**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS**

Marcos Venícius de Castro

Exemplar revisado

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

Utilização de planejamento experimental para otimizar a
produção de metabólitos secundários produzidos por
Penicillium sp., isolado do ambiente marinho

Tese apresentada ao Instituto de Química de São
Carlos da Universidade de São Paulo como parte
dos requisitos para a obtenção de título de doutor em
Ciências.

Área de Concentração: Química Orgânica e Biológica

Orientação: Prof. Dr. Roberto G. S. Berlinck

São Carlos – SP
2015

Dedicatória

À Deus que me deu força e coragem para enfrentar os obstáculos.

Aos Meus Pais

Maria e Luiz pelo apoio e força principalmente nos momentos mais difíceis. Graças a vocês eu consegui chegar até aqui.

Obrigado

Aos meus irmãos sempre pacientes amorosos e disponíveis.

Ao meu companheiro Marcelo pelo apoio, amor e carinho durante todos estes anos.

“...para mim, é impossível existir sem sonho.”

“Ninguém caminha sem aprender a caminhar, sem aprender a fazer o caminho caminhando, refazendo e retocando o sonho pelo qual se pôs a caminhar.”

“A vida na sua totalidade me ensinou, como grande lição, que é impossível assumi-la sem riscos.”

Paulo Freire

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Roberto G. S. Berlinck pela orientação.

Ao Centro de Biologia Marinha (CEBIMAR) pelo apoio logístico durante a coleta da esponja.

À Prof. Dra. Mirna H. R. Selegim, por disponibilizar os laboratórios de microbiologia do Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva – UFSCar e à Darci Javarotti pelo apoio técnico.

Aos Professores Drs. Álvaro José dos Santos Neto e Daniel Rodrigues Cardoso pelos espectros de massas de alta resolução e ao técnico Guilherme Miola pelo apoio na realização das análises.

Ao Prof. Dr. Edenir Rodrigues Pereira Filho pelo acompanhamento no trabalho e ajuda com as análises estatísticas.

Ao Prof. Dr. Antonio Gilberto Ferreira e Luciana Vizotto pelas análises de RMN-¹H e RMN-¹³C.

Aos Técnicos do CAQ Sylvana Cardoso Miguel Agostinho e André Luiz Tognon pelos espectros de RMN-¹H e RMN-¹³C.

À Profa. Dra. Raquel Santos, UNIFRAN, pelos testes de citotoxicidade.

Aos meus amigos e colegas de laboratório pela amizade, colaboração, conselhos e esclarecimento de dúvidas.

Às técnicas do laboratório Fabiana T. Rodrigues e Karin F. Bandeira de Camargo pelo apoio, esclarecimento de dúvidas e ajuda na operação dos equipamentos.

À CAPES e a FAPESP pelo auxílio financeiro.

RESUMO

CASTRO, M. V. Utilização de planejamento experimental para aumentar a produção de metabólitos secundários produzidos por *Penicillium* sp., isolado do ambiente marinho. 2015. 168 f. Exame de qualificação (Doutorado) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

Fungos produzem muitas substâncias bioativas em baixas quantidades. A utilização de técnicas de planejamento experimental e de análise multivariada podem otimizar as condições de cultivo. No presente estudo, foi desenvolvida uma abordagem para incrementar a produção de compostos macrocíclicos relacionados às curvularinas, produzidos pela linhagem *Penicillium* sp. em baixas concentrações. A linhagem de *Penicillium* sp. foi crescida sob um conjunto de diferentes condições, determinadas por combinações das variáveis, tempo de crescimento, temperatura, concentração de nutrientes, agitação e concentração de sais. Depois do crescimento, a filtração e extração em fase sólida dos meios de cultura de cada experimento de crescimento forneceram 4 frações que foram submetidas a análises químicas por CLAE-UV-EM. As respostas obtidas (massa das frações, área e número de picos cromatográficos) foram tratados por meio de uma metodologia multicritério, a função de desejabilidade. Utilizando os valores de desejabilidade global, calcularam-se os efeitos principais e de interação das variáveis sobre a produção de metabólitos secundários. Foram estabelecidas duas condições ótimas para a produção de compostos relacionados às curvularinas as quais requerem: baixas concentrações salinas, longo tempo de incubação, sem agitação, alta concentração de nutrientes, mas diferentes temperaturas. Uma das condições produziu quantidades elevadas de citrinina, enquanto a outra permitiu o isolamento de 1 nova curvularina e 5 novos compostos relacionados às curvularinas, mas contendo um anel tetrahidrotiofeno fundido à lactona. As alterações químicas no perfil químico produzido em meio de cultura por *Penicillium* sp., usando apenas diferentes temperaturas de incubação ilustra a viabilidade da utilização do planejamento experimental, com o objetivo de maximizar a produção, quer de um metabolito único ou uma diversidade de substâncias, produzidas por uma linhagem microbiana.

Palavras Chave: Micro-organismos, Metabolismo secundário. Planejamento Experimental. *Penicillium*.

ABSTRACT

CASTRO, M. V. Application of experimental design to improve the production of secondary metabolites produced by marine-derived *Penicillium* sp. 2015. 159 f. Thesis (Ph. D.) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

Fungi produce many useful metabolites. Application of experimental design techniques and chemometric analysis are able to optimize the fungi culture conditions. In the present investigation, it was developed a refined procedure to improve the production of macrocyclic compounds curvularin-like, produced in low concentrations by *Penicillium* sp. lineage. The *Penicillium* sp. lineage was cultivated under different conditions, determined by a combination of selected variables: time of growth, temperature, total concentration of nutrients, growth under shaking or still mode and total concentration of inorganic salt. After growth, filtration and solid phase extraction of the culture media of each growth experiment provided four fractions that were analyzed by HPLC/UV/MS. The outputs (mass fractions, total area under chromatogram, and number of chromatographic peaks) were treated by a multicriteria approach, the desirability function. Using the global desirability values, we calculated the main and interaction effects of the variables on the production of secondary metabolites. Two optimal conditions were established for the production of compounds curvularin-like: low concentration of inorganic salt, long incubation time on still mode, high concentration of nutrients but different temperatures. One of the conditions produced high amounts of citrinin, while the other allowed the isolation of one new curvularin and five novel related compounds containing a tetrahydrothiophene ring fused to the lactone. Chemical changes in chemical profile produced in the culture media by *Penicillium* sp. using just different incubation temperatures shows the feasibility of using the experimental design in order to improve the production of either a single metabolite or a diversity of compounds produced by a microbial lineage.

Key words: Microorganisms, Secondary metabolism, Experimental design, *Penicillium*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema da incorporação de unidades de acetato na biossíntese de 10,11-dehidrocurvularina-	8
Figura 2 – Esquema de biossíntese da 10,11-dehidrocurvularina.....	9
Figura 3 - Gráficos de superfície de resposta ilustrando as condições ótimas para produção de poligalacturonase.....	12
Figura 4 - Distribuição de Produtos Naturais Marinhos por Filo no período de 1965 a 2007.....	21
Figura 5 - Distribuição de Produtos Naturais Marinhos por Filo no período de 2008 a 2010.....	21
Figura 6 - Fluxograma de extração em fase sólida do meio de cultura líquido (caldo filtrado) obtido a partir do crescimento do fungo <i>Penicillium</i> sp. e pré-purificação das frações (E11)23 e (E17)23.....	34
Figura 7 - Fluxograma de pré-purificação das frações (E11)23 e (E17)23.....	35
Figura 8 – Fluxograma de fracionamento da fração (11+17)23D em coluna Sephadex LH-20.....	36
Figura 9 - Cromatograma de análise da Fração 2, da EFS, obtida do meio de cultura do fungo <i>Penicillium</i> sp. crescido com os parâmetros do experimento 7 (tabela 2 pag. 31) em pequena quantidade conforme parte experimental pag. 32 e 33. Utilizando-se coluna e condições cromatográficas conforme parte experimental (página 29 e tabela 1)	42
Figura 10 - Cromatogramas de análise da fração 2 da EFS, obtida do meio de cultura do fungo <i>Penicillium</i> sp. crescido conforme os parâmetros do experimento 11 (tabela 2 pag. 31) em pequena quantidade conforme parte experimental pag. 32 e 33. Utilizando-se coluna e condições cromatográficas conforme parte experimental (página 29 e tabela 1)	44
Figura 11 - Cromatogramas de análise da fração 2 da EFS, obtida do meio de cultura do fungo <i>Penicillium</i> sp. crescido com os parâmetros do experimento 17 (tabela 2 pag. 31) em pequena quantidade conforme parte experimental pag. 32 e 33. Utilizando-se coluna e condições cromatográficas conforme parte experimental (página 29 e tabela 1)	44
Figura 12 - Cromatograma de análise da Fração 3, da EFS, obtida do meio de cultura do fungo <i>Penicillium</i> sp. crescido com os parâmetros do experimento 11 (tabela 2 pag. 31) em pequena quantidade conforme parte experimental pag. 32 e 33. Utilizando-se coluna e condições cromatográficas conforme parte experimental (página 29 e tabela 1)	45
Figura 13 - Cromatograma de análise da Fração 3, da EFS, obtida do meio de cultura do fungo <i>Penicillium</i> sp. crescido com os parâmetros do experimento 17 (tabela 2 pag. 31) em pequena quantidade conforme parte experimental pag. 32 e 33. Utilizando-se coluna e condições cromatográficas conforme parte experimental (página 29 e tabela 1)	45

Figura 14 – Fluxograma do fracionamento das frações (E11)23 e (E17)23 por cromatografia de permeação em gel (Sephadex LH-20).	47
Figura 15 - Fluxograma do fracionamento da fração (11+17)23-D por cromatografia de permeação em gel (Sephadex LH-20).	48
Figura 16 - Fluxograma das frações obtidas da separação cromatográfica CLAE-UV da fração (E11)23-D2 em coluna semipreparativa de fase reversa C ₁₈ ODS-2. .	49
Figura 17 - Fluxograma das frações obtidas da separação cromatográfica CLAE-UV da fração (E11)23-D2B em coluna analítica de fase reversa C ₁₈ ODS-3.	50
Figura 18 – Fluxograma das frações obtidas da separação cromatográfica CLAE-UV da fração (E11)23-D2C em coluna analítica de fase reversa C ₁₈ X-Terra de 250 mm de comprimento.	51
Figura 19 – Fluxograma das frações obtidas da separação cromatográfica CLAE-UV da fração (E11)23-D2D em coluna analítica de fase reversa C ₁₈ X-terra.	51
Figura 20 – Fluxograma das frações obtidas da separação cromatográfica CLAE-UV da fração (E11)23-D3 em coluna semipreparativa de fase reversa C ₁₈ ODS-2. .	52
Figura 21 – Fluxograma das frações obtidas da separação cromatográfica CLAE-UV da fração (E11)23-D3I em coluna analítica de fase reversa C ₁₈ X-terra.	53
Figura 22 – Fluxograma das frações obtidas da separação cromatográfica CLAE-UV da fração (E11)23-D3J em coluna preparativa de fase reversa C ₈ C8-4.	54
Figura 23 – Fluxograma das frações obtidas da separação cromatográfica CLAE-UV da fração (11+17)23-D4 em coluna semi-preparativa de fase reversa C ₁₈ ODS2.	55
Figura 24 – Fluxograma das frações obtidas da separação cromatográfica CLAE-UV da fração (E11)23-E em coluna preparativa de fase reversa C ₈ C8-4.	55
Figura 25 – Fluxograma das frações obtidas da separação cromatográfica CLAE-UV da fração (E11)23-E2 em coluna preparativa de fase reversa C ₈ C8-4.	56
Figura 26 - Fluxograma das frações obtidas da separação cromatográfica CLAE-UV da fração (E11)23-E2 em coluna preparativa de fase reversa C ₈ C8-4.	57
Figura 27 – Fluxograma das frações obtidas da separação cromatográfica CLAE-UV da fração (E11)23-E5 em coluna preparativa de fase reversa C ₈ C8-4.	58
Figura 28 - Espectro de massas de alta resolução em modo eletrospray positivo da fração (E17)23-E2F6A.	59
Figura 29 - Semi estrutura I do composto (11+17)23-E2F6A (flechas azuis indicam correlações ¹ H- ¹ H observadas no espectro COSY; flechas vermelhas indicam correlações à longa distância ¹ H- ¹³ C observadas no espectro HMBC).	60
Figura 30 - Semiestrutura II do composto (11+17)23-E2F6A (flechas vermelhas indicam correlações à longa distância ¹ H- ¹³ C observadas no espectro HMBC). .	61
Figura 31 - Semi estrutura com anel aromático IV do composto (11+17)23-E2F6A (flechas vermelhas indicam correlações à longa distância ¹ H- ¹³ C observadas no espectro HMBC).	62
Figura 32 - Semi estrutura V do composto isolado na fração (11+17)23-E2F6A.	63
Figura 33 - Estrutura planar do composto 64 (10,11-epoxicurvularina) isolado na fração (11+17)23-E2F6A.	63

Figura 34 - Espectro ^1H NOEDiff (400 MHz, $\text{MeOH-}d_4$) da 10,11-epoxicurvularina (64). Irradiação sobre H-10 (δ 3.83) demonstrou um NOE sobre H-11 em δ 3.13	64
Figura 35 - Espectro de massas de alta resolução em modo eletrospray positivo da fração (E17)23-D2D4.....	66
Figura 36 - Subestruturas do composto isolado na fração (11+17)23-D2D4 (flechas azuis indicam correlações $^1\text{H-}^1\text{H}$ observadas no espectro COSY).	67
Figura 37 - Semi estrutura I e II do composto isolado na fração (11+17)23-D2D4 (flechas azuis indicam correlações $^1\text{H-}^1\text{H}$ observadas no espectro COSY; flechas vermelhas indicam correlações à longa distância $^1\text{H-}^{13}\text{C}$ observadas no espectro HMBC).	68
Figura 38 - Semi estrutura III do composto isolado na fração (11+17)23-D2D4 (flechas azuis indicam correlações $^1\text{H-}^1\text{H}$ observadas no espectro COSY; flechas vermelhas indicam correlações à longa distância $^1\text{H-}^{13}\text{C}$ observadas no espectro HMBC).	69
Figura 39 - Semi estrutura IV do composto isolado na fração (11+17)23-D2D4 (flechas vermelhas indicam correlações à longa distância $^1\text{H-}^{13}\text{C}$ observadas no espectro HMBC).	70
Figura 40 - Estrutura do composto 66 (ciclotiocurvularina A) isolado na fração (11+17)23-D2D4	71
Figura 41 - Estereoquímica relativa do composto ciclotiocurvularina A (flechas pretas indicam correlações NOE observadas nos espectros NOEDiff e NOESY).....	72
Figura 42 - Espectro de RMN ^1H da fração (E17)23-D3J7B em $\text{MeOH-}d_4$ (400 MHz)	73
Figura 43 - Espectro de RMN ^{13}C da fração (E17)23-D3J7B em $\text{MeOH-}d_4$ (100 MHz)	74
Figura 44 - Espectro de massas modo eletrospray positivo do composto 67.....	75
Figura 45 - Correlações a longa distância dos hidrogênios da metoxila e carbonos e estrutura do composto 67 (flechas azuis correlações à longa distância $^1\text{H-}^{13}\text{C}$ observadas no espectro HMBC).	75
Figura 46 - Estereoquímica relativa dos compostos 66 e 67	76
Figura 47 - Espectro de massas modo eletrospray positivo do composto 68	77
Figura 48 - Estereoquímica relativa dos compostos 66 , 67 e 68	78
Figura 49 - Espectro de massas modo eletrospray positivo do composto 69	79
Figura 50 - Estrutura da ciclosulfóxicurvularina (69).....	81
Figura 51 - Espectro de massas modo eletrospray positivo do composto 70	82
Figura 52 - Estrutura do éster metílico da ciclosulfóxicurvularina 70	82
Figura 53 – Esquema geral da biossíntese das penicilinas, cefalosporinas e cefamicinas.....	83
Figura 54 - Esquema de formação de mercaptolactato e sua condensação à 10,11-dehidrocurvularina	84
Figura 55 – Esquema ilustrando a ligação da glutatona ao xenobiótico por meio de uma enzima glutatona S-transferase	85

Figura 56 – Esquema de uma possível via de biotransformação da 10,11-dehidrocurvularina em ciclotiocurvularina via glutathione-S-Transferase (GST) ou uma S-transferase específica.	86
Figura 57 - Esquema de condensação do mercaptopiruvato ou cisteína à 10,11-dehidrocurvularina	87
Figura 58 – Esquema mostrando a abertura da lactona 10,11-dehidrocurvularina por transesterificação ácida e posterior adição de Michael intramolecular levando a formação da curvulona B	90
Figura 59 – Gráfico do efeito de concentrações crescentes da ciclotiocurvularina A sobre a produção de NO ₂ por macrófagos	94
Figura 60 - Exemplo das multiplicações dos valores das colunas para obtenção do efeito da variável 1 (concentração de sais).....	163
Figura 61 - Exemplo das multiplicações dos valores das colunas para obtenção do efeito da interação entre as variáveis 1 (concentração de sais) e 2 (tempo). ...	165

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Gradiente de eluição utilizado nas análises por CLAE-UV-MS	29
Tabela 2 Planejamento fatorial fracionário $2^{(5-1)}$ com os níveis das variáveis não codificados	31
Tabela 3 Planejamento fatorial fracionário $2^{(5-1)}$ com os níveis das variáveis codificadas	31
Tabela 4 Escala de desejabilidade por fração para cada experimento de acordo com a resposta conjunta dos parâmetros, área e número de picos nos cromatogramas e massa das frações.	39
Tabela 5 Condições de cultivo para obter-se as frações 2 e 3 e as duas conjuntamente de forma otimizada estabelecida analisando-se os valores de desejabilidade global	39
Tabela 6 Valores dos efeitos principais (1 variável) e de interação de segunda ordem (2 variáveis) para as frações 2 e 3 e para as duas conjuntamente	40
Tabela 7 Condições de cultivo para obter-se as frações 2 e 3 e as duas conjuntamente de forma otimizada estabelecida com base no cálculo dos efeitos	41
Tabela 8 Médias dos valores de massa das frações, área e número de picos cromatográficos obtidos nos experimentos 11 e 17	43
Tabela 9 Dados de RMN ^{13}C e ^1H do composto 64 e dados de RMN ^{13}C e ^1H obtidos da literatura do composto 65 em $\text{MeOH-}d_4$ [δ , multiplicidade (J em Hz)].	65
Tabela 10 Dados de RMN ^{13}C e ^1H para os compostos 66 , 67 e 69 [δ , multiplicidade (J em Hz)].	80
Tabela 11 Valores de IC_{50} das frações MVC-322 e MVC-P5 em teste de atividade citotóxica.	91
Tabela 12 Média dos valores de IC_{50} das (15 <i>S</i>) e (15 <i>R</i>) curvularinas obtidos em testes de atividade citotóxica, sobre linhagens de células tumorais, realizados por He, et. al. (2004) e Greve, et. al. (2008).	87
Tabela 13 Valores de IC_{50} em teste de atividade citotóxica dos compostos 64 , 66-70 e do composto 66 metilado por reação com diazometano.	

TABELA 14 Respostas obtidas para a fração 2 (F2) de SPE de experimentos de otimização das condições de crescimento de *Penicillium* sp.

TABELA 15 Cálculo das desejabilidade individuais e globais para as respostas da obtidas com a fração 2 (F2) de SPE de experimentos realizados para otimização das condições de cultivo de *Penicillium* sp.

TABELA 16 Exemplo dos cálculos realizados para obtenção dos efeitos de 1ª ordem (uma variável) para fração 2.

TABELA 17 Exemplo dos cálculos realizados para obtenção dos efeitos de 2ª ordem (interação entre duas variáveis) para fração 2.

TABELA 18 Médias dos valores das respostas obtidas (massa das frações, área dos picos cromatográficos e número de picos cromatográficos) com desvio padrão e desvio padrão relativo, bem como valores de desejabilidades individual e desejabilidades globais para a fração 2.

TABELA 19 Médias dos valores das respostas obtidas (massa das frações, área dos picos cromatográficos e número de picos cromatográficos) com desvio padrão e desvio padrão relativo, bem como valores de desejabilidades individual e desejabilidades globais para a fração 3.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Fungos do Ambiente Marinho	1
1.2	Metabólitos ativos de fungos do gênero <i>Penicillium</i> do ambiente marinho.....	2
1.3	As Curvularinas.....	7
1.4	Planejamento Experimental	10
1.5	Uso de Planejamento Experimental na Produção de Produtos Naturais de Fungos	14
1.6	Outras abordagens visando o isolamento de novos compostos	16
2	JUSTIFICATIVA.....	21
3	OBJETIVOS	24
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
4.1	PRESERVAÇÃO DO MICRO-ORGANISMO	25
4.2	PREPARO DA SUSPENSÃO DE ESPOROS	25
4.3	TÉCNICAS CROMATROGRÁFICAS	26
4.3.1	Extração em Fase Sólida (EFS)	26
4.3.2	Cromatografia em Coluna por Permeação em Gel Sephadex LH20.....	26
4.3.3	Separações por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	26
4.4	TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS.....	28
4.4.1	Espectrometria de massas de alta resolução.....	28
4.4.2	Ressonância magnética nuclear (RMN).....	28
4.5	PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....	29
4.6	CULTIVO EM MAIOR QUANTIDADE	33
4.7	FRACIONAMENTO POR CROMATOGRAPHIA EM COLUNA DE PERMEAÇÃO EM GEL (Sephadex LH20).....	35
4.7.1	Pré-purificação das frações (E11) ²³ e (E17) ²³	35
4.7.2	Fracionamento da fração (11+17) ²³ -D	36
4.8	FRACIONAMENTO E PURIFICAÇÃO DAS FRAÇÕES POR CLAE-UV	36

5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1	PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	38
5.2	CRESCIMENTO EM MÉDIA ESCALA E PRÉ-PURIFICAÇÃO DOS EXTRATOS (E11)23 E (E17)23	46
5.3	FRACIONAMENTO E PURIFICAÇÃO DAS FRAÇÕES OBTIDAS APÓS CROMATOGRAFIA DE PERMEAÇÃO EM GEL	48
5.3.1	Fracionamento da fração (11+17)23-D	48
5.3.2	Fracionamento da fração (11+17)23-E	55
5.4	DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DOS COMPOSTOS INÉDITOS ISOLADOS	59
5.4.1	10,11-Epoxicurvularina	59
5.4.2	Ciclotiocurvularina A	65
5.4.4	Ciclotiocurvularina B e seu respectivo éster metílico	76
5.4.5	Ciclosulfóxicurvularina	78
5.4.6	Curvulona B e 10,11-Dehidrocurvularina	89
5.5	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA E ANTI-INFLAMATÓRIA DOS COMPOSTOS PRODUZIDOS POR <i>PENICILLIUM</i> SP. DR(F)2	90
6	CONCLUSÕES	95
7	REFERÊNCIAS	96
	ANEXO A	161
	ANEXO B	161
	ANEXO C	167

1 INTRODUÇÃO

1.1 Fungos do Ambiente Marinho

Os fungos marinhos podem ser obrigatórios, que crescem e esporulam apenas em ambiente marinho, ou facultativos, provenientes do ambiente de água doce ou terrestre e que são capazes de crescer e até mesmo esporular no ambiente marinho (Kohlmeyer & Kohlmeyer, 1979). Fungos marinhos facultativos necessitam ter mecanismos osmorregulatórios que sinalizam a produção de polióis e compostos aaminados em conjugação com o aumento da concentração de íons citoplasmáticos. Glicerol é o principal poliol envolvido no processo de osmoregulação celular tanto em leveduras como em fungos filamentosos, juntamente com o eritritol e o arabinitol que atuam como coadjuvantes. A biossíntese destes solutos para osmoregulação é energeticamente dispendiosa. Assim, estes fungos podem apresentar diminuição da produção de metabolitos secundários ou taxas mais lentas de produção de metabolitos na presença de elevadas concentrações de sais (BUGNI e IRELAND, 2004). Devido à dificuldade de classificar os fungos marinhos como obrigatórios ou facultativos muitos autores têm preferido usar o termo “fungos do ambiente marinho”. Estes micro-organismos podem ser isolados de sedimentos, restos de madeira e folhas, bem como, de organismos marinhos tais como algas, peixes, esponjas, moluscos, tunicados, cnidários e crustáceos, podendo estabelecer com estes relações simbióticas (KELECOM, 2002; DEVARAJAN et al. 2002; DEMARE, 2006; SURYANARAYANAN et al. 2012; RATEB e EBEL 2011).

A química de produtos naturais de fungos do ambiente marinho apresentou um rápido desenvolvimento na última década. Até o início de 2002, haviam sido isolados 272 novos metabolitos secundários produzidos por fungos do ambiente marinho em meio de cultura. Porém, somente no ano de 2009 foram obtidos mais de dois terços deste valor (RATEB e EBEL, 2011). No ano de 2010 foram isolados 155 novos compostos produzidos por fungos do ambiente marinho. O número de novos compostos isolados de meio de cultivo de fungos do ambiente marinho em 2011 e 2012 foi igual 231 e 287, respectivamente. Tais indicadores demonstram o grande interesse do desenvolvimento da pesquisa em produtos naturais de fungos do ambiente marinho.

1.2 Metabólitos ativos de fungos do gênero *Penicillium* do ambiente marinho

Os fungos do gênero *Penicillium* estão entre os mais disseminados na superfície terrestre, e são os principais produtores de metabólitos secundários em meio de cultura (TURQUE et al., 2010). Fungos do gênero *Penicillium* do ambiente marinho também são dos mais investigados para a produção de metabólitos secundários bioativos (BUGNI e IRELAND, 2004; SALEEM et al., 2007; RATEB e EBEL, 2011)

Exemplos recentes incluem dois novos alcaloides quinazolínicos, as arantiomidas B e C (**1**, **2**) produzidas em meio de cultura pelo fungo *Penicillium aurantiogriseum* isolado da espoja *Mycale plumosa*. Estes compostos apresentaram moderada atividade citotóxica sobre linhagens de células de carcinoma e leucemia (XIN et al., 2007). A penicipirona (**3**) foi obtida de uma linhagem de *Penicillium* sp. isolada do cnidário *Annella* sp, e apresentou atividade antibiótica contra *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina, com concentração inibitória mínima (MIC) menor que 200 µg/mL (TRISUWAN et al., 2009).

Dois novos sesquiterpenos JBIR-27 (**4**) e JBIR-28 (**5**) foram produzidos por uma linhagem do gênero *Penicillium* isolada do tunicado *Didemnum molle*. O composto JBIR-284 apresentou atividade sobre linhagens de células de carcinoma cervical com IC₅₀ igual a 92 µM (MOTOHASHI et al., 2009). Um composto derivado da sorbicilina JBIR-59 (**6**) que foi produzido do fungo *Penicillium citrinum* obtido a partir de uma esponja da classe das demospongiae, coletada no litoral da ilha Ishigaki (Japão) apresentou fraca atividade na redução da toxicidade de L-glutamato sobre células N18-RE-105 (hibridoma neural humano) (UEDA, et al., 2010).

4 **5** **6**

A redoxcitrinina (**7**) foi produzida por uma linhagem de *Penicillium* sp. isolada da superfície da alga verde *Ulva pertusa*. Este composto apresentou potente atividade anti-oxidante com IC_{50} igual a 27,7 μ M (ZHANG et al., 2007). Já a linhagem de *Penicillium* isolada da alga marrom *Xiphophora gladiata* produziu duas novas N-deoxi-piridonas (**8** e **9**), análogas do alcaloide N-hidroxi-2-piridona.

7 **8** **9**

Em bioensaios de atividade antimicrobiana, o composto **8** foi ativo sobre *Bacillus subtilis* e *Candida albicans*. Foram geradas zonas de inibição de 8 e 11 mm, respectivamente, com discos contendo 30 μ g do composto. Já o composto **9** nas mesmas condições foi inativo (SILVA, et al., 2009). Uma linhagem *Penicillium chrysogenum* isolada da alga vermelha do gênero *Hypnea* foi submetida ao crescimento em meio de cultura suplementado com brometo de cálcio e produziu dois novos éteres polibromodifenílicos (**10** e **11**). Estes compostos apresentaram potente atividade anti-oxidante demonstrada pela capacidade de “seqüestrar” o radical DPPH com IC_{50} iguais a 18 e 15 μ M, respectivamente (YANG et al., 2010).

10 **11**

Outra linhagem do fungo *Penicillium chrysogenum* isolada da alga vermelha *Laurencia* sp produziu os compostos penicitida A (**12**) e penicimonoterpeno (**13**). O composto **12** apresentou atividade citotóxica sobre a linhagem de células HepG2 (leucemia mielóide) com IC_{50} de 32 $\mu\text{g/mL}$ e o composto **13** demonstrou potente atividade fungicida sobre o fungo patogênico *Alternaria brassicae*, apresentando halo de inibição de 17 mm de diâmetro na concentração de 20 $\mu\text{g/disco}$, similar à da anfotericina B, que apresentou halo de inibição de 18 mm de diâmetro (GAO et al., 2011).

12 **13**

Linhagens distintas de *Penicillium* sp., uma isolada da casca da planta de mangue *Acanthus ilicifolius*, coletada no sudeste da China e uma outra de sedimentos do fundo do mar da baía de Jiaozhou, também na China, produziram o composto penicicolina (**14**) que apresentou potente atividade citotóxica sobre células 95-D e moderada atividade sobre células HepG2 (hepatoma humano) com IC_{50} iguais a 0,57 e 13,5 μM , respectivamente. Este composto também apresentou forte atividade inseticida sobre a praga agrícola *Aphis gossypii*, promovendo 100% de mortalidade na dose de 1000 ppm (SHAO et al., 2010; GAO, et al., 2012).

O fungo *Penicillium chermesinum* isolado de sedimentos marinhos produziu o composto auranomida B (**15**) que apresentou potente atividade citotóxica sobre a linhagem de células HepG2 com IC_{50} de 0,097 μM (SONG et al., 2012).

14 **15**

Outras linhagens de fungos do gênero *Penicillium* das quais não foi determinada a espécie foram isoladas de sedimentos marinhos e produziram vários compostos. A breviona I (**16**) apresentou atividade citotóxica sobre a linhagem de células MCF-7 (câncer de mama) com IC_{50} de 7,44 μ M, semelhante ao controle positivo cisplatina com IC_{50} igual a 8,09 μ M (LI et al., 2012). Já a 6-deoxi-5a,6-didehidroglitoxina (**17**) apresentou potente atividade citotóxica sobre células linfoblastóides de camundongos com IC_{50} de 0,058 μ M (SUN, et al., 2012).

16 **17**

O composto penicilona A (**18**), apresentou moderada atividade citotóxica sobre linhagens de células de HT1080 (fibrosarcoma humano) e CNE-2 (carcinoma de nasofaringe) com IC_{50} de 45,8 e 46,2 μ M, respectivamente. Os penicácidos A-C (**19-21**) apresentaram atividade inibitória sobre a enzima inosina monofosfato desidrogenase, com IC_{50} iguais a 28,86, 6,43 e 73,24 μ M, respectivamente. O composto **19** apresentou significativa atividade imunossupressora, com IC_{50} de 2,46 μ M (CHEN et al., 2012).

18 **19**

A linhagem *Penicillium expansum* que foi isolada das raízes de *Excoecaria agallocha* produziu o composto expansol A (**22**), que exibiu atividade citotóxica moderada sobre a linhagem de célula HL-60 (leucemia promielocítica humana) com valor de IC_{50} de 15,7 μ M. O expansol B (**23**) inibiu a proliferação das células HL-60 e A-549 (carcinoma de pulmão humano) com IC_{50} iguais a 1,9 e 5,4 μ M, respectivamente (LU, et al. 2010).

Uma linhagem de *Penicillium* sp. halotolerante produziu um composto com esqueleto espiroimidazolidínico denominado penispiroloide A (**24**). Este composto apresentou atividade anti-incrustante para larvas do briozoário *Bugula neritina* (HE et al., 2012).

Desta forma, observa-se que fungos do gênero *Penicillium*, em particular aqueles obtidos do ambiente marinho, ainda constituem excelentes fontes para a produção de metabólitos secundários bioativos.

1.3 As Curvularinas

As curvularinas são poliketídeos macrocíclicos pertencentes à família das lactonas do ácido dihidroxifenilacético (dihydroxyphenylacetic acid lactones - DALs), caracterizadas por possuir um anel aromático fundido na posição 3 e 8 do anel da lactona macrocíclica de 12 membros. A curvularina (**25**) foi a primeira lactona pertencente à família das DALs que foi isolada a partir do meio de cultura produzido por fungos (MUSGRAVE, 1956; Xu et. al., 2014). Desde então foram identificados vários macrolídeos desta classe apresentando um anel benzênico substituído e vários tamanhos de anel da lactona, contendo duplas ligações, grupos carbonilas ou epóxidos, além de ligações a grupos metila ou hidroxila (XU et al., 2014). A curvularina e a 10,11-dehidrocurvularina (**26**) são as curvularinas mais conhecidas e foram isoladas a partir de diferentes espécies de fungos, tais como *Aspergillus aureofulgens*, *Nectria galligena*, *Alternaria cinerariae*, *Chrysosporium lobatum*. Além de fungos dos gênero *Curvularia*, *Eupenicillium*, *Cochliobolus* e *Penicillium* spp. (BIRCH et. al., 1959; COOMBE et. al., 1968; CAPUTO e VIOLA, 1977; ARAI et. al., 1989; BICALHO et. al., 2003; GUTIERREZ et. al., 2005; XIE et. al., 2009; KUMAR et. al., 2013).

25

26

Outras curvularinas tais como 11-β-hidroxicurvularina (**27**), 11-α-hidroxicurvularina (**28**), 11-β-metoxicurvularina (**29**), 11-α-metoxicurvularina (**30**), 11,12 dihidroxicurvularina (**31**) e 12-hidroxi-10,11-transdehidrocurvularina (**32**) foram isoladas a partir do cultivo de uma cepa híbrida de *Penicillium citreo-viride*. Neste trabalho foi verificado que a 10,11-dehidrocurvularina quando tratada sobre SiO₂ com MeOH:EtOAc (1:1) convertia-se lentamente em uma mistura dos compostos **29** e **30**. (LAI et. al., 1991)

A origem Biossintética da 10,11-dehidrocurvularina foi investigada. A análise dos espectros de RMNs bidimensionais INADEQUATE (Incredible Natural Abundance Double Quantum Transfer Experiment), obtidos a partir dos experimentos de incorporação que utilizaram acetato uniformemente marcado, demonstraram correlações que evidenciaram o acoplamento entre carbonos da mesma unidade biosintética. Já quando se utilizou uma mistura na proporção 1:1 de moléculas de acetato marcadas no carbono 1 e moléculas de acetato marcadas no carbono 2 verificou-se que ocorreu o acoplamento entre carbonos de unidades adjacentes. A estes experimentos foram acrescentados outros utilizando acetato deuterado e cultivo do fungo em atmosfera fechada contendo o isótopo ^{18}O . Estes experimentos demonstraram que a estrutura da 10,11-dehidrocurvularina é formada a partir da incorporação de 8 unidades intactas de acetato (Figura 1) (ARAI et. al., 1989).

Figura 1 - Esquema da incorporação de unidades de acetato na biossíntese de 10,11-dehidrocurvularina-

A biossíntese das curvularinas é constituída por dois sistemas policetídeos sintases (PKS) fúngicos: PKS4 (um PKS altamente redutor, hrPKS) e PKS13 (um PKS não redutor, nrPKS). Estes sistemas PKS_s trabalham em colaboração para produzir uma macrolactona com um núcleo resorcílico. A biossíntese da 10,11-dehidrocurvularina utiliza uma via de PKS que envolve reações de condensação, redução e subsequente ciclização. Na biossíntese participa inicialmente hrPKS que é uma grande enzima com multi-domínio que se condensa e reduz unidades de acil-CoA de modo a formar uma cadeia tetra-tioéster (C1 a C8). Esta cadeia é então transferida para um nrPKS sendo esta alongada com mais 4 unidades de acetato adicionais (C-9 a C-16). Depois ocorre a condensação aldólica da porção não reduzida (C-3 e C-8) da cadeia e a porção resorcilato é construída. O final da reação é o fechamento do anel da lactona que é realizado pela formação de um éster com o grupo hidroxila do carbono 15 que serve como um nucleófilo (Figura 2) (XU et al., 2013).

Figura 2 – Esquema de biossíntese da 10,11-dehidrocurvularina.

A curvularina (**25**) e seus derivados 10,11-dehidrocurvularina (**26**), 11-hidroxicurvularina (**27** e **28**) e 11-metoxicurvularina (**29** e **30**) demonstraram atividade citotóxica sobre a embriogênese de ouriço do mar nas concentrações de 2,5, 1,2, 25 e 50 μM , respectivamente. A curvularina promove desorganização dos microtúbulos celulares, impedindo a formação do fuso mitótico e com isso a divisão celular foi completamente bloqueada. A hidroxicurvularina e a metoxicurvularina apresentaram moderada atividade citotóxica sobre as células tumorais NCI-H460 (carcinoma de pulmão) com IC_{50} 4,5 e 7,6 e MCF-7 (câncer de mama) IC_{50} 3,3 e 3,6, respectivamente (KOBAYASHI, et al., 1988; ZHAN et al., 2004).

A curvularina também apresentou atividade inibitória sobre a enzima sintase humana, induzida por óxido nítrico na concentração de 45,6 μM (YAO et al., 2003) e também atividade inibitória sobre acetilcolina esterase com IC_{50} igual a 1,36 μM , valor menor que o apresentado pelo padrão galantamina IC_{50} igual a 2,62 μM . Além disso a curvularina e 10,11-dehidrocurvularina apresentaram atividade citotóxica moderada a fraca sobre as linhagens de células tumorais MCF-7 (câncer de mama), A549 (carcinoma de célula epitelial basal), MDA-MB-231 (adenocarcinoma de mama) e células HeLa (linhagem de células humanas imortais) com IC_{50} variando entre 1,3 a 25,6 μM . A curvularina não apresentou atividade citotóxica sobre a linhagem de células de COLO-205 enquanto a 10,11-dehidrocurvularina apresentou IC_{50} igual a 7,9 μM . Com relação à atividade antioxidante, a 10,11-dehidrocurvularina apresentou EC_{50} 50,75 mg/mL^{-1} para radical DPPH e 16,71 mg/mL^{-1} para o ânion superóxido, em ambos os casos a curvularina foi inativa. O ácido ascórbico utilizado como padrão apresentou EC_{50} iguais a 40,28 e 21,01 $\mu\text{g/mL}^{-1}$, respectivamente (KUMAR et. al., 2013).

1.4 Planejamento Experimental

O planejamento experimental é uma metodologia de análise de dados experimentais fundamentada em análise estatística que pode ser utilizada para otimizar produtos e processos por meio da maximização da eficiência. Em um processo ou sistema, as diversas variáveis e as interações entre elas podem ter influência sobre as “respostas” produzidas. O planejamento experimental preconiza

o estudo de variáveis por meio de análise multivariada. Tal metodologia permite não só identificar as variáveis que influenciam positivamente ou negativamente as respostas desejadas, mas também a influência exercida pela interação entre elas, permitindo a otimização do sistema ou processo sob análise (RODRIGUES e LEMMA, 2015; BARROS NETO et al, 2010; MONTGOMERY, 2004). A análise univariada não permite verificação das interações entre variáveis, uma vez que estas são estudadas uma de cada vez (REIS, et al, 1999). Os planejamentos experimentais são planejamentos fatoriais, ou seja, são investigadas as influências de todas as variáveis experimentais de interesse, bem como os efeitos de interação entre elas sobre a resposta ou respostas sob análise. Estudando-se as variáveis em pelo menos dois níveis pode-se determinar os efeitos destas sobre as respostas de interesse (BARROS NETO, et al, 2010). Se a combinação de k variáveis é investigada em dois níveis, um planejamento fatorial consistirá de 2^k experimentos (TEÓFILO e FERREIRA, 2006). Quanto maior o número de variáveis investigadas, maior será o número de experimentos necessários para realizar um planejamento fatorial completo (BARROS NETO, et al, 2010). Uma forma de diminuir o número de experimentos a serem realizados é utilizar planejamentos fatoriais fracionários, ao invés dos fatoriais completos. Em um planejamento fatorial fracionário somente uma fração do total de experimentos é realizada. A notação $b \times 2^k$ é utilizada, na qual k é o número de variáveis e b é o tamanho da fração dos experimentos a serem realizados. Assim, em um planejamento fatorial em que 5 variáveis serão estudadas em 2 níveis e será utilizada uma meia fração ($1/2$) do total de experimentos teremos: $1/2 \times 2^5 = 2^{-1} \times 2^5 = 2^{5-1} = 2^4$. O tamanho da fração influenciará no possível número de efeitos a serem estimados e, conseqüentemente, no número de experimentos necessários (LUNDSTEDT et al, 1998; CARLSON e CARLSON, 2005; RODRIGUES e LEMMA, 2015). Um planejamento fatorial fracionado 2^{5-1} terá metade dos experimentos de um planejamento fatorial completo 2^5 a serem realizados pois serão realizados $2^4 = 16$ experimentos ao invés de $2^5 = 32$ experimentos no planejamento fatorial completo.

Os planejamentos fatoriais completos e, principalmente, os fatoriais fracionários, podem ser utilizados para triagem e determinação das variáveis significativas que influenciam um determinado processo. Por meio da metodologia de análise de superfície de resposta pode-se encontrar os valores que irão produzir

a melhor resposta desejada. Esta metodologia é baseada na criação de modelos matemáticos que descrevem o sistema estudado (TEÓFILO e FERREIRA, 2006).

Em artigo publicado em 2008, a metodologia de planejamento experimental fatorial e análise de superfície de resposta foram utilizadas para verificar a influência das variáveis: umidade inicial do meio, concentração de uma fonte de nitrogênio e concentração de uma fonte de fósforo para produção de poligalacturonase através da fermentação em estado sólido do pedúnculo seco do caju por *Aspergillus niger*. Foi utilizado um planejamento fatorial 2^3 com 3 repetições no ponto central. Como respostas foram avaliadas a atividade poligalacturonásica (U/g), e o percentual de redução de viscosidade. A análise estatística permitiu fixar o valor de umidade em 40% e com os resultados experimentais encontrados foi possível ajustar um modelo linear que relacionou a atividade enzimática com os parâmetros estudados, permitindo a construção das superfícies de resposta (Figura 3) que é a descrição gráfica do modelo (SANTOS et. al., 2008).

Figura 3 - Gráficos de superfície de resposta ilustrando as condições ótimas para produção de poligalacturonase.

Fonte: SANTOS, et. al., 2008, p. 107

Fonte: SANTOS, et. al., 2008, p. 108

Quando é possível a visualização gráfica dos modelos ajustados, e se o número de respostas não é muito grande, as superfícies de resposta podem ser sobrepostas para permitir encontrar a região experimental que possa satisfazer todas as respostas estudadas (SILVERTSEN et al, 2007; BARROS NETO et al, 2010). Quando os valores ótimos das respostas estão localizados em diferentes regiões das superfícies de respostas, as mudanças no nível de uma variável podem melhorar a resposta desta, mas pode ter um efeito muito negativo sobre outra. Nestes casos, pode ser utilizada a aplicação da metodologia de otimização simultânea. Esta é uma metodologia multicritério baseada na criação de uma “função de desejabilidade” para cada resposta, com valores que variam entre 0 e 1 (BEZERRA et al, 2008).

É fato bem determinado que diferentes experimentos de investigação de um mesmo processo ou fenômeno apresentam diferentes respostas experimentais. Por exemplo, quando se analisa o resultado de experimentos de produção de metabólitos secundários em meio de cultura, podem ser utilizados como parâmetros de análises a área de picos cromatográficos das substâncias produzidas, o número de picos cromatográficos (referente à diversidade química produzida), a massa de frações cromatográficas obtidas após o fracionamento do extrato do meio de cultura,

a potência de uma determinada atividade biológica observada para o extrato do meio de cultura, que são diferentes respostas às condições de produção dos metabólitos expressas em diferentes ordens de grandeza. Valores medidos para cada resposta são transformados em uma unidade adimensional, a “desejabilidade individual” (d_i), que varia entre $d_i = 0$, para uma resposta completamente indesejável, e $d_i = 1$, para uma resposta totalmente desejada. A partir dos valores das “desejabilidades individuais”, obtém-se a “desejabilidade global” (D) que é a média geométrica ponderada dos valores de desejabilidade individual. A transformação dos valores das respostas em uma unidade adimensional faz com que seja possível combiná-los e estudá-los conjuntamente, mesmo que estejam em diferentes ordens de grandeza (BEZERRA et al, 2008).

Uma ferramenta adicional para a análise por planejamento experimental é o cálculo dos efeitos de cada variável. Esta metodologia utiliza os resultados obtidos no planejamento fatorial fracionário para construir as superfícies de resposta e obter os valores ótimos para um determinado processo. Ela também permite encontrar as condições ótimas a partir dos valores de desejabilidades globais obtidos para os experimentos de um planejamento fatorial fracionário. Estes valores são utilizados para realizar o cálculo dos efeitos das variáveis sobre as respostas de interesse. Estes são os chamados efeitos principais. O cálculo dos efeitos de interação entre duas variáveis sobre as respostas são denominados efeitos de segunda ordem. O cálculo dos efeitos permite identificar a condição ótima de um determinado processo ou procedimento, mesmo que nem todos os experimentos tenham sido realizados.

Em planejamentos fatoriais completos a função de desejabilidade permite identificar a condição ótima dentre todos os experimentos por meio da análise dos valores de desejabilidades globais obtidos.

1.5 Uso de Planejamento Experimental na Produção de Produtos Naturais de Fungos

Planejamentos experimentais estatísticos têm se mostrado uma ferramenta de fácil utilização para melhorar as condições de produção de metabólitos secundários (SHALIGRAM et. al., 2009). O número de trabalhos que utilizam os planejamentos estatísticos para aumentar a produção de metabólitos secundários

por micro-organismos têm continuamente crescido. Por exemplo, a utilização do planejamento Plackett–Burman e a metodologia de superfície de resposta para otimizar os parâmetros nutricionais para produção de lovastatina (**33**) pelo fungo *Monascus purpureus*. Esta otimização levou à produção de 351 mg/L de lovastatina (SAYYAD et. al., 2007), resultado superior aos 127 e 230 mg/L produzidos por *Monascus paxii* e *Aspergillus terreus*, respectivamente (MANZONI et. al., 1999). A produção de compactina (**34**) pelo fungo *Penicillium brevicompactum* foi aumentada de 450 µg por grama de substrato seco para 905 µg/gss⁻¹, quando se utilizou análise univariada. Já utilizando-se um planejamento fatorial fracionário, juntamente com planejamento Box–Behnken, a produção passou a ser de 1.250 µg gss⁻¹ (SHALIGRAM et. al., 2009). A produção de metabólitos secundários por *Penicillium oxalicum* e *Penicillium citrinum* foi aumentada em mais de 500% utilizando-se planejamento fatorial fracionário. Neste trabalho foram isolados os compostos oxalina (**35**), meleagrina (**36**) e as citrinalinas A e B (**37** e **38**) (PIMENTA et. al., 2010).

O planejamento fatorial composto central permitiu identificar condições que possibilitaram o aumento da produção de ácido ganodérico (**39**) pelo fungo

Ganoderma lucidum em 129%, após a metodologia de superfície de resposta ter indicado as melhores condições para a produção deste metabólito. (LIU et. al., 2012).

1.6 Outras abordagens visando o isolamento de novos compostos

Na natureza os micro-organismos estão continuamente expostos às mudanças ambientais. Para sobreviverem, sofrem alterações metabólicas ao nível da transcriptoma, proteoma e metaboloma. Estudos têm demonstrado que alterações nas condições de cultivo de micro-organismos tais como composição do meio de cultura, valor de pH, temperatura, adição de inibidores de enzimas e fornecimento de oxigênio, podem influenciar a transcrição, tradução e a expressão enzimática dos micro-organismos. Uma abordagem específica utilizada na pesquisa de novos produtos naturais é denominada OSMAC (One Strain, Many Compounds). Ao invés de manter o foco em uma seleção dispendiosa de um grande número de microrganismos e alto rendimento de seus extratos, foca-se no conjunto completo de metabólitos secundários produzidos por um ou alguns micro-organismos. Explora-se a diversidade química que pode ser expressa a partir do genoma de um micro-organismo, permitindo a detecção e isolamento de muitos compostos, por meio de mudanças aleatórias das condições de cultivo, que mimetizam mudanças ambientais naturais. Estas mudanças podem influenciar todos os níveis de biossíntese de metabólitos secundários, levando ao incremento da diversidade química dos mesmos. Esta abordagem resultou da observação de que pequenas mudanças nas condições de cultivo podem mudar completamente o perfil metabólico de vários micro-organismos (BODE et. al., 2002). O emprego desta estratégia levou à

obtenção de mais de 100 compostos representados em mais de 25 tipos diferentes de estruturas, utilizando-se apenas 6 linhagens de micro-organismos (BODE et al., 2002). Rateb e colaboradores (2011) utilizaram a abordagem OSMAC trabalhando com uma linhagem de *Streptomyces* sp. e oito diferentes meios de cultivo verificaram que a mudança da composição dos meios de cultivo não só afetou a quantidade de compostos produzidos mas também levou a produção de novos metabólitos de diferentes classes químicas. Foram isolados da classe dos policetídeos 3 novas macrolactonas com anel de 22 membros denominadas chaxalactinas A-C (**40-42**), bem como o peptídeo cíclico deferroxamina E (**43**) e o glicosídeo hygromicina A (**44**) e 5'' dihidrohygromicina (**45**), já descritos na literatura.

No trabalho de Wang e colaboradores (2014) utilizou-se a abordagem OSMAC para investigar o efeito do Mg²⁺ sobre o metabolismo secundário do fungo *Aschotricha* sp. investigando-se o efeito de concentrações crescentes de cloreto de magnésio (MgCl₂) no meio de cultivo. Verificou-se que a presença do íon Mg²⁺ inibiu a produção dos compostos (+)-6-O-demetilpestalopisina A (**46**) e (+)-6-O-demetilpestalopsina C (**47**) e estimulou a produção do composto (+)-6-O-demetilpestalopisina B (**48**). Porém, à medida que a concentração de cloreto de magnésio foi sendo aumentada a produção de todos os compostos produzidos pelo

fungo foi diminuindo e uma mistura de ésteres de ácidos graxos foi aumentando. Estes trabalhos demonstram como a notável versatilidade dos micro-organismos pode ser explorada pela utilização da abordagem OSMAC de forma a ativar novas rotas metabólicas para produção de novos compostos.

Outra estratégia utilizada para a geração de diversidade e novidade química por micro-organismos é a utilização de modificadores epigenéticos para aumentar a produção de metabólitos secundários. Esta abordagem se baseia no princípio de que agregados de genes (“gene clusters”) que codificam a biossíntese de metabólitos secundários estão silenciados e são expressas somente sob condições ambientais específicas. Formas de controle da expressão gênica a nível transcricional envolvem a metilação do DNA ou modificação da conformação da cromatina. Modificadores epigenéticos atuam sobre enzimas responsáveis pela metilação do DNA e sobre enzimas que alteram a acetilação das histonas modificando o nível de compactação da cromatina. A enzima histona acetiltransferase catalisa a adição de um grupo acetil às histonas. Esta ação é revertida pela enzima histona deacetilase (HDAC). Já a enzima DNA metiltransferase (DNMT) catalisa a transferência de grupamentos metila para o DNA. A inibição da HDAC ou DNMT são alvos interessantes porque levam à ativação de certos agrupamentos biossintéticos silenciosos (CHUNG et. al., 2013).

Esta estratégia foi aplicada sobre 10 diferentes linhagens de fungos filamentosos sobre as quais foi examinado o efeito de modificadores epigenéticos como o 5-AZ (**49**) (5-azacitidina, um inibidor da DNMT) e o SBHA (**50**) (ácido subérico bis-hidroxâmico, um inibidor da HDAC).

A adição do 5-AZ ao meio de cultivo do fungo *Aspergillus sydowii* levou à produção de três novos sesquiterpenos bisabolanos 7-O-metilsidonol (**51**), 12-ácido hidroxissidônico (**52**), 7-deoxi-7,14-didehidrosidonol (**53**). Foram isolados também outros compostos já descritos na literatura, além do aumento de vários metabólitos minoritários (CHUNG et al., 2013).

51 $R_1 = \text{OMe}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{CH}_2\text{OH}$

52 $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{OH}$, $R_3 = \text{COOH}$

A adição concomitante de SBHA e RG-108 (**54**) (um inibidor da DNMT) ao meio de cultivo de *Gibellula formosana*, um fungo entomopatogênico induziu um aumento significativo da diversidade de metabólitos secundários. A partir dos meios de cultura foram isolados dois novos ergosteróis altamente oxidados, formosterol A e B (**55** e **56**) e cinco novos análogos da isariotina, 12-O-acetilisariotina A (**57**), 1-epi-isariotina A (**58**), e isariotinas K-M (**59-61**) (ASAI et. al., 2012).

2 JUSTIFICATIVA

Os micro-organismos marinhos são de interesse crescente de grupos de pesquisa que objetivam a descoberta de substâncias bioativas como potenciais protótipos de fármacos. Tal tendência é claramente ilustrada na figura 4 publicada no *review* de 2009 por Blunt et al. e confirmada na figura 5, onde verifica-se que em 2010 os micro-organismos passaram a constituir o primeiro grupo mais estudado de organismos marinhos (PASSOS, 2010). Tais indicadores assinalam claramente uma mudança na orientação da pesquisa em produtos naturais marinhos nos últimos anos com ênfase na exploração do metabolismo de micro-organismos do ambiente marinho. Esta tendência pode ser justificada pelo uso cada vez mais frequente das técnicas modernas de biologia molecular e de análise genômica na pesquisa microbiológica, uma vez que tais ferramentas possibilitam não somente a descoberta de táxons pouco conhecidos e até desconhecidos, mas também o acesso à maquinaria genômica (metabólitos secundários e enzimas) de micro-organismos cultivados e ainda “não cultivados” em laboratório.

Figura 4 - Distribuição de Produtos Naturais Marinhos por Filo no período de 1965 a 2007

Fonte: Blunt et. al., 2009, p. 231

Figura 5 - Distribuição de Produtos Naturais Marinhos por Filo no período de 2008 a 2010.

Fonte: Passos, 2010, p. 15

A descoberta e exploração de micro-organismos marinhos deve necessariamente ser multidisciplinar, envolvendo tanto taxonomistas como biólogos, biotecnólogos, bem como geneticistas, químicos e farmacologista para potencializar o conhecimento da expressão metabólica que pode vir a ser de extrema utilidade (Bull e Stach, 2007). Jones (2011) ressalta a necessidade de melhor se investigar fungos marinhos, afirmando que o maior desafio para micologia marinha é avaliar a fisiologia e a bioquímica original destes fungos, a sua capacidade para produzir

compostos bioativos, enzimas para tolerar tanto salinidade e pH, e a sua utilização para aplicação comercial. Segundo Aly et al. (2011^a), apenas uma fração muito pequena de espécies de fungos marinhos já foi descrita e explorada no sentido biotecnológico. Ao contrário das bactérias marinhas, muito pouco se conhece sobre a biologia dos fungos marinhos, sua distribuição e funções ecológicas (Imhoff et al., 2011). A expansão e boa manutenção das coleções de fungos marinhos, e o desenvolvimento de novos e inovadores métodos de cultivo, são imprescindíveis para se acessar esta “biodiversidade escondida” (Aly et al., 2011a; Imhoff et al., 2011).

Levando em conta a importância da investigação de micro-organismos marinhos e de seus metabólitos secundários, o Grupo de Química Orgânica de Sistemas Biológicos (QOSBio) do Instituto de Química de São Carlos iniciou o primeiro programa de investigação de metabólitos secundários de micro-organismos marinhos no Brasil em 1998. Neste contexto, a ex-aluna de mestrado Carolina Megumi Mizuno isolou 38 linhagens de fungos da esponja marinha *Dragmacidon reticulatum* e realizou a avaliação da diversidade genética destas linhagens de fungos utilizando o método ARDRA, observando 2 ribotipos distintos para fungos do gênero *Penicillium*. Estes foram identificados com os códigos DR(B)2 e DR(F)2. O extrato produzido pelo ribotipo DR(F)2 apresentou significativa atividade citotóxica contra linhagens tumorais MDA-MB435 (mama), HCT-8 (cólon), SF295 (sistema nervoso) e HL-60 (leucemia). Segundo Mizuno (2010) este extrato também apresentou perfil químico de interesse com substâncias apresentando várias bandas no UV entre 270 e 300 nm, indicando absorções incomuns a compostos do metabolismo primário, bem como substâncias com massa molecular entre 300 e 400 Da. A investigação do extrato do meio de cultura do fungo *Penicillium* DR(F)2 levou ao isolamento da 10,11-dehidrocurvularina (**26**), da curvulona B (**62**) (MIZUNO, 2010). Outros compostos observados não puderam ser isolados por terem sido produzidos em muito baixa quantidade. Sendo assim, esta linhagem foi selecionada para otimização de produção de metabólitos secundários em meio de cultura, utilizando planejamento experimental e análise multivariada para otimização das condições de cultivo visando o aumento da produção de metabólitos secundários.

Em estudo anterior realizado pelo estudante de doutorado Eli Fernando Pimenta, sob orientação do professor Roberto Gomes de Souza Berlick foi observado que o planejamento experimental e a análise multivariada favoreceram a produção da maior diversidade de metabólitos. No referido estudo condições ótimas de crescimento foram estabelecidas para produção dos compostos oxalina e meleagrina (**35** e **36**) pelo fungo *Penicillium Oxalicum* e citrinalina B (**38**) pelo fungo *Penicillium citrinum*. Em cada caso o aumento da produção de metabólitos excedeu 100%, quando comparado com o crescimento dos dois fungos sob condições padrão e chegou a mais de 500% para produção do composto **35** (PIMENTA, et. al., 2010).

A metodologia utilizada no estudo foi extremamente importante e mostrou ser válida na busca por novos compostos naturais e motivou a aplicação da mesma em nosso trabalho.

3 OBJETIVOS

- 1) Desenvolver uma metodologia para aumentar a produção de metabólitos secundários produzidos pela linhagem de *Penicillium* sp. DR(F)2 do ambiente marinho, tanto em quantidade como em diversidade.
- 2) Uma vez desenvolvida a adequada metodologia de produção dos metabólitos produzidos por *Penicillium* sp. DR(F)2, realizar o crescimento em maior quantidade de meio de cultura.
- 3) Isolar e identificar os metabólitos majoritários e minoritários produzidos por *Penicillium* sp. DR(F)2 em meio de cultura, em condições otimizadas.
- 4) Isolados em quantidades suficientes, avaliar as atividades citotóxica dos compostos produzidos por *Penicillium* sp. DR(F)2.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 PRESERVAÇÃO DO MICRO-ORGANISMO

O fungo *Penicillium* sp. DR(F)2 foi preservado em água destilada, a 4°C. A metodologia foi baseada na técnica de Castellani (1967). Foram colocados de 1 a 2 mL de água destilada em tubos Eppendorfs e esterilizados em autoclave. A linhagem foi repicada em placas de Petri contendo o meio de cultura ágar fubá. Após sete dias de incubação a 25 °C, quatro discos de micélio aéreo da superfície da colônia (de preferência com esporos e de distintas regiões) foram transferidos para os Eppendorfs usando-se uma seringa estéril de 1 mL com a ponta cortada, tomando-se o cuidado de não extrair meio de cultura. Os tubos foram armazenados em refrigerador.

4.2 PREPARO DA SUSPENSÃO DE ESPOROS

Para a obtenção da suspensão de esporos para crescimento da linhagem fúngica em placas de Petri e em meio líquido, foi realizado o seguinte procedimento: os fungos foram repicados para tubos de ensaio Pyrex de 10 mL contendo 5 mL de meio de cultura malte 3%, sólido, e incubados a 25° C. Após 7 dias de cultivo, foram adicionados 5 mL de uma solução 0,5% de Tween 80 (1 mL por vez), o ágar foi raspado e filtrado em fibra de vidro em ambiente estéril. Esta suspensão foi centrifugada e resuspendida 3 vezes com água destilada, para retirar o detergente Tween 80. Os esporos assim obtidos foram quantificados utilizando-se um hemocítômetro (câmara de Neubauer). Assim determinou-se a concentração de esporos por mL na solução estoque para incubação em placas de Petri ou meio líquido, a qual foi armazenada em geladeira.

4.3 TÉCNICAS CROMATROGRÁFICAS

4.3.1 Extração em Fase Sólida (EFS)

Para o procedimento de EFS foram utilizadas colunas comerciais pré-empacotadas com sílica-gel derivatizada com grupos octadecilsilil (C_{18}) da marca Phenomenex[®], contendo 2 g e 12 cm³ de fase estacionária para extração de cultivo em pequena escala, e de 5 g com 20 cm³ de fase estacionária para extração do cultivo em maior volume. Os solventes utilizados foram água purificada e deionizada em um sistema Milli-Q Millipore, equipado com resina de troca iônica e filtro biológico, e MeOH grau analítico das marcas QHemis ou FMaia.

4.3.2 Cromatografia em Coluna por Permeação em Gel Sephadex LH20

O fracionamento por cromatografia em coluna de permeação em gel foi realizado em uma coluna de vidro com dimensões de 170 cm de comprimento e 2 cm de diâmetro. A fase estacionária utilizada foi a Sephadex LH20 (Pharmacia-Biotech[®]). Para eluição utilizou-se MeOH:H₂O 7:3 e MeOH:H₂O 1:1 em modo isocrático.

4.3.3 Separações por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Para separações por cromatografia líquida de alta eficiência foram utilizadas as seguintes colunas analíticas:

1. Coluna de fase reversa C_{18} X-terra Waters[®] – dimensões de 50 mm de comprimento por 2,1 mm de diâmetro com 3,5 µm de tamanho da partícula.
2. Coluna de fase reversa C_{18} X-terra da marca Waters[®] – dimensões de 250 mm de comprimento por 4,6 mm de diâmetro com 5 µm de tamanho da partícula.
3. Coluna de fase reversa C_{18} , Inertsil ODS-SP – dimensões de 250 mm de comprimento por 4,6 mm de diâmetro com 5 µm de tamanho da partícula.

4. Coluna semi-preparativa de fase reversa C₁₈ Inertsil da marca Chromatography Sciences – CSC-Inertsil 150A/ODS2, 250 mm de comprimento por 0,94 mm de diâmetro com 5 µm de tamanho da partícula.
5. Coluna preparativa de fase reversa C₈ Inertsil da marca GL Sciences C8-4, 250 mm de comprimento por 14 mm de diâmetro com 5 µm de tamanho da partícula.

Os aparelhos utilizados nas separações cromatográficas foram:

a) sistema cromatográfico da marca Waters[®] que consiste de um injetor Waters 717 Plus, acoplado a um sistema de controle com uma bomba modelo Waters 600, acoplado a um detector espectrofotométrico de duplo feixe UV-visível, modelo Waters 2487, operado utilizando a plataforma Empower.

b) sistema cromatográfico da marca Waters[®] que consiste em um sistema de controle e bomba modelo Waters 600 acoplado a um detector espectrofotométrico de duplo feixe UV-visível modelo Waters 2487 este equipamento é operado utilizando uma plataforma Millenium.

4.4 TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS

4.4.1 Espectrometria de massas de alta resolução

Os espectros de massas de alta resolução foram obtidos utilizando-se um espectrômetro de massas sistema híbrido quadrupolo/tempo-de-voo, modelo Microtof-QII (Bruker Daltonics). As amostras foram introduzidas por infusão direta através de bomba seringa. Foi utilizado como modo de ionização electrospray positivo/negativo, com o equipamento operando no modo MS, voltagem do capilar igual a 4,5KV, vazão do gás secante (nitrogênio) de 4 litros/min, pressão do gás nebulizador (Nitrogênio) de 0,4 bar. A faixa de operação do quadrupolo foi de 50-1000 daltons e a taxa de aquisição dos espectros foi 2 hertz.

4.4.2 Ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de RMN foram obtidos utilizando-se o aparelho Bruker DRX 400 (9,4 Tesla), operando a 400,35 MHz na frequência do hidrogênio (^1H) e a 100,10 MHz na frequência do carbono (^{13}C), do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (DQ-UFSCar). Para realizar as análises por RMN as amostras foram preparadas utilizando-se solventes deuterados da marca Cambridge Isotopes: MeOH deuterado (MeOH- d_4) e DMSO deuterado (DMSO- d_6). O padrão utilizado como referência interna foi o tetrametilsilano (TMS).

4.4.3 Análises por CLAE-UV-EM

Para análises por CLAE-UV-EM foi utilizado um sistema cromatográfico da marca Waters[®] que consiste em um sistema de controle Alliance modelo Waters 2695 acoplado a um detector espectrofotométrico UV-visível modelo Waters 2696 com detector de arranjo de fotodiodos também acoplado a um detector espectrofotométrico de massas modelo Waters Micromass ZQ 2000 operado utilizando plataforma Empower. O detector de massas foi operado com uma

voltagem no capilar de 3,00 kV e temperatura da fonte igual a 100° C. A temperatura de dessolvatação foi 350° C e o equipamento foi operado em modo positivo/negativo electrospray com faixa de detecção entre 100 e 1000 Da. O fluxo de gás no cone e a dessolvatação do cone foram 50 e 350 L/H, respectivamente. Aquisição e processamento de dados foram realizados no Empower 2.0.

Para estas análises as amostras foram diluídas em uma concentração de 1,5 mg.mL⁻¹ e transferidas para frascos específicos (vials) do amostrador.

Para realização das análises das frações obtidas na EFS foi utilizada coluna de fase reversa C₁₈ X-terra de 50 mm de comprimento. A eluição foi realizada em modo gradiente de solventes orgânicos (MeOH/MeCN 1:1 em H₂O + 0,1% de ácido fórmico) (Tabela 1).

As áreas dos picos nos cromatogramas foram obtidas no comprimento de onda de 254 nm.

Tabela 1 – Gradiente de eluição utilizado nas análises por CLAE-UV-MS.

Tempo (min)	Fluxo (mL.min ⁻¹)	H ₂ O (%)	MeOH (%)	MeCN (%)	Curva
-	0,5	90	5	5	-
1	0,5	90	5	5	6
12	0,5	0	50	50	6
16	0,5	0	50	50	1
17	0,5	90	5	5	1
23	0,5	90	5	5	1

4.5 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

O meio de cultivo utilizado neste trabalho foi o meio malte 3% cuja concentração de nutrientes na composição é: peptona de soja 3,0 g/L e extrato de malte 30,0 g/L dissolvidos em água do mar artificial contendo os seguintes sais: CaCl₂ 1,36 g/L; MgCl₂ 9,68 g/L; KCl 0,61 g/L; NaCl 30,00 g/L; Na₂HPO₄ 0,14 mg/L; Na₂SO₄ 3,47 g/L; NaHCO₃ 0,17 g/L; KBr 100 mg/L; SrCl₂ 40 mg/L; H₃BO₃ 30 mg/L.

Foi utilizado planejamento fatorial fracionário (PFF) com 5 variáveis experimentais:

- a) concentração total de sais do meio de cultura, designada [sais];
- b) tempo de incubação, T;
- c) temperatura de incubação, t.
- d) concentração total de nutrientes do meio de cultura, designada [nutrientes];
- e) agitação dos meios de cultura, designada A;

A fórmula utilizada para encontrar-se o número de experimentos para um PFF é 2^{n-1} onde n é o número de variáveis experimentais. Utilizando-se 5 variáveis e trabalhando-se com meia fração tem-se que $\frac{1}{2} \times 2^5 = 2^{-1} \times 2^5 = 2^{(5-1)} = 2^4 = 16$ experimentos diferentes devem ser realizados. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

No planejamento fatorial, valores de máximo (+) e mínimo (-) são atribuídos para cada variável experimental. Utilizaram-se os seguintes valores de máximo e mínimo para cada uma das variáveis experimentais:

- a) Concentração de sais: valor máximo (+) igual a 90% da concentração total de todos os sais; valor mínimo, 10% da concentração total de todos os sais.
- b) Tempo: valor máximo (+) de 35 dias e mínimo (-) de 7 dias.
- c) Temperatura: valor máximo de 30°C e mínimo de 15 °C.
- d) Agitação: valor máximo (+) agitação a 100 RPM e valor mínimo (-) sem agitação.
- e) Concentração de nutrientes: valor máximo (+) igual a 80% da concentração dos nutrientes do meio de cultivo e valor mínimo (-) 20% da concentração dos nutrientes do meio de cultivo.

Desta maneira, foram definidos os níveis das variáveis experimentais de cada experimento e estabeleceu-se um planejamento fatorial com valores de máximo e mínimo. As tabelas 2 e 3 ilustram os experimentos realizados.

O PFF mostrado nas tabelas 2 e 3 foi construído intercalando-se os valores de máximo e mínimo, para cada variável, da seguinte maneira:

- a) coluna [sais] – os valores foram dispostos intercalando-se um mínimo e um máximo (até o experimento 16);
- b) Coluna T (em dias) – os valores foram dispostos intercalando-se dois mínimos e dois máximos (até o experimento 16);
- c) Coluna t (°C) – os valores foram dispostos intercalando-se quatro mínimos e quatro máximos (até o experimento 16);

d) Coluna A – os valores foram dispostos intercalando-se oito mínimos e oito máximos;

e) Coluna [nutrientes] – os valores de mínimo e máximo foram definidos pela multiplicação, em termos de sinais de máximo (+) e mínimo (-), das colunas axbxcxd.

Tabela 2 – Planejamento fatorial fracionário $2^{(5-1)}$ com os níveis das variáveis não codificados

Experimento	[saís]	T (dias)	t (°C)	A	[nutrientes]
1	10	7	15	sem	80
2	90	7	15	sem	20
3	10	35	15	sem	20
4	90	35	15	sem	80
5	10	7	30	sem	20
6	90	7	30	sem	80
7	10	35	30	sem	80
8	90	35	30	sem	20
9	10	7	15	com	20
10	90	7	15	com	80
11	10	35	15	com	80
12	90	35	15	com	20
13	10	7	30	com	80
14	90	7	30	com	20
15	10	35	30	com	20
16	90	35	30	com	80

Tabela 3 – Planejamento fatorial fracionário $2^{(5-1)}$ com os níveis das variáveis codificados

Experimento	[saís]	T (dias)	t (°C)	A	[nutrientes]
1	-1	-1	-1	-1	+1
2	+1	-1	-1	-1	-1
3	-1	+1	-1	-1	-1
4	+1	+1	-1	-1	+1
5	-1	-1	+1	-1	-1
6	+1	-1	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1	-1	+1
8	+1	+1	+1	-1	-1
9	-1	-1	-1	+1	-1
10	+1	-1	-1	+1	+1
11	-1	+1	-1	+1	+1
12	+1	+1	-1	+1	-1
13	-1	-1	+1	+1	+1
14	+1	-1	+1	+1	-1
15	-1	+1	+1	+1	-1
16	+1	+1	+1	+1	+1

Como exemplo, tem-se o experimento 1 da tabela 2 e 3 no qual se tem: salinidade do meio de cultura [10%, sinal negativo (-1), esta variável deve estar no nível mínimo]; tempo de crescimento em dias [7, sinal negativo (-1), esta variável deve estar no nível mínimo]; temperatura [15°C, sinal negativo (-1), esta variável deve estar no nível mínimo]; agitação [sem, sinal negativo, esta variável deve estar no nível mínimo]. Com isto multiplicam-se as quatro colunas (em termos de sinais) e obtém-se: $(-1) \times (-1) \times (-1) \times (-1) = (+1)$. Portanto, a concentração de nutrientes para este experimento deve estar no nível máximo, devido ao sinal positivo, que corresponde a 80%.

Os 16 experimentos do PFF foram realizados da seguinte maneira: 3 frascos Schott de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultura líquido foram preparados de acordo com as condições previstas para cada experimento do PFF. Os esporos da linhagem fúngica *Penicillium* sp. foram inoculados de forma a conter uma concentração de 10^5 esporos/mL. Após o período de crescimento de cada experimento, os inóculos contendo meio de cultura e micélio foram filtrados utilizando-se um funil de vidro sinterizado forrado com papel filtro e sobre este uma camada de aproximadamente 3 cm de celite (terra de diatomáceas) e sobre esta um disco de papel de filtro. Após a filtração foi obtida uma fração líquida (caldo do meio de cultura) e uma fração sólida (micélio). O micélio separado com o auxílio do papel de filtro foi colocado em tubo de ensaio e sobre este foi adicionado 10 mL de MeOH. Os tubos foram colocados em banho ultra-som por 1 minuto e posteriormente filtrados novamente. Obteve-se então o extrato metanólico do micélio (ExMeOH). O solvente foi evaporado e o extrato seco foi pesado. Do meio de cultura líquido (caldo filtrado) foi realizada uma extração em fase sólida (EFS) em coluna de fase reversa C_{18} de 2 g. Após condicionar a coluna com 10 mL de H_2O ; 10 mL de MeOH/ H_2O 1:1; 10 mL de MeOH 100%; 10 mL de MeOH/ H_2O 1:1 e 10 mL de H_2O e aplicar as amostras, a coluna foi eluída com 10 mL de H_2O (descartada) e posteriormente com um gradiente de MeOH/ H_2O . Quatro frações foram obtidas: Fração 1 (F1) – 25:75 MeOH/ H_2O (10 mL); Fração 2 (F2) – 1:1 MeOH/ H_2O (10 mL); Fração 3 (F3) – 75:25 MeOH/ H_2O (10 mL) e Fração 4 (F4) – 100% de MeOH (10 mL). O extrato metanólico do micélio e a fração H_2O da EFS foram descartadas por apresentarem muitos sais e nutrientes do meio de cultura e quantidades insignificantes de metabólitos secundários. As frações 1 também foram descartadas pois a presença de metabólitos secundários foi muito baixa e as frações 4 também por sempre

apresentar massas inferiores a 0,5 mg. O solvente das demais frações (F2 e F3) da EFS foi evaporado em um sistema de centrifugação a vácuo (speedvac). As frações obtidas (frações 2 e 3 da EFS) de todos os experimentos de crescimento realizados foram pesadas. Alíquotas de 1 mg/mL de cada fração foram submetidas à análise por CLAE-UV-EM em uma coluna de fase reversa C₁₈ X-terra de 50 mm de comprimento, da marca Waters® com um gradiente MeOH-MeCN-H₂O durante 23 minutos (Tabela 1). Para todos os experimentos do PFF foram medidas as integrais das áreas dos picos dos cromatogramas e o número de picos observados no intervalo de 4 a 10 minutos e no comprimento de onda de 254 nm. Estes dois parâmetros, juntamente com a massa das frações obtidas, para cada experimento, foram considerados como as respostas dos experimentos de planejamento experimental. Utilizando-se a metodologia multicritério, função de desejabilidade, os valores das respostas foram transformados em um valor adimensional (equações no anexo B), a desejabilidade individual (di), que pode variar de um valor igual a zero (uma resposta totalmente indesejável) até um valor igual a 1 (uma resposta totalmente desejável). O valor de desejabilidade global foi obtido para cada experimento, pelo cálculo da média geométrica dos valores de desejabilidade individual e foi utilizado para realização do cálculo dos efeitos principais e de interação das variáveis utilizadas para o cultivo da linhagem *Penicillium* sp (Anexo B).

4.6 CULTIVO EM MAIOR QUANTIDADE

Foram preparados, de acordo com duas condições otimizadas (experimento 11 e experimento 17), 20 frascos Schott de 500 mL contendo 100 mL de meio de cultura líquido. Os esporos da linhagem fúngica *Penicillium* sp. foram inoculados de forma a conter uma concentração de 10⁵ esporos/mL. Após o período de crescimento, os inóculos contendo meio de cultura e micélio foram filtrados utilizando-se um funil de vidro sinterizado forrado com papel filtro e uma camada de aproximadamente 3 cm de celite (terra de diatomáceas). Após a filtração foi obtida uma fração líquida (caldo do meio de cultura) e uma fração sólida (micélio), que foi descartada. Do meio de cultura líquido (caldo filtrado) foi realizada uma extração em fase sólida (EFS) em coluna de fase reversa C₁₈ de 5 g. Após condicionar a coluna

foram aplicados 100 mL do meio de cultura de uma só vez. A coluna foi eluída com 40 mL de H₂O (descartada) e posteriormente com um gradiente de MeOH/H₂O. Quatro frações foram obtidas: Fração 1 (F1) – 25:75 MeOH/H₂O (40 mL); Fração 2 (F2) – 1:1 MeOH/H₂O (40 mL); Fração 3 (F3) – 75:25 MeOH/H₂O (40 mL) e Fração 4 (F4) – 100% de MeOH (40 mL) (Figura 6). As frações F1 e F4 foram descartadas.

Figura 6 - Fluxograma de extração em fase sólida do meio de cultura líquido (caldo filtrado) obtido a partir do crescimento do fungo *Penicillium* sp. e pré-purificação das frações (E11)23 e (E17)23.

O solvente das frações F2 e F3 da EFS foi evaporado em um sistema de centrifugação a vácuo (speedvac). As frações obtidas (frações 2 e 3 da EFS) foram pesadas, reunidas e receberam os seguintes códigos:

4.7 FRACIONAMENTO POR CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE PERMEAÇÃO EM GEL (Sephadex LH20)

4.7.1 Pré-purificação das frações (E11)23 e (E17)23

A fração (E11)23 (1,05 g) seca foi ressuspensa em MeOH:H₂O 7:3 e dividida em 3 alíquotas contendo 313, 548 e 192 mg. A fração (E17)23 (1,22 g) foi também ressuspensa em MeOH:H₂O 7:3 e dividida em 3 alíquotas de aproximadamente 400 mg. As 6 alíquotas foram separadamente fracionadas por cromatografia em coluna de permeação em gel (Sephadex LH20) eluída com MeOH:H₂O 7:3.

Foram coletadas frações de aproximadamente 8 mL. Estas foram alternadamente duas-a-duas analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de ultra-violeta (CLAE-UV). As frações foram reunidas com base nos seus perfis cromatográficos. Como resultado final, foram obtidas 5 frações para o extrato (E11)23 e 5 frações para o extrato (E17)23. As frações correspondentes foram reunidas obtendo-se finalmente 5 frações. (Figura 7).

Figura 7 - Fluxograma de pré-purificação das frações (E11)23 e (E17)23.

4.7.2 Fracionamento da fração (11+17)23-D

A fração (11+17)-23D (627,3 mg) foi analisada por CLAE-UV-EM e selecionada para purificação por conter alta massa e maior diversidade de picos. Foi fracionada por cromatografia em coluna de permeação em gel (Sephadex LH20) eluída com MeOH:H₂O 1:1. As frações coletadas na eluição foram secas, ressuspensas em 2 mL de solução (MeOH:H₂O - 1:1) e reunidas de 10 em 10. Ao final deste procedimento foram obtidas 9 frações. Estas foram analisadas por CLAE-UV e reunidas com base no seu perfil cromatográfico. Obteve-se, como resultado, 4 frações (Figura 8).

Figura 8 – Fluxograma de fracionamento da fração (11+17)23D em coluna Sephadex LH-20.

4.8 FRACIONAMENTO E PURIFICAÇÃO DAS FRAÇÕES POR CLAE-UV

Para fracionamento e purificação por CLAE-UV foram utilizados os sistemas cromatográficos e as colunas descritas no subitem 4.3.3. As análises foram realizadas monitorando-se as separações nos comprimentos de onda λ_{max} 254 nm e 280 nm.

Foi necessária a utilização de ácido fórmico em concentração de 0,1% nos eluentes em todas as separações realizadas por HPLC. Este procedimento foi adotado para que os compostos presentes estivessem completamente protonados,

evitando o aparecimento de duas espécies químicas (a forma ionizada e a não ionizada). Quando duas espécies químicas de um mesmo composto estão presentes durante uma separação, os picos no cromatograma podem surgir com aspecto alargado, ou mesmo duplicados, pois ambas são detectadas.

4.9 TESTES DE CITOTOXICIDADE

Os testes de citotoxicidade foram realizados pela Professora Dra Raquel Santos da Universidade de Franca (UNIFRAN). As Linhagens de células de mama humana MCF-10A e MCF-7 foram adquiridos da National Cancer Institute Cell Bank, Rio de Janeiro, Brasil. As células de câncer de colo uterino HeLa e A549 do epitélio basal alveolar humano foram doadas pelo Laboratório de Citogenética e Mutagênese, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, SP, Brasil. Todas as linhas celulares foram expandidas e cultivadas em meio completo composto por DMEM + HAM F10 (1:1, v / v) (Sigma-Aldrich) suplementado com 10% de soro fetal de vitela (Sigma, St Louis, EUA) e 1% de penicilina / estreptomicina a solução estabilizada (Sigma-Aldrich) em frascos de cultura celular de 25 mm² (TPP, Suíça). As células foram incubadas a 37 °C e 5% de CO₂ em atmosfera umidificada. Os experimentos foram realizados entre os dias 3 e 8 de cultivo. A IC₅₀ foi determinada com XTT metabólica utilizando o Kit de Proliferação de Células II (Roche) seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, as células foram tripsinizadas e cultivadas a 1x10⁴ células / poço em placa de 96 poços. Após 24 h as células foram tratadas com os compostos **62**, **65**, **66**, **67**, **68**, **69** e uma mistura dos compostos **26** e **62** nas concentrações de 7,8, 15,6, 31,2, 62,5, 125, 250, 500 e 1000 µM. Após 24 h adicionais o meio de cultura foi removido e as células foram incubadas com meio DMEM sem fenol vermelho mais reagente XTT durante 4 h. A absorvância foi medida a 492 nm com uma referência a 620 nm, utilizando um leitor de microplacas (Sunrise, Tecan, Manndorf, Suíça). Os valores de IC₅₀ foram calculados utilizando o programa GraphPad Prism 5.0. A droga utilizada como controle positivo foi a doxorubicina.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Dentre os métodos mencionados na introdução para a geração de diversidade química de metabólitos secundários, sintetizados por micro-organismos, o uso de planejamento experimental tem se mostrado como uma alternativa viável. A otimização das condições de cultivo levam ao incremento da produção dos metabólitos secundários minoritários. Estes podem ser de muito interesse para eventualmente se obter análogos e testar suas atividades biológicas, ou para melhor se conhecer a natureza destas substâncias e assim conhecer sua biossíntese, ou simplesmente se buscar diversidade química como fonte de inspiração para síntese orgânica, por exemplo. Assim, neste trabalho desenvolvemos metodologia de otimização da produção de metabólitos relacionados às curvularinas por *Penicillium* sp. DR(F)2, de maneira a melhor explorar a capacidade de produção metabólica desta linhagem.

A aplicação da metodologia multicritério permitiu obter os valores de desejabilidade global (D) para a otimização da produção dos extratos das frações 2 (F2) e 3 (F3) de cada experimento de crescimento do fungo *Penicillium* sp., bem como para a obtenção otimizada das duas frações conjuntamente (Tabela 4). Estes são os resultados para resposta conjunta dos 3 parâmetros avaliados (massa das frações, área e número de picos cromatográficos gerados por estas frações). Observa-se que a condição do experimento 7 é a melhor para obtenção otimizada de F2 pois apresenta o maior valor de desejabilidade (0,66). Já para obter-se a F3 de formada otimizada, a melhor condição é a do experimento 11 (0,69). Considerando-se a obtenção das F2 e F3 de forma conjunta [(D)F2F3] o experimento 11 é o que apresenta maior valor de desejabilidade (0,65). As condições dos experimentos 7 e 11 estão apresentadas na tabela 5.

Tabela 4 – Escala de desejabilidade por fração para cada experimento de acordo com a resposta conjunta dos parâmetros, área e número de picos nos cromatogramas e massa das frações.

Experimento	(D)F2	(D)F3	(D)F2F3	Experimento	(D)F2	(D)F3	(D)F2F3
1	0,26	0,56	0,38	9	0,58	0,41	0,49
2	0,28	0,16	0,21	10	0,37	0,25	0,31
3	0,39	0,15	0,24	11	0,61	0,69	0,65
4	0,55	0,51	0,53	12	0,36	0,12	0,21
5	0,06	0,06	0,06	13	0,13	0,30	0,20
6	0,21	0,35	0,27	14	0,36	0,18	0,25
7	0,66	0,49	0,57	15	0,36	0,25	0,30
8	0,39	0,22	0,29	16	0,64	0,30	0,44

Tabela 5 – Condições de cultivo para obter-se as frações 2 e 3 e as duas conjuntamente de forma otimizada

Variáveis						
Experimento	Frações	1 [Sais] (%)	2 Tempo (dias)	3 Temperatura (°C)	4 Agitação (RPM)	5 [Nutrientes] (%)
7	F2	10%	35	30	0	80
11	F3	10%	35	15	100	80
11	F2F3	10%	35	15	100	80

Os resultados obtidos por meio da aplicação da metodologia função de desejabilidade representam as condições ótimas levando-se em consideração somente os 16 experimentos realizados. Esta metodologia deve ser complementada com o cálculo dos efeitos, pois sozinha não permite fazer previsões a cerca de experimentos não realizados. Neste trabalho foi feito um planejamento fatorial fracionário no qual o número de experimentos foi a metade do planejamento fatorial completo. Utilizou-se uma meia fração de um planejamento fatorial 2^5 ($1/2 \times 2^5 = 2^{-1} \times 2^5 = 2^{5-1} = 2^4 = 16$). Desta forma, foram realizados 16 experimentos, metade

daqueles realizados em um planejamento fatorial completo $2^5 = 32$. Para fazer previsões sobre possíveis resultados de experimentos não realizados é necessário realizar o cálculo dos efeitos principais e de interação de segunda ordem (Tabela 6) com as respostas obtidas dos 16 experimentos do PFF

Tabela 6 – Valores dos efeitos principais (1 variável) e de interação de segunda ordem (2 variáveis) para as frações 2 e 3 e para as duas conjuntamente

Efeitos Fração F2	valores	Efeitos Fração F3	valores	Efeitos para as frações F2F3 juntas	valores
(2)(4)	-0,08	(1)	-0,12	(4)(5)	-0,09
(3)	-0,07	(4)(5)	-0,11	(3)	-0,07
(4)(5)	-0,06	(1)(4)	-0,08	(1)	-0,06
(1)(2)	-0,03	(1)(5)	-0,07	(2)(4)	-0,06
(3)(4)	-0,03	(3)	-0,07	(1)(4)	-0,05
(1)(4)	0,00	(3)(4)	-0,04	(3)(4)	-0,05
(1)	0,01	(3)(5)	-0,03	(1)(2)	-0,04
(1)(5)	0,02	(1)(2)	-0,03	(1)(5)	-0,03
(3)(5)	0,04	(2)(4)	-0,02	(3)(5)	-0,01
(4)	0,08	(4)	-0,02	(4)	0,02
(5)	0,08	(2)(3)	0,06	(1)(3)	0,07
(1)(3)	0,08	(1)(3)	0,07	(2)(3)	0,09
(2)(3)	0,11	(2)	0,08	(2)(5)	0,14
(2)(5)	0,16	(2)(5)	0,10	(2)	0,14
(2)	0,21	(5)	0,26	(5)	0,17

As melhores condições de crescimento da linhagem *Penicillium* sp. DR(F)2, determinadas pelo cálculo dos efeitos, para otimizar a produção da F2, da F3 e das frações F2 e F3 conjuntamente, estão mostradas na tabela 7. Esta tabela foi construída a partir da determinação do nível (máximo + ou mínimo -) que cada variável deve ser utilizada. A determinação do nível que deve ser utilizado, para cada variável, leva em consideração o valor absoluto do efeito e seu sinal (positivo ou negativo) (Tabela 6). Por exemplo, na determinação dos níveis das variáveis para obtenção da Fração F2 de forma otimizada, observa-se que o maior valor é igual a 0,21 (Tabela 6). Este é o efeito da variável 2 (tempo) nos experimentos de produção

de metabólitos por *Penicillium* sp. DR(F)2. Então esta variável deve ser utilizada no nível máximo (+1), ou seja, 35 dias. Utilizando-se o sinal do efeito da variável 2 como referência, determina-se o sinal dos efeitos das outras variáveis analisando-se os valores dos efeitos de interação desta com as demais. O valor do efeito (2)(5), que é o efeito de interação entre a variável 2 (tempo) e 5 (concentração de nutriente), é igual a 0,16. Este valor é positivo. Logo, o sinal para o efeito desta variável é positivo $[(+1) \times (+1) = +1]$. Assim, a variável 5 (concentração de nutriente) também deve ser utilizada no seu nível máximo (+1), bem como a variável 3 (temperatura), pois o efeito (2)(3) é igual a 0,11. O valor do efeito de interação entre a variável 4 e a variável 2 (efeito (2)(4) é negativo (-0,08). Logo, a variável 4 (agitação) deve ser utilizada no seu nível mínimo (-1), ou seja, sem agitação. O mesmo é observado para a variável 1 (concentração de sais). O efeito de interação desta variável com a variável de referência (efeito (2)(1) é negativo, então esta variável também deve ser utilizada no seu nível mínimo (-1), ou seja, 10% de sais. Desta forma é estabelecida a 1ª linha da tabela 7, em que para otimizar a produção da fração 2 obtida por EFS do meio de cultura, o fungo deve ser cultivado sob as seguintes condições: em um meio no qual a concentração de sais (variável 1) seja 10% (-1), o tempo de cultivo a ser utilizado (variável 2) deve ser de 35 dias (+1), a temperatura de cultivo (variável 3) 30° C (+1), sem agitação (-1) (variável 4) e a concentração de nutrientes no meio de cultura (variável 5) deve ser de 80% (+1). Estas condições são satisfeitas pelo experimento 7. É interessante notar que tanto a função de desejabilidade, quanto a aplicação do cálculo dos efeitos, determinaram que o experimento 7 é aquele que apresenta as melhores condições para obtenção otimizada da F2 da extração em fase sólida do meio de cultura do fungo *Penicillium* sp..

Tabela 7 – Condições de cultivo para obter-se as frações 2 e 3 e as duas conjuntamente de forma otimizada

		Variáveis				
Experimento	Frações	1 [Sais] (%)	2 Tempo (dias)	3 Temperatura (°C)	4 Agitação (RPM)	5 [Nutrientes] (%)
7	F2	10%	35	30	0	80
17	F3	10%	35	15	0	80

17	F2F3	10%	35	15	0	80
----	------	-----	----	----	---	----

Ao analisarmos o perfil cromatográfico obtido pela análise por HPLC-UV-MS das frações F2 e F3 relativas ao experimento 7, verificou-se que esta condição otimiza a produção de um único composto, a citrinina (**63**). No cromatograma da figura 9 verifica-se que a área do pico deste composto sobrepuja todos os outros.

63

Figura 9 - Cromatograma de análise da Fração 2, da EFS, obtida do meio de cultura do fungo *Penicillium* sp. crescido com os parâmetros do experimento 7 (tabela 2 pag. 31) em pequena quantidade conforme parte experimental pag. 32 e 33. Utilizando-se coluna e condições cromatográficas conforme parte experimental (página 29 e tabela 1)

Os resultados apresentados na tabela 7 obtidos pela aplicação da metodologia do planejamento experimental acima descrita, demonstraram que a melhor condição para obter-se a fração 3, bem como para se produzir as frações 2 e 3 de forma otimizada, conjuntamente, a partir da EFS do meio de cultura do fungo *Penicillium* sp., não foi nenhum dos 16 experimentos realizados. Esta condição, que foi determinada estatisticamente, recebeu o número de ordem 17, tornando-se o 17º

experimento e foi realizado *a posteriori*. O fato da condição ótima não ser nenhum dos 16 experimentos realizados está no fato do planejamento utilizado ser um fatorial fracionário 2^{5-1} como explicado anteriormente.

A condição ótima para a produção da fração 3 e frações 2 e 3 de forma conjunta (experimento 17) é quase idêntica a condição ótima para se produzir a fração 2 (experimento 7), porém a temperatura deve estar no nível mínimo (15° C) (Tabela 7). A condição na qual a única diferença com relação ao experimento 7 é a temperatura de 15° C, a citrinina não é produzida. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Montani et al (1988), quando foi demonstrado que a temperatura ótima para o fungo *Penicillium citrinum* produzir citrinina foi de 30° C.

Para confirmar o resultado obtido pela aplicação do planejamento experimental, a linhagem *Penicillium* sp. foi crescida segundo as condições do experimento 17 em pequena quantidade (conforme parte experimental pag. 32 e 33). Após filtração do meio de cultura, realização da EFS e análise por CLAE-UV-EM os resultados das análises das frações F2 e F3 foram comparados aos do experimento 11 (Tabela 8). Analisando-se esta tabela, bem como os cromatogramas de análise das frações 2 e 3 da EFS (Figuras 10 a 13), obtidas do meio de cultura do fungo *Penicillium* sp. crescido com os parâmetros dos experimentos 11 e 17 em pequena escala (conforme parte experimental pag. 32 e 33), pode-se verificar que os resultados do experimento 17 são ligeiramente superiores aos do experimento 11, confirmando a validade da análise estatística.

Tabela 8: Médias dos valores de massa das frações, área e número de picos cromatográficos obtidos nos experimentos 11 e 17

Experimento - Fração	Massa Média das Frações (mg)	Área Média dos Picos (mV*Sec)	Nº médio de Picos (Und.)
11- F2	17,77	5,64	7,00
17- F2	22,50	5,94	8,60
11- F3	5,40	6,52	7,00
17- F3	7,20	7,55	9,00

Figura 10- Cromatogramas de análise da fração 2 da EFS, obtida do meio de cultura do fungo *Penicillium* sp. crescido conforme os parâmetros do experimento 11 (tabela 2 pag. 31) em pequena quantidade conforme parte experimental pag. 32 e 33. Utilizando-se coluna e condições cromatográficas conforme parte experimental (página 29 e tabela 1)

Figura 11- Cromatogramas de análise da fração 2 da EFS, obtida do meio de cultura do fungo *Penicillium* sp. crescido com os parâmetros do experimento 17 (tabela 2 pag. 31) em pequena quantidade conforme parte experimental pag. 32 e 33. Utilizando-se coluna e condições cromatográficas conforme parte experimental (página 29 e tabela 1)

Figura 12 - Cromatograma de análise da Fração 3, da EFS, obtida do meio de cultura do fungo *Penicillium* sp. crescido com os parâmetros do experimento 11 (tabela 2 pag. 31) em pequena quantidade conforme parte experimental pag. 32 e 33. Utilizando-se coluna e condições cromatográficas conforme parte experimental (página 29 e tabela 1)

Figura 13 - Cromatograma de análise da Fração 3, da EFS, obtida do meio de cultura do fungo *Penicillium* sp. crescido com os parâmetros do experimento 17 (tabela 2 pag. 31) em pequena quantidade conforme parte experimental pag. 32 e 33. Utilizando-se coluna e condições cromatográficas conforme parte experimental (página 29 e tabela 1)

É interessante notar que a única diferença entre as condições destes dois experimentos é a ausência de agitação no experimento 17. Ou seja, o cultivo do fungo *Penicillium* sp. e a produção de compostos foi melhor sem agitação do que com agitação. Pode-se inferir que sob agitação formaram-se "*pellets*" com a superfície lisa ("*smooth pellets*") que apresentavam o interior oco "*hollow pellets*". Os quais realmente foram observados. Segundo WHITAKER e LONG (1973), a estrutura do "pellet" é composta pela região periférica onde estão as células mais jovens que são capazes de se reproduzir. Na região intermediária situam-se células mais velhas. O núcleo, ou "*core*", dos pellets é composto por esporos e células não viáveis, as quais podem sofrer lise, dando origem aos "pellets" ocos ("*hollow pellets*"). Em um experimento realizado com o fungo *Aspergillus terreus* em fermentador de 5 litros, foi observado que a utilização de agitação a 425 rpm aparentemente causou danos extensos à cultura por cisalhamento. Isto foi evidenciado por meio de análise microscópica nas quais foram observados "pellets" desgastados. Quando foi usada agitação maior do que 425 rpm, as hifas quebradas pareciam não voltar a crescer e assim não contribuíam para formação da lovastatina. Utilizando-se agitação a 325 rpm a produção de lovastatina foi 29% ou 33% maior do que usando 225 rpm ou 425 rpm, respectivamente (LAI et. al., 2005). Estes resultados sugerem que a agitação deve ser ajustada de forma a permitir a oxigenação do meio de cultivo sem, contudo danificar as hifas. No nosso estudo é possível que a agitação tenha causado algum dano às hifas justificando uma menor produção dos compostos em relação ao modo estático de cultivo. Outra hipótese é a de que em modo estático a oxigenação do meio de cultivo é limitada levando a uma condição de estresse oxidativo do fungo em crescimento.

5.2 CRESCIMENTO EM MÉDIA ESCALA E PRÉ-PURIFICAÇÃO DOS EXTRATOS (E11)23 E (E17)23

O fungo *Penicillium* sp. crescido sob as condições do experimento 11 em maior quantidade (2L) produziu 987 e 66 mg de massa seca das frações 2 e 3 após extração em fase sólida do meio de cultivo, respectivamente. Já o crescimento sob as condições do experimento 17, produziu 1,1 g e 224,6 mg de massa seca das frações 2 e 3 após extração em fase sólida do meio de crescimento, respectivamente. Estes resultados comprovam o previsto pela análise multivariada

que apontou as condições de crescimento do experimento 17 como as melhores para a obtenção da fração 3 da EFS de forma otimizada. A análise realizada pelo cálculo dos efeitos principais e de interação de segunda ordem permitiu a identificação das condições ótimas de crescimento para produção das frações F2 e F3 da EFS, a partir da realização de um planejamento fatorial fracionário, ou seja, com a realização de metade dos experimentos necessários para um planejamento fatorial completo.

Desta forma, as frações F2 e F3 obtidas da EFS do meio de crescimento nas condições do experimento 11 foram reunidas com as frações F2 e F3 obtidas da EFS do meio de crescimento nas condições do experimento 17. A fração reunida foi designada (11+17)23, a qual foi fracionada por cromatografia de permeação em gel (Sephadex LH-20, MeOH como eluente), levando à obtenção de 5 frações (Figura 14). As frações (11+17)23-D e (11+17)23-E foram as que apresentaram maior massa. A soma das massas destas duas frações correspondeu a 63,8% da massa total fracionada.

Figura 14 – Fluxograma do fracionamento das frações (E11)23 e (E17)23 por cromatografia de permeação em gel (Sephadex LH-20).

5.3 FRACIONAMENTO E PURIFICAÇÃO DAS FRAÇÕES OBTIDAS APÓS CROMATOGRAFIA DE PERMEAÇÃO EM GEL

5.3.1 Fracionamento da fração (11+17)23-D

Novo fracionamento da fração (11+17)23-D (627,3 mg) foi realizado por cromatografia em coluna de permeação em gel (Sephadex LH20), levando à obtenção de 4 frações (Figura 15). A fração (11+17)23-D2 foi a que apresentou maior massa 251,7 mg, seguida pela fração (11+17)23-D4 119,5 mg.

Figura 15 - Fluxograma do fracionamento da fração (11+17)23-D por cromatografia de permeação em gel (Sephadex LH-20).

5.3.1.1 Fracionamento da fração (11+17)23-D

O fracionamento cromatográfico da fração (11+17)23-D2 foi realizado por CLAE-UV, utilizando-se uma coluna semi-preparativa de fase reversa C₁₈ ODS2 e MeOH/MeCN/H₂O acidificados com 0,1 % de ácido fórmico como eluente em modo gradiente de 50% a 100% da fase orgânica (MeOH/MeCN 1:1) em água durante 25 minutos e fluxo 1,5 mL por minuto. Foram obtidas cinco frações denominadas (11+17)23-D2A à (11+17)23-D2E (Figura 16). Destas, a fração (11+17)23-D2-D foi a que apresentou maior massa (78,5 mg). A análise por CLAE-UV-EM das frações indicou que a fração (11+17)23-D2A não apresentou picos com absorção no ultravioleta após a varredura em diversos comprimentos de onda. Na fração (11+17)23-D2E foram encontrados os compostos anteriormente isolados por Mizuno, a curvulona B e 10,11-dehidrocurvularina. Assim, estas frações não foram

priorizadas e foram deixadas para o final. As demais frações foram purificadas, os resultados encontram-se nos subitens seguintes.

Figura 16 - Fluxograma das frações obtidas da separação cromatográfica CLAE-UV da fração (E11)23-D2 em coluna semipreparativa de fase reversa C₁₈ ODS-2.

5.3.1.1.1 Fracionamento da fração (11+17)23-D2B

A fração (11+17)23-D2B foi fracionada por CLAE-UV utilizando-se uma coluna analítica ODS-3 e MeOH/H₂O acidificados com 0,1% de ácido fórmico como eluente, em modo isocrático na proporção 20:60, com fluxo de 1,0 mL por minuto. Foram obtidas 10 frações (Figura 17). Nenhuma delas demonstrou estar pura e foram sucessivamente repurificadas. A repurificação da fração (11+17)D2B9 por CLAE-UV foi realizada utilizando-se a coluna analítica X-Terra de 250 mm de comprimento e MeOH/H₂O acidificados com 0,1% de ácido fórmico como eluente, em modo isocrático na proporção de 44:46 com fluxo 1,0 mL por minuto. Foi obtida a fração pura (11+17)23-D2B9B (0,3 mg) (Figura 17) a qual foi enviada para análises espectroscópicas.

Figura 17 - Fluxograma das frações obtidas da separação cromatográfica CLAE-UV da fração (E11)23-D2B em coluna analítica de fase reversa C₁₈ ODS-3.

5.3.1.1.2 Purificação da fração (11+17)23-D2C

A fração (11+17)23-D2C foi purificada por CLAE-UV utilizando-se coluna analítica X-Terra de 250 mm e MeOH/H₂O acidificados com 0,1% de ácido fórmico como eluente, em modo gradiente de 30% a 50% da fase orgânica (MeOH) em H₂O durante 45 minutos com fluxo 1 mL/min. Foram obtidas 8 frações (Figura 18). Somente a fração (11+17)23-D2C7 (6,7 mg) mostrou estar pura e foi enviada para análises espectroscópicas. As demais frações foram purificadas mas não foi possível obter compostos puros a partir delas.

Figura 18 – Fluxograma das frações obtidas da separação cromatográfica CLAE-UV da fração (E11)23-D2C em coluna analítica de fase reversa C₁₈ X-Terra de 250 mm de comprimento.

5.3.1.1.3 Purificação da fração (11+17)23-D2D

A fração (11+17)23-D2D foi purificada por CLAE-UV utilizando-se coluna analítica X-terra de 250 mm de comprimento e MeOH/H₂O como eluente, em modo gradiente de 30% a 45% da fase orgânica (MeOH) em H₂O durante 25 minutos com fluxo 1,0 mL/min. Foram obtidas 6 frações (Figura 19). As frações (11+17)23-D2D4 (47,5 mg) e (11+17)23-D2D6 (2,1 mg) mostraram estar puras e foram enviadas para análises espectroscópicas.

Figura 19 – Fluxograma das frações obtidas da separação cromatográfica CLAE-UV da fração (E11)23-D2D em coluna analítica de fase reversa C₁₈ X-terra.

5.3.1.2 Fracionamento da fração (11+17)23-D3

No fracionamento da fração (11+17)23-D3 por CLAE-UV utilizou-se coluna semi-preparativa ODS2 e MeOH/MeCN/H₂O acidificados com 0,1 % de ácido fórmico como eluente, em modo gradiente de 50% a 100% da fase orgânica (MeOH/MeCN 1:1) em água durante 25 minutos com fluxo de 1,5 mL por minuto. Foram obtidas 10 frações (Figura 20). Estas foram sucessivamente repurificadas. A repurificação das frações (11+17)23-D3I e (11+17)23-D3J levaram à obtenção de compostos puros.

Figura 20 – Fluxograma das frações obtidas da separação cromatográfica CLAE-UV da fração (E11)23-D3 em coluna semipreparativa de fase reversa C₁₈ ODS-2

5.3.1.2.1 Purificação da fração (11+17)23-D3I

A fração (11+17)23-D3I foi purificada utilizando-se CLAE-UV e a coluna analítica X-Terra de 250 mm de comprimento e MeOH/H₂O acidificados com 0,1% de ácido fórmico como eluente, em modo gradiente de 40% a 55% da fase orgânica (MeOH) em água durante 30 minutos, com fluxo 1,0 mL/min. Foram obtidas 3 frações (Figura 21). A fração (11+17)23-D3I2 mostrou estar pura e foi enviada para análises espectroscópicas.

Figura 21 – Fluxograma das frações obtidas da separação cromatográfica CLAE-UV da fração (E11)23-D3I em coluna analítica de fase reversa C₁₈ X-terra.

5.3.1.2.2 Fracionamento e purificação da fração (11+17)23-D3J

O fracionamento da fração (11+17)23-D3J foi realizado por CLAE-UV, utilizando-se a coluna preparativa C8-4 e MeOH/H₂O acidificados com 0,1 % de ácido fórmico como eluente, em modo isocrático na proporção 47:53 e com fluxo 7,0 mL/min. Foram obtidas 7 frações (Figura 22). As frações foram purificadas e duas levaram à obtenção de frações puras. A repurificação da fração (11+17)23-D3J6 foi realizada por CLAE-UV utilizando-se a coluna analítica X-terra de 250 mm e MeOH/H₂O acidificados com 0,1% de ácido fórmico como eluente, em modo isocrático na proporção de 1:1, com fluxo de 1,0 mL/min. Foram obtidas as frações puras (11+17)23-D3J6A e (11+17)23-D3J6B (Figura 22). Já a repurificação da fração (11+17)23-D3J7 por CLAE-UV foi utilizada a mesma coluna e MeOH/H₂O acidificados com 0,1% de ácido fórmico como eluente, em modo gradiente de 60% a 66% da fase orgânica (MeOH) em H₂O durante 20 minutos. Como resultado, obteve-se a fração pura (11+17)23-D3J7B. As frações puras foram enviadas para análises espectroscópicas.

Figura 22 – Fluxograma das frações obtidas da separação cromatográfica CLAE-UV da fração (E11)23-D3J em coluna preparativa de fase reversa C₈ C8-4

5.3.1.2.3 Fracionamento da fração (11+17)23-D4

A fração (11+17)23-D4 (119,5 mg) foi fracionada por CLAE-UV utilizando-se coluna semi-preparativa ODS2 e MeOH/MeCN/H₂O acidificados com 0,1 % de ácido fórmico como eluente, em modo gradiente de 50% a 100% da fase orgânica (MeOH/MeCN 1:1) em H₂O durante 25 minutos com fluxo de 1,5 mL/min. Foram obtidas 5 frações (Figura 23). A fração (11+17)23-D4E foi a que apresentou maior massa (85,4 mg). A análise por CLAE-UV-EM demonstrou que esta fração apresentava uma mistura da 10,11-dehidrocurvarina e da curvulona B e não foi subsequentemente purificada.

Figura 23 – Fluxograma das frações obtidas da separação cromatográfica CLAE-UV da fração (11+17)23-D4 em coluna semi-preparativa de fase reversa C₁₈ ODS2

5.3.2 Fracionamento da fração (11+17)23-E

A fração (11+17)23-E foi fracionada por CLAE-UV utilizando-se coluna preparativa de fase reversa C₈ Inertsil GL Sciences C8-4, 250 mm de comprimento por 14 mm de diâmetro com 5 µm de tamanho da partícula e MeOH/H₂O acidificados com 0,1 % de ácido fórmico como eluente, em modo gradiente de 30% a 100% da fase orgânica (MeOH) em água durante 30 minutos, com fluxo 7,0 mL por minuto. Foram obtidas 6 frações (Figura 24).

Figura 24 – Fluxograma das frações obtidas da separação cromatográfica CLAE-UV da fração (E11)23-E em coluna preparativa de fase reversa C₈ C8-4

5.3.2.1 Fracionamento da fração (11+17)23-E2

A fração (11+17)23-E2 foi fracionada utilizando-se a coluna preparativa de fase reversa C₈ Inertsil da marca GL Sciences C8-4, 250 mm de comprimento por 14 mm de diâmetro com 5 µm de tamanho da partícula e MeOH/H₂O acidificados com 0,1 % de ácido fórmico como eluente, em modo isocrático na proporção de 38:62 e fluxo 7,0 mL/min. Foram obtidas 6 frações (Figura 25). As frações (11+17)23-E2E (32,1 mg) e a fração (11+17)23-E2F (61,2 mg) foram as que apresentaram maior massa. Estas foram repurificadas; porém, somente a fração (11+17)23E2F forneceu uma fração pura.

Figura 25 – Fluxograma das frações obtidas da separação cromatográfica CLAE-UV da fração (E11)23-E2 em coluna preparativa de fase reversa C₈ C8-4

5.3.2.1.1 Purificação da fração (11+17)23-E2F

A fração (11+17)23-E2F foi purificada por CLAE-UV, utilizando-se a coluna preparativa de fase reversa C₈ Inertsil da marca GL Sciences C8-4, 250 mm de comprimento por 14 mm de diâmetro com 5 µm de tamanho da partícula e MeOH/H₂O acidificados com 0,1 % de ácido fórmico como eluente, em modo isocrático na proporção de 40:60, com fluxo 7,0 mL/min. Foram obtidas 10 frações (Figura 26). A partir da fração (11+17)23-E2F6 foram obtidas duas frações puras as quais foram enviadas para análises espectroscópicas.

Figura 26 - Fluxograma das frações obtidas da separação cromatográfica CLAE-UV da fração (E11)23-E2 em coluna preparativa de fase reversa C₈ C8-4

5.3.2.2 Fracionamento da fração (11+17)23-E5

A fração (11+17)23-E5 foi fracionada por CLAE-UV utilizando-se a coluna preparativa de fase reversa C₈ Inertsil da marca GL Sciences C8-4, 250 mm de comprimento por 14 mm de diâmetro com 5 µm de tamanho da partícula e MeOH/H₂O acidificados com 0,1 % de ácido fórmico como eluente, em modo isocrático na proporção de 1:1 e fluxo 7,0 mL/min. Foram obtidas 9 frações (Figura 27).

Figura 27 – Fluxograma das frações obtidas da separação cromatográfica CLAE-UV da fração (E11)23-E5 em coluna preparativa de fase reversa C₈ C8-4

A fração (11+17)23-E5H foi analisada por CLAE-UV-EM e verificou-se que esta apresentava a mistura de 10,11-dehidrocurvularina e curvulona B, sendo muito semelhante à fração (11+17)23-D4E. Estas frações foram reunidas, mas não foram priorizadas para purificação por apresentarem os compostos 10,11-dehidrocurvularina e curvulona B já descritos na literatura.

A massa total obtida pela soma das frações (11+17)23-D4E e (11+17)23-E5H foi igual a 365,8 mg. Estas frações não foram purificadas, mas contêm os compostos 10,11-dehidrocurvularina e curvulona B como majoritários. Indicando que estes compostos foram produzidos em grande quantidade.

O somatório das áreas dos picos destes dois compostos, no cromatograma de análise da fração 3 da extração em fase sólida do meio de cultivo do fungo *Penicillium* sp, sob as condições padrões de crescimento, foi igual 2,74 KV*Sec. Já na condição otimizada (experimento 17) esta área foi igual a 6,0 KV*Sec, significando um aumento de 218% na área dos picos destes compostos.

5.4 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DOS COMPOSTOS INÉDITOS ISOLADOS

5.4.1 10,11-Epoxicurvularina

A fração (11+17)23-E2F6A foi analisada por CLAE-UV-EM e por RMN- ^1H e demonstrou estar pura. Seu espectro de massas de alta resolução em modo eletrospray positivo apresentou um pico de íon molecular protonado $[\text{M}+\text{H}]^+$ em m/z 307,11883, um pico do íon do aduto de sódio $[\text{M}+\text{Na}]^+$ em m/z 329,10063 (Figura 28), que correspondem à fórmula $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_6$, com índice de deficiência de hidrogênio (IDH) igual a 8.

Figura 28 - Espectro de massas de alta resolução em modo eletrospray positivo da fração (E17)23-E2F6A .

Seu espectro de RMN de ^1H (Anexo A fig. 106-108) apresentou dois sinais característicos de hidrogênios ligados a carbono sp^2 em δ 6,32 ($J = 1,9$ Hz) e δ 6,19 ($J = 2,1$ Hz), cinco sinais de hidrogênios localizados próximos a grupos funcionais mais eletronegativos em δ 3,0 e δ 4,6, seis hidrogênios metilênicos em δ 1,0 e δ 2,0 e uma metila dubleto em δ 1,11.

No espectro de RMN ^{13}C (Anexo A fig. 109) podem ser observados sinais em δ 204,8 característico de carbonila de cetona ou aldeído, em δ 173,2 característico de carbonila de éster ou ácido, em δ 162,3 e δ 159,7 característicos de carbonos de anel aromático substituído por oxigênio, sinais em δ 135,8, 120,2, 111,2 e 102,9 característicos de carbonos de anel aromático, sinais em δ 75,4, 63,8 e 62,0 característicos de carbonos ligados a oxigênio, sinais em δ 39,4, 35,1, 33,7 e 22,2 de carbonos alifáticos e um sinal em δ 20,7 atribuído à metila.

A análise conjunta dos espectros COSY, HMBC e HSQC (Anexo A Pag 110, 111 e 112) indicou a presença de correlações entre os hidrogênios do grupo metila em δ 1,1 e o hidrogênio metínico em δ 4,54, entre este último e os hidrogênios metilênicos em δ 1,44, por sua vez acoplados a outro metileno em δ 1,72. Este grupo metileno mostrou estar conectado a outro grupo metileno em δ 1,02. No espectro HMBC foram observadas correlações entre os hidrogênios da metila em δ 1,1 e do metileno em δ 1,44 com o carbono em δ 75,4, entre o grupo metileno em δ 1,44 com o carbono δ 22,0, bem como entre o metileno em δ 1,02 com os carbonos em δ 75,4 e 35,1, indicando a semi-estrutura I da figura 29.

Figura 29 - Semi estrutura I do composto (11+17)23-E2F6A (flechas azuis indicam correlações ^1H - ^1H observadas no espectro COSY; flechas vermelhas indicam correlações à longa distância ^1H - ^{13}C observadas no espectro HMBC).

No espectro HMBC (Anexo A pag. 112) também foram observadas correlações entre o metileno em δ 1,92 com os carbonos em δ 22,2, δ 63,8 e δ 62,0, entre o hidrogênio em δ 3,13 com o carbono em δ 33,7, bem como entre o hidrogênio em δ 3,83 com o carbono da carbonila em δ 204,8 sugerindo a semi estrutura II (Figura 30).

Figura 30 - Semiestrutura II do composto (11+17)23-E2F6A (flechas vermelhas indicam correlações à longa distância ^1H - ^{13}C observadas no espectro HMBC).

No espectro COSY (Anexo A pag. 110) foram observadas correlações entre os hidrogênios aromáticos em δ 6,19 e 6,32, e no espectro HMBC foram observadas correlações entre o hidrogênio em δ 6,19 com os carbonos em δ 162,3, 159,7, 120,2 e 111,2, além de correlações entre o hidrogênio em δ 6,32 com os carbonos em δ 162,3, 120,2 e 102,9. Os valores das constantes de acoplamento dos hidrogênios do anel benzênico ($J = 2,4$ Hz) confirmam uma relação *meta* dos mesmos, sugerindo a semi estrutura da figura 31.

Figura 31 - Semi estrutura com anel aromático IV do composto (11+17)23-E2F6A (flechas vermelhas indicam correlações à longa distância ^1H - ^{13}C observadas no espectro HMBC).

No espectro HMBC (Anexo A pag.112) foram observadas correlações entre os hidrogênios em δ 3,57, 3,08 e 4,54 com o carbono da carbonila em δ 173,2 conforme a semi estrutura V mostrada na figura 32. Estas informações permitem concluir que o composto apresenta uma lactona macrocíclica. Além disso, o número de deficiência de hidrogênios (8) apresentado pela fórmula molecular nos leva a deduzir que os carbonos em 62,0 e 63,8 devem estar substituídos por oxigênio e, portanto, devem formar um epóxido entre si. As informações apresentadas acima permitiram a identificação da estrutura planar do composto **64**, como apresentado na figura 33.

Figura 32 - Semi estrutura V do composto isolado na fração (11+17)23-E2F6A

Figura 33 - Estrutura planar do composto **64** (10,11-epoxicurvularina) isolado na fração (11+17)23-E2F6A

Os deslocamentos químicos em δ 3,83 e 3,13 sugeriram a presença de um grupo epóxido ligado ao hidrogênio CH-10 e CH-11. A constante de acoplamento observada entre estes hidrogênios ($J = 1,9$ Hz) não permite estabelecer a configuração estereoquímica do epóxido, uma vez que pode corresponder a uma configuração *trans*, que possui constantes de acoplamento com valores característicos entre 1,0 e 3,0 Hz, mas também a uma configuração *cis* cujos valores característicos estão entre 2,0 e 5,0 Hz. (PAVIA, et. al., 2010). A realização de um

experimento NOEDiff não foi conclusiva. A irradiação do hidrogênio em δ 3,83 provocou o aparecimento de um sinal que poderia corresponder a um efeito NOE entre este hidrogênio e o hidrogênio em δ 3,13 (Figura 34), porém o sinal é pouco intenso não sendo conclusivo. Desta forma estes dois hidrogênios podem estar *cis* ou *trans* um com relação ao outro. Um composto (**65**) recentemente isolado por Aly e colaboradores a partir do meio de cultura de *Penicillium* sp., foi designado 10,11-epoxicurvularina e foi representado com a configuração estereoquímica *trans* na porção epóxido (ALY et. al., 2011b). Os dados espectroscópicos obtidos para o composto da literatura são semelhantes aos nossos, indicando que possivelmente seja o mesmo composto (Tabela 9).

Figura 34 - Espectro ^1H NOEDiff (400 MHz, $\text{MeOH-}d_4$) da 10,11-epoxicurvularina (**64**). Irradiação sobre H-10 (δ 3.83) demonstrou um NOE sobre H-11 em δ 3.13

65

Tabela 9- Dados de RMN ^{13}C e ^1H do composto **64** e dados de RMN ^{13}C e ^1H obtidos da literatura do composto **65** em MeOH- d_4 [δ , multiplicidade (J em Hz)].

Posição	64^a	64^b	65^a	65^b
1	173,2		172,8	
2	39,4	3,57 (d, 18,2); 3,08 (d, 18,4)	40,0	3,87 (d,15,8); 3,37 (d,15,4)
3	135,8		136,1	
4	111,2	6,32 (d, 1,9)	111,8	6,20, (d, 2,2)
5	162,5		162,1	
6	102,9	6,19 (d, 2,1)	102,1	6,27 (d, 2,2)
7	159,7		159,9	
8	120,2		120,0	
9	204,8		203,9	
10	62,0	3,83 (d, 1,9)	61,9	4,08 (d, 1,9)
11	63,8	3,12 (ddd, 10,2, 3,0, 2,5)	63,8	2,94 (ddd, 9,8, 2,8, 2,2)
12	33,7	1,92 (m); 1,02 (m)	32,8	2,08, m; 1,16, m
13	22,2	1,77 (m); 1,02 (m)	21,5	1,60, m
14	35,1	1,72 (m); 1,44 (m)	34,0	1,76, (m); 1,58 (m)
15	75,4	4,54	74,1	4,82, m
16	20,7	1,11 (d, 6,2)	19,0	1,03 (d, 6,3)

^a125 MHz; ^b500 MHz

Segundo ALY et al. (2011b), a *trans*-10,11-epoxicurvularina (**65**) não apresentou atividade antiparasitária contra *Trypanosoma brucei* brucei S427 e atividade citotóxica avaliada sobre linhagens de células cancerígenas K562 (leucemia mielógena humana), Jurkat (leucemia de células T humanas) e U937 (linfoma histiocítico humano). A 10,11-epoxicurvularina isolada neste trabalho (**64**) teve sua atividade citotóxica avaliada em testes realizados sobre as linhagens tumorais A549 (pulmão), HeLa (cérvis) e MCF-7 (mama) e na linhagem celular normal MCF-10A (mama), mas também não apresentou atividade citotóxica.

5.4.2 Ciclotiocurvularina A

As frações (11+17)23-D2D4 e (11+17)23-J6A foram analisadas por CLAE-UV-EM, demonstrando estarem puras. No espectro de massas de alta resolução, em modo eletrospray positivo, foram observados o pico do íon molecular protonado $[\text{M}+\text{H}]^+$ em m/z 411,11299, do íon do aduto de sódio $[\text{M}+\text{Na}]^+$ em m/z 433.0940

(Figura 35). Os espectros de RMN de ^1H destas duas frações mostraram ser idênticos. Por isso as frações foram reunidas e a fração resultante recebeu a denominação (11+17)23-D2D4.

Figura 35 - Espectro de massas de alta resolução em modo eletrospray positivo da fração (E17)23-D2D4.

No espectro de RMN de ^1H da fração (11+17)23-D2D4 obtido em $\text{MeCN-}d_3$ (Anexo A pag. 114-116) foram observados dois sinais singletos característicos de hidrogênios aromáticos com valores de deslocamento químico δ 6,48 e δ 6,30. Estes sinais no espectro de RMN de ^1H obtido em $\text{MeOH-}d_4$ aparecem como dubletos com valores de deslocamento químico δ 6,45 e δ 6,22 (Anexo A pag. 122). Foram observados cinco sinais de hidrogênios localizados próximos a elementos mais eletronegativos com valores de deslocamento químico na região entre δ 2,88 e δ 4,68, seis hidrogênios metilênicos com valores de deslocamento químico entre δ 1,0 e δ 2,0 e uma metila dubleto com deslocamento químico δ 1,18 (Anexo A pag. 114-116). Tais características indicam que o composto presente nesta fração pertence à mesma classe estrutural da 10,11-epóxicurvularina (**64**).

No espectro de RMN ^{13}C (Anexo A pag. 117) foi observado sinal em δ 209,3 característico do grupo carbonila de cetona similar ao observado em **64**, sinais em δ 174,8 e 171,3 característicos de carbonila de éster ou ácido, sinais em δ 161,5 e δ 159,0 característicos de carbonos de anel aromático substituídos por grupo hidroxila, sinais em δ 136,2, 121,7, 111,9 e 103,2 característicos de carbono de anel aromático, sinais em δ 75,4, 63,8 e 62,0 característicos de carbonos localizados próximos a átomos mais eletronegativos, sinais em δ 40,8, 38,3, 34,6, 31,2 e 27,3 característicos de carbonos metilênicos alifáticos e sinal em δ 21,6 atribuído ao carbono da metila.

No espectro COSY (Anexo A pag. 118) foram observadas correlações entre o hidrogênio metínico em δ 4,64 com os hidrogênios do grupo metileno em δ 1,68 e com os hidrogênios do grupo metila em δ 1,18. Também foi observada a correlação entre os hidrogênios em δ 1,46 com o hidrogênio δ 4,64. Foram igualmente observadas correlações entre os hidrogênios δ 4,11 e 1,38 com os hidrogênios 3,88 e 1,55, respectivamente. Tais correlações indicaram a presença das subestruturas A e B (Figura 36).

Figura 36 - Subestruturas do composto isolado na fração (11+17)23-D2D4 (flechas azuis indicam correlações ^1H - ^1H observadas no espectro COSY).

Foram observadas correlações no espectro HMBC (Anexo A pag. 120) do hidrogênio em δ 4,64 com os carbonos em δ 27,0 e 171,0. Também correlações dos

hidrogênios em δ 1,46 e 1,68 com o carbono em δ 34,0 que sugerem a semi-estrutura I mostrada na figura 37. No espectro COSY (Anexo A pag. 118) foram observadas correlações entre os hidrogênios aromáticos δ 6,30 e 6,48. No espectro HMBC (Anexo A pag. 120) também foram observadas correlações entre os hidrogênios em δ 4,0 e 3,16 com o carbono em δ 171,0, do hidrogênio em δ 6,30 com o carbono em δ 38,0 e dos hidrogênios aromáticos δ 6,30 e 6,48 com o carbono em δ 121,0. Tais correlações indicam a semi-estrutura II com o anel aromático mostrada na figura 37.

Figura 37 - Semi estrutura I e II do composto isolado na fração (11+17)23-D2D4 (flechas azuis indicam correlações ^1H - ^1H observadas no espectro COSY; flechas vermelhas indicam correlações à longa distância ^1H - ^{13}C observadas no espectro HMBC).

O espectro HMBC (Anexo A pag. 120) apresentou ainda correlação do carbono em δ 209,0 com os hidrogênios aromáticos em δ 6,30 e δ 6,48 e também com o hidrogênio em δ 3,88, bem como do carbono em δ 27,0 com o hidrogênio em δ 3,88. Já no espectro COSY (Anexo A pag. 118) foram observadas correlações

entre o hidrogênio em δ 3,88 com o hidrogênio em δ 4,11 e com os hidrogênios em δ 1,38 e δ 1,55. Estas informações sugeriram a semi-estrutura III (Figura 38).

Figura 38 - Semi estrutura III do composto isolado na fração (11+17)23-D2D4 (flechas azuis indicam correlações ^1H - ^1H observadas no espectro COSY; flechas vermelhas indicam correlações à longa distância ^1H - ^{13}C observadas no espectro HMBC).

A análise do espectro HMBC também indicou correlações entre o hidrogênio δ 2,91 e o carbono em δ 209,0 e correlações dos hidrogênios em δ 4,11 e 3,88 com o carbono da carbonila em δ 174,0. Foram observadas também correlações dos hidrogênios δ 2,91, 3,43 e 4,11 com um carbono quaternário em δ 87,0. Os dados obtidos e descritos acima, bem como a ausência de deslocamentos químicos que evidenciam a presença de um éster na região descrita, sugerem que a carbonila ligada ao carbono δ 174,0 seja uma carbonila de ácido carboxílico que está ligado ao carbono δ 87,0 e por sua vez substituído por um grupo hidroxila (Figura 39).

Figura 39 - Semi estrutura IV do composto isolado na fração (11+17)23-D2D4 (flechas vermelhas indicam correlações à longa distância ^1H - ^{13}C observadas no espectro HMBC).

A análise da semi estrutura IV (Figura 39) demonstrou que todos os carbonos foram atribuídos. A semi estrutura IV apresentou massa molecular igual a 378,0 Da restando 32,0 Da para se chegar à massa exata 411.11299 Da, determinada pela análise do espectro de massas de alta resolução. Verificou-se que a massa restante era condizente com a presença de um átomo de enxofre na estrutura, indicando a formação de um anel 3-hidroxitetrahidrotiofeno-3-ácido carboxílico. Desta forma, chegou-se à estrutura do composto **66** (Figura 40) denominada ciclotiocurvarina A. A presença do resíduo de ácido 2-hidroxi-3-mercaptopropanóico condensado à cadeia policetí dica foi confirmada pela realização de experimento de incorporação de [U-¹³C¹⁵N]cisteína, realizado com a linhagem *Penicillium* sp., pela aluna de mestrado Laura Pavan Ióca, orientada pelo Prof. Roberto G. S. Berlinck.

Figura 40 - Estrutura do composto 66 (ciclotiocurvarina A) isolado na fração (11+17)23-D2D4

A configuração relativa na junção cíclica entre o anel tetrahidrotiofeno e o anel macrocíclico não pôde ser estabelecida com base na constante de acoplamento $J = 11,0-11,2$ Hz medida entre H-10 e H-11, uma vez que tanto uma junção *cis* ou *trans* seriam responsáveis por tal valor da constante de acoplamento. A configuração relativa nesta junção foi estabelecida por análise do espectro NOESY (Anexo A pag. 124) da ciclotiocurvarina A, que mostrou um acoplamento dipolar entre H-17a em δ 3,43 com o hidrogênio CH-10 em δ 4,11 (Figura 41), mas não entre os hidrogênios CH₂-17 com CH-11 ou entre CH-10 e CH-11. Os mesmos resultados foram obtidos por uma série de experimentos NOEDiff (Anexo A pag. 125 e 126), sugerindo uma junção *trans* entre os dois anéis.

Figura 41 - Estereoquímica relativa do composto ciclотиоcурварина A (flechas pretas indicam correlações NOE observadas nos espectros NOEDiff e NOESY).

5.4.3 Éster metílico da Ciclотиоcурварина A

O composto **67** isolado na fração (11+17)23-D3J7B apresentou dados de RMN de ^1H e ^{13}C muito semelhantes aos obtidos para a ciclотиоcурварина A (**66**) realizados em MeOH-d_4 (Anexo A página 127 e 132) exceto pela presença de um sinal singlete em δ 3,62 no espectro ^1H (Figura 42) e no espectro ^{13}C presença do sinal de um carbono adicional em δ 53,34, e redução do valor de deslocamento químico da carbonila do ácido carboxílico de 176,6 para 174,4 (Figura 43).

Figura 42 - Espectro de RMN ^1H da fração (E17)23-D3J7B em $\text{MeOH-}d_4$ (400 MHz)

Figura 43 - Espectro de RMN ^{13}C da fração (E17)23-D3J7B em $\text{MeOH-}d_4$ (100 MHz)

Sendo assim, verificou-se que o composto **67** corresponde ao éster metílico da ciclотиоcурvularina B. A análise de seu espectro de massas de alta resolução indicou um pico do íon molecular protonado $[\text{M}+\text{H}]^+$ em m/z 425,12865 e o íon aduto de sódio $[\text{M}+\text{Na}]^+$ em m/z 447,10943 (Figura 44). Estas informações são condizentes com a presença de 14 unidades de massa a mais em **67** do que na ciclотиоcурvularina A (**66**).

Figura 44 - Espectro de massas modo eletrospray positivo do composto 67

A presença da metoxila pôde ser confirmada pelas correlações observadas no espectro HMBC (Anexo A pag. 135). Os hidrogênios da metila δ 3,62 correlacionam-se a longa distância com o carbono em δ 174,9 (Figura 45). Desta forma, a estrutura do composto **67** (Figura 45) é a do éster metílico da ciclotiocurvarina A.

Figura 45 - Correlações a longa distância dos hidrogênios da metoxila e carbonos e estrutura do composto **67** (flechas azuis correlações à longa distância ^1H - ^{13}C observadas no espectro HMBC).

Como os dados de RMN dos compostos ciclотиocurricularina A (**66**) e do seu éster metílico (**67**) foram praticamente idênticos, assumiu-se a mesma estereoquímica para os mesmos. O espectro NOESY de **66** mostrou um acoplamento dipolar entre H-17a em δ 3,43 e H-10 em δ 4,10, mas não foi observado NOE entre CH₂-17 e CH-11 ou entre CH-10 e CH-11. Além disso, a análise por mecânica molecular utilizando Chem3D MM2 indicou que, se o grupo éster metílico estivesse na posição relativa *trans*-pseudo-axial em relação ao CH-10, estaria muito perto de CH-11 e deveria apresentar um efeito NOE, que, no entanto não é observado nos experimentos NOESY ou NOEDiff (Anexo A pag. 136-138). Por isso, assumiu-se que a orientação do éster metílico é *cis*-pseudo-equatorial em relação à CH-10 (Figura 46).

Figura 46 - Estereoquímica relativa dos compostos **66** e **67**.

5.4.4 Ciclотиocurricularina B e seu respectivo éster metílico

As frações (11+17)23-D2C7 e (11+17)23-D3I2 apresentaram espectros de RMN de ¹H idênticos e foram reunidas. Após a identificação da substância presente nas frações reunidas, esta mostrou ser o composto **68**, estereoisômero distinto da ciclотиocurricularina A (**66**). No espectro de massas do composto **68**, modo eletrospray positivo, foram observados o pico do íon molecular protonado [M+H]⁺ em *m/z* 411,09614 e do íon aduto de sódio [M+Na]⁺ em *m/z* 433,07643 (Figura 47).

Figura 47 - Espectro de massas modo eletrospray positivo do composto **68**

O composto **68** apresentou a mesma fórmula molecular da ciclotiocurvarina A (**66**) (C₁₉H₂₂O₈S). Os dados de RMN de **68** e **66** mostraram ser muito semelhantes. Foram observadas as alterações mais significativas para os deslocamentos químicos atribuídos para o grupamento metila CH₃-16 e o CH-15 metino, sugerindo uma estereoquímica diferente em C-15, bem como em C-10 e C-11.

Os espectros NOESY e NOEDiff de **68** mostraram acoplamentos dipolares tanto entre H-10 e H-17a como entre H-10 e H-17b. No entanto, não foi observado efeito NOE entre H-10 e H-11, bem como entre o H-17a e H-11 ou entre H-17b e H-11 (Anexo A pag. 146). Desta forma, considerou-se que a posição relativa *trans*-vicinal entre H-10 e H-11 ocorre como na ciclotiocurvarina A (**66**), porém oposta a esta. Assim a estereoquímica relativa da ciclotiocurvarina A e do seu éster metílico deve ser C-10(S*), C-11(S*), C-18(R*). Já a estereoquímica do composto **68** é C-10(R*), C-11(R*), C-18(R*) (Figura 48). A configuração estereoquímica em C-15 não foi determinada.

Figura 48 - Estereoquímica relativa dos compostos 66, 67 e 68.

5.4.5 Ciclosulfóxicurvularina

A fração pura (11+17)23-D2D6 foi analisada por CLAE-UV-EM, demonstrando estar pura. Em seu espectro de massas de alta resolução, em modo eletrospray positivo, foram observados o pico do íon molecular protonado $[M+H]^+$ em m/z 427.1049 e do íon aduto de sódio $[M+Na]^+$ em m/z 449.0855 (Figura 49), que correspondem à fórmula $C_{19}H_{22}O_9S$, deduzida conjuntamente por comparação dos dados de RMN deste composto (**69**) com os dados dos compostos **66-68**.

Figura 49 - Espectro de massas modo eletrospray positivo do composto **69**.

A estrutura planar do composto **69** foi deduzida por análise dos espectros de ^1H , ^{13}C , COSY, HSQC e HMBC (Anexo A pag. 147-154). As principais diferenças observadas nos espectros de ^1H e ^{13}C do composto **69** quando comparado com os compostos **66**, **67** e **69** (Tabela 10) foram os valores de deslocamentos do carbono C-10 (δ_c 58,4) mais blindado do que nos compostos **66-68** ($64,0 < \delta_c < 64,9$), o carbono 11 mais desblindado em **69** (δ_c 59,8) em comparação com **66-68** ($49,8 < \delta_c < 50,4$), bem como o CH_2 -17 mais desblindado em **69** (δ_c 65,5) do que nos compostos **66-68** ($40,9 < \delta_c < 41,2$).

Tabela 10 - Dados de RMN ^{13}C e ^1H para os compostos **66**, **67** e **69** [δ , multiplicidade (J em Hz)].

Posição	66 ^a	66 ^b (MeOH- d_4)	67 ^a	67 ^b (MeOH- d_4)	69 ^a	69 ^b (MeOH- d_4)
1	172,5		172,7		170,6	
2	38,5	4,13 (d, 11,9); 3,12 (d, 11,9)	38,7	4,07 (d, 12,1); 3,01 (d, 12,0)	37,6	4,10 (d, 7,9); 3,15 (d, 8,0)
3	136,3		136,4		135,2	
4	111,8	6,45 (d, 1,9)	112,1	6,35 (d, 2,4)	110,9	6,34 (d, 1,4)
5	162,8		163,1		161,4	
6	103,6	6,22 (d, 1,9)	103,1	6,13 (d, 2,2)	102,8	6,23 (d, 1,4)
7	160,5		160,4		159,5	
8	121,7		121,7		119,6	
9	209,7		209,8		205,9	
10	64,0	4,27 (d, 11,0)	64,9	4,04 (d, 11,2)	58,4	4,55 (d, 8,3)
11	50,0	3,93 (t, 11,5)	50,4	3,84 (dt, 2,2, 11,3)	59,8	3,50 (dt, 8,0)
12	34,9	1,66 (m); 1,36 (m)	35,5	1,55 (m); 1,28 (m)	22,4	1,70 (m); 1,26 (m)
13	27,7	1,50 (m)	28,1	1,44 (m)	24,5	1,49 (m); 1,43 (m)
14	31,5	1,73 (m); 1,42 (m)	31,8	1,65 (m); 1,37 (m)	30,6	1,75 (m); 1,52 (m)
15	76,3	4,64 (m)	76,5	4,56 (m)	74,7	4,62 (m)
16	21,7	1,21 (d, 6,3)	22,0	1,11 (d, 6,3)	21,6	1,11 (d, 6,3)
17	40,9	3,45 (d, 11,4); 2,92 (d, 11,4)	41,0	3,48 (d, 11,4); 2,80 (d, 11,5)	65,5	3,90 (d, 9,1); 2,68 (d, 8,9)
18	88,0		87,5		84,0	
19	176,6		174,4		173,0	
20-OCH ₃			53,3	3,62 (s)		

^a100 MHz; ^b400 MHz

As mudanças discutidas acima, juntamente com a verificação de 16 unidades de massa adicionais (que corresponde a um átomo de oxigênio) no espectro de massas de **69**, sem que tenha sido detectada a presença de qualquer carbono adicional substituído com oxigênio, levou-nos a estabelecer a presença de um grupo sulfóxido em **69**. Esse composto foi denominado ciclosulfóxicurvularina (Figura 50).

Figura 50 - Estrutura da ciclosulfóxicurvularina (**69**).

Por analogia ao composto **69**, a fração (11+17)23-D2B9B foi analisada por espectrometria de massas de alta resolução, modo eletrospray positivo, tendo sido observados pico do íon molecular protonado $[M+H]^+$ em m/z 441.11859 e do íon aduto de sódio $[M+Na]^+$ em m/z 463.09964 (Figura 51) indicando a fórmula molecular $C_{20}H_{24}O_9S$, sugerindo a presença de um grupo metila adicional. Essa hipótese foi confirmada pela observação de um grupo éster metílico ligado a C-19, com deslocamento químico em δ_H 3,62 (s) / δ_C 53,3. Analisando-se os espectros HSQC e HMBC foi confirmada esta atribuição. O composto **70** foi nomeado como o éster metílico do composto ciclosulfóxicurvularina (Figura 52).

Figura 51 - Espectro de massas modo eletrospray positivo do composto **70**.

Figura 52 - Estrutura do éster metílico da ciclosulfóxycurvularina **70**.

Os resultados dos experimentos NOEDiff (Anexo A pag. 160) nos quais o hidrogênio em δ 3,72 (CH11) foi irradiado demonstraram que houve efeito NOE nos hidrogênios em δ 4,02 e δ 3,13 (CH 17a) e (CH 17b), respectivamente. Porém no

espectro de RMN de ^1H do composto **70** o sinal do hidrogênio CH10 estava ausente e no espectro de ^{13}C o sinal em δ 59,8, relativo ao C-10, apresentava-se alargado e com baixa intensidade. Apesar do composto **70** ser mais estável que o composto **69** os dados não foram conclusivos para se estabelecer a sua configuração relativa.

As três novas ciclотиocurricularinas e as duas ciclosulfoxicurricularinas são compostos macrocíclicos que possuem uma estrutura incomum na qual existe um átomo de enxofre na estrutura.

As penicilinas (**71**), as cefalosporinas (**72**) e cefamicinas (**73**) são antibióticos β -lactâmicos que também apresentam átomo de enxofre na estrutura. Na biossíntese destes compostos são utilizados três aminoácidos como precursores: o ácido L- α -aminoadípico, a L-cisteína e a L-valina que formam o tripeptídeo ACV que é o precursor dos antibióticos β -lactâmicos (Figura 53) (RAMOS, et. al., 1985; OLIVEIRA, et. al. 2009).

Figura 53 – Esquema geral da biossíntese das penicilinas, cefalosporinas e cefamicinas

A origem dos átomos de carbono na estrutura das penicilinas são os aminoácidos, assim como a origem do átomo de enxofre que é originário do aminoácido cisteína. Já os compostos isolados nesse trabalho são policetídeos, formados pela condensação de unidades acetato, ou malonato e acetato. Mas o átomo de enxofre também é originário da cisteína, via uma condensação da lactona macrocíclica com mercaptolactato (ou mercaptopiruvato), confirmado por estudos de biossíntese das ciclotiocurvularinas recentemente concluídos por Laura P. Ióca, aluna de mestrado orientada pelo Prof. Roberto G. S. Berlinck. Estes resultados confirmam as suspeitas de Meng, et. al. (2013) que isolaram a partir do fungo *Penicillium sumatrense* as sumularinas A, B e C (**74-76**). Os autores sugerem que o átomo de enxofre nestes compostos seja proveniente da cisteína via 3-mercaptolactato. Para formação do 3-mercaptolactato, a cisteína sofre transaminação formando mercaptopiruvato, e este pela ação da lactato desidrogenase é convertido a mercaptolactato, o qual seria condensado à curvularina formando as sumularinas (Figura 54) (ADELIN et. al., 2012).

Figura 54 - Esquema de formação de mercaptolactato e sua condensação à 10,11-dehidrocurvularina

A reação de condensação do mercaptolactato a compostos endógenos ou xenobióticos é pouco comum. Segundo Adelin et. al. (2012) o único composto relatado na literatura que sofre esta reação é a cisteína, formando mercaptolactato cisteína dissulfeto. Estes autores estudaram a biotransformação de produtos naturais utilizando o fungo *Aspergillus niger* e observaram pela primeira vez que este micro-organismo catalisou a condensação de mercaptolactato a um composto. Segundo eles o significado biológico desta tio-conjugação ainda não está claro, mas pode ser um mecanismo de proteção similar aquela da glutathione redutase.

A condensação entre compostos com enxofre e compostos endógenos ou xenobióticos envolve a participação da enzima glutathione-S-transferase (CUMMINS et. al., 2011). No caso dos compostos isolados em nosso trabalho, a enzima responsável poderia ser uma "S-transferase" específica, ou seja, mercaptolactato-S-transferase ou mercaptopiruvato-S-transferase.

Na fase I do metabolismo de drogas que ocorre em células humanas e micro-organismos, enzimas do tipo citocromo P450 catalisam a introdução de um grupo funcional, normalmente um epóxido, na estrutura do xenobiótico para posterior ação da glutathione-S-transferase. Este grupo funcional oferece um centro eletrofílico que é atacado pela glutathione reduzida (GSH) (**71**) em uma reação catalisada pela enzima glutathione-S-transferase (GST) (Figura 55) (SHERRATT e HAYES, 2001).

Figura 55 – Esquema ilustrando a ligação da glutathione ao xenobiótico por meio de uma enzima glutathione S-transferase

As ciclocurvularinas obtidas neste trabalho podem ser produtos de um processo de desintoxicação das células do fungo. Fazendo-se uma análise em paralelo com a reação catalisada pela glutathiona-S-transferase demonstrada acima, é possível que o composto 10,11-dehidrocurvularina (**26**) seja um composto que ofereça o centro eletrofílico (dupla ligação conjugada com a carbonila) para ação de uma enzima glutathiona-S-transferase. O produto da condensação, curvularina-glutathiona, poderia sofrer ação da enzima γ -glutamato-transpeptidase, que elimina glutamato. O conjugado restante cisteinil-glicil-curvularina pode sofrer ação da enzima aminopeptidase que elimina a glicina, resultando em uma “cisteína-curvularina”. Outra possibilidade que poderia levar à formação do complexo “cisteína-curvularina” ou do complexo “mercaptopiruvato-curvularina” seria a condensação direta de uma cisteína ou do mercaptopiruvato ao anel da lactona por meio de uma S-transferase. A cisteína condensada poderia sofrer a reação de transaminação formando “mercaptopiruvato-curvularina”. O carbono da carbonila do mercaptopiruvato poderia reagir com um carbono da lactona formando o anel tetrahidrotiofeno levando à formação das ciclотиocurvularinas e derivados (Figura 56).

Figura 56 – Esquema de uma possível via de biotransformação da 10,11-dehidrocurvularina em ciclотиocurvularina via glutathiona-S-Transferase (GST) ou uma S-transferase específica.

Existe ainda a possibilidade de que ocorra a condensação direta do mercaptopiruvato ao anel da lactona através de uma reação espontânea destes compostos com a 10,11-dehidrocurvularina numa reação semelhante à sugerida por Meng e colaboradores (2013) (Figura 57). O composto de massa 411 Da é observado nas frações da extração em fase sólida, mas não pôde ser isolado.

Figura 57 - Esquema de condensação do mercaptopiruvato ou cisteína à 10,11-dehidrocurvularina

A glutathione está frequentemente envolvida em processos de detoxificação celular, mas atua também em várias reações redox, tais como a formação de ligações de dissulfeto nas proteínas e a destruição de peróxidos e radicais livres. Esta função confere à glutathione efeitos antioxidantes que impedem o dano oxidativo dos sistemas bioquímicos no qual participa (CHAKRAVARTHI et. al., 2006; RODRIGUES NETO, 2010).

A exposição das células de um organismo a condições ambientais adversas desencadeia um processo de resposta para minimizar os danos celulares. A via KEAP1 / NRF2, é um mecanismo de defesa celular essencial que protege a célula de eletrófilos e espécies reativas de oxigênio. Esta via regula diversos genes, os mais antigos conhecidos são aqueles que produzem enzimas da fase II, que participam do metabolismo e transporte de xenobióticos e compostos celulares tais como glutathione S-transferases (GSTs), NAD(P)H:quinona oxidoreductase 1 (NQO1), epóxido hidrolase e UDP glicoronosiltransferases. Outro mecanismo de defesa é

controlado pelo fator de transcrição denominado fator de regulação do choque térmico (Heat Shock Factor 1 - HSF1), que protege a célula em condições de estresse proteotóxico agudo e crônico e preserva a integridade do proteoma. Os reguladores KEAP1, NRF2 e HSF1 são ativados por pequenas moléculas (indutores) que têm como pré requisito a capacidade de reagir com centros sulfidrilas. Para isto é fundamental que o indutor tenha centro eletrofílico (DINKOVA-KOSTOVA, 2012).

Gunatilaka e colaboradores (2012) avaliaram 80.000 compostos dentre produtos naturais, sintéticos e extratos parcialmente purificados para verificar a atividade sobre o fator de regulação do choque térmico HSF1. Eles verificaram que a maioria dos compostos que apresentaram atividade eram produtos naturais representando cinco diferentes classes químicas (limonóides, curvularinas, vitanolides, celastraloides e coletofragarones). Além disso, todos estes compostos possuíam um sistema carbonil α,β -insaturado com um forte potencial de reatividade com grupos tiol. A 10,11-dehidrocurvularina demonstrou atividade de pico de indução do choque térmico em 5 μ M, enquanto a curvularina que não possui o sistema α,β -insaturado foi inativa.

Pode-se especular que as condições ótimas estabelecidas por meio do planejamento experimental tenham levado a um estado de estresse celular ou problemas na homeostase celular e isto levou a um aumento da produção de 10,11-dehidrocurvularina. Não está claro se a 10,11-dehidrocurvularina é um indutor dos sistemas KEAP1 / NRF2 e HSF1 que ativaria estes sistemas como resposta ao estresse. As quantidades foram muito elevadas para justificar uma simples sinalização celular intermediada por este composto. Por outro lado a glutathione-S-transferase e outras enzimas da via KEAP1 / NRF2 atuam no sentido de neutralizar nucleófilos. Pode ser que este seja um mecanismo de desligamento do indutor. Porém se o estímulo para defesa permanecer constante, a produção de 10,11-dehidrocurvularina pode ser disparada e estes sistemas podem atuar num ciclo vicioso para manter a homeostase. Os compostos formados podem ser o resultado do processo de desintoxicação das células do fungo por meio da ação da enzima glutathione-S-transferase, uma das enzimas da fase II ativada pelo sistema KEAP1 / NRF2. Os resultados dos testes de citotoxicidade corroboram isto, uma vez que as ciclotiocurvularinas e as sulfóxicurvularinas não apresentaram efeito citotóxico sobre

as linhagens de células tumorais avaliadas, sendo possivelmente um produto da neutralização do indutor. (Item 5.5 pag. 89).

5.4.6 Curvulona B e 10,11-Dehidrocurvularina

Os compostos 10,11-dehidrocurvularina (**26**) e seu derivado curvulona B (**62**) foram obtidos em diversas frações. Uma mistura destes dois compostos foi obtida em grande quantidade nas frações (11+17)23-D4E (80 mg) e (11+17)23-E5H (280 mg). A massa destas frações somou 380,0 mg. Isto demonstra que estes foram os compostos majoritários produzidos pela linhagem *Penicillium* sp. nas condições otimizadas obtidas no planejamento experimental. Em seu trabalho Mizuno (2010) obteve 0,3 mg do composto curvulona B e menos de 10 mg do composto 10,11-dehidrocurvularina.

intramolecular, levando à formação da curvulona B, sendo este um artefato de isolamento (Figura 58). Os compostos foram identificados por comparação de seus dados de espectrometria de massas de alta resolução e RMN com dados da literatura (JIANG et. al., 2008; DAI et. al., 2010).

Figura 58 – Esquema mostrando a abertura da lactona 10,11-dehidrocurvularina por transesterificação ácida e posterior adição de Michael intramolecular levando a formação da curvulona B

5.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA E ANTI-INFLAMATÓRIA DOS COMPOSTOS PRODUZIDOS POR *PENICILLIUM* SP. DR(F)2

A atividade citotóxica dos compostos 10,11-dehidrocurvularina (**26**), curvulona B (**62**) e dos compostos **66-70** foi avaliada em testes realizados sobre linhagens de células tumorais A549 (pulmão), HeLa (cérvix) e MCF-7 (mama) e na linhagem celular normal MCF-10A (mama).

Os compostos 10,11-dehidrocurvularina e curvulona B foram testados em duas frações, uma contendo uma mistura dos dois compostos (MVC-P5) e outra quase pura (MVC-322), contendo curvulona B, mas ainda pequena contaminação com a 10,11-dehidrocurvularina. Foi observada atividade citotóxica seletiva. As

células tumorais de pulmão (A549) foram as menos sensíveis, apresentando os maiores valores de IC_{50} 37,87 e 37,7 para as frações MVC-322 e MVC-P5, respectivamente (Tabela 11). As células de mama apresentaram IC_{50} intermediário sendo que as células normais foram mais sensíveis que as células tumorais. Já as células tumorais da linhagem HeLa (cérnix) mostraram-se bastante sensíveis frente as frações testadas. A fração MVC-322 apresentou boa atividade citotóxica IC_{50} 7,32 e a fração MVC-P5 potente atividade citotóxica IC_{50} 1,52, sobre esta linhagem de células (Tabela 11). É interessante observar que a fração contendo maior concentração do composto curvulona B apresentou atividade citotóxica muito semelhante à atividade apresentada pela mistura dos compostos curvulona B e 10,11-dehidrocurvularina. Isto indica que não houve efeito sinérgico entre os dois compostos no sentido de aumentar a citotoxicidade. Com exceção dos resultados obtidos para linhagem mais sensível (HeLa), sobre a qual pode ter ocorrido este efeito ou os resultados observados devem-se ao efeito da maior concentração de 10,11-dehidrocurvularina na fração MVC-P5 (Tabela 10).

Tabela 11 – Valores de IC_{50} das frações MVC-322 e MVC-P5 em teste de atividade citotóxica.

Frações	Linhagem Celular (IC_{50} -mM)			
	A549 (câncer de Pulmão)	HeLa (câncer de Cervix)	MCF-7 (câncer de mama)	MCF-10A (mama normal)
MVC-322	37,8 ± 0,61	7,32 ± 0,42	14,6 ± 2,2	10,38 ± 0,93
MVC-P5	32,7 ± 0,43	1,52 ± 0,09	12,35 ± 2,1	10,2 ± 0,83

He et. al. (2004) testaram a atividade citotóxica de diferentes (+)-(15S) curvularinas sobre 4 linhagens de células tumorais utilizando o método colorimétrico a base de tetrazólio (MTT) e Greve et. al. (2008) testaram a atividade citotóxica de diferentes (+)-(15R)-curvularinas sobre 36 linhagens de células tumorais utilizando a metodologia de iodeto de propídio monocamada modificado. Os valores de IC_{50} para cada uma das linhagens testadas foram obtidos e a média destes valores foi calculada. Estes testes apesar de utilizarem metodologias diferentes, revelaram que as dehidrocurvularinas independentemente da configuração em torno do carbono 15 foram os compostos que apresentaram os menores valores de IC_{50} 1,25 e 1,7 μ M (TABELA 12). Nos testes de citotoxicidade realizados em nosso trabalho os valores de

IC₅₀ para as linhagens avaliadas não foram tão significativos (IC₅₀ 32,7 e 12,35), mas a 10,11-dehidrocurvularina não se encontrava pura talvez isto tenha afetado sua atividade. Por outro lado o resultado obtido para linhagem HeLa corrobora os encontrados na literatura visto que a fração contendo maior concentração de 10,11-dehidrocurvularina foi mais ativa que a fração mais pura contendo maior concentração de curvulona B. Indicando que a 10,11-dehidrocurvularina deve ser o composto que apresenta potente atividade citotóxica sobre a linhagem de células tumorais HeLa.

O estado de oxidação do anel da lactona exerce influência na atividade citotóxica dos compostos da classe das curvularinas. Nos resultados obtidos por He, et. al. (2004) a metóxicurvularina IC₅₀ 0,9 µM foi mais ativa que a hidroxicurvularina IC₅₀ 2,87 µM (TABELA 12). Resultado semelhante foi observado em nosso trabalho onde a ciclotiocurvularina A (**66**) após ser metilada apresentou aumento da atividade citotóxica, verificada pela redução do valor de IC₅₀ que passou de > 1000 µM para 284,4 µM, ou seja, cerca de 5 vezes mais ativa que a forma natural do composto. Já de acordo com os resultados obtidos por Greve, et. al. (2008) a presença de uma hidroxila ligada ao carbono 13 da 10,11-dehidrocurvularina diminuiu sua atividade 24 vezes (TABELA 12). Além disso, os resultados obtidos por Meng, et. al. (2013) demonstraram que a curvularina não apresentou atividade citotóxica sobre as 7 linhagens de células tumorais avaliadas enquanto a 10,11-dehidrocurvularina apresentou media de IC₅₀ igual a 6,0 µM. Fica claro que a presença da dupla ligação em C-10 é crucial para atividade citotóxica da 10,11-dehidrocurvularina.

Tabela 12 – Média dos valores de IC₅₀ das (15S) e (15R) curvularinas obtidos em testes de atividade citotóxica, sobre linhagens de células tumorais, realizados por He, et. al. (2004) e Greve, et. al. (2008).

CURVULARINAS	MÉDIA DOS VALORES DE IC ₅₀ (µM)
(+)-(15S)-10,11-Dehidrocurvularina	1,7
(+)-(15S)-11-Metóxicurvularina	0,9
(+)-(15S)-11-Hidroxicurvularina	2,87
(+)-(15R)-10,11-Dehidrocurvularina	1,25
(+)-(15R)-13-Hidroxi-10,11-Dehidrocurvularina	30,06

Os compostos **64** e **66-70** apresentaram valores de IC₅₀ maiores que 900 µM (Tabela 13), ou seja, não apresentaram atividade citotóxica. Mas a sumalarina C apresentou média de IC₅₀ igual a 6,8 µM em testes de atividade citotóxicas realizados sobre 7 linhagens de células tumorais (MENG, et al., 2013).

Tabela 13 – Valores de IC₅₀ em teste de atividade citotóxica dos compostos **64**, **66 -70** e do composto **66** metilado por reação com diazometano.

Compostos	Linhagens Celulares (IC ₅₀ - µM)			
	A549 (câncer de Pulmão)	HeLa (câncer de colo do útero)	MCF-7 (câncer de mama)	MCF10A (mama normal)
Doxorrubicina	0,19	0,14	0,12	0,4
Ciclotiocurvularina A Metilada	>1000	284.4 ± 0.14	> 1000	829.3 ± 0.061
Éster metílico da Ciclotiocurvularina A (67)	>1000	983.4 ± 0.26	> 1000	>1000
10,11-epoxicurvularina (64)	>1000	>1000	>1000	>1000
Ciclosulfóxicurvularina (69)	>1000	964.2 ± 0.14	>1000	>1000
Ciclotiocurvularina B (68)	>1000	>1000	>1000	>1000
Ciclotiocurvularina A (66)	>1000	>1000	>1000	>1000

A sumalarina C difere das ciclotiocurvularinas A e B por apresentar o mercaptolactato condensado à lactona, mas não fundido a ela, sendo esta a única característica que a difere destes compostos. Isto evidencia que a presença do anel tetrahidrotiofeno originado pela fusão do composto mercaptolactato à lactona, levou à perda da atividade citotóxica.

A ciclotiocurvularina A (**66**) teve sua atividade anti-inflamatória avaliada (Figura 59), porém não apresentou atividade. A modulação da produção de NO₂ de forma dose dependente não foi observada. É interessante salientar que dentre os compostos naturais da classe das curvularinas somente a curvularina apresenta

atividade anti-inflamatória relatada na literatura (YAO, et. al., 2003; ELZNER et. al., 2008; SCHMIDT et. al., 2012).

Figura 59 – Gráfico do efeito de concentrações crescentes da ciclotiocurvarina A sobre a produção de NO_2 por macrófagos

* Significativo em relação ao Meio ($p < 0,05$).

Significativo em relação ao controle de LPS ($p < 0,05$).

ND = Não detectável.

6 CONCLUSÕES

A aplicação da metodologia de planejamento experimental e análise multivariada permitiram a seleção de condições ótimas de cultivo que levaram à geração de maior diversidade química e maior rendimento de compostos do metabolismo secundário produzidos pela linhagem de fungo do gênero *Penicillium* sp isolada do ambiente marinho.

Neste trabalho foi possível incrementar a produção de uma diversidade de compostos do metabolismo secundário do fungo *Penicillium* sp. e isto permitiu o isolamento e identificação dos compostos, contendo enxofre os quais são raros na literatura.

As condições estabelecidas pelo planejamento experimental levaram à otimização da produção do composto 10,11-dehidrocurvularina que durante o processamento das amostras converteu-se em curvulona B. Foram obtidos mais de 250 mg da mistura de 10,11-dehidrocurvularina e curvulona B. A área do pico relativa a estes dois compostos foi aumentada em 218% em relação à condição padrão.

Foram isoladas três novas ciclotiocurvularinas (**ciclotiocurvularina A e B e o éster metílico da ciclotiocurvularina A**) e duas ciclosulfóxicurvularinas (**ciclosulfóxicurvularina e seu éster metílico**). Compostos macrocíclicos inéditos na literatura que possuem uma estrutura incomum na qual um resíduo de ácido 2-hidroxi-3-mercaptopropanoico (mercaptopiruvato) forma um anel tetrahidrotiofeno fundido ao anel macrocíclico. Além de ser isolada uma 10,11- epóxicurvularina.

Os compostos inéditos na literatura bem como a 10-11-epóxicurvularina não apresentaram atividade citotóxica, sobre as linhagens de células tumorais testadas.

7 REFERÊNCIAS

- ADELIN, E.; MARTIN, M. T.; BRICOT, M. F.; CORTIAL, S.; RETAILLEAU, P.; OUAZZANI, J. Biotransformation of natural compounds: unexpected thio conjugation of Sch-642305 with 3-mercaptolactate catalyzed by *Aspergillus Niger* ATCC 16404 cells. **Phytochemistry**, v. 84, p. 135-140, 2012.
- ALY, A .H.; DEBBAB, A.; PROKSCH, P. Fifty years of drug discovery from fungi. **Fung. Div.**, v. 50, p. 3–19, 2011a.
- ALY A, A. H.; DEBBAB A, A.; CLEMENTS C.; EBEL R. E.; ORLIKOVA B.; DIEDERICH M.; WRAY, V.; LIN, W.; PROKSCH, P. NF kappa B inhibitors and antitrypanosomal metabolites from endophytic fungus *Penicillium* sp. isolated from *Limonium tubiflorum* **Bioorg. Med. Chem.**, v. 19, p. 414-421, 2011b.
- ARAI K.; RAWLINGS, B. J.; YOSHIKAWA, Y.; VEDERAS J. C. Biosyntheses of antibiotic A26771B by *Penicillium turbatum* and dehydrocurvularin by *Alternaria cinerariae*: comparison of stereochemistry of polyketide and fatty acid enoyl thiol ester reductases. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 111, p. 3391-3399, 1989.
- ASAI, T.; CHUNG, Y. M.; SAKURAI, H.; OZEKI, T.; CHANG, F. R.; WU, Y. C.; YAMASHITA, K.; OSHIMA, Y. Highly oxidized ergosterols and isariotin analogs from an entomopathogenic fungus, *Gibellula formosana*, cultivated in the presence of epigenetic modifying agents **Tetrahedron**, v. 68, p. 5817-5823, 2012.
- BARROS NETO, B.; SCARMÍNIO, J. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: aplicações na Ciência e na Indústria**. Porto Alegre: Bookman, 2010. 407 p.
- BEZERRA, M. A.; SANTELLI, R. E.; OLIVEIRA, E. P.; VILLAR, L. S.; ESCALEIRA, L. A. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, v. 76, p. 965-977, 2008.
- BICALHO B.; GONCALVES R. A. C.; ZIBORDI A. P. M.; MANFIO G. P.; MARSAIOLI A. J. Antimicrobial compounds of fungi vectored by *Clusia* spp. (Clusiaceae) pollinating bees. **Z. Naturforsch. C: J. Biosci.**, v. 58, p. 746-751, 2003.
- BIRCH, A. J.; MUSGRAVE, O. C.; RICKARDS, R. W.; SMITH, H. Studies in relation to biosynthesis. Part XX. The structure and biosynthesis of curvularin. **J. Chem. Soc.**, p. 3146-3152, 1959.

BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; HUA, W. P.; MUNRO, M. H. G.; NORTHCOTE, P. T.; PRINSEP, M. R. Marine natural products. **Nat. Prod. Rep.**, v. 26, p. 170-244, 2009.

BULL, A. T.; STACH, J. E. M. Marine actinobacteria: new opportunities for natural product search and discovery. **Trends Microbiol.**, v. 15, p. 491-499, 2007.

BODE, H. B.; BETHE, B.; HÖFS, R.; ZEECK, A. Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity. **ChemBioChem**, v. 3, p. 619-627, 2002.

BUGNI, T. S.; IRELAND, C. M. Marine-derived fungi: a chemically and biologically diverse group of microorganisms. **J. Nat. Prod.**, v. 21, p. 143-163, 2004.

CAPUTO, O.; VIOLA, F. Isolation of α,β -dehydrocurvularin from *aspergillus aureofulgens*. **Planta Med.**, v. 31, p. 31-32, 1977.

CARLSON, R.; CARLSON, J. E. **Design and optimization in organic synthesis**. Second Revised and Enlarged edition. Amsterdam: Elsevier Science, 2005. 596 p. Disponível em: http://books.google.com.br/books/about/Design_and_Optimization_in_Organic_Synthesis.html?id=jwUGLZVKq1kC&redir_esc=y Acesso em: 20 dez. 2012.

CASTELLANI, A. Maintenance and cultivation of common pathogenic fungi in man in sterile distilled water, further researches, **J Trop Med Hyg**, v. 70, p. 181-184, 1967.

CHAKRAVARTHI, S.; JESSOP, C. E.; BULLEID, N. J. The role of glutathione in disulphide bond formation and endoplasmic-reticulum-generated oxidative stress. **EMBO Reports**, v. 7, p. 271-275, 2006.

CHEN, Z.; ZHENG, Z.; HUANG, H.; SONG, Y.; ZHANG, X.; MA, J.; WANG, B.; ZHANG, Z.; JU, J. Penicacids A–C, three new mycophenolic acid derivatives and immunosuppressive activities from the marine-derived fungus *Penicillium* sp. SOF07. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 22, p. 3332-3335, 2012.

CHUNG, Y. M.; WEI, C. K.; CHUANG, D. W.; SHAZLY, M. E.; HSIEH, C. T.; ASAI, T.; OSHIMA, Y.; HSIEH, T. J.; HWANG, T. L.; WUA, Y. C.; CHANG, F. R. An epigenetic modifier enhances the production of anti-diabetic and anti-inflammatory sesquiterpenoids from *Aspergillus sydowii*. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 21, p. 3866-3872, 2013.

COOMBE, R. G.; JACOBS, J. J.; WATSOW, T. R. Constituents of some *Curvularia* species. **Aust. J. Chem.**, v. 21, p. 783-788, 1968.

CUMMINS, I.; DIXON, D. P.; POHL, S. F.; SKIPSEY, M.; EDWARDS, R. Multiple roles for plant glutathione transferases in xenobiotic detoxification. **Drug Metab. Rev.**, v. 43, p. 266-280, 2011.

DAI, J.; KROHN, K.; FLÖRKE, U.; PESCIPELLI, G.; KERTI, G.; PAPP, T.; KÖVÉR, K. E.; BÉNYEI, A. C.; DRAEGER, S.; SCHULZ, B.; KURTÁN, T. Curvularin-type metabolites from the fungus *Curvularia* sp. isolated from a marine alga. **Eur. J. Org. Chem.**, v. 2010, p. 6928–6937, 2010.

DEMARE, S.; RAGHUKUMAR, C.; RAGHUKUMAR, S. Fungi in deep-sea sediments of the central Indian basin. **Deep-Sea Res. I**, v. 53, p. 14-27, 2006.

DEVARAJAN, P. T.; SURYANARAYANAN, T. S. Endophytic fungi associated with the tropical seagrass *Halophila ovalis* (Hydrocharitaceae). **Indian J. Mar. Sci.**, v. 31, p. 73-74, 2002.

DINKOVA-KOSTOVA, A. T. The role of sulfhydryl reactivity of small molecules for the activation of the KEAP1/NRF2 pathway and the heat shock response. **Scientifica**, v. 2012, p. 1-19, 2012

ELZNER S.; SCHMIDT D.; SCHOLLMAYER D.; ERKEL G.; ANKE, T.; KLEINERT H.; FÜRSTERMANN, U.; KUNZ H. Inhibitors of inducible NO synthase expression: total synthesis of (S)-curvularin and its ring homologues **Chem. Med. Chem.**, v. 3, p. 924-939, 2008.

FERREIRA, S. L. C.; SANTOS W. N. L.; QUINTELLA, C. M. ; BARROS NETO, B. ; BOSQUE-SENDRA, J. M.. Doehlert matrix: a chemometric tool for analytical chemistry **Talanta**, v. 63, n.4, p. 1061-1067, 2006

GAO, S. S.; LI, X. M.; DU, F. Y.; LI, C. S.; PROKSCH, P.; WANG, B. G. Secondary metabolites from a marine-derived endophytic fungus *Penicillium chrysogenum* QEN-24S. **Mar. Drugs**, v. 9, p. 59-70, 2011.

GAO, H.; ZHANG, L.; ZHU, T.; GU, Q.; LI, D. Unusual pyrrolyl 4-quinolinone alkaloids from the marine-derived fungus *Penicillium* sp. ghq208. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 60, p. 1458-1460, 2012.

GREVE H.; SCHUPP, P. J.; EGUEREVA, E.; KEHRAUS S.; KELTER G.; MAIER A.; FIEBIG H. H.; KÖNIG, G. M. Apralactone A and a new stereochemical class of curvularins from the marine fungus *Curvularia* sp. **Eur. J. Org. Chem.**, p. 5085-5092, 2008.

GUTIERREZ M.; THEODULOZ C.; RODRIGUEZ J.; LOLAS M.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Bioactive metabolites from the fungus *Nectria galligena*, the main apple canker agent in Chile. **J. Agric. Food Chem.**, v. 53, p. 7701–7708, 2005.

HE, F.; LIU, Z.; YANG, J.; FU, P.; PENG, J.; ZHU, W. M.; QI, S. H. A novel antifouling alkaloid from halotolerant fungus *Penicillium* sp. OUCMDZ-776 **Tetrahedron Lett.**, v. 53, p. 2280-2283, 2012.

IMHOFF, J. F.; LABES, A.; WIESE, J. Bio-mining the microbial treasures of the ocean: new natural products. **Biotechnol. Adv.**, v. 29, p. 468–482, 2011.

JENSEN, P. R.; FENICAL, W. Secondary metabolites from marine fungi. In: HYDE, K. D. **Fungi in marine environments**. Hong Kong: Fungal Diversity Press, 2002. v. 7, p. 293-315. (Fungal Diversity Research Series).

JIANG, S-J.; QIANG, S.; ZHU, Y-Z.; DONG, Y-F. Isolation and phytotoxicity of a metabolite from *Curvularia eragrostidis* and characterisation of its modes of action. **Annals of Applied Biology**, n. 152, p. 103-111, 2008.

JONES, E. B. G. Fifty years of marine mycology. **Fung. Div.**, v. 50, p. 73–112, 2011.

KELECOM, A. Secondary metabolites from marine microorganisms. **Acad. Bras. Cienc.**, v.74, p. 151-170, 2002.

KOBAYASHI, A.; HINO, T.; YATA, S.; ITOH, T. J.; SATO, H.; Kawaz, K. Unique spindle poisons, curvularin and its derivatives, isolated from *Penicillium* species. **Agric. Biol. Chem.**, v. 52, p. 3119-3123, 1988.

KOHLMEYER, J.; KOHLMEYER, E. **Marine mycology**: the higher fungi. New York: Academic Press, 1979. 704 p.

KUMAR, C. G.; MONGOLLA, P.; SUJITHA, P.; JOSEPH, J.; BABU, K. S.; SURESH, G.; RAMAKRISHNA, K. V. S.; PURUSHOTHAM, U.; SASTRY, G. N.; KAMAL, A. Metabolite profiling and biological activities of bioactive compounds produced by *Chrysosporium lobatum* strain BK-3 isolated from Kaziranga National Park, Assam, India **SpringerPlus**, v. 2, p. 1-9, 2013.

LAI, S.; SHIZURI, Y.; YAMAMURA, S.; KAWAI, K.; FURUKAWA, H. New curvularin type metabolites from the hybrid strain ME 005 derived from *Penicillium citreo-viride* B. IFO 4692 and 6200. **Bull. Chem. Soc. Jpn.**, v. 64, p. 1048-1050, 1991.

LAI, L. S. T.; TSAI, T. H.; CHI WANG, T.; CHENG, T. Y. The influence of culturing environments on lovastatin production by *Aspergillus terreus* in submerged cultures **Enzyme Microb. Technol.**, v. 36, p. 737-748, 2005.

LI, Y.; YE, D.; SHAO, Z.; CUI, C.; CHE, Y. A sterol and spiroditerpenoids from a *Penicillium* sp. isolated from a deep sea sediment sample. **Mar. Drugs**, v. 10, p. 497-508, 2012.

LIU, G. Q.; WANG, X. L.; HAN, W. J.; LIN, Q. L. Improving the fermentation production of the individual key triterpene ganoderic acid me by the medicinal fungus ganoderma lucidum in submerged culture. **Molecules**, v.17, p. 12575-12586, 2012.

LU, Z.; ZHU, H.; FU, P.; WANG, Y.; ZHANG, Z.; LIN, H.; LIU, P.; ZHUANG, Y.; HONG, K.; ZHU, W. Cytotoxic polyphenols from the marine-derived fungus *Penicillium expansum*. **J. Nat. Prod.**, v. 73, p. 911-914, 2010.

LUNDSTEDT, T.; SEIFERT, E.; ABRAMO, L.; THEILIN, B.; NYSTRÖM, A.; PETTERSEN, J.; BERGMAN, R. Experimental design and optimization. **Chemom. Intell. Lab. Syst.**, v. 42, p. 3-40, 1998.

MANZONI, M.; BERGOMI, S.; ROLLINI, M.; CAVAZZONI, V. Production of statins by filamentous fungi. **Biotechnol. Lett.**, v. 21, p. 253-257, 1999.

MENG, L. H.; LI, X. M.; LV, C. T.; LI, C. S.; XU, G. M.; HUANG, C. G.; WANG, B. G. Sulfur containing cytotoxic curvularin macrolides from *Penicillium Sumatrense* MA-92, a fungus obtained from the rhizosphere of the mangrove *Lumnitzera racemosa*. **J. Nat. Prod.**, v. 76, p. 2145-2149, 2013.

MIZUNO, C. M. **Estudos químicos e microbiológicos de micro-organismos associados à esponja marinha *Dragmacidon reticulatum*, objetivando o isolamento de metabólitos secundários bioativos**. 2010. 127 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2010.

MONTANI, M.; VAAMONDE, G.; RESNIK, S. A.; BUERA, P. Temperature influence on *Penicillium citrinum* Thorn growth and citrinin accumulation kinetics. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 7, p. 115-122, 1988.

MONTGOMERY, D. C. **Design and analysis of experiments**. 6th edition. New York: John Wiley, 2004. 643 p.

MOTOHASHI, K.; HASHIMOTO, J.; INABA, S.; KHAN, S. T.; KOMAKI, H.; NAGAI, A.; TAKAGI, M.; SHIN-YA, K. New sesquiterpenes, JBIR-27 and -28, isolated from a tunicate-derived fungus, *Penicillium* sp. **J. Antibiot.**, v. 62, p. 247-250, 2009.

MURPHY, T. E.; TSUI, K. L.; ALLEN, J. K. A review of robust design methods for multiple responses. **Res. Eng. Des.**, v. 16, p. 118-132, 2005.

MUSGRAVE, O. C. Curvularin. Part I. Isolation and partial characterisation of a metabolic product from a new species of *Curvularia*. **J. Chem. Soc.**, p.4301-4305, 1956.

OLIVEIRA, J. H. H. L.; GRANATO, A. C.; HIRATA, D. B.; HOKKA, C. O.; BARBOZA, M. Ácido clavulânico e cefamicina c: uma perspectiva da biossíntese, processos de isolamento e mecanismo de ação. **Quim. Nova**, v. 32, p. 2142-2150, 2009.

PASSOS, M. S. **Metabólitos secundários das esponjas *Aiolochoia crassa* e *Dysidea robusta* e do fungo *Aspergillus sydowii***. 2013. 104 f Dissertação (Mestrado em Química Orgânica e Biológica) – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução à Espectroscopia**. 4ª ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010.

PIMENTA, E. F.; VITA-MARQUES, A. M.; TININIS, A.; SELEGHIM, M. H. R.; SETTE, L. D.; VELOSO, K.; FERREIRA, A. G.; WILLIAMS, D. E.; PATRICK, B. O.; DALISAY, D. S.; ANDERSEN, R. J.; BERLINCK, R. G. S. Use of experimental design for the optimization of the production of new secondary metabolites by two *Penicillium* species. **J. Nat. Prod.**, v. 73, p. 1821–1832, 2010.

RAMOS, F. R.; LOPEZ-NIETO, M. J.; MARTIN, J. F. Isopenicillin N synthetase of *Penicillium chrysogenum*, an enzyme that converts δ -(L- α -aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine to isopenicillin N. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 27, p. 380-387, 1985.

RATEB, M. E.; EBEL, R. Secondary metabolites of fungi from marine habitats. **Nat. Prod. Rep.**, v. 28, p. 290-344, 2011.

RATEB, M. E.; HOUSSEN, W. E.; HARRISON, W. T. A.; DENG, H.; OKORO, C. K.; ASENJO, J. A.; ANDREWS, B. A.; BULL, A. T.; GOODFELLOW, M.; EBEL, R.; JASPARS, M. Diverse metabolic profiles of a *Streptomyces* strain isolated from a hyper-arid environment. **J. Nat. Prod.**, v. 74, p. 1965-1971, 2011.

REIS, C. Estudo comparativo da seletividade de um método cinético-catalítico: a determinação de cromo(VI) pela oxidação da o-dianisidina pelo peróxido de hidrogênio. **Quím. Nova**, v. 22, p. 189-193, 1999.

RODRIGUES, M. I.; LEMMA, A. F. **Experimental design and process optimization**. Boca Raton: CRC Press, 2015. 336 p.

RODRIGUES NETO, A. S. S. **Glutathione: envolvimento em defesa anti-oxidante, regulação de morte celular programada e detoxificação de drogas**. 2010. 66 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2010.

SALEEM, M.; ALI, M. S.; HUSSAIN, S.; JABBAR, A. ASHRAF, M. LEE, Y. S. Marine natural products of fungal origin. **Nat. Prod. Rep.**, v. 24, p. 1142-1152, 2007.

SANTAGATA, S.; XU, Y. M.; KITHSIRI WIJERATNE, E. M.; KONTRNIK, R.; ROONEY, C.; PERLEY, C. C.; KWON, H.; CLARDY, J.; KESARI, S.; WHITESELL, L.; LINDQUIST, S.; GUNATILAKA, A. A. L. Using the heat-shock response to discover anticancer compounds that target protein homeostasis. **Amer. Chem. Soc.**, v. 7, p. 340-349, 2012.

SANTOS, S. F. M.; SOUZA, R. L. A.; ALCÂNTARA, S. R.; PINTO, G. A. S.; SILVA, F. L. H.; MACEDO, G. R. Aplicação da metodologia de superfície de resposta no estudo da produção de pectinase por fermentação em estado sólido do pedúnculo de caju. **Rev. Bras. Prod. Agroind.**, v. 2, p. 101-109, 2008.

SAYYAD, S. A.; PANDA, B. P.; JAVED, S.; ALI, M. Optimization of nutrient parameters for lovastatin production by *Monascus purpureus* MTCC 369 under submerged fermentation using response surface methodology. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 73, p. 1054-1058, 2007.

SCHMIDT, N.; ART, J.; FORSCH, I.; WERNER, A.; ERKEL, G.; JUNG, M.; HORKE, S.; KLEINERT, H.; PAUTZ, A. The anti-inflammatory fungal compound (S)-curvularin reduces proinflammatory gene expression in an in vivo model of rheumatoid arthritis. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 343, p. 106-114, 2012.

SHALIGRAM, N. S.; SINGH, S. K.; SINGHAL, R. S.; PANDEY, A.; SZAKACS, G. Compactin production studies using *Penicillium brevicompactum* under solid-state fermentation conditions. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 159, p. 505–520, 2009.

SHAO, C. L.; WANG, C. Y.; GU, Y. C.; WEI, M. Y.; PAN, J. H.; DENG, D. S.; SHE, Z. G.; LIN, Y. C. Penicinoline, a new pyrrolyl 4-quinolinone alkaloid with an unprecedented ring system from an endophytic fungus *Penicillium* sp. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 20, p. 3284-3286, 2010.

SHERRATT, P. J.; HAYES, J. D. Glutathione S-transferases In: COSTAS IOANNIDES **Enzyme systems that metabolise drugs and other xenobiotics** (Eletrônico). New York: John Wiley, 2001. p. 319-352.

SILVA, E. D.; GEIERMANN, A. S.; MITOVA, M. I.; KUEGLER, P.; BLUNT, J. W.; COLE, A. L. J.; MUNRO, M. H. G. Isolation of 2-pyridone alkaloids from a New Zealand marine-derived penicillium species. **J. Nat. Prod.**, v. 72, p. 477–479, 2009.

SIIVERTSEN, E.; BJERKE, F.; ALMOY, T.; SEGTMAN, V.; NAES, T. Multivariate optimization by visual inspection. **Chemom. Intell. Lab. Syst.**, v. 85, p. 110-118, 2007.

SONG, F.; REN, B.; YU, K.; CHEN, C.; GUO, H.; YANG, N.; GAO, H.; LIU, X.; LIU, M.; TONG, Y.; DAI, H.; BAI, H.; WANG, J.; ZHANG, L. Quinazolin-4-one coupled with pyrrolidin-2-iminium alkaloids from marine-derived fungus *Penicillium aurantiogriseum*. **Mar. Drugs**, v.10, p. 1297-1306, 2012.

SUN, Y. ; TAKADA K.; TAKEMOTO Y.; YOSHIDA, M.; NOGI, Y.; OKADA, S.; MATSUNAGA, S. Gliotoxin analogues from a marine-derived fungus, *Penicillium* sp. and their cytotoxic and histone methyltransferase inhibitory activities. **J. Nat. Prod.**, v. 75, p. 111-114, 2012.

SURYANARAYANAN, T. S. The diversity and importance of fungi associated with marine sponges. **Bot. Mar.**, v. 55, p. 553-564, 2012

TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Quím. Nova**, v. 29, p. 338-350, 2006.

TRISUWAN, K.; RUKACHAISIRIKUL, V.; SUKPONDMA, Y.; PHONGPAICHIT, S.; PREEDANON, S.; SAKAYARO, J. Lactone derivatives from the marine-derived fungus *Penicillium* sp. PSU-F44. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 57, p. 1100-1102, 2009.

TURQUE, A. S.; SILVEIRA, C. B.; VIEIRA, R. P.; MURICY, G.; CARDOSO, A. M.; CLEMENTINO, M. M.; MARTINS, O. B. Micro-organismos associados a poríferos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 37, p. 64-69, 2010.

UEDA, J. Y.; HASHIMOTO, J.; INABA, S.; TAKAGI, M.; SHIN-YA, K. JBIR-59, a new sorbicillinoid, from a marine-derived fungus *Penicillium citrinum* Spl080624G1f01. **J. Antibiot.**, p. 1-3, 2010.

WANG, W. J.; LI, D. Y.; LI, Y. C.; HUA, H. M.; MA, E. L.; LI, Z. L. Caryophyllene sesquiterpenes from the marine-derived fungus *Ascotricha* sp. ZJ-M-5 by the one strain-many compounds strategy. **J. Nat. Prod.**, v. 77, p. 1367-1371, 2014.

Whitaker, A.; Long, P.A. Fungal pelleting. **Proc. Biochem.** v. 66, p. 27-31, 1973

XIE, L. W.; OUYANG, Y. C.; ZOU, K.; WANG, G. H.; CHEN, M. J.; SUN, H. M.; DAI, S. K.; LI, X. Isolation and difference in anti *Staphylococcus aureus* bioactivity of curvularin derivatives from fungus *Eupenicillium* sp. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 159, p. 284-293, 2009.

XIN, Z. H.; TIAN, L.; ZHU, T. J.; WANG, W. L.; DU, L.; FANG, Y. C.; GU, Q. Q.; ZHU, W. M. Isocoumarin derivatives from the sea squirt-derived fungus *Penicillium stoloniferum* QY2-10 and the halotolerant fungus *Penicillium notatum* B-52 of a subtidal Rhodophyte. **Am. J. of Bot.**, v. 93, p. 547-556, 2006.

XIN, Z. H.; FANG, Y.; DU, L.; ZHU, T.; DUAN, L.; GU, Q. Q.; ZHU, W. M. Aurantiomides A-C, quinazoline alkaloids from the sponge-derived fungus *Penicillium aurantiogriseum* SP0-19. **J. Nat. Prod.**, v. 70, p. 853-855, 2007.

XU, Y.; ARTILES, P. E.; SCHUBERT, V.; XU, Y. M.; ZHANG, W.; LIN, M.; GUNATILAKA, A. A. L.; SÜSSMUTH, R.; MOLNÁRA, I. Characterization of the biosynthetic genes for 10,11-dehydrocurvularin, a heat shock response-modulating anticancer fungal polyketide from *Aspergillus terreus*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 79, p. 2038-2047, 2013.

XU, J.; JIANG², C. S.; ZHANG¹, Z. L.; MA, W. Q.; GUO, Y. W. Recent progress regarding the bioactivities, biosynthesis and synthesis of naturally occurring resorcinolic macrolides. **Acta Pharmacol. Sin.**, v. 35, p. 316-330, 2014.

YANG, G.; YUN, K.; NENKEP, V. N.; CHOI, H. D.; KANG, J. S.; SON, B. W. Induced production of halogenated diphenyl ethers from the marine-derived fungus *Penicillium chrysogenum*. **Chem. Biodiv.**, v. 7, p. 2766-2770, 2010.

YAO, Y.; HAUSDING, M.; ERKEL, G.; ANKE, T.; FORSTERMANN, U.; KLEINERT, H. Sporogen, S14-95, and S-Curvularin, three inhibitors of human inducible nitric-oxide synthase expression isolated from fungi. **Mol. Pharmacol.**, v. 63, p. 383-391, 2003.

ZHAN, J.; WIJERATNE, E. M.; SELIGA, C. J.; ZHANG, J.; PIERSON, E. E.; PIERSON, L. S.; VANETTEN, H. D.; GUNATILAKA, A. A. L. A new anthraquinone and cytotoxic curvularins of a *Penicillium* sp from the rhizosphere of *Fallugia paradoxa* of the Sonoran desert. **J. Antibiot.**, v. 57, p. 341–344, 2004.

ZHANG, D.; LI, X.; KANG, J. S.; CHOI, H. D.; JUNG, J. H.; SON, B. W. Redoxcitrinin, a biogenetic precursor of citrinin from marine isolate of fungus penicillium sp. **J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 17, p. 865–867, 2007.

ANEXO A

Espectro de RMN ^1H da fração (E17)23-E2F6A - 10,11-Epoxicurvularina (**64**) em $\text{MeOH-}d_4$ (400 MHz)

Expansão 1 do espectro de RMN ^1H da fração (E17)23-E2F6A - 10,11-Epoxicurricularina (**64**) em $\text{MeOH-}d_4$ (400 MHz)

Expansão 2 do espectro de RMN ^1H da fração (E17)23-E2F6A - 10,11-Epoxicurvularina (**64**) em $\text{MeOH-}d_4$ (400 MHz)

Espectro de RMN ^{13}C da fração (E17)23-E2F6A - 10,11-Epoxicurvularina (**64**) em $\text{MeOH-}d_4$. (100 MHz)

Espectro de RMN COSY da fração (11+17)23-E2F6A) - 10,11-Epoxicurvularina (**64**) em MeOH- d_4 500 MHz

Espectro de RMN HSQC da fração (11+17)23-E2F6A) - 10,11-Epoxicurvularina (**64**) em MeOH-d₄ 500 MHz

Espectro de RMN HMBC da fração (11+17)23-E2F6A) - 10,11-Epoxicurvularina (**64**) em MeOH- d_4 500 MHz

Espectro de RMN ^1H NOEDiff da fração (E17)23-E2F6A - 10,11-Epoxicurvularina (**64**) em $\text{MeOH-}d_4$ (400 MHz). Irradiação do H-10 δ 3.83 demonstrou efeito NOE no H-11 δ 3.13.

Espectro de RMN de ^1H da fração (11+17)23-D2D4 Ciclotiocurricularina A (**66**) em $\text{MeCN-}d_3$ 400 MHz

Expansão 1 espectro de RMN de ^1H da fração (11+17)23-D2D4 Ciclotiocurvularina A (66) em $\text{MeCN-}d_3$ 400 MHz

Expansão 2 espectro de RMN de ^1H da fração (11+17)23-D2D4 Ciclotiocurvularina A (66) em $\text{MeCN-}d_3$ 400 MHz

Espectro de RMN de ^{13}C da fração (11+17)23-D2D4 Ciclotiocurvularina A (**66**) em $\text{MeCN-}d_3$ 100 MHz

Espectro de RMN COSY da fração (11+17)23-D2D4 Ciclotiocurvularina A (**66**) em MeOH- d_4 500 MHz em MeOH- d_4 500 MHz

Espectro de RMN HSQC da fração (11+17)23-D2D4 Ciclotiocurvularina A (**66**) em MeOH- d_4 500 MHz em MeOH- d_4 500 MHz

Espectro de RMN HMBC da fração (11+17)23-D2D4 Ciclotiocurvularina A (**66**) em MeOH- d_4 500 MHz em MeOH- d_4 500 MHz

Espectro de RMN de ^1H da fração (11+17)23-D2D4 Ciclotiocurricularina A (**66**) em $\text{MeOH-}d_4$ 400 MHz

Expansão 1 espectro de RMN de ^1H da fração (11+17)23-D2D4 Ciclotiocurvularina A (**66**) em $\text{MeOH-}d_4$ 400 MHz

Espectro de RMN de ^{13}C da fração (11+17)23-D2D4 Ciclotiocurvularina A (**66**) em $\text{MeOH-}d_4$ 100 MHz

Espectro de RMN NOESY da fração (11+17)23-D2D4 Ciclotiocurvularina A (**66**) em MeOH- d_4 (400 MHz).

Espectro de RMN ^1H NOEDiff da fração (11+17)23-D2D4 –Ciclotiocurvularina A (**66**) em $\text{MeOH-}d_4$ (400 MHz). Irradiação do H-10 δ 4,27 demonstrou efeito NOE no H-17a δ 3,45.

Espectro de RMN ^1H NOEDiff da fração (11+17)23-D2D4 -Ciclotiocurvularina A (**66**) em $\text{MeOH-}d_4$ (400 MHz). Irradiação do H-11 δ 3,93 não demonstrou efeito NOE no H-17a δ 3,45, H-17b δ 2,92 e H-10 δ 4,27.

Espectro de RMN de ^1H da fração (11+17)23-D3J7B éster metílico da Ciclotiocurvularina A (**67**) em $\text{MeOH-}d_4$ 400 MHz

Expansão 1 do espectro de RMN de ^1H da fração (11+17)23-D3J7B éster metílico da Ciclotiocurvularina A (**67**) em $\text{MeOH-}d_4$ 400 MHz

Expansão 2 do espectro de RMN de ^1H da fração (11+17)23-D3J7B éster metílico da Ciclotiocurvularina A (**67**) em $\text{MeOH-}d_4$ 400 MHz

Expansão 3 do espectro de RMN de ^1H da fração (11+17)23-D3J7B éster metílico da Ciclotiocurvarina A (**67**) em $\text{MeOH-}d_4$ 400 MHz

Expansão 4 do espectro de RMN de ^1H da fração (11+17)23-D3J7B éster metílico da Ciclotiocurvularina A (**67**) em $\text{MeOH-}d_4$ 400 MHz

Espectro de RMN de ^{13}C da fração (11+17)23-D3J7B éster metílico da Ciclotiocurvularina A (**67**) em $\text{MeOH-}d_4$ 100 MHz

Espectro de RMN COSY da fração (11+17)23-D3J7B éster metílico da Ciclotiocurvularina A (**67**) em MeOH- d_4 100 MHz

Espectro de RMN HSQC da fração (11+17)23-D3J7B éster metílico da Ciclotiocurvularina A (**67**) em MeOH- d_4 100 MHz

Espectro de RMN HMBC da fração (11+17)23-D3J7B éster metílico da Ciclotiocurvularina A (**67**) em MeOH- d_4 100 MHz

Espectro de RMN NOESY da fração (11+17)23-D3J7B éster metílico da Ciclotiocurvularina A (**67**) em MeOH- d_4 (400 MHz).

Espectro de RMN ^1H NOEDiff da fração (11+17)23-D3J7B éster metílico da Ciclotiocurvarina A (**67**) em $\text{MeOH-}d_4$ (400 MHz). Irradiação dos hidrogênios da metóxila em $\delta 3,62$ não demonstrou efeito NOE no H-11 $\delta 3,84$.

Espectro de RMN ^1H NOEDiff da fração (11+17)23-D3J7B éster metílico da Ciclotiocurvarina A (**67**) em $\text{MeOH-}d_4$ (400 MHz). Irradiação do hidrogênio H-11 δ 3,84 não demonstrou efeito NOE nos hidrogênios da metóxila δ 3,62.

Espectro de RMN de ^1H da fração (11+17)23-D3I2 Ciclotiocurvularina B (**68**) em $\text{MeOH-}d_4$ 400 MHz

Expansão 1 do espectro de RMN de ^1H da fração (11+17)23-D3I2 Ciclotiocurvularina B (**68**) em $\text{MeOH-}d_4$ 400 MHz

Expansão 2 do espectro de RMN de ^1H da fração (11+17)23-D3I2 Ciclotiocurvularina B (**68**) em $\text{MeOH-}d_4$ 400 MHz

Espectro de RMN de ^{13}C da fração (11+17)23-D3I2 Ciclotiocurvarina B (**68**) em $\text{MeOH-}d_4$ 100 MHz

Espectro de RMN de COSY da fração (11+17)23-D3I2 Ciclotiocurvularina B (**68**) em MeOH- d_4 400 MHz

Espectro de RMN de HSQC da fração (11+17)23-D3I2 Ciclotiocurvarina B (**68**) em MeOH- d_4 400 MHz

Espectro de RMN de HMBC da fração (11+17)23-D3I2 Ciclotiocurvarina B (**68**) em MeOH- d_4 400 MHz

Espectro de RMN ^1H NOEDiff da fração (11+17)23-D3I2 Ciclotiocurvarina B (**68**) em $\text{MeOH-}d_4$ (400 MHz). Irradiação do hidrogênio H-11 δ 3,68 não demonstrou efeito NOE nos hidrogênios H-10, H-17a e H-17b

Espectro de RMN de ^1H da fração (11+17)23-D2D6 Ciclosulfóxicurvularina (**69**) em $\text{MeOH-}d_4$ 400 MHz

Expansão 1 do espectro de RMN de ^1H da fração (11+17)23-D2D6 Ciclosulfóxicurvularina (**69**) em $\text{MeOH-}d_4$ 400 MHz

Expansão 2 do espectro de RMN de ^1H da fração (11+17)23-D2D6 Ciclosulfóxicurvularina (**69**) em MeOH- d_4 400 MHz

Expansão 3 do espectro de RMN de ^1H da fração (11+17)23-D2D6 Ciclosulfóxicurvularina (**69**) em $\text{MeOH-}d_4$ 400 MHz

Espectro de RMN de ^{13}C da fração (11+17)23-D2D6 Ciclosulfóxicurvularina (**69**) em $\text{MeOH-}d_4$ 100 MHz

Espectro de RMN COSY da fração (11+17)23-D2D6 Ciclosulfóxicurvularina (**69**) em MeOH- d_4 400 MHz

Espectro de RMN HSQC da fração (11+17)23-D2D6 Ciclosulfóxicurvularina (**69**) em MeOH- d_4 400 MHz

Espectro de RMN HMBC da fração (11+17)23-D2D6 Ciclosulfóxicurvularina (**69**) em MeOH- d_4 400 MHz

Espectro de RMN de ^1H da fração (11+17)23-D2B9B éster metílico da Ciclosulfóxicurvularina (**70**) em MeOH- d_4 400 MHz

Espectro de RMN de ^{13}C da fração (11+17)23-D2B9B éster metílico da Ciclosulfóxicurvularina (**70**) em $\text{MeOH-}d_4$ 400 MHz

Espectro de RMN COSY da fração (11+17)23-D2B9B éster metílico da Ciclosulfóxicurvularina (**70**) em MeOH- d_4 400 MHz

Espectro de RMN HSQC da fração (11+17)23-D2B9B éster metílico da Ciclosulfóxicurvularina (**70**) em MeOH- d_4 400 MHz

Espectro de RMN HMBC da fração (11+17)23-D2B9B éster metílico da Ciclosulfóxicurvularina (**70**) em MeOH- d_4 400 MHz

Espectro de RMN ^1H NOEDiff da fração (11+17)23-D2B9B éster metílico da Ciclosulfóxicurvularina (**70**) em $\text{MeOH-}d_4$ (400 MHz). Irradiação do hidrogênio H-11 δ 3,72 apresentando discreto efeito NOE nos hidrogênios H-17a e H-17b.

ANEXO B

1 Análise multivariada

1.1 Metodologia multicritério

Utilizando-se a metodologia multicritério, função de desejabilidade, os valores das respostas obtidas em cada experimento (R) são transformados em um valor adimensional, a desejabilidade individual (d_i). Como os valores desejados para respostas é o máximo possível (T), a transformação é realizada por meio da Equação de desejabilidade (d) (Tabelas 14 e 15). A desejabilidade individual (d_i) pode variar de um valor igual a zero (uma resposta totalmente indesejável) até um valor igual a 1 (uma resposta totalmente desejável).

EQUAÇÃO DE DESEJABILIDADE (d) PARA UM VALOR DE RESPOSTA MÁXIMO

$$d = \begin{cases} 0 & \text{se } y < L \\ \left(\frac{R - L}{T - L} \right)^s & \text{se } L \leq y \leq T \\ 1 & \text{se } y > T \end{cases}$$

Onde:

R = Valor obtido para respostas

T = Maior valor obtido para respostas

L = Menor valor obtido para respostas

s = Peso

Quando:

s = 1, a função de desejabilidade é linear

s > 1, é dado maior peso aos valores próximos ao valor de resposta mais alto

s < 1, é dado menos peso aos valores próximos ao valor de resposta mais alto

Cálculo para obtenção da desejabilidade global (D): É obtida através do cálculo da média geométrica entre os valores de desejabilidade individual (d_i) calculado para cada uma das respostas em cada um dos experimentos. Esse valor é utilizado para realização do cálculo dos efeitos principais e de interação das variáveis utilizadas para o cultivo da microbiana.

Tabela 14. Respostas obtidas para a fração 2 (F2) de SPE de experimentos de otimização das condições de crescimento de *Penicillium* sp.

Respostas (R)														
R1	Massa (mg)	Área	Nº de Picos	R2	Massa (mg)	Área	Nº de Picos	R3	Massa (mg)	Área	Nº de Picos	Média Massa	Média Área	Média Picos
1-F2	14,00	2,31	5	1-F2	12,20	1,71	4	1-F2	12,70	1,73	5	12,97	1,92	5
2-F2	5,50	5,24	7	2-F2	5,60	3,18	5	2-F2	5,20	3,66	4	5,43	4,03	5
3-F2	9,70	5,03	9	3-F2	4,70	5,20	5	3-F2	8,00	1,75	11	7,47	3,99	8
4-F2	12,60	5,06	10	4-F2	11,50	4,87	7	4-F2	11,60	5,7	9	11,90	5,21	9
5-F2	3,30	2,50	3	5-F2	2,30	1,03	2	5-F2	3,40	1,10	2	3,00	1,54	2
6-F2	10,40	4,05	2	6-F2	14,30	3,84	2	6-F2	17,40	2,26	1	14,03	3,38	2
.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
16-F2	14,10	10,35	7	16-F2	14,90	8,36	7	16-F2	16,30	5,94	5	15,10	8,22	6
												Menor valor (L)	2,30	1,03
												Maior valor (T)	21,20	11,01
														11

Tabela 15. Cálculo das desejabilidade individuais e globais para as respostas da obtidas com a fração 2 (F2) de SPE de experimentos realizados para otimização das condições de cultivo de *Penicillium* sp.

Respostas (R)				Desejabilidade individual (d_i) $d = (Y-L/T-L)^1$			Desejabilidade global (D)
Ensaio	Média Massa (mg)	Média Área	Média Nº de Picos	d_i Massa	d_i Área	d_i Picos	Média geométrica entre as d_i
1	12,97	1,92	5	0,5644	0,0889	0,3667	0,26
2	5,43	4,03	5	0,1658	0,3004	0,4333	0,28
3	7,47	3,99	8	0,2734	0,2970	0,7333	0,39
4	11,90	5,21	9	0,5079	0,4190	0,7667	0,55
5	3,00	1,54	2	0,0370	0,0516	0,1333	0,06
6	14,03	3,38	2	0,6208	0,2358	0,0667	0,21
.	.	.	.	.	.	.	.
.	.	.	.	.	.	.	.
.	.	.	.	.	.	.	.
16	15,10	8,22	6	0,6772	0,7203	0,5333	0,64
Menor valor (L)	2,30	1,03	1				
Maior valor (T)	21,20	11,01	11				

1.2 Cálculo dos Efeitos Principais (Uma Variável)

Após realizar o cálculo das desejabilidades globais (D) para as frações da EFS (F2, F3 e F2/F3 conjuntamente) de todos os experimentos (Tabela 4; pág. 39) foi possível obter os efeitos principais, ou seja, de primeira ordem (efeito de uma variável) e de 2ª ordem (efeito de duas variáveis). Para realizar os cálculos dos efeitos foi utilizada uma planilha no programa Excel. As variáveis do planejamento fatorial foram numeradas: (1) concentração de sais; (2) Tempo em dias; (3) Temperatura; (4) Agitação; (5) Concentração de nutrientes do meio de cultura.

Os cálculos dos efeitos de interação de primeira ordem que estão mostrados na tabela 16 (página seguinte) foram efetuados através da multiplicação dos sinais de máximo ou mínimo (Tabela 3; pág. 31) pelos valores encontrados para as desejabilidades dos experimentos de crescimento da linhagem de *Penicillium* sp (Tabela 4, pág. 39). Na figura 60 estão exemplificados os cálculos para variável 1 (concentração de sais) pode-se observar que os valores de máximo (+1) e mínimo (-1) da coluna “1” foram multiplicados pelos valores da coluna de desejabilidade identificada como “D”. Este procedimento foi realizado para todas as variáveis.

Figura 60- Exemplo das multiplicações dos valores das colunas para obtenção do efeito da variável 1 (concentração de sais).

Exp.	1	2	3	4	5	(D) F2	1 x D	2
1	-1	-1	-1	-1	1	0,264	-0,264	-0
2	1	-1	-1	-1	-1	0,278	0,278	-0
3	-1	1	-1	-1	-1	0,390	-0,390	0,
4	1	1	-1	-1	1	0,546	0,546	0,

Os valores obtidos nesta multiplicação foram somados e divididos por 8, pois existem 8 valores positivos e 8 negativos para cada coluna. Assim, para a variável 1 a soma dos valores obtidos pela multiplicação das colunas foi igual a 0,081 . Este resultado foi dividido por 8. Obtendo-se o valor **0,010**, este valor é o efeito que a variável 1 (concentração de sais) exerceu no valor das respostas conjuntas (massa da fração, área e número de picos cromatográficos), ou seja, na produção de

metabólitos secundários detectados na fração 2 da EFS, obtida a partir da linhagem de *Penicillium* sp.

Tabela 16 – Exemplo dos cálculos realizados para obtenção dos efeitos de 1ª ordem (uma variável) para fração 2.

Exp.	1	2	3	4	5	(D) F2	1 x D	2 x D	3 x D	4 x D	5 x D
1	-1	-1	-1	-1	1	0,264	-0,264	-0,264	-0,264	-0,264	-0,264
2	1	-1	-1	-1	-1	0,278	0,278	-0,278	-0,278	-0,278	0,278
3	-1	1	-1	-1	-1	0,390	-0,390	0,390	-0,390	-0,390	-0,390
4	1	1	-1	-1	1	0,546	0,546	0,546	-0,546	-0,546	0,546
5	-1	-1	1	-1	-1	0,063	-0,063	-0,063	0,063	-0,063	-0,063
6	1	-1	1	-1	1	0,214	0,214	-0,214	0,214	-0,214	0,214
7	-1	1	1	-1	1	0,662	-0,662	0,662	0,662	-0,662	-0,662
8	1	1	1	-1	-1	0,387	0,387	0,387	0,387	-0,387	0,387
9	-1	-1	-1	1	-1	0,584	-0,584	-0,584	-0,584	0,584	-0,584
10	1	-1	-1	1	1	0,370	0,370	-0,370	-0,370	0,370	0,370
11	-1	1	-1	1	1	0,610	-0,610	0,610	-0,610	0,610	-0,610
12	1	1	-1	1	-1	0,355	0,355	0,355	-0,355	0,355	0,355
13	-1	-1	1	1	1	0,132	-0,132	-0,132	0,132	0,132	-0,132
14	1	-1	1	1	-1	0,359	0,359	-0,359	0,359	0,359	0,359
15	-1	1	1	1	-1	0,361	-0,361	0,361	0,361	0,361	-0,361
16	1	1	1	1	1	0,638	0,638	0,638	0,638	0,638	0,638
Cálculos						Σ	0,081	1,686	-0,581	0,605	0,658
Efeitos das variáveis						Σ/8	0,010	0,211	-0,073	0,076	0,082

(D) desejabilidade obtida a partir dos valores de massa, área e número de picos cromatográficos da fração 2 da EFS (50:50 MeOH/H₂O) de cada um dos experimentos de crescimento de *Penicillium* sp.

1.3 Cálculo dos Efeitos de Interação de 2ª Ordem (2 Variáveis)

Para realização do cálculo de interação de 2ª ordem, as variáveis do planejamento fatorial foram numeradas: (1) concentração de sais; (2) Tempo em dias; (3) Temperatura; (4) Agitação; (5) Concentração de nutrientes do meio de cultura e foi efetuada a multiplicação dos sinais de máximo e mínimo (Tabela 3; pág. 31) de duas variáveis, pelos valores encontrados para desejabilidade (Tabela 4; pág.

39). Parte da tabela com os cálculos dos efeitos de interação de 2ª ordem estão mostrados na tabela 17 (na página seguinte). Na figura 61 estão exemplificadas, as multiplicações para os cálculos de interação entre as variáveis 1 (concentração de sais) e 2 (tempo). Os valores da coluna “1” foram multiplicados pelos valores da coluna “2” que foram multiplicados pelos valores da coluna desejabilidade identificada pela coluna “D” (1x2xD).

Figura 61- Exemplo das multiplicações dos valores das colunas para obtenção do efeito da interação entre as variáveis 1 (concentração de sais) e 2 (tempo).

Exp.	1	2	3	4	5	D(F2)	1x2xD
1	-1	-1	-1	-1	1	0,264	0,264
2	1	-1	-1	-1	-1	-0,278	-0,278
3	-1	1	-1	-1	-1	-0,390	0,390
4	1	1	-1	-1	1	0,546	-0,546

Os valores obtidos foram somados e este resultado foi dividido por 8, pois existem 8 valores positivos e 8 negativos para cada coluna. Assim para interação entre as variáveis 1 (concentração de sais) e 2 (tempo) a soma dos valores foi 0,677. Dividindo-se este valor por 8 tem-se 0,085. Esse é o resultado para o efeito (influência) que a interação entre a concentração de sais (1) e o tempo (2) exerceu no valor das respostas conjuntas (massa da fração, área e número de picos cromatográficos), ou seja, na produção de metabólitos secundários detectados na fração 2 da EFS, obtida a partir da linhagem de *Penicillium* sp.

Tabela 17 – Exemplo dos cálculos realizados para obtenção dos efeitos de 2ª ordem (interação entre duas variáveis) para fração 2.

Exp.	1	2	3	4	5	D(F2)	1x2xD	1x3xD	1x4xD	1x5xD	2x3xD
1	-1	-1	-1	-1	1	0,264	0,264	0,264	-0,264	0,264	0,264
2	1	-1	-1	-1	-1	-0,278	-0,278	-0,278	-0,278	0,278	-0,278
3	-1	1	-1	-1	-1	-0,390	0,390	0,390	0,390	-0,390	-0,390
4	1	1	-1	-1	1	0,546	-0,546	-0,546	0,546	-0,546	0,546
5	-1	-1	1	-1	-1	0,063	-0,063	0,063	0,063	-0,063	0,063
6	1	-1	1	-1	1	-0,214	0,214	-0,214	0,214	-0,214	-0,214
7	-1	1	1	-1	1	-0,662	-0,662	0,662	-0,662	0,662	-0,662
8	1	1	1	-1	-1	0,387	0,387	-0,387	-0,387	0,387	0,387
9	-1	-1	-1	1	-1	0,584	0,584	-0,584	0,584	0,584	0,584
10	1	-1	-1	1	1	-0,370	-0,370	0,370	0,370	0,370	-0,370
11	-1	1	-1	1	1	-0,610	0,610	-0,610	-0,610	-0,610	-0,610
12	1	1	-1	1	-1	0,355	-0,355	0,355	-0,355	-0,355	0,355
13	-1	-1	1	1	1	0,132	-0,132	-0,132	-0,132	-0,132	0,132
14	1	-1	1	1	-1	-0,359	0,359	0,359	-0,359	-0,359	-0,359
15	-1	1	1	1	-1	-0,361	-0,361	-0,361	0,361	0,361	-0,361
16	1	1	1	1	1	0,638	0,638	0,638	0,638	0,638	0,638
Cálculos				Σ			0,677	-0,009	0,120	0,875	-0,276
Efeitos				Σ/8			0,085	-0,001	0,015	0,109	-0,035

(D) desejabilidade obtida a partir dos valores de massa, área e número de picos cromatográficos da fração 2 da EFS (50:50 MeOH/H₂O) de cada um dos experimentos de crescimento de *Penicillium* sp.

ANEXO C

Tabela 18 - Médias dos valores das respostas obtidas (massa das frações, área dos picos cromatográficos e número de picos cromatográficos) com desvio padrão e desvio padrão relativo, bem como valores de desejabilidades individual e desejabilidades globais para a fração 2.

Experimento	Massa Média (mg)	Área Média (mV*S)	Massa SD	Área SD	Massa RSD	Área RSD	Média Picos (Und.)	d massa	d área	d picos	D
1	12,97	1,92	0,93	0,34	7,17	18	5	0,56	0,09	0,37	0,26
2	5,43	4,03	0,21	1,08	3,83	27	5	0,17	0,30	0,43	0,28
3	7,47	3,99	2,54	1,95	34,05	49	8	0,27	0,30	0,73	0,39
4	11,90	5,21	0,61	0,44	5,11	8	9	0,51	0,42	0,77	0,55
5	3,00	1,54	0,61	0,83	20,28	54	2	0,04	0,05	0,13	0,06
6	14,03	3,38	3,51	0,98	24,99	29	2	0,62	0,24	0,07	0,21
7	15,07	9,08	4,05	1,92	26,90	21	6	0,68	0,81	0,53	0,66
8	9,10	5,83	0,87	0,94	9,58	16	4	0,36	0,48	0,33	0,39
9	9,33	6,37	0,55	0,25	5,90	4	11	0,37	0,53	1,00	0,58
10	10,90	3,11	0,44	0,41	4,00	13	6	0,46	0,21	0,53	0,37
11	17,77	5,64	2,99	0,38	16,85	7	7	0,82	0,46	0,60	0,61
12	7,50	3,89	0,62	0,11	8,33	3	7	0,28	0,29	0,57	0,36
13	13,35	1,22	0,65	0,07	4,87	6	3	0,58	0,02	0,20	0,13
14	7,60	3,10	0,30	0,43	3,95	14	9	0,28	0,21	0,80	0,36
15	5,95	5,60	0,15	0,05	2,52	1	6	0,19	0,46	0,53	0,36
16	15,10	8,22	1,11	2,21	7,37	27	6	0,68	0,72	0,53	0,64
	2,30	1,03				Menor					
	21,20	11,01				Maior					

Tabela 19 - Médias dos valores das respostas obtidas (massa das frações, área dos picos cromatográficos e número de picos cromatográficos) com desvio padrão e desvio padrão relativo, bem como valores de desejabilidades individual e desejabilidades globais para a fração 3.

Experimento	Massa Média	Área Média	Massa SD	Área SD	Massa RSD	Área RSD	Média Picos	d massa	d área	d picos	D
1	3,93	5,74	0,38	0,29	9,63	5	6	0,63	0,65	0,42	0,56
2	0,90	2,03	0,10	0,36	11,11	18	2	0,12	0,22	0,17	0,16
3	2,67	0,43	0,06	0,30	2,17	69	4	0,42	0,03	0,25	0,15
4	3,17	3,24	1,00	2,63	31,63	81	9	0,50	0,36	0,75	0,51
5	0,47	0,62	0,25	0,30	53,93	48	2	0,05	0,05	0,08	0,06
6	1,47	7,05	0,12	1,46	7,87	21	4	0,21	0,81	0,25	0,35
7	4,83	4,30	0,75	0,56	15,53	13	12	0,79	0,48	0,75	0,66
8	2,30	0,99	0,10	0,07	4,35	7	3	0,36	0,10	0,33	0,22
9	2,03	2,44	0,65	1,52	32,00	62	10	0,31	0,27	0,83	0,41
10	1,73	2,31	0,06	0,15	3,33	7	5	0,26	0,25	0,25	0,25
11	5,40	6,52	0,60	0,68	11,11	10	6	0,88	0,75	0,50	0,69
12	1,67	0,89	0,06	0,14	3,46	15	3	0,25	0,08	0,08	0,12
13	4,35	1,44	1,75	0,30	40,23	21	3	0,70	0,15	0,25	0,30
14	2,20	0,72	0,50	0,35	22,73	48	3	0,34	0,06	0,25	0,18
15	1,65	2,42	0,05	0,03	3,03	1	3	0,25	0,26	0,25	0,25
16	3,20	2,97	0,87	1,04	27,24	35	4	0,51	0,33	0,17	0,30
	0,20	0,18				Menor					
	6,10	8,68				Maior					