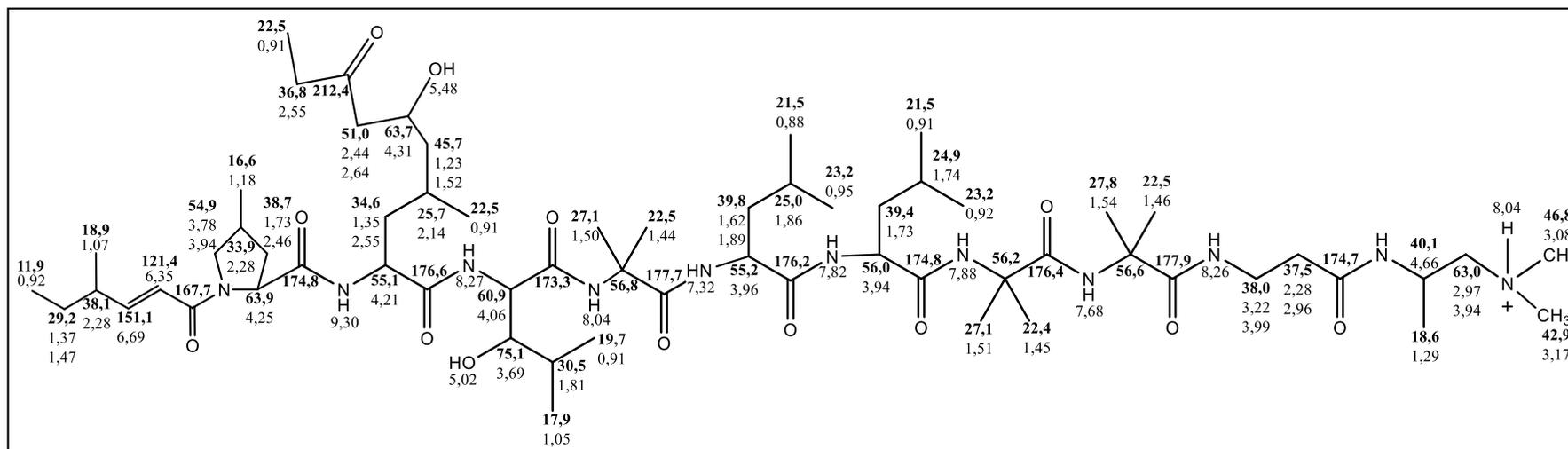


Figura 36: Proposta estrutural para a leucinostatina A

5.2.3. Caracterização dos compostos presentes nas frações **Pe4S10** por espectrometria de massas

A Figura 37 apresenta o espectro em *full scan* da fração **Pe4S10**, com um perfil semelhante ao encontrado na fração **Pe4S11**. De maneira análoga à fração subsequente, a região onde se concentram os íons no espectro indica a presença de outras leucinostatinas nesta amostra.

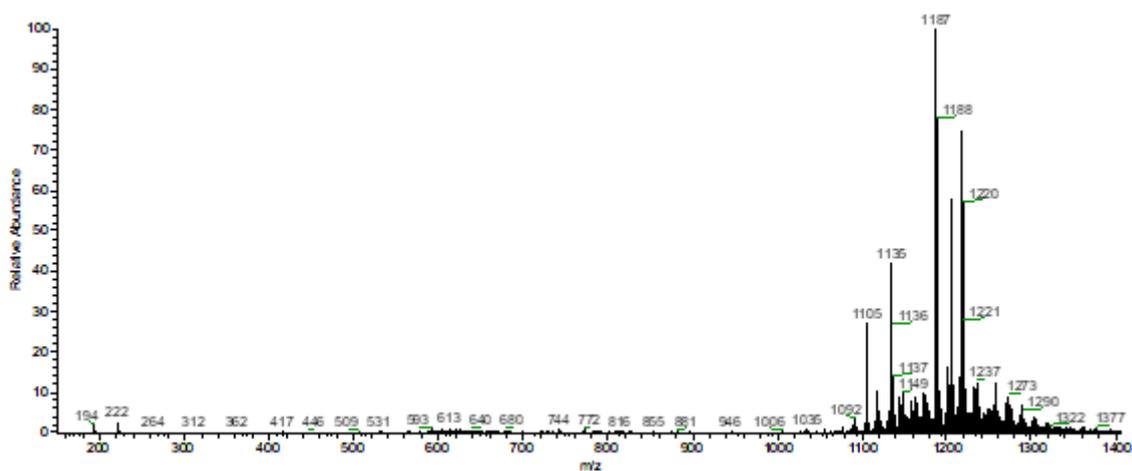


Figura 37: Espectro de massas da fração Pe4S10, obtido em fonte ESI, no modo positivo

Na Figura 38 estão os espectros de CID para os íons majoritários presentes na fração **Pe4S10**, ressaltando as perdas das unidades características que compõem estas leucinostatinas. Assim, com base na análise destes dados, pode-se sugerir que os íons $[M+H]^+$ m/z 1204,7, 1186,8, 1134,7 e 1104,7 estão relacionados com os peptibióticos leucinostatina B (L-B), leucinostatina B2 (L-B2), leucinostatina H (L-H) e leucinostatina F (L-F), respectivamente, devido a consistência nos produtos de fragmentação encontrados com os dados disponíveis na literatura (RADICS et al., 1987; ISOGAI et al., 1992; MARTINEZ e MORAES, 2015).

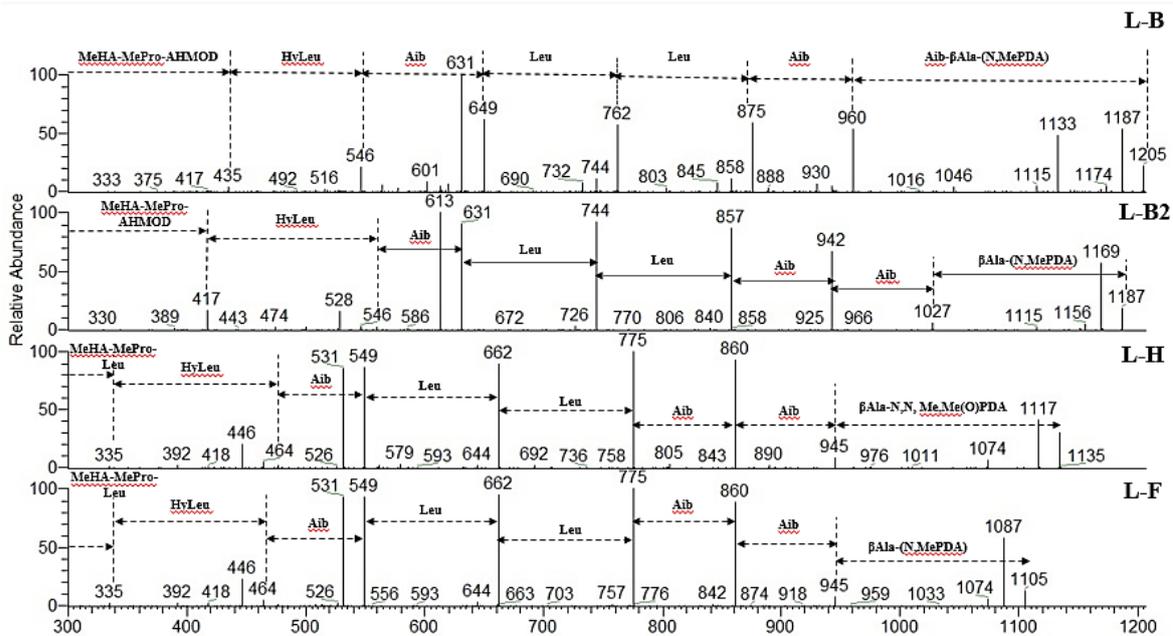


Figura 38: Fragmentação dos íons $[M+H]^+$ m/z 1205 (L-B), 1187 (L-B2), 1135 (L-H) e 1105 (L-F), com suas respectivas perdas identificadas

As Figura 39 e Figura 40 fornecem a estrutura destas leucinostatinas, com a proposta de fragmentação baseada nas perdas do tipo *b* (ISOGAI et al., 1992; MARTINEZ e MORAES, 2015). Os íons de massas menores não foram observados em **Pe4S10** pela limitação do tipo de analisador utilizado (*ion trap*).

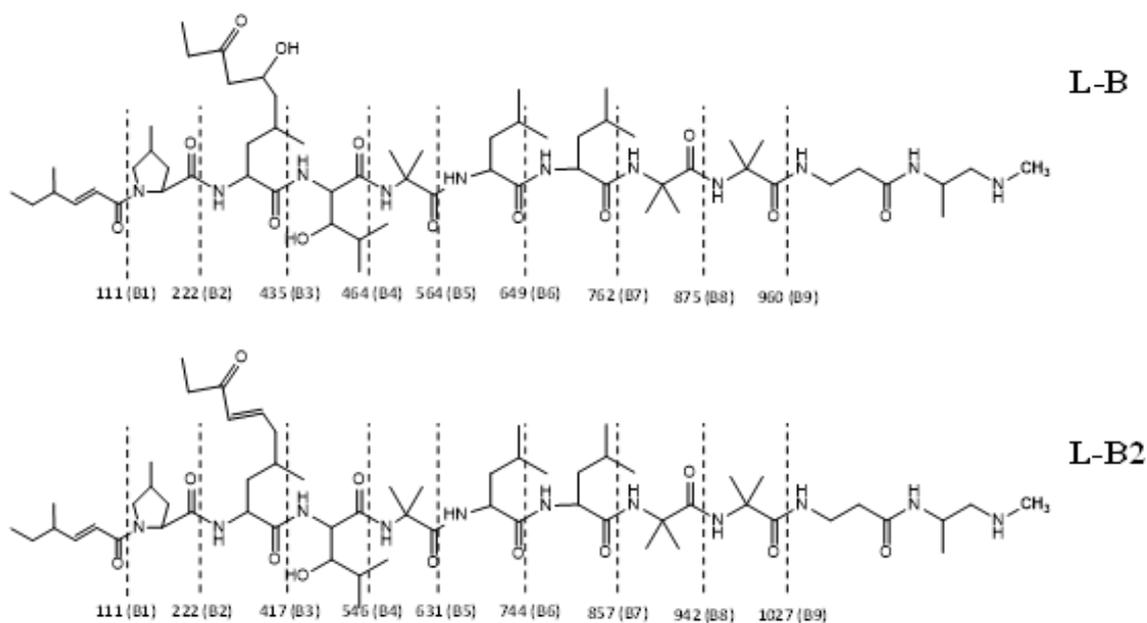


Figura 39: Estrutura e proposta de fragmentação para os íons m/z 1205 (L-B) e 1187 (L-B2)

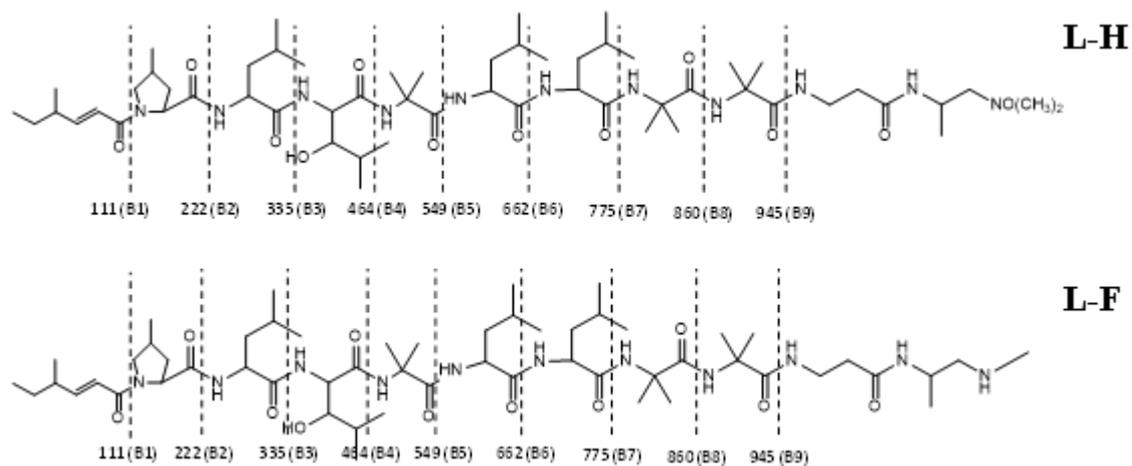


Figura 40: Estrutura e proposta de fragmentação para os íons m/z 1135 (L-H) e 1105 (L-F)

A Tabela 8 compila os dados encontrados nos espectros de fragmentação das leucino-statinas majoritárias das frações **Pe4S10** e **Pe4S11**, coerentes com os principais fragmentos observados por outros autores (ISOGAI et al., 1992; MARTINEZ e MORAES, 2015).

Tabela 8: Dados de fragmentação das leucinostatinas encontradas neste trabalho

Leucinostatina	m/z [M+H] ⁺	MS/MS
A	1218,8	1045,4 (B8), 875,5 (B7), 762,3 (B6), 649,1 (B5), 631,3 (B5'), 564,5 (B4), 546,4 (B4'), 435,3 (B3), 222,1 (B2), 194,1 (A2)
A2	1200,8	1027,5 (B9), 942,4 (B8), 857,4 (B7), 744,3(B6), 631,3 (B5), 613,3 (B5'), 528,3 (B4'), 417,3 (B3), 222,1 (B2), 194,2 (A2)
B	1204,7	960,5 (B8), 875,5 (B7), 762,4 (B6), 649,3 (B5), 631,4 (B5'), 564,3 (B4), 546,4 (B4'), 435,3 (B3)
B2	1186,8	1027,5 (B9), 942,5 (B8), 857,4 (B7), 744,3 (B6), 631,3 (B5), 613,3 (B5'), 546,3 (B4), 528,3 (B4'), 417,3 (B3)
D	1118,7	945,4 (B9), 860,4 (B8), 775,4 (B7), 662,3 (B6), 549,3 (B5), 531,3 (B5'), 446,2 (B4'), 335,1 (B3), 222,1 (B2), 194,3 (A2)
F	1104,7	945,4 (B9), 860,4 (B8), 775,4 (B7), 662,3 (B6), 549,3 (B5), 531,3 (B5'), 464,3 (B4), 446,3 (B4'), 335,1 (B3)
H	1134,7	945,4 (B9), 860,4 (B8), 775,4 (B7), 662,3 (B6), 549,3 (B5), 531,3 (B5'), 464,3 (B4), 446,3 (B4'), 335,2 (B3)

5.3. ATIVIDADE LARVICIDA

Nos ensaios de atividade larvicida de *A. albopictus* frente ao extrato bruto do meio aquoso (**Pe**) foi observado 100% de mortalidade em 24 horas. A fração **Pe3** apresentou 90% e 100% a 24 e 48 horas, respectivamente. A fração **Pe4** apresentou 40% de mortalidade nas primeiras 24 horas, ficando em 50% ao final das 72 horas de análise. A fração **Pe2** apresentou apenas 10% de atividade nas 72 horas de ensaio (Figura 41). Em relação aos dados observados, o extrato bruto do meio líquido (**Pe**) foi o mais tóxico para as larvas de *A. albopictus*. A fração **Pe3** apresentou a maior mortalidade diante as outras frações testadas. A

atividade larvicida da fração **Pe1** não foi avaliada por ter sido fracionada antes dos ensaios serem executados.

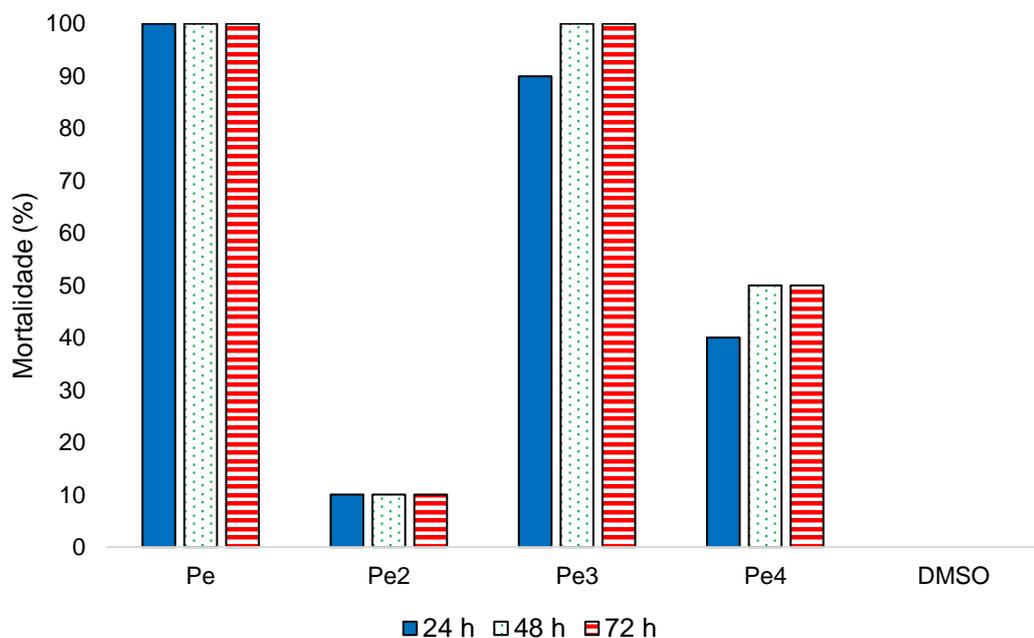


Figura 41: Atividade larvicida do extrato bruto **Pe** e subfrações **Pe2**, **Pe3** e **Pe4** contra larvas em terceiro estágio de *A. albopictus*

Em relação ao efeito das amostras que causaram mortalidade das larvas, foi observado que após administração dos extratos as larvas sofrem alterações na sua morfologia interna (Figura 42). Ainda são necessários mais estudos para avaliar os mecanismos da patogenicidade dos extratos sobre as larvas.

Nos ensaios de mortalidade das larvas de *A. albopictus* pelas frações subsequentes dos extratos foi observado que as frações **Pe3D** e **Pe4R** apresentaram 100% de toxicidade em 24 horas. As frações **Pe3C** e **Pe4S** apresentaram 80% e 55% de mortalidade nas primeiras 24 horas, 90% e 65% nas próximas 48 horas e 90 e 75% nas 72 horas finais do ensaio, respectivamente (Figura 43).

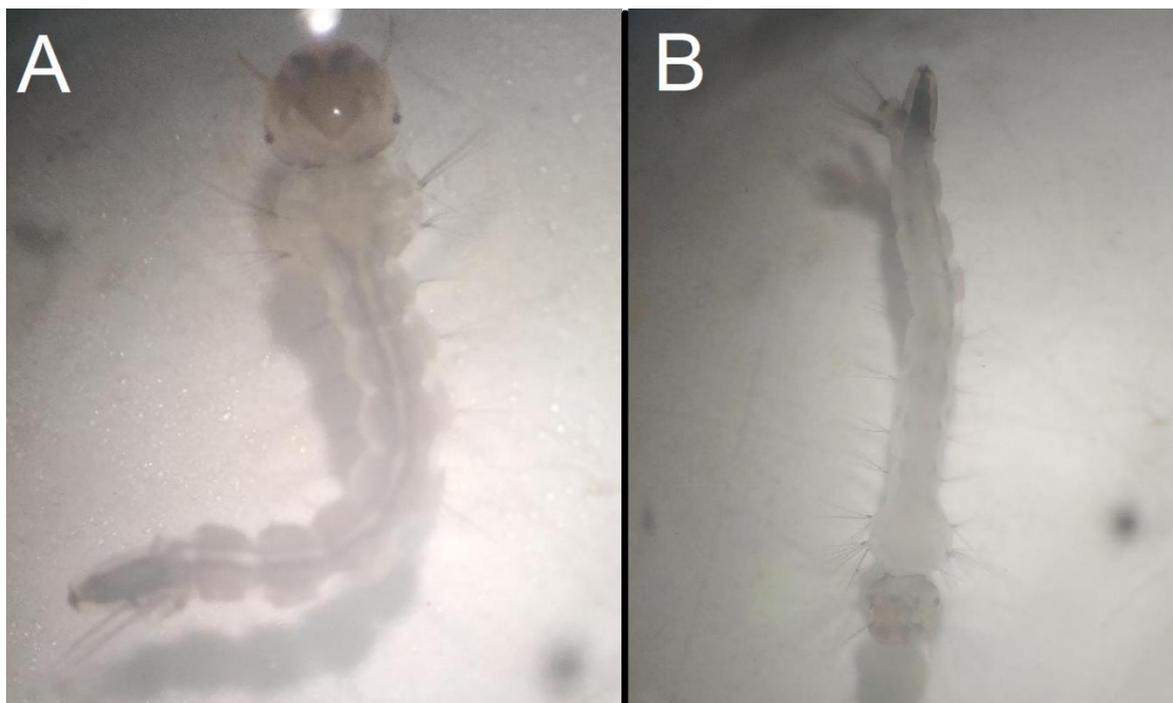


Figura 42: Aparência das larvas de *A. albopictus*: (A) larva controle e (B) após administração dos extratos larvicidas

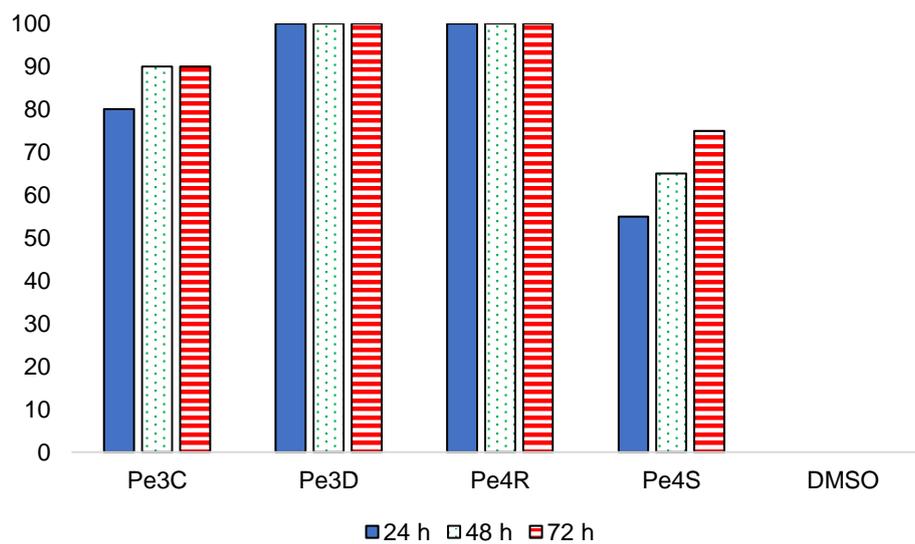


Figura 43: Atividade larvicida observada nas frações bioativas

Após novos fracionamentos, neste estudo bioguiado, a mortalidade das larvas de *A. albopictus* pelas sub-frações analisadas **Pe4R1**, **Pe4R2**, **Pe4S10** e **Pe4S11** foi de 100% das larvas em 24 horas (Figura 44).

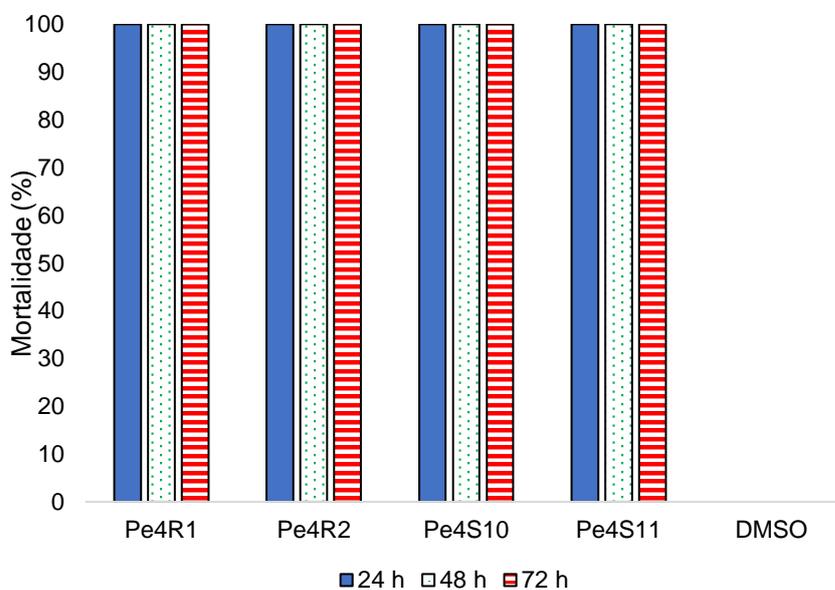


Figura 44: Atividade larvicida das frações onde foram identificadas leucinostatinas

Alguns estudos apontam a eficácia entomopatogênica de extratos provenientes de linhagens de *P. lilacinum*. Al-Mekhlafi (2017) constatou a atividade larvicida presente no extrato metanólico contra larvas de quarto estágio de *Aedes caspius* e *Culex pipiens*, com 100% de mortalidade nas primeiras 24 horas e uma dose letal mediana (LD_{50}) de 190,66 e 254,25 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Luz et al. (2007) observaram atividade ovicida significativa ao inocular em ovos de *A. aegypti* esporos de *P. lilacinum*, levando a morte das larvas antes da eclosão dos ovos.

Conforme discutido na seção 5.2, as frações **Pe4S10**, **Pe4S11**, **Pe4R1**, **Pe4R2** apresentam leucinostatinas em sua composição como produtos majoritários. Devido as frações relatadas serem ricas nestes peptabólitos, pode-se sugerir que a ação larvicida seja ocasionada por um conjunto destas moléculas ou por alguma delas em específico. É importante ressaltar que a ação bioativa

das leucinostatinas já foi identificada contra bactérias, fungos e plantas. Contudo, este seria o primeiro relato da atividade biológica de misturas compostas por leucinostatinas com efetividade para as larvas de *A. albopictus*.

5.4. ANÁLISE DOS ENSAIOS DE CITOTOXIDADE

A Tabela 9 e a Figura 45 contém as viabilidades de frações nos ensaios de citotoxicidade realizados frente a linhagens de fibroblastos MRC5. Foram ensaiadas sub-frações das famílias **Pe1**, **Pe2** e **Pe3**, de modo a verificar se haveria variação na toxicidade entre as mesmas. **Pe4** ainda não havia sido fracionada quando estes ensaios foram realizados, portanto não se tem dados relacionados a subfrações desta amostra.

Conforme observa-se na Tabela 9, todas as frações testadas apresentaram algum grau de citotoxicidade para as linhagens MRC5, de acordo com a classificação de citotoxicidade descrita na Tabela 3. É interessante observar, contudo, a diminuição da porcentagem da viabilidade celular nas frações **Pe1**, **Pe2** e **Pe3**, sucessivamente. Ou seja, quanto mais próximo da fração metanólica **Pe4**, maior o grau de citotoxicidade encontrado nestas frações. As próprias frações **Pe3A** e **Pe3D** já apresentam valores severamente citotóxicos em baixas concentrações.

Note-se que a atividade larvicida aumentar progressivamente da mesma forma que a citotoxicidade nas frações acima, sendo menor na fração **Pe2** e maior na fração **Pe3**. Conforme analisado na seção 5.2, foram identificadas leucinostatinas nas subfrações **Pe3** e **Pe4**, sugerindo que estas moléculas são as responsáveis por ambas as atividades ensaiadas, larvicida e citotóxica. Esta conclusão é reforçada pelo trabalho de Ishiyama et al. (2009) que realizaram ensaios de citotoxicidade *in vitro* com as leucinostatinas A e B frente a linhagens MRC-5 e verificaram uma concentração inibitória média (IC₅₀) de 2550 e 3110 ng/mL, respectivamente, enquanto o controle positivo Suramin apresentou um valor maior que 100.000 ng/mL.

Tabela 9: Viabilidades para as frações testadas para linhagens de fibroblasto MRC5

Frações	Concentrações ($\mu\text{g/mL}$)							
	50		25		12,5		6,25	
	Média(%)	σ (%)	Média(%)	σ (%)	Média(%)	σ (%)	Média(%)	σ (%)
Pe1A	20,95	0	65,14	0,15	67,85	0	75,90	0,14
Pe2A	26,88	0,71	61,37	0,61	67,32	0,16	74,70	0,18
Pe3A	13,32	0,075	18,27	0,44	21,40	0,11	30,51	0,048
Pe3D	13,19	0,32	15,72	0,042	16,53	0,25	19,07	0,11
Controle negativo	99,88	0,0042	99,96	0,0054	99,71	0,67	100	0,66

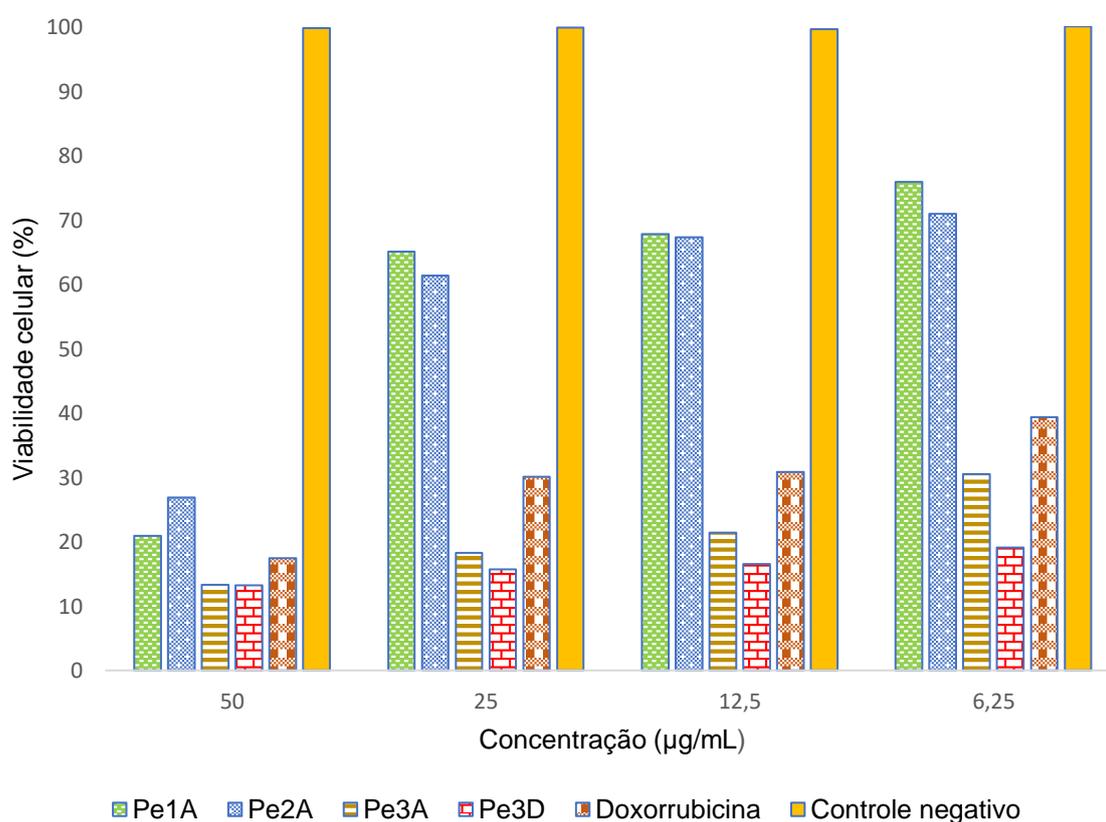


Figura 45: Viabilidade celular das frações testadas contra linhagens de fibroblastos MRC5

5.5. ANÁLISE DOS ENSAIOS ANTIPLASMÓDICOS

A Tabela 10 apresenta os valores de IC_{50} das frações testadas contra as linhagens de *Pl. falciparum*, onde pode ser constatado que todas as amostras avaliadas apresentaram resultados efetivos contra o agente causal da malária. As frações com os melhores resultados, contudo, foram as frações **Pe2B** e **Pe1B**, com IC_{50} de 8,385 e 7,456 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Estes dados se mostram significativos quando comparados com a concentração inibitória média da droga comercialmente utilizada para o tratamento de malária, a quinina, cujo valor encontrado nestes testes foi de 7,879 $\mu\text{g/mL}$.

Tabela 10: Valores IC_{50} e classificação de atividade antiplasmódica

Amostra	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	CLASSIFICAÇÃO DE ATIVIDADE	Amostra	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	CLASSIFICAÇÃO DE ATIVIDADE
QUININO	7,879	CONROLE ATIVO	Pe1A	28,08	Efetivo
Pe	22,02	Efetivo	Pe3B	29,5	Efetivo
Pe2C	22,03	Efetivo	Pe2D	22,75	Efetivo
Pe2B	8,385	Efetivo	Pe3D	~ 30,78	Efetivo
Pe3A	17,54	Efetivo	Pe2A	22,19	Efetivo
Pe1B	~ 7,456	Efetivo			

Ao analisar as frações **Pe2B** e **Pe1B** por espectrometria de massas, observou-se sinais característicos aos encontrados nas frações **Pe4S11** e **Pe4S10**, indicando a presença majoritária de leucinostatinas também nestas amostras (Figuras 53 e 54). Estes dados sugerem que estes peptabólitos podem exercer papel no efeito antiplasmódico observado. De fato, Otoguro et al. (2003) verificaram que a leucinostatina A apresentou atividade expressiva contra linhagens de *Pl. falciparum* FCR3, sendo mais potente que as drogas comerciais artemisinina, cloroquina, ambas com IC_{50} de 0,4 a 0,9 nM. Brand et al. (2021) corrobora com estes resultados, haja vista que os experimentos *in vitro* empregando a leucinostatina A contra o mesmo protozoário revelou uma IC_{50} de 0,61 nM.

6 CONCLUSÃO

O estudo bioguiado do extrato do meio cultivado pela linhagem do fungo *Purpleocillium lilacinum* estudada no presente trabalho revelou uma inédita atividade larvicida a *A. albopictus*.

Várias frações apresentaram resultados significativos nos ensaios biológicos, sendo observado que algumas das frações que apresentaram 100% de mortalidade nos ensaios larvicidas frente ao mosquito *A. albopictus*, também apresentaram citotoxicidade elevada (viabilidade abaixo de 30% na concentração de 12,5 µg/mL para células MRC5).

Além disso, com base nos espectros das fragmentações obtidos através do espectrômetro de massas, foi possível identificar sete leucinostaninas nas principais frações bioativas, indicando que estas moléculas possivelmente são as responsáveis pela bioatividade observada. Contudo, como as frações estão compostas de uma mistura destes peptabólitos, não é possível afirmar qual (ou quais) deles exatamente é o responsável pela ação larvicida observada.

Foi constatada também atividade antiplasmódica elevada em frações ricas de leucinostatinas, onde observou-se concentrações inibitórias semelhantes àquelas observadas a droga comercialmente utilizada quinina.

A leucinostatina A e o ácido 9(S),12(S),13(S)-trihidroxi-10(Z)-octadecenóico foram identificados a partir de espectros de RMN uni e bidimensionais, em associação com os respectivos dados de fragmentação gerados por espectrometria de massas, sendo a primeira vez que este ácido graxo foi descrito para a espécie estudada.

Levando em consideração o incrível potencial observado nos metabólitos secundários produzidos por este organismo, novos estudos podem ser empregados de modo a se identificar a leucinostatina responsável pela ação larvicida observada, bem como determinar a concentração mínima letal em ensaios larvicidas direcionados.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-WARETH, M. T. A. et al. Snailicidal, antimicrobial, antioxidant and anticancer activities of *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces lilacinus* fungal extracts. **Egyptian Journal of Aquatic Biology & Fisheries**, 23, 2019. 195-212.

AL-MEKHLAFI, F. A. Larvicidal activity of some fungal extracts on *Aedes caspius* and *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). **Entomological Research**, 2017.

ARAI, T. et al. A new antibiotic, Leucinostatin, derived from *Penicillium lilacinum*. **The journal of antibiotics**, v. 26, p. 157-161, 1972.

AYERS, S. et al. Cytotoxic xanthone–anthraquinone heterodimers from an unidentified fungus of the order Hypocreales (MSX 17022). **The Journal of antibiotics**, 65, 2012. 3-8.

BACON, C. W.; WHITE, J. F. **Microbial Endophytes**. Nova Iorque: Marcel Dekker, 2000.

BHATT, S. et al. The global distribution and burden of dengue. **Nature**, 2013.

BLACKWELL, M. The fungi: 1, 2, 3. 5,1 million species? **American Journal of Botany**, v. 98, 2011.

BRAND, M. et al. Antiprotozoal Structure–Activity Relationships of Synthetic Leucinostatin Derivatives and Elucidation of their Mode of Action. **Angewandte Chemie International Edition**, 60, 2021. 15613-15621.

CATTARINO, L. et al. Mapping global variation in dengue transmission intensity. **SCIENCE TRANSLATIONAL MEDICINE**, 2020. 1-10.

CERRINI, S. et al. The Crystal and Molecular Structure of the α -Helical Nonapeptide Antibiotic Leucinostatin A. **Biopolymers**, v. 28, p. 409-420, 1989.

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

CHEN, W. et al. Asperpentenone A, A novel polyketide isolated from the deep-sea derived fungus *Aspergillus* sp. SCSIO 41024. **Phytochemistry Letters**, 2020. 99-102.

CHITEMERERE, T. A.; MUKANGANYAMA, S. Evaluation of cell membrane integrity as a potential antimicrobial target for plant products. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, 2014.

CHOI, H. G. et al. Inhibition of Prostaglandin D2 Production by Trihydroxy Fatty Acids Isolated from *Ulmus davidiana* var. *japonica*. **PHYTOTHERAPY RESEARCH**, 2012.

CHOUIN-CARNEIRO, T. et al. Zika virus transmission by Brazilian *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* is virus dose and temperature-dependent. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, 2020.

COHEN, J. P.; STURGEON, G.; COHEN, A. Measuring Progress in Neglected Disease Drug Development. **Clinical Therapeutics**, v. 36, p. 1037-1042, 2014.

CUNHA, B. R. D.; FONSECA, L. P.; CALADO, C. R. C. Antibiotic Discovery: Where Have We Come from, Where Do We Go? **Antibiotics**, v. 8, 2019.

DEGENKOLB, T.; BRUCKNER, H. Peptaibiotics: Towards a Myriad of Bioactive Peptides Containing Ca-Dialkylamino Acids? **CHEMISTRY & BIODIVERSITY**, v. 5, p. 1817-1843, 2008.

DEVIA, R. et al. Fungal secondary metabolites and their biotechnological applications for human health. **New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering.**, p. 147-161, 2020.

ELBANDY, M. et al. α -Pyrones and Yellow Pigments from the Sponge-Derived Fungus *Paecilomyces lilacinus*. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, 2009. 188-192.

FUKUSHIMA, K. et al. Studies on peptide antibiotics, Leucinostatins. Separation, physical chemical properties and biological activities of Leucinostatins A and B. **The Journal of Antibiotics**, v. XXXVI, p. 1606-1612, 1983.

FULGORUM, I. Indexfungorum.org, 2022. Disponível em: <Indexfungorum.org>. Acesso em: 8 Agosto 2022.

GARCIA, L. P. Epidemia do vírus Zika e microcefalia no Brasil: emergência, evolução e enfrentamento. **IPEA**, 2018.

GERIS, R. et al. Larvicidal Effects of Fungal Meroterpenoids in the Control of *Aedes aegypti*L., the Main Vector of Dengue and Yellow Fever. **CHEMISTRY & BIODIVERSITY**, v. 5, p. 341-345, 2008.

GIRI, B. et al. Effect of *Rhizoglyphus fasciculatum* and *Paecilomyces lilacinus* in the biocontrol of root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* in *Capsicum annuum* L. **COMMUNICATIVE & INTEGRATIVE BIOLOGY**, 2022. 75-87.

GOUDA, S. et al. Endophytes: A treasure house of bioactive compounds of medicinal importance. **Frontiers in Microbiology**, 2016.

GUBLER, D. J. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. **Clinical Microbiology Reviews**, p. 480–496, 1998.

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, p. 509–526, 2006.

HAWKSWORTH, D. L.; LÜCKING, R. Fungal Diversity Revisited: 2.2 to 3.8 Million Species. **Microbiology Spectrum** , 2017.

HOFFMANN, E. D.; STROOBANT, V. **Mass Spectrometry**. 3. ed. [S.l.]: John Wiley & Sons, 2007.

ISAKA, M. et al. Acremoxanones A and B, novel antibiotic polyketides from the fungus *Acremonium* sp. BCC 31806. **Tetrahedron Letters**, 50, 2009. 284-287.

ISHIYAMA, A. et al. In vitro and in vivo antitrypanosomal activities of three peptide antibiotics: leucinostatin A and B, alamethicin I and tsushimycin. **The Journal of Antibiotics**, v. 62, p. 303–308, 2009.

ISOGAI, A. et al. Structural Elucidation of Minor Components of Peptidyl Antibiotic P168s (Leucinostatins) by Tandem Mass Spectrometry. **Bioscience. Biotechnology. Biochemistry**, 1992. 1079-1085.

JÚNIOR, C. V.; BOLZANI, V. D. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química nova**, v. 29, p. 326-337, 2006.

KAWADA, M. et al. Leucinostatin A inhibits prostate cancer growth through reduction of insulin-like growth factor-I expression in prostate stromal cells. **International Journal of Cancer**, v. 126, p. 810–818, 2010.

KHARWAR, R. N. et al. Anticancer compounds derived from fungal endophytes: their importance and future challenges. **Natural Product Reports**, 2011. 1208-1228.

KUMAR, S.; KAUSHIK, N. Metabolites of endophytic fungi as novel source of biofungicide: a review. **Phytochemistry Reviews**, 2013.

LAI, D. et al. Bioactive polyketides and alkaloids from *Penicillium citrinum*, a fungal endophyte isolated from *Ocimum tenuiflorum*. **Fitoterapia**, v. 91, p. 100-106, 2013.

LAUPACIS, A. et al. Cyclosporin A: a powerful immunosuppressant. **Therapeutic Review**, v. 126, p. 1041-1046, 1982.

LENTA, B. N. et al. Purpureone, an antileishmanial ergochrome from the endophytic fungus *Purpureocillium lilacinum*. **Zeitschrift für Naturforschung A**, 71, 2016. 1159-1167.

LIEW, C.; CURTIS, C. F. Horizontal and vertical dispersal of dengue vector mosquitoes, *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*, in Singapore. **Medical and Veterinary Entomology**, p. 351-360, 2004.

LIU, C.-C. et al. Secondary metabolites from Antarctic marine-derived fungus *Penicillium crustosum* HDN153086. **Natural Product Research**, p. 6, 2018.

LÖNROTH, E. C.; DAHL, S. E. Citotoxicity of liquidas and powers of chemically different dental materials evaluated using dimethylthiazoldiphenyl tetrazolium and neutral red tests. **Acta Scandinavica**, v. 52-6, p. 52-56, 2003.

LUZ, C. et al. Ovicidal Activity of Entomopathogenic Hyphomycetes on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Under Laboratory Conditions. **VECTOR CONTROL, PEST MANAGEMENT, RESISTANCE, REPELLENTS**, 44, 2007. 798-804.

LUZ, K. G.; SANTOS, G. I. V. D.; VIEIRA, R. D. M. Febre pelo vírus Zika. **Epidemiologia e Serviços de Saúde** , p. 785-788, 2015.

MADARIAGA-MAZON, A. et al. Absolute Configuration of Acremoxanthone C, a Potent Calmodulin Inhibitor from *Purpureocillium lilacinum*. **Journal of Natural Products**, 76, 2013. 1454-1460.

MANE, R. S.; PAARAKH, P. M.; VEDAMURTHY, A. B. Brief Review on Fungal Endophytes. **International Journal of Secondary Metabolite**, v. 5, n. 4, p. 288-303, 2018.

MARTÉZ, J. L. et al. Control bioogico de *Meloidogyne incognita* en tomate en Puerto Rico. **Nematropica**, 1996. 143-152.

MARTÍNEZ-LUIS, S. et al. Screening and evaluation of antiparasitic and in vitro anticancer activities of Panamanian endophytic fungi. **International Microbiology**, v. 14, p. 95-102, 2011.

MIKAMI, Y. et al. Paecilotoxin production in clinical or terrestrial isolates of *Paecilomyces lilacinus* strains. **Mycopathologia**, 108, 1989. 195-199.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletim Epidemiológico, 2016.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Descrição do processo de monitoramento dos testes de diagnóstico rápido de malária, Brasil, 2014 a 2016. **Boletim Epidemiológico**, v. 50, p. 9, 2019.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletim epidemiológico, v. 52, 2021.

MUSSI-DIAS, V. et al. Endophytic fungi associated with medicinal plants. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, 2012.

NADEEM, M. et al. UHPLC-QTOF-MS/MS metabolites profiling and antioxidant/antidiabetic attributes of *Cuscuta reflexa* grown on *Casearia tomentosa*: exploring phytochemicals role via molecular docking. **INTERNATIONAL JOURNAL OF FOOD PROPERTIES**, 23, 2020. 918–940.

NAGAI, T. et al. Anti-allergic activity of a Kampo (Japanese herbal) medicine “Sho-seiryu-to (Xiao-Qing-Long-Tang)” on airway inflammation in a mouse model. **International Immunopharmacology**, 4, 2004. 1353–1365.

NASIRUDDIN et al. Endophytes of Terrestrial Plants: A Potential Source of Bioactive Secondary Metabolites. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 8, n. 7, p. 362-377, 2020.

NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 11. ed. [S.I.]: Atheneu, 2016.

OTOGURO, K. et al. In Vitro Antimalarial Activities of the Microbial Metabolites. **The Journal of Antibiotics**, 56, 2003. 322-324.

PATOCKA, J. et al. Cyclosporine A: Chemistry and Toxicity – A Review. **Current Medicinal Chemistry**, 2020. 1-10.

PANIKER, C. J.; GHOSH, S. **Paniker's textbook of medical parasitology**. 8. ed. [S.I.]: Jaypee Brothers Medical Publishers, 2018.

PARK, J.-O. et al. Production of leucinostatins and nematicidal activity of Australian isolates of *Paecilomyces lilacinus*(Thom) Samson. **Letters in Applied Microbiology**, v. 38, p. 271–276, 2004.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and Food Spoilage**. 3^a. ed. [S.I.]: Springer, 2009.

PRASAD, P.; VARSHNEY, D.; ADHOLEYA, A. Whole genome annotation and comparative genomic analyses of bio-control fungus *Purpureocillium lilacinum*. **Biomed Central**, 2015.

REY, L. **Parasitologia**. 4^a. ed. [S.I.]: Guanabara Koogan, 2007.

REZZA, G. *Aedes albopictus* and the reemergence of Dengue. **BMC Public Health**, 2012.

RODRIGUES, J. P. A. **Estudo comparativo entre antibióticos de origem naturale semissintética da família das penicilinas em bactérias Gram positivo**. Bragança: Dissertação (Mestrado em Farmácia e Química de Produtos Naturais) - Instituto Politécnico de Bragança, Universidade de Salamanca, 2013.

ROSSI, C.; TUTTOBELLO, L.; RICCI, M. Leucinostatin D, a novel peptide antibiotic from *Paelomyces marquandi*. **The Journal of Antibiotics**, v. XL, p. 130-133, 1987.

SANTIAGO, D. C. et al. Seleção de isolados de *Paecilomyces lilacinus* (Thom.) Samson para controle de *Meloidogyne paranaensis* em tomateiro. **Ciência Rural**, 2006. 1055-1064.

SHAHRIZAILA, N.; LEHMANN, H. C.; KUWABARA, S. Guillain-Barré Syndrome. **The Lancet**, v. 397. 2021.1214-1228.

SIDDIQUI, Z. A.; MAHMOOD, I. BIOLOGICAL CONTROL OF PLANT PARASITIC NEMATODES BY FUNGI: A REVIEW. **Bioresource Technology**, 1996. 229-239.

SILVERSTEIN, R. M. et al. **Spectrometric identification of organic compounds**. [S.l.]: Wiley, 2015.

SINGH, B. P. **Advances in Endophytic Fungal Research**. [S.l.]: Springer , 2019.

SINKA, M. E. et al. A global map of dominant malaria vectors. **Parasites & Vectors**, v. 5, p. 11, 2012.

SINKA, M. E. et al. A global map of dominant malaria vectors. **Parasites & Vectors**, v. 5, p. 11, 2012.

SLETTEN, G. B.; DAHL, J. E. Cytotoxicity effects of extracts of compomers. **Acta Odontologica Scandinavica**, v. 57, p. 316-322, 1999.

SONG, L. et al. Synthesis, Antimicrobial, Moisture Absorption and Retention Activities of Kojic Acid-Grafted Konjac Glucomannan Oligosaccharides. **Polymers**, 11, 2019.

STIERLE, A. A.; Stierle, d. bioactive compounds from four endophytic penicilliumsf. of a northwest pacific yew tree. **Natural Products Chemistry**, v. 24, p. 933-977, 2000.

STROBEL, G. et al. Natural Products from Endophytic Microorganisms. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 257-268, 2004.

SURYANARAYANAN, T. S. Endophyte research: going beyond isolation and metabolite documentation. **Fungal Ecology**, v. 6, p. 561-568, 2013.

TAKAHASHI, J. A. et al. Fungos Filamentosos e Química: Velhos Conhecidos, Novos Aliados. **Revista Virtual de Química**, v. 9, 2017.

TELES, A. P. C.; TAKAHASHI, J. A. Paecilomide, a new acetylcholinesterase inhibitor from *Paecilomyces lilacinus*. **Microbiological Research**, 2013. 204-210.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiology**: an introduction. 13. ed. [S.I.]: Pearson, 2019.

TRAGER, W.; JENSEN, J. Human Malaria Parasites in Continuous Culture. **Science**, p. 673-675, 1976.

UZMA, F. et al. Endophytic Fungi: Promising Source of Novel Bioactive Compounds. **Springer**, 2019. 243-265.

VALENCIA, E. Y.; CHAMBERGO, F. S. Mini-review: Brazilian fungi diversity for biomass degradation. **Fungal Genetics and Biology**, v. 60, p. 9-18, 2013.

VALLE, D.; PIMENTA, D. N.; AGUIAR, R. Zika, dengue e chikungunya: desafios e questões. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, p. 419-422, 2016.

VESPER, S. J. et al. Comparison of populations of mould species in homes in the UK and USA using mould-specific quantitative PCR. **Letters in Applied Microbiology**, v. 41, p. 367-373, 2005.

VU, D. M.; JUNGKIND, D.; LABEAUD, A. D. Chikungunya Virus. **Clinics in Laboratory Medicine**, p. 371-382, 2017.

WHITE, N. J. et al. Malaria. **Lancet**, v. 13, p. 723-735, 2014.

WICKLOW, D. T. et al. Antifungal Metabolites (Monorden, Monocillin IV, and Cerebrosides) from *Humicola fuscoatra* Traaen NRRL 22980, a Mycoparasite of *Aspergillus flavus* Sclerotia. **Environmental Microbiology**, 1998. 4482-4484.

WIELANEK, A. C. et al. Guillain-Barré syndrome complicating a chikungunya virus infection. **Neurology**, p. 2105-2108, 2007.

WOJTANOWSKI, K. K.; MROCZEK, T. Study of a complex secondary metabolites with potent anti-radical activity by two dimensional TLC/HPLC coupled to electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry and bioautography. **Analytica Chimica Acta**, xxx, 2018. 1-12.

WORLD MALARIA REPORT, W. World Health Organization, 2020. Disponível em: <<https://www.who.int/publications-detail/world-malaria-report-2019>>. Acesso em: 20 Janeiro 2021.

YADAV, A. S.; PRABHUDESAI, A. P.; UMEKAR, D. M. J. Ayurveda: The Alternative Treatment For Dengue. **World Journal of Pharmaceutical Research**, 2020. 427-440.

YANG, G. et al. Flavusides A and B, Antibacterial Cerebrosides from the Marine-Derived Fungus *Aspergillus flavus*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, 2011. 1174-1177.

YUADAV, P.; SINGH, R. A REVIEW ON ANTHELMINTIC DRUGS AND THEIR FUTURE SCOPE. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, p. 17-21, 2011.

YUAN, H. et al. The Traditional Medicine and Modern Medicine from Natural Products. **Molecules**, v. 21, 2016.

ZARA, A. L. D. S. A. et al. Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, p. 391-404, 2016.

ZHANG, Y.-G. et al. Isolation and Identification of the nematicidal secondary metabolites from a strain of entomogenous fungi. **Chinese Journal of pesticide science**, 2010. 225-228.

ANEXOS

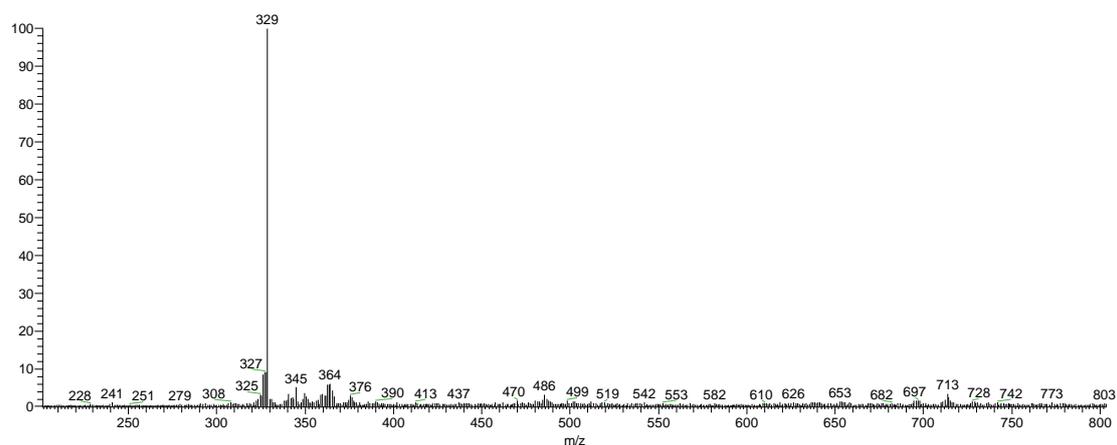


Figura 46: Espectro de massas da fração Pe3C4, modo negativo

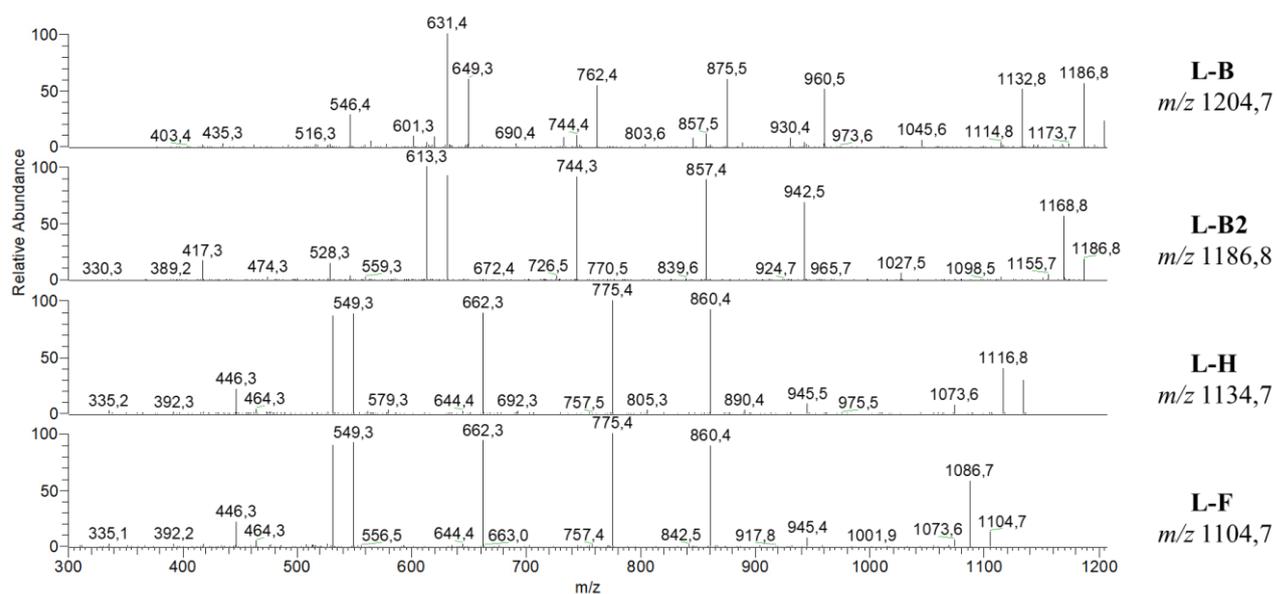


Figura 47: Espectro de MS2 da fração Pe4S10

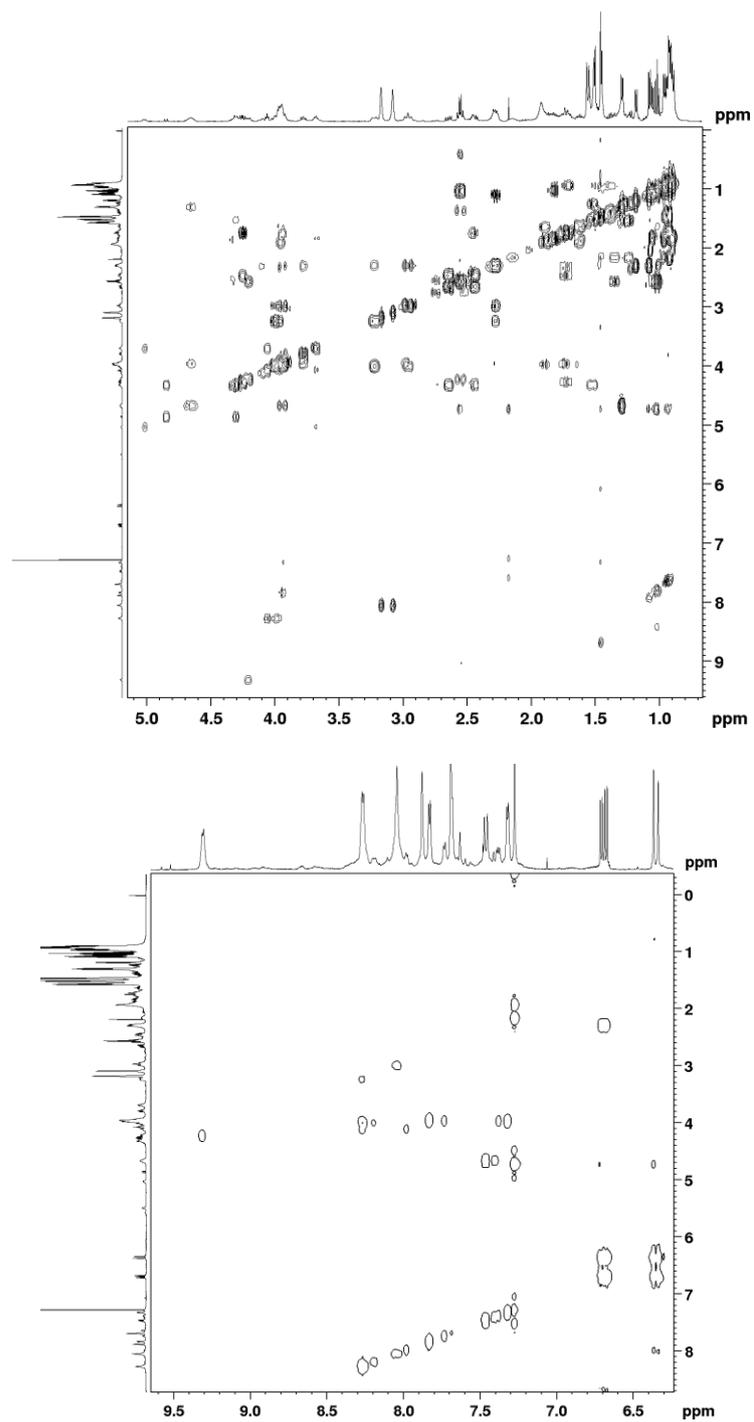


Figura 48: Mapa de correlação ¹H-¹H no espectro de COSY da fração Pe4S11 em CDCl₃

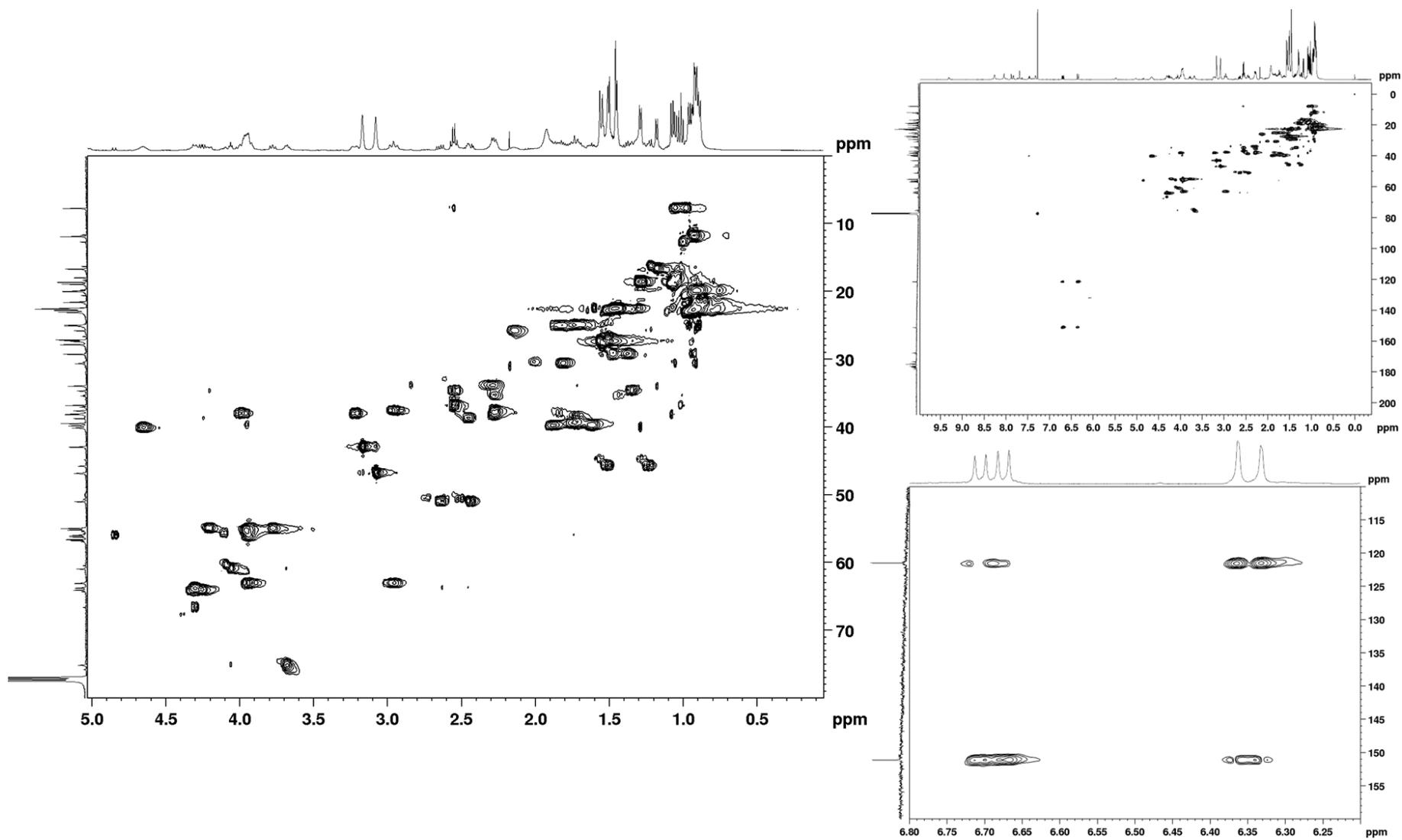


Figura 49: Espectro de HSCQ para a fração Pe4S11

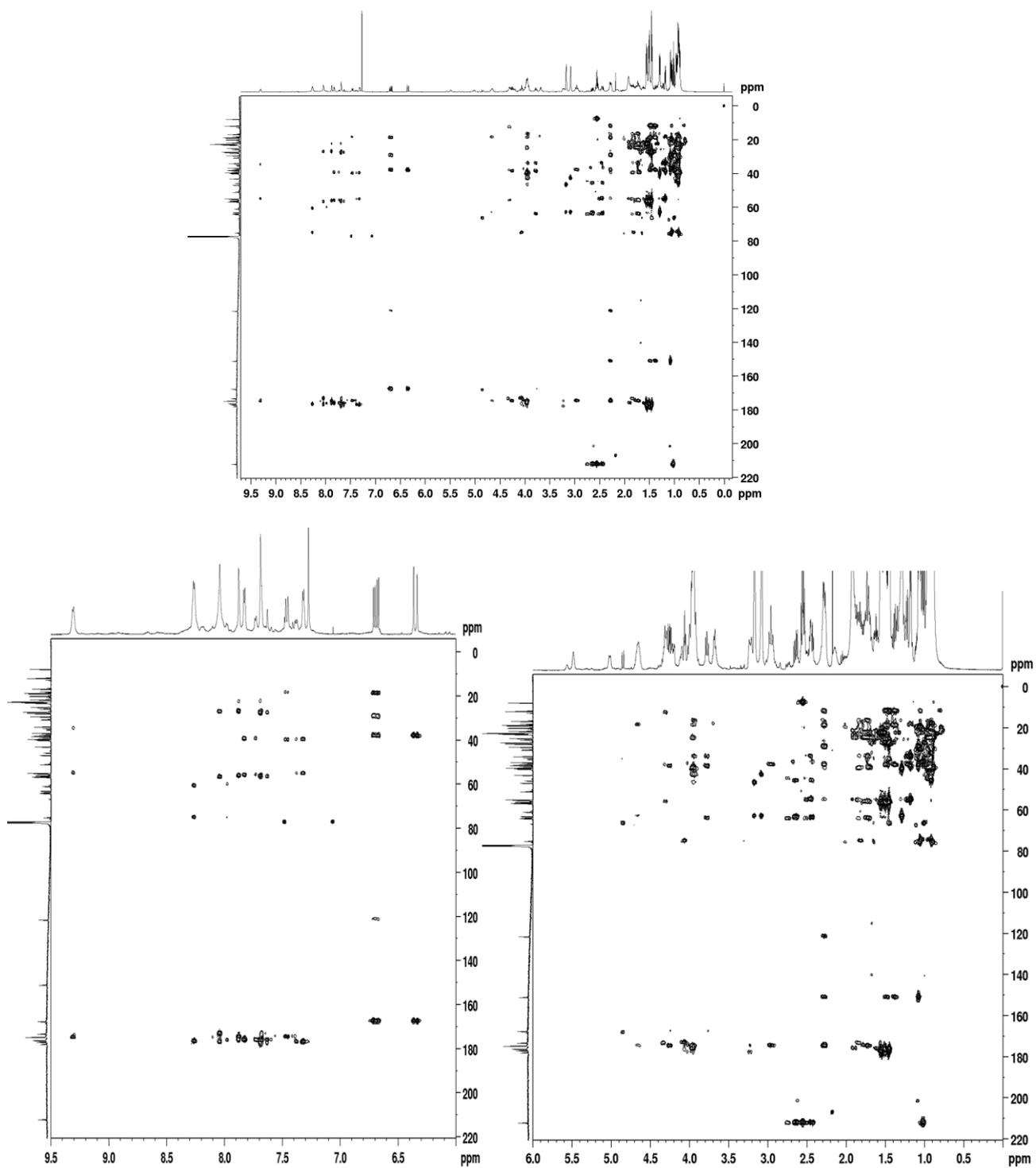


Figura 50: Mapa de correlação de HMBC da fração Pe4S11 em CDCl₃

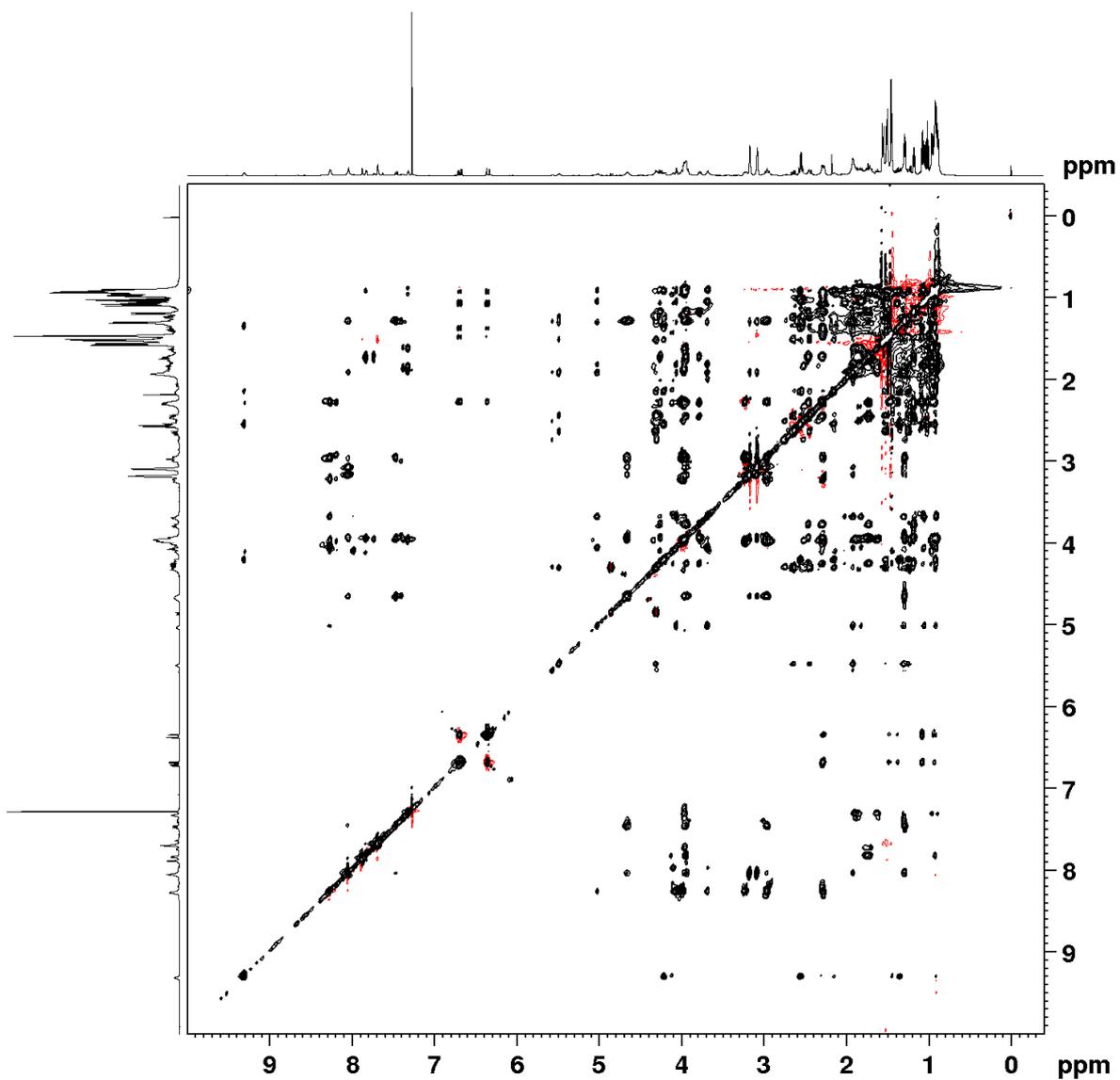


Figura 51: Mapa de correlação TOCSY em CDCl_3 para a fração Pe4S11

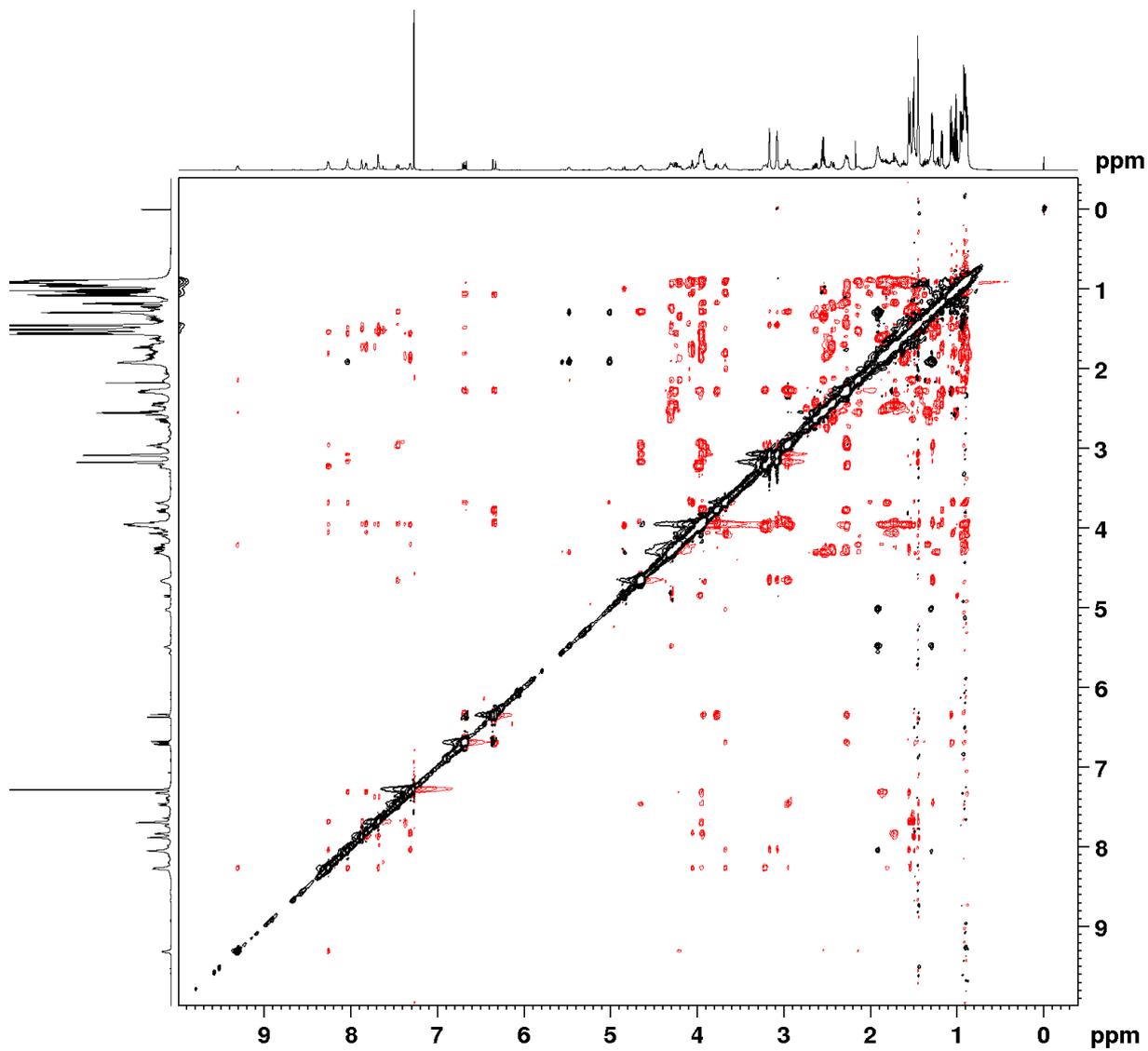
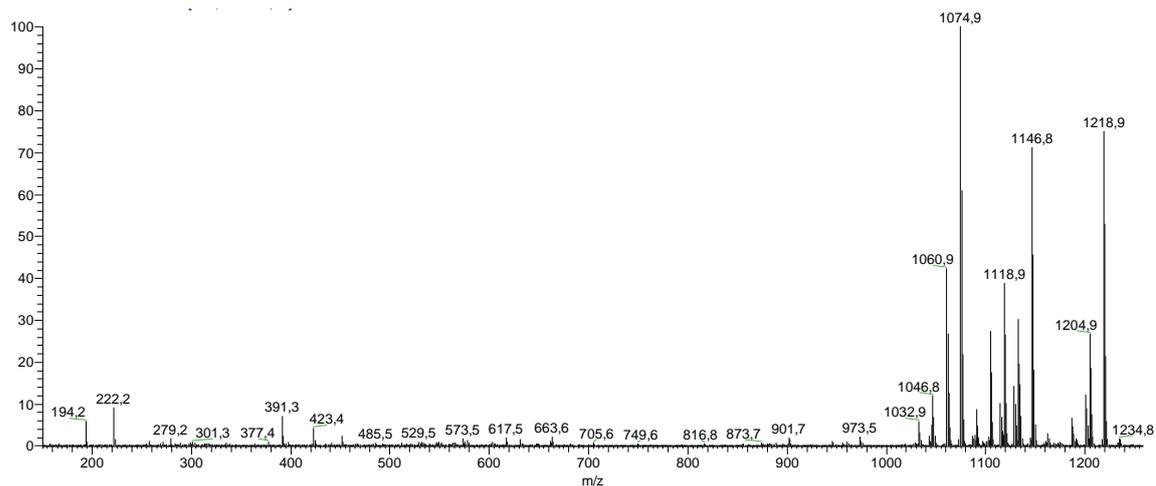
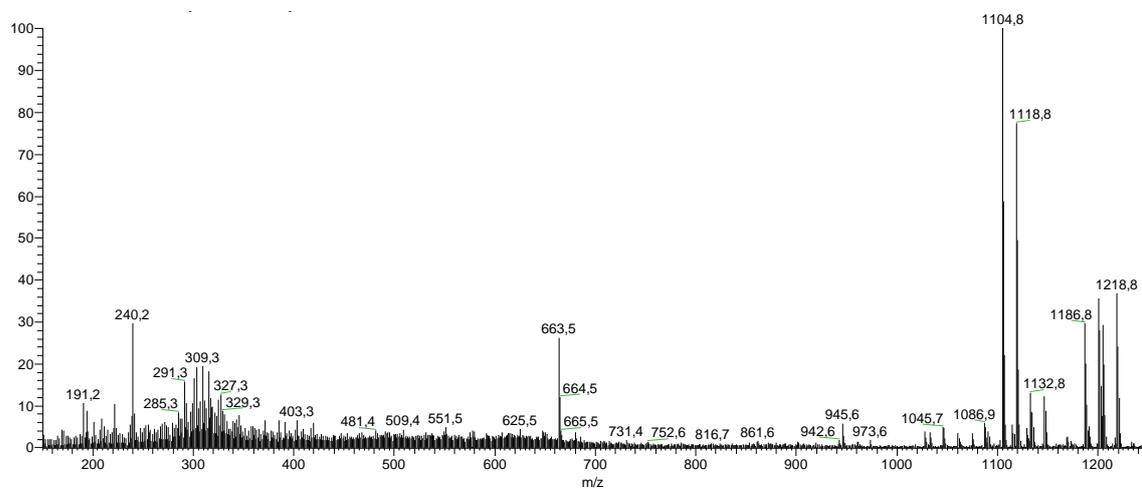


Figura 52: Mapa de correlação ROESY para a fração Pe4S11

Figura 53: Espectro de massas *full scan* da fração Pe1BFigura 54: Espectro de massas *full scan* da fração Pe2B