UNIVERSIDADE ESTADUAL DO PIAUÍ

CENTRO DE CIÊNCIAS DA NATUREZA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ESTUDO DA PROSPECÇÃO METABÓLICA DO FUNGO BIOLUMINESCENTE *Neonothopanus gardneri*.

NEYCIANO SOUSA MACHADO

ORIENTADOR: PROF. DR. JOAQUIM SOARES DA COSTA JÚNIOR

Teresina – PI
2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO PIAUÍ

CENTRO DE CIÊNCIAS DA NATUREZA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ESTUDO DA PROSPECÇÃO METABÓLICA DO FUNGO BIOLUMINESCENTE *Neonothopanus gardneri*.

NEYCIANO SOUSA MACHADO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Piauí, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Química – Área de concentração: Prospecção Fitoquímica.
Orientador: Prof. Dr. Joaquim Soares da Costa Júnior.

Teresina – PI

2018

"ESTUDO DA PROSPECÇÃO METABÓLICA DO FUNGO BIOLUMINESCENTE *Neonothopanus gardneri*".

NEYCIANO SOUSA MACHADO

Dissertação/Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Piauí, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Química – Área de concentração: Química

Aprovado em 06 de abril de 2018.

Membros da Banca:

Prof. Dr. Joaquim Soares da Costa Júnior
(Presidente da Banca – IFPI/UESPI)

Profa. Dra. Chistiane Mendes Feitosa
(Membra Titular – UFPI)

Profa. Dra. Teresinha de J. A. dos Santos Andrade
(Membra Titular – IFMA)

Profa. Dra. Valdiléia Teixeira Uchôa
(Membra Suplente – UESPI)

Teresina – PI

2018

Dedico este trabalho as pessoas que mais amo:

meu pai Patriolino, minha mãe Maria, minha

esposa Marília, meu filho Arthur e minhas

irmãs Neyara, Neyane e Neylúcia.

Por apoiar os meus sonhos

e pelo amor de todos.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me ajudar em todos os momentos difíceis e proporcionar grandes bênçãos.

À minha família, minha amada esposa Marília e meu pequeno príncipe Arthur Kawan pelo grande apoio nesta empreitada.

Aos meus pais Patriolino e Maria e minhas irmãs Neyara, Neyane e Neylúcia pelo carinho concedido durante todos esses anos.

Ao professor/orientador Dr. Joaquim Soares da Costa Júnior, pela oportunidade de trabalhar com um profissional de alto gabarito, pela contribuição na minha aprendizagem e pelo desenvolvimento das pesquisas no Laboratório de Química Orgânica e Produtos Naturais do IFPI.

À professora Dra. Teresinha de Jesus Aguiar dos Santos Andrade, enriquecendo nossos conhecimentos, compartilhando ideias e ajudando em diversas análises dentro e fora do país com seus parceiros amigos.

Aos professores Dr. Herbert Barbosa e Dr. José Luís pelas ótimas aulas ministradas durante os períodos do curso.

Aos colegas colaboradores, Jurandy do Nascimento Silva do IFPI (Campus zona Sul) pela gentileza e atenção na realização dos experimentos de avaliação da atividade antioxidante.

À professora Dra. Chistiane Mendes Feitosa pela valorosa colaboração.

A minha grande amiga e parceira de laboratório nas pesquisas Maria das Dores Alves de Oliveira pela sua parceria nos trabalhos de isolamento desde o começo da trajetória.

A todos os queridos amigos que participaram de maneira direta ou indiretamente durante toda essa jornada desde o segundo período de 2015, meu obrigado!

Aos órgãos financiadores pelo apoio financeiro (CAPES e FAPEPI) e pelas bolsas concedidas a N. S. Machado (FAPEPI) e M. D. A. de Oliveira (CAPES). Ao Instituto Federal do Piauí, Campus Central, Teresina, PI pelo uso do Laboratório Química Orgânica e Produtos Naturais em toda pesquisa.

“Os sonhos não determinam o lugar em que você vai estar, mas produzem a força necessária para tirá-lo do lugar em que está.”

(A. Cury, em Nunca desista dos seus sonhos)

RESUMO

O cogumelo bioluminescente *Neonothopanus gardneri* (Berk. ex Gardner) conhecido como “flor-de-coco” usa suas propriedades luminescentes para atrair ou repelir insetos para à sua proteção ou dispersão de seus esporos. Desde a sua recente redescoberta em 2008 foram realizados poucos estudos com este fungo.

Foi realizado um trabalho de coleta, identificação do material botânico, extração do material bruto com metanol, etanol e acetato de etila. O fracionamento e o isolamento foram feito em coluna cromatográfica em gel (Sephadex LH-20) e traçado um perfil cromatográfico em CCD.

A identificação das substâncias a partir do extrato metanólico foi feita utilizando as técnicas de CLAE-DAD, CLAE-EM, IV e RMN para caracterizar e identificar as estruturas químicas presentes neste extrato, assim como também foram realizados ensaios biológicos para as atividades antioxidantes, anti-acetilcolinesterase e antifúngica.

O extrato metanólico apresentou um perfil cromatográfico com três picos bem intensos em CLAE-UV-DAD. Após o fracionamento, em gel Sephadex LH-20, foram coletadas 9 frações e todas foram cromatografadas em CCD utilizando sílica com indicador UV e borrifadas com ninhidrina, identificando possíveis isolamentos e classes fitoquímicas. O perfil cromatográfico em CLAE-UV-DAD foi traçado e confirmado o isolamento de duas substâncias.

A substância 1 é um líquido incolor com *m/z* 314 em EM-IES e as análise dos espectros de IV e RMN ^{1}H, ^{13}C e técnicas RMN 2D aponta um estrutura de uma hidrazida. A substância 2 também é um líquido incolor com *m/z* 314 em EM-IES e somado aos espectros de IV e RMN ^{1}H, ^{13}C e técnicas RMN 2D sugere a estrutura de um peptídeo.

Os extratos metanólico, etanólico e de acetato de etila apresentaram boa atividade antioxidante para os radicais DPPH e ABTS, com destaque para o extrato metanólico quando comparados aos controles positivos ácido ascórbico e trolox, respectivamente. A avaliação *in vitro* da atividade de inibição da enzima acetilcolinesterase apresentou resultado negativo para o extrato etanólico e baixa atividade para os extratos metanólico e de acetato de etila. Já na atividade

antifúngica contra *Candida* spp, o extrato metanólico apresentou atividade de inibição apenas sobre o isolado de *C. tropicalis.*

Palavras-chave: *Neonothopanus gardneri*, bioluminescente, isolamento, antioxidante.

ABSTRACT

The bioluminescent mushroom *Neonothopanus gardneri* (Berk. Ex Gardner) known as "coconut blossom" uses its luminescent properties to attract or repel insects for their protection or dispersion of their spores. Since its recent rediscovery in 2008 few studies have been carried out with this fungus.

It was carried out a collecting work, identification of the botanical material, extraction of the raw material with methanol, ethanol and ethyl acetate was carried out. Fractionation and isolation were done on a gel chromatographic column (Sephadex LH-20) and a CCD chromatographic profile was drawn.

The identification of the substances from the methanolic extract was done using the techniques of HPLC-DAD, HPLC-EM, IR and NMR to characterize and identify the chemical structures present in this extract, as well as biological tests were carried out for antioxidant, anti-acetylcholinesterase and antifungal activities.

The methanolic extract presented a chromatographic profile with three very intense peaks in HPLC-UV-DAD. After fractionation, on Sephadex LH-20 gel, 9 fractions were collected and all were chromatographed on CCD using silica with UV indicator and sprinkled with ninhydrin, identifying possible isolations and phytochemical classes. The chromatographic profile in HPLC-UV-DAD was drawn and the isolation of two substances was confirmed.

Substance 1 is a colorless liquid with *m/z* 314 in ESI-ESI and the analysis of IR and NMR ^{1}H, ^{13}C spectra and 2D NMR techniques points to a hydrazide structure. Substance 2 is also a colorless liquid with *m/z* 314 in ESI-MS and added to IR and NMR ^{1}H, ^{13}C spectra and 2D NMR techniques suggest the structure of a peptide.

The methanolic, ethanolic and ethyl acetate extracts presented a good antioxidant activity for the DPPH and ABTS radicals, with emphasis on the methanolic extract when compared to the positive ascorbic acid and trolox, respectively. The *in vitro* evaluation of acetylcholinesterase enzyme inhibition activity presented negative result for the ethanolic extract and low activity for the methanolic and ethyl acetate extracts. In the antifungal activity against *Candida spp*., the methanolic extract presented inhibition activity only on the isolate of *C. tropicalis.*

Key words: *Neonothopanus gardneri*, bioluminescent, isolation, antioxidant.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura do corpo de frutificação. 21

Figura 2: *Neonothopanus gardneri (a); Bathocyroe fosteri (b); Leiurus quinquestriatus (c); Arachnocampa (d)*. 22

Figura 3: *Neonothopanus gardneri* (dia) (foto: acervo particular) 27

Figura 4: *Neonothopanus gardneri* (noite) (foto: acervo particular)..... 28

Figura 5: Localização geográfica do ponto de coleta: povoado Mimoso (6°13'00.1"S 43°08'59.3"W), município de São Francisco - MA (Foto do Google Earth). 29

Figura 6: Desenho de uma análise em CCD. 32

Figura 7: Frações coletadas após realização da coluna cromatográfica em Sephadex LH-20 do extrato metanólico de *N. gardneri* (foto do acervo particular). 41

Figura 8: Placas reveladas com ninhidrina em A (F2 e F3), B (F4 e F5), C (F6 e F7), D (F8 e F9) e E (Extrato metanólico), na câmara UV as frações isoladas em F (F8) e G (F9). 42

Figura 9: Cromatograma analítico do extrato metanólico de N. gardneri, no modo gradiente MeCN/H_2O 5:95 → MeCN 100% em 40 min com fluxo de 1,0 mL/min. C18. λ = 254 nm. 42

Figura 10: Cromatograma do extrato metanólico e das frações após a cromatografia de coluna (FM6)(FM7) e cromatograma das frações purificadas (FM8)(FM9). 43

Figura 11: Cromatograma analítico da fração FM6 a partir do extrato metanólico de N. gardneri, no modo gradiente MeCN/H_2O 5:95 → MeCN 100% em 40 min com fluxo de 1,0 mL/min. C18. λ = 254 nm. 44

Figura 12: Cromatograma analítico da fração FM7 a partir do extrato metanólico de *N. gardneri*, no modo gradiente MeCN/H_2O 5:95 → MeCN 100% em 40 min com fluxo de 1,0 mL/min. C18. λ = 254 nm. 44

Figura 13: Cromatograma analítico da subfração FM7-5 a partir da fração FM7 do extrato metanólico de *N. gardneri*, no modo gradiente MeCN/H_2O 5:95 → MeCN 100% em 40 min com fluxo de 1,0 mL/min. C18. λ = 254 nm. 45

Figura 14: Cromatograma analítico da subfração FM7-6 a partir da fração FM7 do extrato metanólico de *N. gardneri*, no modo gradiente MeCN/H_2O 5:95 → MeCN 100% em 40 min com fluxo de 1,0 mL/min. C18. λ = 254 nm. 45

Figura 15: Cromatograma representativo da coluna cromatográfica em sílica gel (Sephadex LH-20), com a fase móvel MeOH/H_2O (1:1), com a separação do terceiro pico de interesse. 46

Figura 16: Cromatograma analítico da fração FM8 a partir do extrato metanólico de *N. gardneri*, no modo gradiente MeCN/H_2O 5:95 → MeCN 100% em 40 min com fluxo de 1,0 mL/min. C18. λ = 254 nm e espectro de UV. 46

Figura 17: Cromatograma analítico da fração FM9 a partir do extrato metanólico de *N. gardneri*, no modo gradiente MeCN/H_2O 5:95 → MeCN 100% em 40 min com fluxo de 1,0 mL/min. C18. λ = 254 nm e espectro de UV. 47

Figura 18: Espectro de infravermelho da substância 1. 48

Figura 19: Correlações COSY (seta dupla) e HMBC (H→C) para a substância 1. ... 49

Figura 20: Cromatograma de massas EM – IES (-) da substância 1. 51

Figura 21: Espectro de RMN 1H da substância 1 (500 MHz, CD_3OD)..... 53

Figura 22: Ampliação do espectro de RMN ^{1}H da substância 1 (500 MHz, CD_3OD). 53

Figura 23: Espectro de RMN ^{13}C da substância 1 (500 MHz, CD_3OD). 54

Figura 24: Espectro de RMN 2D - HSQC da substância 1 (500 MHz, CD_3OD). 54

Figura 25: Espectro de RMN 2D - HMBC da substância 1 (500 MHz, CD_3OD). 55

Figura 26: Espectro de RMN 2D - COSY da substância 1 (500 MHz, CD_3OD). 55

Figura 27: Espectro de infravermelho da substância 2. 56

Figura 28: Correlações COSY (seta dupla) e HMBC (H→C) para a substância 2. ... 57

Figura 29: Cromatograma de massas EM – IES (-) da substância 2. 59

Figura 30: Espectro de RMN ^{1}H da substância 2 (500 MHz, CD_3OD). 60

Figura 31: Espectro de RMN ^{13}C da substância 2 (500 MHz, CD_3OD). 61

Figura 32: Espectro de RMN ^{13}C - DEPT da substância 2 (500 MHz, CD3OD)..... 61

Figura 33: Espectro de RMN 2D - COSY da substância 2 (500 MHz, CD_3OD). 62

Figura 34: Espectro de RMN 2D - HSQC da substância 2 (500 MHz, CD_3OD). 62

Figura 35: Espectro de RMN 2D - HMBC da substância 2 (500 MHz, CD_3OD). 63

Figura 36: Estrutura do DPPH e reação antioxidante 64

Figura 37: Ensaio de eliminação do radical catiônico DPPH (foto: acervo particular) 64

Figura 38: Porcentagem de inibição do extrato metanólico, etanólico e de acetato de etila a partir de *N. gradneri*. 65

Figura 39: Estabilização do radical ABTS por um antioxidante 66

Figura 40: Porcentagem de inibição do extrato metanólico, etanólico e de acetato de etila a partir de *N. gradneri*. 67

Figura 41: Teste de inibição da enzima acetilcolinesterase. Para o extrato metanólico placa A, extrato etanólico placa B e extrato acetato de etila placa C. Aplicações em 1 com controle positivo cafeína e de 2 a 6 aplicações dos extratos na CCD. 68

Figura 42: Efeito do tempo de exposição do extrato metanólico de *N. gardneri* na viabilidade de *Candida* spp. 70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Rendimento dos extratos brutos e frações partindo de uma extração inicial com MeOH 40

Tabela 2: Dados espectrais de RMN ^{1}H e ^{13}C da substância NgF8 em CD_3OD, J em Hz, δ em ppm. 52

Tabela 3: Dados espectrais de RMN ^{1}H e ^{13}C da substancia NgF9 em CD_3OD, J em Hz, δ em ppm. 58

Tabela 4: Conteúdo de atividade antioxidante (CE_{50}) para DPPH•..... 65

Tabela 5: Conteúdo de atividade antioxidante (CE_{50}) para ABTS+. 66

Tabela 6: Média das porcentagens de inibição para o extrato metanólico de *N. gardneri* nas concentrações 1,0; 0,5; 0,25 e 0,12 mg/mL 69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1D – Unidimensional

2D – Bidimensional

ABTS - (2,2') azinobis-3-etil-benzotiazolina-6-sulfônico

AChE - Acetilcolinesterase

AcOEt – Acetato de etila

CC – Cromatografia em coluna

CCD – Cromatografia em camada delgada

CD_3OD – Metanol deuterado

CE_{50} – Concentração efetiva mediana

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência

CLAE-DAD – Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos

CLAE-DAD-UV – Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos e ultravioleta

COSY– *Correlated Spectroscopy*

dd – Duplo dubleto

d – Dubleto

DEPT – *Distortionless enhancement by polarization transfer*

DPPH – (1,1) difenil-2-picril-hidrazil

EM – Espectrometria de massa

EM-IES – Espectrometria de massas com ionização por eletrospray

F – Fração

FM – Fração metanólica

HMBC – *Heteronuclear Multiple-Bond Correlation*

HSQC – *Heteronuclear Single Quantum Coherence*

IV – Infravermelho

J – Constante de acoplamento

m – Multipleto

MeCN – Acetonitrila

MeOH – Metanol

NgF – Fração de *Neonothopanus gardneri*

PA – Para Análise

RMN – Ressonância magnética nuclear

s – *Singleto*

st – Sexteto

t – Tripleto

TMS – Tetrametilsilil

TR – Tempo de retenção

UFC – *colony forming unit*

UV – Ultravioleta

δ – Deslocamento químico

λ – Comprimento de onda

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO 20

1.1 Fungos 20
1.2 Bioluminescência 21
1.3 Fungos bioluminescentes como fonte de metabólitos secundários 23
1.4 Objetivos 26

CAPÍTULO 2 - METODOLOGIA EXPERIMENTAL 27

2.1 Coleta e identificação da amostra 27
2.2 Determinação do perfil cromatográfico em CLAE-EM 29
2.3 Determinação do perfil espectroscópico em RMN 29
2.4 Infravermelho (IV) 30
2.5 Extração, fracionamento e isolamento 30
2.6 Determinação do perfil cromatográfico em CCD 31
2.7 Cromatografia em coluna clássica e CLAE 32
2.7.1 Exclusão em gel 32
2.7.2 Determinação do perfil cromatográfico em CLAE-UV-DAD 33
2.8 A utilização de métodos espectroscópicos para a elucidação de compostos orgânicos 33
2.8.1 Ressonância Magnética Nuclear (RMN) 33
2.8.2 Espectrometria de Massas (EM) 34
2.8.3 Infravermelho (IV) 35
2.9 Ensaios 35
2.9.1 Atividade de eliminação do radical catiônico DPPH 35
2.9.2 Atividade de eliminação do radical catiônico ABTS 36
2.9.3 Atividade inibitória de AChE dos extratos 37
2.9.4 Atividade antifúngica. 38
2.9.4.1 Microrganismos. 38
2.9.4.2 Atividade antifúngica contra *Candida* spp. 38

CAPÍTULO 3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO 40

3.1 Fracionamento e isolamento a partir do extrato metanólico de *N. gardneri* 40
3.2 Perfil cromatográfico em CCD 41
3.3 Análises das frações a partir de *N. gardneri* por CLAE-UV-DAD 42
3.3.1 Extrato metanólico 42
3.3.2 Fração 6 - FM6 (117,6 mg) 43
3.3.3 Fração 7 - FM7 (52,9 mg) 44
3.3.4 Fração 8 - FM8 (2,5 mg) 46
3.3.5 Fração 9 - FM9 (5,9 mg) 47
3.4 Identificação e elucidação estrutural dos compostos isolados 47
3.4.1 Análise por LC-MS/MS, IV e RMN 48
3.4.1.1 NgF8 (2,5 mg) 48
3.4.1.2 NgF9 (5,9 mg) 56
3.5 Considerações sobre os ensaios realizados com os extratos metanólico, etanólico e acetato de etila 63
3.5.1 Atividade de eliminação do radical catiônico DPPH 63
3.5.2 Atividade de eliminação do radical catiônico ABTS 65
3.5.3 Atividade de inibição da enzima acetilcolinesterase 67
3.5.4 Atividade antifúngica contra *Candida* spp. 68
CAPÍTULO 4 - CONSIDERAÇÕES FINAIS 71

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

1.1 Fungos

Fungos são microrganismos em sua grande maioria filamentosos, com filamentos de forma tubular com o nome de hifa, cujo aglomerado destas formam o corpo do fungo (Figura 1), intitulado de micélio que se encontra na forma de uma rede frouxa ou um tecido maciço na forma de cogumelos. Porém, alguns fungos não são formados por micélios, as leveduras que são seres unicelulares. A forma de nutrição mais comum dos fungos é a absorção (osmose ou difusão) e sua reprodução é através de esporos, que pode ser de duas formas: sexuada e assexuada. E com apenas fragmentos de um fungo pode ser potencialmente um novo indivíduo, facilitada numa temperatura entre 22 e 30 °C na maioria das espécies (M.; REID; CHAN, 1981). Os fungos se alimentam infectando outros organismos, como parasitas ou simbióticos mutualistas, ou como saprófitos, na decomposição da matéria orgânica.

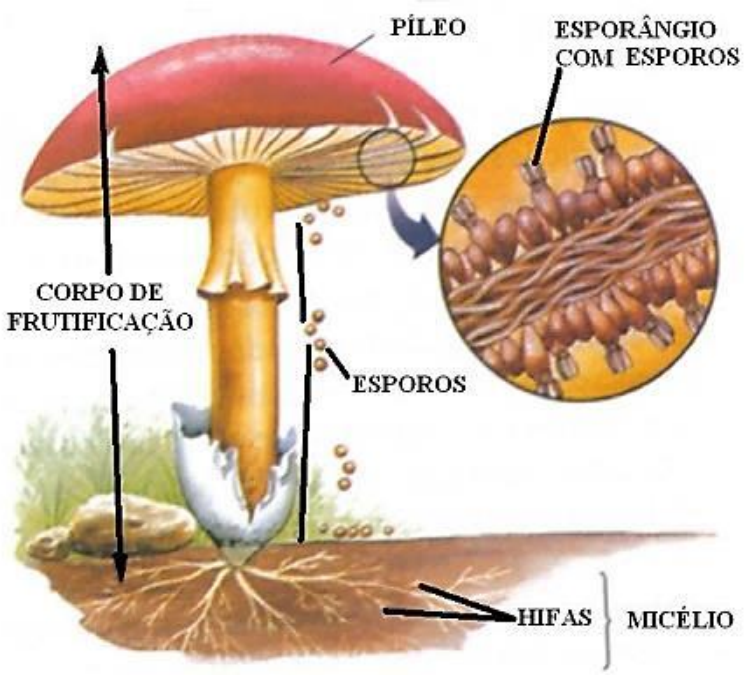


Figura 1: Estrutura do corpo de frutificação.

Os fungos são de grande importância na produção de alimentos, bebidas alcoólicas, também estão presentes na indústria farmacêutica, no processo de biodegradação e tratamento biológico de efluentes, e são de grande potencial agrícola e ambiental. Os fungos possuem uma variedade muito grande de espécies e dessa forma estão presentes um grande número de substratos orgânicos e inorgânicos. (ABREU; ROVIDA; PAMPHILE, 2018; RAVEN; EICHHORN; EVERT, 1992).

1.2 Bioluminescência

Muitas investigações têm sido feitas ao redor do tema da emissão de luz por animais e plantas que tem despertado a curiosidade da humanidade desde os tempos de Aristóteles (383 – 322 a. C.) e Plínio (d. C. 23 – 70). Vários outros pesquisadores continuaram as suas inquietações pelos fenômenos de luminescência ou bioluminescência, assim usado os dois termos pela luz produzida proveniente de seres vivos. A bioluminescência é caracterizada pela emissão de luz visível e fria por seres vivos, e é um acontecimento largamente distribuído ao redor da Terra (Figura 2). Várias espécies de bactérias, vermes terrícolas e marinhos,

algas primitivas, peixes, celenterados, moluscos, crustáceos, insetos e fungos são classificados como bioluminescentes (OLIVEIRA, ANDERSON GARBUGLIO et al., 2013).

Figura 2: ***Neonothopanus gardneri (a); Bathocyroe fosteri (b); Leiurus quinquestriatus (c); Arachnocampa (d).***

A bioluminescência dos fungos foi primeiramente descrita por Aristóteles (383 – 322 a. C.) a partir da emissão de luz proveniente da decomposição da madeira e Plínio (d. C. 23 – 70) em seu *Historia Naturals* com um fungo bioluminescente com propriedades farmacológicas, desta forma curiosamente estes fungos despertavam o interesse das mais diversas formas de emprego (HARVEY, 1957). Uma ampla variedade de fungos bioluminescentes tem sido encontrada nos últimos tempos.

O sistema bioluminescente de um organismo pode abranger várias reações químicas, na qual as reações de bioluminescência ocorrem com a oxidação de um substrato que gera energia para a formação do estado excitado (CAMPBELL, 1988; SHIMOMURA, 2006).

O mecanismo que permite ocorrer à emissão de luz por fungos é um sistema enzimático subordinado pelo NAD(P)H. Foi proposto na década de 60 (AIRTH; FOERSTER, 1962) e foi ratificado por Oliveira (OLIVEIRA, A. G.; STEVANI, 2009). As reações para ocorrer à emissão de luz tem a participação de uma molécula chamada luciferina, na qual é catalisada por uma enzima chamada luciferase (Esquema 1).

$$L + NAD(P)H + H^+ \xrightarrow[(redutase)]{\text{enzima solúvel}} LH_2 + NAD(P)^+$$

$$LH_2 + O_2 \xrightarrow[(luciferase)]{\text{enzima insolúvel}} LO + H_2O + h\nu$$

L: precursor da luciferina, LH_2: luciferina, LO: luciferina oxidada

Esquema 1: Mecanismo enzimático de emissão de luz por fungos.

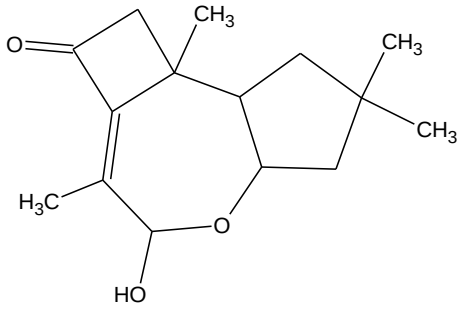
Em suma, a produção da luciferina é a partir da redução do seu antecessor o NAD(P)H que é catalisada pela redutase. Portanto, a luciferina é oxidada pelo oxigênio e a luciferase catalisa a reação e ocorre a liberação de energia luminosa visível e fria.

A luminescência dos fungos possuem estágios em seu ciclo de vida, quando os corpos de frutificação e micélio são jovens, possuem luminescência mais intensa (SHIMOMURA, 2006). A bioluminescência para a os fungos possuem funções como: ajudar a atrair invertebrados para a propagação dos esporos (SIVINSKI, 1981), a luz emitida seria uma forma de alarme para predadores que se alimentam de micélio, mostrando assim que o fungo é perigoso (HOMER; TIFFANY; KNAPHUS, 1995; MAMIYA, 2006) e também foi citado como uma maneira de desintoxicação, especialmente de peróxidos, produzidos no decorrer da degradação da lignina da madeira (BERMUDES; PETERSEN; NEALSON, 1992).

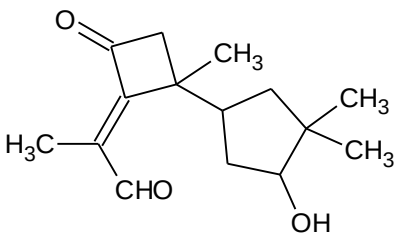
1.3 Fungos bioluminescentes como fonte de metabólitos secundários

Os fungos bioluminescentes têm apresentado grande potencial com diferentes metabólitos secundários, essas substâncias foram isoladas de diversas espécies dos gêneros: *Omphalotus, Armillaria, Mycena* e do próprio *Neonothopanus.*

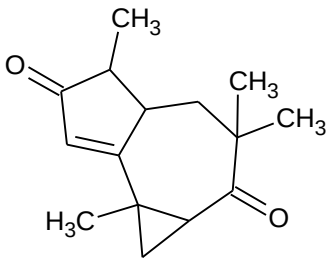
A partir de basidiomiceto *Omphalotus illudens* muitos sesquiterpenos foram isolados (MCMORRIS et al., 2002). Dentre eles, os metabólitos abaixo:



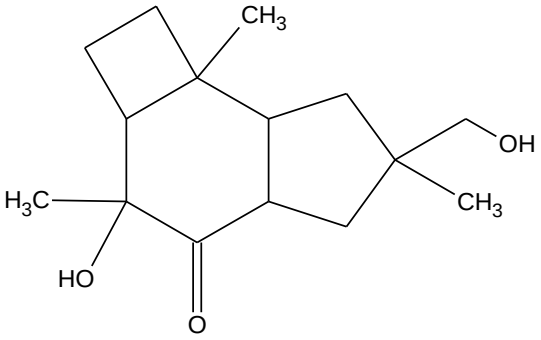
Illudosona hemiacetal



illudosona

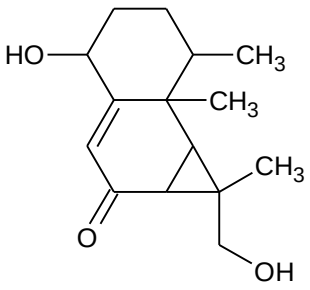


isoomphadiona

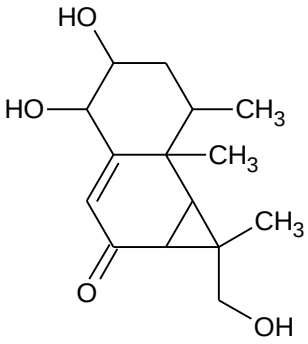


illudiolona

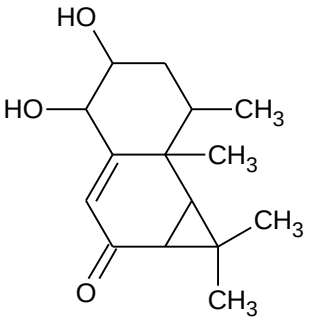
Assim como a própria linhagem *Neonothopanus*, com *Neonothopanus nambi,* que é um cogumelo luminescente e venenoso. São basidiocarpos encontrados normalmente em troncos ou madeira morta em florestas do nordeste da Tailândia. O trabalho de isolamento e caracterização estrutural, a partir de *N. nambi,* produziu sete novas substâncias mostradas abaixo, para este gênero, e duas dessas substâncias mostraram citotoxidade contra linhas celulares de câncer (KANOKMEDHAKUL et al., 2012).



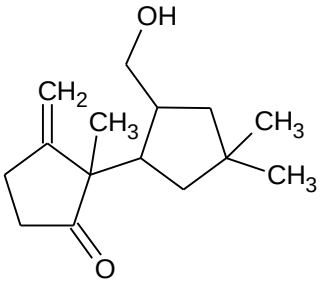
nambinona A



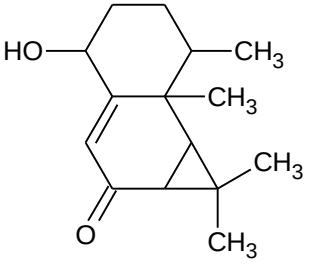
nambinona B



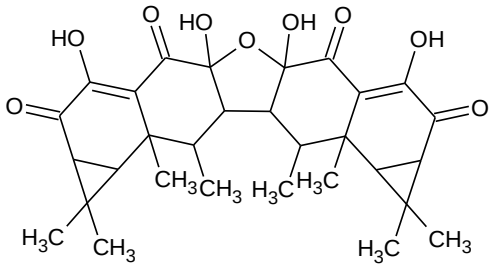
nambinona C



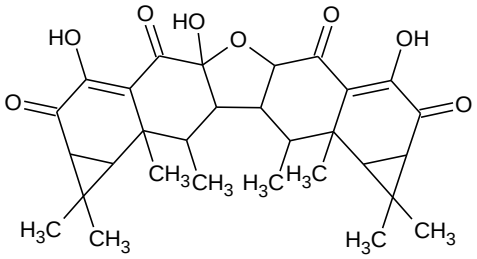
1-epi-nambinona B



nambinona D.

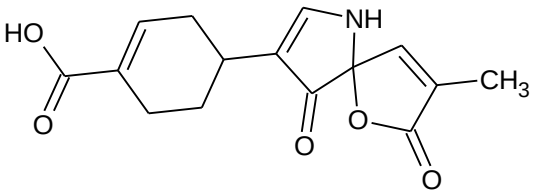


aurisin A

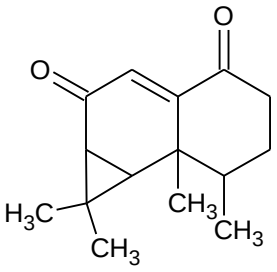


aurisin K.

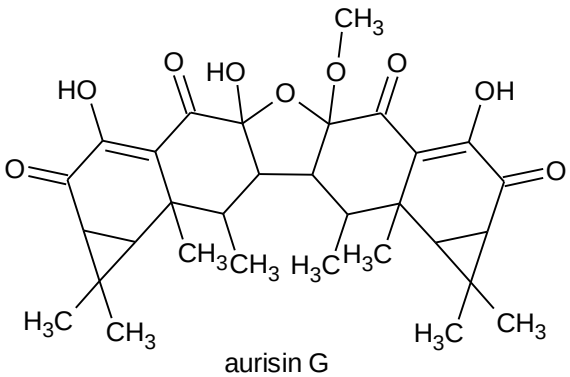
Várias substâncias abaixo apresentaram um resultado positivo para atividades biológicas como: atividades antimalárica e citotoxidade contra células cancerosas (INTARAUDOM et al., 2013).



ácido antracofílico



antracofillona



aurisin G

Os fungos luminosos compartilham de um mecanismo de bioluminescência (OLIVEIRA, A. G. et al., 2012), essas estruturas são relatadas como luciferinas (ENDO; KAJIWARA; NAKANISHI, 1970; ISOBE, M.; UYAKUL; GOTO, 1987; ISOBE, MINORU; UYAKUL; GOTO, 1988; PURTOV et al., 2015).

1.4 Objetivos

Estudar as propriedades químicas e biológicas de *Neonothopanus gardneri*, incluindo:

- Realizar análises químicas de extratos, frações e compostos puros do *Neonothopanus gardneri* usando abordagens de análise de metabólitos alvo, por meio de técnicas cromatográficas e espectrométricas.
- Realizar análises biológicas de extratos, frações e compostos puros para atividades antioxidantes, anti-acetilcolinesterase e atividade antifúngica.

Capítulo 2

METODOLOGIA EXPERIMENTAL

2.1 Coleta e identificação da amostra

Neonothopanus gardneri (Berk. ex Gardner) é um cogumelo bioluminescente com características morfológicas semelhantes a uma flor (Figura 3) que se desenvolve na base de palmeiras, principalmente babaçu, por isso é chamado de flor-de-coco e é encontrado no bioma Mata dos Cocais na região Norte-Nordeste do Brasil (VENTURA; SILVA; STEVANI, 2015).

Figura 3: *Neonothopanus gardneri* (dia) (foto: acervo particular)

Possui um brilho de cor verde-clara de forte intensidade à noite (Figura 4) e seu corpo vegetativo (micélio) é responsável pela emissão de luz, obtenção de

alimento e crescimento, e essa bioluminescência pode atrair predadores como animais fungívoros e/ou alerta-los, também servindo para dispersão de seus esporos (SHIMOMURA, 2006). *N. gardneri* foi identificado em 1840 pelo botânico George Gardner, mas somente em 2008 foram realizadas novas coletas de seus corpos de frutificação (HOMER et al., 1995; MAMIYA, 2006; VENTURA et al., 2015).

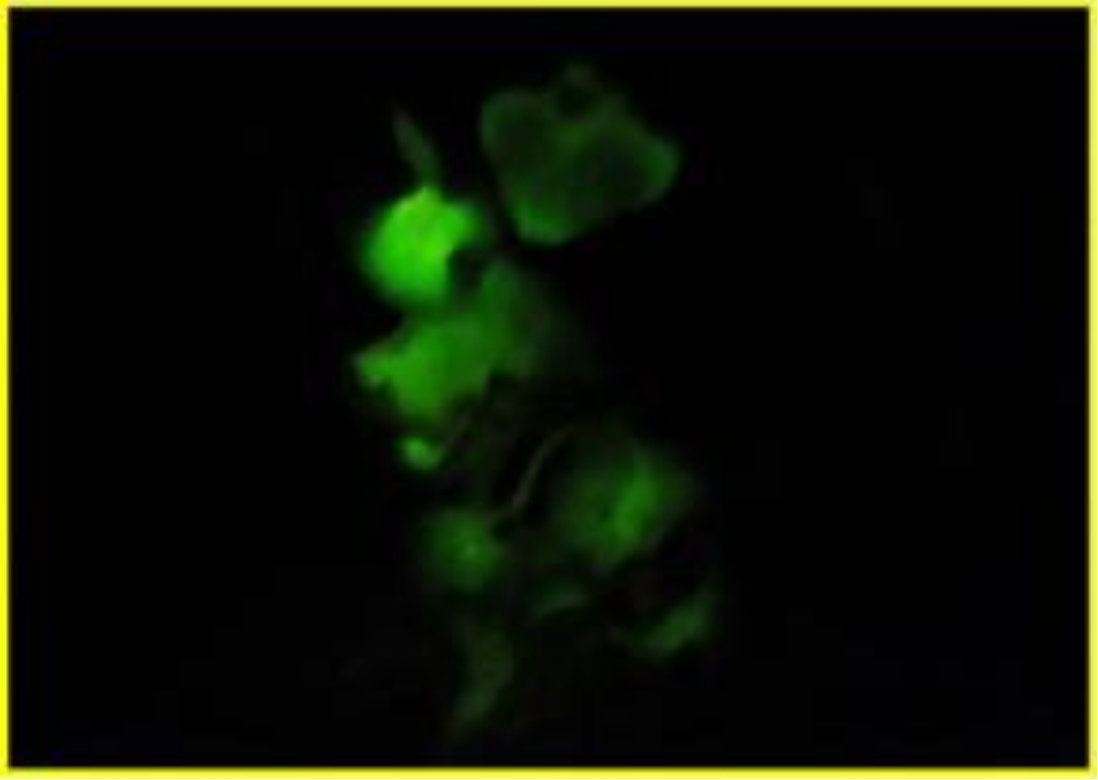


Figura 4: *Neonothopanus gardneri* (noite) (foto: acervo particular)

Espécies do cogumelo *N. gardneri* foram coletados no povoado Mimoso (6°13'00.1"S 43°08'59.3"W) (Figura 5), localizado no município de São Francisco, estado do Maranhão, Brasil, em bases de coqueiros babaçu (*Orbignya phalerata*), no período de janeiro a maio de 2013, no horário entre 18 e 20 horas, sob autorização mediante comprovante de registro para coleta e transporte de material botânico, fúngico e microbiológico, SISBIO número 54548-1. Os cogumelos foram mantidos congelados a uma temperatura de -5 °C. O material foi identificado pelo professor Dr. Cassius Vinícius Stevani e seu grupo de pesquisadores do Laboratório de Bioluminescência de Fungos, Instituto de Química, da Universidade de São Paulo (USP, São Paulo, Brasil).

Figura 5: Localização geográfica do ponto de coleta: povoado Mimoso (6°13'00.1"S 43°08'59.3"W), município de São Francisco - MA (Foto do Google Earth).

2.2 Determinação do perfil cromatográfico em CLAE-EM

Cromatógrafo Líquido acoplado ao espectrômetro de massas (CLAE-PDA/EM-IES) Thermo Instruments MS system (LTQ XL/ LTQ Orbitrap Discovery acoplado a sistema de CLAE, binário-Thermo Fisher Scientific, detector PDA, injetor automático. As análises foram realizadas com voltagem do capilar 45 V, temperatura do capilar 260 °C, gás de arraste (N_2), fluxo 10-20 (unidades arbitrárias). O software Xcalibur (Thermo Scientific®) foi utilizado durante a aquisição e processamento dos dados espectrométricos (Marine Biodiscovery Centre; University of Aberdeen-Scoltland-UK).

2.3 Determinação do perfil espectroscópico em RMN

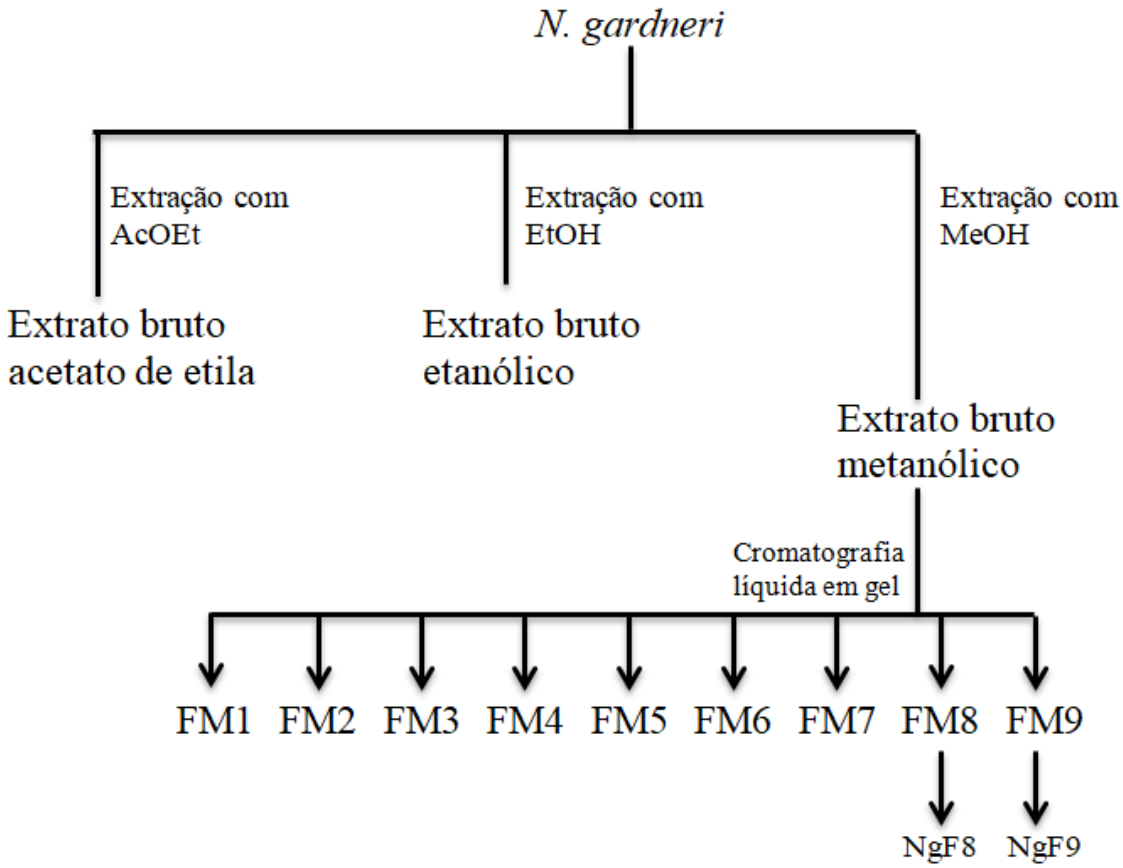
Os espectros de RMN foram obtidos em um espectrômetro Bruker Avance DRX-500 e Varian Inova, operando a 500 MHz e 400 MHz na frequência de ^{1}H e ^{13}C e os solventes utilizados na dissolução das amostras para obtenção dos espectros foram D_2O orgânicos) e CD_3OD (CIL e Isotec-INC), $CDCl_3$, DMSO-d6 (CIL e Isotec-INC), sendo utilizado TMS ou o solvente residual não deuterado como referência interna.

2.4 Infravermelho (IV)

Os espectros de infravermelho foram obtidos empregando a inserção de pastilhas de KBr no Espectrofotômetro Infravermelho por transformada de Fourier, marca Shimadzu modelo IR PRESTIGE-21 de faixa espectral de 350 cm^{-1} a 7800 cm^{-1}.

2.5 Extração, fracionamento e isolamento

Os corpos de frutificação do fungo *N. gardneri* foram utilizados como material de partida para o fracionamento e isolamento, os cogumelos foram submetidos a processos de trituração, liofilização e extração com metanol, etanol e acetato de etila. O extrato metanólico foi analisado em CLAE para a obtenção do seu perfil cromatográfico, buscando fornecer subsídios para uma melhor caracterização dos metabólitos de *N. gardneri*. Após o resultado dessa análise o extrato foi submetido à cromatografia de coluna em gel (Sephadex LH-20), usando o metanol como eluente, coletando-se nove frações, FM1 a FM9, que foram reinjetadas em CLAE (e duas frações foram reconhecidas como substâncias isoladas) como mostra o **esquema 2**.



Esquema 2: Esquema de fracionamento em Sephadex de *N. gardneri*.

2.6 Determinação do perfil cromatográfico em CCD

O extrato metanólico junto às frações foram analisadas em CCDs. Na qual, foram utilizadas nessas análises pequenas placas de vidro (7,5 x 1,5 cm) recobertas com sílica gel com indicador UV F_{254} (Sigma Aldrich) e ativadas a 100 °C em estufa.

Para fazer as análises em CCD, as amostras foram aplicadas nas placas com o auxilio de pequenos tubos capilar e colocadas em uma cuba especial de cromatografia CCD (Figura 6), com tampa, contendo no seu interior um papel filtro recortado retangularmente, do tamanho a ocupar a altura da cuba e encoste em 2/3 da sua parte interna e 10 mL da fase móvel: metanol/clorofórmio (1:1) para fazer o transporte das substâncias com o seu poder de solubilização da amostra.

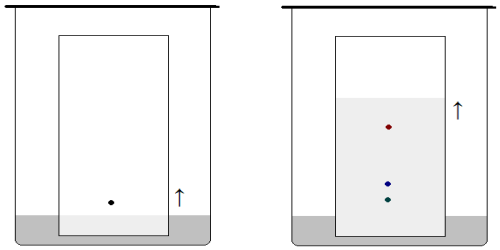


Figura 6: Desenho de uma análise em TLC.

As placas foram observadas em câmara UV e após a observação foram borrifadas com o revelador ninhidrina. Pois a ninhidrina revela as aminas primárias e os aminoácidos.

2.7 Cromatografia em coluna clássica e CLAE

No presente trabalho foram utilizadas as cromatografias por exclusão em gel e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

2.7.1 Exclusão em gel

Foi utilizado Sephadex LH-20 (Sigma Aldrich) para o fracionamento (frações) e isolamento das substâncias a partir do extrato metanólico de *N. gardneri*. Para o preparo do gel, o gel foi intumescido previamente por 48 horas com o solvente (MeOH) dentro de um béquer.

Em seguida, foi feito o empacotamento da coluna de vidro (700 x 10 mm), transferindo o gel para a coluna com a ajuda de um funil e permitindo que o solvente flua, abrindo a torneira, até se obter a sedimentação total do suporte. Após esses procedimentos a amostra (500 mg) foi dissolvida em metanol e aplicada diretamente sobre a fase estacionária e então adicionado suavemente o eluente para começar a exclusão. Ao se ajustar o fluxo da eluição, as frações foram coletadas em erlenmeyer, concentradas sob pressão reduzida (rotaevaporador, marca Fisatom 801) e analisadas por CCDs e CLAE-DAD.

Foi pesado (500 mg) do extrato metanólico de *N. gardneri* e feita uma cromatografia em coluna Sephadex LH-20 com fase móvel de MeOH, desta forma foram obtidas 9 frações. Em seguida, foram analisadas por CCD e CLAE-DAD-UV.

2.7.2 Determinação do perfil cromatográfico em CLAE-UV-DAD

Após a utilização da coluna cromatográfica em Sephadex LH-20 todas as frações foram analisadas por CLAE-UV para se obter um perfil do extrato metanólico, visando acompanhar o isolamento de novas substâncias a partir de *N. gardneri*.

A impressão digital do extrato metanólico, das frações e dos isolados por CLAE-UV-DAD, uma pequena alíquota de cada amostra foi submetida à análise. As análises foram realizadas em cromatógrafo analítico marca Shimadzu modelo LC-20 A. Controlador CBM-20A, detector UV-Vis com arranjo de diodos (DAD), modelo SPD- M20 A, coluna Nuleodur® 100-5 Macherey-Nagel, C18, 5µm (250 x 4,6 mm).

O sistema de análise utilizado foi uma coluna de fase reversa C18, no modo gradiente com acetonitrila e água [MeCN/H_2O 5:95 $\rightarrow$ MeCN 100% em 40 min] com fluxo de 1,0 mL/min, volume de injeção de 20 µL e varredura por UV de 190 a 800 nm.

2.8 A utilização de métodos espectroscópicos para a elucidação de compostos orgânicos

Há uma grande diversidade de compostos químicos conhecidos atualmente, tanto orgânicos quanto inorgânicos. Atualmente, na química orgânica, existem métodos muito utilizados para se identificar novas fórmulas estruturais. Os métodos espectroscópicos de infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear (RMN) e a espectrometria de massas (EM) são ferramentas muito utilizadas para a elucidação estrutural de compostos orgânicos (DONALD L. PAVIA et al., 2010; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2006).

2.8.1 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear é uma das ferramentas mais poderosas e importantes para um químico orgânico na elucidação estrutural na área de produtos naturais por exemplo. Esta técnica oferece informações suficientes para conhecer completamente a estrutura de uma molécula desconhecida. No entanto, o método mais simples de análise é o unidimensional (1D), o sinal está

representado apenas em função de um deslocamento químico, enquanto a análise bidimensional (2D) são representados por dois eixos de deslocamento químico no espectros de RMN de ^{1}H e ^{13}C. As técnicas foram divididas em homonucleares, COSY (*COrrelation SpectroscopY*), NOESY (*Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy*), TOCSY (*TOtal Correlation SpectroscopY*) e heteronucleares, HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*) e HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*) (DONALD L. PAVIA et al., 2010).

2.8.2 Espectrometria de Massas (EM)

A espectrometria de massas é uma das técnicas mais antigas dentre os métodos espectroscópicos aqui estudados. Desde os anos de 1890, com a razão massa/carga do elétron por J. J. Thomson e assim recebeu o prêmio Nobel. Em 1918 A. J. Dempster construiu o primeiro espectrômetro de massa.

Com o desenvolvimento cada vez maior, essa técnica foi se desenvolvendo e se popularizando e, assim, se tornou uma técnica de análise indispensável em vários tipos de seguimentos como: indústria biotecnológica, indústria farmacêutica, clínicas de saúde, cientistas ambientais etc.

O princípio básico desta técnica é gerar íons independente do método de introdução da amostra, separá-los pela sua razão massa/carga (*m/z*) e detectar suas abundâncias. O analito pode ser pode ionizado de diversas formas (DONALD L. PAVIA et al., 2010):

- Ionização por elétrons (EI): um feixe de elétrons acelerados e com alta energia, a partir de um filamento de tungstênio aquecido, e é impactado com a molécula causando a ionização que é acelerada para a detecção do espectrômetro.
- Ionização química (CI): as moléculas da amostra colidem com íons num fluxo de gás que são usados para gerar íons em moléculas neutras com transferências de prótons, elétrons e formação de adultos.
- Técnicas de ionização por dessorção (*SIMS, FAB e MALDI*): no método *SIMS – espectrometria de massa de íon secundário* a amostra é colocada no caminho de um feixe de íons de energia alta, na *FAB – bombardeamento de átomos rápidos* a amostra é colocada no caminho de

um feixe de átomos neutros ou de fótons de alta intensidade *MALDI – ionização por dessorção a laser assistido por matriz.*

- Ionização por eletrospray (ESI): uma solução da amostra é submetida a formação de um spray através de um tubo capilar fino para dentro de uma câmara aquecida, produzindo um aerossol com gotículas carregadas, que vai para dentro da câmara de ionização. As gotículas são evaporadas num contrafluxo de gás e, assim os íons resultantes vão para o detector.

2.8.3 Infravermelho (IV)

A maioria dos compostos que possuam ligações covalentes, sejam orgânicos ou inorgânicos, absorvem em muitas frequências da faixa do infravermelho do espectro eletromagnético. Nessa região se encontra os comprimentos de onda com valores acima da região do visível, aproximadamente entre 400 a 800 nm, mas que são menores que o comprimento de onda da região das micro-ondas. O comprimento de ondas, ou em modo de região vibracional do infravermelho chamada de número de onda, e está entre 2,5 μm e 25 μm.

O processo de absorção do infravermelho ocorre quando as moléculas absorvem energia na região do infravermelho e a radiação nessa faixa compreende frequências vibracionais de estiramento e dobramento das ligações covalentes. Desta forma, a energia absorvida intensifica a amplitude dos movimentos vibracionais das ligações na molécula. E isso se torna importante, pois, cada tipo de ligação tem sua frequência de vibração, ou seja, nunca dois espectros de infravermelho de duas moléculas diferentes serão iguais (DONALD L. PAVIA et al., 2010).

2.9 Ensaios

2.9.1 Atividade de eliminação do radical catiônico DPPH

Os extratos metanólico, etanólico e de acetato de etila foram analisados através do decréscimo das absorbâncias das soluções usando o ácido ascórbico como controle positivo. A solução do radical catiônico DPPH (CAS 1898-66-4,

Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) foi preparada num volume de 100 mL de solução estoque na concentração de 60 µg/mL mantida protegida da luz.

Soluções do extrato metanólico, etanólico, acetato de etila e do controle positivo foram diluídas nas concentrações 1,0 mg/mL, 2,5 mg/mL, 4,0 mg/mL, 5,5 mg/mL e 7,0 mg/mL. As medidas das absorbâncias foram realizadas em espectrofotômetro UV-Vis (Quimis, modelo Q898DPT) num comprimento de onda de 517 nm para todas as soluções medidas em cubetas de vidro e utilizando como branco o etanol.

Para a análise das amostras, foram preparadas as misturas reacionais adicionando 1,5 mL da solução etanólica do radical DPPH$^{\bullet}$ e uma alíquota de 0,5 mL das amostras contendo diferentes concentrações de cada extrato e do controle positivo e foram protegidas da luz. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 517 nm, após 30 minutos do início da reação. As determinações foram feitas em triplicata acompanhada de um controle (sem antioxidante). A queda na leitura da densidade ótica das amostras foi correlacionada com o controle (somente o radical), estabelecendo-se a porcentagem de descoloração do radical DPPH$^{\bullet}$ (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995; VIEIRA et al., 2011).

2.9.2 Atividade de eliminação do radical catiônico ABTS

Os extratos metanólico, etanólico, acetato de etila e o controle positivo trolox foram examinados através do declínio das absorbâncias das soluções. A solução do radical catiônico ABTS (CAS 30931-67-0, Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) foi gerado a partir da reação de 7 mM de ABTS com 2,45 mM de persulfato de potássio, sendo reservados à temperatura ambiente e na ausência de luz, por 12-16 horas. Transcorrido esse período, a solução foi diluída em etanol PA até obter-se uma solução com absorbância de 0,70 (± 0,01).

As soluções dos extratos e do controle positivo foram diluídas nas concentrações 1,0 mg/mL, 2,5 mg/mL, 4,0 mg/mL, 5,5 mg/mL e 7,0 mg/mL. As medidas das absorbâncias foram realizadas em espectrofotômetro UV-Vis (Quimis, modelo Q898DPT) num comprimento de onda de 734 nm para todas as soluções medidas em cubetas de vidro e utilizando como branco o etanol.

As misturas reacionais foram feitas a partir de 40 µL das amostras diluídas (em etanol) a 1960 µL da solução contendo o radical, determinando-se a absorbância em espectrofotômetro a 734 nm, após 30 minutos de reação. A queda na leitura da densidade ótica das amostras foi correlacionada com o controle (somente o radical), estabelecendo-se a porcentagem de descoloração do radical $ABTS^{+}$.

$$\% \text{ proteção} = [(Abs_{controle} - Abs_{branco}) / Abs_{controle}] \times 100$$

Além do porcentual de proteção também foi calculado, a concentração eficaz para inibir 50% dos radicais testados (CE_{50}) (LIMA, 2008; RE et al., 1999).

2.9.3 Atividade inibitória de AChE dos extratos

- Reagentes necessários
    - Iodeto de acetiltiocolina
    - Ácido 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzóico)
    - Tris-hidroxi-metil-amino-metano (para tampões)
    - Enzima acetilcolinesterase 5U (5 unidades da enzima em tampão tris)
    - Cromatoplacas de gel de sílica em alumina
    - Hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol.
    - Padrão (cafeína)

- Metodologia para o ensaio em cromatografia em camada delgada (CCD) para detecção de inibidores da AChE em extratos

Os extratos e compostos puros foram testados frente a AChE seguindo a metodologia de Ellman et al. (1961) adaptado por Rhee (2001).

O ensaio para detecção de inibição qualitativa da enzima AchE foi realizado com extratos brutos e substâncias isoladas que foram dissolvidos em metanol para se obter uma concentração de 10 mg/mL. Então 1,5-2,5 µl de cada amostra foi aplicada em placa de sílica gel e eluída em clorofórmio/metanol (9:1). Após a placa ser desenvolvida a atividade inibitória do spot foi detectada utilizando revelador

baseado no método de Ellman. A placa foi pulverizada com DTNB (ácido 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzóico)/ATCI (Iodeto de acetiltiocolina) (1 mM DTNB e 1 mM ATCI em tampão A) até que houvesse saturação com o reagente, mas não tanto para escorrer. Depois de seca por 3-5 minutos pulverizou-se com 5 units/mL da enzima. Finalmente, o teste positivo é observado através das placa que apresentarem-se amarelas e com manchas brancas, depois de 5 minutos é que mostraram inibição comparando-se com um padrão, a cafeína (ELLMAN et al., 1961; INGKANINAN, 2000; INGKANINAN K et al., 2003; RHEE et al., 2001).

2.9.4 Atividade antifúngica.

2.9.4.1 Microrganismos.

Os fungos patogênicos à seres humanos utilizados foram *Candida albicans, C. parapsilosis, C. tropicalis e C. krusei* foram obtidos no Laboratório de Toxinas Vegetais do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, Brasil.

2.9.4.2 Atividade antifúngica contra *Candida* spp.

Para realização dos ensaios, células de leveduras (*C. albicans, C. parapsilosis, C. krusei e C. tropicalis*) foram cultivadas em meio caldo batata-dextrose (pH 5,1), por 24 horas. Após este período, uma alíquota de cada inóculo foi transferida para placas contendo meio ágar batata-dextrose e, então, cultivadas por 24 horas. Posteriormente, foram preparadas suspensões iniciais de cada inóculo em NaCl 0,15 M até atingir o ponto 0,5 da escala de McFarland. As suspensões foram então diluídas 1000 vezes para obtenção de inóculos finais em uma faixa de 0,5 a 2,5 x 10^3 UFC/mL. Uma alíquota de 100 µL de cada suspensão foi aplicada nos poços contendo 50 µL de solução de Nistatina ou do extrato metanólico de *N. gardneri* em diferentes concentrações e 50 µL de meio caldo batata-dextrose em concentração equivalente a 4 vezes àquela recomendada pelo fabricante. As placas foram incubadas a 37 ºC por 24 horas e a avaliação do crescimento das leveduras foi realizada nos tempos 0 e 24 horas após o início da incubação. O crescimento das células foi mensurado em absorbância 620 nm. A Concentração Inibitória Mínima

(CIM_{50}) definida como sendo a menor concentração da amostra capaz de produzir inibição de 50% no crescimento das leveduras.

Capítulo 3

RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Fracionamento e isolamento a partir do extrato metanólico de *N. gardneri*

Técnicas cromatográficas são utilizadas para a separação e isolamento de substâncias químicas em misturas complexas para a realização de pesquisas que envolvem a busca de novas substâncias, como na fitoquímica, facilitando assim a caracterização de princípios ativos interessantes, assim conduzindo o plano de atividades desta pesquisa (MACIEL et al., 2002; MENDONÇA-FILHO; MENEZES, 2003; VENDRUSCOLO; RATES; MENTZ, 2005).

Inicialmente foi realizada uma análise do extrato metanólico por CLAE-UV-DAD nas condições de análise no modo gradiente com acetonitrila e água [MeCN/H_2O 5:95 → MeCN 100% em 40 min]. Com os resultados da análise o material foi submetido a uma cromatografia de coluna em gel (Sephadex LH-20) eluída com MeOH e foram obtidas 9 frações (Tabela 1) (Figura 7).

Tabela 1: Rendimento dos extratos brutos e frações partindo de uma extração inicial com MeOH

Fungo	Massa do extrato	FM1	FM2	FM3	FM4	FM5	FM6	FM7	FM8	FM9
N. Gardneri	500 mg	--	1,3 mg	3,1 mg	48,9 mg	128,7 mg	117,6 mg	52,9 mg	2,5 mg	5,9 mg

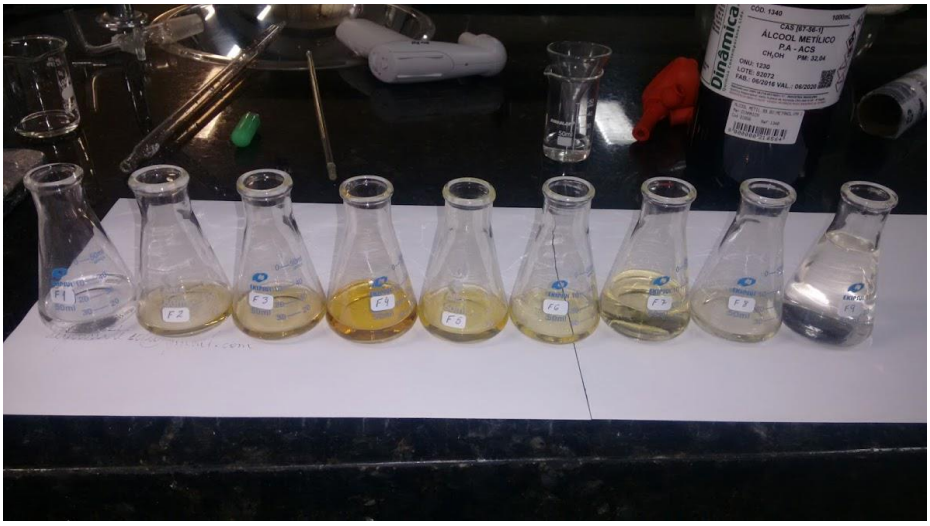


Figura 7: Frações coletadas após realização da coluna cromatográfica em Sephadex LH-20 do extrato metanólico de *N. gardneri* (foto do acervo particular).

Após o fracionamento do extrato metanólico analisou-se as frações por CCD e CLAE-UV-DAD que permitiu prever o isolamento das substâncias **1** (2,5 mg, NgF8) e **2** (5,9 mg, NgF9). A partir da fração FM7 foi isolada outra substância, mas não foi identificada, pois não houve massa suficiente para realizar as análises, e as demais frações não apresentaram pureza.

3.2 Perfil cromatográfico em CCD

O extrato metanólico e suas frações tiveram seu perfil cromatográfico traçado em CCD, utilizando placas de vidro recobertas de sílica gel com indicador UV. Após as amostras serem aplicadas nas placas e colocadas em cuba especial contendo o eluente foram submetidas à câmara UV e ao revelador ninhidrina.

A primeira observação foi realizada em câmara UV, e demonstrando a presença de dois compostos isolados. Mas o resultado que mais chamou atenção foi após borrifar o revelador ninhidrina nas placas, demonstrando a presença de aminas primárias e/ou aminoácidos. Dessa forma as placas reveladas foram analisadas para obter-se uma melhor compreensão das possíveis substâncias presentes (Figura 8).

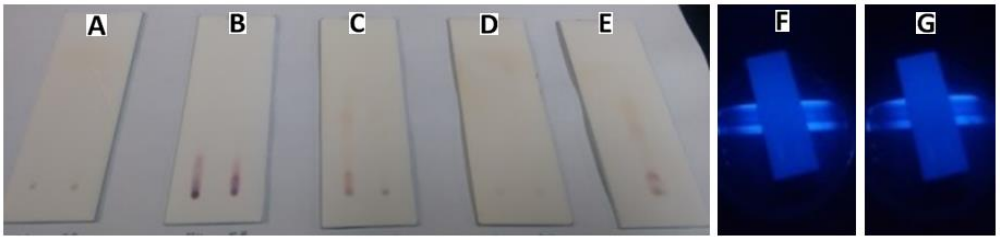


Figura 8: Placas reveladas com ninhidrina em A (F2 e F3), B (F4 e F5), C (F6 e F7), D (F8 e F9) e E (Extrato metanólico), na câmara UV as frações isoladas em F (F8) e G (F9).

3.3 Análises das frações a partir de *N. gardneri* por CLAE-UV-DAD

3.3.1 Extrato metanólico

Na análise perfil cromatográfico do extrato metanólico de *N. gardneri* por CLAE-DAD (Figura 9) apresentou uma pequena quantidade de metabólitos, na qual a maioria destes se encontrava com tempo de retenção entre 4,0 min e 11,0 min. Estes picos se apresentaram de separados entre si de forma suficiente para se usar um fracionamento utilizando uma cromatografia em coluna com Sephadex LH-20.

É importante observar que a detecção pelo o sistema de Arranjo de Diodos (DAD) depois da separação por CLAE nos mostra algumas informações estruturais, pelos espectros de UV, que podem ser formuladas. Apesar de limitadas essas informações podem indicar alguma classe de compostos.

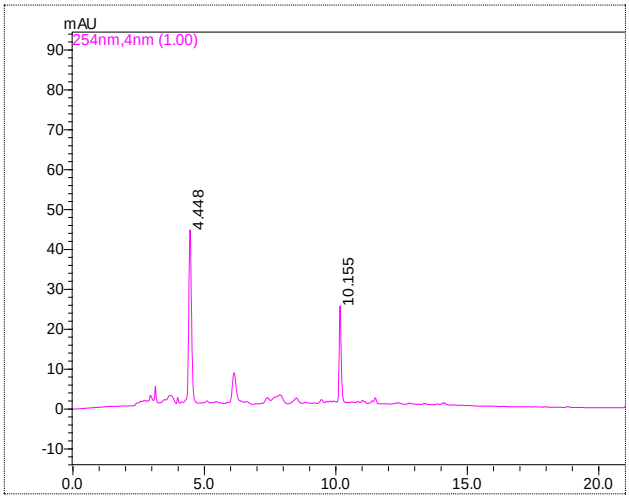


Figura 9: Cromatograma analítico do extrato metanólico de *N. gardneri*, no modo gradiente MeCN/H_2O 5:95 → MeCN 100% em 40 min com fluxo de 1,0 mL/min. C18. λ = 254 nm.

As frações FM1 (10 mL), FM2 (5 mL) e FM3 (10 mL) nada foi detectado após a análise por CLAE-DAD-UV e as frações FM4 (10 mL) e FM5 (10 mL) apesar apresentar uma coloração amarela intensa, obtida em coluna Sephadex LH-20 foi analisada por CLAE-DAD-UV, mas a análise dos picos com pouca intensidade não houve interesse para prosseguir a purificação da mesma.

As análises realizadas em CLAE-DAD do extrato metanólico de *N. gardneri* mostra a condução de uma boa separação dos picos, na qual foi possível observar a purificação de duas frações, como mostra na Figura 10.

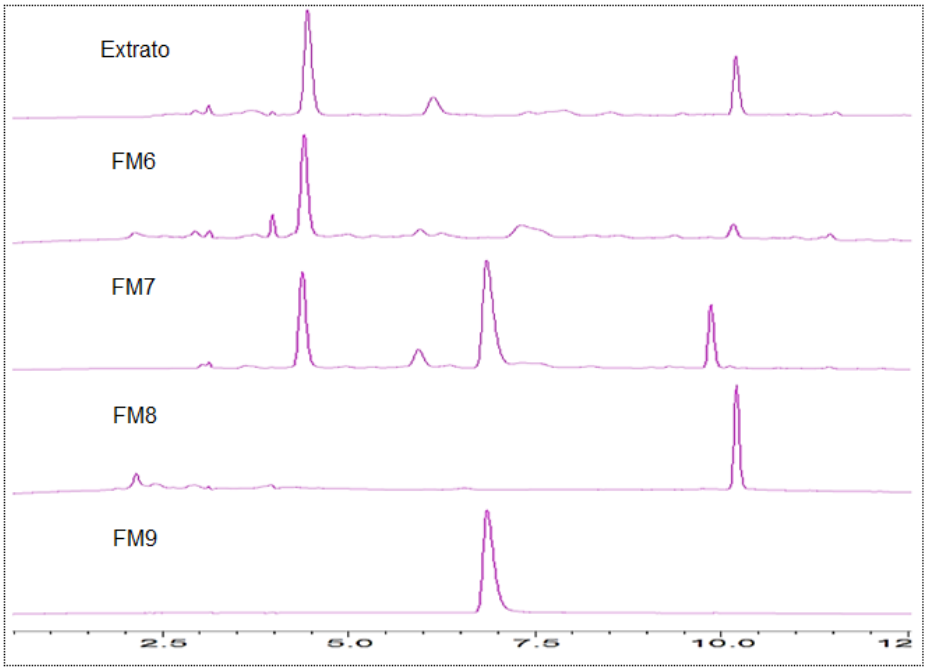


Figura 10: Cromatograma do extrato metanólico e das frações após a cromatografia de coluna (FM6)(FM7) e cromatograma das frações purificadas (FM8)(FM9).

Pode-se observar que nos cromatogramas do extrato metanólico de *N. gardneri* analisados aparecem três picos majoritários, demonstrando reduzida complexidade, com os tempos de retenção (TR) em 4,388 min, 6,849 min e 10,174 min.

3.3.2 Fração 6 - FM6 (117,6 mg)

A análise da fração FM6 por CLAE-DAD-UV (Figura 11) demostrou picos bem intensos em 4.395 min em λ = 254 nm.

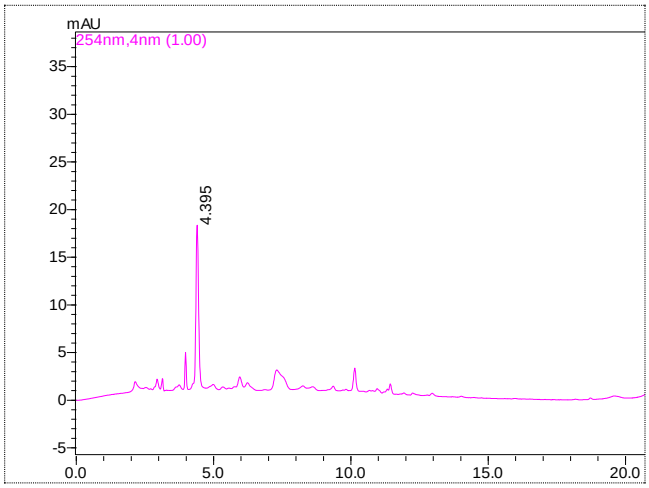


Figura 11: Cromatograma analítico da fração FM6 a partir do extrato metanólico de *N. gardneri*, no modo gradiente MeCN/H_2O 5:95 → MeCN 100% em 40 min com fluxo de 1,0 mL/min. C18. λ = 254 nm.

3.3.3 Fração 7 - FM7 (52,9 mg)

A análise da fração FM7 por CLAE-DAD-UV, a fração FM7 (Figuras 12) também demostrou picos bem intensos em 4,388 min, 6,849 min e 9,849 min em λ = 254 nm.

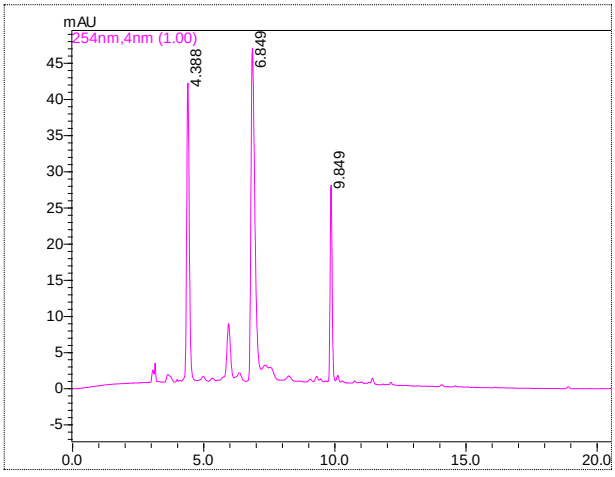


Figura 12: Cromatograma analítico da fração FM7 a partir do extrato metanólico de *N. gardneri*, no modo gradiente MeCN/H_2O 5:95 → MeCN 100% em 40 min com fluxo de 1,0 mL/min. C18. λ = 254 nm.

A análise da fração FM7 apresentou picos de relevância presentes no extrato, de acordo com o cromatograma na Figura 12. A absorção UV para a fração FM7

com RT 4,388 min apresentou λ_{max} 261 nm e com RT 10,174 min λ_{max} 259 nm, e as substâncias presentes nessas amostras podem ter grupos nitrogenados de acordo com os resultados apresentados pelas CCDs. Para essa amostra foi realizada uma nova coluna cromatográfica (30 cm x 0,5 cm) em gel (Sephadex LH-20), utilizando como fase móvel MeOH/H_2O (1:1) no intuito de coletar os picos majoritários e foram coletadas 6 frações. Após a coleta, essas novas frações foram analisadas em CLAE (Figuras 13 e 14), e aquelas que não apresentaram nenhum pico ou com picos de baixa intensidade foram descartadas.

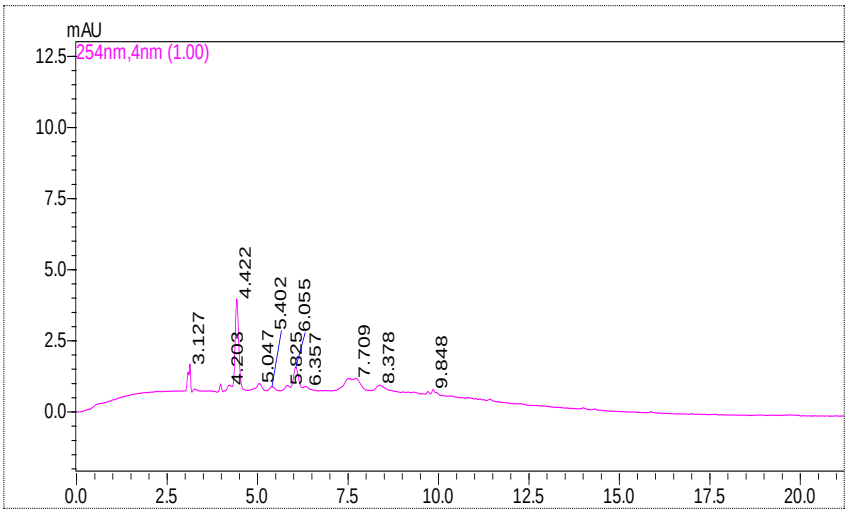


Figura 13: Cromatograma analítico da subfração FM7-5 a partir da fração FM7 do extrato metanólico de *N. gardneri*, no modo gradiente MeCN/H_2O 5:95 → MeCN 100% em 40 min com fluxo de 1,0 mL/min. C18. λ = 254 nm.

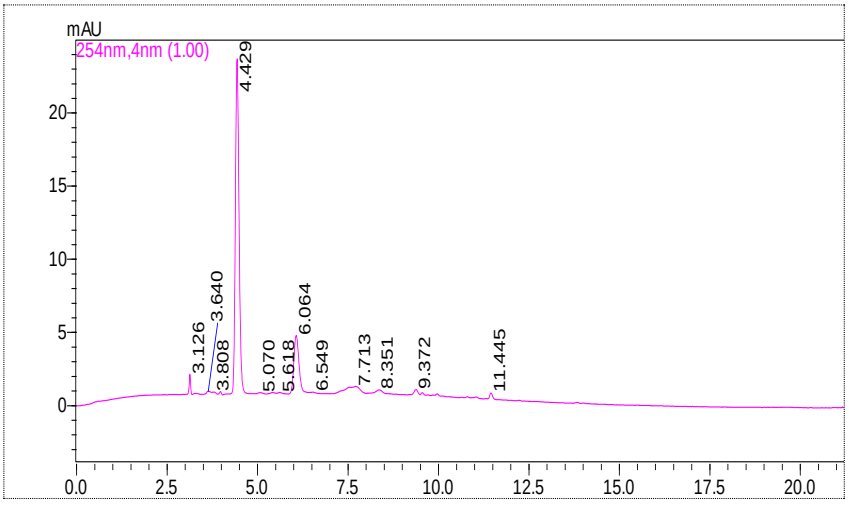


Figura 14: Cromatograma analítico da subfração FM7-6 a partir da fração FM7 do extrato metanólico de *N. gardneri*, no modo gradiente MeCN/H_2O 5:95 → MeCN 100% em 40 min com fluxo de 1,0 mL/min. C18. λ = 254 nm.

Com a realização da nova coluna cromatográfica em gel (Sephadex LH-20) de fase móvel MeOH/H_2O (1:1), a partir da fração FM7 foi separado o composto com o terceiro pico de interesse com TR 4.429 min e banda λ_{max} 261 nm. (Figura 15)

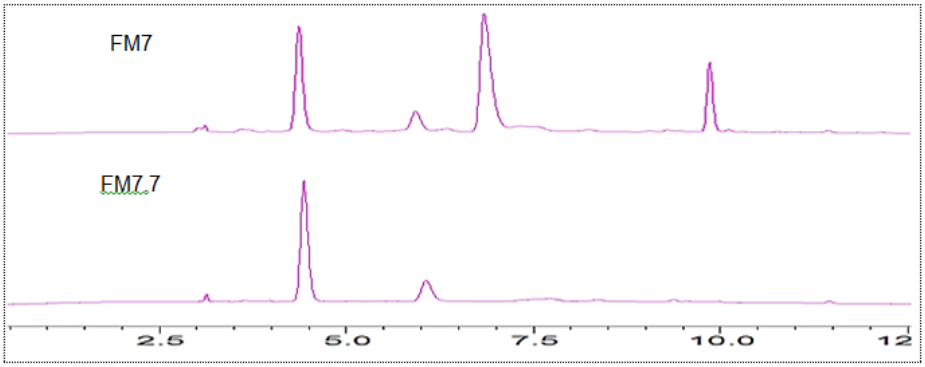


Figura 15: Cromatograma representativo da coluna cromatográfica em sílica gel (Sephadex LH-20), com a fase móvel MeOH/H_2O (1:1), com a separação do terceiro pico de interesse.

3.3.4 Fração 8 - FM8 (2,5 mg)

Esta fração apresentou apenas um pico majoritário, e sua análise se demonstra como uma substância pura por CCD e CLAE-DAD-UV (Figura 16).

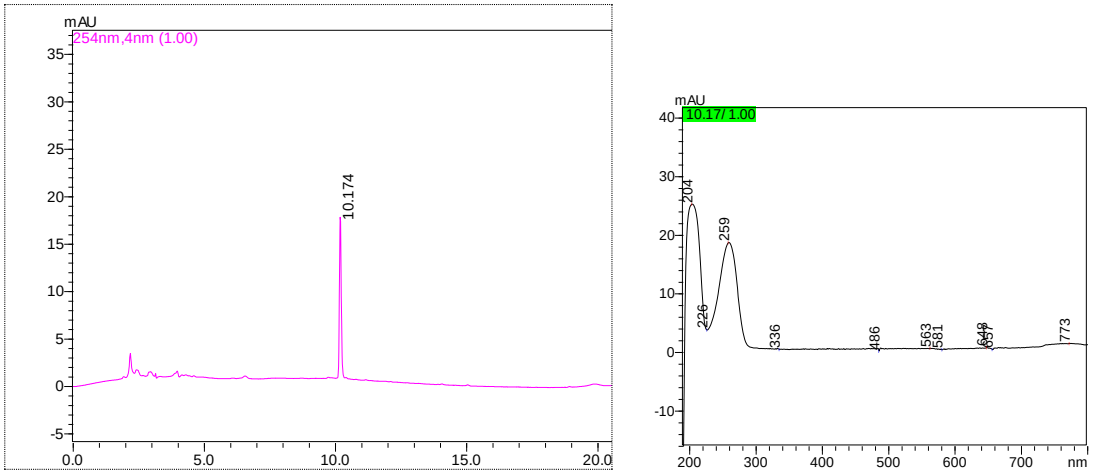


Figura 16: Cromatograma analítico da fração FM8 a partir do extrato metanólico de *N. gardneri*, no modo gradiente MeCN/H_2O 5:95 → MeCN 100% em 40 min com fluxo de 1,0 mL/min. C18. λ = 254 nm e espectro de UV.

O composto foi analisado por LC-MS, RMN de ^{1}H e ^{13}C e IV para identificação da substância.

3.3.5 Fração 9 - FM9 (5,9 mg)

A análise da fração FM9 por CCD e CLAE-DAD-UV (figura 17) demostrou o isolamento do composto 2.

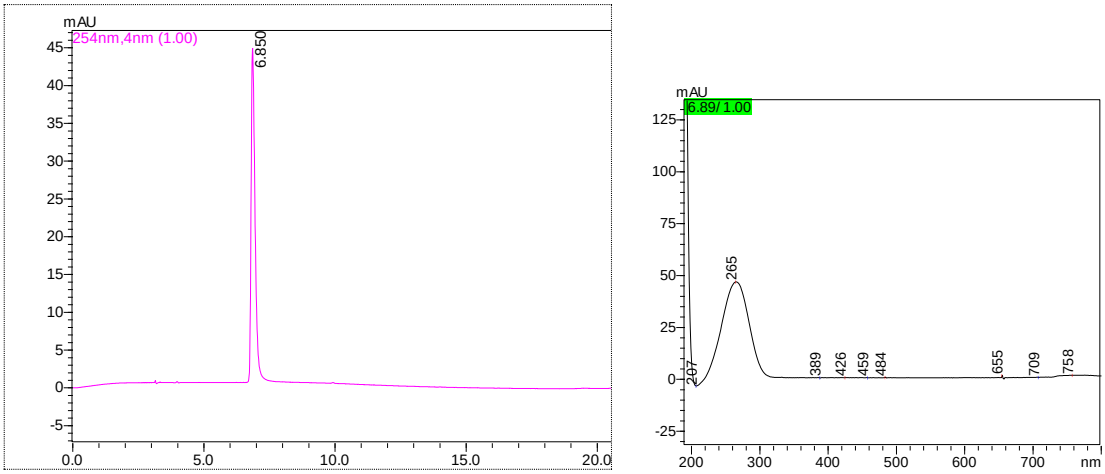


Figura 17: Cromatograma analítico da fração FM9 a partir do extrato metanólico de *N. gardneri*, no modo gradiente MeCN/H_2O 5:95 → MeCN 100% em 40 min com fluxo de 1,0 mL/min. C18. λ = 254 nm e espectro de UV.

As frações apresentadas na Figura 10 do cromatograma (FM8) e (FM9) foram consideradas puras com o seu perfil analisado em CLAE e cromatoplacas, com TR 10,174 min com λ_{max} 259 nm, e com TR em 6,850 min e λ_{max} 265 nm.

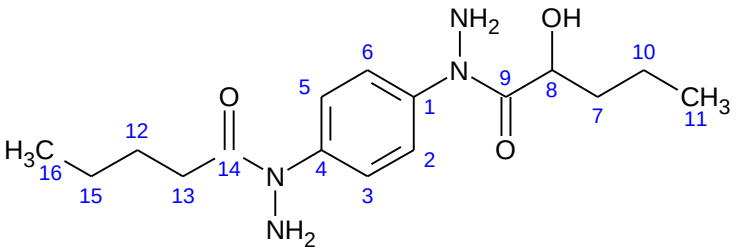
O composto isolado foi analisado por LC-MS, RMN de ^{1}H e ^{13}C e IV para identificação da substância.

3.4 Identificação e elucidação estrutural dos compostos isolados

As análises para a identificação e elucidação das estruturas das substâncias isoladas foram realizadas através da espectrometria de massas, espectroscopia de RMN de ^{1}H e ^{13}C e a espectroscopia de infravermelho (IV).

3.4.1 Análise por LC-MS/MS, IV e RMN

3.4.1.1 NgF8 (2,5 mg)



Substância 1

A substância 1 (NgF8) foi isolada como um líquido incolor de massa 2,5 mg a partir de uma coluna cromatográfica em gel (Sephadex LH-20). O espectro de massas de alta resolução EM-IES (-) da substância 1 apresentou pico para molécula em *m/z* 313,4070 $[M-H]^+$ no modo negativo, m/z 337,2345 $[M+Na]^+$ e 629,4980 $[2M+H]^+$(Figura 20). O espectro de IV (Figura 18) mostrou a presença de hidroxila (1272 e 1072 cm^{-1}), carbonila (1726 cm^{-1}) e estiramentos N-H (2121 e 1601 cm^{-1}). As análises dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C sugeriu a fórmula molecular $C_{16}H_{26}N_4O_3$.

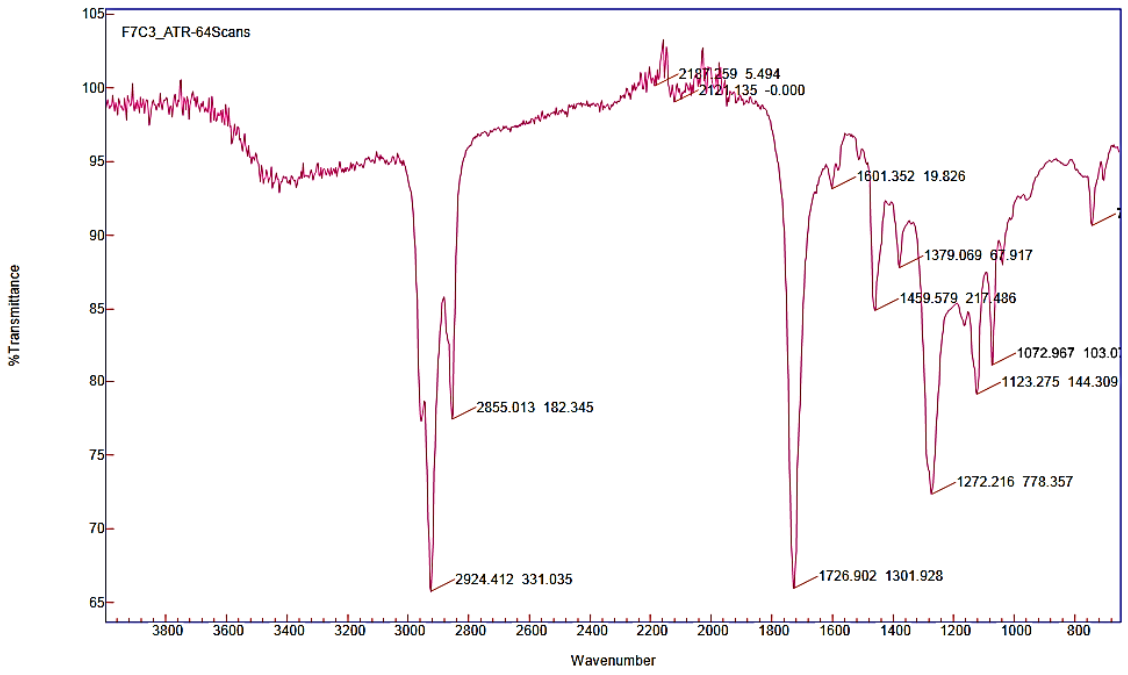


Figura 18: Espectro de infravermelho da substância 1.

Os dados espectrais do RMN de ^{1}H observados mostrou quatro dubletos atribuídos a metínicos de hidrogênios de aromáticos em δH 7,61 (*s*; 1H; H3;H5); 7,70 (*s*; 1H; H2;H6), evidenciando um anel aromático dissubistituído. Assim como também foram observados cinco multipletos atribuídos aos hidrogênios metilênicos em δH 1,42 (*m*; 2H; H13); 1,31 (*m*; 2H; H12); 1,33 (*m*; 2H; H15); 1,67 (*m*; 2H; H7); 1,43 (*m*, 2H, H10). Somando-se os hidrogênios das metilas, dois tripletos, em δH 0,91 (*t*; 3H; H16); 0,95 (*t*; 3H; H11) e um sexteto em δH 4,20 (*st*; 1H; H8).

Os espectros de RMN ^{13}C e DEPT indicaram 16 átomos de carbono atribuíveis para duas metilas, cinco metilenos, cinco metínicos e a presença de duas carbonilas. A análise dos espectros de RMN ^{1}H e ^{13}C (Tabela 2) e técnicas de RMN 2D (COSY, HSQC e HMBC) da substância **1** aponta uma estrutura de uma hidrazida. As atribuições para os espectros de RMN foram confirmadas pelas técnicas COSY e HMBC. O espectro COSY mostrou correlações entre H8↔H7↔H10↔H11 e H12↔H15↔H16 (Figura 26).

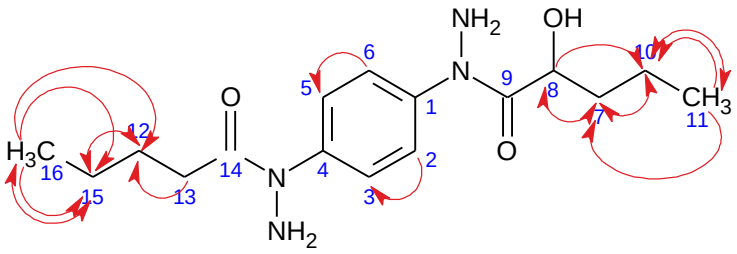


Figura 19: Correlações COSY (seta dupla) e HMBC (H→C) para a substância 1.

O espectro de RMN de ^{13}C aliado ao experimento de HSQC apresentou a existência de duas carbonilas em δC 169,35 (C9; C14), cinco carbonos metínicos em δC 129,86 (C2; C6); 132,41 (C3; C5) e 69,09 (C8), cinco metilênicos δC 31,59 (C13); 30,15 (C12); 24,05 (C15); 40,14 (C7) e 24,97 (C10) e dois carbonos metílicos δC 14,42 (C16) e 11,44 (C11). Todos os carbonos foram atribuídos aos respectivos átomos de hidrogênio com base nos experimentos de HSQC.

As posições dos hidrogênios foram ainda ratificadas pelas correlações HMBC do carbono (δC 132,41, C3 e C5) com o hidrogênio aromático H6 (δH 7,70), (δC 30,15, C12) com os hidrogênios metilênicos H13 (δH 1,42) e os hidrogênios metílicos H16 (δH 0,91), o carbono secundário (δC 24,05, C15) com o hidrogênio H16 (δH 0,91), e na outra parte da estrutura molecular os carbonos secundários (δC

40,14, C7); (δC 24,97, C10) com os hidrogênios metílicos H11 (δH 0,95); para o carbono primário (δC 11,44, C11) com o hidrogênio metínico H8 (δH 4,20) (Tabela 2).

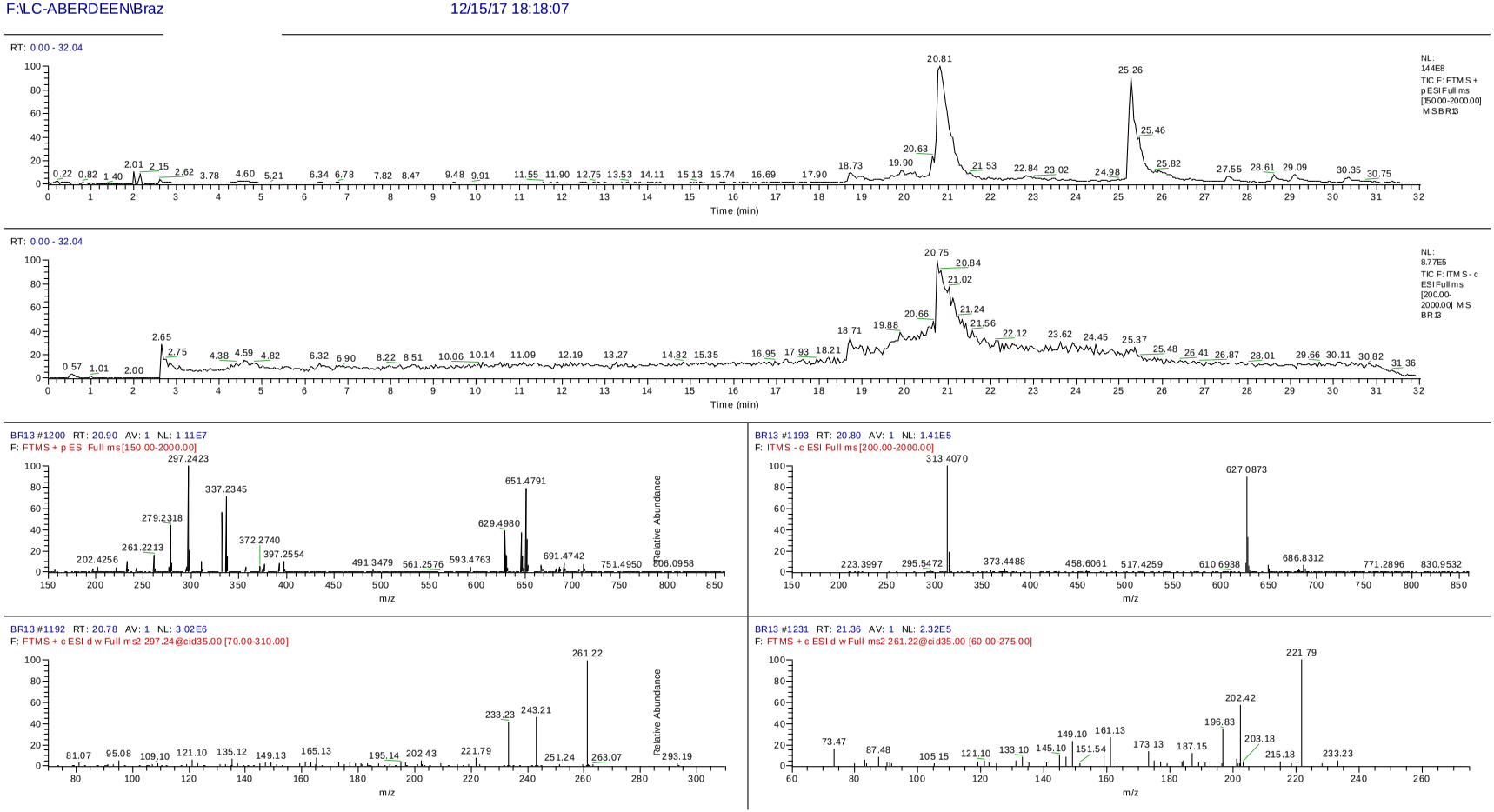


Figura 20: Cromatograma de massas EM – IES (-) da substância 1.

Tabela 2: Dados espectrais de RMN ^{1}H e ^{13}C da substância NgF8 em CD_3OD, J em Hz, δ em ppm.

C	HSQC		HMBC		COSY
	δC	δH	$^{2}J_{CH}$	$^{3}J_{CH}$	
1	133,57	-			
4	133,57	-			
9	169,35	-			
14	169,35	-			
CH					
2	129,86	7,70 (d,6)			
3	132,41	7,61 (d,6)	H-2		
5	132,41	7,61 (d,6)	H-6		
6	129,86	7,70 (d,6)			
8	69,09	4,20 (st)			H-7
CH_2					
13	31,59	1,42 (m)			H-16
12	30,15	1,31 (m)	H-13	H-16	H-15
15	24,05	1,33 (m)	H-16		H-16
7	40,14	1,67 (m)		H-11	H-10
10	24,97	1,43 (m)	H-11		
CH_3					
16	14,42	0,91 (t)			H-12
11	11,44	0,95 (t)		H-8	H-10

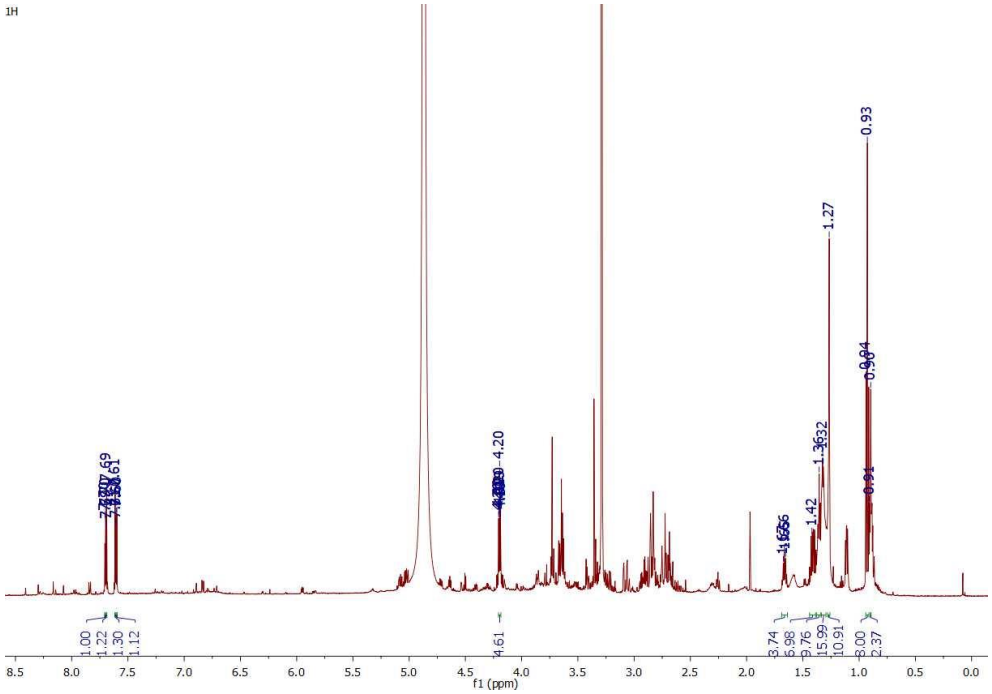


Figura 21: Espectro de RMN 1H da substância 1 (500 MHz, CD_3OD).

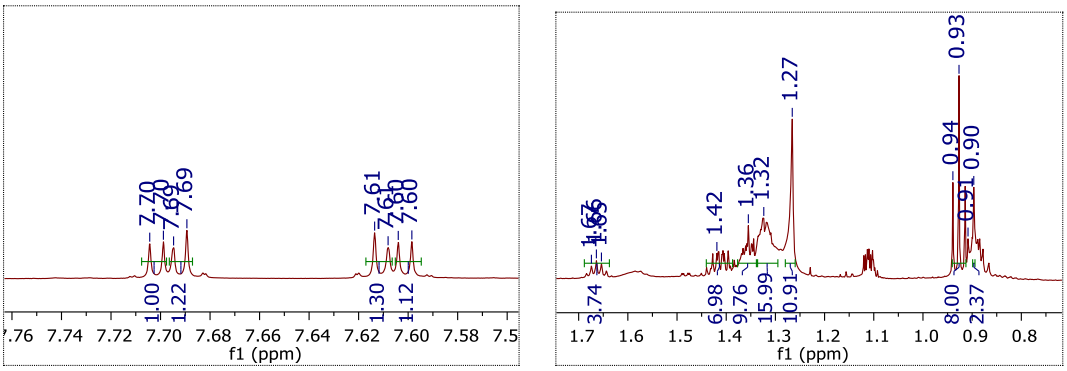


Figura 22: Ampliação do espectro de RMN ^1H da substância 1 (500 MHz, CD_3OD).

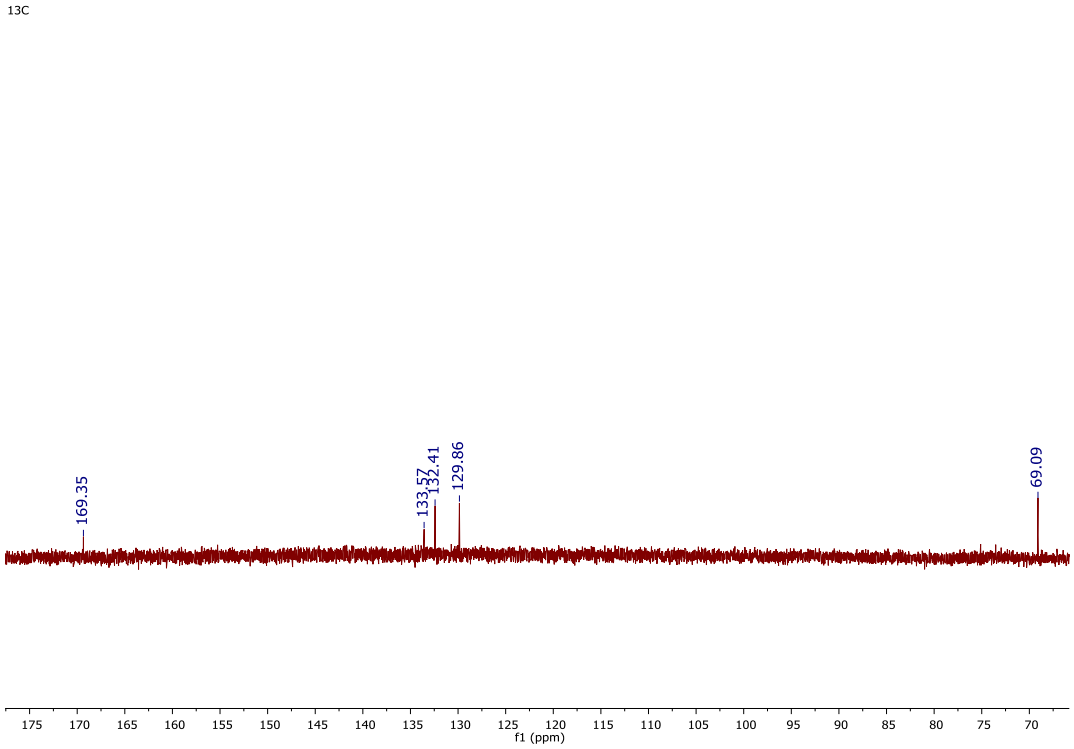


Figura 23: Espectro de RMN ^{13}C da substância 1 (500 MHz, CD_3OD).

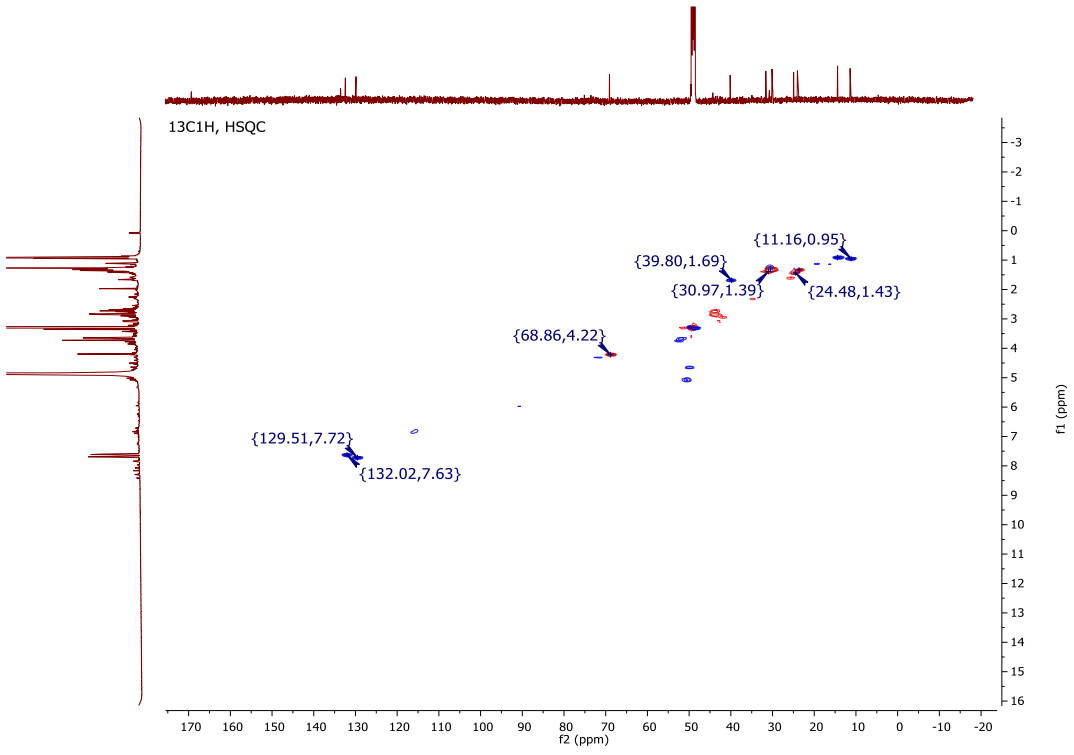


Figura 24: Espectro de RMN 2D - HSQC da substância 1 (500 MHz, CD_3OD).

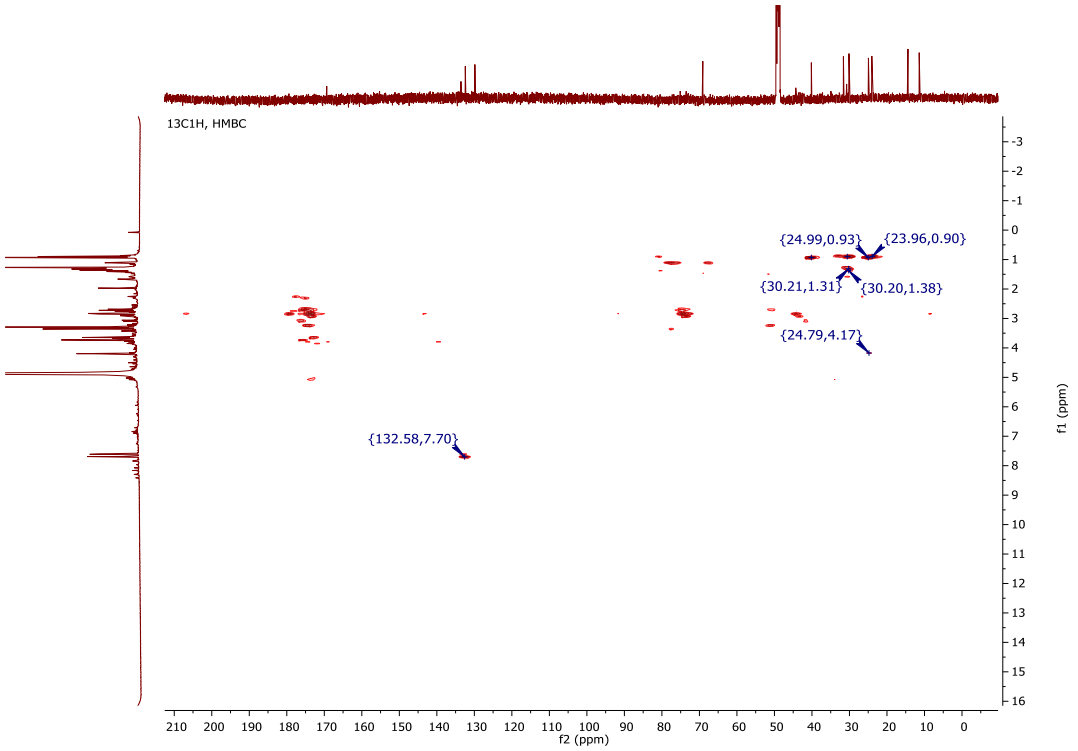


Figura 25: Espectro de RMN 2D - HMBC da substância 1 (500 MHz, CD_3OD).

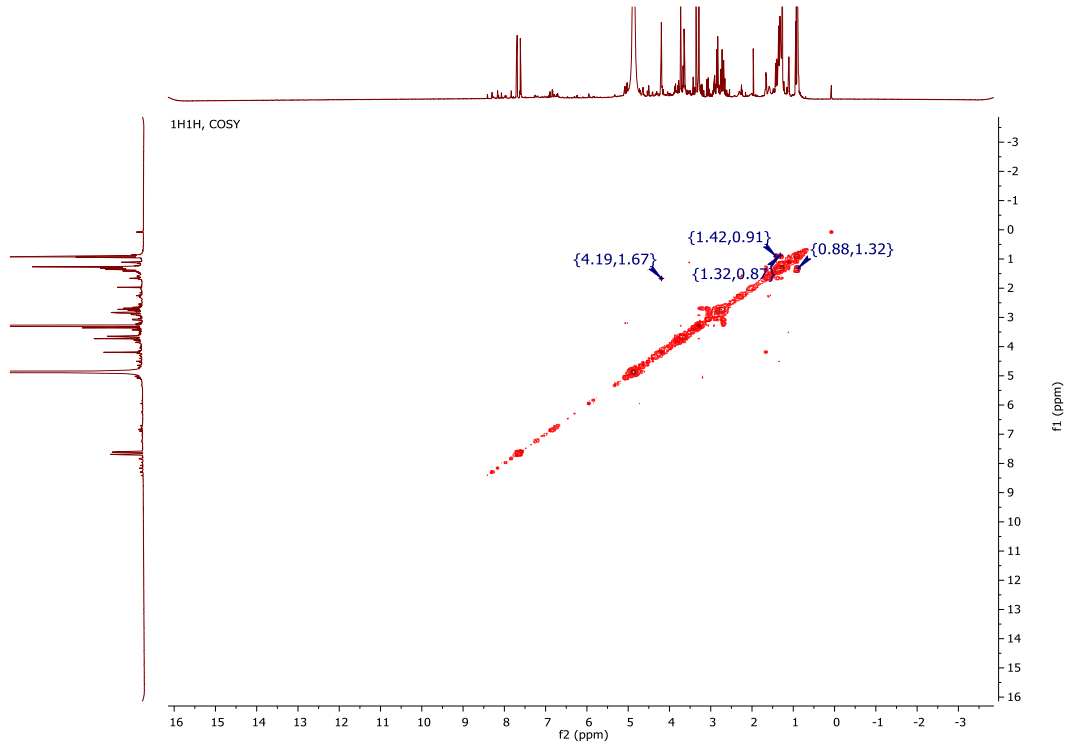


Figura 26: Espectro de RMN 2D - COSY da substância 1 (500 MHz, CD_3OD).

3.4.1.2 NgF9 (5,9 mg)

A substância **2** (NgF9) foi isolada como um líquido incolor de massa 5,9 mg a partir de uma coluna cromatográfica em gel (Sephadex LH-20). De acordo com a análise do cromatograma analítico mostrou um pico em 6,85 min. O espectro EM-IES (-) mostrou íon para a molécula com m/z 313,3753 $[M-H]^+$ no modo negativo, m/z 337,2347 $[M+Na]^+$ e m/z 627,0191 $[2M-H]^+$ (Figura 29). Os dados de RMN de ^1H e ^{13}C, sugerindo a fórmula molecular $C_{18}H_{27}NO_5$. O espectro de IR (Figura 27) mostrou a presença de hidroxilas (1272 e 1073 cm^{-1}), carbonila (1733 cm^{-1}) e estiramentos de aminoácidos (2357 cm^{-1}).

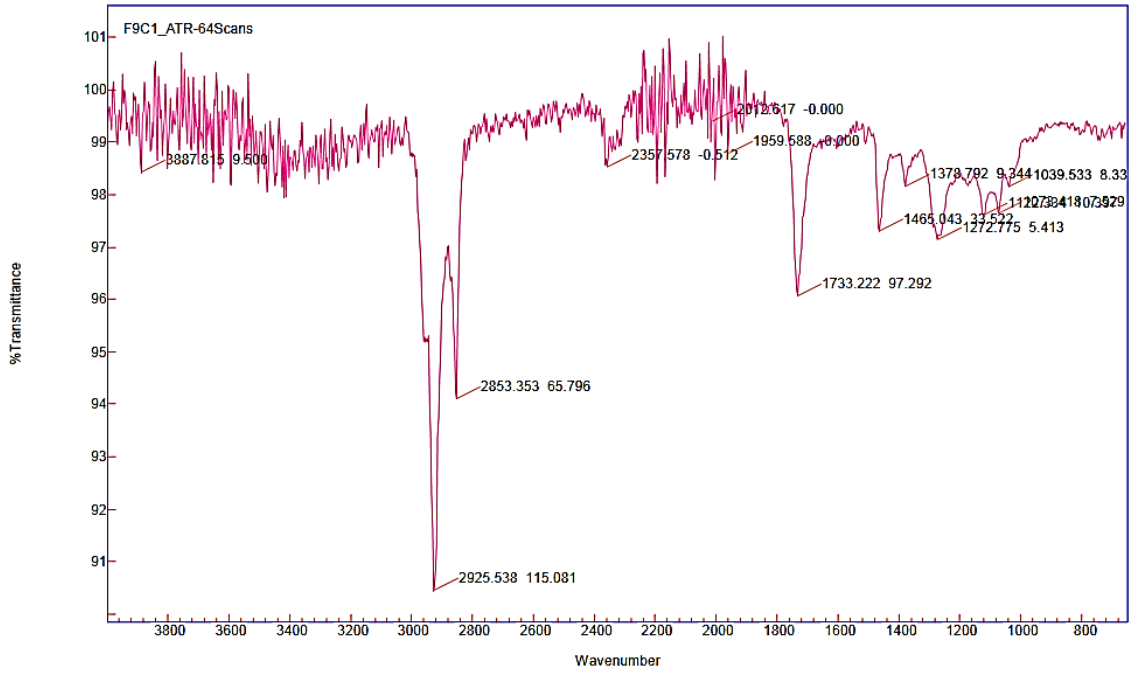


Figura 27: Espectro de infravermelho da substância 2.

Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C da substância 2 (Tabelas 3) sugeriram uma estrutura semelhante à da substância **2**. Com 18 átomos de carbono dispostos em duas metilas, seis metilenos, seis metinas e a presença de duas carbonilas. A análise dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C e técnicas de RMN 2D (COSY, HSQC e HMBC) da substância **2** estabelece uma estrutura de um peptídeo. A estrutura foi

confirmada pelas técnicas COSY e HMBC. O espectro COSY mostrou correlações entre H2↔H3; H5↔H6; H11B↔H9↔H10 e H14↔H18↔H7 (Figura 33).

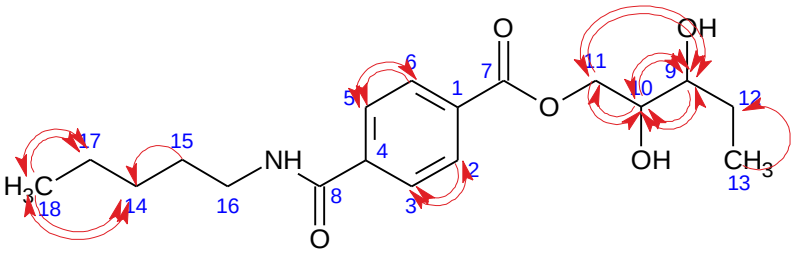


Figura 28: Correlações COSY (seta dupla) e HMBC (H→C) para a substância 2.

Para o RMN de ^{1}H foram-se observados quatro dubletos atribuídos às metinas de hidrogênios de aromáticos em *δ*H 7,70 (*d*; 1H; H3;H5); 7,61 (*d*; 1H; H2;H6), evidenciando um anel aromático dissubistituído e também foram observados três multipletos, dois atribuídos aos hidrogênios metilênicos em *δ*H 1,66 (*m*; 2H; H16) e 1,58 (*m*; 2H; H15), o outro hidrogênio metínico 3,69 (*m*; 1H; H9). Somando-se os hidrogênios das metilas, dois tripletos, em *δ*H 0,90 (*t*; 3H; H13); 0,94 (*t*; 3H; H16).

O espectro de RMN de ^{13}C aliado ao experimento de HSQC apresentou a existência de duas carbonilas em *δ*C 178,98 (C7) e *δ*C 181,21 (C8), seis carbonos metínicos em *δ*C 130 (C3; C3); 132,46 (C2; C6); 72,88 (C9) e 71,48 (C10), seis metilênicos *δ*C 39,73 (C16); 30,31 (C14); 24,50 (C12); 26,13 (C15); 23,55 (C7) e 64,72 (C11) e dois carbonos metílicos *δ*C 14,04 (C18) e 11,03 (C13). Todos os carbonos foram atribuídos aos respectivos átomos de hidrogênio com base nos experimentos de HSQC.

Para os hidrogênios, apresentam as seguintes correlações HMBC do carbono (*δ*C 130, C3 e C5) com o hidrogênio aromático H2 e H6 (*δ*H 7,70), para os carbonos secundários (*δ*C 71,48, C10) com os hidrogênios H11A (*δ*H 3,81), H11B (*δ*H 3,62) e H9 (*δ*H 3,69); (*δ*C 24,50, C12) com os hidrogênios metílicos H13 (*δ*H 0,90); (*δ*C 64,72, C11) com o hidrogênio metínico H10 (*δ*H 3,77); os carbonos primários (*δ*C 72,88, C9) com os hidrogênios H10 (*δ*H 3,77), H11A (*δ*H 3,81), e H11B (*δ*H 3,62); (*δ*C 11,44, C12) com o hidrogênio metínico H9 (*δ*H 4,20). Para a outra parte da molécula os carbonos secundários (*δ*C 30,31, C14) com os hidrogênios metílicos H18 (*δ*H 0,94) e metilênicos H15 (*δ*H 1,58); (*δ*C 23,55, C7) com o hidrogênio metílico H18 (*δ*H 0,94) (Tabela 3).

Tabela 3: Dados espectrais de RMN ^{1}H e ^{13}C da substancia NgF9 em CD_3OD, J em Hz, δ em ppm.

C	H	HSQC		HMBC		COSY
		δ_C	δ_H	$^{2}J_{CH}$	$^{3}J_{CH}$	
1			-			
4			-			
7		178,98	-			
8		181,21	-			
CH						
2		132,46	7,61			H-3
3		130	7,70	H-2		H-2
5		130	7,70	H-6		H-6
6		132,46	7,61			H-5
10		71,48	3,77	H-9/ H-11A/ H-11B		H-9
9		72,88	3,69 (m)	H-10	H-11A/H-11B	H-10/H-11B
CH_2						
11	11-A	64,72	3,81 (d)	H-10		
	11-B		3,62(d)			H-9
16		39,73	1,66 (m)			
15		26,13	1,58 (m)			
14		30,31	1,28 (s)	H-15	H-18	
7		23,55	1,32	H-18		
12		24,50	1,42	H-13		
CH_3						
18		14,04	0,94 (t)			H-14/H-7
13		11,03	0,90			

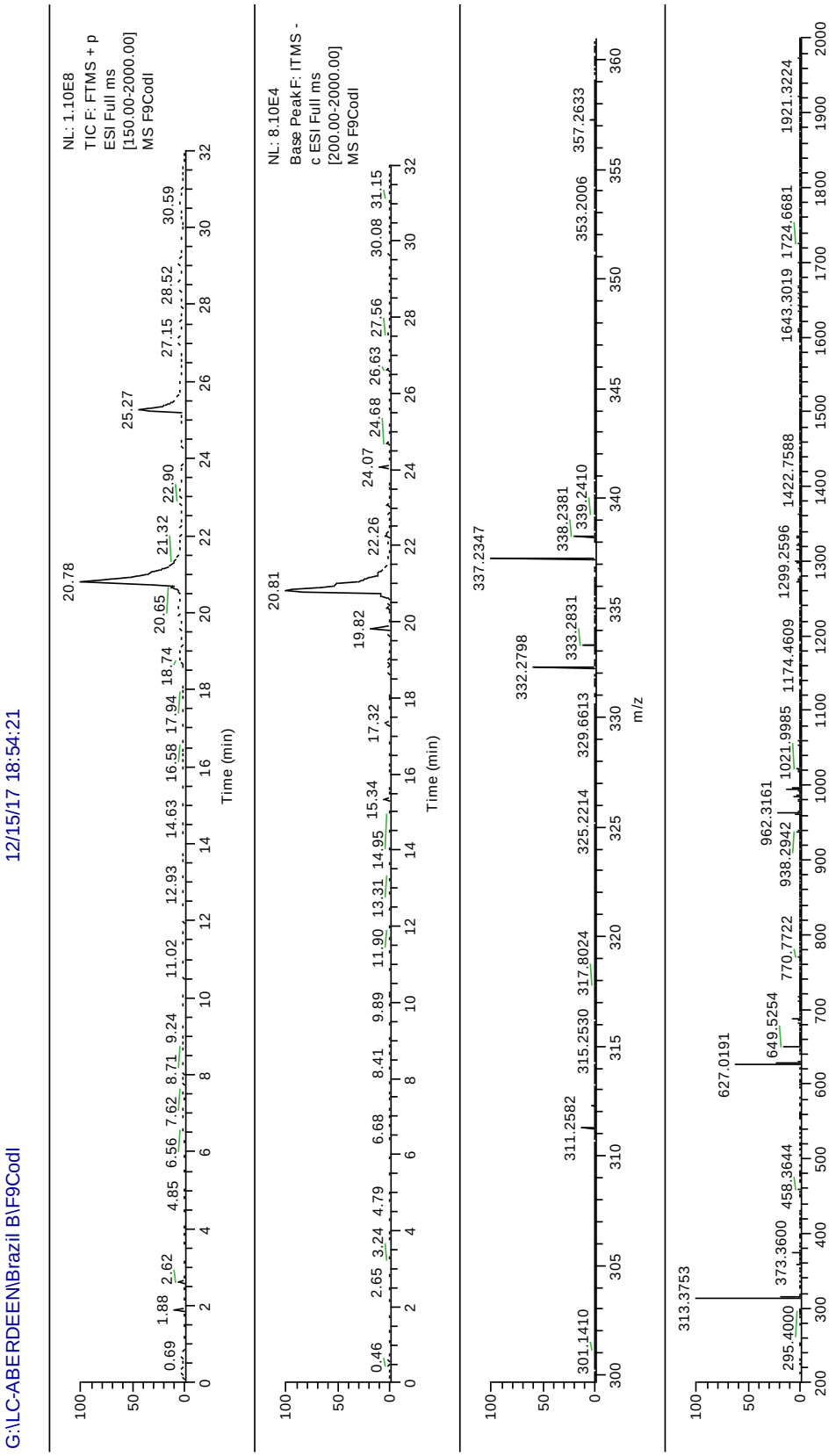


Figura 29: Cromatograma de massas EM – IES (+) da substância 2.

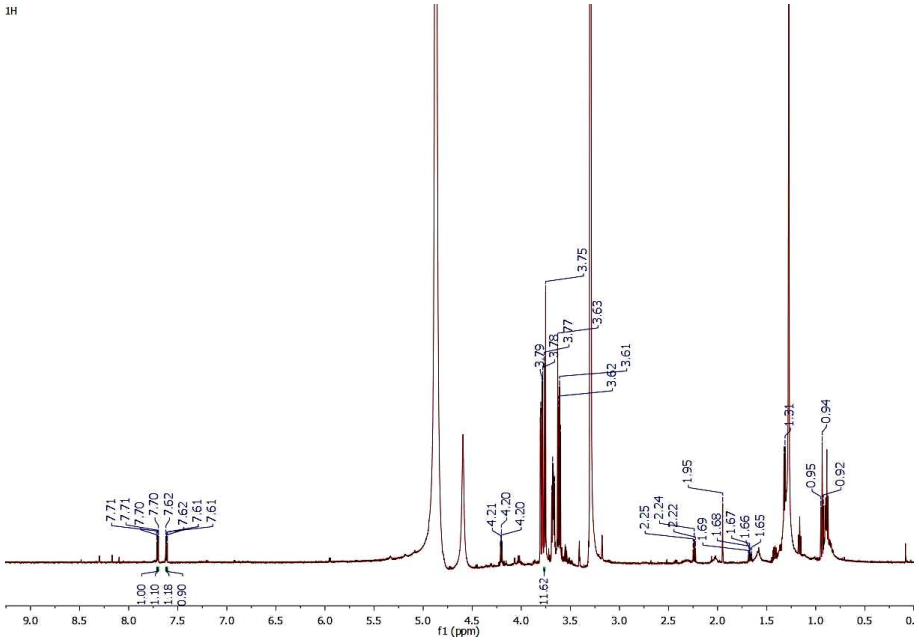


Figura 30: Espectro de RMN ^{1}H da substância 2 (500 MHz, CD_3OD).

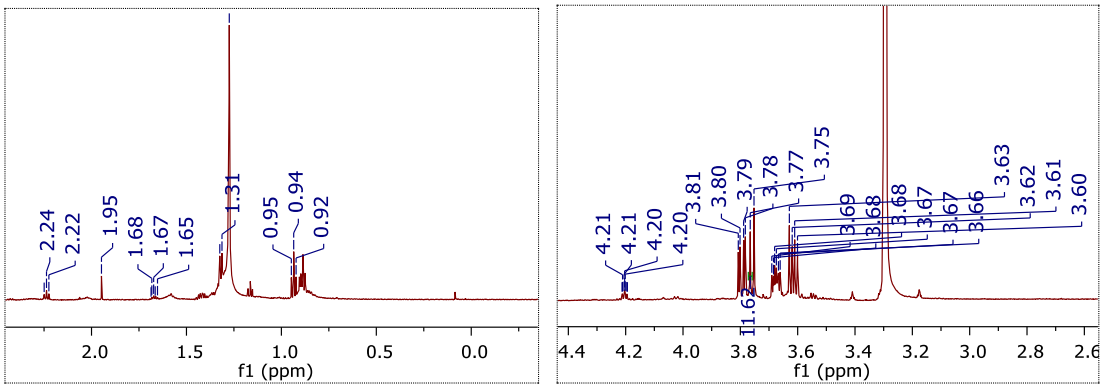


Figure 1: Ampliação do espectro de RMN 1H da substância 2 (500 MHz, CD_3OD).

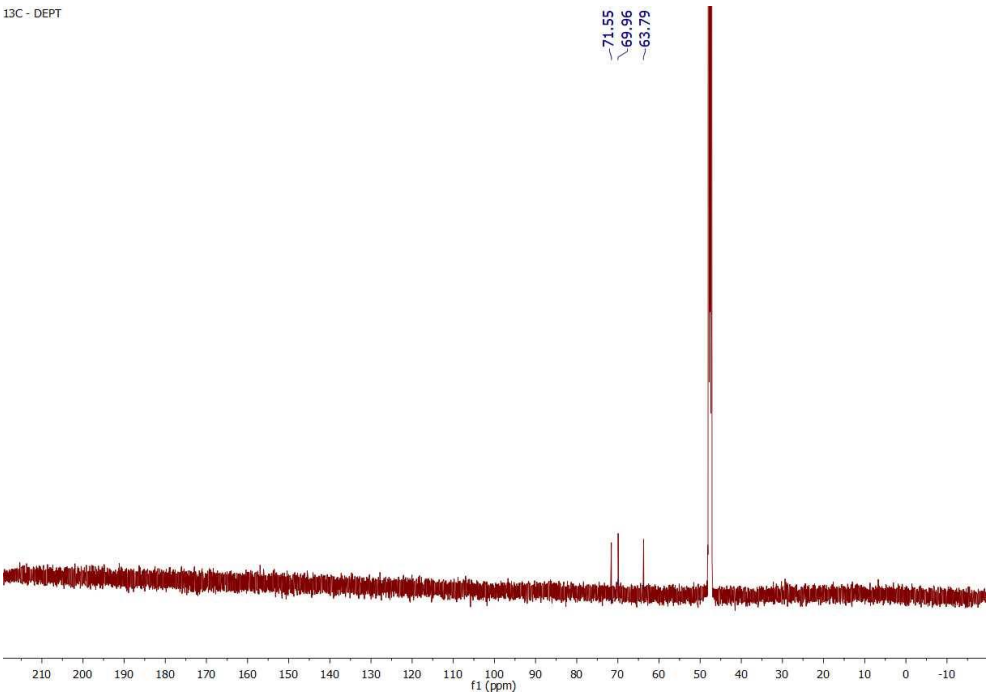


Figura 31: Espectro de RMN ^{13}C da substância 2 (500 MHz, CD_3OD).

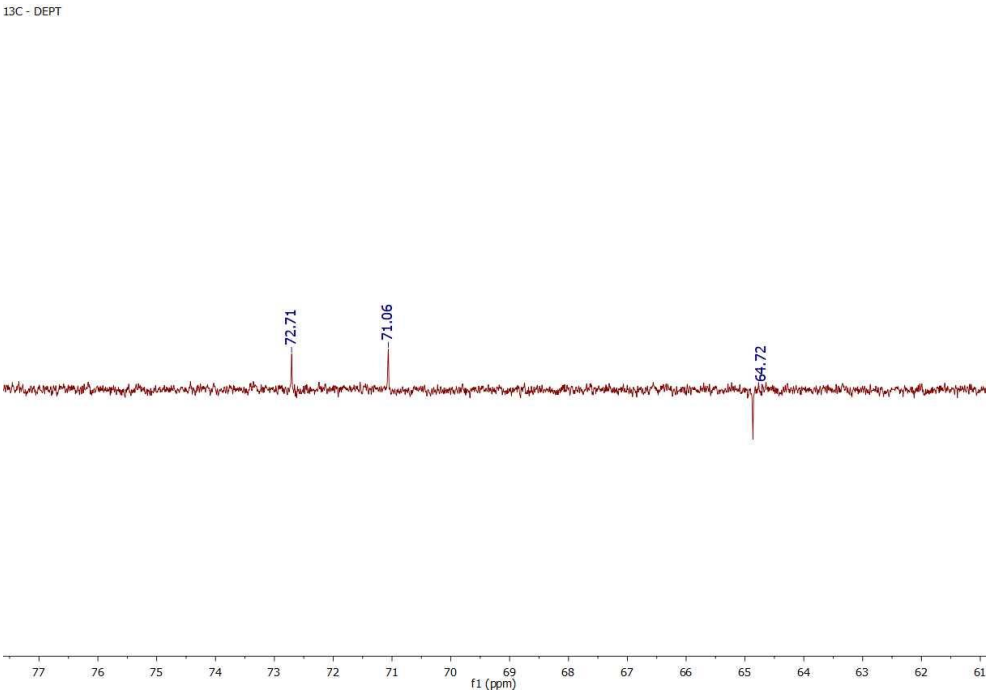


Figura 32: Espectro de RMN 13C - DEPT da substância 2 (500 MHz, CD3OD).

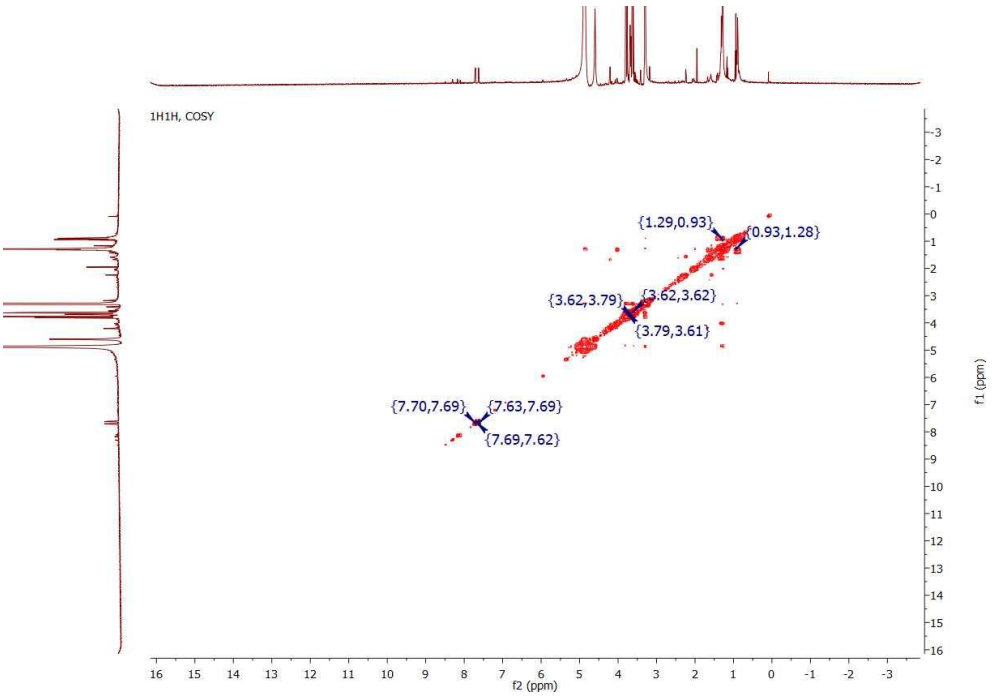


Figura 33: Espectro de RMN 2D - COSY da substância 2 (500 MHz, CD_3OD).

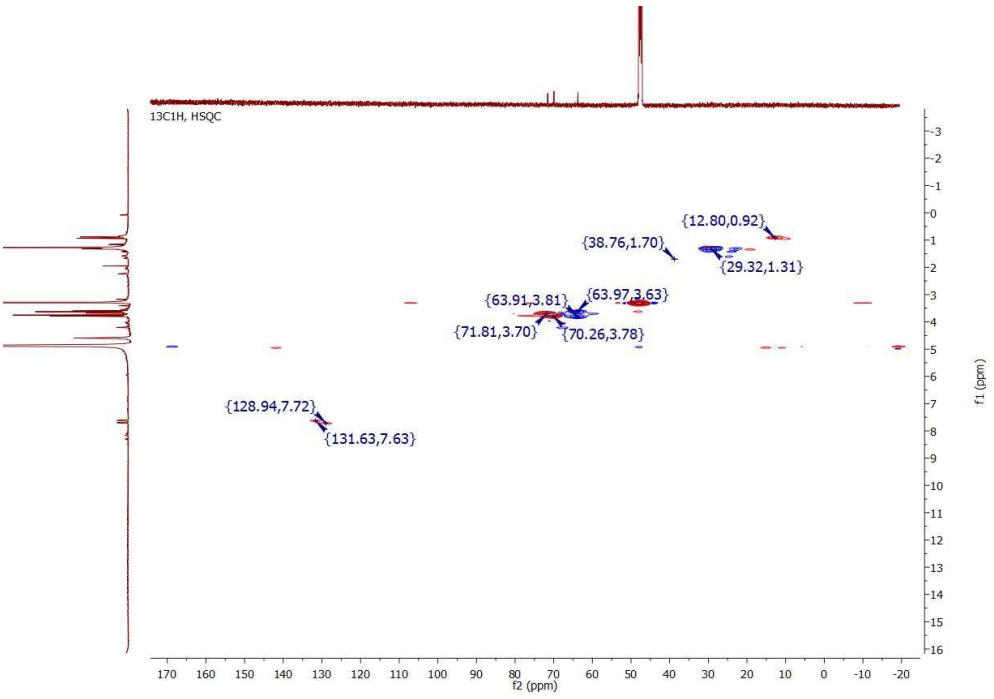


Figura 34: Espectro de RMN 2D - HSQC da substância 2 (500 MHz, CD_3OD).

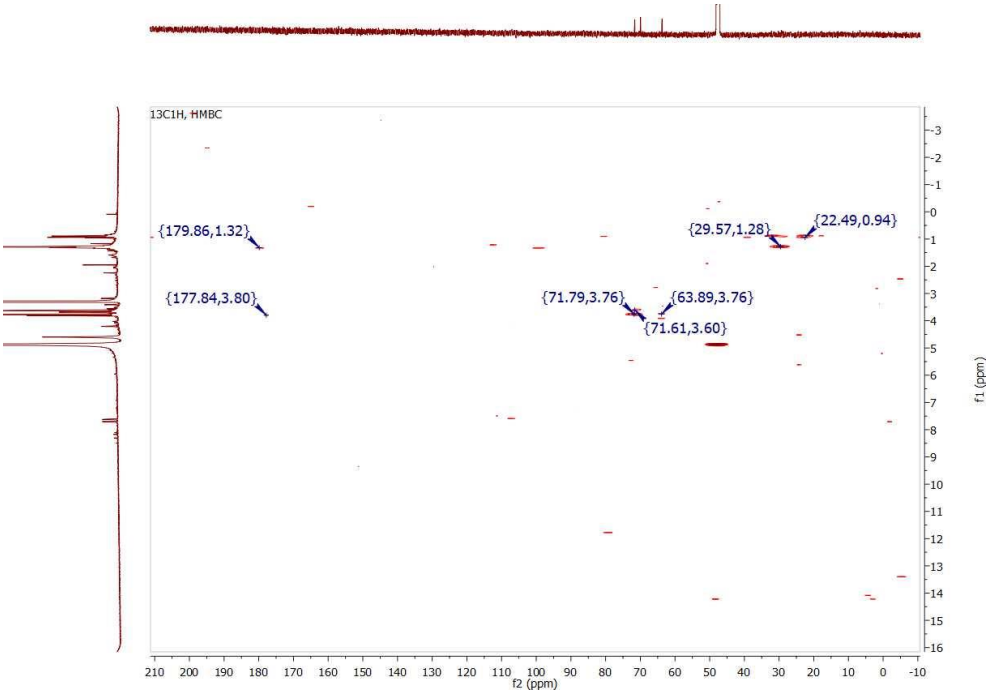


Figura 35: Espectro de RMN 2D - HMBC da substância 2 (500 MHz, CD_3OD).

3.5 Considerações sobre os ensaios realizados com os extratos metanólico, etanólico e acetato de etila

3.5.1 Atividade de eliminação do radical catiônico DPPH

A avaliação antioxidante dos extratos de *N. gardneri* foi investigada segundo o método descrito por BRAND-WILLIANS, 1995 e VIEIRA, 2011.

O princípio deste ensaio baseia-se na propriedade do radical DPPH possuir uma forte absorção no espectro visível, e quando se faz a mistura reacional com a presença de substâncias antioxidantes (Figura 36), ou seja, capazes de capturar radicais livres, a solução resultante possui um grau de descoloração (Figura 37) e a queda da leitura da densidade óptica das amostras.

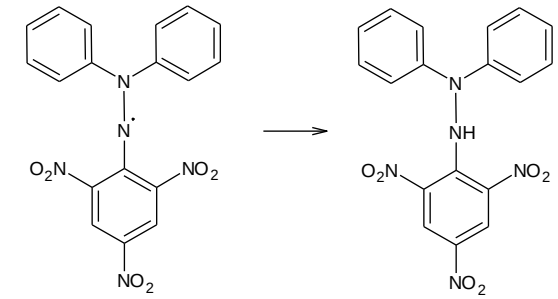


Figura 36: Estrutura do DPPH e reação antioxidante

Os extratos metanólico, etanólico e de acetato de etila foram analisadas em comprimento de onda de 517 nm, e 30 min após a adição da mistura reacional, a média dos dados obtidos pelo decaimento das absorbâncias foi calculada juntamente com as medidas obtidas com o controle positivo. Uma forma bem comum de expressar os resultados é calcular a quantidade do oxidante capaz de capturar a metade dos radicais livres $DPPH^{\bullet}$ presentes na mistura reacional. Este cálculo indicador é chamado de CE_{50}. Quanto menor o valor do CE_{50} apresentados nas análises dos extratos, menor a concentração do extrato para reduzir 50% do radical livre $DPPH^{\bullet}$ e maior será sua atividade antioxidante.

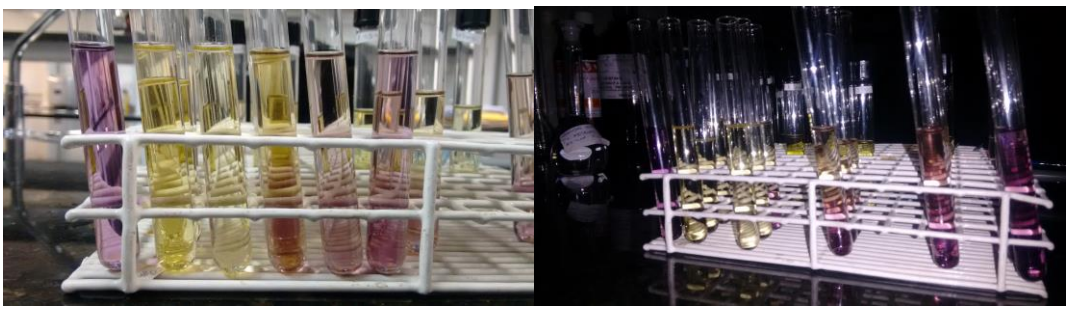


Figura 37: Ensaio de eliminação do radical catiônico DPPH (foto: acervo particular)

A atividade de inibição para o radical $DPPH^{\bullet}$ do extrato de metanólico foi mais elevada que todos os outros extratos no intervalo de concentração 1,0 – 7,0 mg/mL. O extrato de metanólico de *N. gardneri*, a 7,0 mg/mL, mostrou uma atividade de inibição bem superior, equiparando-se a atividade do controle positivo ácido ascórbico, dos demais tipos de extrato (Figura 38).

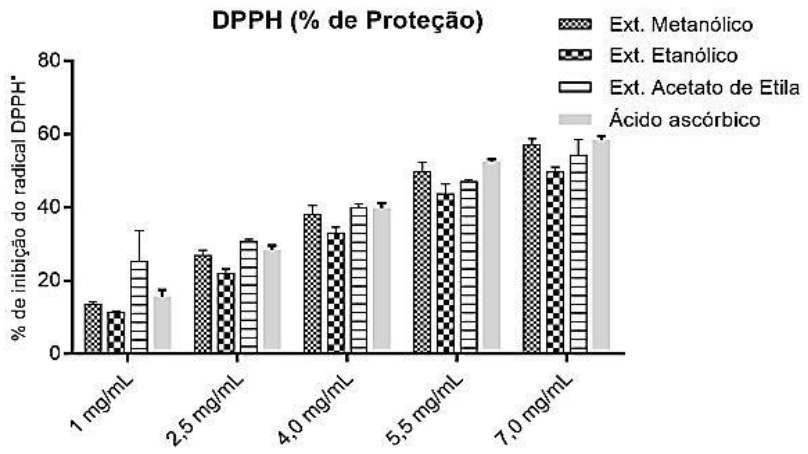


Figura 38: Porcentagem de inibição do extrato metanólico, etanólico e de acetato de etila a partir de *N. gradneri*.

Os extratos metanólico, etanólico e de acetato de etila apresentaram inibição dos radicais DPPH• em diferentes resultados de acordo com a concentração, mostrando que todos os extratos têm atividade sequestradora do radical DPPH•. Apenas o extrato metanólico, na concentração de 7,0 mg/mL, apresentou atividade antioxidante em torno de 60%, equiparando-se ao controle positivo.

Tabela 4: Conteúdo de atividade antioxidante (CE_{50}) para DPPH•.

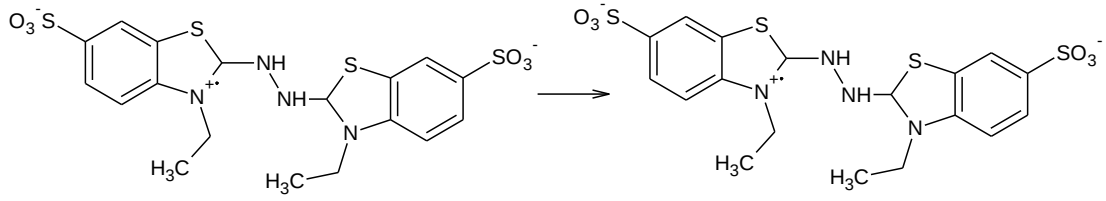
EXTRATO	CE_{50} ± mg/mL
	DPPH•
Metanólico	5,765 ± 0,160
Etanólico	6,895 ± 0,070
Acetato de Etila	6,202 ± 0,480
Controle*	3,223 ± 0,089

*para o DPPH• o ácido ascórbico; ± Desvio padrão da média, com n=3; Para ANOVA e o teste Tukey ($p<0,05$).

3.5.2 Atividade de eliminação do radical catiônico ABTS

O princípio deste ensaio baseia-se na propriedade do radical ABTS possuir uma forte absorção no espectro visível, e quando se faz a mistura reacional com a presença de substâncias antioxidantes (Figura 39), ou seja, capazes de capturar

radicais livres, a solução resultante possui um grau de descoloração e a queda da leitura da densidade óptica das amostras.



2,2´- azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (colração verde-escuro)

2,2´- azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (colração verde-claro)

Figura 39: Estabilização do radical ABTS por um antioxidante

Todos os extratos apresentaram uma boa capacidade de reagir com o radical ABTS. A atividade de inibição para o radical $ABTS^+$ do extrato de metanólico foi mais elevada, assim como no ensaio da atividade de inibição do radical $DPPH^{\bullet}$, que todos os outros extratos no intervalo de concentração 1,0 – 7,0 mg/mL. O extrato de metanólico de *N. gardneri*, a 7,0 mg/mL, mostrou uma atividade de inibição bem superior, equiparando-se a atividade do controle positivo, dos demais tipos de extrato (Figura 40).

A quantidade dos extratos analisados necessários para decrescer a concentração inicial de $ABTS^+$ em 50%, CE_{50} (Tabela 5), variou entre os três extratos, sendo que o extrato metanólico de *N. gardneri* mostrou-se comparável ao controle positivo, ácido ascórbico, enquanto o extrato de acetato de etila apresentou o maior valor no ensaio ABTS. Pois quanto for o maior consumo de $ABTS^+$, menor será a CE_{50} e maior sua atividade antioxidante (SOUSA et al., 2007).

Tabela 5: Conteúdo de atividade antioxidante (CE_{50}) para ABTS+.

EXTRATO	**CE_{50} ± mg/mL**
	$ABTS^+$
Metanólico	6,132 ± 0,190
Etanólico	10,730 ± 0,270
Acetato de Etila	14,090 ± 0,170

Controle*	4,690 ± 0,210

*para o $ABTS^{+}$ o trolox; ± Desvio padrão da média, com n=3; Para ANOVA e o teste Tukey (p<0,05).

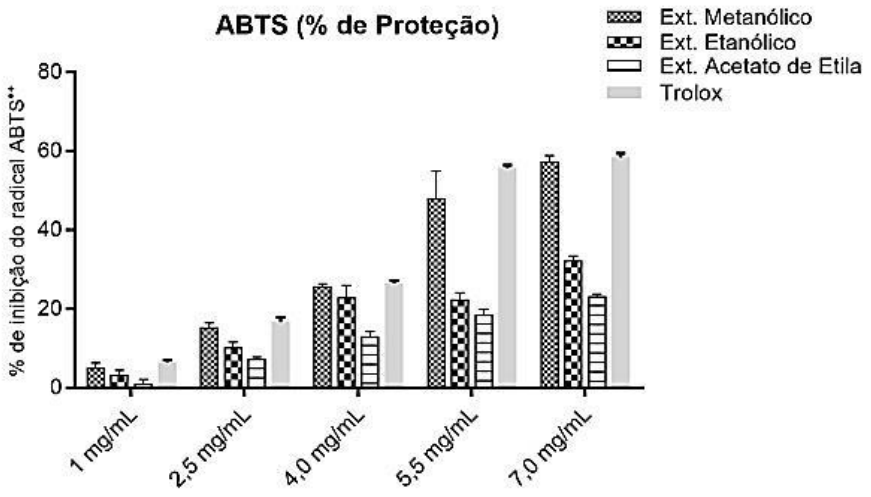


Figura 40: Porcentagem de inibição do extrato metanólico, etanólico e de acetato de etila a partir de *N. gradneri*.

Ao se considerar a análise estatística dos dados dos ensaios de $DPPH^{\bullet}$ e $ABTS^{+}$ em todas as concentrações testadas (1,0 – 7,0 mg/mL), utilizando-se a ANOVA e teste de Tukey, verificou-se que os extratos apresentaram diferenças significativas (p<0,05) no potencial como fontes de substâncias inibitórias de radicais livres.

3.5.3 Atividade de inibição da enzima acetilcolinesterase

Na avaliação dos efeitos das atividades *in vitro* dos extratos metanólico, etanólico e acetato de etila apresentaram resultado negativo o extrato etanólico e baixa inibição para os extratos metanólico e de acetato de etila para inibição da enzima acetilcolinesterase nas concentrações analisadas, visto que há pouca visualização em placa de campo amarelo e halos brancos utilizando-se a cafeína, isolada de *Paulinia cupana* como padrão positivo (Figura 41).

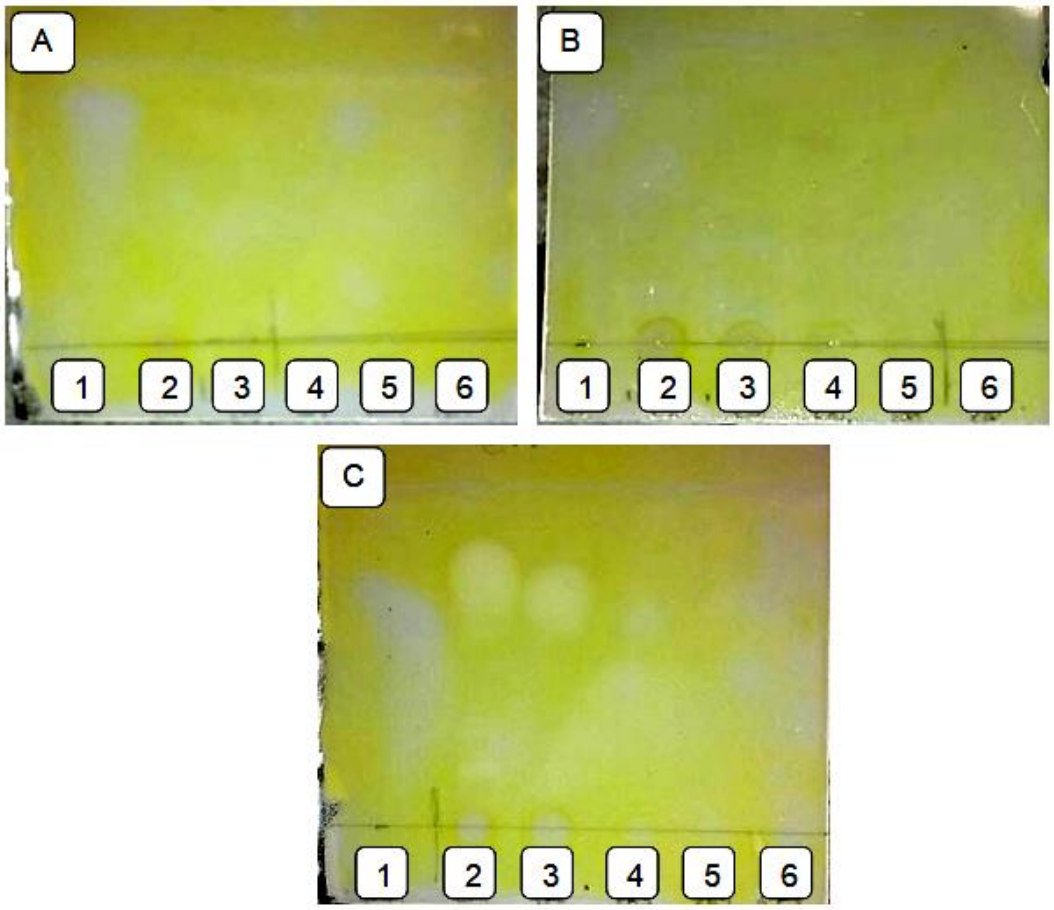


Figura 41: Teste de inibição da enzima acetilcolinesterase. Para o extrato metanólico placa A, extrato etanólico placa B e extrato acetato de etila placa C. Aplicações em 1 com controle positivo cafeína e de 2 a 6 aplicações dos extratos na CCD.

3.5.4 Atividade antifúngica contra *Candida* spp.

O ensaio apresenta o efeito do extrato metanólico de *N. gardneri* sobre as diferentes espécies do gênero *Candida*: *C. albicans, C. parapsilosis, C. tropicalis* e *C. krusei*.

As cepas de *C. albicans, C. parapsilosi* e *C. krusei* foram resistentes a ação do extrato metanólico de *N. gardneri* em todas as concentrações testadas. Os resultados para a Concentração Mínima Inibitória (CIM) para o extrato apresentou atividade de inibição apenas sobre o isolado de *C. tropicalis* como mostra a Tabela 6.

Tabela 6: Média das porcentagens de inibição para o extrato metanólico de *N. gardneri* nas concentrações 1,0; 0,5; 0,25 e 0,12 mg/mL

Diluição	Espécies do gênero *Cândida* spp			
	albicans	*parapsilosis*	*tropicalis*	*krusei*
1,0 mg/mL	NI	NI	34,5 %	NI
0,5 mg/mL	NI	NI	35,2 %	NI
0,25 mg/mL	NI	NI	26,0 %	NI
0,12 mg/mL	NI	NI	NI	NI

*NI: Não houve inibição

De acordo com a padronização encontrada na literatura (ALIGIANNIS et al., 2001; DUARTE et al., 2005) a atividade antifúngica encontrada é considerada fraca, propôs que as concentrações inibitórias mínimas de até 0,5 mg/mL são avaliadas fortes , de 0,55 a 1,5 mg/mL são avaliadas moderadas e acima de 1,5 mg/mL são avaliadas fracas.

A figura 42 mostra a influência do tempo de exposição ao extrato metanólico de *N. gardneri* na viabilidade das cepas de *Candida*. O resultado mostrou a CIM que o extrato reduziu o crescimento microbiano em 35,2 %, quando comparado ao crescimento das culturas sem tratamento apenas para a cepa de *C. tropicalis.*

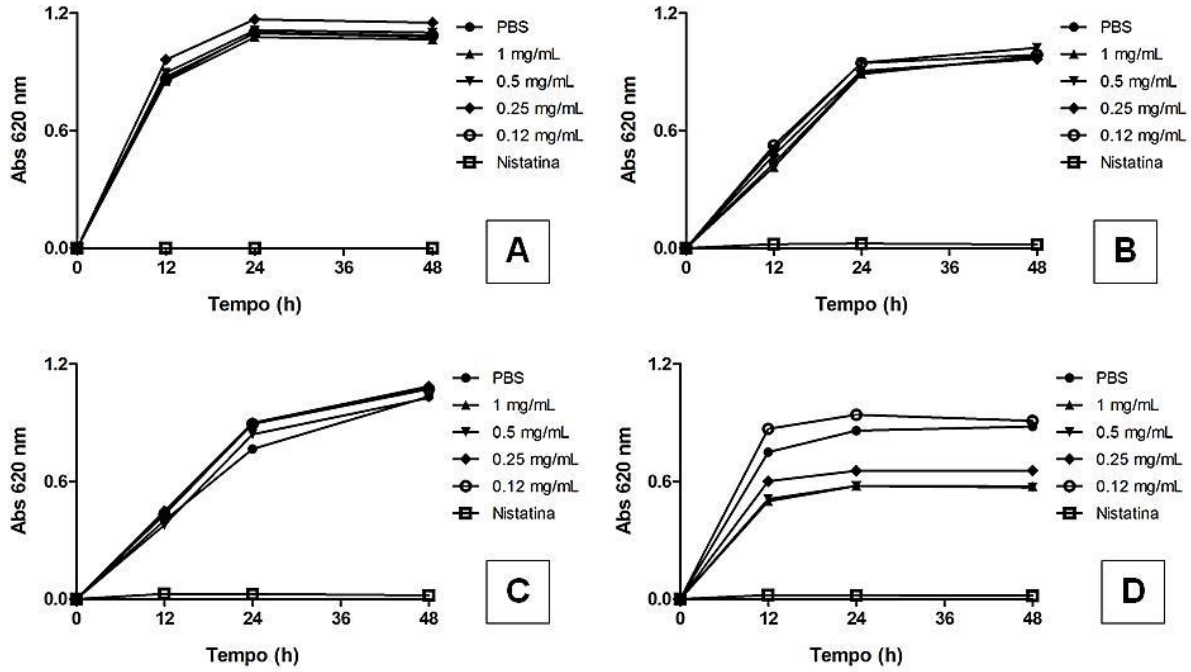


Figura 42: Efeito do tempo de exposição do extrato metanólico de *N. gardneri* na viabilidade de *Candida* spp.

A: *C. albicans*; B: *C. krusei*; C: *C. parapsilosis*; D: *C. tropicalis*. □ Controle positivo: nistatina; ▲▼○♦ CIM A, B, C, D: 1,0 mg/ mL, 0,5 mg/mL, 0,25 mg/ mL e 0,12 mg/ mL; ● PBS: controle sem tratamento. Os valores estão expressos pela média ± EPM de quatro experimentos. A análise foi realizada por ANOVA e valor de *p<0,05 quando comparado ao controle.

Capítulo 4

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O principal objetivo deste trabalho aqui descrito foi fazer o isolamento e identificação de metabólitos secundários a partir do extrato metanólico de *N. gardneri*, utilizando técnicas cromatográficas como cromatografia de coluna em gel, CLAE e técnicas espectroscópicas para a identificação como IV, EM – IES e RMN de ^{1}H e ^{13}C 1D e 2D.

Numa nova perspectiva para a compreensão do mecanismo e da natureza dos seus constituintes químicos, pois há poucos trabalhos de isolamento, purificação e caracterização de princípios ativos de *N. gardneri*. Deste modo, relatamos o isolamento, caracterização e identificação de duas novas substancias nesse gênero a partir do extrato metanólico de *N. gardneri*, **NgF8** e **NgF9**.

A separação por cromatografia de coluna em Sephadex LH-20 do extrato metanólico de *N. gardneri* resultou no isolamento de uma hidrazida e um peptídeo. Infelizmente não foi possível concluir o trabalho de identificação estrutural, desta forma destacamos a presença das classes das substâncias isoladas reveladas pelo perfil cromatográfico em CCD, as análises espectroscópicas em IV e RMN com seus deslocamentos característicos. Um terceiro composto foi isolado, mas não em quantidade suficiente para fazer sua identificação.

Atividades biológicas, dos extratos metanólico, etanólico e acetato de etila, determinadas foram: atividades antioxidantes com a captura do radical $DPPH^{\bullet}$ e $ABTS^{\bullet+}$, inibição da enzima Acetilcolinesterase e apenas para o extrato metanólico a atividade antifúngica contra *Candida* spp. Todos os extratos apresentaram atividade inibitória dos radicais $DPPH^{\bullet}$ e $ABTS^{\bullet+}$, mas extrato metanólico foi o que melhor apresentou atividade antioxidante. Já para as atividades de inibição da enzima acetilcolinesterase todos os extratos apresentaram resultado negativo. Os resultados mostrados pela CIM do extrato metanólico de *N. gardneri* contra a cepa de *C. tropicalis* apresentou uma baixa atividade antifúngica quando comparadas ao

controle nistatina e todas as outras cepas testadas se mostraram resistentes ao extrato.

A identificação de constituintes químicos de *N. gardneri* com atividades antioxidantes da continuidade para a realização de um estudo interdisciplinar com um potencial econômico para indústrias, como a farmacêutica, por exemplo, e dar continuidade para novas descobertas no campo da bioprospecção fitoquímica.

REFERÊNCIAS

ABREU, J. A. S. D. E.; ROVIDA, A. F. D. A. S.; PAMPHILE, J. A. Fungos de interesse: aplicações biotecnológicas. **REVISTA UNINGÁ REVIEW; v. 21 n. 1 (2015): REVISTA UNINGÁ REVIEW**, 16 jan. 2018.

AIRTH, R. L.; FOERSTER, G. E. The isolation of catalytic components required for cell-free fungal bioluminescence. **Arch Biochem Biophys,** v. 97, p. 567-73, Jun 1962.

ALIGIANNIS, N. et al. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two Origanum species. **J Agric Food Chem,** v. 49, n. 9, p. 4168-70, Sep 2001.

BERMUDES, D.; PETERSEN, H.; NEALSON, K. H. Low-Level Bioluminescence Detected in Mycena haematopus Basidiocarps. **Mycologia,** v. 84, p. 799-802, 1992.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology,** v. 28, n. 1, p. 25-30, jan 1 1995.

CAMPBELL, Anthony. K. **Chemiluminescence: Principles and Applications in Biology and Medicine**. Wiley-VCH Verlag GmbH, 1988.

CARLILE, Michael. J.; WATKINSON, Sarah. C. **The fungi**. 2. ed. London: Academic Press, Ltd., 1994.

PAVIA. Donald L. et al. **Introdução à Espectroscopia.** 4. ed. Cengage Learning, 2010.

DUARTE, M. C. T. et al. Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology,** v. 97, n. 2, p. 305-311, feb 28 2005.

ELLMAN, G. L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem Pharmacol,** v. 7, p. 88-95, Jul 1961.

ENDO, M.; KAJIWARA, M.; NAKANISHI, K. **Fluorescent constituents and cultivation of Lampteromyces japonicus**. 1970.

HARVEY, E. N. **A History of Luminescence from Ancient Times until 1900**. Baltimore: J. H. Furst Company, 1957.

HOMER, H. T.; TIFFANY, L. H.; KNAPHUS, G. Oak-Leaf-Litter Rhizomorphs from Iowa and Texas: Calcium Oxalate Producers. **Mycologia,** v. 87, p. 44, 1995.

INGKANINAN, Kornkanok. **Novel Procedures for Lead Finding in Plant Extracts: Application of CPC prefractionation and On-line HPLC-UV-MS-biochemical Detection**. Universiteit Leiden 2000.

INGKANINAN K et al. Screening for acetylcholinesterase inhibitory activity in plants used in Thai traditional rejuvenating and neurotonic remedies. **Journal of Ethnopharmacology,** v. 89, p. 261-264, 2003.

INTARAUDOM, C. et al. Novel spiro-sesquiterpene from the mushroom Anthracophyllum sp. BCC18695. **Phytochemistry Letters,** v. 6, n. 3, p. 345-349, jan 08 2013.

ISOBE, M.; UYAKUL, D.; GOTO, T. Lampteromyces bioluminescence--1. Identification of riboflavin as the light emitter in the mushroom L. japonicus. **J Biolumin Chemilumin,** v. 1, n. 3, p. 181-8, May 1987.

ISOBE, M.; UYAKUL, D.; GOTO, T. Lampteromyces bioluminescence - 2 lampteroflavin, a light emitter in the luminous mushroom, L. japonicus. **Tetrahedron Letters,** v. 29, n. 10, p. 1169-1172, jan 1 1988.

KANOKMEDHAKUL, S. et al. Cytotoxic sesquiterpenes from luminescent mushroom Neonothopanus nambi. **Tetrahedron,** v. 68, n. 39, p. 8261-8266, sep 30 2012.

LIMA, A. **Caracterização química, avaliação da atividade *in vitro* e *in vivo*, e identificação dos compostos fenólicos presentes no Pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.)**. 219 Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2008.

M., P.; REID, R.; CHAN, E. C. S. **Microbiologia**. São Paulo: Mc Graw-Hill, 1981.

MACIEL, M. A. M. et al. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova,** v. 25, p. 429-438, 2002.

MAMIYA, Y. Attraction of the pinewood nematode to mycelium of some wood-decay fungi. **Japanese Journal of Nematology,** v. 36, p. 1, 2006.

MCMORRIS, T. C. et al. Sesquiterpenes from Omphalotus illudens. **Phytochemistry,** v. 61, n. 4, p. 395-398, oct 1 2002.

MENDONÇA-FILHO, R. F. W.; MENEZES, F. S. Estudo da utilização de plantas medicinais pela população da Ilha Grande-RJ. **Revista Brasileira de Farmacognosia,** v. 13(Supl), p. 55-58, 2003.

OLIVEIRA, A. G. et al. Bioluminescência de fungos: distribuição, função e mecanismo de emissão de luz. **Química Nova,** v. 36, p. 314-319, 2013.

OLIVEIRA, A. G. et al. Evidence that a single bioluminescent system is shared by all known bioluminescent fungal lineages. **Photochem Photobiol Sci,** v. 11, n. 5, p. 848-52, May 2012.

OLIVEIRA, A. G.; STEVANI, C. V. The enzymatic nature of fungal bioluminescence. **Photochem Photobiol Sci,** v. 8, n. 10, p. 1416-21, Oct 2009.

PURTOV, K. V. et al. The Chemical Basis of Fungal Bioluminescence. **Angew Chem Int Ed Engl,** v. 54, n. 28, p. 8124-8, Jul 6 2015.

RAVEN, P. H.; EICHHORN, S. E.; EVERT, R. F. **Biologia Vegetal**. 5. Guanabara Koogan, 1992. ISBN 9788527723626.

RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radic Biol Med,** v. 26, n. 9-10, p. 1231-7, May 1999.

RHEE, I. K. et al. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. **J Chromatogr A,** v. 915, n. 1-2, p. 217-23, Apr 27 2001.

SHIMOMURA, Osamu. **Bioluminescence — Chemical Principles and Methods**. Singapore: World Scientific Publishing Co. Pte. Lt., 2006.

SILVERSTEIN, Robert. M.; WEBSTER, Francis. X.; KIEMLE, David. J. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos.** 7. ed. LTC, 2006.

SIVINSKI, J. M. Arthropods Attracted To Luminous Fungi. **PSYCHE,** v. 88, p. 383-390, 1981.

SOUSA, C. M. D. M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova,** v. 30, p. 351-355, 2007.

VENDRUSCOLO, G. S.; RATES, S. M. K.; MENTZ, L. A. Dados químicos e farmacológicos sobre as plantas utilizadas como medicinais pela comunidade do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Farmacognosia,** v. 15, p. 361-372, 2005.

VENTURA, F. F.; SILVA, R. T. P.; STEVANI, C. V. História do Fungo Bioluminescente Flor-de-Coco (Neonothopanus gardneri) e Efeitos das Condições de Cultura Sobre a Emissão de Luz. **Revista Virtual de Química,** v. 1, p. 41-55, 2015.

VIEIRA, L. M. et al. Fenólicos totais e capacidade antioxidante in vitro de polpas de frutos tropicais. **Revista Brasileira de Fruticultura,** v. 33, p. 888-897, 2011.