Universidade de São Paulo
Instituto de Química de São Carlos

**Abordagens alternativas para a obtenção de novos metabólitos secundários
produzidos a partir de linhagens fúngicas**

Julie Paulín García Rodríguez

Orientador: Prof. Dr. Roberto Gomes de Souza Berlinck

Exemplar revisado

O exemplar original encontra-se em
acervo reservado na Biblioteca do IQSC-USP

São Carlos
Agosto, 2018

Julie Paulín García Rodríguez

**Abordagens alternativas para a obtenção de novos metabólitos secundários
produzidos a partir de linhagens fúngicas**

Tese apresentada ao Instituto de Química de São Carlos
da Universidade de São Paulo como requisito para obter
o título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Química Orgânica e Biológica

Orientador: Prof. Dr. Roberto Gomes de Souza Berlinck

São Carlos
Agosto, 2018

AGRADECIMENTOS

A autora do presente trabalho agradece atentamente:

Ao Prof. Dr. Roberto G. S. Berlinck, pela orientação e paciência durante a realização do presente trabalho;

À Prof. Dra. Lara D. Sette (IB – UNESP), pela cessão das linhagens fúngicas utilizadas neste trabalho;

Ao Prof. Dr. Antônio G. Ferreira (DQ – UFSCar), pela obtenção dos espectros de RMN;

Aos técnicos: Fabiana, Karin, André, Silvana, Aldimar, pelo apoio técnico;

Às secretárias Andreia, Silvia e Gislei, pela ajuda durante os últimos sete anos;

Ao Instituto de Química de São Carlos – USP, pela infraestrutura disponibilizada;

À CAPES pela bolsa concedida;

Aos amigos e colegas, alunos e ex-alunos do grupo QOSBio – IQSC;

A todo o povo brasileiro.

RESUMO

RODRÍGUEZ, Julie P.G. **Abordagens alternativas para a obtenção de novos metabólitos secundários produzidos a partir de linhagens fúngicas**. 234p. Tese (Doutorado em Química Orgânica e Biológica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018.

Neste trabalho foram estudadas duas abordagens para a obtenção de novos metabólitos secundários produzidos por linhagens fúngicas. Na primeira, foram sintetizados o ácido hidroxâmico suberoilânilda (SAHA) e cinco análogos. Sua atividade como modificadores epigenéticos foi avaliada em oito linhagens fúngicas do ambiente marinho. Os fungos *Penicillium* sp. DRF2 e *Acremonium* sp. DRF1 apresentaram modificações no seu perfil metabolômico quando crescidos em pequena escala na presença do derivado 4F-SAHA. O fungo *Microphaeropsis* sp. DRA6. apresentou modificação na presença do 2AM-SAHA. O fungo *Penicillium* sp. DRF2 foi crescido em maior escala e os compostos de interesse foram isolados. Na segunda abordagem, uma nova estratégia de extração utilizando a mistura de resinas XAD-2, XAD-4 e XAD-7 foi desenvolvida para a “captura” de metabólitos hidrossolúveis do meio de cultivo de diferentes fungos. Esta metodologia permitiu a extração e posterior isolamento de seis novos alcaloides peptídicos e dois peptídeos a partir da fração aquosa do meio de cultivo do fungo do ambiente antártico *Penicillium* sp. IS1-A. A mesma metodologia foi aplicada na investigação do metabolismo secundário do fungo do ambiente antártico *Thelebolus globosus* E2. A partir do extrato metanólico do meio de cultivo de *T. globosus* E2 foram isoladas a ciclopenina e o ciclopenol, e foram detectados os alcaloides viridicatina e viridicatol. O fungo *Thelebolus globosus* E2 mostrou-se produtor de estatinas, sendo isolada a mevastatina como composto majoritário.

Palavras-chave: SAHA, Fungos antárticos, fração aquosa, alcaloides peptídicos, estatinas.

ABSTRACT

RODRIGUEZ, Julie P.G. **Alternative approaches for the isolation of new secondary metabolites produced by fungal strains.** 234 p. Thesis (Ph.D. in Organic and Biological Chemistry) – São Carlos Institute of Chemistry, University of São Paulo, São Carlos, 2018

Two innovative strategies for the isolation of novel secondary metabolites from fungal strains were implemented. i) Metabolite diversification via epigenetic modification was explored. Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) and five SAHA derivate compounds were synthesized and evaluated as epigenetic modifiers on cultures of eight marine-derived fungi. The metabolic profiles of the fungi *Penicillium* sp. DRF2 and *Acremonium* sp. DRA6 were modified in presence of 4F-SAHA and the fungus *Microphaeropsis* sp. DRF1 was modified in presence of 2AM-SAHA derivate compounds. ii) A new solid phase strategy for secondary metabolite capture was introduced. Using a mixture of XAD-2, XAD-4 and XAD-7 resins for the adsorption of water-soluble metabolites from fungal cultures, six new peptide alkaloids and two new peptides were isolated from the aqueous fraction of the Antarctic-derived fungus *Penicillium* sp. IS1-A growth medium. The XAD-2, -4 and -7 resin mixture based extraction strategy was also used in the investigation of secondary metabolites produced by the Antarctic-derived fungus *Thelebolus globosus* E2. Isolation and identification of cyclopenine and cyclopenol, as well as the detection of the alkaloids viridicatine and viridicatol, was achieved from the methanolic fraction of the *T. globosus* E2 growth medium. The fungus *T. globosus* E2 also produced statins, in particular mevastatin.

Keywords: SAHA, Antarctic-derived fungi, aqueous fraction, peptide alkaloids, statins.

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Origem dos 1211 fármacos aprovados pela FDA entre 1981 – 2014	17
Figura 2. Número de produtos naturais publicados por ano e taxa de isolamento de novos compostos como uma porcentagem do isolamento total do produto natural.	18
Figura 3. Representação esquemática do modelo farmacofórico básico e ligação de inibidores HDAC à base de ácido hidroxâmico.	34
Figura 4. Estrutura dos inibidores da enzima HDAC à base de SAHA	34
Figura 5. Procedimento para a síntese do ácido hidroxâmico SAHA e seus análogos proposto por Gediya et. al.	37
Figura 6. Diluições preparadas utilizando SAHA e análogos sintetizados.	42
Figura 7. Cromatograma da separação da fração DRF2-F4.	45
Figura 8. Mecanismo da reação de formação da ligação amida.	47
Figura 9. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) do SAHA em $\text{DMSO}-d_6$.	48
Figura 10. Comparação dos cromatogramas no UV dos extratos metanólicos do fungo DRF2. Cromatogramas extraídos a 254 nm.	52
Figura 11. Espectros do composto DRF2F4A A. Espectro de massas de alta resolução $[\text{ESI}^+]$. B. Espectro no UV-visível.	53
Figura 12. Espectros do composto DRF2F4B A. Espectro de massas de alta resolução $[\text{ESI}^+]$. B. Espectro no UV-visível.	53
Figura 13. Espectros de RMN de P2 em Piridina- d_5 . A. Espectro de RMN ^1H (600 MHz). B. Espectro de RMN de ^{13}C (150 MHz).	54
Figura 14. Comparação dos perfis químicos das frações 50% MeOH obtidas a partir do extrato aquoso do meio de cultura do fungo DRA6. A. Cromatogramas observados a 254 nm. B. Cromatogramas TIC no modo ESI^+ .	55
Figura 15. Compostos encontrados na base de dados DNP que apresentam as mesmas características espectroscópicas do composto 1.	56
Figura 16. Comparação dos perfis químicos das frações 100%MeOH obtidas a partir do extrato aquoso do meio de cultura do fungo DRF1. A. Cromatogramas extraídos a 254 nm. B. Cromatograma TIC no modo (ESI^-) .	57
Figura 17. Compostos encontrados na base de dados DNP que apresentam características espectroscópicas similares às obtidas para o composto presente na fração 100% MeOH, obtida a partir do extrato aquoso do fungo DRF1 em presença do 3am-SAHA.	58
Figura 18. Metabólitos secundários derivados dos fungos antárticos (compostos 38 a 48).	61
Figura 19. Metabólitos secundários derivados dos fungos antárticos (compostos 49 a 55).	62
Figura 20. Comparação do estado físico do meio de cultivo utilizado no crescimento de fungos nos artigos publicados na revista JNP no período entre 2008-2018.	63
Figura 21. Metodologias de extração mais utilizadas no isolamento de metabólitos secundários a partir de fungos.	64
Figura 22. Estrutura química dos compostos isolados a partir do meio de crescimento de fungos utilizando resinas poliméricas.	65
Figura 23. Estrutura química de duas novas ciclosulfoxicurvularinas isoladas a partir do meio de cultivo do fungo <i>Penicillium</i> sp. DRF2.	67
Figura 24. Cromatograma da separação da fração XI-50. Coluna semipreparativa C_{18} (InertSustain, 10 x 250 mm, 5 μm), monitorado no comprimento de onda 254. Fase móvel $\text{H}_2\text{O}:\text{MeCN}:\text{MeOH}$ (70:15:15, v/v), vazão: 4 mL min^{-1} .	72

Figura 25.	Cromatograma da separação da fração XI-50D. Coluna semipreparativa C ₈ InertSustain® (10 x 250 mm, 5µm), monitorado no comprimento de onda 254 e 360 nm. Fase móvel H ₂ O:MeOH (60:40, v/v) Fluxo: 4 mL min ⁻¹ .	73
Figura 26.	Cromatograma da separação da fração IF2 monitorado no comprimento de onda 220 nm. Coluna C8-4, fase móvel H ₂ O:MeCN (87:13, v/v).	76
Figura 27.	Cromatograma de separação da fração IF2-B, monitorada no comprimento de onda 320 nm; coluna analítica C8-4 (4,6 x 250 mm, 5µm), fase móvel MeOH:H ₂ O (20:80, v/v).	76
Figura 28.	Espectro de RMN de ¹ H obtido para IF2-C (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆).	77
Figura 29.	Cromatograma de separação da fração IF56-B, monitorada no comprimento de onda 220 nm; coluna analítica C8-4, fase móvel MeOH:H ₂ O (30:70, v/v).	78
Figura 30.	Cromatograma de separação da fração XI-43F2 monitorada no comprimento de onda 230 nm; coluna analítica C8-4, fase móvel H ₂ O:MeOH (62:38, v/v).	79
Figura 31.	Cromatograma de separação da fração XI-43F2C monitorada no comprimento de onda 220 nm; coluna analítica fenila, fase móvel H ₂ O:MeCN (70:30, v/v).	80
Figura 32.	Cromatograma de separação da fração XI54F3B monitorada no comprimento de onda 230 nm; coluna analítica C8-4, fase móvel H ₂ O:MeCN:MeOH (68:9:23, v/v).	82
Figura 33.	Cromatograma de separação da fração XI54F4 monitorado no comprimento de onda 230 nm; coluna C ₁₈ RP X-Terra, fase móvel H ₂ O:MeCN:MeOH (70:15:15, v/v).	82
Figura 34.	Cromatograma de separação da fração XI50F4 monitorada no comprimento de onda 220 nm; coluna C ₁₈ RP X-Terra, fase móvel H ₂ O:MeCN:MeOH (50:25:25, v/v).	83
Figura 35.	Cromatograma de separação da fração XI50F5 monitorado no detector ELSD; coluna fenila e fase móvel H ₂ O:MeCN:MeOH (46:56, v/v), vazão 0,8 mL min ⁻¹ .	84
Figura 36.	Cromatograma de separação da fração APER40 monitorado no comprimento de onda 220 nm; coluna C ₁₈ RP X-Terra e fase móvel H ₂ O:MeOH:MeCN (74:13:13, v/v), vazão 2,5 mLmin ⁻¹ .	87
Figura 37.	Cromatograma de separação da fração APER40E monitorado no comprimento de onda 220 nm; coluna C ₈ InertSustain® (10 x 250 mm, 5 µm), fase móvel H ₂ O:MeOH (55:45, v/v), vazão 4 mL min ⁻¹ .	88
Figura 38.	Cromatograma de separação da fração APER40F monitorado no comprimento de onda 220 nm; coluna C ₈ InertSustain® (10 x 250 mm, 5 µm), fase móvel H ₂ O:MeOH:MeCN (63:35:2, v/v), vazão 4 mL min ⁻¹ .	88
Figura 39.	Cromatograma de separação da fração APER60 monitorado no comprimento de onda 220 nm;	89
Figura 40.	Espectros do composto IP2 . A. Espectro de massas de alta resolução (ESI ⁺) B. Espectro de absorções no UV (MeOH).	94
Figura 41.	Estrutura química planar determinada para IP2 a partir da análise dos espectros de RMN mono e bidimensionais.	98
Figura 42.	A. Comparação dos cromatogramas extraídos a 340 nm para o padrão L-Glu derivatizado com reagente de <i>Marfey</i> (Cromatograma preto) e o produto da hidrólise e derivatização de IP2 (Cromatograma azul).	98
Figura 43.	Espectro de dicroísmo circular (DC) obtido para IP2 em MeOH.	99
Figura 44.	Espectros do composto IP9 . A. Espectro de massas de alta resolução (ESI ⁺) B. Espectro de absorções no UV (MeOH).	100
Figura 45.	A. Correlações observadas nos espectros COSY e HMBC que confirmam a estrutura proposta para IP9 . Estrutura química planar proposta para IP9 com atribuições dos sinais de RMN de ¹³ C.	102

Figura 46.	A. Comparação dos cromatogramas extraídos a 340 nm para o padrão L-Glu derivatizado com reagente de <i>Marfey</i> (Cromatograma preto) e o produto da hidrólise e derivatização de IP9 (Cromatograma azul). FDAA: Excedente do reagente de <i>Marfey</i> após reação. Condições cromatográficas: Coluna C ₁₈ RP X-Terra (4,6 x 250 mm, 4,6 μm). Eluição modo gradiente MeOH: H ₂ O.	102
Figura 47.	Espectro de dicroísmo circular (DC) obtido para IP9 em MeOH.	103
Figura 48.	Espectros do composto IP12 . A. Espectro de massas de alta resolução (ESI ⁺). B. Espectro de absorções no UV (MeOH).	104
Figura 49.	A. Correlações observadas nos espectros COSY e HMBC que confirmam a estrutura proposta para IP12 . B. Estrutura química planar proposta para IP12 com atribuições dos sinais de RMN de ¹³ C.	106
Figura 50.	Comparação dos cromatogramas extraídos a 340 nm para o padrão L-Glu derivatizado com reagente de <i>Marfey</i> (Cromatograma azul) e o produto da hidrólise e derivatização de IP12 (Cromatograma preto).	106
Figura 51.	Espectro de dicroísmo circular (DC) obtido para IP12 em MeOH.	107
Figura 52.	Espectros do composto IP14N . A. Espectro de massas de alta resolução (ESI ⁺). B. Espectro de absorções no UV (MeOH).	108
Figura 53.	A. Correlações observadas nos espectros COSY e HMBC que confirmam a estrutura proposta para IP14N . Estrutura química planar proposta para IP14N com atribuições dos sinais de RMN de ¹³ C.	110
Figura 54.	Comparação dos cromatogramas extraídos a 340 nm para o padrão L-Glu derivatizado com reagente de <i>Marfey</i> (Linha azul) e o produto da hidrólise e derivatização de IP14N (Linha preta).	111
Figura 55.	Comparação de espectros dos compostos IP14N (preto) e IP14a (vermelho): A. RMN de ¹ H B. RMN de ¹³ C (600 e 150 MHz, respetivamente; MeOH- <i>d</i> ₄).	112
Figura 56.	Hipótese da estrutura química de IP14a em relação à estrutura do composto IP14N .	112
Figura 57.	Comparação dos espectros de RMN de ¹ H de IP14N e IP14A (600 MHz; MeOH- <i>d</i> ₄ + TFA- <i>d</i> ₄).	113
Figura 58.	Espectros do composto IP15 . A. Espectro de massas de alta resolução (ESI ⁺). B. Espectro de absorções no UV (MeOH).	114
Figura 59.	A. Correlações observadas nos espectros COSY e HMBC que confirmam a estrutura proposta para IP15 . Estrutura química planar proposta para IP15 com atribuições dos sinais de RMN de ¹³ C.	117
Figura 60.	Comparação dos cromatogramas extraídos a 340 nm para o padrão L-Glu derivatizado com reagente de <i>Marfey</i> (Linha azul) e o produto da hidrólise e derivatização de IP15 (Linha preta).	118
Figura 61.	Espectros do composto IP27 . A. Espectro de massas de alta resolução (ESI ⁺). B. Espectro de absorções no UV (MeOH).	118
Figura 62.	A. Correlações observadas nos espectros COSY e HMBC que confirmam a estrutura proposta para IP27 . Estrutura química planar proposta para IP27 com atribuições dos sinais de RMN de ¹³ C.	119
Figura 63.	Espectros de dicroísmo circular em metanol de: a) IP15 e b) IP27	120
Figura 64.	Rota biosintética proposta para os brocaeloides A-C (83).	121
Figura 65.	Espectros do composto IP11 . A. Espectro de massas de alta resolução (ESI ⁺). B. Espectro de absorções no UV (MeOH).	122
Figura 66.	A. Correlações observadas nos espectros COSY e HMBC que confirmam a estrutura proposta para IP11 . Estrutura química planar proposta para IP11 com atribuições dos sinais de RMN de ¹³ C.	125
Figura 67.	Comparação dos cromatogramas extraídos a 340 nm para os padrões derivatizados L-Phe, L-Val o produto da derivatização de IP11 .	126
Figura 68.	Espectro de dicroísmo circular em metanol de IP11 .	126

Figura 69.	Espectros do composto IP17 . A. Espectro de massas de alta resolução (ESI ⁺). B. Espectro de absorções no UV (MeOH).	127
Figura 70.	Espectros do composto IP16 . A. Espectro de massas de alta resolução (ESI ⁺). B. Espectro de absorções no UV (MeOH).	129
Figura 71.	Espectros do composto IP20 . A. Espectro de massas de alta resolução (ESI ⁺). B. Espectro de absorções no UV (MeOH).	130
Figura 72.	Fotografia do fungo E2 crescido em: A. meio líquido PDB e B. Arroz.	133

LISTA DE DIAGRAMAS

	Pág.
Diagrama 1. Fracionamento do extrato metanólico obtido a partir do meio de cultivo do fungo <i>Penicillium</i> sp. DRF2 crescido em presença do 4F-SAHA.	44
Diagrama 2. Fracionamento dos extratos obtidos a partir do meio de cultivo do fungo <i>Microphaereopsis</i> sp. (DRA6) crescido em presença de 4F-SAHA.	45
Diagrama 3. Fracionamento dos extratos obtidos a partir do meio de cultivo do fungo <i>Acremonium</i> sp. (DRF1) crescido em presença de 3AM-SAHA.	46
Diagrama 4. Metodologia utilizada no <i>screening</i> em pequena escala dos fungos antárticos crescidos em três meios de cultivo diferente: Malte 3% (M3), Potato dextrose broth (PDB) e Sabouraud (SBD).	69
Diagrama 5. Fracionamento dos extratos fúngicos obtidos em pequena escala.	70
Diagrama 6. Separação cromatográfica dos extratos, metanólico e aquoso, obtidos a partir do meio de cultivo do fungo <i>Penicillium</i> sp. IS1-A (5 L, PDB).	71
Diagrama 7. Separação cromatográfica dos extratos, metanólico e aquoso, obtidos a partir do meio de cultivo do fungo <i>Penicillium</i> sp. IS1-A (10 L).	74
Diagrama 8. Fracionamento por extração em fase sólida das frações XI-10 a XI-50 do fungo <i>Penicillium</i> sp. IS1-A (10 L).	75
Diagrama 9. Fracionamento cromatográfico das subfrações XI-10F2 e XI-20F2 em coluna Sephadex G-15 eluída em modo isocrático. Fase móvel a mistura de solventes H ₂ O:MeOH (9:1, v/v).	75
Diagrama 10. Fracionamento cromatográfico da fração XI-40F30 em coluna pré-empacotada com fase estacionária sílica gel derivatizada com grupos fenila. Eluída em modo gradiente MeOH:H ₂ O.	79
Diagrama 11. Fracionamento cromatográfico da fração XI-43F2.	80
Diagrama 12. Fracionamento da subfração XI-50F4 em coluna pré-empacotada com fase estacionária sílica derivatizada com grupos fenila, eluída em modo gradiente. Fase móvel MeOH:H ₂ O.	81
Diagrama 13. Fracionamento da subfração XI-54F3 em coluna empacotada com fase estacionária Sephadex G-15, eluída em modo isocrático. Fase móvel H ₂ O: MeOH (9:1, v/v).	81
Diagrama 14. Fracionamento de XI54F4 por HPLC-UV.	83
Diagrama 15. Fracionamento de XI50F5 por HPLC-UV.	84
Diagrama 16. Separação cromatográfica dos extratos, metanólico e aquoso, obtidos a partir do meio de cultivo do fungo <i>Thelebolus globosus</i> E2 (5,6 L, PDB).	86
Diagrama 17. Fracionamento de APER40 por HPLC-UV.	87
Diagrama 18. Fracionamento de APER60 por HPLC-UV.	89
Diagrama 19. Separação cromatográfica do extrato metanólico obtido a partir do meio de cultivo do fungo <i>Thelebolus globosus</i> E2 (80 g de arroz).	90

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1. Condições de purificação em coluna flash do produto bruto obtido na etapa 1.	38
Tabela 2. Condições de purificação em sistema HPLC-UV do produto bruto obtido na etapa 2, monitorado no comprimento de onda de 254 nm.	39
Tabela 3. Região aromática dos espectros de RMN de ^1H dos compostos sintetizados.	50
Tabela 4. Desreplicação dos dados espectroscópicos e espectrométricos dos sinais observados no cromatograma da fração 100% MeOH, obtida a partir do extrato aquoso do fungo DRA6 crescido em presença de 4F-SAHA.	56
Tabela 5. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (600 e 150 MHz, respetivamente; DMSO- d_6) de IP2 .	95
Tabela 6. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (600 e 150 MHz, respetivamente; DMSO- d_6) de IP9 .	101
Tabela 7. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (600 e 150 MHz, respetivamente; MeOH- d_4) de IP12 .	105
Tabela 8. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (600 e 150 MHz, respetivamente, MeOH- d_4) de IP14N e IP14A .	109
Tabela 9. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (600 e 150 MHz, respetivamente, DMSO- d_6) de IP15 e IP27 .	115
Tabela 10. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (600 e 150 MHz, respetivamente, DMSO- d_6) de IP11 .	123
Tabela 11. Comparação dos valores de deslocamento químico dos sinais observados no espectro de RMN de ^1H do tetrapeptídeo relatado na literatura e o composto IP17 isolado no presente trabalho.	128
Tabela 12. Estatinas detectadas nas frações do fungo E2 crescido em arroz.	136

LISTA DE ABREVIATURAS

[α]_D	Rotação específica
AcOEt	Acetato de etila
CCD	Cromatografia em camada delgada
CIM	Concentração Inibitória Mínima
COSY	<i>Correlation spectroscopy</i>
DC	Dicroísmo circular
DCC	Diciclohexilcarbodiimida
DMF	Dimetilformamida
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DNP	<i>Dictionary of Natural Products</i>
ELSD	<i>Evaporative Light Scattering Detector</i>
ESI	<i>Electrospray ionization</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FDA	1-fluoro-2-4-dinitrophenyl-5-L-alanine amide (Reagente de Marfey)
HAT	Histona Acetyltransferase
HDAC	Histonas Deacetilases
<i>g</i>HMBC	<i>gradient-Selected heteronuclear multiple bond coherence</i>
HOBt	1-hidroxibenzotriazol
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HRMS	<i>High Resolution Mass Spectrometry</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence Spectroscopy</i>
IDH	Índice de Deficiência de Hidrogênio
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento
JNP	<i>Journal of Natural Products</i>
K_D	Coeficiente de distribuição
K_{ow}	Coefficiente de partição octanol/água
<i>m/z</i>	Razão massa/carga
M2	Malte 2%

MS	<i>Mass Spectrometry</i>
NRPS	<i>Nonribosomal Peptide Synthetases</i>
OSMAC	<i>One Strain, Many Compounds</i>
PBP	<i>Penicillin Binding Proteins</i>
PDB	<i>Potato dextrose broth</i>
PKS	<i>Polyketide synthase</i>
PNs	Produtos naturais
qTOF	<i>Quadrupole–time-of-flight (tandem mass spectrometer)</i>
RBS	Rotas Biossintéticas Silenciosas
RMN de $^1\text{H}/^{13}\text{C}$	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio/Carbono
SAHA	Suberoilânida do ácido hidroxâmico
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i>
UPLC	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i>
UV	Ultravioleta
δ	Deslocamento químico
λ	Comprimento de onda

SUMÁRIO

	Pág
INTRODUÇÃO GERAL	17
PARTE EXPERIMENTAL	20
1. GENERALIDADES	20
2. INSTRUMENTAÇÃO E CONDIÇÕES ANALÍTICAS	21
3. PROTOCOLOS DOS BIOENSAIOS	23
3.1 ATIVIDADE LEISHMANICIDA	24
3.2 ATIVIDADE ANTI <i>T. Cruzi</i> IN VITRO	25
3.3 INIBIÇÃO DO PROTEASSOMO	25
3.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	26
3.5 INIBIÇÃO DA PROTEÍNA PBP2X	27
3.6 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIPROLIFERATIVO DE CÉLULAS TUMORAIS (CITOTOXICIDADE)	28
CAPÍTULO I. DIVERSIFICAÇÃO QUÍMICA DO METABOLOMA DE FUNGOS DE ORIGEM MARINHA POR MODULAÇÃO EPIGENÉTICA	30
1.1 INTRODUÇÃO	30
1.1.1 UTILIZAÇÃO DE MODULADORES EPIGENÉTICOS PARA A EXPRESSÃO DO METABOLISMO SECUNDÁRIO DE FUNGOS	31
1.1.1.1 Modificação Epigenética	31
1.1.1.2 Ácido hidroxâmico suberoilânilda (SAHA)	33
1.2 OBJETIVOS	35
1.2.1 OBJETIVO GERAL	35
1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
1.3 PARTE EXPERIMENTAL	36
1.3.1 LINHAGENS FÚNGICAS	36
1.3.2 SÍNTESES DO ÁCIDO HIDROXÂMICO SUBEROILANILIDA (SAHA) E COMPOSTOS ANÁLOGOS	36
1.3.2.1 Procedimento de síntese	36
1.3.2.2 Dados espectroscópicos dos compostos sintetizados	39
	41

1.3.3 USO DE SAHA E ANÁLOGOS SINTETIZADOS PARA A DIVERSIFICAÇÃO QUÍMICA DO METABOLISMO SECUNDÁRIO DE LINHAGENS FÚNGICAS	41
1.3.3.1 <i>Screening</i> da variabilidade química gerada pelos modificadores epigenéticos sintetizados	42
1.3.3.1.1 Experimento teste 1.	43
1.3.3.1.2 Experimento teste 2.	
1.3.3.2 Crescimento em maior escala dos fungos em presença dos modificadores epigenéticos.	47
1.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	
1.4.1 SÍNTESE DE POTENCIAIS MODIFICADORES EPIGENÉTICOS DERIVADOS DO SAHA	51
1.4.2 USO DO SAHA E SEUS ANÁLOGOS SINTETIZADOS NA DIVERSIFICAÇÃO QUÍMICA DO METABOLISMO SECUNDÁRIO DE LINHAGENS DE FUNGOS	51
1.4.2.1 <i>Penicillium</i> sp. (DRF2)	57
1.4.2.2 <i>Microphaereopsis</i> sp. (DRA6)	59
1.4.2.3 <i>Acremonium</i> sp. (DRF1)	
1.5. CONCLUSÃO	
CAPÍTULO II. ESTUDO DO METABOLISMO SECUNDÁRIO DE LINHAGENS FÚNGICAS DE ORIGEM ANTÁRTICA	
2.1 INTRODUÇÃO	60
2.1.1 METODOLOGIAS DE EXTRAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS	63
2.1.2 ESTAMOS PERDENDO COMPOSTOS INÉDITOS NA FASE AQUOSA?	66
2.2 OBJETIVOS	68
2.2.1 OBJETIVO GERAL	68
2.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	68
2.3 PARTE EXPERIMENTAL	69
2.3.1 EXPLORAÇÃO QUÍMICA DE LINHAGENS FÚNGICAS	69
2.3.2 INVESTIGAÇÃO DO METABOLISMO SECUNDÁRIO DO FUNGO <i>Penicillium</i> sp. IS1-A	70
2.3.2.1 Crescimento em 5 L de meio de cultura	70

2.3.2.2 Crescimento em 10 L de meio de cultura	74
2.3.3 INVESTIGAÇÃO DO METABOLISMO SECUNDÁRIO DO FUNGO <i>Thelebolus globosus</i> E2	85
2.3.4 DETERMINAÇÃO DA CONFIGURAÇÃO ABSOLUTA DOS AMINOÁCIDOS	91
2.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	92
2.4.1 ESTUDO QUÍMICO DA LINHAGEM <i>Penicillium</i> sp. IS1-A	92
2.4.1.1 Identificação dos compostos isolados a partir do meio de cultivo do fungo <i>Penicillium</i> sp. IS1-A	93
2.4.1.1.1 Determinação estrutural dos alcaloides peptídicos	94
2.4.1.1.2 Determinação estrutural dos peptídeos	122
2.4.1.1.3 Outros compostos isolados	130
2.4.1.1.4 Dados espectroscópicos dos compostos inéditos isolados	131
2.4.2 ESTUDO DO METABOLISMO SECUNDÁRIO DO FUNGO <i>Thelebolus</i> <i>globosus</i> (E2)	132
2.5 CONCLUSÃO	138
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	139
APÊNDICE	148

INTRODUÇÃO GERAL

Os produtos naturais (PNs) são definidos como o conjunto de pequenas moléculas de organismos vivos que não estão envolvidas no metabolismo primário. A biossíntese destes compostos é geneticamente codificada e são produzidos por vias metabólicas secundárias. Os metabólitos secundários são importantes na descoberta de novos fármacos, na biotecnologia, na ecologia e na biossíntese, e em diversas outras áreas tecnológicas.

A origem dos medicamentos aprovados pela FDA entre 1981 e 2014 foi analisada recentemente. Observou-se que 56% destes correspondem a produtos naturais, seus derivados e imitações de PNs¹ (**Figura 1**). Entre as diferentes fontes de PNs, os microrganismos são particularmente interessantes, pelo seu potencial adaptativo, biossintético e biotecnológico. Atualmente, cerca de 100 medicamentos de origem microbiana são comercializados para uso humano, dentre os quais, antibióticos, antifúngicos, e estatinas são os mais vendidos (1).

Figura 1. Origem dos 1211 fármacos aprovados FDA entre 1981 – 2014(1).

¹ Sustância sintética que possui o grupo farmacofórico do produto natural.

Os organismos vivos constituem uma rica fonte de diversidade química para a descoberta de substâncias químicas bioativas. Porém, o reisolamento de produtos naturais conhecidos é cada vez mais frequente; encontrar novas estruturas moleculares é um desafio crescente na área de produtos naturais (2). Nesse sentido, a curva vermelha na **Figura 2** indica uma tendência positiva no número de novos produtos naturais. Observa-se que de poucos metabólitos secundários relatados por ano na década dos 50, atualmente são descobertos milhares de compostos por ano.

No entanto, quando se analisa a novidade estrutural das moléculas reportadas, (curva azul - **Figura 2**) observa-se que, embora atualmente o número de novos produtos naturais descobertos/ano seja maior, tem sido mais difícil encontrar novos esqueletos químicos (2). Deste modo, é necessário o desenvolvimento e utilização de estratégias alternativas que permitam a produção, extração e isolamento de novos metabólitos secundários.

Figura 2. Número de produtos naturais publicados por ano e taxa de isolamento de novos compostos como uma porcentagem do isolamento total do produto natural (2)

Neste trabalho, foram desenvolvidas duas abordagens para obtenção de novos metabólitos secundários a partir do meio de crescimento de linhagens fúngicas: o uso de modificadores epigenéticos como elicitadores do metabolismo secundário de fungos, e a implementação de uma nova estratégia de extração de metabólitos secundários polares, presentes na fração aquosa.

O capítulo I apresenta o uso de modificadores epigenéticos para induzir a produção de novos metabólitos secundários. Neste estudo, o inibidor da histona desacetilase SAHA e cinco compostos análogos foram sintetizados e utilizados para induzir a produção de novos metabólitos secundários no meio de cultivos de fungos do ambiente marinho.

No capítulo II apresenta-se uma nova estratégia de extração foi implementada para investigar metabólitos secundários presentes em frações aquosas de meios de cultivo de fungos. Foram utilizadas as resinas poliméricas para a extração de compostos solúveis na fração aquosa, após extração do meio com AcOEt.

PARTE EXPERIMENTAL

1. GENERALIDADES

Os meios de cultivo utilizados para o crescimento das linhagens fúngicas foram: extrato de malte (Acumedia), extrato de batata e dextrose (Acumedia), dextrose (Synth), peptona (Acumedia), ágar (Himedia). Para preparação dos meios de cultivo foi utilizada água purificada por osmose reversa TE 4007-10 (Tecnal) e autoclave vertical AV (Phoenix Luferco).

Para o crescimento das linhagens foram utilizadas as seguintes incubadoras: incubadora refrigerada B.O.D. modelo TE-371 (Tecnal), incubadora com agitação orbital New Brunswick Innova 44 (Eppendorf). Para preparar os inóculos foi utilizada uma capela de fluxo laminar modelo PA420 (SPLabor).

Os solventes utilizados nos procedimentos de extração e fracionamento dos extratos foram de grau analítico (Synth). Nos procedimentos de análise e purificação cromatográfica dos analitos foram utilizados solventes grau HPLC e água destilada Milli-Q Millipore.

Para a preparação de extratos e frações a partir dos meios de cultura dos fungos foram utilizados AcOEt, MeOH, hexano, CH₂Cl₂ e acetona com grau de pureza analítico. Resinas poliméricas Amberlite XAD-2, XAD-4 e XAD-7 (Sigma-Aldrich) foram utilizadas para a captura de metabólitos hidrossolúveis em concentração 20% v/v.

Para secagem de extratos foram utilizados evaporadores rotativos Fisatom 802D, sob pressão reduzida com auxílio de bomba de vácuo B-169 (Brinkmann), e *speedvac* Savant SC 210A (Thermo Scientific) acoplado a uma bomba de alto vácuo RV8 (Edwards).

Para o pré-fracionamento de extratos brutos foram utilizadas colunas pré-empacotadas com sílica-gel, sílica derivatizada com grupos cianopropila, fenila ou

octadecilsilil C₁₈ (Phenomenex Strata® ou Waters Sep-Pak®). Separações cromatográficas de permeação em gel foram realizadas em coluna de vidro (2 x 170 cm), utilizando como fase estacionária Sephadex® LH-20 (Pharmacia-Biotech®) ou coluna de vidro (2 x 100 cm) com fase estacionária Sephadex G15 (Pharmacia Fine Chemicals AB). As eluições foram realizadas utilizando-se MeOH grau HPLC e H₂O purificada em sistema de osmose reversa.

Frações foram avaliadas por cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando-se folhas de sílica gel 60 sobre poliéster (7 x 7 cm) com indicador ultravioleta F₂₅₄ (Sigma-Aldrich). Após eluição, as placas foram observadas sob luz UV nos comprimentos de onda 254 e 365 nm, utilizando-se uma lâmpada ENF240 C/FE (Spectroline), e reveladas separadamente em ácido fosfomolibdico, ninhidrina e Dragendorff. Como eluentes foram utilizados Hex:AcOEt (8:2, v/v) e CH₂Cl₂:MeOH (9:1, v/v).

2. INSTRUMENTAÇÃO E CONDIÇÕES ANALÍTICAS

Os espectros no ultravioleta (UV) foram obtidos em espectrômetro V-630 (Jasco). As amostras foram solubilizadas em 1 mL de solvente. Os espectros no infravermelho (IV) foram obtidos em equipamento IRAffinity (Shimadzu). As amostras foram solubilizadas em MeOH, aplicadas em pastilhas de sílicas e o solvente evaporado com nitrogênio (N₂). As medidas de rotação específica $[\alpha]_D$ foram registradas em polarímetro P-2000 (Jasco). As amostras foram diluídas em 1,5 mL de solvente e as análises realizada a 23 °C. Os espectros de dicroísmo circular (DC) foram obtidos em espectrômetro J-815 (Jasco) e as amostra solubilizadas em 1 mL de solvente.

Para análises por HPLC-UV-MS, frações foram diluídas à concentração de 2 mg mL⁻¹ e analisadas em cromatógrafo líquido modelo Alliance 2695 (Waters®) equipado com injetor automático, acoplado a um detector de arranjo de fotodiodos modelo 2996 ($\lambda_{\text{máx}}$. 200 - 800 nm, Waters®) e a um espectrômetro de massas Micromass ZQ 2000 (Waters®), operado nas seguintes condições: analisador quadrupolo com varredura de massas entre 150 e 1200 Da, modo de ionização por *electrospray* (ESI) operado nos modos positivo e negativo, temperatura de ionização 100 °C, temperatura de dessolvatação 350 °C, fluxo de gás no cone 50 L h⁻¹ e de dessolvatação 350 L h⁻¹.

Foi utilizada uma coluna de fase reversa de sílica derivatizada com grupos C₁₈ RP X-Terra (4,6 x 250 mm, 5 μ m; Waters®). A fase móvel foi constituída por A: H₂O + 0,1% de ácido fórmico e B: MeCN:MeOH (1:1) + 0,1% ácido fórmico. O gradiente linear de eluição

utilizado foi de 10 a 100% B em 30 minutos; 100% B foi mantido por 5 minutos e finalmente 10% B por 10 minutos; vazão de 1 mL min⁻¹. O volume de injeção das amostras foi de 20 µL.

Para a obtenção de espectros de massas de alta resolução foi utilizado um cromatógrafo líquido de ultra eficiência ACQUITY UPLC H-Class (Waters Corporation, Milford, MA, EUA) equipado com um injetor automático de amostras, acoplado a um espectrômetro de massas quadrupolo-TOF (Xevo G2-XS QToF, Waters, EUA) com ionização por *eletrospray* (ESI), operada nas seguintes condições: voltagem do capilar 1,2 kV, voltagem do cone de 30 V, temperatura da fonte de 100 °C, temperatura de dessolvatação de 450 °C, vazão do gás no cone de 50 L h⁻¹ e vazão do gás de dessolvatação de 750 L h⁻¹. A detecção foi realizada em modo positivo (ESI⁺), no modo resolução, o tempo de aquisição foi de 0 a 10 minutos, o intervalo de massa de 150 a 1200 Da, o *scan time* foi de 0,2 s⁻¹, a energia de colisão (alta energia) foi de 20 a 40 V. Para calibração interna, utilizou-se uma solução de leucina-encefalina (Sigma) 20 µg mL⁻¹, infundida pela sonda do *lock-mass* com vazão de 10 µL min⁻¹.

As separações cromatográficas foram realizadas em coluna cromatográfica de fase reversa Acquity UPLC BEH C₁₈ (2,1 x 100 mm, 1,7 µm; Waters Corporation); fase móvel constituída por A: H₂O + 0,1% de ácido fórmico e B: MeCN + 0,1% de ácido fórmico. O gradiente linear de eluição utilizado foi de 10 a 100% B em 7 minutos; 100% B foi mantido por 2 minutos e 10% B por 1 minuto; vazão de 0,5 mL min⁻¹. Coluna Acquity UPLC BEH Amida (2,1 x 100 mm, 1,7 µm; Waters Corporation); fase móvel constituída por A: tampão 10 mM ácido acético/acetato de amônia e B: MeCN + 0,1% de ácido fórmico. O gradiente linear de eluição utilizado foi 5 a 50% de A, de 1 a 7 minutos, 50% A foi mantido por 2 minutos e 5% de A por 1 minuto; vazão de 0,5 mL min⁻¹. O volume de injeção utilizado foi de 2-10 µL. A coluna e pré-coluna foram mantidas a uma temperatura de 40 °C, enquanto as amostras foram mantidas a 15 °C.

O fracionamento de amostras e purificação de substâncias em escala analítica e semi-preparativa foram realizadas em um sistema cromatográfico HPLC 2535 (Waters) equipado com um sistema quaternário de bombas, acoplado a detector UV 2489 (Waters) de duplo feixe e detector de espalhamento de luz ELSD 2424 (Waters). Foram utilizadas as seguintes colunas: a. Colunas de sílica-gel derivatizada com grupos C₁₈ InertSustain® (4,6 x 250 mm, 5µm; GL Science, Inc., Japão), InertSustain® (10 x 250 mm, 5µm; GL Science, Inc., Japão), RP X-Terra® (7,8 x 150 mm, 5µm; Waters, Irlanda); b. Colunas de

sílica-gel derivatizada com grupos C₈ Inertsil® C8-4 (4,6 x 250 mm, 5µm; GL Science, Inc., Japão), InertSustain® (4,6 x 250 mm, 5µm; GL Science, Inc., Japão), InertSustain® (10 x 250 mm, 5µm; GL Science, Inc., Japão); c. Coluna de sílica-gel derivatizada com grupos fenila Inertsil® Ph (4,6 x 250 mm, 5µm; GL Science, Inc., Japão).

As substâncias puras foram submetidas a análise por RMN de ¹H em alíquotas diluídas em MeOH deuterado (MeOH-*d*₄), piridina deuterada (piridina-*d*₅) ou dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-*d*₆) (*Cambridge Isotope Laboratories, Inc.*, Tewksbury, MA, EE.UU). Foram realizadas análises de RMN de ¹³C, COSY, HSQC, HMBC, NOESY, quando necessário. As análises foram realizadas em equipamento Bruker, modelo AVANCE III 9,4 Tesla, de 400 MHz na frequência do ¹H e 100 MHz na frequência do ¹³C, ou 14,1 Tesla de 600 MHz na frequência do ¹H e de 150 MHz na frequência do ¹³C, equipado com crio-sonda TCI (¹H/¹³C/¹⁵N) de 5 mm com ATMA® (*Automatic Tunning Matching*) e gradiente de campo em z.

3. PROTOCOLOS DOS BIOENSAIOS

Alíquotas de 1 a 3 mg de extratos e frações foram enviados para os seguintes ensaios biológicos:

- Leishmanicida e tripanossomicida: Realizados pelos Dr. Danilo Ciccone Miguel e Dra. Fernanda Gadelha – Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas, SP;
- Inibição do proteassomo: Realizado pela Dr. Daniela Trivela – LNBio, Campinas, SP;
- Antibacteriano: Realizado pelo Dr. Carlos Martins - UNIFRAN, Franca, SP;
- Inibição da PBP2x: Realizado pela Dra. Andrea Dessen – LNBio, Campinas, SP;
- Citotoxicidade: Realizado pela Dra. Raquel Santos -UNIFRAN, Franca, SP.

3.1 ATIVIDADE LEISHMANICIDA

O cultivo dos promastigotas de *Leishmania amazonensis* e *Leishmania infantum* foram mantidos em culturas estéreis de 25 cm², a 26°C, em meio 199 (Sigma-Aldrich), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Nutricell). Às culturas de *L. infantum* foram adicionados 2% de urina humana masculina filtrada e mais 10% de soro fetal bovino. A sensibilidade de promastigotas frente aos diferentes compostos foi avaliada utilizando-se o método do MTT (3,4).

A primeira fase dos testes consistiu na avaliação da atividade dos compostos a partir em duas concentrações 50 e 100 µg mL⁻¹, durante 24 h. Após este período, caso a viabilidade celular calculada com relação ao controle não tratado fosse igual ou inferior a 15%, foram realizados ensaios com as seguintes concentrações do composto de interesse: 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 µg mL⁻¹, durante 24 h. Foi acrescentado ao ensaio um grupo incubado com 1% DMSO como controle de diluente.

Os ensaios para avaliação de sensibilidade *in vitro* foram realizados com promastigotas de fase logarítmica (2,5 a 5 x 10⁶ por poço em placas de 96 poços) incubados com concentrações crescentes dos compostos por 24 h. A seguir, adicionou-se 30 µL de 5 mg mL⁻¹ de MTT (Sigma-Aldrich) preparado em PBS 1X estéril para incubação por 2 h à 26 °C. Logo, foram adicionados 30 µL de SDS 20% e o produto liberado teve sua absorbância medida através de um espectrofotômetro (MultiSkan Synergy).

As curvas dose-resposta para obtenção das concentrações efetivas para inibição de 50 e 90% de crescimento das culturas (EC50% e EC90% respectivamente), assim como as concentrações letais (100%), foram determinadas utilizando-se o software Origin (OriginLab Corp.). Cada ensaio foi realizado em triplicata. Os resultados foram apresentados como médias ± erro padrão da média (SEM) e analisados estatisticamente com o software GraphPad Prism 4.0 Software (San Diego, CA, USA), levando-se em conta o tipo de teste mais adequado para cada condição experimental. Os valores de concentração inibitória foram determinados para 50%, 90% e 100% das culturas. Apenas valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

3.2 ATIVIDADE ANTI *T. cruzi* IN VITRO

Epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Y) foram cultivados em meio de infusão de triptose de fígado suplementado com 20 mg L⁻¹ de hemina e 10% de soro fetal de vitelo a 28 °C (5). Os parasitas transfectados foram cultivados no mesmo meio contendo 200 µg L⁻¹ de G418. Após 5 dias de proliferação, as células foram recolhidas por centrifugação (1000 x g a 4 °C, 5 min), lavadas e ressuspensas em solução salina com tampão fosfato (PBS pH 7,3). Para a contagem das células foi utilizada uma câmara de Neubauer.

A atividade antiparasitária foi avaliada contra tripanosomatídeos utilizando o teste de viabilidade de MTT após 24 h de incubação (4). Os valores de concentração máxima efetiva (EC₅₀) para as populações de *T. cruzi* foram calculados a partir da regressão sigmoide das curvas concentração-resposta utilizando o software Origin 5.0. Os experimentos foram realizados em triplicata e repetidos três vezes.

Os experimentos citotóxicos foram realizados utilizando-se macrófagos de medula óssea obtidos a partir de camundongos BALB c⁻¹. As células diferenciadas foram cultivadas em placas de 96 poços a 37 °C para posterior incubação com concentrações crescentes das amostras ativas durante 24 h. O método MTT também foi realizado e os valores de IC₅₀ foram calculados em conformidade. Os experimentos com camundongos BALB c⁻¹ foram aprovados pelo Comitê Ético de Experimentação Animal do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP (4535-1/2017).

3.3 INIBIÇÃO DO PROTEASSOMO

A partícula 20S do proteassomo foi purificada de células de *Saccharomyces cerevisiae*. O substrato fluorescente Suc-LLVY, específico para atividade tipo quimotripsina (subunidade β5), foi obtido comercialmente. Os ensaios foram realizados em placas de 384 poços contendo 1 µL das frações-teste na concentração de 1 mg mL⁻¹ (extratos brutos, frações enriquecidas ou compostos puros) e 19 µL do proteassomo preparado na concentração de 1 µg mL⁻¹ em solução tampão (Tris 100 mmol L⁻¹ pH 7,5; EDTA 0,5 mmol L⁻¹; SDS 0,03%). A placa foi incubada à 37 °C por 30 min.

Em seguida, foram adicionados 5 µL do substrato suc-LLVY-AMC a 250 µM no mesmo tampão. A intensidade de fluorescência (IF, λ_{máx} excitação = 355 nm; λ_{máx} emissão

= 460 nm) em cada poço foi medida após 1 h de incubação da enzima com o substrato. Um grupo controle na ausência de inibidor (DMSO) foi realizado para referência. A IF das amostras de proteassomo tratadas com as frações-teste foi normalizada pelos valores do controle em DMSO (o qual representou 100% da atividade enzimática) e expressos como porcentagem de atividade remanescente da enzima após incubação com a fração teste. Os melhores compostos identificados foram submetidos a experimentos em diferentes concentrações, a fim de se obter os seus valores de IC₅₀.

3.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Para os ensaios foram utilizadas bactérias de coleção (cepas padrão) da *American Type Culture Collection* (ATCC/USA) e da *National Collection of Type Cultures* (NCTC/UK), bem como isolados clínicos (IC) de pacientes com infecções causadas por bactérias multirresistentes, cedidas pelo Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. A atividade antibacteriana foi avaliada pela técnica de micro diluição em caldo para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).

Para a obtenção do inóculo, cepas armazenadas em freezer a -80 °C foram repicadas em meio de cultura Ágar Sangue. Após isto, as bactérias foram incubadas em temperatura de 37 °C em estufa bacteriológica durante 24 h. Após este período, as cepas foram utilizadas para os ensaios da determinação da CIM. A quantidade do inóculo foi padronizada a fim de assegurar a reprodutibilidade dos ensaios.

Primeiramente, foi preparada a escala 0,5 de McFarland. Em seguida, 500 µL foram transferidos para um tubo com 4,5 mL de solução salina. Posteriormente, 2 mL foram transferidos para um tubo com 10 mL de caldo Mueller-Hinton (MHb). Foi utilizada solução salina para calibrar a transmitância à 100% em espectrofotômetro em comprimento de onda de 625 nm. A suspensão do padrão 0,5 da escala de McFarland foi medida, esperando-se uma transmitância de 96%, que corresponde a 10⁶ UFC mL⁻¹. Todas as suspensões bacterianas foram ajustadas na mesma transmitância.

Os compostos foram diluídos em DMSO. Um miligrama das amostras foi pesado e solubilizado em 125 µL de DMSO. Para cada 125 µL desta solução, foram adicionados 500 µL de caldo Mueller-Hinton (Difco). Para a validação da técnica foi utilizada tetraciclina (Sigma) em concentrações que variaram entre 0,0115 e 5,9 µg mL⁻¹ preparadas a uma

concentração de 10 mg mL⁻¹ sendo diluídas em água destilada esterilizada. Em seguida, foram transferidos 4 µL do composto para um tubo contendo 1.996 µL de caldo Mueller-Hinton.

Para determinação da CIM utilizou-se a técnica de micro diluição em microplaca realizada de acordo com a metodologia preconizada pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute*, com adaptações, empregando-se resazurina como revelador do crescimento bacteriano.

A determinação da CIM para cada bactéria foi realizada em duplicata. Com o auxílio de uma alça de inoculação esterilizada, culturas das bactérias foram transferidas para tubos contendo solução salina a 0,9% e padronizadas em espectrofotômetro. Em uma microplaca esterilizada de 96 poços foram depositadas um total de 100 µL da mistura do caldo Mueller-Hinton, amostra teste e suspensão bacteriana, de forma a obter-se uma concentração das amostras de 0,048 a 100 µg mL⁻¹. Em um dos poços foi realizado o controle de cultura. Em um segundo poço o controle de esterilidade do caldo e da amostra. Em um terceiro poço o controle do solvente (DMSO). A placa foi incubada à 37 °C em estufa bacteriológica, durante 24 h.

Após o período de incubação, 30 µL de resazurina (Sigma) preparado em solução aquosa (0,02%) foram adicionados em cada poço. Este sistema revelador permitiu a observação visual, sendo que a cor azul representou ausência de crescimento microbiano e a cor vermelha a sua presença (6). As microplacas foram reincubadas por 30 min e após este período foram observadas e analisadas de forma descritiva. As amostras foram consideradas ativas, quando a CIM foi igual ou inferior a 100 µg mL⁻¹.

3.5 INIBIÇÃO DA PROTEÍNA PBP2X (*Penicillin-binding protein 2x*)

Fragmentos correspondentes as PBPs 2b cepas 5205 e R6, PBP2x e PBP1b de *Streptococcus pneumoniae* foram clonados em vetor pGEX-4T-1. As proteínas recombinantes foram expressas na presença de 1 mM de IPTG durante um período overnight à 16 °C. Uma vez induzidas, as células foram submetidas a centrifugação a 6000 rpm por 10 min a 4 °C e os precipitados foram ressuspensos em tampão de lise 50 mM Tris e 200 mM NaCl em pH 7,5. A ruptura das células, bem como do DNA das amostras, foi realizada mecanicamente no gelo utilizando-se sonicação (2 segundos com intervalos de

10 segundos por 2 min), e os extratos foram centrifugados a 13000 rpm durante 40 min a 4 °C para a obtenção do sobrenadante.

Para a purificação da proteína, o sobrenadante contendo a proteína de interesse foi fracionado em coluna GSTrap (GE Healthcare) de 5 mL previamente equilibrada com tampão A: 50 mM Tris e 200 mM NaCl em pH 8,0 e a proteína foi eluída após tratamento com trombina por 2 h a temperatura ambiente em tampão: 50 mM Tris e 200 mM NaCl em pH 8,0. As frações contendo a proteína foram então submetidas à exclusão por tamanho em coluna Superdex 75 16/60 (GE Healthcare) utilizando-se para tanto tampão: 20 mM Tris, 200 mM NaCl e 1 mM EDTA em pH 8,0.

Os compostos puros foram incubados por 1 h com a proteína recombinante purificada. Posteriormente, foi adicionada Bocilina FL® (Invitrogen), análogo fluorescente à penicilina, utilizado como competidor ao domínio de ligação à penicilina das proteínas PBPs. Foram utilizadas placas escuras de 384 poços ProxiPlate® (PerkinElmer®), e o leitor ClarioStar® do LNBIO com comprimento de onda de excitação de 485 nm e emissão de 520 nm, utilizando-se um filtro a 515 nm para bloquear excitações residuais. O pré-ensaio de otimização e o ensaio de *screening* utilizando-se as diferentes bibliotecas foram realizados de acordo com protocolo descrito em Fedarovich (7) sob supervisão do Dr. Artur Cordeiro especialista em HTS e pesquisador integrante do Laboratório Nacional de Biociências LNBio.

3.6 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIPROLIFERATIVO DE CÉLULAS TUMORAIS (CITOTOXICIDADE)

A citotoxicidade foi determinada por meio da utilização do *Cell Proliferation Kit* (Roche Applied Science), baseado na clivagem do sal amarelo tetrazolium XTT pelas células metabolicamente ativas, formando o corante formazana alaranjado. Foram semeadas 10⁴ células por poço em placas de 96 poços e mantidas em estufa de CO₂ à 37 °C por 24 h. Após esse período o protocolo de tratamento consistiu na exposição das células a diferentes concentrações da substância teste (0,1; 1; 10 e 100 µM) por 24 h.

O controle negativo não recebeu tratamento e o controle positivo foi tratado com DMSO 10% (v/v). Após esse tempo de exposição, foi realizada lavagem das células com tampão salino fosfato (PBS) 1X e incubação das mesmas em meio DMEM sem fenol vermelho acrescido da solução XTT/elétron por 4 h. Após esse período, foi realizada a

leitura colorimétrica em espectrofotômetro (492-690 nm), sendo então determinada a proporção de células viáveis em razão das medidas de absorbância. O IC₅₀ foi calculado por meio de regressão não-linear usando o software GraphPad Prism 3.0.

Diversificação química do metaboloma de fungos de origem marinha por modulação epigenética

1.1 INTRODUÇÃO

Estudos do metabolismo secundário de microrganismos utilizando-se modificações das condições de cultivo (OSMAC, *One strain, many compounds*), destacam como uma única linhagem pode produzir diversos metabólitos secundários quando cultivada em diferentes condições. Parâmetros como concentração de nutrientes, temperatura e taxa de aeração podem ser facilmente modificados, alterando o ambiente global de crescimento de uma cepa microbiana e, por sua vez, afetando a expressão de seu metabolismo secundário (8).

Embora a abordagem OSMAC permita, até certo ponto, encontrar e isolar uma grande variedade de metabólitos, condições químicas ou ambientais que permitem induzir a expressão de genes de metabólitos secundários nos microrganismos parecem estar ausentes em condições de cultura em laboratório (9).

Pesquisas relacionadas ao estudo do sequenciamento dos genomas microbianos indicam que somente uma pequena parte destes genes é expressa. Esta descoberta despertou o interesse em se investigar rotas biossintéticas silenciosas (RBS) que podem levar à produção de metabólitos secundários inéditos e bioativos (10-13).

Assim, o número de metabólitos secundários expressos por muitos microrganismos em condições de cultivo típicos de laboratório correspondem a uma fração muito pequena quando comparados ao seu potencial biossintético genético (14-16).

A investigação das RBSs avançou significativamente nos últimos 10 anos. Novos avanços tecnológicos devem diversificar e ampliar a descoberta de metabólitos

secundários bioativos. As abordagens baseadas nas modificações das condições de cultivo continuam sendo um recurso viável incrementar a diversificação do metabolismo secundário de microrganismos.

1.1.1. UTILIZAÇÃO DE MODULADORES EPIGENÉTICOS PARA A EXPRESSÃO DO METABOLISMO SECUNDÁRIO DE FUNGOS

A genômica utiliza a bioinformática para identificar sequências genéticas responsáveis por funções específicas. A bioinformática permite pesquisar o genoma de um organismo e identificar grupos de genes que codificam enzimas que podem produzir determinados metabólitos secundários (17,18). Além disso, permite prever a estrutura potencial de produtos naturais codificados por determinados agrupamentos de genes (clusters). Porém, muitos metabólitos previstos pelo genoma não são expressos sob condições de cultivo em laboratório (19). Esses agrupamentos de genes são conhecidos como genes silenciosos ou crípticos.

Com o objetivo estimular a produção de novos metabólitos secundários são utilizadas abordagens, como co-cultivo, engenharia ribossômica, alteração de regiões promotoras e fatores de transcrição, bem como alteração das condições de crescimento (20). Outra metodologia, consiste em tratar os meios de cultura de fungos com pequenas moléculas, conhecidas como modificadores epigenéticos.

1.1.1.1 Modificação Epigenética

A epigenética é a alteração da expressão dos genes por mecanismos diferentes das alterações nas sequências subjacentes do DNA. A maior parte dos mecanismos que induzem a função de modificação epigenética altera a forma como o DNA é armazenado, pela adição de moléculas ao DNA ou nas histonas (21-24).

As histonas são proteínas altamente conservadas que junto com o DNA formam a cromatina. As histonas contêm muitos resíduos de lisinas carregadas positivamente, que podem agir como pontos de modificação, como a acetilação (25-27). Diferentes famílias de histona acetiltransferases (HAT) são responsáveis por catalisar a adição covalente de grupos acetila; a reação inversa é realizada por enzimas histona desacetilases (HDAC).

As histonas sofrem uma ampla gama de modificações pós-traducionais, sendo a acetilação e a metilação as duas alterações mais frequentes (28,29). Ao alterar a estrutura da histona através dessas modificações, a transcrição do DNA que rodeia a histona pode ser afetada. Por exemplo, a acetilação de uma histona diminui a sua densidade de carga positiva; consequentemente, as interações eletrostáticas entre a histona carregada positivamente e o DNA carregado negativamente são diminuídas (30). Isso afeta a maneira como o DNA liga-se à histona e a cromatina se torna em uma estrutura relaxada. A estrutura relaxada da cromatina facilita o acesso das enzimas replicativas e o aumento na transcrição dos genes (25).

Diversos compostos inibem seletivamente as funções das histonas. Estes compostos são ferramentas moleculares importantes para estudar os epigenomas (31). A tricostatina A (**1**), um hidroxamato isolado do meio de cultivo da bactéria *Streptomyces platensis*, e o seu mimico sintético, suberoilanolida do ácido hidroxâmico (SAHA, **2**), são dois exemplos de potentes inibidores do epigenoma utilizados com sucesso como moduladores epigenéticos químicos em uma variedade de sistemas eucarióticos, modificando quantitativa e/ou qualitativamente seu perfil metabólico (23-24,31-32).

O estudo do genoma do fungo *A. niger* indicou que essa espécie de microrganismo contém 33 agrupamentos de genes poliketido sintetase (PKS), 15 agrupamentos peptídeo sintetase não ribossomal (NRPS), e 9 agrupamentos híbridos. Dentre os agrupamentos identificados, menos de 30% das moléculas correspondentes foram isoladas em condições de laboratório (21). Porém, após alterações do meio de cultivo de

Aspergillus niger, com o modulador epigenético ácido hidroxâmico suberoilânilda (SAHA, **2**), 48 dos 57 agrupamentos mencionados acima foram detectados (21).

A adição do SAHA ao meio de cultura do fungo *Cladosporium cladosporioides* induziu a produção de uma série de perilenequinonas. Duas foram caracterizadas como novos metabólitos, os cladocromos F (**3**) e G (**4**) (33).

O fungo *Aspergillus niger* produziu a nigerona A (**5**) quando cultivado em presença de SAHA. Esse composto não foi detectado na ausência do modificador epigenético (34).

3. R₁ = OH; R₂ = *p*-hidroxibenzoato (Cladocromo F)

4. R₁ = OH; R₂ = *p*-hidroxicarbonato (Cladocromo G)

5

1.1.1.2 Ácido hidroxâmico suberoilânilda (SAHA)

Os ácidos hidroxâmicos (RCONR'OH) são uma família de ácidos orgânicos muitos mais fracos do que os ácidos carboxílicos correspondentes. Esses compostos são conhecidos desde 1869, com a descoberta do ácido oxalohidroxâmico. No entanto, o estudo sobre a estrutura e síntese dos ácidos hidroxâmicos e suas atividades biológicas tornou-se relevante apenas a partir da década de 80 (35).

Ácidos hidroxâmicos inibem enzimas como peroxidases (36,37), hidrolases (38,39), histona deacetilase (40,41), entre outras. Esses compostos têm sido avaliados no tratamento de diferentes doenças relacionadas com a inativação dessas enzimas, como diferentes tipos de câncer, de inibição do vírus HIV, no combate à doença de Alzheimer e doenças cardiovasculares (32).

No ano de 1996 Breslow e colaboradores descobriram o SAHA, um potente inibidor das enzimas tipo I e II histona desacetilase (HDAC). O SAHA foi o primeiro

inibidor da histona desacetilase a ser aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) para ser utilizado no tratamento de linfoma cutâneo de células T (42).

Estudos realizados por difração de raios X demonstraram que o SAHA interage com o sítio ativo da enzima HDAC, que consiste num bolso do tipo tubo estreito, com uma profundidade de cadeia linear de 4 a 6 carbonos e um íon Zn^{2+} no sitio ativo no interior da HDAC (**Figura 3**).

Figura 3. Representação esquemática do modelo farmacofórico básico e ligação de inibidores HDAC à base de ácido hidroxâmico (43).

Potentes inibidores da HDAC apresentam um grupo chamado de *cap*, com características hidrofóbicas, uma cadeia alifática contendo cinco ou seis átomos de carbono e um grupo de ligação ao zinco (ZBG, **Figura 4**) (43). Essas três características devem ser levadas em conta no momento de sintetizar análogos do SAHA.

Figura 4. Estrutura dos inibidores da enzima HDAC à base de SAHA

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 OBJETIVO GERAL

Induzir modificações epigenéticas no metabolismo secundário de fungos isolados do ambiente marinho, que permitam a expressão de genes silenciosos, favorecendo a produção e obtenção de novos compostos potencialmente bioativos.

1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar o SAHA e cinco análogos estruturais modificando a estrutura do anel aromático.
- Realizar experimentos de modificação epigenética, com a adição dos agentes sintetizados aos meios de cultura, avaliando possíveis mudanças do perfil químico dos extratos das linhagens em estudo.
- Purificar os compostos produzidos pelas linhagens fúngicas após adição dos agentes epigenéticos.
- Determinar a estrutura química dos compostos puros obtidos, assim como avaliar sua atividade biológica.

1.3. PARTE EXPERIMENTAL

1.3.1 LINHAGENS FÚNGICAS

As linhagens fúngicas utilizadas nos experimentos de modificação epigenética são as descritas a seguir:

- ✓ DRF1 (*Acremonium* sp.): Isolado da esponja *Dragmacidon reticulatum*.
- ✓ DRF2 (*Penicillium* sp.): Isolado da esponja *Dragmacidon reticulatum*.
- ✓ DRF5 (*Myrmecridium* sp.): Isolado da esponja *Dragmacidon reticulatum*.
- ✓ BF (*Beauveria felina*): Isolado da alga *Caulerpa* sp.
- ✓ DRG1 (*Aspergillus sydowii*): Isolado da esponja *Dragmacidon reticulatum*.
- ✓ DRA6 (*Microphaeropsis* sp.): Isolado da esponja *Dragmacidon reticulatum*.
- ✓ DLM3-8 (*Aspergillus* sp.): Isolado da ascídia *Didemnum ligulum*.
- ✓ CBMAI 1061 (*Tinctoporellus* sp.): Isolado da esponja *Dragmacidon reticulatum*.

1.3.2 SÍNTESES DO ÁCIDO HIDROXÂMICO SUBEROILANILIDA (SAHA) E COMPOSTOS ANÁLOGOS

Todos os solventes e reagentes utilizados na síntese dos derivados do SAHA foram adquiridos na *Sigma-Aldrich* e *TCI Chemicals*, e utilizados sem prévia purificação.

O avanço das diferentes reações de todos os compostos, assim como sua purificação, foi monitorado por cromatografia em camada delgada (CCD), em folhas cromatográficas com sílica gel 60 F₂₅₄ (Merck). A visualização dos compostos foi realizada utilizando-se lâmpada UV (254 nm).

A purificação dos compostos intermediários foi realizada por cromatografia de adsorção em coluna sobre sílica gel (60-230 mesh, Aldrich), sendo eluída com mistura dos solventes Hex:AcOEt com aumento gradual da polaridade (8:2, 3:7; v/v).

1.3.2.1 Procedimento de síntese

Dos procedimentos encontrados na literatura para a síntese do SAHA (44-49), o proposto por Gediya *et. al.* é uma síntese que envolve duas etapas em condições de reação suaves, e leva à obtenção de SAHA de alta pureza com um rendimento global de reação de

79,8 % (47). Essa via permite gerar diversidade química em relação ao anel aromático, substituindo a anilina por outros análogos (**Figura 5**).

Figura 5. Procedimento para a síntese do ácido hidroxâmico SAHA e seus análogos proposto por Gediya *et. al.* (47)

Foram utilizadas as arilaminas **6** - **11** separadamente para sintetizar, em duas etapas, seus ácidos hidroxâmicos correspondentes. Após a primeira etapa, a purificação foi realizada em coluna cromatográfica empacotada com sílica-gel. Após a segunda etapa os compostos obtidos foram purificados utilizando-se um sistema HPLC-UV e colunas analítica C₁₈ InertSustain® (4,5 x 250 mm, 5 µm) e semi-preparativa de fase reversa C₁₈ InertSustain® (10 x 250 mm, 5 µm).

Etapas 1. Em um balão de 50 mL foram adicionados o éster monometil suberato (53,1 mmol), 1-hidroxibenzotriazol (63,7 mmol), a amina selecionada (63,7 mmol, **6** (0,59 g), **7** (0,71 g), **8** (0,71 g), **9** (0,69 g), **10** (0,60 g), **11** (0,6 g)), dissolvidos em 6 mL de dimetilformamida (DMF) à temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionada diciclohexilcarbodiimida (DCC) (63,7 mmol). A mistura foi agitada à temperatura

ambiente durante 3-12 horas. O precipitado de diciclohexiluréia foi separado por filtração e lavado com DMF. O filtrado foi adicionado à 90 mL de água fria em agitação. O precipitado formado foi filtrado e seco. A purificação do produto bruto foi realizada em coluna cromatográfica empacotada com sílica-gel e eluído com uma mistura de solventes Hex:AcOEt ou EtOAc:MeOH (**Tabela 1**). O solvente foi removido em evaporador rotativo, obtendo-se os compostos **12-17**.

Tabela 1. Condições de purificação em coluna flash do produto bruto obtido na **etapa 1**

Éster metílico do ácido suberanílico	R _f	Sistema de solventes	Rendimento
12	0,4	Hex:EtOAc 1:1	1,24 g, 89%
13	0,33	Hex:EtOAc 1:1	0,98 g, 66%
14	0,52	Hex:EtOAc 1:1	1,35 g, 91%
15	0,46	Hex:EtOAc 1:1	0,89 g, 60%
16	0,27	Hex:EtOAc 1:1	0,92 g, 62%
17	0,44	EtOAc:MeOH 95:5	0,52 g, 37%

Etapa 2. Cloridrato de hidroxilamina (86,1 mmol, 5,98 g) em MeOH (15 mL) foi misturado à uma solução de KOH (86,1 mmol, 4,83 g) em MeOH a 0°C. A mistura foi filtrada. Em seguida, foi adicionado ao filtrado o produto 1 obtido na etapa anterior, além de KOH (70 mmol, 0,4 g) ao longo de 30 minutos. A mistura foi agitada à temperatura ambiente

durante 3-24 horas. Em seguida, a mistura foi adicionada a 150 mL de água fria e o pH foi ajustado para 7 com ácido acético. O precipitado foi separado por filtração e o filtrado, o **produto 2** da reação, foi seco num sistema *speedvac* modelo Savant SC 210A (Thermo Scientific), acoplado a uma bomba de alto vácuo modelo RV8 (Edwards). Os ácidos hidroxâmicos obtidos **2,18-22** foram purificados em sistema HPLC-UV (**Tabela 2**).

Tabela 2. Condições de purificação em sistema HPLC-UV do produto bruto obtido na etapa 2, monitorado no comprimento de onda de 254 nm. Colunas analítica C₁₈ InertSustain® (4,5 x 250 mm, 5 µm) e semi-preparativa de fase reversa C₁₈ InertSustain® (10 x 250 mm, 5 µm). Vazão 4 mL min⁻¹, eluição em modo isocrático.

Ácido hidroxâmico	Composição da fase Móvel
2	H ₂ O:MeCN 70:30
18	H ₂ O:MeOH 70:30
19	H ₂ O:MeCN:MeOH 46:27:27
20	H ₂ O:MeOH 65:35
21	H ₂ O:MeCN 52:48
22	H ₂ O:MeCN:MeOH 70:15:15

1.3.2.2 Dados espectroscópicos dos compostos sintetizados

Ácido hidroxâmico suberoilanicida (SAHA)

Sólido branco (0,96 g, 69%). FM: C₁₄H₂₀N₂O₃. IV (KBr) 3230, 2931, 1666, 1548, 1498, 1315, 960, 759, 690 cm⁻¹; RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) *J* (Hz) δ 10,32 (s, 1H, -OH), 9,83 (s, 1H, -NH), 8,64 (s, 1H, -NH), 7,58 (d, 2H, *J* = 7,9), 7,28 (t, 2H, *J* = 7,8), 7,01 (t, 1H, *J* = 7,3), 2,28 (t, 2H, *J* = 7,5), 1,95 (t, 2H, *J* = 7,4), 1,57 (m, 2H), 1,49 (m, 2H), 1,27 (m, 4H). HRMS (ESI⁺) encontrado [M+H]⁺ em *m/z* 265,1559; calculado para C₁₄H₂₀N₂O₃ [M+H]⁺ 265,1552; 2,6 ppm.

Ácido hidroxâmico *p*OH-suberoilânilda (*p*OH-SAHA)

Sólido branco (0,82 g 55%). FM: C₁₄H₂₀N₂O₄. IV (KBr) 3400, 3298, 3091, 2856, 1656, 1610, 1590, 1510, 1448, 1226, 1041, 727 cm⁻¹; RMN de ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) *J* (Hz) δ 9,71 (s, 1H, -NH), 7,34 (d, 2H, *J* = 8,9), 6,67 (d, 2H, *J* = 8,9), 2,22 (t, 2H, *J* = 7,4), 1,93 (t, 2H, *J* = 7,4), 1,54 (m, 2H), 1,48 (m, 2H), 1,26 (m, 4H). HRMS (ESI⁺) encontrado [M+H]⁺ em *m/z* 281,1499; calculado para C₁₄H₂₀N₂O₄ [M+H]⁺ 281,1501; 0,7 ppm.

Ácido hidroxâmico *p*Me -suberoilânilda (*p*Me-SAHA)

Sólido branco (1,06 g, 72%) FM: C₁₅H₂₂N₂O₃. IV (KBr) 3356, 2945, 2854, 1720, 1693, 1597, 1529, 1438, 1338, 960, 819, 692 cm⁻¹; RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) *J* (Hz) δ 9,73 (s, 1H), 7,46 (d, 2H, *J* = 8,4), 7,07 (d, 2H, *J* = 8,3), 2,25 (t, 2H, *J* = 7,5), 2,23 (s, 3H), 1,93 (t, 2H, *J* = 7,4), 1,55 (m, 2H), 1,48 (m, 2H), 1,27 (m, 4H). HRMS (ESI⁺) encontrado [M+H]⁺ em *m/z* 279,1712; calculado para C₁₅H₂₂N₂O₃ [M+H]⁺ 279,1708; 1,4 ppm.

Ácido hidroxâmico 2F-suberoilânilda (2F-SAHA)

Sólido branco. FM (0,74 g, 50%): C₁₄H₁₉FN₂O₃. IV (KBr) 3292, 2941, 2862, 1666, 1618, 1531, 1456, 1315, 975, 754 cm⁻¹; RMN de ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) *J* (Hz) δ 10,33 (s, 1H, -OH), 9,63 (s, 1H, -NH), 7,82 (m, 1H), 7,22 (m, 1H), 7,14 (m, 2H), 2,35 (t, 2H, *J* = 7,4), 1,93 (t, 2H, *J* = 7,4), 1,56 (m, 2H), 1,48 (m, 2H), 1,27 (m, 4H). HRMS (ESI⁺) encontrado [M+H]⁺ em *m/z* 283,1468; calculado para C₁₄H₁₉FN₂O₃ [M+H]⁺ 283,1458; 3,5 ppm.

Ácido hidroxâmico 4F-suberoilânilda (4F-SAHA)

Sólido branco amarelado (0,78 g, 53%). FM: $C_{14}H_{19}FN_2O_3$. IV (KBr) 3383, 2943, 1695, 1541, 1511, 1435, 1338, 846, 779, 651 cm^{-1} ; RMN de 1H (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ (ppm) J (Hz) δ 9,90 (s, 1H), 7,58 (m, 2H), 7,11 (t, 1H, $J = 8,9$), 2,26 (t, 2H, $J = 7,5$), 1,93 (t, 2H, $J = 7,4$), 1,57 (m, 2H), 1,48 (m, 2H), 1,27 (m, 4H). HRMS (ESI⁺) encontrado $[M+H]^+$ em m/z 283,1465; calculado para $C_{14}H_{19}FN_2O_3$ $[M+H]^+$ 283,1458; 2,5 ppm.

Ácido hidroxâmico 2AM-suberoilânilda (2AM-SAHA)

Sólido branco (0,33 g, 23%). FM: $C_{13}H_{19}N_3O_3$. RMN de 1H (500 MHz, $DMSO-d_6$) δ (ppm) J (Hz) δ 10,45 (s, 1H), 10,35 (s, 1H), 8,67 (s, 1H), 8,28 (m, 1H), 8,08 (d, 2H, $J = 8,4$), 7,74 (t, 1H, $J = 7,4$), 7,06 (m, 1H), 2,36 (t, 2H, $J = 7,4$), 1,93 (t, 2H, $J = 7,4$), 1,56 (m, 2H), 1,48 (m, 2H), 1,27 (m, 4H). HRMS (ESI⁺) encontrado $[M+H]^+$ em m/z 266,3119; calculado para $C_{13}H_{19}N_3O_3$ $[M+H]^+$ 266,3112; 2,6 ppm.

1.3.3 USO DE SAHA E ANÁLOGOS SINTETIZADOS PARA A DIVERSIFICAÇÃO QUÍMICA DO METABOLISMO SECUNDÁRIO DE LINHAGENS FÚNGICAS

1.3.3.1 *Screening* da variabilidade química gerada pelos modificadores epigenéticos sintetizados

De maneira a se determinar a concentração necessária do modulador epigenético para induzir uma modificação visível no perfil químico dos extratos dos fungos estudados, foram preparadas soluções padrão dos compostos sintetizados puros **2,18-22**. A partir das soluções padrão foram preparadas uma série de diluições em DMSO variando a concentração de 390 μM a 200 mM (**Figura 6**).

Figura 6. Diluições preparadas utilizando SAHA e análogos sintetizados.

1.3.3.1.1 Experimento teste 1. Para cada linhagem foram preparados 10 frascos de 20 mL contendo 3 mL de meio de cultura PDB. Alíquotas de 30 µL de cada diluição do SAHA foram adicionadas separadamente em cada frasco (1% solução do modificador epigenético). Adicionou-se 10^5 esporos mL^{-1} a cada tubo ou 1 plug de 0,5 cm do fungo crescido em placa de Petri. Os frascos foram incubados em um sistema de agitação orbital a 28 °C, 150 rpm durante 15 dias. Simultaneamente, foram realizados experimentos de controle, um do meio de cultivo contendo DMSO e outro do inóculo em ausência do SAHA.

Após este período, os experimentos foram extraídos particionando-se o meio de cultivo com AcOEt, filtrados à vácuo em funil de Büchner através de uma camada de celite e particionados em funil de separação. A fração orgânica foi seca em rotaevaporador, ressuspensa em MeOH aquoso (MeOH:H₂O 9:1 v/v) e particionada com hexano. Os extratos metanólicos obtidos foram secos e analisados em sistema HPLC-UV-MS. O mesmo procedimento foi realizado para os cinco análogos **18-22** sintetizados.

1.3.3.1.2 Experimento teste 2. Para cada linhagem foram utilizados como meios de cultura malte 2% (M2) e *potato dextrose broth* (PDB). Em frascos Schott de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultura foram adicionados separadamente uma alíquota de 500 µL de uma solução de concentração 10 mM de cada um dos compostos sintetizados e inoculados separadamente com 10^5 esporos de cada fungo ou 1 plug de 0,5 cm do fungo

crescido em placa Petri. Os frascos foram incubados em um sistema de agitação orbital a 28 °C, 150 rpm durante 15 dias. Simultaneamente foram realizados experimentos de controle do meio de cultivo contendo DMSO e controle do inóculo em ausência dos moduladores epigenéticos sintetizados.

Após o período de cultivo, os meios de cultura foram extraídos com 50 mL de AcOEt. A mistura de meio de cultura + AcOEt foi filtrada à vácuo em funil de Büchner através de uma camada de celite e particionada em funil de separação. A fração orgânica foi seca em rotaevaporador. Antes da análise, todas as amostras foram desengorduradas por partição líquido-líquido entre metanol aquoso (MeOH:H₂O 9:1, v/v) e hexano. A fração metanólica foi evaporada e posteriormente analisada em sistema HPLC-UV-MS.

Após a extração com AcOEt, a fração aquosa dos meios de cultura foi evaporada até remoção do AcOEt residual. Em seguida, foi adicionada uma mistura 1:1:1 de resinas XAD 2, 4 e 7 (Sigma-Aldrich), sob agitação orbital por 24h. Após este período, as resinas foram separadas do meio de cultura por filtração e os analitos dessorvidos, utilizando-se uma mistura 1:1 MeOH:acetona. A fração orgânica foi seca. O extrato obtido foi fracionado em coluna pré-empacotada com sílica gel derivatizada com grupos C₁₈ e eluída com MeOH:H₂O 1:1 e 100%MeOH.

Uma alíquota de 2 mg mL⁻¹ de cada um dos extratos e frações obtidas do meio de cultura dos experimentos controle e dos experimentos com modificador epigenético foram analisadas por HPLC-UV-MS e seus espectros foram comparados.

1.3.3.2 Crescimento em maior escala dos fungos em presença dos modificadores

A linhagem *Penicillium* sp. DRF2 foi cultivada em 96 frascos *Schott* de 500 mL contendo cada um 100 mL de meio de cultura M2, 1 mL de solução 10 mM de 4F-SAHA (**21**) e inoculados com 10⁵ esporos mL⁻¹. Os experimentos foram incubados num sistema de agitação orbital a 150 rpm e 28 °C. Após 15 dias de incubação as culturas foram reunidas, o meio de crescimento junto com o micélio foram extraídos com AcOEt e filtrados através de uma camada de celite. A fração orgânica foi particionada em funil de separação. As frações orgânicas de cada experimento foram combinadas e evaporadas em evaporador rotativo. O extrato obtido foi ressuspenso em 100 mL de MeOH:H₂O (9:1, v/v) e particionado com igual quantidade de n-hexano (3X).

O extrato metanólico (2 g) foi submetido a fracionamento em coluna cromatográfica empacotada com fase estacionária sílica gel (60g), eluída em modo gradiente com mistura dos solventes AcOEt/Hex (2:8 v/v; **F1**), AcOEt/Hex (3:7 v/v; **F2**), AcOEt/Hex (4:6 v/v; **F3**), AcOEt/Hex (5:5 v/v; **F4**), AcOEt/Hex (8:2 v/v; **F5**), AcOEt/Hex (10:0 v/v; **F6**), AcOEt/MeOH (1:1 v/v; **F7**) e MeOH (**F8**) (**Diagrama 1**).

Diagrama 1. Fracionamento do extrato metanólico obtido a partir do meio de cultivo do fungo *Penicillium* sp. DRF2 crescido em presença do 4F-SAHA.

*Frações não ficaram completamente secas

Uma alíquota de 2 mg mL⁻¹ das frações foi analisada num sistema HPLC-UV-MS. A fração **F4** foi fracionada em um sistema HPLC-UV utilizando coluna semi-preparativa com fase reversa de sílica gel derivatizada com grupos C₁₈ InertSustain® (10 x 250 mm, 5 µm), utilizando-se como fase móvel H₂O:MeOH:MeCN (50:25:25, v/v), vazão 4 mL min⁻¹ e monitorado no comprimento de onda 360 nm e 250 nm (**Figura 7**).

Figura 7. Cromatograma da separação da fração DRF2-F4. Coluna semi-preparativa C₁₈ InertSustain® (10 x 250 mm, 5µm), monitorado no comprimento de onda 360 nm. Fase móvel H₂O:MeCN:MeOH (50:25:25, v/v), vazão: 4 mL min⁻¹.

A linhagem *Microphaeropsis* sp. DRA6 foi cultivada em 48 frascos *Schott* de 500 mL contendo cada um 100 mL de meio de cultura M2, 1 mL de solução 10 mM de 4F-SAHA (**21**) e inoculados com 10⁵ esporos mL⁻¹. Os experimentos foram incubados num sistema de agitação orbital a 150 rpm e 28 °C. Após 15 dias de incubação as culturas foram reunidas, o meio de crescimento junto com o micélio foi extraído e os extratos obtidos fracionados como descrito na seção 1.3.3.1.2 (**Diagrama 2**).

Diagrama 2. Fracionamento dos extratos obtidos a partir do meio de cultivo do fungo *Microphaereopsis* sp. (DRA6) crescido em presença de 4F-SAHA.

A linhagem *Acremonium* sp. DRF1 foi cultivada em 48 frascos *Schott* de 500 mL contendo cada frasco 100 mL de meio de cultura PDB, 1 mL de solução 10 mM de 3AM-SAHA (**22**) e inoculados com 10⁵ esporos mL⁻¹. Os experimentos foram incubados num sistema de agitação orbital a 150 rpm e 28 °C. Após 15 dias de incubação, as culturas foram

reunidas, o meio de crescimento junto com o micélio foi extraído e os extratos obtidos fracionados como descrito anteriormente na seção 1.3.3.1.2.

Diagrama 3. Fracionamento dos extratos obtidos a partir do meio de cultivo do fungo *Acremonium* sp. (DRF1) crescido em presença de 3AM-SAHA.

As frações obtidas a partir dos extratos do meio de cultivo dos fungos DRA6 e DRF1 foram analisadas separadamente num sistema HPLC-UV-MS e seus cromatogramas comparados com os cromatogramas obtidos para os experimentos controle.

1.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1.4.1 SÍNTESE DE SAHA E ANÁLOGOS

A reação de acoplamento do éster monometílico do ácido subérico com aminas aromáticas, na presença de DCC (diciclohexilcarbodiimida) e HOBt (1-hidroxibenzotriazol) produziu as amidas correspondentes **2**, **18-22**.

Na primeira etapa da reação é formada a ligação amida. Esta reação não ocorre de forma espontânea. Assim, foi necessário ativar a carboxila do éster de monometílico do ácido subérico (**23**). A ativação foi realizada por adição de DCC (**24**) e HOBt no solvente aprótico DMF. O éster monometílico do ácido subérico formou o éster O-acilisourea (**25**) que na presença do HOBt (**26**), produz um éster ativo de benzotriazol (**27**) que é a espécie final que reage com o grupo amina disponível para formar a ligação amida (**28**). A presença do HOBt é necessária para evitar a formação de N-aciluréia por protonação da O-acilisouréia (**Figura 8**).

Figura 8. Mecanismo da reação de formação da ligação amida promovida por DCC e HOBt

As arilaminas utilizadas na síntese dos análogos do SAHA possuem substituintes diferentes na posição *orto* ou *para*. Estes substituintes, como o grupo hidroxila, pode aumentar ou diminuir a nucleofilicidade da anilina (50).

O grupo metil da *p*-toluidina que é um doador fraco de elétrons por hiperconjugação, exerce um pequeno incremento na nucleofilicidade da amina. No caso do *p*-aminofenol, o rendimento da reação foi menor quando comparado com o produzido pela anilina.

A reação utilizando *p*-fluoroanilina apresentou um rendimento maior do que quando foi utilizado seu isômero *orto* substituído. Isso porque o substituinte na posição *orto* apresenta efeitos polares sobre o grupo amina, o que afeta sua reatividade. Assim, a anilina *o*-substituída é menos nucleofílica que a *p*-substituída.

Na **Figura 9** observa-se que no espectro de RMN de ^1H do SAHA apresentam-se 5 sinais entre 1 ppm e 2,5 ppm que correspondem aos grupos metilenos presentes na molécula: δ_{H} 1,27 (m, 4H), 1,49 (m, 2H), 1,57 (m, 2H), 1,95 (t, 2H, $J = 7,4$) e 2,28 (t, 2H, $J = 7,5$). Na região dos hidrogênios aromáticos, observa-se um sinal em δ_{H} 7,01 (t, 1H, $J = 7,4$) atribuído ao hidrogênio ligado na posição *para* do anel aromático, em δ_{H} 7,28 (t, 2H, $J = 7,8$) que corresponde aos dois hidrogênios aromáticos ligados na posição *meta*, e um sinal em δ_{H} 7,58 (t, 2H, $J = 7,9$) atribuído aos dois hidrogênios aromáticos ligados na posição *orto*.

Figura 9. Espectro de RMN de ^1H do SAHA em (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$).

Os sinais em δ_H 8,64 (s, 1H) e 9,83 (s, 1H) correspondem aos hidrogênios dos grupos N-H, e o sinal em δ_H 10,33 (s, 1H) foi atribuído à hidroxila do ácido hidroxâmico. Todos esses dados estão de acordo com os relatados na literatura para este composto (47).

Os compostos análogos do SAHA apresentaram mudanças estruturais somente no anel aromático; a cadeia alifática e o ácido hidroxâmico permaneceram sem alterações. Quando comparados, os sinais na região dos hidrogênios aromáticos do espectro de RMN de 1H do SAHA com o espectro de seus análogos, observam-se mudanças tanto de deslocamentos químico como de desdobramento dos sinais (**Tabela 3**).

O espectro RMN de 1H do derivado *p*Me-SAHA apresenta dois dubletos em δ_H 7,07 (d, 2H, $J = 8,2$) e 7,45 (d, 2H, $J = 8,4$) que correspondem aos hidrogênios ligados na posição *orto* e *meta* à amida. Observa-se em δ_H 2,23 um singlete indicando a presença da metila no composto em posição para.

O espectro de RMN de 1H do derivado *p*OH-SAHA apresenta dois sinais dubletos em δ_H 6,67 (d, 2H, $J = 8,9$) e 7,34 (d, 2H, $J = 8,9$) que correspondem aos hidrogênios ligados na posição *orto* e *meta* à amida.

No espectro de RMN de 1H do derivado 4F-SAHA observa-se a presença de dois sinais em δ_H 7,11 (m, 2H) e 7,58 (m, 2H) que correspondem aos hidrogênios ligados na posição *orto* e *meta* à amida. No espectro de RMN de 1H do derivado 2F-SAHA observam-se três sinais multipletos em δ_H 7,14 (m, 2H), 7,22 (m, 1H) e 7,82 (m, 1H). A presença de quatro hidrogênios com ambientes químicos diferentes confirma a localização do flúor na posição *orto* à amida.

O desdobramento dos sinais aromáticos nos espectros de RMN de 1H de 4F-SAHA e 2F-SAHA são mais complexos do que nos outros derivados, devido à presença na molécula do átomo de flúor, que apresenta spin $\frac{1}{2}$ e abundância natural de 100%, e, portanto, no espectro de RMN de 1H são observados os acoplamentos 1H - ^{19}F .

O espectro de RMN de 1H do derivado 2AM-SAHA apresentou quatro sinais característico de anel piridínico em δ_H 7,06 (ddd, 1H, $J = 7,3, 4,9, 1,0$), 7,74 (t, 1H, $J = 7,4$), 8,08 (d, 1H, $J = 8,4$) e 8,28 (m, 1H).

Tabela 3. Expansão na região aromática dos espectros de RMN de ^1H dos compostos sintetizados.²

COMPOSTO	RMN- ^1H	CAP
SAHA		
pMe-SAHA		
pOH-SAHA		
4F-SAHA		
2F-SAHA		
2AM-SAHA		

² Todos os espectros encontram-se nos anexos.

1.4.2 USO DO SAHA E SEUS ANÁLOGOS SINTETIZADOS NA DIVERSIFICAÇÃO QUÍMICA DO METABOLISMO SECUNDÁRIO DE LINHAGENS DE FUNGOS

Uma modificação epigenética pode ser observada pela comparação dos cromatogramas obtidos para experimentos em presença de moduladores epigenéticos e dos experimentos controle. A presença de um sinal cromatográfico no espectro obtido para o experimento com o modulador e ausência do mesmo no espectro obtido para o experimento controle indica a ocorrência da modificação epigenética.

Os primeiros experimentos de adição do SAHA e derivados em pequena escala, descritos na **seção 1.3.3.1.1**, não apresentaram mudanças qualitativas significativas nos perfis químicos quando comparados separadamente com seus controles.

Tais resultados podem ser decorrentes da pequena quantidade de meio de cultura utilizado nos experimentos (3 mL) e, conseqüentemente, pouca quantidade de extrato produzido. A maior parte dos cromatogramas apresentou somente os compostos majoritários, sendo difícil analisar os compostos minoritários. Portanto, estes resultados foram considerados não conclusivos.

Crescimentos em pequena escala descritos no **experimento 2 (seção 1.3.3.1.2)** indicaram diferenças no perfil cromatográfico dos extratos produzidos pelos fungos *Penicillium* sp. (DRF2), *Microphaereopsis* sp. (DRA6) e *Acremonium* sp. (DRF1).

1.4.2.1 *Penicillium* sp. (DRF2)

O fungo *Penicillium* sp. foi crescido em M2 em presença de 4F-SAHA (**Diagrama 1**). Após comparação dos cromatogramas monitorados no UV e massas (modos ESI⁺ e ESI⁻), do crescimento em presença de 4F-SAHA com experimentos controle realizados em ausência do modificador epigenético, foi observado que o perfil químico do extrato metanólico apresentou dois picos cromatográficos adicionais, como indica a **Figura 10**.

Figura 10. Comparação dos cromatogramas no UV dos extratos metanólicos do meio de cultivo do fungo DRF2. Cromatogramas extraídos a 254 nm. Coluna analítica C₁₈ RP X-terra (4,6 x 250 mm, 5 µm). Fase móvel constituída por A: H₂O + 0,1% de ácido fórmico e B: MeCN:MeOH (1:1, v/v) + 0,1% ácido fórmico. O gradiente linear de eluição utilizado foi de 10 a 100% B em 30 minutos; 100% B foi mantido por 5 minutos e finalmente 10% B por 10 minutos; vazão de 1 mL min⁻¹.

O composto DRF2F4A (3 mg) foi obtido como um sólido amorfo verde. A análise por espectrometria de massas de alta resolução ESI no modo positivo (**Figura 11a**) para o composto DRF2A forneceu os íons pseudo-moleculares $[M+H]^+$ em m/z 360,1243 e $[M+Na]^+$ em m/z 382,1061, que correspondem à fórmula molecular C₂₂H₁₇NO₄, com índice de deficiência de hidrogênio (IDH) igual a 15. Seu espectro no UV-visível apresentou duas bandas de absorção em 237 e 385 nm (**Figura 11b**).

O composto DRF2F4B (0,8 mg) foi obtido como um sólido amarelo. A análise por espectrometria de massas de alta resolução ESI no modo positivo (**Figura 12a**) para o composto DRF2B forneceu os íons pseudo-moleculares a $[M+H]^+$ em m/z 342,1142 e $[M+Na]^+$ em m/z 364,0964, que correspondem à fórmula molecular C₂₂H₁₅NO₃, com IDH igual a 16. Seu espectro no UV-visível apresentou duas bandas de absorção em 279 e 393 nm (**Figura 12b**).

Os compostos DRF2F4A e DRF2F4B foram analisados por HPLC-UV-MS e observou-se a constante presença dos dois picos. Ainda assim, as frações foram analisadas separadamente por RMN de ¹H e observou-se que ao longo das análises o composto DRF2F4A sofreu degradação, apresentando uma perda de 18 unidades de massa, levando à formação de DRF2F4B.

Figura 11. Espectros do composto DRF2F4A A. Espectro de massas de alta resolução [ESI⁺]. B. Espectro no UV-visível.

Figura 12. Espectros do composto DRF2F4B A. Espectro de massas de alta resolução [ESI⁺]. B. Espectro no UV-visível.

O espectro de RMN de ^1H de DRF2F4B (**Figura 13**) apresentou nove sinais que integram para ± 15 hidrogênios, número que concorda com a fórmula molecular proposta para este composto. Porém, no espectro de carbono, mesmo após 71680 *scans*, só foram observados nove dos 22 sinais que a fórmula molecular indicou para DRF2F4B.

Figura 13. Espectros de RMN de DRF2F4B em piridina- d_5 . **A.** Espectro de RMN de ^1H (600 MHz,) **B.** Espectro de RMN de ^{13}C (150 MHz)

Após várias tentativas, não foi possível a elucidação estrutural DRF2F4B. Embora, os resultados obtidos até esta parte do estudo poderiam ser considerados promissores, a relação resultados/tempo investido fez inviável sua finalização.

1.4.2.2 *Microphaereopsis* sp. (DRA6)

Quando comparados os cromatogramas monitorados no UV e no massas (ESI⁺ e ESI⁻) das frações obtidas a partir dos experimentos de crescimento em pequena escala descritos na seção 1.3.3.1.2, foi observado que a fração 50% MeOH obtida a partir do extrato aquoso do meio de cultivo do fungo DRA6, crescido em presença do 4F-SAHA (**21**), apresentou mudanças no seu perfil químico em relação aos experimentos controle realizados em ausência do modificador epigenético (**Figura 14**).

Figura 14 Comparação dos perfis químicos das frações 50% MeOH obtidas a partir do extrato aquoso do meio de cultura do fungo DRA6. Condição cromatográfica: coluna analítica C₁₈ RP X-Terra (4,6 x 250 mm; 5 µm), composição da fase móvel A: H₂O + 0,1% de ácido fórmico e B: MeCN/MeOH (1:1) + 0,1% ácido fórmico. Gradiente linear de eluição utilizado: 10 a 100% B em 30 minutos; 100% B foi mantido por 5 minutos e finalmente 10% B por 10 minutos. → Indica compostos produzidos em presença do 4F-SAHA. **A.** Cromatogramas extraídos a 254nm. **B.** Cromatogramas TIC no modo ESI⁺.

Os dados espectroscópicos e espectrométricos dos quatro picos cromatográficos diferenciados observados para o experimento tratado com 4F-SAHA, foram utilizados para realizar a desreplicação no *Dictionary of Natural Products* (DNP) (**Tabela 4**). Cada conjunto de dados foi pesquisado no DNP utilizando as bandas máximas de absorção do espectro no UV-vis numa faixa de ± 10 nm e os valores de massa molecular numa faixa de ± 1 Da, em relação aos valores relatados na **Tabela 4**.

Tabela 4. Desreplicação dos dados espectroscópicos e espectrométricos dos sinais observados no cromatograma da fração 50% MeOH, obtida a partir do extrato aquoso do fungo DRA6 crescido em presença de 4F-SAHA.

Composto	t _R (min)	Bandas UV (nm)	Massa molecular	Número total de resultados no DNP	Número resultados para Fungos
1	15,2	242/325	222,2	49	10
2	17,7	230/298	290,3	108	13
3	18,8	246/314	311,4	104	21
4	19,2	223/270/301	292,3	124	7

Para o composto 1 da tabela foram obtidos 49 resultados de compostos com dados espectroscópicos similares. Porém, somente 10 deles são relatados como produzidos por fungos. A análise das bandas de absorção no UV-vis dos compostos relatados indicou que cinco desses compostos (**29-33**) poderiam corresponder ao composto 1 (**Figura 15**).

Figura 15. Compostos encontrados na base de dados DNP que apresentam as mesmas características espectroscópicas do composto 1.

Este fungo foi crescido em maior escala (4,8 L), em presença de 4F-SAHA, na tentativa de se isolar os compostos observados e identificar suas estruturas. Infelizmente, o resultado obtido em pequena escala não foi reprodutivo, e na fração 50% MeOH do experimento em maior escala não foi possível observar os compostos de interesse.

1.4.2.3 *Acremonium* sp. (DRF1)

Quando comparados os cromatogramas monitorados no UV e massas (ESI⁺ e ESI⁻) das frações obtidas a partir dos experimentos crescidos em pequena escala descritos na seção 1.3.3.1.2, foi observado que a fração 100% MeOH, obtida a partir do extrato aquoso do meio de cultivo do fungo DRF1 crescido em presença do 2AM-SAHA (**22**), apresentou mudanças no seu perfil químico em relação aos experimentos controle realizados em ausência do modificador epigenético (**Figura 16**).

Figura 16. Comparação dos perfis químicos das frações 100% MeOH obtidas a partir do extrato aquoso do meio de cultura do fungo DRF1. Condição cromatográfica: Coluna analítica C₁₈ RP X-Terra, composição da fase móvel A: H₂O + 0,1% de ácido fórmico e B: MeCN/MeOH (1:1) + 0,1% ácido fórmico. Gradiente linear de eluição utilizado: 10 a 100% B em 30 minutos; 100% B foi mantido por 5 minutos e finalmente 10% B por 10 minutos. → Indica composto produzido em presença do 2AM-SAHA. **A.** Cromatogramas extraídos a 254nm. **B.** Cromatograma TIC no modo (ESI⁻).

Na pesquisa realizada na base de dados DNP foram encontrados 77 resultados com massa molecular (279 ± 1 Da) e bandas de UV (247 ± 10 nm) coincidentes, mas somente quatro desses compostos (**34-37**) foram isolados a partir de fungos (**Figura 17**). Os resultados indicam que a substância presente nesse extrato pode ser inédita, pois não se observa um padrão estrutural entre os compostos encontrados.

Figura 17. Compostos encontrados na base de dados DNP que apresentam características espectroscópicas similares às obtidas para o composto presente na fração 100% MeOH, obtida a partir do extrato aquoso do fungo DRF1 em presença do 3am-SAHA.

Assim, fungo DRF1 foi crescido em maior escala (4,8 L) em presença de 2AM-SAHA (**22**), realizando o mesmo procedimento de extração e fracionamento utilizado no estudo em pequena escala, na tentativa de se isolar o composto observado e identificar sua estrutura. Infelizmente, o resultado obtido em pequena escala não foi reprodutivo, e na fração 100% MeOH do experimento em maior escala não foi possível observar o composto de interesse.

Infelizmente, devido ao processo de degradação sofrido por alguns dos compostos produzidos, que os resultados obtidos em pequena escala não foram reprodutivos em larga escala, o isolamento das moléculas produzidas em presença dos modificadores epigenéticos não foi possível neste projeto. Três anos foram dedicados ao estudo da diversificação do metaboloma de fungos via modificação epigenética sem resultados concretos. Assim, considerando as limitações de tempo inerentes à execução de um projeto de doutorado, optou-se por priorizar os esforços em outras abordagens propostas como parte da pesquisa alvo da presente tese.

1.5 CONCLUSÃO

A modificação do epigenoma de fungos tem se mostrado como uma alternativa viável para a obtenção de novos metabólitos secundários. As vantagens mais relevantes do uso de pequenas moléculas como modificadores epigenéticos são seu baixo custo, aplicação relativamente fácil para realizar triagem de microrganismos e que pode ser utilizada para estudar fungos sem prévio conhecimento de genoma.

Infelizmente, este método não é eficaz para todas as linhagens fúngicas, uma vez que o estudo do genoma tem demonstrado que os fungos podem produzir uma ampla diversidade de metabólitos secundários, porém alguns não respondem positivamente aos inibidores epigenéticos atualmente disponíveis.

Talvez a melhor solução para acessar aos produtos naturais de vias biossintéticas silenciosas exigirá um trabalho conjunto das abordagens química e genômica, em que a triagem epigenética química é utilizada para identificar rapidamente cepas fúngicas promissoras e técnicas subsequentes de manipulação molecular são empregadas para fornecer controle a longo prazo sobre a produção de metabólitos.

A compreensão atual dos processos epigenéticos em fungos é dependente de descobertas derivadas de um número limitado de organismos modelo. Estudos adicionais são necessários para se entender como os processos epigenéticos impactam à biossíntese de produtos naturais em fungos.

Abordar essa questão ajudará a fornecer um enfoque baseado em evidências preditivas para ativar de forma racional as vias biossintéticas silenciosas em novos sistemas fúngicos. Além disso, será importante identificar quais são as características regulatórias que atuam em conjunto com os mecanismos epigenéticos, para que seja possível melhor compreender como é controlada a biossíntese de produtos naturais.

ESTUDO DO METABOLISMO SECUNDÁRIO DE LINHAGENS FÚNGICAS DE ORIGEM ANTÁRTICA

2.1 INTRODUÇÃO

Vários estudos sugerem que organismos coletados em áreas remotas, como ambientes marinhos, calotas polares e desertos, constituem fontes ainda inexploradas de novos produtos naturais ou de esqueletos químicos com atividades biológicas relevantes do ponto de vista farmacêutico (51).

Microrganismos provenientes de ecossistemas com condições extremas, como o ambiente marinho ou o continente antártico, são uma rica fonte de novos produtos naturais bioativos. A região antártica é uma área remota, influenciada por baixas temperaturas, ventos fortes, baixa radiação UV e nutrientes ou combinações desses fatores. Microrganismos que se desenvolvem nesse ambiente necessitam de adaptações bioquímicas e fisiológicas essenciais para a sobrevivência. Essas adaptações são frequentemente acompanhadas de modificações na regulação gênica e nas suas vias metabólicas, aumentando a possibilidade de encontrar diversificadas classes de metabólitos secundários com importância farmacêutica (51).

Quando se compara o grande número de microrganismos polares descritos na literatura, são poucos os relatos relacionados com o estudo da produção de metabólitos secundários. Produtos naturais bioativos têm sido isolados a partir de microrganismos polares. Por exemplo, a partir do extrato orgânico da fermentação do fungo ascomiceto antártico *Geomyces* sp, foram isolados cinco novos derivados de ácido astérrico, asterato de etila (38), asterato de n-butila (39) e as geomicinas A-C (40-42) (52)(Figura 18).

Figura 18. Metabólitos secundários isolados a partir do meio de cultivo a partir de fungos do ambiente antárticos (compostos **38** a **48**)

A geomicina B (**41**) apresentou atividade antifúngica significativa contra *Aspergillus fumigatus* ATCC 10894, com valores IC₅₀/CIM de 0,86/29,5 µM. A geomicina C (**42**) mostrou atividade antimicrobiana moderada contra as bactérias *Gram*-positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e *Streptococcus pneumoniae* CGMCC 1.1692) e bactérias *Gram*-negativas (*Escherichia coli* CGMCC 1.2340) (52).

O estudo químico do meio de crescimento do fungo *Trichoderma asperellum*, isolado de sedimento da Ilha do Pinguim Antártico, resultou no isolamento de seis novos peptaibols denominados asperelinas A-F (**43-48**) (**Figura 18**). Peptaibols são peptídeos não ribossomais caracterizados por conter na sua estrutura um resíduo incomum de prolinol (53). Estudos adicionais com a mesma linhagem de fungo levaram à descoberta de trinta e oito peptaibols, incluindo trinta e dois novos compostos chamados asperelinas G – Z1 (54).

Duas novas epipolítioxipiperazinas, chamadas quetracinas B (**49**) e C (**50**), e cinco novas dicetopiperazinas, denominadas quetracina D (**51**) e oidioperazinas A – D (**52-55**, **Figura 19**), foram isoladas a partir do meio de crescimento do fungo antártico *Oidiodendron truncatum* GW3-13. Estudos químicos mostraram que a ponte de sulfeto é um fator determinante para a citotoxicidade desses compostos, no entanto o número de átomos de enxofre no composto pareceu não influenciar na bioatividade (55).

Figura 19. Metabólitos secundários derivados dos fungos antárticos (compostos 49 a 55)

2.1.1 METODOLOGIAS DE EXTRAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS

Na atualidade, considera-se preocupante o decréscimo no isolamento de novos produtos naturais acessíveis por abordagens *top-down*. Afirma-se que a diversidade de produtos naturais parece que foi amplamente esgotada e os modelos de descobertas existentes não são mais capazes de fornecer novos compostos (2).

Novas metodologias e abordagens para a descoberta de produtos naturais são necessárias. As metodologias de extração mais utilizadas para o isolamento de metabólitos secundários a partir de culturas fúngicas foram analisadas no *Journal of Natural Products* (JNP) no período entre 2008-2018.

Uma análise sobre o estado físico do meio de cultivo utilizado para o crescimento dos fungos indica que, nos estudos realizados no período 2008-2012, o meio líquido foi mais utilizado. Porém, no período 2013-2014 essa tendência mudou, e o meio sólido passou a ser mais utilizado, em particular o arroz e *potato dextrose ágar* (**Figura 20**).

Figura 20. Comparação do estado físico do meio de cultivo utilizado no crescimento de fungos nos artigos publicados na revista JNP no período entre 2008-2018.

Contudo, a variação do estado físico do meio de cultivo não fez muita diferença na metodologia de extração utilizada nos diferentes estudos, como se pode observar na **Figura 21**. A maior parte dos compostos isolados foi obtida a partir da fração orgânica, produto da extração com solventes de média ou baixa polaridade, sendo AcOEt o mais utilizado.

Figura 21. Metodologias de extração mais utilizadas no isolamento de metabólitos secundários a partir de fungos.

No período compreendido entre 2008-2018, foram publicados 499 artigos relatando o isolamento de metabólitos secundários de fungos. Somente 5% dessas publicações investigaram o meio de crescimento utilizando uma metodologia diferente à extração com solvente. Extrações foram realizadas utilizando-se resinas como SP207ss, XAD, Diaion HP-20 e *Amberchrome*, bem como sílica-gel derivatizada com grupos C₁₈ para extração em fase sólida (EFS) (53,56-78).

O uso da extração em fase sólida, utilizando-se principalmente resinas poliméricas, levou ao isolamento de compostos quimicamente diversos e biologicamente ativos (**Figura 22**).

A feofungina (**56**), um novo depsipeptídeo cíclico isolado do fungo *Phaeosphaeria* sp., é constituída por sete aminoácidos e o ácido β -di-hidroxi- γ -metil-hexadecanóico dispostos num depsipeptídeo cíclico de 25 membros. A feofungina apresentou atividade antifúngica moderada contra *C. albicans* (CIM 16–32 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e melhor atividade contra *Aspergillus fumigatus* (CIM 8–16 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e *Trichophyton mentagrophytes* (CIM 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$). O peptídeo linear foi inativo, sugerindo que o anel macrocíclico é essencial para o envolvimento do alvo e atividade antifúngica (74).

Três novos policetídeos (**57-59**), um novo alcaloide de quinolona (**60**) e sete derivados de policetídeos conhecidos foram isolados a partir das culturas de *Penicillium* sp. I09F 484. Os compostos **58** e **59** exibiram atividade inibidora contra a metalo- β -lactamase-1 com valores IC₅₀ de 94,9 e 87,9 μM , respectivamente (68).

Dois novos peptaibols lineares de 15 resíduos, denominados chilenopectinas A (**61**) e B (**62**), juntamente com os conhecidos peptaibols tilopectinas A e B, foram isolados a partir da cultura semi-sólida da cepa KSH 883. As chilenopectinas A e B exibiram forte atividade inibitória contra *B. cinerea*, atividade modesta contra *P. infestans*, e apenas efeitos leves contra *S. tritici* (70).

Figura 22. Estrutura química dos compostos isolados a partir do meio de crescimento de fungos utilizando resinas poliméricas. Log P = Coeficiente de partição n-octanol e água calculado teoricamente no programa MarvinSketch 18.15.

2.1.2 ESTAMOS PERDENDO COMPOSTOS INÉDITOS NA FASE AQUOSA?

O isolamento de compostos presentes na fração aquosa requer metodologias de extração diferentes às tradicionais extrações líquido-líquido. Em extrações em fase líquida, a fração de analito extraído em condições de equilíbrio pela fração orgânica é determinada pela equação:

$$E = \frac{K_D \Psi}{1 + K_D \Psi} \quad (1)$$

sendo K_D a constante de distribuição, Ψ a relação de fases ($O_{\text{orgânico}}/A_{\text{aquoso}}$) e a fração de analito extraído(79). Considerando-se a impossibilidade de conhecer a K_D de todos os solventes orgânicos, normalmente utiliza-se a constante de distribuição K_{ow} (K_D no sistema n-octanol/água).

A quantidade de transferência de um soluto da água para um solvente imiscível particular não será idêntica à transferência de massa observada no sistema n-octanol / água, mas o K_{ow} é diretamente proporcional à partição de um soluto entre a água e várias outras fases hidrofóbicas (80). Quanto maior o valor de K_{ow} , maior a tendência do soluto a migrar da água para uma fase hidrofóbica.

Os valores de K_{ow} são definidos como segue: valores menores que 500 ($\log P = 2,7$), valores como $500 \leq K_{ow} \leq 1000$ ($2,7 \leq \log P \leq 3,0$) e valores altos de K_{ow} como maiores que 1000 ($\log P > 3,0$). Outros acharam útil considerar compostos com um $\log K_{ow}$ menor que 1 como altamente hidrofílico, e compostos com um $\log K_{ow}$ acima de 3 a 4 (dependendo da natureza da fase imiscível) como altamente hidrofóbicos (81).

Os valores de $\log P$ foram calculados para os compostos **56-62** (**Figura 22**). Os compostos **56, 61-62** apresentaram um valor $\log P$ negativo, o que sugere uma alta hidrofiliicidade, à diferença dos compostos **57-60** que apresentaram valores positivos, inclusive maior que 1 no caso de **57** (**Figura 22**).

De acordo com a equação 1, se o meio de cultivo dos fungos produtores dos compostos **56-62** tivesse sido extraído com solvente orgânico, como o AcOEt e assumindo uma relação de fases 1:1, menos de 0,01% dos compostos **56, 61-62** teriam sido extraídos. Já os compostos **57-60** seriam extraídos por um solvente orgânico em um percentual de 95%, 58%, 18,6% e 60%, respetivamente.

Esses valores de Log P para **56**, **61-62** sugerem que esses compostos apresentariam uma alta afinidade pelo meio líquido aquoso, razão pela qual se presume foi de grande importância realizar a extração utilizando resinas em vez da tradicional extração com solventes.

Duas novas curvularinas condensadas com um resíduo de mercaptolactato, as ciclosulfoxicurvularinas **63-64**, foram isoladas a partir do extrato do meio de cultivo do fungo *Penicillium* sp. DRF2 (71) (**Figura 23**). Os analitos foram extraídos do meio de cultivo por EFS utilizando-se fase estacionária C₁₈, porque curiosamente, quando o meio de cultivo foi extraído utilizando AcOEt, elas não foram detectadas.

De acordo com a equação 1 e assumindo uma relação de fases 1:1, **63** e **64** seriam extraídos por um solvente orgânico em um percentual de 39% e 41% respectivamente. A baixa recuperação, somado ao fato de os valores de Log P indicaram que **63** e **64** teriam mais afinidade pela fase aquosa, e à presença de outros analitos na matriz com maior afinidade à fase orgânica, seriam algumas das razões que permitiriam explicar o fato de **63** e **64** ter sido detectados no extrato obtido mediante extração em fase sólida e não no extrato de AcOEt.

Figura 23. Estrutura química de duas novas ciclosulfoxicurvularinas que foram isoladas a partir do meio de cultivo do fungo *Penicillium* sp. (76).

Metabólitos secundários solúveis em água representam a menor fração de produtos naturais investigados, provavelmente devido à dificuldade de manusear extratos aquosos. Como a investigação de metabólitos polares é bastante negligenciada, objetivamos implementar uma nova estratégia para o isolamento desses compostos.

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 OBJETIVO GERAL

Implementar uma nova estratégia para o isolamento de produtos naturais hidrossolúveis a partir do meio de cultivo de fungos de origem antártica.

2.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar em pequena escala o metabolismo secundário das linhagens antárticas diversificando as condições de cultivo tais como a natureza e composição do meio.
- Realizar *screening* biomonitorado das frações metanólica e aquosa obtidas a partir do meio de crescimento em pequena escala das linhagens fúngicas.
- Crescer em maior escala as linhagens que apresentarem atividade biológica para isolamento dos metabólitos secundários.
- Elucidar as estruturas químicas das substâncias puras por técnicas espectroscópicas e espectrométricas.
- Avaliar os compostos puros em ensaios de atividade biológica.

2.3 PARTE EXPERIMENTAL

2.3.1 EXPLORAÇÃO QUÍMICA DE LINHAGENS FÚNGICAS

Foi investigado o metabolismo secundário das linhagens fúngicas *Penicillium* sp. IS1-A, e *Thelebolus globosus* E2, fornecidas pela Professora Dra. Lara D. Sette. Os fungos foram incubados separadamente em pequena escala em três meios de cultivo, a saber: malte 3% (M3), *potato dextrose broth* (PDB) e *sabouraud* (SBD), em dois volumes diferentes (100 mL e 200 mL) em frascos *Schott* de 500 mL, sob agitação e em modo estático, e dois tempos de crescimento (15 e 30 dias), como ilustrado no **diagrama 4**.

Diagrama 4. Metodologia utilizada no *screening* em pequena escala dos fungos antárticos crescidos em três meios de cultivo diferente: Malte 3% (M3), Potato dextrose broth (PDB) e Sabouraud (SBD).

Depois do período de incubação, todos os experimentos foram extraídos e fracionados separadamente como indicado no **diagrama 5**. Com o intuito de realizar um isolamento biomonitorado que levasse à obtenção de compostos bioativos, as frações obtidas foram enviadas para avaliação da atividade citotóxica, anti-*Leishmania*, antibacteriana, inibição do proteassomo e inativação das proteínas de ligação à penicilina

(PBP). Os experimentos cujas frações apresentaram atividade biológica foram crescidos em maior escala, sob as mesmas condições da fermentação inicial.

Diagrama 5. Fracionamento dos extratos fúngicos obtidos em pequena escala.

2.3.2 INVESTIGAÇÃO DO METABOLISMO SECUNDÁRIO DO FUNGO *Penicillium* sp. IS1-A

2.3.2.1 Crescimento em 5 L de meio de cultura.

A linhagem fúngica *Penicillium* sp. IS1-A foi cultivada em 50 frascos *Schott* de 500 mL contendo 100 mL do meio de cultivo PDB, preparado com 24 g de caldo de batata dextrose para cada litro de água destilada, com inóculos contendo 10^5 esporos mL^{-1} . Após 30 dias de incubação a 20 °C e modo estático, as culturas foram reunidas. O meio de crescimento, junto com o micélio, foram extraídos com AcOEt e filtradas através de uma camada de celite. As fases foram particionadas em funil de separação e as frações orgânicas foram combinadas e evaporadas em evaporador rotativo. O extrato obtido foi ressuspenso em 100 mL de MeOH:H₂O (9:1, v/v) e particionado com igual quantidade de n-hexano (3X), e nomeado AI (1,2 g).

O extrato AI (1,2 g) foi submetido à separação cromatográfica em coluna Sephadex LH-20 (2 x 170 cm), eluída em modo isocrático com MeOH. Foram coletadas 175 frações de 4 mL cada uma, que posteriormente foram agrupadas de acordo com o perfil observado em análise por CCD (**Diagrama 6**).

Diagrama 6. Separação cromatográfica dos extratos, metanólico e aquoso, obtidos a partir do meio de cultivo do fungo *Penicillium* sp. IS1-A (5L, PDB).

A fração aquosa dos meios de cultura foi submetida à adsorção em fase sólida com uma mistura de resinas adsorventes XAD-2, XAD-4, XAD-7 (1:1:1, 500 g) e sob agitação orbital de 160 rpm por 12 h. A mistura de resinas foi filtrada, lavada com água e extraída com 4 x 500 mL de acetona:MeOH (1:1, v/v) em banho de ultrassom (30 min). O extrato resultante, nomeado XI (640 mg), foi evaporado e foram obtidos 640 mg de um sólido marrom esverdeado (**Diagrama 6**).

O extrato XI foi submetido à separação cromatográfica em coluna pré-empacotada com fase estacionária de sílica-gel derivatizada com grupos C₁₈ (10g), eluído em modo gradiente com adição sequencial de 120 mL das seguintes misturas de solventes: MeOH:H₂O (1:3, v/v, **XI-25**), MeOH:H₂O (1:1, v/v, **XI-50**), MeOH:H₂O (3:1, v/v, **XI-75**) e 100% MeOH (**Diagrama 6**).

A fração XI-50 foi fraccionada em um sistema HPLC-UV utilizando-se uma coluna semi-preparativa de fase reversa C₁₈ InertSustain® (10 x 250 mm, 5 µm), eluída em modo isocrático, fase móvel H₂O:MeCN:MeOH (70:15:15, v/v) e vazão de 4 mL min⁻¹. A detecção UV foi realizada nos comprimentos de onda $\lambda_{\text{máx}}$. 254 e 360 nm. Um total de 7 frações foram coletadas de acordo com as bandas cromatográficas observadas (**Figura 24**).

Figura 24. Cromatograma da separação da fração XI-50. Coluna semi-preparativa C₁₈ (InertSustain, 10 x 250 mm, 5µm), monitorado no comprimento de onda 254. Fase móvel H₂O:MeCN:MeOH (70:15:15, v/v), vazão: 4 mL min⁻¹.

A fração XI50-D foi purificada por HPLC-UV, em coluna de fase-reversa C₈ InertSustain® (4,6 x 250 mm, 5µm) eluída com fase móvel H₂O:MeOH (60:40, v/v), 1 mL min⁻¹ e monitorada a 254 e 310 nm (**Figura 25**). As frações foram evaporadas e analisadas por HPLC-UV-MS. A fração XI50-D1 (30,5 mg), renomeada **IP2**, apresentou

grau de pureza satisfatório. Experimentos de RMN mono e bidimensionais, assim como análises espectroscópicas de UV, infravermelho, dicroísmo circular e $[\alpha]_D$ foram realizados para a completa identificação deste composto.

Figura 25. Cromatograma da separação da fração XI-50D. Coluna semi-preparativa C8 InertSustain® (10 x 250 mm, 5 μ m), monitorado no comprimento de onda 254 e 360 nm. Fase móvel H₂O:MeOH (60:40, v/v) Fluxo: 4 mL min⁻¹.

As frações XI50-B e XI50-F foram repurificadas, mas não foi possível obter compostos com pureza desejável e massa suficiente para a identificação de suas estruturas. Portanto, a linhagem fúngica IS1-A foi cultivada em 10L do meio de cultivo (**Diagrama 6**).

As frações XI-25 (156 mg) e XI-75 (59 mg) foram separadamente fracionadas em coluna cromatográfica empacotada com Sephadex LH-20 (2 x 170 cm), eluída em modo isocrático, utilizando-se como fase móvel MeOH:H₂O (3:2, v/v). Para cada amostra foram coletadas 175 frações de 3 mL cada uma, agrupadas de acordo com o perfil de UV observado em análise por HPLC-UV-MS. Todas as frações foram enviadas para avaliação da atividade citotóxica.

2.3.2.2 Crescimento em 10 L de meio de cultura.

A linhagem fúngica *Penicillium* sp. IS1-A foi cultivada em 100 frascos *Schott* de 500 mL contendo cada um 100 mL do meio de cultivo PDB, sendo as condições de incubação e extração idênticas às apresentadas na seção 2.3.2.1.

O extrato bruto (XI, 7g), obtido a partir da extração utilizando-se as resinas XAD-2, XAD-4 e XAD-7, foi submetido à separação cromatográfica em coluna de sílica derivatizada com grupos C_{18} (70 g) e eluído em modo gradiente com adição sequencial de 800 mL das seguintes misturas de solventes: MeOH:H₂O (1:90, v/v; **XI-10**), MeOH:H₂O (20:80, v/v; **XI-20**), MeOH:H₂O (30:70, v/v; **XI-30**), MeOH:H₂O (40:60, v/v; **XI-40**), MeOH:H₂O (50:50, v/v; **XI-50**), MeOH:H₂O (60:40, v/v; **XI-60**), MeOH:H₂O (70:30, v/v; **XI-70**), MeOH:H₂O (80:20, v/v; **XI-80**) e MeOH (**XI-100**) (**Diagrama 7**). As frações obtidas foram evaporadas utilizando-se um sistema *speedvac*.

Diagrama 7. Separação cromatográfica dos extratos, metanólico e aquoso, obtidos a partir do meio de cultivo do fungo *Penicillium* sp. IS1-A (10L).

As frações XI-10 a XI-50 foram submetidas, separadamente, a um segundo fracionamento em coluna pré-empacotada utilizando-se como fase estacionária sílica gel derivatizada com grupos fenila. A eluição foi feita em modo gradiente com adição sequencial de 120 mL de solventes de diferentes composições de H₂O:(MeOH:MeCN, 1:1

v/v), aumentando-se a proporção da fase orgânica em 10% a cada vez, como se ilustra no **diagrama 8**.

Diagrama 8. Fracionamento por extração em fase sólida das frações XI-10 a XI-50 do fungo *Penicillium* sp. IS1-A (10L).

As frações **XI-10F2** (58 mg) e **XI-20F2** (80 mg) foram reunidas e fracionadas em coluna empacotada com fase estacionária Sephadex G-15, eluída em modo isocrático utilizando-se como fase móvel a mistura de solventes H₂O:MeOH (9:1, v/v). Foram coletadas 100 frações de 3 mL cada uma e agrupadas de acordo com o perfil de UV observado em análise por HPLC-UV-MS (**Diagrama 9**).

Diagrama 9. Fracionamento cromatográfico das subfrações XI-10F2 e XI-20F2 em coluna Sephadex G-15 eluída em modo isocrático. Fase móvel a mistura de solventes H₂O:MeOH (9:1, v/v).

A fração **IF2** (35 mg) foi purificada por HPLC-UV em coluna analítica de fase reversa C₈ (C8-4, 4,6 x 250 mm, 5 µm), eluída com fluxo de 0,8 mL min⁻¹ da fase móvel H₂O:MeCN (87:13, v/v), monitorado nos comprimentos de onda 220 e 369 nm (**Figura 26**).

Figura 26. Cromatograma da separação da fração **IF2** monitorado no comprimento de onda 220 nm. Coluna C8-4, fase móvel H₂O:MeCN (87:13, v/v)

As frações obtidas foram analisadas por HPLC-UV-MS. A fração **IF2-B** (2,4 mg) foi purificada por HPLC-UV em coluna analítica de fase-reversa C₈ (Inertsil® C8-4, 4,6 x 250 mm, 5 µm) utilizando-se como fase móvel H₂O:MeOH (80:20, v/v), monitorada nos comprimentos de onda 230 e 310 nm e vazão de 0,8 mL min⁻¹ (**Figura 27**). A fração IF2-B2 (1 mg), renomeada **IP20**, apresentou grau de pureza satisfatório pelo que foi analisada por RMN ¹H, ¹³C, COSY, HSQC, HMBC, HRMS, UV, IV, CD e [α]_D.

Figura 27. Cromatograma de separação da fração **IF2-B**, monitorada no comprimento de onda 320 nm; coluna analítica C8-4 (4,6 x 250 mm, 5µm), fase móvel MeOH:H₂O (20:80, v/v).

A fração **IF2-C** (15 mg) apresentou grau de pureza satisfatório e foi analisada por RMN de ^1H . Não foi possível observar sinais característicos de um composto orgânico no espectro de RMN de ^1H , nem a multiplicidade de quinteto característico do sinal do solvente DMSO (**Figura 28**). O perfil do espectro de RMN de ^1H sugeriu a presença de algum elemento paramagnético na amostra que afetava o tempo de relaxação do experimento, e não permitia observar desdobramento dos sinais.

Figura 28. Espectro de RMN de ^1H obtido para IF2-C (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$).

Assim, a fração **IF2-C** foi solubilizada em 6 mL de água, misturada com um volume equivalente de uma solução a 1 M de 8-hidroxiquinolina, para remover átomos de Fe^{2+} eventualmente presentes na fração, com agitação por 12 h. Para remover a 8-hidroxiquinolina foi realizada uma partição com 6 mL de CH_2Cl_2 (3X). As duas fases foram separadas e a fase aquosa foi seca e analisada por HPLC-UV-MS. A fração IF2-C (8 mg), renomeada **IP5**, apresentou um grau de pureza satisfatório e foi analisada por RMN de ^1H , ^{13}C , COSY, HSQC, HMBC.

As frações **IF5** e **IF6** foram reunidas e submetidas a fracionamento em HPLC-UV, utilizando-se coluna analítica de fase reversa C₈ (Inertsil® C8-4, 4,6 x 250 mm, 5 µm), fase móvel MeOH:H₂O (30:70, v/v), monitorado nos comprimentos de onda 220 e 320 nm e vazão 0,8 mL min⁻¹ (**Figura 29**). As frações foram evaporadas e analisadas por HPLC-UV-MS. A fração IF56-B (7,2 mg), renomeada **IP12**, apresentou grau de pureza satisfatório e foi analisada por RMN de ¹H, ¹³C, COSY, HSQC, HMBC, HRMS, UV, IR, CD e [α]_D.

Figura 29. Cromatograma de separação da fração IF56-B, monitorada no comprimento de onda 220 nm; coluna analítica C8-4, fase móvel MeOH:H₂O (30:70, v/v).

A fração **XI-40F3** (189 mg) foi fracionada em coluna pré-empacotada com sílica-gel derivatizada com grupos fenila e eluída em modo gradiente com adição sequencial de 120 mL das seguintes misturas de solventes: MeOH:H₂O (10:90, v/v; **XI-43F1**), MeOH:H₂O (20:80, v/v; **XI-43F2**), MeOH:H₂O (30:70, v/v; **XI-43F3**) e MeOH (**XI-43FM**). As frações obtidas foram evaporadas em sistema *speedvac* e analisadas por HPLC-UV-MS (**Diagrama 10**).

Diagrama 10. Fracionamento cromatográfico da fração XI-40F30 em coluna pré-empacotada com fase estacionária sílica gel derivatizada com grupos fenila. Eluída em modo gradiente MeOH:H₂O.

A fração **XI-43F2** (98 mg) foi purificada em HPLC-UV, utilizando-se coluna analítica de fase-reversa C8 (Inertsil® C8-4, 4,6 x 250 mm, 5 µm), fase móvel H₂O:MeOH (62:38, v/v), monitorada nos comprimentos de onda 230 e 310 nm e vazão de 0,8 mL min⁻¹ (**Figura 30**). Todas as frações foram evaporadas e analisadas por HPLC-UV-MS.

Figura 30. Cromatograma de separação da fração XI-43F2 monitorada no comprimento de onda 230 nm; coluna analítica C8-4, fase móvel H₂O:MeOH (62:38, v/v).

A fração **XI-43F2C** (36 mg) foi selecionada para ser purificada em HPLC-UV, utilizando-se coluna analítica de fase-reversa fenila (Inertsil® fenila, 4,6 x 250 mm, 5 µm), fase móvel H₂O:MeCN (70:30, v/v), monitorada nos comprimentos de onda 220 e 340 nm e vazão de 0,8 mL min⁻¹ (**Figura 31**).

Figura 31. Cromatograma de separação da fração XI-43F2C monitorada no comprimento de onda 220 nm; coluna analítica fenila, fase móvel H₂O:MeCN (70:30, v/v).

As frações obtidas foram evaporadas em sistema *speedvac* e analisadas por HPLC-UV-MS (**Diagrama 11**). A fração XI-43F2B foi identificada como sendo o composto **IP2**, a fração XI-43F2C (2,2 mg). Renomeada **IP11**, apresentou grau de pureza satisfatório e foi analisada por RMN de ¹H, ¹³C, COSY, HSQC, HMBC, HRMS, UV, IV, CD e [α]_D.

Diagrama 11. Fracionamento cromatográfico da fração XI-43F2.

A fração **XI-50F4** foi fracionada em coluna pré-empacotada com fase estacionária sílica gel derivatizada com grupos fenila (5 g) eluída em modo gradiente com adição sequencial de 60 mL de mistura de solventes de diferentes composições MeOH:H₂O (30:70, v/v; **XI54-F3**), MeOH:H₂O (40:60, v/v; **XI54-F4**), MeOH:H₂O (50:50, v/v; **XI54-F5**) e MeOH (**XI54-FM**) (**Diagrama 12**). As frações obtidas foram evaporadas em sistema *speedvac* e analisadas por HPLC-UV-MS.

Diagrama 12. Fracionamento da subfração XI-50F4 em coluna pré-empacotada com fase estacionária sílica derivatizada com grupos fenila, eluída em modo gradiente. Fase móvel MeOH em H₂O.

A fração **XI54-F3** (192 mg) foi fracionada em coluna empacotada com fase estacionária Sephadex G-15, eluída em modo isocrático utilizando como fase móvel a mistura de solventes H₂O:MeOH (9:1, v/v). Foram coletadas 175 frações de 3 mL cada uma, e agrupadas de acordo com o perfil de UV observado em análise por HPLC-UV-MS (**Diagrama 13**).

Diagrama 13. Fracionamento da subfração XI-54F3 em coluna empacotada com fase estacionária Sephadex G-15, eluída em modo isocrático. Fase móvel H₂O: MeOH (9:1, v/v).

A fração **XI54F3B** foi selecionada para ser purificada por HPLC-UV, utilizando-se coluna analítica de fase-reversa C₈ (Inertsil® C8-4, 4,6 x 250 mm, 5 µm), fase móvel H₂O:MeCN:MeOH (68:9:23, v/v), monitorado nos comprimentos de onda de 230 e 310 nm e vazão 0,8 mL min⁻¹ (**Figura 32**). As frações obtidas foram evaporadas e analisadas por HPLC-UV-MS.

Figura 32. Cromatograma de separação da fração XI54F3B monitorada no comprimento de onda 230 nm; coluna analítica C8-4, fase móvel H₂O:MeCN:MeOH (68:9:23, v/v).

As frações **XI54F3B2** e **XI54F3B5**, renomeadas **IP9** e **IP15**, apresentaram grau de pureza satisfatório e foram analisadas por RMN de ¹H, ¹³C, COSY, HSQC, HMBC, HRMS, UV, IV, CD e [α]_D.

A fração **XI54F4** (**Diagrama 12**) foi selecionada para ser purificada por HPLC-UV em coluna semi-preparativa de fase-reversa C₁₈ RP X-Terra (7,8 x 150 cm, 5μm), fase móvel H₂O:MeCN:MeOH (70:15:15, v/v), monitorado nos comprimentos de onda de 230 e 280 nm e vazão 2,5 mL min⁻¹ (**Figura 33**). As frações obtidas foram evaporadas e analisadas por HPLC-UV-MS (**Diagrama 14**).

Figura 33. Cromatograma de separação da fração XI54F4 monitorado no comprimento de onda 230 nm; coluna C₁₈ RP X-Terra, fase móvel H₂O:MeCN:MeOH (70:15:15, v/v).

Diagrama 14. Fracionamento de XI54F4 por HPLC-UV

As frações **XI54F43D** e **XI54F4E**, renomeadas **IP14** e **IP27**, apresentaram grau de pureza satisfatório e foram analisadas por RMN de ^1H , ^{13}C , COSY, HSQC, HMBC, HRMS, UV, IV, CD e $[\alpha]_D$. Quando **IP14** foi solubilizado em $\text{DMSO}-d_6$ formou-se um precipitado, que foi filtrado e analisado separadamente. A substância solúvel em DMSO foi renomeada **IP14N** e o precipitado **IP14a**.

A fração **XI50F5** foi selecionada para ser fracionada em HPLC-UV, utilizando-se uma coluna semi-preparativa C_{18} RP X-Terra (7,5 x 150 mm, 5 μm), fase móvel $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}:\text{MeCN}$ (50:25:25, v/v), monitorado nos comprimentos de onda de 220 e 280 nm e vazão 2 mL min^{-1} (**Figura 34**). As frações obtidas foram evaporadas e analisadas por HPLC-UV-MS (**Diagrama 15**).

Figura 34. Cromatograma de separação da fração XI50F4 monitorada no comprimento de onda 220 nm; coluna C_{18} RP X-Terra, fase móvel $\text{H}_2\text{O}:\text{MeCN}:\text{MeOH}$ (50:25:25, v/v).

Diagrama 15. Fracionamento de XI50F5 por HPLC-UV

A fração **XI50F5B** foi selecionada para ser fracionada em HPLC-UV, utilizando-se uma coluna analítica de sílica-gel derivatizada com grupos C₈ (Inertsil® C8-4, 4,6 x 250 mm, 5 µm), fase móvel H₂O: MeOH (46:56, v/v), detector ELSD e vazão 0,8 mL min⁻¹ (**Figura 35**). As frações obtidas foram evaporadas e analisadas por HPLC-UV-MS. As frações **XI50F5B1** e **XI50F5B2**, renomeadas **IP16** (0,8 mg) e **IP17** (2 mg) respectivamente, apresentaram grau de pureza satisfatório e foram analisadas por RMN de ¹H, ¹³C, COSY, HSQC, HMBC, HRMS, UV, IV, CD e [α]_D.

Figura 35. Cromatograma de separação da fração XI50F5 monitorado no detector ELSD; coluna C8-4 e fase móvel H₂O:MeOH (46:56, v/v), vazão 0,8 mL min⁻¹

2.3.3 INVESTIGAÇÃO DO METABOLISMO SECUNDÁRIO DO FUNGO *Thelebolus globosus* E2

A linhagem fúngica *Thelebolus globosus* E2 foi cultivada em 56 frascos *Schott* de 500 mL contendo 100 mL do meio de cultivo PDB, preparado com 24 g de caldo de batata dextrose para cada litro de água destilada, com inóculos contendo 10^5 esporos mL⁻¹. Após 15 dias de incubação a 20 °C em modo estático, as culturas foram reunidas. O meio de crescimento junto com o micélio foram extraídos com AcOEt e filtradas através de uma camada de celite. As fases foram particionadas em funil de separação e as frações orgânicas foram combinadas e evaporadas em evaporador rotativo. O extrato obtido foi ressuspensionado em 100 mL de MeOH:H₂O (9:1, v/v) e particionado com igual quantidade de n-hexano (3X), e nomeado PE (1 g) (**Diagrama 16**).

O extrato metanólico (1 g) foi submetido à separação cromatográfica em coluna pré-empacotada com fase estacionária de sílica-gel derivatizada com grupos cianopropila (10 g), eluída em modo gradiente com adição sequencial de 120 mL das seguintes misturas de solventes: CH₂Cl₂ (**PE1**), CH₂Cl₂:AcOEt (1:1, v/v; **PE2**), AcOEt (**PE3**), AcOEt:MeOH (1:1, v/v; **PE4**) e MeOH (**PE5**) (**Diagrama 16**).

A fração **PE1** (450 mg) foi submetida à separação cromatográfica em coluna pré-empacotada com fase estacionária de sílica-gel (10 g), eluída em modo gradiente de AcOEt em Hexano, seguido de gradiente de MeOH em AcOEt (**Diagrama 16**).

As frações **APE1A-APE1D** e **APE2** foram reunidas e submetidas a fracionamento em coluna pré-empacotada com fase estacionária de sílica-gel derivatizada com grupos C₁₈ (10g), e fase móvel constituída por A: MeOH:MeCN (1:1, v/v) e B: H₂O. Eluição em modo gradiente por adição sequencial das seguintes misturas de solventes: A:B (1:4, v/v; **APER20**), A:B (2:3, v/v; **APER40**) A:B (3:2, v/v; **APER60**), A:B (4:1, v/v; **APER80**) e MeOH (**APER100**) (**Diagrama 16**).

A fração **APER40** foi submetida a fracionamento em HPLC-UV, utilizando uma coluna semi-preparativa C₁₈ RP X-Terra (7,5 x 150 mm, 5 µm), fase móvel H₂O:MeOH:MeCN (74:13:13, v/v), monitorado nos comprimentos de onda de 220 e 230 nm e vazão 2,5 mL min⁻¹ (**Figura 36**). As frações obtidas foram evaporadas e analisadas por HPLC-UV-MS (**Diagrama 17**). As frações **APER40A**, e **APER40B** apresentaram grau de pureza satisfatório e foram analisadas por RMN de ¹H.

Diagrama 16. Separação cromatográfica dos extratos, metanólico e aquoso, obtidos a partir do meio de cultivo do fungo *Thelebolus globosus* E2 (5,6 L, PDB).

ELUENTES

Extrato aquoso (XPE)

XPE-25 -> 25%MeOH
XPE-50 -> 50% MeOH
XPE-75 -> 75%MeOH
XPE-100 -> 100% MeOH

Fração Orgânica (APE)

APE1-->CH₂Cl₂
APE2-->CH₂Cl₂/AceOEt (1:1)
APE3-->AceOEt
APE4-->AcOEt/MeOH (1:1)
APE5--> MeOH

Subfrações APE1

HA-> Hexano/AcOEt (1:1)
A-> AcOEt
AM-> AcOEt/MeOH (1:1)
M-> MeOH

Subfração APER

APER-20-> 20% (MeOH/MeCN1:1)
APER-40-> 40% (MeOH/MeCN1:1)
APER-60-> 60% (MeOH/MeCN1:1)
APER-80-> 80% (MeOH/MeCN1:1)
APER-100->100% (MeOH/MeCN1:1)

* Frações que não ficaram completamente secas.

Figura 36. Cromatograma de separação da fração APER40 monitorado no comprimento de onda 220 nm; coluna C₁₈ RP X-Terra e fase móvel H₂O:MeOH:MeCN (74:13:13, v/v), vazão 2,5 mL min⁻¹.

Diagrama 17. Fracionamento de APER40 por HPLC-UV.

A fração **APER40E** foi selecionada para ser submetida a fracionamento em HPLC-UV, utilizando uma coluna semi-preparativa C8 InertSustain® (10 x 250 mm, 5 µm), fase móvel H₂O:MeOH (55:45, v/v), monitorado nos comprimentos de onda de 220 e 230 nm e vazão 4 mL min⁻¹ (**Figura 37**). As frações **APER40E1**, **APER40E2** e **APER40E3**, renomeadas **APERP3** (1,9 mg), **APERP4** (5,0 mg) e **APERP5** (2,8 mg) respectivamente, apresentaram grau de pureza satisfatório e foram analisadas por RMN de ¹H.

A fração **APER40F** foi selecionada para ser submetida a fracionamento em HPLC-UV, utilizando uma coluna semi-preparativa C8 InertSustain® (10 x 250 mm, 5 µm), fase móvel H₂O:MeOH:MeCN (63:35:2, v/v), monitorado nos comprimentos de onda de 220 e 230 nm e vazão 4 mL min⁻¹ (**Figura 38**). As frações **APER40F1** e **APER40F2**, renomeadas **APERP6** (0,6 mg) e **APERP7** (3,8 mg) respectivamente, apresentaram grau de pureza satisfatório e foram analisadas por RMN de ¹H.

Figura 37. Cromatograma de separação da fração APER40E monitorado no comprimento de onda 220 nm; coluna C₈ InertSustain® (10 x 250 mm, 5 µm), fase móvel H₂O:MeOH (55:45, v/v), vazão 4 mL min⁻¹.

Figura 38. Cromatograma de separação da fração APER40F monitorado no comprimento de onda 220 nm; coluna C₈ InertSustain® (10 x 250 mm, 5 µm), fase móvel H₂O:MeOH:MeCN (63:35:2, v/v), vazão 4 mL min⁻¹.

A fração **APER60** foi submetida a fracionamento em HPLC-UV, utilizando uma coluna semi-preparativa C₁₈ RP X-Terra (7,5 x 150 mm, 5 µm), fase móvel H₂O:MeOH:MeCN (62:35:2, v/v), monitorado nos comprimentos de onda de 220 e 260 nm e vazão 2,5 mL min⁻¹ (**Figura 39**). As frações obtidas foram evaporadas e analisadas por HPLC-UV-MS (**Diagrama 18**).

Figura 39. Cromatograma de separação da fração APER60 monitorado no comprimento de onda 220 nm; coluna semi-preparativa C₁₈ RP X-Terra (7,5 x 150 mm, 5 µm), fase móvel H₂O:MeOH:MeCN (62:35:2, v/v), vazão 2,5 mL min⁻¹.

Diagrama 18. Fracionamento de APER60 por HPLC-UV.

A fração aquosa dos meios de cultura foi submetida à adsorção em fase sólida com uma mistura de resinas adsorventes XAD-2, XAD-4, XAD-7 (1:1:1, 500 g) e sob agitação orbital de 160 rpm por 12 h. A mistura de resinas foi filtrada, lavada com água e extraída com 4 x 500 mL de acetona:MeOH (1:1 v/v) em banho de ultrassom (30 min). O extrato resultante foi evaporado e nomeado XE (900 mg) (**Diagrama 16**).

O extrato bruto (XE) foi submetido à separação cromatográfica em coluna pré-empacotada com fase estacionária de sílica-gel derivatizada com grupos C₁₈ (10g), e eluído em modo gradiente com adição sequencial de 120 mL das seguintes misturas de

solventes: MeOH:H₂O (1:3, v/v; **XE25**), MeOH:H₂O (1:1, v/v; **XE50**), MeOH:H₂O (3:1, v/v; **XE75**) e MeOH (**XE100**) (**Diagrama 16**).

A linhagem fúngica *Thelebolus globosus* E2 foi cultivada em frascos *Schott* de 2000 mL contendo 40 g de arroz branco e 70 mL de água, autoclavado três vezes a 120 °C. Após 15 dias de incubação a 20 °C e modo estático, as culturas foram reunidas. O meio de crescimento junto com o micélio foram extraídos com AcOEt e filtradas através de uma camada de celite. As fases foram particionadas em funil de separação e as frações orgânicas foram combinadas e evaporadas em evaporador rotativo. O extrato obtido foi ressuspensionado em 100 mL de MeOH:H₂O (9:1, v/v) e particionado com igual quantidade de n-hexano (3X), e nomeado AAE (0,85 g) (**Diagrama 20**).

O extrato metanólico (0,85 g) foi submetido à separação cromatográfica em coluna pré-empacotada com fase estacionária de sílica-gel derivatizada com grupos cianopropila (10 g), eluída em modo gradiente com adição sequencial de 120 mL das seguintes misturas de solventes: CH₂Cl₂ (**AAE1**), CH₂Cl₂:AcOEt (1:1, v/v; **AAE2**), AcOEt (**AAE3**), AcOEt:MeOH (1:1, v/v; **AAE4**) e MeOH (**AAE5**) (**Diagrama 20**). As frações obtidas foram evaporadas e analisadas por HPLC-UV-MS.

Diagrama 19. Separação cromatográfica do extrato metanólico obtido a partir do meio de cultivo do fungo *Thelebolus globosus* E2 (80 g de arroz).

2.3.4 DETERMINAÇÃO DA CONFIGURAÇÃO ABSOLUTA DOS AMINOÁCIDOS

O estudo da estereoquímica absoluta dos aminoácidos presentes nos compostos isolados foi realizado mediante derivatização de *Marfey*. Na primeira etapa, 0,5 mg de amostra foram dissolvidos em 1 mL de HCl 6N. A amostra foi aquecida à temperatura 100-110 °C por 24h. Posteriormente, as soluções produto da hidrólise foram evaporadas.

Na segunda etapa, à amostra hidrolisada foram adicionados 20 µL de bicarbonato de sódio (NaHCO₃, 0,5M), 50 µL de água e 80 µL de uma solução de reagente de *Marfey* preparada em acetona. A amostra foi agitada por 1 hora a 40 °C. Em seguida, 16 µL de uma solução de HCl 0,5N foram adicionados, a amostra foi evaporada e solubilizada em MeOH para ser analisada por HPLC-UV-MS.

Essa última etapa foi realizada tanto para os produtos da hidrólise, como para os padrões dos aminoácidos. Os padrões e as amostras hidrolisadas foram analisados separadamente por HPLC-UV-MS, utilizando-se uma coluna analítica C₁₈ RP X-Terra (4,6 x 250 mm, 5 µm). Fase móvel constituída por A: H₂O + 0,1% de ácido fórmico e B: MeOH + 0,1% de ácido fórmico; gradiente linear de eluição utilizado foi de 10 a 100% B em 20 minutos; 100% B foi mantido por 5 minutos e finalmente 10% B por 10 minutos; vazão de 1 mL min⁻¹. A comparação dos cromatogramas foi realizada no comprimento de onda 340 nm.

2.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.4.1 ESTUDO QUÍMICO DA LINHAGEM *Penicillium* sp. IS1-A

Sete compostos inéditos na literatura, seis alcaloides peptídicos e um dipeptídeo, foram isolados a partir do extrato aquoso obtido utilizando-se a mistura 1:1:1 de resinas XAD-2, XAD-4, XAD-7. As etapas de fracionamento e posterior purificação incluíram SPE em fase reversa, cromatografia de exclusão de tamanho e HPLC analítica e semi-preparativa.

Inédito
IP2

Inédito
IP9

Inédito
IP12

Inédito
IP14N

Inédito
IP15

Inédito
IP27

Inédito
IP11

As estruturas planares dos compostos foram estabelecidas por análises espectroscópicas usando experimentos de RMN uni e bidimensionais e espectrometria de massa de alta resolução. A configuração absoluta dos resíduos de aminoácidos de cada composto foi estabelecida pelo método de *Marfey*. A configuração absoluta **IP2** e **IP9** está sendo estabelecida por análise conformacional em fase gasosa e solução de cálculos de TDDFT-ECD. Todos os compostos foram caracterizados por UV-Vis, DC e $[\alpha]_D$.

Adicionalmente, foram identificados três compostos já relatados na literatura: os alcaloides viridicatol (**65**) e 2,3-dihidroxi-4-fenilquinolina (**66**), assim como o sideróforo ferricromo **IP5**.

2.4.1.1 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS ISOLADOS A PARTIR DO MEIO DE CULTIVO DO FUNGO *Penicillium* sp. IS1-A

A linhagem fúngica foi crescida em pequena escala como descrito na seção 2.3.2.1. As frações XI25 (25% MeOH) e XI50 (50% MeOH), obtidas após fracionamento por SPE do extrato aquoso do experimento crescido em PDB e incubado por 30 dias, apresentaram atividade citotóxica contra células de fibroblasto de pulmão humano GM07492A, contra a linhagem de células de câncer de mama MCF-7 e contra células tumorais de câncer gástrico ACP01.

O fungo *P. sp.* IS1-A foi crescido em 5 L de PDB (**Diagrama 6**). A partir da fração **XI50** (50% MeOH) foi isolado o alcaloide peptídico IP2, sendo este o composto majoritário nessa fração. Um segundo crescimento em maior escala (10 L) do fungo IS1-A foi realizado com o intuito de isolar compostos análogos ao majoritário, detectados nas frações **XI25** e **XI50**. Porém, devido à pouca massa obtida dessas frações, não foi possível adquirir seus espectros de RMN.

A partir de diferentes frações do experimento de crescimento do fungo em 10 L de meio de cultivo foram isolados os compostos **IP9**, **IP11**, **IP12**, **IP14N**, **IP15** e **IP27** como descrito na seção 2.3.2.2.

2.4.1.1.1 Determinação estrutural dos alcaloides peptídicos isolados do meio de cultivo do fungo *Penicillium* sp. IS1-A

Determinação estrutural dos compostos IP2, IP9 e IP12

O composto **IP2** foi obtido como um sólido amorfo verde neon. Sua fórmula molecular $C_{20}H_{27}N_3O_4$ foi estabelecida por espectrometria de massas de alta resolução com ionização por *electrospray* (HRMS-ESI⁺) obtendo-se o íon $[M+H]^+$ em m/z 374,2079 (calculado para $C_{20}H_{28}N_3O_4^+$ 374,2080, 0,3 ppm), indicando nove graus de insaturação (**Figura 40a**). Seu espectro no UV apresentou as bandas de absorção nos comprimentos de onda 240, 263 e 396 nm (**Figura 40b**).

Figura 40. Espectros do composto **IP2**. A. Espectro de massas de alta resolução (ESI⁺) B. Espectro de absorções no UV (MeOH).

A análise dos espectro de RMN de ^1H (Apêndice 18-21), e HSQC (Apêndice 27) do composto **IP2**, indicaram a presença de dois sinais com deslocamentos químicos em δ_{H} 0,83 (δ_{C} 22,7) e 0,91 (δ_{C} 24,6) atribuídos a hidrogênios de metilas; três sinais em δ_{H} 1,93, 2,26 e 3,10 atribuídos a hidrogênios de três grupos metileno; dois sinais em δ_{H} 2,64 e δ_{H} 3,17 atribuídos a hidrogênios de dois grupos; um sinal em δ_{H} 3,30 atribuído a um metino substituído por nitrogênio; dois sinais em δ_{H} 4,86 atribuídos a hidrogênios geminais; um sinal em δ_{H} 5,62 atribuído a um hidrogênio vinílico; quatros sinais em δ_{H} 6,42, 6,80, 7,19 e 7,38 atribuídos a hidrogênios aromáticos; e dois sinais em δ_{H} 7,13 e 8,38 atribuídos a hidrogênios ligados a nitrogênios (**Tabela 5**).

Tabela 5. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (600 e 150 MHz, respetivamente; DMSO- d_6) de **IP2**.

IP2		
Posição	$\delta_{\text{ppm}}^{13}\text{C}$; Tipo	$\delta_{\text{ppm}}^1\text{H}$ (Mult., J/Hz)
NH-1	-	7,13, d (3,8)
2	59,8; CH	3,17, d (3,9)
3	46,3; CH	2,64, t (7,6)
4	193,9; C	-
4a	115,5; C	-
5	126,2; CH	7,38, dd (7,9; 1,5)
6	114,8; CH	6,42, ddd (7,9; 6,9; 1,0)
7	135,3; CH	7,19, ddd (8,5; 7,0; 1,6)
8	114,9; CH	6,80, d (8,3)
8a	151,0; C	-
9	42,8; C	-
10	144,8; CH	5,62, dd (17,1; 11,1)
11	113,0; CH ₂	4,87, dd, (11,1; 1,1) 4,86, dd, (17,1; 1,2)
12	24,6; CH ₃	0,91, s
13	22,7; CH ₃	0,83, s
14	40,7; CH ₂	3,10, dd (7,5; 6,2)
NH-15	-	8,38, t (5,4)
16	172,6; C	-
17	32,2; CH ₂	2,26 (m, 2H)
18	27,5; CH ₂	1,93, td (13,9; 6,4) 1,87, td (13,5; 6,0)
19	54,0; CH	3,30, t (6,0)
20	171,0; C	-

O espectro de RMN de ^{13}C (Apêndice 22), apresenta dois sinais em δ_c 115,5 e 151,0 atribuídos aos carbonos aromáticos tetrasubstituídos; três sinais com deslocamentos químicos em δ_c 171,0, 172,6 e 193,9 atribuídos às carbonilas de ácido carboxílico, amida e cetona, respectivamente (**Tabela 5**).

Quatro sinais na região aromática do espectro de ^1H em $\delta_H = 7,38, 6,80, 7,19$ e $6,42$ indicaram a presença de um sistema de benzeno 1,2-dissubstituído, que foi corroborado por correlações COSY (Apêndice 23-26).

As correlações observadas de COSY entre H-1 e H-2 e entre H-10 e H-11 no espectro COSY, bem como as correlações de HMBC (Apêndice 28-31) das metilas CH_3 -12 e CH_3 -13 com C-10, C-11, C-2 e C-9 indicaram a presença do fragmento indicado a seguir.

Segundo a correlação observada no espectro HMBC entre H-2 com o carbono aromático nitrogenado C-8a, com deslocamento químico característico de carbono sp^2 ligado a nitrogênio, indicaria que os dois fragmentos anteriores deveriam estar conectados por ligação entre o C-8a e o nitrogênio NH-1.

As correlações observadas no espectro COSY entre H-3 e H-14, assim como as correlações no HMBC entre a carbonila C-4 com os hidrogênios aromáticos H-5 e H-8, os hidrogênios H-2 e H-3, o metileno H-14 e o NH-1, bem como as correlações entre C-4a e os hidrogênios H-3 e NH-1, entre C-9 com H-3 e entre C-2 com H-14, permitiram estabelecer a formação de um segundo ciclo de seis membros, envolvendo a ligação da carbonila C-4 ao anel aromático no C-4a e uma ligação simples entre os carbonos C-2 e C-3, assim como a ligação do metileno C-14 ao C-3.

No espectro COSY foram observadas correlações entre H-17 e H-18 e entre H-18 e H-19, assim como a correlação no HMBC entre a carbonila C-20 com H-19 e da carbonila C-16 com H-17, e sendo que C-19 apresenta um deslocamento químico característico de carbono sp^3 ligado a nitrogênio, indicaram a presença do fragmento de ácido glutâmico no composto **72**.

Adicionalmente, as correlações no espectro COSY entre NH-15 e H-14, bem como a correlação de HMBC de H-14 com o grupo carbonila C-16 e entre NH-15 com C-17, foi finalmente estabelecida a ligação amida entre o C-16 e o nitrogênio NH-15, sendo estabelecida a estrutura do composto **IP2** como apresentado na **Figura 41**.

Figura 41. Estrutura química proposta para IP2 a partir da análise dos espectros de RMN mono e bidimensionais.

A configuração absoluta do resíduo de aminoácido foi determinada utilizando derivatização de *Marfey*, tanto do produto após hidrólise ácida de **IP2**, como do padrão do L-Glu. Os dois derivados foram analisados por HPLC-UV-MS e os tempos de retenção, no cromatograma extraído a 340 nm para o padrão e o produto derivatizado de **IP2** revelaram a presença L-Glu (**Figura 42**).

Figura 42. A. Comparação dos cromatogramas extraídos a 340 nm para o padrão L-Glu derivatizado com reagente de *Marfey* (Cromatograma preto) e o produto da hidrólise e derivatização de **IP2** (Cromatograma azul). FDAA: Excesso do reagente de *Marfey* após reação. Condições cromatográficas: Coluna RP X-Terra (4,6 x 250 mm, 4,6 µm). Eluição modo gradiente MeOH:H₂O.

A estereoquímica absoluta dos carbonos C-2 e C-3 está sendo determinada baseando-se em cálculos TDDFT-ECD. A análise de **IP2** em MeOH por dicroísmo circular apresentou efeito Cotton (EC) negativo na faixa 240–363 nm e EC positivo na faixa 437–475 nm (**Figura 43**). A análise por $[\alpha]_D^{24}$ apresentou desvio à direita do plano da luz polarizada (+ 377°).

Figura 43. Espectro de dicroísmo circular (DC) obtido para **IP2** em MeOH

O composto **IP9** foi obtido como um sólido marrom esverdeado. Sua fórmula molecular $C_{20}H_{27}N_3O_4$ foi estabelecida por espectrometria de massas de alta resolução com ionização por *electrospray* (HRMS-ESI⁺) obtendo-se o íon $[M+H]^+$ em m/z 374,2077 (calculado para $C_{20}H_{28}N_3O_4^+$ 374,2080, 1,3 ppm), indicando nove graus de insaturação (**Figura 44a**). Seu espectro no UV apresentou as bandas de absorção mais intensas em $\lambda_{\text{máx}}$ 210, 251 e 290 nm (**Figura 44b**).

Figura 44. Espectros do composto **IP9**. A. Espectro de massas de alta resolução (ESI⁺) B. Espectro de absorções no UV (MeOH).

Os dados espectroscópicos de RMN de ^1H (Apêndice 32-34) e RMN de ^{13}C (Apêndice 35) de **IP9**, analisados em conjunto com HSQC (Apêndice 39-41), foram muito semelhantes aos de **IP2**. Porém, os dois sinais dos grupos metinos em δ_{C} 59,6 e 46,1, assim como da carbonila em δ_{C} 193,9 de **IP2** não foram observados nos espectros de **IP9**. Por outro lado, foram observados nos espectros de **IP9** um sinal para um carbono quaternário em δ_{C} 56,1 (C-3), um grupo metileno em δ_{C} 30,4 ppm (C-13) e um sinal de carbonila de amida em 179,2 (C-2) (**Tabela 6**).

O espectro COSY (Apêndice 36-38) apresentou correlações entre H-13 e H-14 e entre H-14 e NH-15. No espectro HMBC (Apêndice 42-46) foram observadas correlações entre os hidrogênios H-13 e H-14 com C-3, e entre H-13 e NH-1 com C-2. Essas correlações indicaram a formação de um ciclo de cinco membros com a presença de um carbono quaternário C-3 ligado ao resíduo de aminoácido por um fragmento $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$.

Tabela 6. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (600 e 150 MHz, respectivamente; DMSO- d_6) de **IP9**.

IP9		
Posição	$\delta_{\text{ppm}}^{13}\text{C}$, Tipo	$\delta_{\text{ppm}}^1\text{H}$ (Mult., J/Hz)
NH-1	-	10,44, s
2	179,2; C	-
3	56,1; C	-
3a	129,7; C	-
4	125,3; CH	7,15, d (7,8)
5	120,7; CH	6,95, td (7,5; 1,2)
6	127,8; CH	7,18, td (7,7; 1,2)
7	109,0; CH	6,83, d (7,6)
7a	142,7; C	-
8	41,2; C	-
9	143,4; CH	6,02, dd (17,5; 10,8)
10	113,2; CH ₂	5,04, dd (10,8; 1,3) 4,93, dd (17,5; 1,3)
11	22,1; CH ₃	1,02, s
12	21,3; CH ₃	0,95, s
13	30,4; CH ₂	1,98, m
14	35,3; CH ₂	2,41, m
NH-15	-	7,89, t (5,5)
16	170,4; C	-
17	30,5; CH ₂	2,21, m 2,12, m
18	25,8; CH ₂	1,93, m
19	51,5; CH	3,83, m
20	170,7; C	-
NH-21	-	8,38, s

Foram também observadas correlações entre os hidrogênios H-11 e H-12 e C-3, indicando que o grupo isoprenila encontra-se ligado ao C-3. Também foram observadas as correlações no HMBC entre os hidrogênios aromáticos H-4, H-5 e H-7 com C-3 (**Figura 45**).

A presença da carbonila da amida no ciclo de cinco membros em **IP9**, explica a mudança no deslocamento químico do carbono C-2 em relação à C-3 na estrutura do composto **IP2**.

Figura 45. A. Correlações observadas nos espectros COSY e HMBC que confirmam a estrutura proposta para IP9. Estrutura química planar proposta para IP9 com atribuições dos sinais de ^{13}C

A configuração absoluta do resíduo do ácido glutâmico foi determinada utilizando-se derivatização de *Marfey*, e os tempos de retenção, no cromatograma extraído a 340 nm para o padrão e o produto derivatizado de **IP9** revelaram a presença de L-Glu (**Figura 46**).

Figura 46. A. Comparação dos cromatogramas extraídos a 340 nm para o padrão L-Glu derivatizado com reagente de *Marfey* (Cromatograma preto) e o produto da hidrólise e derivatização de **IP9** (Cromatograma azul). FDAA: Excedente do reagente de *Marfey* após reação. Condições cromatográficas: Coluna C_{18} RP X-Terra (4,6 x 250 mm, 4,6 μm). Eluição modo gradiente $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$.

A estereoquímica absoluta do carbono C-12 está sendo determinada baseando-se em cálculos TDDFT-ECD. A análise de **IP9** por dicroísmo circular (**Figura 47**) em MeOH apresentou efeito Cotton (EC) negativo na faixa 237–276 nm e EC positivo na faixa 366–428 nm. A análise por $[\alpha]_D^{24}$ apresentou desvio à esquerda do plano da luz polarizada (-45°).

Figura 47. Espectro de dicroísmo circular (DC) obtido para **IP9** em MeOH.

O composto **IP12** foi obtido como um sólido branco amarelado. Sua fórmula molecular $C_{20}H_{25}N_3O_4$ foi estabelecida por espectrometria de massas de alta resolução com ionização por *electrospray* (HRMS-ESI⁺) obtendo-se o íon $[M+H]^+$ em m/z 372,1922 $[M+H]^+$ (calculado para $C_{20}H_{26}N_3O_4^+$ 372,1923, 0,3 ppm), indicando dez graus de insaturação (**Figura 48a**). Seu espectro no UV apresentou bandas de absorção mais intensas em λ_{max} 214, 239, 247, 318 e 330 nm (**Figura 48b**).

Figura 48. Espectros do composto **IP12**. A. Espectro de massas de alta resolução (ESI⁺). B. Espectro de absorções no UV (MeOH).

Os dados espectroscópicos de RMN de ^1H (Apêndice 47-49) e RMN de ^{13}C (Apêndice 50-51) de **IP12** analisados em conjunto com HSQC (Apêndice 54-56), foram muito semelhantes aos de IP2. Os dois sinais dos dois metinos em δ_{C} 59,6 (C-2) e 46,1 (C-3) de IP2 não são observados no espectro de IP12. Em vez disso, no espectro de RMN de ^{13}C de IP12 são observados dois sinais de carbonos sp^2 em δ_{C} 158,6 (C-2) e δ_{C} 116,5 (C-3) (**Tabela 7**). Além disso, em IP2 o sinal H-14 apresenta-se desdobrado; para o composto IP12 mostra-se como um singlete em δ_{H} 4,36 (H-14).

Os dados anteriores sustentam a presença de uma dupla ligação entre C-2 e C-3. Esta alteração estrutural explica o menor deslocamento químico da carbonila de cetona no anel de seis membros de **IP12** em relação ao valor apresentado em IP2 (**Figura 49**). Todas as correlações foram corroboradas no espectro COSY (Apêndice 52-53) e HMBC (Apêndice 57-60).

Tabela 7. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (600 e 150 MHz, respectivamente; $\text{MeOH-}d_4$) de **IP12**.

IP12		
Posição	$\delta_{\text{ppm}}^{13}\text{C}$, Tipo	$\delta_{\text{ppm}}^1\text{H}$ (Mult., J/Hz)
NH-1		-
2	158,6; C	-
3	116,5; C	-
4	180,6; C	-
4a	125,0; C	-
5	120,0; CH	7,89, d (8,3)
6	125,7; CH	7,41, ddd (8,0; 7,0; 0,9)
7	133,5; CH	7,60, ddd (8,4; 7,0; 1,4)
8	125,9; CH	8,21, dd (8,2; 1,1)
8a	140,7; C	-
9	44,5; C	-
10	146,5; CH	6,14, dd (17,5; 10,8)
11	114,0; CH_2	5,07, dd (17,4; 10,8)
12	28,4; CH_3	1,54, s
13	28,4; CH_3	1,54, s
14	38,3; CH_2	4,36, s
NH-15		-
16	174,5; C	-
17	33,1; CH_2	2,33, t (6,6)
18	28,1; CH_2	2,06, m
		2,00, m
19	55,5; CH	3,61, m
20	173,5; C	-

A configuração absoluta do resíduo de aminoácido foi determinada utilizando derivatização de *Marfey*, tanto do produto após hidrólise ácida de **IP12**, como do padrão do L-Glu. Os dois derivados foram analisados por HPLC-UV-MS e os tempos de retenção, no cromatograma extraído a 340 nm para o padrão e o produto derivatizado de **IP12** revelaram a presença L-Glu (**Figura 50**).

Figura 49. A. Correlações observadas nos espectros COSY e HMBC que confirmam a estrutura proposta para IP12. Estrutura química planar proposta para **IP12** com atribuições dos sinais de ^{13}C .

Figura 50. Comparação dos cromatogramas extraídos a 340 nm para o padrão L-Glu derivatizado com reagente de *Marfey* (Cromatograma azul) e o produto da hidrólise e derivatização de **IP12** (Cromatograma preto). FDAA: Excedente do reagente de *Marfey* após reação. Condições cromatográficas: Condições cromatográficas: Coluna C_{18} RP X-Terra (4,6 x 250 mm, 4,6 μm). Eluição modo gradiente $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$.

A análise de **IP12** por dicroísmo circular (**Figura 51**) em MeOH apresentou efeito Cotton (EC) positivo na faixa 350–428 nm. A análise por $[\alpha]_D^{24}$ apresentou desvio à esquerda do plano da luz polarizada ($-11,5^\circ$).

Figura 51. Espectro de dicroísmo circular (DC) obtido para **IP12** em MeOH.

Determinação estrutural dos compostos **IP14N** e **IP14a**

O composto **IP14N** foi obtido como um sólido marrom. Sua fórmula molecular $C_{20}H_{27}N_3O_4$ foi estabelecida por espectrometria de massas de alta resolução com ionização por *electrospray* (HRMS-ESI⁺) obtendo-se o íon $[M+H]^+$ em m/z 390,2010 (calculado para $C_{20}H_{28}N_3O_5^+$ 390,2029, 5 ppm), indicando nove graus de insaturação (**Figura 52a**). Seu espectro no UV apresentou as bandas de absorção mais intensas em $\lambda_{\text{máx}}$ 233, 261, 267 e 328 nm (**Figura 52b**).

A análise dos dados espectroscópicos de RMN de 1H (Apêndice 61-63) e RMN de ^{13}C (Apêndice 64) de **IP14N**, em conjunto com o espectro HSQC (Apêndice 68-70), indicaram semelhanças estruturais com o composto **IP2**. No entanto, os sinais dos metinos em δ_c 59,8 (C-2) e 46,3 (C-3) de **IP2** não foram observados nos espectros de **IP14N**. Em vez disso, foram observados os sinais para uma carbonila adicional em δ_c 177,9 (C-8) e um grupo metileno em δ_c 40,4 (C-15) foram observados nos espectros de RMN de **IP14N** (**Tabela 8**).

No espectro de HMBC (Apêndice 71-74) foram observadas correlações entre os hidrogênios da dupla ligação H-10 e H-11 e os hidrogênios das metilas H-12 e H-13 com a carbonila C-8. No espectro COSY (Apêndice 65-67) foram observadas as correlações entre H-15 e H-16 e no espectro HMBC as correlações entre H-15 e H-16 e C-14. Esses dados indicaram a estrutura proposta para a amostra **IP14N** na **Figura 53**.

Figura 52. Espectros do composto **IP14N**. A. Espectro de massas de alta resolução (ESI⁺). B. Espectro de absorções no UV (MeOH)

Tabela 8. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (600 e 150 MHz, respetivamente, $\text{MeOH-}d_6$) de **IP14N** e **IP14A**.

IP14N $\text{MeOH-}d_4$			IP14A $\text{MeOH-}d_4$	
Posição	$\delta_{\text{ppm}}^{13}\text{C}$, Tipo	δ_{H} , ppm (Mult., J/Hz)	$\delta_{\text{ppm}}^{13}\text{C}$, Tipo	$\delta_{\text{ppm}}^1\text{H}$, (Mult., J/Hz)
1	124,1; C	-	124,1; C	-
2	122,1; CH	8,50, dd (8,5; 0,6)	122,0; CH	8,51, dd (8,5; 1,0)
3	124,3; CH	7,10, dd (8,0; 7,4; 1,2)	124,2; CH	7,11, dd (8,0; 7,4; 1,1)
4	135,9; CH	7,48, ddd (8,6; 7,3; 1,6)	135,9; CH	7,48, ddd (8,6; 7,3; 1,5)
5	132,5; CH	7,95, dd (8,0; 1,4)	132,5; CH	7,95, dd (8,0; 1,4)
6	141,6; C		141,7; C	
NH-7	-	-	-	-
8	177,9; C		177,9; C	
9	48,0; C		48,0; C	
10	143,8; CH	6,03, dd (17,4; 10,7)	143,8; CH	6,04, dd (17,4; 10,7)
11	115,5; CH_2	5,26, dd (17,5; 0,8) 5,20, dd (10,7; 0,6)	115,5; CH_2	5,26, dd (17,4; 0,9) 5,20, dd (10,7; 0,8)
12	25,3; CH_3	1,31, s	25,3; CH_3	1,31, s
13	25,3; CH_3	1,31, s	25,3; CH_3	1,31, s
14	204,4; C		204,4; C	
15	40,4; CH_2	3,23, t (6,5)	40,4; CH	3,23, t (6,5)
16	36,4; CH_2	3,48, t (6,5)	36,3; CH_2	3,47, t (6,5)
NH-17	-	-	-	-
18	174,4; C	-	175,1; C	-
19	32,6; CH_2	2,37, td (7,2; 1,3)	33,0; CH_2	2,33, td (7,2; 1,3)
20	27,3; CH_2	2,09, m 2,02, m	27,8; CH_2	2,00, m
21	53,7; CH	3,92, t (6,3)	55,2; CH	3,61, t (5,8)
22	171,6; C	-	173,2; C	-

Figura 53. A. Correlações observadas nos espectros COSY e HMBC que confirmam a estrutura proposta para IP14N. Estrutura química planar proposta para IP14N com atribuições dos sinais de ^{13}C

A configuração absoluta do resíduo de ácido glutâmico foi determinada utilizando derivatização de *Marfey*, e revelou a presença L-Glu em **IP14N** (Figura 54).

Figura 54. Comparação dos cromatogramas extraídos a 340 nm para o padrão L-Glu derivatizado com reagente de *Marfey* (Linha azul) e o produto da hidrólise e derivatização de **IP14N** (Linha preta). FDAA: Excedente do reagente de *Marfey* após reação. Condições cromatográficas: Condições cromatográficas: Coluna C₁₈ RP X-Terra (4,6 x 250 mm, 4,6 µm). Eluição modo gradiente MeOH:H₂O.

Na análise de **IP14N** por dicroísmo circular não apresentou efeito Cotton na faixa de comprimento de onda analisado (200 – 500 nm). A análise por $[\alpha]_D^{24}$ para o composto **IP14N** apresentou desvio à esquerda do plano da luz polarizada (-9°).

Quando foi solubilizada em DMSO, a fração **IP14N** formou um precipitado que foi filtrado e analisado separadamente. O precipitado da fração **IP14N**, nomeado **IP14a**, mostrou ser um sólido branco amarelado, apresentou espectros de RMN de ^1H (Apêndice 75) e RMN de ^{13}C (Apêndice 76) muito semelhantes aos de **IP14N** (**Tabela 8**), exceto pela sutil mudança do deslocamento químico dos carbonos e hidrogênios α do suposto ácido glutâmico presente no composto **IP14a**, (**Figura 55**).

Embora, o deslocamento químico dos hidrogênios α e β do aminoácido presente em **IP14N** e **IP14a** seja diferente, não foram observadas correlações diferenciadas entre os espectros bidimensionais dos dois compostos (Apêndices 77-79). Em princípio se pensava que na estrutura química de **IP14a** a ligação peptídica tinha-se formado através do ácido carboxílico do aminoácido, ao contrário de **IP14N**, cuja ligação peptídica tinha sido formada através do ácido carboxílico no extremo da cadeia alifática de Glu (**Figura 56**).

Figura 55. Comparação de espectros dos compostos **IP14N** (preto) e **IP14a** (vermelho): A. RMN de ^1H B. RMN de ^{13}C (600 e 150 MHz, respectivamente; $\text{MeOH-}d_4$)

Figura 56. Hipótese da estrutura química de **IP14a** em relação à estrutura do composto **IP14N**.

Para conferir esta hipótese, as duas frações foram analisadas separadamente por RMN de ^1H solubilizando as amostras em $\text{MeOH-}d_4$ mais uma gota de $\text{TFA-}d_4$. O espectro de RMN de ^1H das duas frações apresentou deslocamentos químicos correspondentes aos hidrogênios α e β idênticos (δ_{H} 4,01, 2,18 e 2,12) indicando tratar-se do mesmo composto (**Figura 57**). Isso pode ser explicado pela formação da base livre do ácido glutâmico em meio básico, com a consequente formação de glutamatos insolúveis em solvente orgânico.

Figura 57. Comparação dos espectros de RMN de ^1H de **IP14N** e **IP14A** (600 MHz; $\text{MeOH-}d_4$ + $\text{TFA-}d_4$).

Determinação estrutural IP15 e IP27

O composto **IP15** foi obtido como um sólido marrom. Sua fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_3$ foi estabelecida por espectrometria de massas de alta resolução com ionização por *electrospray* (HRMS-ESI $^+$) obtendo-se o íon $[\text{M}+\text{H}]^+$ em m/z 358,2139 (calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{N}_3\text{O}_3^+$ 358,2130, 5 ppm), indicando nove graus de insaturação (**Figura 58a**). Seu espectro no UV apresentou as bandas de absorção mais intensas em $\lambda_{\text{máx}}$ 226, 284, 291 nm (**Figura 58b**).

Figura 58. Espectros do composto **IP15**. A. Espectro de massas de alta resolução (ESI⁺). B. Espectro de absorções no UV (MeOH)

Os dados de RMN de ^1H de **IP15** (Apêndice 80-82) indicaram a presença de quatro sinais de hidrogênios aromáticos H-4, H-5, H-6 e H-7. Correlações observadas no espectro COSY (Apêndice 84-86) indicaram a presença de um sistema de benzeno 1,2-dissubstituído (**Tabela 9**). No espectro HMBC (Apêndice 90-93) a correlação entre NH-1 e os carbonos C-2, C-3, C-3a e C-7a, indicam a presença do um resíduo indólico na estrutura de **IP15**.

Tabela 9. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (600 e 150 MHz, respetivamente, $\text{DMSO}-d_6$) de **IP15** e **IP27**.

Posição	IP15		IP27	
	$\delta_{\text{ppm}}^{13}\text{C}$; Tipo	$\delta_{\text{ppm}}^1\text{H}$ (Mult., J/Hz)	$\delta_{\text{ppm}}^{13}\text{C}$; Tipo	$\delta_{\text{ppm}}^1\text{H}$ (Mult., J/Hz)
NH-1	-	10,47, s	-	10,42, s
2	140,1; C	-	140,0; C	-
3	107,1; C	-	107,1; C	-
3a	129,1; C	-	129,1; C	-
4	110,9; CH	7,31, d (8,0)	110,9; CH	7,29, d (8,0)
5	118,2; CH	6,92, ddd (7,9; 6,9; 1,0)	118,2; CH	6,93, ddd (8,0; 7,2; 1,2)
6	120,3; CH	6,99, ddd (8,1; 7,1; 1,1)	120,3; CH	6,99, ddd (8,0; 7,2; 1,2)
7	117,6; CH	7,49, d (8,0)	117,6; CH	7,48, d (7,9)
7a	134,7; C	-	134,6; C	-
8	38,7; C	-	38,7; C	-
9	146,2; CH	6,14, dd (17,2; 10,7)	146,2; CH	6,14, dd (17,2; 10,7)
10	110,9; CH_2	5,03, dd (17,1; 1,0) 5,01, dd (10,6; 1,1)	110,9; CH_2	5,05, dd (17,1; 1,3) 5,02, dd (10,6; 1,2)
11	27,8; CH_3	1,48, s	27,8; CH_3	1,48, s
12	27,8; CH_3	1,48, s	27,8; CH_3	1,48, s
13	25,4; CH_2	2,87, m	25,3; CH_2	2,84, m
14	39,9; CH_2	3,18, m	39,8; CH_2	3,17, m
NH-15	-	8,29, t (5,1)	-	8,00, t (5,7)
16	171,9; C	-	171,7; C	-
17	31,9; CH_2	2,29, m	31,4; CH_2	2,15, m
18	27,1; CH_2	1,95, m 1,91, m	30,1; CH_2	1,90, m 1,69, m
19	53,8; CH	3,32, m	69,3; CH	3,88, dd (7,6; 4,1)
20	170,6; C	-	175,7; C	-

A análise dos espectros COSY e HMBC confirmaram a presença de um grupo isoprenila na molécula. No espectro HMBC foram observadas as correlações entre C-2 e os hidrogênios oleofínicos H-9 e H-10 e com os hidrogênios metílicos H-11 e H-12, que confirmam a posição do substituinte isoprenila ligado ao carbono C-2.

No espectro COSY foram observadas correlações entre os hidrogênios metilênicos H-13 e H-14, e entre H-14 e NH-15. No HMBC são observadas correlações entre H-13, H-14 e NH-15 com C-3, indicando um grupo etilamina ligado a C-3. Correlações nos espectros COSY e HMBC indicaram a presença de um resíduo de ácido glutâmico na molécula, através da formação da ligação amida no nitrogênio NH-15 (**Figura 59**).

Figura 59. A. Correlações observadas nos espectros COSY e HMBC que confirmam a estrutura proposta para IP15. Estrutura química planar proposta para 33 com atribuições dos sinais de ^{13}C .

A configuração absoluta do resíduo de aminoácido determinada utilizando derivatização de *Marfey* revelou a presença de L-Glu (**Figura 60**).

Figura 60. Comparação dos cromatogramas extraídos a 340 nm para o padrão L-Glu derivatizado com reagente de *Marfey* (Linha azul) e o produto da hidrólise e derivatização de **IP15** (Linha preta). FDAA: Excedente do reagente de *Marfey* após reação. Condições cromatográficas: Condições cromatográficas: Coluna C₁₈ RP X-Terra (4,6 x 250 mm, 4,6 µm). Eluição modo gradiente MeOH:H₂O.

O composto **IP27** foi obtido como um sólido marrom. Sua fórmula molecular C₂₀H₂₆N₂O₄ foi estabelecida por espectrometria de massas de alta resolução com ionização por *electrospray* (HRMS-ESI⁺) obtendo-se o íon [M+H]⁺ em *m/z* 359,1968 (calculado para C₂₀H₂₇N₂O₄⁺ 359,1971, 1 ppm), indicando nove graus de insaturação (**Figura 61a**). Seu espectro no UV apresentou as bandas de absorção mais intensas em λ_{máx} 206, 224, 282, 291 nm (**Figura 61b**).

Figura 61. Espectros do composto **IP27**. A. Espectro de massas de alta resolução (ESI⁺). B. Espectro de absorções no UV (MeOH).

Dados de RMN de ^1H (Apêndice 94-96) e RMN de ^{13}C (Apêndice 97) de **IP27** (**Tabela 9**) mostraram ser quase idênticos aos de IP15, exceto que o metileno δ_{C} 27,1 (C-18), o metino δ_{C} 53,8 (C-19) e a carbonila δ_{C} 170,6 (C-20) de IP15 apresentaram valores de deslocamento químico maiores em **IP27**. Em **IP27** o grupo metileno mostrou-se em δ_{C} 30,1 (C-18), o metino em δ_{C} 69,3 (C-19) e a carbonila em δ_{C} 175,7 (C-20).

Considerando-se a diferença de massa molecular entre **IP15** e **IP27** de 1 u.m.a, e que C-19 em **IP27** apresentou deslocamento químico característico de carbono ligado a oxigênio, se propôs que no lugar do ácido glutâmico de **IP15** encontra-se o ácido 2-hidroxi-glutâmico, dando origem ao composto **IP27**. As correlações observadas nos espectros COSY (Apêndice 98-100) e HMBC (Apêndice 104-108) são apresentadas na **Figura 62**.

Figura 62. A. Correlações observadas nos espectros COSY e HMBC que confirmam a estrutura proposta para **IP27**. Estrutura química planar proposta para **IP27** com atribuições dos sinais de RMN de ^{13}C .

A configuração do carbono α (C-19) em **IP27** foi determinada comparando-se seu espectro com o espectro de dicroísmo circular de **IP15** (**Figura 63**), para o qual a configuração do aminoácido foi previamente atribuída por *Marfey*. Devido à similaridade dos espectros de dicroísmo circular, além de **IP27** apresentar o mesmo cromóforo de **IP15**, pode-se inferir a estereoquímica relativa de C_α em **IP27** como L.

Figura 63. Espectros de dicroísmo circular em metanol de: a) IP15 e b) IP27

Alcaloides indólicos são amplamente encontrados em plantas, bactérias, fungos e animais. Fungos, especialmente ascomycota, têm sido relatados como produtores prolíficos de alcaloides indólicos, muitos dos quais exibem potentes atividades biológicas (82).

A confluência entre as vias biossintéticas do alcaloide indólico e da prenilação ocorre comumente no metabolismo secundário dos fungos. As estruturas de ressonância, utilizando o par solitário em nitrogênio, mostram que a densidade eletrônica do carbânion pode ser ubicada em C2, C3, C4, C5, C6 ou C7. Embora, fora do sítio ativo da enzima, C3 seja quimicamente observado como o nucleófilo mais reativo. Os fungos exploraram esse potencial de reatividade desenvolvendo um conjunto de prenilttransferases que podem acoplar cátions prenila em cada um dos sete carbonos reativos do anel indólico (84).

Os alcaloides peptídicos isolados no presente trabalho exibem similaridade estrutural indicando que são provavelmente gerados por uma via de biossíntese comum a partir do precursor triptofano. Compostos com estruturas químicas similares aos isolados no presente trabalho, chamados de brocaeloides A-C (**67-69**, **Figura 64**), foram isolados a partir da fração metanólica do meio de cultivo do fungo *Penicillium brocae* (83).

A proposta de biossíntese proposta por Zang e colaboradores (83) é apresentada na **Figura 64**.

Figura 64. Rota biosintética proposta para os brocaeloides A-C (83).

No caso particular dos compostos isolados no presente trabalho, na rota de biossíntese proposta, em lugar de ocorrer uma acetilação na posição N-terminal da triptamina, uma reação de desidratação levaria a formação da ligação peptídica com ácido glutâmico. Na sequência de reações apresentada, os compostos **67-69** se apresentariam com intermediários da formação de **IP2**.

Diferentemente dos compostos **IP2**, **IP12**, **IP14N** e **IP15**, o composto **IP9** apresenta na sua estrutura uma prenilação reversa em C-3. Observa-se que o fungo produz as enzimas necessárias para realizar a prenilação reversa do triptofano tanto no C-2 como no C-3. Uma possível migração do grupo prenila de C-3 a C-2 pode acontecer, mas no final uma prenilação normal seria observada em C-2 (84).

Derivados do ácido glutâmico podem ter efeitos antagônicos sobre o câncer(85). Os alcaloides peptídicos isolados foram avaliados contra as células cancerosas MCF-7, MCF-10A, ACP01, HELA e A549. Infelizmente, nenhum dos compostos apresentou citotoxicidade nas concentrações testadas. Outros testes biológicos serão realizados.

2.4.1.1.2 Determinação estrutural dos peptídeos isolados do meio de cultivo do fungo *Penicillium* sp. IS1-A

Determinação estrutural de IP11, IP17, IP16 e IP20

O composto **IP11** foi obtido como um sólido branco amarelado. Sua fórmula molecular $C_{16}H_{22}N_2O_4$ foi estabelecida por espectrometria de massas de alta resolução com ionização por *electrospray* (HRMS-ESI⁺) observando-se o íon $[M+H]^+$ em m/z 307,1657 (calculado para $C_{16}H_{23}N_2O_4^+$ 307,1658, 0,3 ppm), indicando sete graus de insaturação (**Figura 65a**). Seu espectro no UV apresentou as bandas de absorção mais intensas em $\lambda_{\text{máx}}$ 213 e 272 nm (**Figura 65b**).

Figura 65. Espectros do composto IP11. A. Espectro de massas de alta resolução (ESI⁺). B. Espectro de absorções no UV (MeOH).

A análise dos espectros de RMN de ^1H de **IP11** (Apêndice 109-111) e HSQC (Apêndice 116-118), apresentam dois sinais com deslocamentos químicos em δ_{H} 0,78 e 1,75 atribuídos a hidrogênios de metilas; dois sinais em δ_{H} 2,73 e 2,93 atribuídos a hidrogênios metilênicos; três sinais em δ_{H} 1,99, 4,11 e 4,70 atribuídos a hidrogênios metínicos; três sinais em δ_{H} 7,18, 7,24 e 7,26 atribuídos a hidrogênios aromáticos; e dois sinais em δ_{H} 8,08 e 8,17 atribuídos a hidrogênios ligados a nitrogênios (**Tabela 10**).

Um total de 14 sinais foi observado no espectro de RMN de ^{13}C (Apêndice 112), incluindo três sinais em δ_{C} 18,0, 19,0 e 22,6 atribuídos a carbonos metílicos, um sinal em δ_{C} 38,6 atribuído a um metileno, três sinais em δ_{C} 30,2, 53,8 e 57,3, sendo os dois últimos carbonos sp^3 ligados a nitrogênio. Três sinais em δ_{C} 126,4, 128,1 e 129,4 atribuídos a carbonos metínicos aromáticos, assim como sinais correspondentes a carbonos quaternários em δ_{C} 169,1, 171,6 e 173,1 atribuídos a carbonila de duas amidas e um ácido carboxílico, respectivamente (**Tabela 10**).

Tabela 10. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (600 e 150 MHz, respectivamente, $\text{DMSO}-d_6$) de **IP11**.

IP11			
Posição	δ_{C}, ppm	Tipo de Carbono	δ_{H}, ppm (Mult., J/Hz, Integral)
<i>D-Val</i>			
1	173,1	C_{q}	
2	57,3	CH	4,11 (dd, 8,7, 5,8, 1H)
3	30,2	CH	1,99 (dsept, 7,5, 6,3, 1H)
4	19,2	CH_3	0,78 (d, 6,6, 3H)
5	18,0	CH_3	0,79 (d, 6,6, 3H)
NH-6	-	-	8,17 (d, 9,1, 1H)
<i>L-Phe</i>			
7	171,6	C_{q}	
8	169,1	C_{q}	
9	138,0	C_{q}	
10,11	129,4	CH	7,26 (m, 2H)
12,13	128,1	CH	7,24 (m, 1H)
14	126,4	CH	7,18 (m, 2H)
15	53,8	CH	4,70 (ddd, 9,5, 8,9, 5,3, 1H)
16	38,6	CH_2	2,93 (dd, 13,6, 5,3, 1H) 2,73 (dd, 13,6, 9,7, 1H)
17	22,6	CH_3	1,75 (s, 3H)
NH-18	-	-	8,08 (d, 8,8, 1H)

Os três sinais na região aromática do espectro de RMN de ^1H indicaram a presença de um anel benzênico monossustituído. Tal hipótese foi corroborada pela análise do espectro COSY (Apêndice 113-116). No espectro COSY são observadas as correlações entre H-15 e H-16 e entre H-15 e NH-18. No espectro HMBC (Apêndice 119-121) são observadas as correlações entre C-9 e os hidrogênios H-15 e H-16, bem como as correlações da carbonila C-7 com H-15 e H-16, o que indica a presença do aminoácido fenilalanina na molécula.

Correlações observadas no espectro COSY entre os hidrogênios metílicos H-4 e H-5 com H-3, entre H-3 com H-2, assim como entre H-2 de NH-6, complementadas com a correlação no HMBC entre C-1 e H-2, revelam a presença do aminoácido valina na molécula. A correlação entre NH-6 da valina e a carbonila C-7 da fenilalanina, demonstra a posição da formação da ligação peptídica entre estes dois aminoácidos.

Por fim, a correlação no HMBC entre a carbonila C-8 e H-17 e NH-18, confirmam a ligação, no nitrogênio da fenilalanina, de grupo acetamida. As correlações são apresentadas na **Figura 66**.

Figura 66. A. Correlações observadas nos espectros COSY e HMBC que confirmam a estrutura proposta para IP11. Estrutura química planar proposta para **IP11** com atribuições dos sinais de ^{13}C .

A configuração absoluta dos aminoácidos fenilalanina e valina, determinada utilizando-se a derivatização de *Marfey*, e confirmou a presença de L-Phe e D-Val (**Figura 67**).

Figura 67. Comparação dos cromatogramas extraídos a 340 nm para os padrões derivatizados L-Phe, L-Val, e o produto da hidrólise e derivatização de **IP11**. FDAA: Excedente do reagente de *Marfey* após reação. Condições cromatográficas: Coluna C₁₈ RP X-Terra (4,6 x 250 mm, 4,6 µm). Eluição modo gradiente MeOH:H₂O. A. Fenilalanina. B. Valina

A análise de **IP11** por dicroísmo circular (**Figura 68**) em MeOH apresentou efeito Cotton (EC) negativo na faixa 277–251 nm e EC positivo na faixa 350–428 nm. A análise por $[\alpha]_D^{24}$ apresentou desvio à esquerda do plano da luz polarizada (-120°).

Figura 68. Espectro de dicroísmo circular em metanol de **IP11**.

O composto **IP17** foi obtido como um sólido branco amarelado. Sua fórmula molecular $C_{28}H_{38}N_4O_6$ foi estabelecida por espectrometria de massas de alta resolução com ionização por *electrospray* (HRMS-ESI⁺) obtendo-se o íon $[M+H]^+$ em m/z 527,2879 (calculado para $C_{28}H_{39}N_4O_6^+$ 527,2870, 1,7 ppm), indicando 12 graus de insaturação (**Figura 69a**). Seu espectro no UV apresentou as bandas de absorção mais intensas em $\lambda_{\text{máx}}$ 206, 225 e 278 nm (**Figura 69b**).

Figura 69. Espectros do composto **IP17**. A. Espectro de massas de alta resolução (ESI⁺). B. Espectro de absorções no UV (MeOH).

Pela análise dos dados espectroscópicos de UV, massa exata e RMN bidimensionais possibilitaram a identificação de **IP17** como o tetrapeptídeo Phe-Val-Val-Tyr (Apêndice 122-133). A comparação dos valores de deslocamento químico obtidos no presente estudo e os relatados na literatura são comparados na **Tabela 11**.

Tabela 11. Comparação dos valores de deslocamento químico dos sinais observados no espectro de RMN de ^1H do tetrapeptídeo relatado na literatura [90] e o composto IP17 isolado no presente trabalho.

D-Phe-L-Val-D-Val-L-Tyr [90] DMSO-d_6			IP17, DMSO-d_6	
Posição	δ_c, ppm	δ_H, ppm (Mult., J/Hz)	δ_c, ppm	δ_H, ppm (Mult., J/Hz)
D-Phe				
1	169,9		168,5	
2	54,1	3,89 (br, t, 7,0)	53,4	4,20 (br, t, 7,3)
3	38,8	2,95 (dd, 13,4, 7,2) 2,79 (dd, 13,4, 7,4)	37,8	3,03 (dd, 13,8, 6,8) 2,93 (dd, 13,6, 4,7)
4	136,6		135,5	
5,9	129,5	7,21 – 7,27 (m)	129,7	7,31 (m)
6,8	128,5	7,24 – 7,29 (m)	128,6	7,30 (m)
7	126,8	7,19 – 7,23 (m)	127,2	7,25 (m)
Val-1				
1	171,3		170,8	
2	57,7	4,25 (t, 8,0)	57,1	4,50 (dd, 8,6, 5,4)
3	30,6	1,71-1,78 (m)	31,6	1,82 (m)
4	19,2	0,71 (d, 6,7)	19,2	0,67 (d, 6,9)
5	18,1	0,57 (d, 6,7)	17,5	0,65 (d, 6,9)
NH-6	-	8,25 (br, d, 8,0)	-	8,46 (d, 9,2)
Val-2				
1	170,7		170,5	
2	57,3	4,12 – 4,17 (m)	56,9	4,30 (m)
3	28,9	1,91 – 1,96 (m)	30,8	1,81 (m)
4	19,8	0,73 (d, 6,7)	19,5	0,64 (d, 6,5)
5	17,9	0,68 (d, 6,7)	17,5	0,65 (d, 6,9)
NH-6	-	8,31 (br, d, 8,3)	-	8,17 (d, 9,2)
L-Tyr				
1	173,5		173,5	
2	54,8	4,12-4,17 (m)	54,0	4,33 (m)
3	37,0	2,89 (dd, 13,6, 4,8) 2,69, (dd, 13,6, 8,4)	36,5	2,94 (dd, 13,2, 8,3) 2,68 (dd, 13,8, 9,9)
4	128,6		127,8	
5,9	130,2	6,94 (d, 8,3)	130,2	6,99 (d, 8,5)
6,8	114,9	6,59 (d, 8,3)	115,0	6,62 (d, 8,5)
7	155,8		156,1	
NH-8	-	7,58 (br, s)	-	8,25 (br, s)

Os valores de deslocamento químico apresentados para os hidrogênios NH-6 da valina e NH-8 e da tirosina de **IP17** são diferentes aos relatados na literatura para o tetrapeptídeo **D-Phe-L-Val-D-Val-L-Tyr**, como pode ser observado na **Tabela 11**. Isso pode indicar que **IP17** seja um estereoisômero ainda não relatado na literatura [90].

O produto hidrolisado de **IP17** será derivatizado com reagente de *Marfey* para determinar a estereoquímica absoluta dos aminoácidos. O tetrapeptídeo relatado na literatura apresentou atividade antifúngica comparável com a atividade do produto comercial *benomil* contra o fitopatógeno da soja *Fusarium virguliforme*. A ação antifúngica, dos peptídeos **IP11** e **IP17**, será avaliada contra três leveduras: *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Candida tropicalis*.

O composto **IP16** foi obtido como um sólido branco. Sua fórmula molecular $C_{29}H_{40}N_4O_6$ foi estabelecida por espectrometria de massas de alta resolução com ionização por *electrospray* (HRMS-ESI⁺) obtendo-se o íon $[M+H]^+$ em m/z 541,3026 (calculado para $C_{29}H_{42}N_4O_6^+$ 541,3026, 0,0 ppm), indicando 12 graus de insaturação (**Figura 70a**). Seu espectro no UV apresentou as bandas de absorção mais intensas em $\lambda_{máx}$ 224 e 275 nm (**Figura 70b**).

Figura 70. Espectros do composto **IP16**. A. Espectro de massas de alta resolução (ESI⁺). B. Espectro de absorções no UV (MeOH).

Os espectros de RMN de 1H (Apêndice 139) e RMN de ^{13}C (Apêndice 140) mostram que **IP16** é um peptídeo, ainda não relatado na literatura, com estrutura química similar à de **IP17**. Os espectros de RMN bidimensionais estão sendo analisados e proximamente sua estrutura será determinada.

O composto **IP20** foi obtido como um sólido branco amarelado. Sua fórmula molecular está sendo determinada a partir do íon $[M+H]^+$ em m/z 712,2880 (**Figura 71a**). Seu espectro no UV apresentou bandas de absorção em $\lambda_{\text{máx}}$ 208 nm (**Figura 71b**).

Figura 71. Espectros do composto **IP20**. A. Espectro de massas de alta resolução (ESI⁺). B. Espectro de absorções no UV (MeOH).

Os espectros de RMN mono e bidimensionais estão sendo analisados e proximamente sua estrutura será determinada.

2.4.1.1.3 Outros compostos isolados

O viridicatol (**65**, Apêndices 141-143), foi isolado em grandes quantidades (≈ 100 mg) a partir do extrato metanólico do meio de cultivo (5 L) de *P. sp.* Já o composto 2,3-dihidroxi-4-fenilquinolina (**66**, Apêndices 144-145) foi obtido a partir da fração aquosa. Esses dois compostos pertencem à família das viridicatinas, já reportadas com produzidas pelo fungo *P. sp.* (86).

O sideróforo ferricromo (**IP5**, Apêndices 144-149) também foi isolado a partir do extrato da fração aquosa. Sideróforos são moléculas pequenas ($PM < 1.500$ Da) que quelam Fe (II) com uma alta afinidade. Centenas de sideróforos microbianos já foram identificados, e podem ser classificados em três grupos com base no tipo de grupo funcional quelante de ferro: hidroxamatos, hidroxicarboxilatos ou catecolatos.

Todos os sideróforos fúngicos isolados até o momento foram hidroxamatos, com exceção do policarboxilato rizoferrina. Os sideróforos do tipo hidroxamato, que contêm resíduos de *N*⁵-acetil-*N*⁵-hidroxiornitina como os ligantes de Fe (II), podem ser ainda subdivididos em três classes estruturais: ferricromos, fusarininas e coprogênios. Ferricromo foi o primeiro sideróforo identificado isolado de *Ustilago sphaerogena*. Posteriormente, outros derivados foram identificados como ferricrocina, ferrichrysina, ferrirrodina, ferrirubina e ferricromo (87).

2.4.1.2 DADOS ESPECTROSCÓPICOS DOS COMPOSTOS INÉDITOS ISOLADOS

Composto **IP2**: Sólido amorfo verde neon. $[\alpha]_D^{23} = +377^\circ$ ($c = 2,3$; MeOH). UV (MeOH): 240 (21.683), 263 (7.106), 396 (5.222) nm. ECD [MeOH, λ ($\Delta\epsilon$), $c = 6,24 \times 10^{-3}$ M]: 240 (-94,5), 263 (-25,8), 396 (14,2). Dados espectroscópicos RMN de ¹H e ¹³C são apresentados na Tabela 5. HRMS (ESI⁺) em m/z 374,2091 [M+H]⁺ (calculado para C₂₀H₂₈N₃O₄⁺ 374,2080, 3 ppm).

Composto **IP9**: Sólido amorfo marrom verdoso. $[\alpha]_D^{23} = -45^\circ$ ($c = 2,6$; MeOH). UV (MeOH): 210 (18.748), 251 (5.084), 290 (1.020) nm. ECD [MeOH, λ ($\Delta\epsilon$), $c = 2,2 \times 10^{-2}$ M]: 258 (-5,87), 398 (1,71). Dados espectroscópicos RMN de ¹H e ¹³C são apresentados na Tabela 6. HRMS-ESI⁺ [M+H]⁺ em m/z 374,2091 (calculado para C₂₀H₂₈N₃O₄⁺ 374,2080, 3 ppm).

Composto **IP12**: Sólido amorfo branco amarelado. $[\alpha]_D^{23} = -11,5^\circ$ ($c = 2,6$; MeOH). UV (MeOH): 214 (34.403), 239 (35.537), 318 (10.182), 330 (8.884) nm. ECD [MeOH, λ ($\Delta\epsilon$), $c = 1.02 \times 10^{-2}$ M]: 398 (4,61) nm. Dados espectroscópicos RMN de ¹H e ¹³C são apresentados na Tabela 7. HRMS-ESI⁺ [M+H]⁺ em m/z 372,1922 (calculado para C₂₀H₂₆N₃O₄⁺ 372,1923, 0,3 ppm).

Composto **IP14N**: Sólido amorfo branco amarelado. $[\alpha]_D^{23} = -9^\circ$ ($c = 1,3$; MeOH). UV (MeOH): 233 (4.951), 261 (2.614), 328 (1.150) nm. Dados espectroscópicos RMN de ^1H e ^{13}C são apresentados na Tabela 8. HRMS-ESI $[\text{M}+\text{H}]^+$ em m/z 390,2010 (calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{N}_3\text{O}_5^+$ 390,2029, 5 ppm).

Composto **IP15**: Sólido amorfo branco amarelado. $[\alpha]_D^{23} = -8,1^\circ$ ($c = 4,6$; MeOH). UV (MeOH): 226 (1.625), 284 (486), 291 (445) nm. ECD [MeOH, λ ($\Delta\epsilon$), $c = 2,3 \times 10^{-2}$ M]: 398 (6,82) nm. Dados espectroscópicos RMN de ^1H e ^{13}C são apresentados na Tabela 9. HRMS-ESI $[\text{M}+\text{H}]^+$ em m/z 358,2139 (calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{N}_3\text{O}_3^+$ 358,2130, 5 ppm)

Composto **IP27**: Sólido amorfo branco amarelado. $[\alpha]_D^{23} = -55^\circ$ ($c = 0,4$; MeOH). UV (MeOH): 224 (18.752), 282 (13.969), 291 (12.188) nm. ECD [MeOH, λ ($\Delta\epsilon$), $c = 1,4 \times 10^{-3}$ M]: 398 (1,00) nm. Dados espectroscópicos RMN de ^1H e ^{13}C são apresentados na Tabela 9. HRMS-ESI $[\text{M}+\text{H}]^+$ em m/z 359,1968 (calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_4^+$ 359,1971, 1 ppm).

Composto **IP11**: Sólido amorfo branco amarelado. $[\alpha]_D^{23} = -120^\circ$ ($c = 1,33$; MeOH). UV (MeOH): 213 (11.092), 272 (719) nm. ECD [MeOH, λ ($\Delta\epsilon$), $c = 5,9 \times 10^{-3}$ M]: 238 (-29), 375 (4,36) nm. Dados espectroscópicos RMN de ^1H e ^{13}C são apresentados na Tabela 10. HRMS-ESI $[\text{M}+\text{H}]^+$ em m/z 307,1657 (calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_4^+$ 307,1658, 0,3 ppm).

Composto **IP17**: Sólido amorfo branco amarelado. $[\alpha]_D^{23} = 2,1^\circ$ ($c = 2,9$; EtOH). UV (EtOH): 206 (8.379), 225 (4.443), 278 (866) nm. Dados espectroscópicos RMN de ^1H e ^{13}C são apresentados na Tabela 11. HRMS-ESI $[\text{M}+\text{H}]^+$ em m/z 527,2879 (calculado para $\text{C}_{28}\text{H}_{39}\text{N}_4\text{O}_6^+$ 527,2870, 1,7 ppm).

2.4.2 ESTUDO DO METABOLISMO SECUNDÁRIO DO FUNGO *Thelebolus globosus* (E2)

O fungo *Thelebolus globosus* (E2) foi isolado dos tecidos de uma estrela de mar encontrada no continente Antártico. No melhor de nosso conhecimento, não existem relatos na literatura de metabólitos secundário do fungo *Thelebolus globosus*. Embora as frações obtidas a partir do meio de crescimento do fungo E2 não apresentarem atividade biológica nos testes realizados neste trabalho, o *screening* químico revelou que *Thelebolus globosus* E2 produz metabólitos secundários interessantes.

O fungo foi crescido em meio sólido de arroz e meio líquido PDB, com o intuito de observar diferenças qualitativas na composição química dos extratos. Em meio líquido E2 cresceu principalmente na forma de micélio. Enquanto que, quando foi crescido em arroz, esta linhagem cresceu em forma de esporos (**Figura 72**).

Quanto à massa de extrato obtido, o rendimento foi similar para os dois experimentos. No caso do experimento em meio líquido, 5,6 L renderam 1,0 g de extrato, enquanto que o fungo crescido em 80 g de arroz rendeu 0,85 g de extrato.

Figura 72. Fotografia do fungo E2 crescido em: A. meio líquido PDB e B. Arroz

Nos dois extratos foi possível observar a presença de três tipos de compostos: ciclopeninas, viridicatinas e estatinas. As duas primeiras classes de compostos foram produzidas principalmente pelo crescimento em meio sólido, e sua presença dificultou a visualização das estatinas nesse extrato. A ciclopenina (**70, APER40A**) e o ciclopenol (**71, APER40B**) foram isolados e identificados pelos seus respectivos espectros de massa de alta resolução e os espectros de RMN (Apêndice 150-155). A viridicatina (**72, APER40D**) e o viridicatol (**73, APER40E**) foram detectados e identificados por espectros no UV e espectros de massas (Apêndices 156-157).

Alcalóides quinolínicos são particularmente abundantes na natureza e foram isolados a partir de fontes vegetais, animais e microbianas. A formação de (72) por um rearranjo da ciclopenina (70) catalisada pela enzima “ciclopenase” foi demonstrada em *P. viridicatum* e *P. cyclopium* (88).

Foi previsto que as benzodiazepinedionas se originassem da condensação do antranilato e de um aminoácido. Além disso, experimentos de incorporação com precursores marcados isotopicamente demonstraram que a formação da ciclopenina envolvia a ativação do antranilato por uma adeniltransferase. Este tipo de reação é realizado por sintetases peptídicas não ribossomais (NRPSs) (84).

O extrato metanólico obtido do meio de cultivo líquido PDB forneceu uma série de compostos com um espectro no UV-visível característico de estatinas. Essa família de compostos são policetídeos que apresentam atividade como inibidores da enzima HMG-CoA redutase, que é responsável pela biossíntese do colesterol no fígado.

A mevastatina (74) foi encontrada como a estatina mais abundante nos dois extratos, AAE e APE, sendo isolados quase 100 mg deste composto na fração **APER80**. Sua identificação foi realizada pela análise de seu espectro de massas de alta resolução, assim como de seus espectros de RMN mono e bidimensionais (Apêndices 158-163).

A mevastatina, ou compactina, foi a primeira estatina natural isolada a partir de *P. citrinum* em 1971, e apresentou-se como um inibidor da HMG-CoA reductase, enzima que controla a velocidade da via do mevalonato mediante a qual são produzidos o colesterol

e outros isoprenóides. Os estudos pré-clínicos da mevastatina foram suspensos pelo fatos deste composto ter apresentado alta toxicidade (89).

Embora **74** seja um composto já conhecido produzido por fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Monascus* e *Pleurotus*, é a primeira vez que é relatado como produzida por um fungo do gênero *Thelebolus*.

Adicionalmente, a partir do extrato metanólico APE foram isoladas as estatinas **75-78**, já relatadas na literatura (Apêndices 164-171). Assim mesmo, foram detectadas ML-236C (**79**), ácido mevinolínico (**80**), (1S,2S,4aR,6S,8-S,8aS,3'S,5'R,2''S)-metil1,2,4a,5,6,7,8,8a-octahidro-3',5'-dihidroxi-2,6-dimetil-8-[(2-metil-1-oxobutil)oxi]-1-naftalenheptanoato (**81**) (Apêndices 172-174).

No extrato metanólico AAE foram detectadas mevastatina (**74**), dihidromonacolina L ácida (**76**), ML-236C (**79**), ácido mevinolínico (**80**), (1S,2S,4aR,6S,8-S,8aS,3'S,5'R,2''S)-metil1,2,4a,5,6,7,8,8a-octahidro-3',5'-dihidroxi-2,6-dimetil-8-[(2-metil-1-oxobutil)oxi]-1-naftalenheptanoato (**81**).

Tabela 12. Estatinas detectadas por HPLC-UV-MS e UPLC-HRMS nas frações do fungo E2 crescido em arroz.

UV-visível	ESTATINA
<p>24.117 Peak 1 236.6</p>	<p>ML-236C (79)</p> <p>$[M+H]^+$ m/z 291,1952 Erro = 1 ppm</p>
<p>24.933 Peak 3 235.4</p>	<p>Mevastatina (74)</p> <p>$[M+H]^+$ m/z 391,2477 Erro = 1 ppm</p>
<p>25.233 Peak 4 235.4</p>	<p>(81)</p> <p>$[M+Na]^+$ m/z 445,2556 Erro = 0 ppm</p>
<p>25.950 Peak 5 235.4</p> <p>274.4</p>	<p>Dihidromonacolina L ácida (76)</p> <p>$[M+Na]^+$ m/z 415,2451 Erro = 2,28 ppm</p>

As estatinas naturais que apresentam na sua estrutura um sistema bicíclico decalina são chamadas de tipo 1. Entre elas a mais conhecida é a lovastatina (**82**).

A lovastatina (**82**) foi o primeiro inibidor específico da HMG-CoA redutase a receber aprovação para o tratamento da hipercolesterolêmica. Na sua biossíntese participam duas enzimas PKS, LovB e LovF. LovB participa na formação do biciclo decalina, realizando a adição sequencial de oito unidades de malonil-CoA, e posteriormente uma ciclização [4+2]. A enzima LovF utiliza uma unidade acetil-CoA para levar à formação do grupo metilbutiril-CoA, que na última etapa do processo vai esterificar a monacolina J (produzida como intermediário na biossíntese) utilizando a enzima acetiltransferase LovD (84,89).

A biossíntese destes compostos ainda não está completamente compreendida, mas informações estruturais sobre as proteínas PKS fornecerão uma visão fascinante sobre como essas estruturas complexas são formadas e os mecanismos de controle que determinarão sua funcionalidade.

2.5 CONCLUSÃO

Na segunda etapa deste trabalho uma metodologia alternativa para a exploração de frações aquosas, visando a extração de metabólitos secundários inéditos de alta polaridade, foi implementada no estudo do metabolismo das linhagens fúngicas antárticas *Penicillium* sp. IS1-A (isolado de um isópode) e *Thelebolus globosus* E2 (isolado de uma estrela de mar). Nesta metodologia se utilizou a adição de uma mistura de resinas XAD 2-4-7 à fração aquosa. A extração ocorre sob agitação orbital. Após filtração os metabólitos adsorvidos na resina são dessorvidos da resina utilizando-se a mistura de solventes MeOH:acetona.

A metodologia mostrou ser bem-sucedida na extração de compostos hidrofílicos a partir da fração aquosa. Os compostos isolados mediante a metodologia implementada não foram detectados no extrato metanólico do fungo estudado.

A partir do extrato aquoso da linhagem fúngica *P. sp.* IS1-A foram isolados seis alcaloides peptídicos e dois peptídeos inéditos na literatura. A atividade citotóxica dos alcaloides peptídicos foi avaliada contra células cancerosas MCF-7, MCF-10A, ACP01, HELA e A549. Nenhum dos compostos apresentou atividade nas concentrações testadas. Os compostos serão testados em bioensaios antibacteriano e antifúngico buscando sua atividade biológica.

O fungo *Thelebolus globosus* E2 mostrou ser produtor de compostos benzodiazepínicos, viridicatinas e policetídeos. Dentre eles, compostos bem conhecidos como o ciclopenol, o viridicatol e a mevastatinas foram isolados a partir do extrato metanólico de E2. Até o melhor de nosso conhecimento, este é o primeiro relato sobre metabolismo secundário do fungo *Thelebolus globosus*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629–661, 2016.
- 2 PYE, C. R.; BERTIN, M. J.; LOKEY, R. S.; GERWICK, W. H.; LININGTON, R. G. Retrospective analysis of natural products provides insights for future discovery trends. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 22, p. 5601–5606, 2017.
- 3 ZAULI-NASCIMENTO, R.C.; MIGUEL, D.C.; YOKOYAMA-YASUNAKA, J.K.U.; PEREIRA, L. I.A.; PELLI DE OLIVEIRA, M.A.; RIBEIRO-DIAS, F.; DORTA, M.L.; ULIANA, S.R.B. In vitro sensitivity of *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* and *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* brazilian isolates to meglumine antimoniate and amphotericin B. **Tropical Medicine and International Health**, v. 15, n. 1, p. 68–76, 2010.
- 4 MIGUEL, L.; OWEN, D.M.; LIM, C.; LIEBIG, C.; EVANS, J.; MAGEE, A.I.; JURY, E.C. Primary human CD4+ T cells have diverse levels of membrane lipid order that correlate with their function. **The Journal of Immunology**, v. 186, n. 6, p. 3505–3516, 2011.
- 5 PELOSO, E.F.; DIAS, L.; QUEIROZ, R.M.L.; LEME, A. F.P.P.; PEREIRA, C.N.; CARNIELLI, C.M.; WERNECK, C.C.; SOUSA, M.V.; RICART, C.A.O.; GADELHA, F.R. *Trypanosoma cruzi* mitochondrial trypanredoxin peroxidase is located throughout the cell and its pull down provides one step towards the understanding of its mechanism of action. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1864, n. 1, p. 1–10, 2016.
- 6 SARKER, S.D.; NAHAR, L.; KUMARASAMY, Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. **Methods**, v. 42, n. 4, p. 321–324, 2007.
- 7 FEDAROVICH, A.; DJORDJEVIC, K.A.; SWANSON, S.M.; PETERSON, Y.K.; NICHOLAS, R. A.; DAVIES, C. High-Throughput screening for novel inhibitors of *Neisseria gonorrhoeae* penicillin-binding protein 2. **PLoS ONE**, v. 7, n. 9, e44918, 2012.
- 8 BODE, H. B. B.; BETHE, B.; HÖFS, R.; ZEECK, A. Big effects from small changes : possible ways to explore nature ' s chemical diversity. **ChemBioChem**, v. 3, n. 7, p. 619–627, 2002.
- 9 CHIANG, Y.-M.; LEE, K.-H.; SANCHEZ, J. F.; KELLER, N. P.; WANG, C. C. C. Unlocking fungal cryptic natural products. **Natural Product Communications**, v. 4, n. 11, p. 1505–1510, 2009.
- 10 BODE, H. B.; MÜLLER, R. The impact of bacterial genomics on natural product research. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 44, n. 42, p. 6828–6846, 2005.

- 11 SCHERLACH, K.; HERTWECK, C. Triggering cryptic natural product biosynthesis in microorganisms. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v. 7, n. 9, p. 1753–1760, 2009.
- 12 WILKINSON, B.; MICKLEFIELD, J. Mining and engineering natural-product biosynthetic pathways. **Nature Chemical Biology**, v. 3, n. 7, p. 379–386, 2007.
- 13 ZERIKLY, M.; CHALLIS, G. L. Strategies for the discovery of new natural products by genome mining. **ChemBioChem**, v. 10, n. 4, p. 625–633, 2009.
- 14 GALAGAN, J.E.; CALVO, S.E.; CUOMO, C.; MA, L. J.; WORTMAN, J.R.; BATZOGLOU, S.; LEE, S.I.; BAŞTÜRKMEN, M.; SPEVAK, C.C.; CLUTTERBUCK, J.; KAPITONOV, V.; JURKA, J.; SCAZZOCCHIO, C.; FARMAN, M.; BUTLER, J.; PURCELL, S.; HARRIS, S.; DRAHT, O.; BUSCH, S.; BOUCHIER, C.; GOLDMAN, G.H.; BELL-PEDERSEN, D.; GRIFFITHS-JONES, S.; DOONAN, J. H.; YU, J.; VIENKEN, K.; PAIN, A.; FREITAG, M.; SELKER, E.U.; ARCHER, D.B.; PEÑALVA, M.Á.; OAKLEY, B. R.; MOMANY, M.; TANAKA, T.; KUMAGAI, T.; ASAI, K.; MACHIDA, M.; NIERMAN, W.C.; DENNING, D.W.; CADDICK, M.; HYNES, M.; PAOLETTI, M.; FISCHER, R.; MILLER, B.; DYER, P.; SACHS, M.S.; OSMANI, S.A.; BIRREN, B.W. Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. **Nature**, v. 438, n. 7071, p. 1105–1115, 2005.
- 15 PEL, H.J.; DE WINDE, J.H.; ARCHER, D.B.; DYER, P.S.; HOFMANN, G.; SCHAAP, P.J.; TURNER, G.; DE VRIES, R.P.; ALBANG, R.; ALBERMANN, K.; ANDERSEN, M.R.; BENDTSEN, J.D.; BENEN, J.A E.; VAN DEN BERG, M.; BREESTRAAT, S.; CADDICK, M.X.; CONTRERAS, R.; CORNELL, M.; COUTINHO, P. M.; DANCHIN, E.G.J.; DEBETS, A.J.M.; DEKKER, P.; VAN DIJCK, P.W.M.; VAN DIJK, A.; DIJKHUIZEN, L.; DRIESSEN, A.J.M.; D'ENFERT, C.; GEYSSENS, S.; GOOSEN, C.; GROOT, G.S.P.; DE GROOT, P.W.J.; GUILLEMETTE, T.; HENRISSAT, B.; HERWEIJER, M.; VAN DEN HOMBERGH, J.P.T.W. VAN DEN HONDEL, C.A.M.J.J.; VAN DER HEIJDEN, R.T.J.M.; VAN DER KAAIJ, R. M.; KLIS, F.M.; KOOLS, H.J.; KUBICEK, C.P.; VAN KUYK, P.A.; LAUBER, J.; LU, X.; VAN DER MAAREL, M.J.E.C.; MEULENBERG, R.; MENKE, H.; MORTIMER, M.A.; NIELSEN, J.; OLIVER, S.G.; OLSTHOORN, M.; PAL, K.; VAN PEIJ, N.N.M.E.; RAM, A.F.J.; RINAS, U.; ROUBOS, J. A.; SAGT, C.M.J.; SCHMOLL, M.; SUN, J.; USSERY, D.; VERVECKEN, W.; VAN DE VONDERVOORT, P.J.J.; WEDLER, H.; ZENG, A.P.; VAN OUYEN, A.J.J.; VISSER, J.; STAM, H. Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. **Nature Biotechnology**, v. 25, n. 2, p. 221–231, 2007.
- 16 VAN DEN BERG, M.A.; ALBANG, R.; ALBERMANN, K.; BADGER, J.H.; DARAN, J.M.; M DRIESSEN, A.J.; GARCIA-ESTRADA, C.; FEDOROVA, N.D.; HARRIS, D.M.; HEIJNE, W.H.M.; JOARDAR, V.; W KIEL, J.A.K.; KOVALCHUK, A.; MARTÍN, J.F.; NIERMAN, W.C.; NIJLAND, J.G.; PRONK, J.T.; ROUBOS, J.A.; VAN DER KLEI, I.J.; VAN PEIJ, NOËL N.M.E.; VEENHUIS, M.; VON DÖHREN, H.; WAGNER, C.; WORTMAN, J.; BOVENBERG, R.A.L. Genome sequencing and analysis of the filamentous fungus *Penicillium chrysogenum*. **Nature Biotechnology**, v. 26, n. 10, p. 1161–1168, 2008.
- 17 LIM, F. Y.; SANCHEZ, J. F.; WANG, C. C. C.; KELLER, N. P. Toward awakening cryptic secondary metabolite gene clusters in filamentous fungi. **Methods in Enzymology**, v. 517, p. 303–324, 2012.

- 18 MEDEMA, M. H.; BLIN, K.; CIMERMANCIC, P.; DE JAGER, V.; ZAKRZEWSKI, P.; FISCHBACH, M. A.; WEBER, T.; TAKANO, E.; BREITLING, R. AntiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. 2, p. 339–346, 2011.
- 19 HERTWECK, C. Hidden biosynthetic treasures brought to light. **Nature Chemical Biology**, v. 5, n. 7, p. 450–452, 2009.
- 20 CHIANG, Y.M.; CHANG, S.L.; OAKLEY, B.R.; WANG, C.C.C. Recent advances in awakening silent biosynthetic gene clusters and linking orphan clusters to natural products in microorganisms. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 15, n. 1, p. 137–143, 2011.
- 21 FISCH, K.M.; GILLASPY, A.F.; GIPSON, M.; HENRIKSON, J.C.; HOOVER, A.R.; JACKSON, L.; NAJAR, F.Z.; WÄGELE, H.; CICHEWICZ, R.H. Chemical induction of silent biosynthetic pathway transcription in *Aspergillus niger*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 9, p. 1199–1213, 2009.
- 22 WILLIAMS, R.B.; HENRIKSON, J.C.; HOOVER, A.R.; LEE, A.E.; CICHEWICZ, R.H. Epigenetic remodeling of the fungal secondary metabolome. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v. 6, n. 11, p. 1895–1997, 2008.
- 23 ASAI, T.; YAMAMOTO, T.; OSHIMA, Y. Aromatic polyketide production in cordyceps indigotica, an entomopathogenic fungus, induced by exposure to a histone deacetylase inhibitor. **Organic Letters**, v. 14, n. 8, p. 2006–2009, 2012.
- 24 BEAU, J.; MAHID, N.; BURDA, W.N.; HARRINGTON, N.L.; SHAW, L.N.; MUTKA T, K.D.E.; BARISIC, B.; VAN OLPHEN, A.; BAKER, B.J. Epigenetic tailoring for the production of anti-infective cytosporones from the marine fungus *Leucostoma persoonii*. **Marine Drugs**, v. 10, n. 4, p. 762–774, 2012.
- 25 GRUNSTEIN, M. EBSCOhost: histone acetylation in chromatin structure and transcription. **Nature**, v. 389, p. 349–352, 1997.
- 26 HAMMET, A.; MAGILL, C.; HEIERHORST, J.; JACKSON, S.P. Rad9 BRCT domain interaction with phosphorylated H2AX regulates the G1 checkpoint in budding yeast. **EMBO Reports**, v. 8, n. 9, p. 851–857, 2007.
- 27 GENG, F.; TANSEY, W.P.; SOMMER, T. Polyubiquitylation of Histone H2B. **Molecular Biology of the Cell**, v. 19, n. 9, p. 3616–3624, 2008.
- 28 TROEJER, P.; BRANDTNER, E.M.; BROSCHE, G.; LOIDL, P.; GALEHR, J.; LINZMAIER, R.; HAAS, H.; MAIR, K.; TRIBUS, M.; GRAESSLE, S. Histone deacetylases in fungi: novel members, new facts. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 14, p. 3971–3981, 2003.
- 30 HASSAN, Y.I., ZEMPLINI, J. Epigenetic regulation of chromatin structure and gene function by biotin. **Recent Advances in Nutritional Sciences**, v. 136, n. 7, p. 1763–1765, 2006.

- 31 BIEL, M.; WASCHOLOWSKI, V.; GIANNIS, A. Epigenetics - an epicenter of gene regulation: histones and histone-modifying enzymes. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 44, n. 21, p. 3186–3216, 2005.
- 32 COLE, P. A. Chemical probes for histone-modifying enzymes. **Nature Chemical Biology**, v. 4, n. 10, p. 590–597, 2008.
- 33 CICHEWICZ, R. H. Epigenome manipulation as a pathway to new natural product scaffolds and their congeners. **Natural Product Reports**, v. 27, n. 1, p. 11–22, 2010.
- 34 HENRIKSON, J.C.; HOOVER, A.R.; JOYNER, P.M.; CICHEWICZ, R.H. A Chemical epigenetics approach for engineering the in situ biosynthesis of a cryptic natural product from *Aspergillus niger*. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v. 7, n. 3, p. 435–438, 2009.
- 35 MURI, E. M. F.; NIETO, M. J.; SINDELAR, R. D.; WILLIAMSON, J. S. Hydroxamic acids as pharmacological agents. **Current Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 17, p. 1631–53, 2002.
- 36 STEWARD, W. P. Marimastat (BB2516): current status of development. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 43, n. 1, p. 56–60, 1999.
- 37 BOTOS, I.; SCAPOZZA, L.; ZHANG, D.; LIOTRAT, L. A; MEYER, E. F. Batimastat, metalloproteinase binding. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 7, p. 2749–2754, 1996.
- 38 SANI, M.; BELOTTI, D.; GIAVAZZI, R.; PANZERI, W.; VOLONTERIO, A.; ZANDA, M. Synthesis and evaluation of stereopure α -trifluoromethyl-malic hydroxamates as inhibitors of matrix metalloproteinases. **Tetrahedron Letters**, v. 45, n. 8, p. 1611–1615, 2004.
- 39 TEGONI, M.; DALLAVALLE, F.; SANTOS, M. A. Succinylhydroxamic derivatives of α -amino acids as MMP inhibitors. Study of complex-formation equilibria with Cu^{2+} , Ni^{2+} and Zn^{2+} . **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 98, n. 2, p. 209–218, 2004.
- 40 INDIANI, C.; SANTONI, E.; BECUCCI, M.; BOFFI, A.; FUKUYAMA, K.; SMULEVICH, G. New insight into the peroxidase-hydroxamic acid interaction revealed by the combination of spectroscopic and crystallographic studies. **Biochemistry**, v. 42, n. 47, p. 14066–14074, 2003.
- 41 O'BRIEN, E. C.; FARKAS, E.; GIL, M. J.; FITZGERALD, D.; CASTINERAS, A.; NOLAN, K. B. Metal complexes of salicylhydroxamic acid (H_2Sha), anthranilic hydroxamic acid and benzohydroxamic acid. Crystal and molecular structure of $[\text{Cu}(\text{phen})_2(\text{Cl})]\text{Cl} \cdot \text{H}_2\text{Sha}$, a model for a peroxidase-inhibitor complex. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 79, n. 4, p. 47–51, 2000.
- 42 MARKS, P. A.; BRESLOW, R. Dimethyl sulfoxide to vorinostat: development of this histone deacetylase inhibitor as an anticancer drug. **Nature Biotechnology**, v. 25, n. 1, p. 84–90, 2007.

- 43 GUPTA, S. P. QSAR Studies on hydroxamic acids: a fascinating family of chemicals with a wide spectrum of activities. **Chemical Reviews**, v. 115, n. 13, p. 6427–6490, 2015.
- 44 STOWELL, J. C.; HUOT, R. I.; VAN VOAST, L. The synthesis of N-hydroxy-N'-phenyloctanediamide and its inhibitory effect on proliferation of axc rat prostate cancer cells. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 38, n. 8, p. 1411–1413, 1995.
- 45 MAI, A.; ESPOSITO, M.; SBARDELLA, G.; MASSA, S. A new facile and expeditious synthesis of N-hydroxy-N'-phenyloctanediamide, a potent inducer of terminal cytodifferentiation. **Organic Preparations and Procedures International**, v. 33, n. 4, p. 391–394, 2001.
- 46 SALMI-SMAIL, C.; FABRE, A.; DEQUIEDT, F.; RESTOUIN, A.; CASTELLANO, R.; GARBIT, S.; ROCHE, P.; MORELLI, X.; BRUNEL, J.M.; COLLETTE, Y. Modified cap group suberoylanilide hydroxamic acid histone deacetylase inhibitor derivatives reveal improved selective antileukemic activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, n. 8, p. 3038–3047, 2010.
- 47 GEDIYA, L. K.; CHOPRA, P.; PURUSHOTTAMACHAR, P.; MAHESHWARI, N.; NJAR, V. C. O. A new simple and high-yield synthesis of suberoylanilide hydroxamic acid and its inhibitory effect alone or in combination with retinoids on proliferation of human prostate cancer cells. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, n. 15, p. 5047–5051, 2005.
- 48 XIE, R.; SHI, J.; QU, Y.; TANG, P.; WU, X.; YANG, M.; YUAN, Q. Synthesis and anti-tumor activities of novel phenyl substituted suberoylanilide hydroxamic acid derivatives against human cancer cells. **Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 7, p. 636–648, 2015.
- 49 CHUN, P.; KIM, W. H.; KIM, J.; KANG, J. A.; LEE, H. J.; PARK, J. Y.; AHN, M. Y.; KIM, H. S.; MOON, H. R. Synthesis and importance of bulky aromatic cap of novel SAHA analogs for HDAC inhibition and anticancer activity. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 32, n. 6, p. 1891–1896, 2011.
- 50 SYKES, P. **A guidebook to mechanism in organic chemistry**. Cambridge: Pearson Education India, 1986, 214p.
- 51 RUISI, S.; BARRECA, D.; SELBMANN, L.; ZUCCONI, L.; ONOFRI, S. Fungi in Antarctica. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 6, n. 1, p. 127–141, 2007.
- 52 LI, Y.; SUN, B.; LIU, S.; JIANG, L.; LIU, X.; ZHANG, H.; CHE, Y. Bioactive asterric acid derivatives from the antarctic ascomycete fungus *Geomyces* sp. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 9, p. 1643–1646, 2008.
- 53 REN, J.; XUE, C.; TIAN, L.; XU, M.; CHEN, J.; DENG, Z.; PROKSCH, P.; LIN, W. Asperelines A - F , peptaibols from the marine-derived fungus *Trichoderma asperellum*. **Journal of Natural Products**, v. 72, n.6, p. 1036–1044, 2009.

- 54 REN, J.; YANG, Y.; LIU, D.; CHEN, W.; PROKSCH, P.; SHAO, B.; LIN, W. Sequential determination of new peptaibols asperelines G-Z12 produced by marine-derived fungus *Trichoderma asperellum* using ultrahigh pressure liquid chromatography combined with electrospray-ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1309, p. 90–95, 2013.
- 55 LI, L.; LI, D.; LUAN, Y.; GU, Q.; ZHU, T. Cytotoxic metabolites from the antarctic psychrophilic fungus *Oidiodendron truncatum*. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 5, p. 920–927, 2012.
- 56 DING, L.; FOTSO, S.; LI, F.; QIN, S.; LAATSCH, H. Hualyzin, a symmetrical urea derivative isolated from *Penicillium herquei* isolate GA4. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 6, p. 1068–1069, 2008.
- 57 YANG, S. W.; CHAN, T.M.; TERRACCIANO, J.; BOEHM, R.P.E.; CHEN, G.; LOEBENBERG, D.; PATEL, M.; GULLO, V.; PRAMANIK, B.; CHU, M. Caryophyllenes from a fungal culture of *Chrysosporium pilosum*. **Journal of Natural Products**, v. 72, n. 3, p. 484–487, 2009.
- 58 ZHAO, J.; FENG, J.; TAN, Z.; LIU, J.; ZHAO, J.; CHEN, R.; XIE, K.; ZHANG, D.; LI, Y.; YU, L.; CHEN, X.; DAI, J. Stachybotrysins A-G, phenylspirodrimane derivatives from the fungus *Stachybotrys chartarum*. **Journal of Natural Products**, v. 80, n. 6, p. 1819–1826, 2017.
- 59 PARISH, C.A.; CRUZ, M.; SMITH, S.K.; ZINK, D.; BAXTER, J.; TUCKER-SAMARAS, S.; COLLADO, J.; PLATAS, G.; BILLS, G.; DÍEZ, M.T.; VICENTE, F.; PELÁEZ, F.; WILSON, K. Antisense-guided isolation and structure elucidation of pannomycin, a substituted *cis*-decalin from *Geomyces pannorum*. **Journal of Natural Products**, v. 72, n. 1, p. 59–62, 2009.
- 60 LIU, J.; ZHANG, D.; ZHANG, M.; ZHAO, J.; CHEN, R.; WANG, N.; ZHANG, D.; DAI, J. Eremophilane sesquiterpenes from an endophytic fungus *Periconia* species. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 9, p. 2229–2235, 2016.
- 61 EL AOUAD, N.; PÉREZ-MORENO, G.; SÁNCHEZ, P.; CANTIZANI, J.; ORTIZ-LÓPEZ, F.J.; MARTÍN, J.; GONZÁLEZ-MENÉNDEZ, V.; RUIZ-PÉREZ, L.M.; GONZÁLEZ-PACANOWSKA, D.; VICENTE, F.; BILLS, G.; REYES, F. Lasionectrin, a naphthopyrone from a *Lasionectria* sp. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 6, p. 1228–1230, 2012.
- 62 DING, L.; DAHSE, H. M.; HERTWECK, C. Cytotoxic alkaloids from *Fusarium incarnatum* associated with the mangrove tree *Aegiceras corniculatum*. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 4, p. 617–621, 2012.
- 63 PÉREZ-VICTORIA, I.; MARTÍN, J.; GONZÁLEZ-MENÉNDEZ, V.; DE PEDRO, N.; EL AOUAD, N.; ORTIZ-LÓPEZ, F.J.; TORMO, J.R.; PLATAS, G.; VICENTE, F.; BILLS, G.F.; GENILLOU, O.; GOETZ, M.A.; REYES, F. Isolation and structural elucidation of cyclic tetrapeptides from *Onychocola sclerotica*. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 6, p. 1210–1214, 2012.

- 64 DE CASTRO, M. V. IÓCA, L.P.; WILLIAMS, D.E.; COSTA, B.Z.; MIZUNO, C.M.; SANTOS, M.F.C.; DE JESUS, K.; FERREIRA, E.L.F.; SELEGHIM, M.H.R.; SETTE, L.D.; PEREIRA FILHO, E.R.; FERREIRA, A.G.; GONÇALVES, N.S.; SANTOS, R.A.; ANDERSEN, R.J.; BERLINCK, R.G.S. Condensation of macrocyclic polyketides produced by *Penicillium* sp. DRF2 with mercaptopyruvate represents a new fungal detoxification pathway. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 6, p. 1668–1678, 2016.
- 65 WU, X.; LIN, S.; ZHU, C.; YUE, Z.; YU, Y.; ZHAO, F.; LIU, B.; DAI, J.; SHI, J. Homo- and Heptanor-sterols and tremulane sesquiterpenes from cultures of *Phellinus igniarius*. **Journal of Natural Products**, v. 73, n. 7, p. 1294–1300, 2010.
- 66 HERATH, K.; JAYASURIYA, H.; ZINK, D.L.; SIGMUND, J.; VICENTE, F.; DE LA CRUZ, M.; BASILIO, A.; BILLS, G.F.; POLISHOOK, J.D.; DONALD, R.; PHILLIPS, J.; GOETZ, M.; SINGH, S.B.; Isolation, structure elucidation, and antibacterial activity of methiosetin, a tetramic acid from a tropical sooty mold (*Capnodium* sp.). **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 3, p. 420–424, 2012.
- 67 NOUMEUR, S.R.; HELALY, S.E.; JANSEN, R.; GEREKE, M.; STRADAL, T. E. B.; HARZALLAH, D.; STADLER, M. Preussilides A-F, bicyclic polyketides from the endophytic fungus *Preussia similis* with antiproliferative activity. **Journal of Natural Products**, v. 80, n. 5, p. 1531–1540, 2017.
- 68 GAN, M.; LIU, Y.; BAI, Y.; GUAN, Y.; LI, L.; GAO, R.; HE, W.; YOU, X.; LI, Y.; YU, L.; XIAO, C. Polyketides with New Delhi metallo- β -lactamase 1 inhibitory activity from *Penicillium* sp. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 9, p. 1535–1540, 2013.
- 69 PÉREZ-BONILLA, M.; GONZÁLEZ-MENÉNDEZ, V.; PÉREZ-VICTORIA, I.; DE PEDRO, N.; MARTÍN, J.; MOLERO-MESA, J.; CASARES-PORCEL, M.; GONZÁLEZ-TEJERO, M.R.; VICENTE, F.; GENILLOU, O.; TORMO, J.R.; REYES, F. Hormonemate derivatives from *Dothiora* sp., an endophytic fungus. **Journal of Natural Products**, v. 80, n. 4, p. 845–853, 2017.
- 70 OTTO, A.; LAUB, A.; WENDT, L.; PORZEL, A.; SCHMIDT, J.; PALFNER, G.; BECERRA, J.; KRÜGER, D.; STADLER, M.; WESSJOHANN, L.; WESTERMANN, B.; ARNOLD, N. Chilenopeptins A and B, peptaibols from the chilean *Sepedonium* aff. *chalcipori* KSH 883. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 4, p. 929–938, 2016.
- 71 ORTÍZ-LÓPEZ, F.J.; MONTEIRO, M.C.; GONZÁLEZ-MENÉNDEZ, V.; TORMO, J.R.; GENILLOU, O.; BILLS, G.F.; VICENTE, F.; ZHANG, C.; ROEMER, T.; SINGH, S.B.; REYES, F. Cyclic colisporifungin and linear cavinafungins, antifungal lipopeptides isolated from *Colispora cavincola*. **Journal of Natural Products**, v. 78, n. 3, p. 468–475, 2015.
- 72 MALAK, L.G.; IBRAHIM, M.A.; BISHAY, D.W.; ABDEL-BAKY, A.M.; MOHARRAM, A.M.; TEKWANI, B.; CUTLER, S.J.; ROSS, S. A. Antileishmanial metabolites from *geosmithia langdonii*. **Journal of Natural Products**, v. 77, n. 9, p. 1987–1991, 2014.

- 73 MARTÍN, J.; CRESPO, G.; GONZÁLEZ-MENÉNDEZ, V.; PÉREZ-MORENO, G.; SÁNCHEZ-CARRASCO, P.; PÉREZ-VICTORIA, I.; RUIZ-PÉREZ, L.M.; GONZÁLEZ-PACANOWSKA, D.; VICENTE, F.; GENILLOU, O.; BILLS, G.F.; REYES, F. MDN-0104, an antiplasmodial betaine lipid from *heterospora chenopodii*. **Journal of Natural Products**, v. 77, n. 9, p. 2118–2123, 2014.
- 74 SINGH, S.B.; ONDEYKA, J.; HARRIS, G.; HERATH, K.; ZINK, D.; VICENTE, F.; BILLS, G.; COLLADO, J.; PLATAS, G.; GONZÁLEZ DEL VAL, A.; MARTIN, J.; REYES, F.; WANG, H.; KAHN, J.N.; GALUSKA, S.; GIACOBBE, R.; ABRUZZO, G.; ROEMER, T.; XU, D. Isolation, structure, and biological activity of phaeofungin, a cyclic lipodepsipeptide from a *Phaeosphaeria* sp. Using the genome-wide *Candida albicans* fitness test. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 3, p. 334–345, 2013.
- 75 VON BARGEN, K. W.; NIEHAUS, E. M.; BERGANDER, K.; BRUN, R.; TUDZYNSKI, B.; HUMPF, H. U. Structure elucidation and antimalarial activity of apicidin F: an apicidin-like compound produced by *Fusarium fujikuroi*. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 11, p. 2136–2140, 2013.
- 76 CHEN, Z.; SONG, Y.; CHEN, Y.; HUANG, H.; ZHANG, W.; JU, J. Cyclic heptapeptides, cordyheptapeptides C-E, from the marine-derived fungus *Acremonium persicinum* SCSIO 115 and their cytotoxic activities. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 6, p. 1215–1219, 2012.
- 77 SANDARGO, B.; THONGBAI, B.; STADLER, M.; SURUP, F. Cysteine-derived pleurotin congeners from the nematode-trapping basidiomycete *Hohenbuehelia grisea*. **Journal of Natural Products**, v. 81, n. 2, p. 286–291, 2018.
- 78 ALMEIDA, C.; PÉREZ-VICTORIA, I.; GONZÁLEZ-MENÉNDEZ, V.; DE PEDRO, N.; MARTÍN, J.; CRESPO, G.; MACKENZIE, T.; CAUTAIN, B.; REYES, F.; VICENTE, F.; GENILLOU, O. Non-geminal aliphatic dihalogenation pattern in dichlorinated diaporthins from *Hamigera fusca* NRRL 35721. **Journal of Natural Products**, v. 81, n. 6, p. 1488–1492, 2018.
- 79 BORGES, K.B.; FIGUEIREDO, E.C.; QUEIROZ, M.E.C. Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos. **Rio de Janeiro: Editora LTC**, 2015. 263 p.
- 80 LOPEZ-AVILA, V.; BAUER, K.; MILANES, J.; BECKERT, W. F. Evaluation of Soxtec extraction procedure for extracting organic compounds from soils and sediments. **Journal of AOAC International**, v. 76, n. 4, p. 864 - 880, 1993.
- 81 WELLS, M.J. Principles of extraction and the extraction of semivolatile organics from liquids. In: MITRA, S. (Ed.). **Sample preparation techniques in analytical chemistry**. New Jersey: Wiley-Blackwell, 2003, p. 37–138.
- 82 HANSON, J. R. **The chemistry of fungi**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2008. 221 p.

- 83 ZHANG, P.; MENG, L.H.; MÁNDI, A.; KURTÁN, T.; LI, X.M.; LIU, Y.; LI, X.; LI, C.S.; WANG, B.G. Brocaeloids A-C, 4-oxoquinoline and indole alkaloids with C-2 reversed prenylation from the mangrove-derived endophytic fungus *Penicillium brocae*. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2014, n. 19, p. 4029–4036, 2014.
- 84 WALSH, C.T.; TANG, Y. **Natural product biosynthesis**. Londres: The Royal Society of Chemistry, 2017. 765 p.
- 85 ALI, I.; WANI, W.A.; HAQUE, A.; SALEEM, K. Glutamic acid and its derivatives: candidates for rational design of anticancer drugs. **Future Medicinal Chemistry**, v. 5, n. 8, p. 961–978, 2013.
- 86 NIELSEN, K.F.; LARSEN, T.O.; FRISVAD, J.C. Lightweight expanded clay aggregates (LECA), a new up-scaleable matrix for production of microfungal metabolites. **The Journal of Antibiotics**, v. 57, n. 1, p. 29–36, 2004.
- 87 J JENS LAURIDS SØRENSEN , MICHAEL KNUDSEN, F. T. H.; CLAUS OLESEN , PATRICIA ROMANS FUERTES, T. V. L.; TEIS ESBEN SONDERGAARD, C. N. S. P.; DITLEV EGESKOV BRODERSEN, AND H. G. Fungal NRPS-dependent siderophores: from function to prediction. In: ZEILINGER, S.; MARTIN, J. F.; GARCÍA-ESTRADA, C. (Ed.). **Biosynthesis and molecular genetics of fungal secondary metabolites**. New York: Springer-Verlag New York, 2014. v. 2, p. 317–339.
- 88 ENDO, A. A historical perspective on the discovery of statins. **Proceedings of the Japan Academy, Series B**, v. 86, n. 5, p. 484–493, 2010.
- 89 CAMPBELL, C. D.; VEDERAS, J. C. Mini Review: biosynthesis of lovastatin and related metabolites formed by fungal iterative PKS enzymes. **Biopolymers**, v. 93, n. 9, p. 755–763, 2010.
- 90 BERTINETTI, B. V.; PEÑA, N. I.; CABRERA, G. M. An antifungal tetrapeptide from the culture of *Penicillium canescens*. **Chemistry and Biodiversity**, v. 6, n. 8, p. 1178–1184, 2009.

APÊNDICE

Apêndice 1. Espectro de massas de alta resolução (ESI⁺) do SAHA.

Apêndice 2. Espectro de infravermelho do SAHA (Filme em pastilha de sílica).

Apêndice 3. Espectro de RMN-¹H do 2F-SAHA em DMSO-*d*₆ (500 MHz).

Apêndice 4. RMN de ¹⁹F do 2F-SAHA em DMSO-*d*₆ (470 MHz).

Apêndice 5. Espectro de massas de alta resolução (ESI⁺) do 2F-SAHA.

Apêndice 6. Espectro de infravermelho do 2F-SAHA (Filme em pastilha de sílica).

Apêndice 7. Espectro de RMN-¹H do 4F-SAHA em DMSO-*d*₆ (500 MHz).

Apêndice 8. RMN de ¹⁹F do 4F-SAHA em DMSO-*d*₆ (470 MHz).

Apêndice 9. Espectro de infravermelho do 4F-SAHA (Filme em pastilha de sílica).

Apêndice 10. Espectro de RMN de ^1H do *p*Me-SAHA em $\text{DMSO}-d_6$ (400 MHz)

Apêndice 11. Espectro de massas de alta resolução (ESI⁺) do *p*Me-SAHA.

Apêndice 12. Espectro de infravermelho do *p*Me-SAHA (Filme em pastilha de sílica).

Apêndice 13. Espectro de RMN de ¹H do *p*OH-SAHA em DMSO-*d*₆ (500 MHz).

Apêndice 14. Espectro de massas de alta resolução (ESI⁺) do *p*-OH-SAHA.

Apêndice 15. Espectro de infravermelho do *p*-OH-SAHA (Filme em pastilha de sílica).

Apêndice 16. Espectro de RMN de ^1H do 2AM-SAHA em $\text{DMSO}-d_6$ (500 MHz).

Apêndice 17. Espectro de massas de alta resolução (ESI⁺) do 2AM-SAHA.

Apêndice 18. Espectro de RMN de ¹H (DMSO-*d*₆, 600 MHz) de IP2.

Apêndice 19. Expansão No 1 do espectro de RMN de ¹H (DMSO-*d*₆, 600 MHz) de IP2.

Apêndice 20. Expansão No 2 do espectro de RMN de ¹H (DMSO-*d*₆, 600 MHz) de IP2.

Apêndice 21. Expansão No 3 do espectro de RMN de ¹H (DMSO-*d*₆, 600 MHz) de IP2.

Apêndice 22. Espectro de RMN de ¹³C (DMSO-*d*₆, 150 MHz) de IP2.

Apêndice 23. Espectro COSY (DMSO- d_6 , 600 MHz) de IP2.

Apêndice 24. Espectro COSY (DMSO- d_6 , 600 MHz) de IP2 – Expansão 1.

Apêndice 25. Espectro COSY (DMSO-*d*₆, 600 MHz) de **IP2** – Expansão 2.

Apêndice 26. Espectro COSY (DMSO-*d*₆, 600 MHz) de **IP2** – Expansão 3.

Apêndice 27. Espectro HSQC de IP2.

Apêndice 28. Espectro HMBC de IP2.

Apêndice 29. Espectro HMBC de **IP2** – Expansão 1.

Apêndice 30. Espectro HMBC de **IP2** – Expansão 2.

Apêndice 31. Espectro HMBC de IP2 – Expansão 3.

Apêndice 32. Espectro de RMN de ^1H ($\text{DMSO-}d_6$, 600 MHz) de IP9.

Apêndice 33. Espectro de RMN de ^1H ($\text{DMSO}-d_6$, 600 MHz) de **IP9** - Expansão No 1.

Apêndice 34. Espectro de RMN de ^1H ($\text{DMSO}-d_6$, 600 MHz) de **IP9** - Expansão No 2.

Apêndice 35. Espectro de RMN de ^{13}C ($\text{DMSO-}d_6$, 150 MHz) de **IP9**.

Apêndice 36. Espectro COSY ($\text{DMSO-}d_6$, 600 MHz) de **IP9**.

Apêndice 37. Espectro COSY (DMSO-*d*₆, 600 MHz) de **IP9** – Expansão 1.

Apêndice 38. Espectro COSY (DMSO-*d*₆, 600 MHz) de **IP9** – Expansão 2.

Apêndice 39. Espectro HSQC de **IP9**.

Apêndice 40. Espectro HSQC de **IP9** – Expansão 1.

Apêndice 41. Espectro HSQC de IP9 – Expansão 2.

Apêndice 42. Espectro HMBC de IP9.

Apêndice 43. Espectro HMBC de **IP9** – Expansão 1.

Apêndice 44. Espectro HMBC de **IP9** – Expansão 2.

Apêndice 45. Espectro HMBC de **IP9** – Expansão 3.

Apêndice 46. Espectro HMBC de **IP9** – Expansão 4.

Apêndice 47. Espectro de RMN de ^1H ($\text{MeOH-}d_4$, 600 MHz) de **IP12**.

Apêndice 48. Espectro de RMN de ^1H ($\text{MeOH-}d_4$, 600 MHz) de **IP12** – Expansão 1.

Apêndice 49. Espectro de RMN de ¹H (MeOH-*d*₄, 600 MHz) de IP12 – Expansão 2.

Apêndice 50. Espectro de RMN de ¹³C (MeOH-*d*₄, 150 MHz) de IP12.

Apêndice 51. Espectro de RMN de ^{13}C ($\text{MeOH-}d_4$, 150 MHz) de **IP12** – Expansão 1.

Apêndice 52. Espectro COSY ($\text{MeOH-}d_4$, 600 MHz) de **IP12**.

Apêndice 53. Espectro COSY (MeOH- d_4 , 600 MHz) de **IP12** – Expansão 1.

Apêndice 54. Espectro HSQC de **IP12**.

Apêndice 55. Espectro HSQC de **IP12** – Expansão 1.

Apêndice 56. Espectro HSQC de **IP12** – Expansão 2.

Apêndice 57. Espectro HMBC de IP12.

Apêndice 58. Espectro HMBC de IP12 – Expansão 1.

Apêndice 59. Espectro HMBC de **IP12** – Expansão 2.

Apêndice 60. Espectro HMBC de **IP12** – Expansão 3.

Apêndice 61. Espectro de RMN de ¹H (MeOH-*d*₄, 600 MHz) de **IP14N**.

Apêndice 62. Espectro de RMN de ¹H (MeOH-*d*₄, 600 MHz) de **IP14N** – Expansão 1.

Apêndice 63. Espectro de RMN de ¹H (MeOH-*d*₄, 600 MHz) de IP14N – Expansão 2.

Apêndice 64. Espectro de RMN de ¹³C (MeOH-*d*₄, 150 MHz) de IP14N.

Apêndice 65. Espectro COSY (MeOH- d_4 , 600 MHz) de **IP14N**.

Apêndice 66. Espectro COSY (MeOH- d_4 , 600 MHz) de **IP14N** – Expansão 1.

Apêndice 67. Espectro COSY (MeOH- d_4 , 600 MHz) de **IP14N** – Expansão 2.

Apêndice 68. Espectro HSQC de **IP14N**.

Apêndice 69. Espectro HSQC de **IP14N** – Expansão 1.

Apêndice 70. Espectro HSQC de **IP14N** – Expansão 2.

Apêndice 71. Espectro HMBC de **IP14N**.

Apêndice 72. Espectro HMBC de **IP14N** – Expansão 1.

Apêndice 73. Espectro HMBC de IP14N – Expansão 2.

Apêndice 74. Espectro HMBC de IP14N – Expansão 3.

Apêndice 75. Espectro de RMN de ¹H (MeOH-*d*₄, 600 MHz) de IP14a.

Apêndice 76. Espectro de RMN de ¹³C (MeOH-*d*₄, 150 MHz) de IP14a.

Apêndice 77. Espectro COSY (MeOH- d_4 , 600 MHz) de **IP14a**.

Apêndice 78. Espectro HSQC de **IP14a**.

Apêndice 79. Espectro HMBC de IP14a.

Apêndice 80. Espectro de RMN de ^1H ($\text{DMSO}-d_6$, 600 MHz) de IP15.

Apêndice 81. Espectro de RMN de ¹H (DMSO-*d*₆, 600 MHz) de IP15 – Expansão 1.

Apêndice 82. Espectro de RMN de ¹H (DMSO-*d*₆, 600 MHz) de IP15 – Expansão 2.

Apêndice 83. Espectro de RMN de ^{13}C ($\text{DMSO-}d_6$, 150 MHz) de **IP15**.

Apêndice 84. Espectro COSY ($\text{DMSO-}d_6$, 600 MHz) de **IP15**.

Apêndice 85. Espectro COSY (DMSO-*d*₆, 600 MHz) de **IP15** – Expansão 1.

Apêndice 86. Espectro COSY (DMSO-*d*₆, 600 MHz) de **IP15** – Expansão 2.

Apêndice 87. Espectro HSQC de IP15.

Apêndice 88. Espectro HSQC de IP15 – Expansão 1.

Apêndice 89. Espectro HSQC de **IP15** – Expansão 2.

Apêndice 90. Espectro HMBC de **IP15**.

Apêndice 91. Espectro HMBC de **IP15** – Expansão 1.

Apêndice 92. Espectro HMBC de **IP15** – Expansão 2.

Apêndice 93. Espectro HMBC de **IP15** – Expansão 3.

Apêndice 94. Espectro de RMN de ^1H ($\text{DMSO-}d_6$, 600 MHz) de **IP27**.

Apêndice 95. Espectro de RMN de ^1H ($\text{DMSO}-d_6$, 600 MHz) de **IP27** – Expansão 1.

Apêndice 96. Espectro de RMN de ^1H ($\text{DMSO}-d_6$, 600 MHz) de **IP27** – Expansão 2.

Apêndice 97. Espectro de RMN de ^{13}C ($\text{DMSO}-d_6$, 600 MHz) de IP27.

Apêndice 98. Espectro COSY ($\text{DMSO}-d_6$, 600 MHz) de IP27.

Apêndice 99. Espectro COSY (DMSO-*d*₆, 600 MHz) de IP27 – Expansão 1.

Apêndice 100. Espectro COSY (DMSO-*d*₆, 600 MHz) de IP27 – Expansão 2.

Apêndice 101. Espectro HSQC de IP27.

Apêndice 102. Espectro HSQC de IP27 – Expansão 1.

Apêndice 103. Espectro HSQC de IP27 – Expansão 2.

Apêndice 104. Espectro HMBC de IP27.

Apêndice 105. Espectro HMBC de IP27 – Expansão 1.

Apêndice 106. Espectro HMBC de IP27 – Expansão 2.

Apêndice 107. Espectro HMBC de **IP27** – Expansão 3.

Apêndice 108. Espectro HMBC de **IP27** – Expansão 4.

Apêndice 109. Espectro de RMN de ^1H ($\text{DMSO}-d_6$, 600 MHz) de **IP11**.

Apêndice 110. Espectro de RMN de ^1H ($\text{DMSO}-d_6$, 600 MHz) de **IP11** – Expansão 1.

Apêndice 111. Espectro de RMN de ^1H ($\text{DMSO}-d_6$, 600 MHz) de **IP11** – Expansão 2.

Apêndice 112. Espectro de RMN de ^{13}C ($\text{DMSO}-d_6$, 600 MHz) de **IP11**.

Apêndice 113. Espectro COSY (DMSO-*d*₆, 600 MHz) de **IP11**.

Apêndice 114. Espectro COSY (DMSO-*d*₆, 600 MHz) de **IP11** – Expansão 1.

Apêndice 115. Espectro COSY (DMSO-*d*₆, 600 MHz) de **IP11** – Expansão 2.

Apêndice 116. Espectro HSQC de **IP11**.

Apêndice 117. Espectro HSQC de IP11 – Expansão 1.

Apêndice 118. Espectro HSQC de IP11 – Expansão 2.

Apêndice 119. Espectro HMBC de IP11.

Apêndice 120. Espectro HMBC de IP11 – Expansão 1.

Apêndice 121. Espectro HMBC de **IP11** – Expansão 2.

Apêndice 122. Espectro de RMN de ^1H ($\text{DMSO-}d_6$, 600 MHz) de **IP17**.

Apêndice 123. Espectro de RMN de ^1H ($\text{DMSO}-d_6$, 600 MHz) de **IP17** – Expansão 1.

Apêndice 124. Espectro de RMN de ^1H ($\text{DMSO}-d_6$, 600 MHz) de **IP17** – Expansão 2.

Apêndice 125. Espectro de RMN de ^{13}C ($\text{DMSO}-d_6$, 150 MHz) de **IP17**.

Apêndice 126. Espectro de RMN de ^{13}C ($\text{DMSO}-d_6$, 150 MHz) de **IP17** – Expansão 1.

Apêndice 127. Espectro de RMN de ^{13}C ($\text{DMSO-}d_6$, 150 MHz) de **IP17** – Expansão 2.

Apêndice 128. Espectro COSY ($\text{DMSO-}d_6$, 600 MHz) de **IP17**.

Apêndice 129. Espectro COSY (DMSO- d_6 , 600 MHz) de **IP17** – Expansão 1.

Apêndice 130. Espectro COSY (DMSO- d_6 , 600 MHz) de **IP17** – Expansão 2.

Apêndice 131. Espectro HSQC de IP17.

Apêndice 132. Espectro HSQC de IP17 – Expansão 1.

Apêndice 133. Espectro HSQC de IP17 – Expansão 2.

Apêndice 134. Espectro HMBC de IP17.

Apêndice 135. Espectro HMBC de **IP17** – Expansão 1.

Apêndice 136. Espectro HMBC de **IP17** – Expansão 2.

Apêndice 137. Espectro HMBC de **IP17** – Expansão 3.

Apêndice 138. Espectro HMBC de **IP17** – Expansão 4.

Apêndice 139. Espectro de massas de alta resolução $[M+H]^+$ do viridicatol.

Apêndice 140. Espectro de RMN de ^1H do viridicatol ($\text{DMSO}-d_6$, 600 MHz).

Apêndice 141. Espectro de RMN de ^{13}C do viridicatol ($\text{DMSO}-d_6$, 150 MHz).

Apêndice 142. Espectro de RMN de ^1H da viridicatina ($\text{DMSO}-d_6$, 600 MHz).

Apêndice 143. Espectro de RMN de ^{13}C da viridicatina ($\text{DMSO}-d_6$, 150 MHz).

Apêndice 144. Espectro de massas de alta resolução $[\text{M}+\text{H}]^+$ do ferricromo: A. Em presença de Ferro. B. Após remoção do ferro.

Apêndice 145. Espectro de RMN de ^1H do ferricromo ($\text{DMSO-}d_6$, 600 MHz).

Apêndice 146. Espectro de RMN de ^{13}C do ferricromo ($\text{DMSO-}d_6$, 150 MHz).

Apêndice 147. Espectro COSY (DMSO-*d*₆, 600 MHz) do ferricromo.

Apêndice 148. Espectro HSQC do ferricromo.

Apêndice 149. Espectro HSQC do ferricromo.

Apêndice 150. Espectro de massas de alta resolução $[M+H]^+$ da ciclopenina.

Apêndice 151. Espectro de RMN de ¹H da ciclopenina (DMSO-*d*₆, 400 MHz).

Apêndice 152. Espectro de RMN de ¹³C da ciclopenina (DMSO-*d*₆, 100 MHz).

Apêndice 153. Espectro de massas de alta resolução $[M+H]^+$ do ciclopentol.

Apêndice 154. Espectro de RMN de 1H do ciclopentol ($DMSO-d_6$, 400 MHz).

Apêndice 155. Espectro de RMN de ^{13}C do ciclopentol ($\text{DMSO}-d_6$, 100 MHz).

Apêndice 156. Espectros do Viridicatol. A. Espectro de massas HRMS-ESI⁺. B. Espectro no UV.

Apêndice 157. Espectros do Viridicatin. A. Espectro de massas HRSM-ESI⁺. B. Espectro no UV.

Apêndice 158. Espectro de massas HRSM-ESI⁺ da mevastatin.

Apêndice 159. Espectro de RMN de ¹H da mevastatina (DMSO-*d*₆, 600 MHz).

Apêndice 160. Espectro de RMN de ¹³C da mevastatina (DMSO-*d*₆, 150 MHz).

Apêndice 161. Espectro COSY (DMSO- d_6 , 600 MHz) da mevastatina.

Apêndice 162. Espectro HSQC da mevastatina.

Apêndice 163. Espectro HMBC da mevastatina.

Apêndice 164. Espectro de massas HRSM-ESI⁺ da dehidromevastatina. [M+Na]⁺ em m/z 415.

Apêndice 165. Espectro de RMN de ^1H da dehidromevastatina ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz)

Apêndice 166. Espectro de massas HRSM-ESI $^+$ da dihidromonacolina L ácida. $[\text{M}+\text{H}]^+$ em m/z 325,1512.

Apêndice 167. Espectro de RMN de ^1H da dihidromonacolina L ácida ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz)

Apêndice 168. Espectro de massas HRSM-ESI $^+$ da monacolina J ácida. $[\text{M}+\text{Na}]^+$ em m/z 361,2007.

Apêndice 169. Espectro de RMN de ^1H da monacolina J ácida ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz).

Apêndice 170. Espectro de massas HRSM-ESI $^+$ de (78). $[\text{M}+\text{Na}]^+$ em m/z 415,2428.

Apêndice 171. Espectro de RMN de ¹H de (78) (DMSO-*d*₆, 400 MHz).

Apêndice 172. Espectro de massas HRSM-ESI⁺ de (79). [M+Na]⁺ em *m/z* 291,1956.

Apêndice 173. Espectro de massas HRSM-ESI⁺ da monacolina J ácida (**80**). [M+Na]⁺ em m/z 445,2566.

Apêndice 174. Espectro de massas HRSM-ESI⁺ da monacolina J ácida (**81**). [M+Na]⁺ em m/z 459,2701.