Éverton Leandro de França Ferreira

**Estudo químico e de biossíntese de metabólitos secundários produzidos
pelas linhagens fúngicas *Roussoella* sp. DLM33 e *Annulohypoxylon*
moriforme MA9**

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

Área de concentração: Química Orgânica e Biológica

Orientador: Prof. Dr. Roberto Gomes de Souza Berlinck

São Carlos - SP

2017

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Maria do Socorro e João Batista, que sempre me orientaram pela busca de conhecimento, proporcionando a melhor educação possível e as minhas irmãs Luana e Lorena pelo incentivo, amor e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr Roberto G. S. Berlinck por sempre se mostrar presente como orientador durante toda a execução desse trabalho e por me estimular sempre em ser melhor.

Aos meus pais Maria do Socorro de F. Ferreira e João Batista Ferreira, e minhas irmãs Luana Gabrielle e Lorena Maria pelo amor, incentivo e compreensão.

Aos amigos e colegas de laboratório, em especial Karen Nicácio, Lorena López, Renata Torres, Laura Ioca, Mirelle Takaki, Raquel Urano, Juliano Slivinski, Julie Paulin, Ariane Bertonha, Marcos Castro, Maria Camila e Fabiana Tessari, pela amizade, convivência, incentivo e por tornarem minha vida em São Carlos mais agradável.

Às técnicas do laboratório Fabiana T. Rodrigues e Karin F. Bandeira de Camargo pelo apoio e disponibilidade em ensinar e ajudar na operação de equipamentos.

Ao Prof. Dr. Antonio Gilberto Ferreira e Luciana Vizotto pelas análises de ressonância magnética nuclear.

Aos amigos da República Macaco Branco, em especial o Vitor de Carvalho, Lucyano Macêdo, Rodrigo Iost, Roberto Luz e Germano Costa pela convivência e amizade.

Aos amigos piauienses Erika Thalyta, Isabella Cristhina, Luis Paulo e Buana Carvalho por sempre se mostrarem presentes durante todos os anos do doutorado e por cultivar amizade de longos anos.

Aos amigos que fiz em São Carlos, em especial o Fernando Gomes, Naiza Vilas Bôas, Amaury Barbosa, Junior Quilles, Larissa Gallo, Pedro Junior, Maíra Garcia, dentre tantos outros, que sempre me fizeram sentir São Carlos como minha segunda casa, compartilhando de ótimos momentos.

À CAPES, CNPq e FAPESP pelo auxílio financeiro.

RESUMO

FERREIRA, E L F. Estudo químico e de biossíntese de metabólitos secundários produzidos pelas linhagens fúngicas *Roussoella* sp. DLM33 e *Annulohypoxylon moriforme* MA9. 2017. 188f. Tese de Doutorado - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.

Microorganismos são uma excelente fonte de substâncias bioativas, porém muitas destas substâncias são biossintetizadas em baixas quantidades. A utilização de técnicas de planejamento experimental e de análise multivariada permite melhorar as condições de cultivo e incrementar a produção de metabolitos secundários. A linhagem fúngica *Roussoella* sp. DLM-33 produziu o composto roussoellatídeo (**33**) inédito na literatura com esqueleto de carbono novo. A utilização do planejamento fatorial fracionado e da metodologia multicritério permitiu incrementar a produção do composto roussoellatídeo (**33**), para investigar sua biossíntese utilizando precursores marcados com ^{13}C . Experimentos de incorporação com precursores $[1-^{13}\text{C}]$ acetato de sódio, $[1,2-^{13}\text{C}]$ acetato de sódio e $[\text{metil-}^{13}\text{C}]$ metionina permitiu verificar que a biossíntese do composto (**33**) envolve dois rearranjos de Favorskii e uma ciclização de Diels-Alder intermolecular entre duas cadeias policetídicas independentes. Também, o estudo químico do meio de cultivo da linhagem *Annulohypoxylon moriforme* MA9, levou ao isolamento e identificação de dois compostos inéditos denominados por: (*E*)-3-benzilideno-hexahidro-2-metilpirrolo[1,2-*a*]-pirazina-1,4-diona (**36**) e 4,7,9-trihidroxi-3-metoxi-2,3,6b,7-tetrahidro-1H-benzo[*j*]fluoranten-8-ona (**57**), e 10 compostos conhecidos: TCM-95A (**43**), TMC-95B (**44**), daidzeína (**49**), 5-hidroxi-3,4-dihidro-2*H*-naftalen-1-ona (**50**), 4,8-dihidroxi-3,4-dihidro-2*H*-naftalen-1-ona (**51**), 4-metoxi-1-naftalenol (**52**) e 3-benzil-hexahidro-pirrolo[1,2-*a*]-pirazina-1,4-diona (**53**), hypoxylonol C (**54**), hypoxylonol B (**55**) e hypoxylonol E (**56**). Os compostos **43** e **44** foram descobertos ainda quando presentes no extrato bruto de *Annulohypoxylon moriforme* MA9 por meio da co-cristalização do extrato com a enzima responsável pela atividade do proteassomo. Os dados obtidos por cristalografia de raio-X juntamente com os dados da literatura permitiram determinar suas estruturas químicas.

Palavras Chave: *Roussoella* sp.. Roussoellatídeo. Planejamento experimental. Biossíntese. *Annulohypoxylon moriforme*

ABSTRACT

FERREIRA, E L F. Chemical study and study of the biosynthesis of secondary metabolites produced by fungal line *Roussoella* sp. DLM33 e *Annulohypoxylon moriforme* MA9. 2017. 188f. PhD Thesis - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.

Microorganisms are an excellent source of bioactive substances. However, most metabolites are biosynthesized in small amounts. The use of experimental design and multivariate analysis allows to improve the culture conditions and increase the production of secondary metabolites. The fungal strain *Roussoella* sp. DLM33 produced the roussoellatide (**33**), which is unprecedented and present a with novel carbon backbone chemical structure. Utilizing fractional factorial design and multicriteria analyses allowed us to increase the production of the roussoellatide (**33**) in order to investigate its biosynthesis using precursors labeled with ^{13}C . Feeding experiments utilizing [1- ^{13}C]acetate, [1,2- ^{13}C]acetate, and [methyl- ^{13}C]methionine enabled us to verify that the biosynthesis **33** we postulate the involvement of two Favorskii rearrangements and one intermolecular Diels-Alder cyclization between two independent polyketide chains. Also, the chemical investigation of the culture medium of the strain *Annulohypoxylon moriforme* MA9 led to the isolation and identification of two new compounds: (*E*)-3-benzylidenehexahydro-2-methylpyrrolo[1,2-a]pyrazine-4-dione (**36**) and 4,7,9-trihydroxy-3-methoxy-2,3,6b,7-tetrahydro-1H-benzo[j]fluorane-8-one (**57**), along with 10 compounds already known in the literature: TCM-95B (**43**), TMC-95A (**44**), daidzein (**49**), 5-hydroxy-3,4-dihydro-2*H*-naphthalen-1-one (**50**), 4,8-dihydroxy-3,4-dihydro-2*H*-naphthalen-1-one (**51**), 4-methoxy-1-naphthalenol (**52**) and 3-benzylhexahydro-pyrrolo [1,2-a]pyrazine-1,4-dione (**53**), hypoxylonol C (**54**), hypoxylonol B (**55**) and hypoxylonol E (**56**). Compounds **43** and **44** were discovered by the co-crystallization of the extract medium with the enzyme responsible for the proteasome activity. Data obtained by X-ray crystallography, NMR and MS analyses combined or data available in the literature allowed to determine their chemical structures.

Keywords: *Roussoella* sp.. Roussoellatide. Experimental planning. Biosynthesis. *Annulohypoxylon moriforme*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Porcentagem de novos compostos isolados de fungos de ambiente marinho, dividida por suas fontes ¹⁸	14
Figura 2 – Generalidades na biossíntese de policetídeos ²⁶	15
Figura 3 – Halogenase que utiliza FADH ₂ e O ₂ na biossíntese de rebecamicina (20) ³⁶	18
Figura 4 – Rearranjo de Favorskii para a molécula de enterocina ⁴²	18
Figura 5 - Fracionamento do extrato AcOEt do meio de cultura da linhagem DLM33	25
Figura 6 – Fluxograma de fracionamento da fração DLM33-A7A	26
Figura 7 – Fluxograma de fracionamento da fração DLM33-A6A	28
Figura 8 - Perfil cromatográfico por CLAE-UV dos extratos após adição dos precursores isotopicamente marcados. Detecção no λ_{max} = 254 nm. O pico indicado é do rousoellatídeo (33).	33
Figura 9 - Análise de CLAE-UV da fração H ₂ O/MeOH (1:1 + 3:7)	33
Figura 10 - Perfil cromatográfico da fração proveniente da separação da etapa 1	34
Figura 11 - Fracionamento da fração orgânica do meio de cultivo produzido pelo fungo <i>A. moriforme</i> MA9	35
Figura 12 – Fluxograma de fracionamento da amostra HM64	36
Figura 13 - Separação por CLAE-UV da amostra HM01-21. Condição de análise: coluna InertSustain C18 semipreparativa, método isocrático H ₂ O/MeOH/MeCN (40:30:30)..	37
Figura 14 – Separação por CLAE-UV da amostra HM11-13. Condição de análise: coluna InertSustain C18 semipreparativa, método isocrático H ₂ O/MeOH (48:52).	38
Figura 15 – Separação por CLAE-UV da amostra HM11-32. Condição de análise: coluna InertSustain C18 semipreparativa, método isocrático H ₂ O/MeOH/MeCN (62:20:18)..	39
Figura 16 – Fluxograma de fracionamento da fração HM11.	40
Figura 17 - Espectro ESI ⁺ e no UV da subfração DLM33-A7ppt.....	41
Figura 18 - Espectro de RMN ¹ H de 29 (MeOH-d ₄ , 500 MHz).....	43
Figura 19 - Espectro de RMN ¹³ C de 29 (MeOH-d ₄ , 125 MHz).....	44
Figura 20 - Espectro ESI ⁻ e no UV da subfração A7A19M2	45
Figura 21 - Espectro de RMN ¹ H do composto 30 em DMSO-d ₆ (400 MHz).....	47
Figura 22 - Espectro de RMN ¹³ C do composto 30 em DMSO-d ₆ (100 MHz).....	48
Figura 23 - Espectro no UV e ESI ⁺ da subfração Ex4-B2	49
Figura 24 – Espectro no UV e ESI ⁺ da subfração Ex4-B3	49
Figura 25 – Espectro de RMN ¹ H do composto 31 (600 MHz, DMSO-d ₆).....	51

Figura 26 - Espectro de RMN ^1H do composto 32 (600 MHz, DMSO- d_6).....	52
Figura 27 - Espectro de RMN ^{13}C do composto 31 (150 MHz, DMSO- d_6).	53
Figura 28 –Espectro UV da subfração A6A13D	54
Figura 29 – Espectro de massas de alta resolução (ESI^+) do roussoellatídeo (33).....	55
Figura 30 - Correlações gCOSY ^1H - ^1H e gHMBC ^1H - ^{13}C no composto 33	56
Figura 31 – Correlações NOEs ^1H - ^1H no composto 33	57
Figura 32 – Representação ORTEP do composto 33 , definido por cristalografia de raio-X	58
Figura 33 - Efeito da atividade anti-inflamatória do extrato MeOH do meio de cultura do fungo <i>Roussoella</i> sp. DLM33 na produção de NO. *Significativo em relação ao Meio ($p < 0,05$) e # significativo em relação ao controle de LPS ($p < 0,05$).	59
Figura 34 – Espectro de RMN ^1H do composto 33 (600 MHz, DMSO- d_6).....	60
Figura 35 – Espectro de RMN ^{13}C do composto 33 (150 MHz, DMSO- d_6).....	61
Figura 36 – Perfil cromatográfico do extrato do meio de cultura do fungo DLM33 obtido com a metodologia de extração do meio de cultura com AcOEt/MeOH/ CH_2Cl_2 (3:2:1) com 1% de ácido fórmico. Pico 1: roussoelatídeo. (Condições de análise vide item 3.5)	64
Figura 37 - Análise comparativa de CLAE-UV ($\lambda_n = 254 \text{ nm}$) do extrato produzido por <i>Roussoella</i> sp. DLM33 sob as condições dos experimentos #4 e #19	68
Figura 38 - Espectros de massas (ESI^+) do roussoellatídeo (33) isotopicamente marcado, produzido na presença de diferentes precursores marcados com ^{13}C	68
Figura 39 - Padrão de incorporação com $[1\text{-}^{13}\text{C}]$ acetato de sódio e $[\text{metil-}^{13}\text{C}]$ metionina	70
Figura 40 - Padrão de incorporação com $[1,2\text{-}^{13}\text{C}_2]$ acetato de sódio	70
Figura 41 - Biossíntese de cryptosporiopsinol	71
Figura 42 - Biossíntese da cadeia policetí dica com rearranjo do tipo Favorskii.....	72
Figura 43 – Estruturas da brevetoxina B (34), ácido ocadáico (35) e ambruticina (36).	73
Figura 44 – Ciclização do tipo Diels-Alder intermolecular formando o roussoellatídeo (33)	74
Figura 45 – Estruturas das cumarinas diméricas kuwanona J (34) e chalcomoracina (35)	75
Figura 46 – Biossíntese do ácido macrofômico (36) ⁵⁴	75

Figura 47 – Correlações de COSY e HMBC observados para o composto 36 e derivado de dicepiperazina diidroxilada.....	78
Figura 48 – Dicetopiperazinas N-metiladas.	79
Figura 49 - Espectro de RMN ^1H do composto 36 (600 MHz, MeOH- d_4).....	81
Figura 50 - Espectro de RMN ^{13}C do composto 36 (125 MHz, MeOH- d_4).....	82
Figura 51 – Bioensaio de inibição do proteassomo 20S (A) e curva concentração-resposta (B).....	83
Figura 52 – Curva de concentração-resposta no ensaio contra o proteassoma para as amostras HM11-13A e HM11-13C e cristalografia de raio-X da amostra bioativa HM11-13C no sítio catalítico da enzima.....	84
Figura 53 – Subestrutura I do composto HM11-13BC1 (linhas sombreadas indicam correlações ^1H - ^1H observadas no espectro COSY; e flechas indicam correlações à longa distância ^1H - ^{13}C observadas no espectro HMBC).....	85
Figura 54 – Subestrutura II do composto 44 (linhas sombreadas indicam correlações ^1H - ^1H observadas no espectro COSY; e flechas indicam correlações à longa distância ^1H - ^{13}C observadas no espectro HMBC).....	86
Figura 55 – Subestrutura III do composto 44 (linhas sombreadas indicam correlações ^1H - ^1H observadas no espectro COSY; e flechas indicam correlações à longa distância ^1H - ^{13}C observadas no espectro HMBC).....	86
Figura 56 – Composto 44 (flechas indicam correlações à longa distância ^1H - ^{13}C observadas no espectro HMBC, indicando as conectividades entre as subestruturas I, II e III).....	87
Figura 57 – Inibidores do proteassomo isolados de fungos	88
Figura 58 - Espectro de RMN ^1H do composto 38 (600 MHz, DMSO- d_6).....	93
Figura 59 - Espectro de RMN ^{13}C do composto 38 (125 MHz, DMSO- d_6).	94
Figura 60 - Espectro de RMN ^1H do composto 37 (600 MHz, DMSO- d_6).....	95
Figura 61 - Espectro de RMN ^{13}C do composto 37 (125 MHz, DMSO- d_6).	96
Figura 62 – Espectros UV e ESI da fração HM11-32A (39).....	97
Figura 63 - Espectro de RMN ^1H do composto 39 (600 MHz, DMSO- d_6).....	99
Figura 64 – Expansão do espectro de RMN ^1H do composto 39 (600 MHz, DMSO- d_6).	100
Figura 65 – Espectro de RMN ^{13}C do composto 39 (125 MHz, DMSO- d_6).....	101
Figura 66 – Espectros de UV das amostras HM64-B5 (40) e HM64-B4E (41).....	102
Figura 67 - Espectro de RMN ^1H do composto 40 (600 MHz, DMSO- d_6).....	105

Figura 68 – Expansão do espectro de RMN ^1H do composto 40 (600 MHz, DMSO- d_6).	106
Figura 69 – Espectro de RMN ^{13}C do composto 40 (125 MHz, DMSO- d_6).	107
Figura 70 – Espectro de RMN ^1H do composto 41 (600 MHz, DMSO- d_6).	108
Figura 71 – Expansão do espectro de RMN ^1H do composto 41 (600 MHz, DMSO- d_6).	109
Figura 72 – Espectro de RMN ^{13}C do composto 41 (125 MHz, DMSO- d_6).	110
Figura 73 – Espectro de RMN ^1H do composto 42 (600 MHz, CDCl_3).	111
Figura 74 – Expansão do espectro de RMN ^1H do composto 42 (600 MHz, CDCl_3).	112
Figura 75 – Espectro de RMN ^{13}C do composto 42 (125 MHz, CDCl_3).	113
Figura 76 – Espectros UV e EM da fração HM64-B4B2.....	114
Figura 77 – Espectro de RMN ^1H do composto 43 (600 MHz, DMSO- d_6).	116
Figura 78 – Expansão do espectro de RMN ^1H do composto 43 (600 MHz, DMSO- d_6).	117
Figura 79 – Espectro de RMN ^{13}C do composto 43 (150 MHz, DMSO- d_6).	118
Figura 80 - Espectros no UV das amostras 21D5A, 21D5C, 21D5E e HM11-32E....	119
Figura 81 - Anel do tipo hidronaftaleno I (linhas sombreadas indicam correlações ^1H - ^1H observadas no espectro gCOSY; e flechas indicam correlações à longa distância ^1H - ^{13}C observadas no espectro gHMBC).	120
Figura 82 - Anel do tipo hidronaftaleno II (linhas sombreadas indicam correlações ^1H - ^1H observadas no espectro gCOSY; e flechas indicam correlações à longa distância ^1H - ^{13}C observadas no espectro gHMBC).	121
Figura 83 – Junção entre os fragmentos de hidronaftaleno I e II na formação da cadeia do policetídeo policíclico do tipo benzo[j]fluoranteno.	121
Figura 84 – Estrutura do composto 47 (linhas sombreadas indicam correlações ^1H - ^1H observadas no espectro gCOSY; e flechas indicam correlações à longa distância ^1H - ^{13}C observadas no espectro gHMBC).	122
Figura 85 – Biossíntese das daldinonas C, D, F e G ^{71,72}	123
Figura 86 – Espectro de RMN ^1H do composto 44 (600 MHz, acetona- d_6).	128
Figura 87 – Espectro de RMN ^{13}C do composto 44 (150 MHz, acetona- d_6).	129
Figura 88 – Espectro de RMN ^1H do composto 45 (600 MHz, acetona- d_6).	130
Figura 89 – Espectro de RMN ^{13}C do composto 45 (150 MHz, acetona- d_6).	131
Figura 90 – Espectro de RMN ^1H do composto 46 (600 MHz, acetona- d_6).	132
Figura 91 – Espectro de RMN ^{13}C do composto 46 (150 MHz, acetona- d_6).	133

Figura 92 – Espectro de RMN ^1H do composto 47 (600 MHz, DMSO- d_6).....	134
Figura 93 – Espectro de RMN ^{13}C do composto 47 (150 MHz, DMSO- d_6).....	135
Figura 94 – Espectro gCOSY do composto roussoellatídeo 33 , obtido em DMSO- d_6 (600 MHz).....	149
Figura 95 - Espectro gHSQC do composto roussoellatídeo 33 , obtido em DMSO- d_6 (600 MHz).....	150
Figura 96 - Espectro gHMBC do composto roussoellatídeo 33 , obtido em DMSO- d_6 (600 MHz).....	151
Figura 97 – Espectro tROESY do composto roussoellatídeo 33 em DMSO- d_6 (600 MHz)	152
Figura 98 - Espectro de RMN ^{13}C do composto 33 em MeOH- d_4 + benzeno- d_6 (150 MHz).....	153
Figura 99 - Espectro de RMN ^{13}C do composto 33 marcado com $[1-^{13}\text{C}]$ acetato em MeOH- d_4 + benzeno- d_6 (150 MHz)	154
Figura 100 - Espectro de RMN ^{13}C do composto 33 marcado com $[1,2-^{13}\text{C}]$ acetato em MeOH- d_4 + benzeno- d_6 (150 MHz)	155
Figura 101 - Espectro de RMN ^{13}C do composto 33 marcado com $[\text{metil-}^{13}\text{C}]$ metionina em MeOH- d_4 + benzeno- d_6 (150 MHz)	156
Figura 102 – Espectro INADEQUATE do composto 33 marcado com o precursor $[1,2-^{13}\text{C}]$ acetato em MeOH- d_4 + benzeno- d_6 (600 MHz)	157
Figura 103 - Espectro gCOSY do composto 36 em MeOH- d_4 (600 MHz).....	158
Figura 104 – Espectro gHSQC do composto 36 em MeOH- d_4 (600 MHz).....	159
Figura 105 – Espectro gHMBC do composto 36 em MeOH- d_4 (600 MHz).....	160
Figura 106 – Expansão do espectro de HMBC do composto 36 em MeOH- d_4 (600 MHz)	161
Figura 107 – Espectro de massas de alta resolução do composto 36	162
Figura 108 – Espectro de massas de alta resolução do composto 37	163
Figura 109 – Espectro de massas de alta resolução do composto 38	164
Figura 110 – Espectro gCOSY do composto 37 , obtido em DMSO- d_6 (600 MHz) ...	165
Figura 111 – Espectro de HSQC do composto 37 , obtido em DMSO- d_6 (600 MHz)	166
Figura 112 - Espectro de gHMBC do composto 37 , obtido em DMSO- d_6 (600 MHz)	167
Figura 113 – Expansão I do espectro de gHMBC do composto 37 , obtido em DMSO- d_6 (600 MHz)	168

Figura 114 – Expansão II do espectro de gHMBC do composto 37 , obtido em DMSO-d ₆ (600 MHz)	169
Figura 115 – Espectro de massas de alta resolução do composto 39	170
Figura 116 - Espectro de massas de alta resolução do composto 40	171
Figura 117 – Espectro de massas de alta resolução do composto 42	172
Figura 118 – Espectro de massas de alta resolução do composto 43	173
Figura 119 - Espectro de gCOSY do composto 47 , obtido em DMSO-d ₆ (600 MHz)	174
Figura 120 - Espectro de HSQC do composto 47 , obtido em DMSO-d ₆ (600 MHz) .	175
Figura 121 - Espectro de gHMBC do composto 47 , obtido em DMSO-d ₆ (600 MHz)	176
Figura 122 – Expansão do espectro de gHMBC do composto 47 , obtido em DMSO-d ₆ (600 MHz)	177
Figura 123 – Expansão do espectro de gHMBC do composto 47 , obtido em DMSO-d ₆ (600 MHz)	178
Figura 124 – Expansão do espectro de gHMBC do composto 47 , obtido em DMSO-d ₆ (600 MHz)	179
Figura 125 - Espectro de massas de alta resolução do composto 45	180
Figura 126 - Espectro de massas de alta resolução do composto 44	181
Figura 127 - Espectro de massas de alta resolução do composto 46	182
Figura 128 - Espectro de massas de alta resolução do composto 47	183

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Gradiente de eluição utilizado nas análises cromatográficas e obtenção dos espectros de massas e de bandas de absorção no UV das frações e extratos de <i>Roussoella</i> sp. DLM33.....	23
Tabela 2 - Fatores e níveis do PFF para melhorar a produção do composto 33	29
Tabela 3 – Condições de crescimento estabelecidas para o planejamento experimental	30
Tabela 4 - Matrix de planejamento para os experimentos de PFF	31
Tabela 5 - Dados de RMN ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) de 29 em MeOH- d_4	42
Tabela 6 - Dados de RMN ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) de 30 em DMSO- d_6	46
Tabela 7 - Dados de RMN ^1H (600 MHz) e ^{13}C (150 MHz) do composto 33	59
Tabela 8 - Valores de desejabilidade (d) para cada experimento do PFF	65
Tabela 9 - Efeitos de 1ª ordem e 2ª ordem no planejamento experimental para melhorar a produção do composto roussoellatideo (33)	66
Tabela 10 - Taxa de incorporação dos experimentos marcados isotopicamente com [1- ^{13}C]acetato de sódio, [1,2- ^{13}C]acetato de sódio e [Metil- ^{13}C]metionina.....	69
Tabela 11 - Dados de RMN ^1H (600 MHz) e ^{13}C (150 MHz) do composto 36	80
Tabela 12 - Dados de RMN ^1H (600 MHz) da amostra HM11-13B (37) e TMC-95B ⁵⁶	90
Tabela 13 - Dados de RMN ^1H (600 MHz) da amostra HM11-13C (38) e TMC-95A ⁵⁶	91
Tabela 14 - Dados de RMN ^{13}C (150 MHz) dos compostos 37 e 38 e TMC-95B e TMC-95C ⁵⁶	92
Tabela 15 - Dados de RMN ^1H (600 MHz) e ^{13}C (150 MHz) do composto 39	98
Tabela 16 - Dados de RMN ^1H (600 MHz) e ^{13}C (150 MHz) dos compostos 40 , 41 e 42	104
Tabela 17 - Dados de RMN ^1H (600 MHz) e ^{13}C (150 MHz) do composto 43	115
Tabela 18 - Dados de RMN ^1H (600 MHz) e ^{13}C (150 MHz) da amostra 21D5A (44)	124
Tabela 19 - Dados de RMN ^1H (600 MHz) e ^{13}C (150 MHz) da amostra 21D5C (45)	125
Tabela 20 - Dados de RMN ^1H (600 MHz) e ^{13}C (150 MHz) da amostra 21D5E (46)	126

Tabela 21 - Dados de RMN ^1H (600 MHz) e ^{13}C (150 MHz) da amostra HM11-32E (47)	127
--	-----

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 - Proposta de biossíntese para o cryptosporiopses.....	62
Esquema 2 - Proposta de biossíntese para o roussoellatídeo (33), a partir de uma única cadeia policetílica via metilação de C-2 de um grupo acetato.....	62
Esquema 3 - Proposta de biossíntese para a formação do roussoellatídeo (33), envolvendo uma reação Diels-Alder intermolecular de duas cadeias policetílicas.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ASW	<i>Artificial Sea Water</i>
AcOEt	Acetato de Etila
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-UV-EM	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada a um Detector de Ultravioleta e a um Detector de Espectrometria de Massas
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
δ	Deslocamento químico
DMSO-d_6	Dimetilsulfóxido Deuterado
ELSD	Evaporative Ligth Scattering Detector
INADEQUATE	<i>Incredible Natural Abundance Double Quantum Transfer Experiment</i>
IC₅₀	Concentração inibitória 50%
<i>J</i>	Constante de acoplamento
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence Spectroscopy</i>
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Coherence Spectroscopy</i>
HRESI	<i>High-Resolution Electron Ionization Mass Spectrometry</i>
λ	Comprimento de onda
m/z	Relação massa/carga
MHz	Megahertz
PDA	Photodiode Array Detector (Detector de arranjo de diodos)
ppm	Partes por milhão
<i>t</i>ROESY	<i>Transverse Rotating Frame Overhauser Enhancement Spectroscopy</i>
[α]_D	Rotação óptica
RMN ¹H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN ¹³C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	Metabólitos secundários produzidos por micro-organismos	12
1.2	Biossíntese de Metabólitos Secundários.....	15
2	OBJETIVOS	20
2.1	Objetivo Geral	20
2.2	Objetivos Específicos	20
3	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	21
3.1	Obtenção e identificação da linhagem DLM33	24
3.2	Solventes e equipamentos.....	21
3.3	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	21
3.4	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	22
3.5	Análise por CLAE-UV-EM.....	22
3.6	Análises por UPLC-QToF-HRMS	23
3.7	<i>Roussoella</i> sp. DLM33	24
3.6.1	Obtenção e fracionamento do extrato do fungo <i>Roussoella</i> sp. DLM33	24
3.6.2	Fracionamento da fração DLM33-A7	25
3.6.3	Fracionamento da fração DLM33-A6	27
3.8	Metodologias de extração para obtenção do extrato de DLM33	28
3.9	Planejamento experimental e análise quimiométrica para o melhoramento na produção do composto 33	29
3.10	Experimentos de incorporação com precursores marcados com ^{13}C	32
3.11	Fracionamento dos extratos e isolamento do composto 33 isotopicamente marcado com ^{13}C	32
3.12	Isolamento e identificação dos metabólitos de <i>Annulohypoxylon moriforme</i> MA9	34
3.12.1	Obtenção e fracionamento do extrato de MA9.....	34
3.12.2	Fracionamento da fração HM64.....	35

3.12.3	Fracionamento da fração HM01	36
3.12.4	Fracionamento da fração HM11	37
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1	Estruturas das substâncias isoladas de <i>Roussuella</i> sp. DLM33	41
4.2	Identificação estrutural do composto 29	41
4.3	Identificação estrutural do composto 30	45
4.4	Identificação estrutural de dois isômeros do cryptosporiopsinol, 31 e 32	49
4.5	Identificação estrutural do roussoellatídeo, 33	54
4.6	Metodologias de Extração e Planejamento Experimental para aumento da produção do roussoellatídeo (33)	63
4.7	Proposta de biossíntese do composto 33	69
4.8	Estruturas das substâncias isoladas de <i>A. moriforme</i> MA9	77
4.9	Identificação estrutural do composto 36	77
4.10	Identificação estrutural dos compostos 43 e 44	83
4.11	Identificação estrutural do composto 45	97
4.12	Identificação estrutural dos compostos 46, 47 e 48	102
4.13	Identificação estrutural da dicetopiperazina 43	114
4.14	Identificação e elucidação estrutural dos compostos 50-53	119
5	CONCLUSÕES	136
6	REFERÊNCIAS	138

1 INTRODUÇÃO

1.1 Metabólitos secundários produzidos por micro-organismos

A busca por metabólitos secundários bioativos sempre foi um desafio para os químicos de produtos naturais. Desde o primeiro relato da penicilina G, isolada do fungo *Penicillium notatum* por Alexander Fleming em 1928, os micro-organismos tornaram-se uma importante fonte de novos metabólitos potencialmente bioativos.^{1,2} Muitos estudos por vezes levam ao isolamento de compostos estruturalmente interessantes do ponto de vista farmacológico, uma vez que podem vir a serem utilizados como base para a síntese de novos compostos, como por exemplo: a aspirona (**1**), isolada dos fungos *Aspergillus melleus*³ e *A. ochraceus*⁴, o antibiótico cefalosporina C (**2**), produzido pela linhagem *A. chrysogenum*⁵ e a hialoidina (**3**), composto isolado da mixobactéria *Hyalangium minutum*, que possui atividade citotóxica (IC₅₀ de 1,23 a 3,93 µM) contra células mamárias e atividade antibacteriana contra as linhagens *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.⁶

Dentre os micro-organismos, os fungos endofíticos e fungos provenientes do ambiente marinho representam uma importante fonte de metabolitos secundários estruturalmente únicos e com diferentes propriedades biológicas e farmacológicas.³⁻⁷ Fungos endofíticos são micro-organismos que habitam o interior dos tecidos de plantas sem causar efeito negativo imediato à sua saúde.⁸ A coevolução de endófito e planta hospedeira provavelmente desempenha um importante papel na comunicação planta-hospedeiro e na adaptação do hospedeiro às mudanças do ambiente.⁹

O taxol (**4**) e a vincristina (**5**) foram inicialmente obtidos de plantas e posteriormente isolados de fungos a elas associadas. O taxol (**4**), ou paclitaxel, é atualmente utilizado no tratamento do câncer e é produzido pelo fungo *Taxomyces andreanae*. A princípio acreditava-se na transferência horizontal de genes entre o endófito e o hospedeiro. Contudo, os genomas do endófito não possuem qualquer sequência gênica

semelhante aos genes que regulam a biossíntese do taxol em *Taxus* spp.¹⁰⁻¹² Outro composto bioativo produzido pelo endófito e sua planta hospedeira é a vincristina (**5**), anticancerígeno, isolado de *Fusarium oxysporum*, endofítico da planta *Catharanthus roseus*.¹³

Fungos endofíticos produzem todas as classes principais de metabólitos secundários: terpenos, alcaloides, fenilpropanoides, policetídeos e peptídeos.¹⁴ O fungo *Peyronella coffeae-arabicae* endófito da planta *Pritchardia lowreyana* produz quatro policetídeo-sesquiterpenos as peironellinas A-C (**6-8**) e a 11-desidroxi-epoxifomalina (**9**). O composto **9** apresenta atividade antiproliferativa com IC₅₀ de 0,5 µM contra células de câncer do ovário humano (OVCAR3).¹⁵

O fungo endofítico *Periconia* sp. F-31, isolado da planta *Annona muricata*, produz duas novas citocalasinas tricíclicas estruturalmente raras: a periconiasina G (**10**) que apresentou fraca atividade anti-HIV com IC₅₀ de 67 µM, e a periconiasina H (**11**) que apresenta um grupo sulfóxido em sua estrutura.¹⁶

Fungos provenientes de ambiente marinho podem ser divididos em dois grupos: fungos marinhos obrigatórios, que esporulam exclusivamente em habitat marinho e fungos marinhos facultativos, que são oriundos de ambientes de água doce ou terrestres e são capazes de crescer (ou esporular) em ambiente marinho.¹⁷

As algas, esponjas e plantas de mangues representam as principais fontes de exploração de fungos em busca de novos metabolitos secundários (**Figura 1**). Estudos químicos com esses fungos indicam uma vasta variabilidade química de compostos com potentes atividades biológicas.^{17,18}

Figura 1 – Porcentagem de novos compostos isolados de fungos de ambiente marinho, dividida por suas fontes¹⁸

Nos dois últimos anos, mais de 300 novos compostos foram isolados de fungos de ambiente marinho¹⁸, como **12** e **13**, produzidos por *Aspergillus* sp.¹⁹. O composto **13** apresentou potente atividade contra o vírus sincicial respiratório (VSR), um dos principais responsáveis por infecções das vias respiratórias em recém-nascidos. O estudo de biossíntese realizado com o fungo *Penicillium citrinum* levou ao isolamento de duas novas citrinalinas, **14** e **15**.²⁰

1.2 Biossíntese de Metabólitos Secundários

Grande parte dos compostos isolados de produtos naturais têm sua biossíntese codificada por um conjunto de genes, que são expressos por um grupo de enzimas conhecidas como poliketídeo sintases (PKS). Essas enzimas são classificadas em três grupos distintos (tipo I, tipo II e tipo III), dependentes de suas estruturas e bioquímica. Esta classe de enzimas pode ser encontrada como proteínas multifuncionais organizadas em domínios.²¹⁻²⁴ Cada domínio apresenta uma função específica (**Figura 2**), atuando tanto na extensão da cadeia como em reações de redução de grupos carbonílicos (KR), desidratação formando ésteres conjugados (DH) e na redução de ligações olefinicas (ER). A atividade desses domínios varia durante o processo de formação das cadeias, garantindo assim uma maior variabilidade entre as estruturas formadas (compostos aromáticos, macrolídeos e ácidos graxos).^{25,26}

Figura 2 – Generalidades na biossíntese de poliketídeos²⁶

Anteriormente à utilização das ferramentas de biologia molecular, o estudo de biossíntese de policetídeos foi realizado extensivamente com a utilização de precursores isotopicamente marcados com ^{14}C . Posteriormente, foi sugerido que as unidades de acetil-CoA seriam as unidades formadoras das cadeias.²⁷ Com os avanços na utilização de espectroscopia de RMN ^{13}C , os experimentos com acetato isotopicamente marcado com ^{13}C permitiram estabelecer diversos processos químicos e rotas de biossíntese. Em particular, a utilização de acetato duplamente marcado $[1,2-^{13}\text{C}]$ não apenas demonstrou a introdução de unidades intactas de acetato, como também deu suporte para o conhecimento dos processos envolvidos na formação das cadeias.^{26,28}

Estudos a nível molecular provaram que as enzimas da classe das PKS utilizam pequenas unidades ácidas como o acetato, propionato e em menor extensão butirato e outros, na formação de policetídeos (embora outras enzimas ou domínios utilizem também diversas moléculas pequenas como o glicerol, o ácido glicólico e aminoácidos proteicos e não-proteicos na formação de policetídeos híbridos). Essas enzimas são encontradas em bactérias, fungos, fitoplânctons, plantas e invertebrados.²⁶

Durante o processo de formação das cadeias policetídicas outras enzimas são responsáveis por reações do tipo redox (hidroxilação, epoxidação, introdução de oxigênio), halogenação, deleção de carbono e metilação.^{29,30} Uma mesma reação pode ser realizada por diferentes enzimas, resultando em transformações nada triviais do ponto de vista químico.²⁶ A princípio, por exemplo, acreditava-se que todas as reações de formação de ligação carbono-halogênio ocorriam apenas pela ação de enzimas heme haloperoxidasas. No entanto, diferentes enzimas foram identificadas e hoje sabe-se que essas reações podem ser catalisadas por metil-haleta transferases, halogenetos dependentes de S-adenosil metionina e outras enzimas do grupo halogenase.²⁹

O primeiro produto natural contendo halogênio a ser isolado foi o aminoácido diiodotirosina (**16**), obtido do coral *Gorgonia cavolii*.³⁰ Por muitos anos compostos halogenados foram considerados raros, no entanto, atualmente, muitos metabólitos halogenados são conhecidos, como o antibiótico cloranfenicol (**17**) isolado da bactéria *Streptomyces venezuelae*³¹, o antimicótico griseofulvina (**18**) isolado do fungo *Penicillium griseofulvum*³¹, e a cryptosporiopsina (**19**) isolada dos fungos *Cryptosporiopsis* sp.^{32,33}, *Sporormia affinis*³⁴ e *Periconia macrospinos*³⁵, que apresenta atividade antifúngica contra 70 linhagens de fungos.

As enzimas do grupo das halogenases são responsáveis pela introdução de átomos de cloro, bromo e iodo nas moléculas e são conhecidas por três tipos distintos de cofatores que atuam em conjunto com estas enzimas: (i) flavoenzimas; (ii) α -cetoglutarato-dependente de ferro não-heme; e (iii) vanádio peroxidases.³⁷ Estas enzimas atuam de formas diferentes transformando halogênios em espécies eletrofílicas (X^+), radicalares ($X^\cdot$) e nucleofílicas (X^-).³⁶⁻³⁸ Um exemplo ocorre com a molécula de rebecamicina (**20**), um agente antitumoral isolado do actinomiceto *Saccharothrix aerocolonigenes*. Neste caso uma flavoenzima inicialmente torna o átomo de Cl uma espécie mais susceptível ao ataque nucleofílico por um anel benzênico, ocorrendo assim a halogenação da molécula de triptofano (**Figura 3**).³⁸

Além das reações de halogenação, as flavoenzimas também são responsáveis por catalisar processos como a oxidação de aminas e álcoois, a epoxidação de olefinas, ciclização de Diels-Alder, a expansão de anel por Baeyer-Villiger e rearranjo de Favorskii.³⁶

Figura 3 – Halogenase que utiliza FADH₂ e O₂ na biossíntese de rebecamicina (**20**)³⁶

No trabalho realizado por Seto e colaboradores precursores marcados com ¹³C foram utilizados para estudar a biossíntese da enterocina (**21**), metabólito isolado da bactéria *Streptomyces maritimus*³⁹. Durante este estudo, sugeriram a presença de um raro processo oxidativo durante a biossíntese. Cerca de 40 anos mais tarde foi relatada que a enzima FAD-dependente ‘favorskiiase’ era responsável por este processo (**Figura 4**).³⁹⁻⁴¹ Rearranjo análogo ao de Favorskii também foi observado para a aspirona (**1**).^{3,4}

Figura 4 – Rearranjo de Favorskii para a molécula de enterocina⁴²

Um dos maiores problemas de se realizar o isolamento de compostos bioativos produzidos por micro-organismos é o baixo rendimento de que estes são produzidos.²² Assim, é necessário elaborar estratégias que favoreçam a produção em maior escala destes metabólitos secundários. Algumas metodologias têm sido utilizadas como: otimização da composição do meio de cultura, variação das condições de crescimento (pH, luminosidade, temperatura, etc) e co-cultura microbiana.⁴³

No trabalho realizado por Castro *et al.*⁴⁴, a utilização do planejamento fatorial fracionado (2^{n-1}) e de uma metodologia multicritério permitiu definir as melhores condições de crescimento fúngico e produção de metabólitos da classe das curvularinas. Além de aumentar a produção destes compostos, foi possível isolar compostos anteriormente não observados e inéditos na literatura, como o composto **22** uma nova curvularina e os compostos **23-28** relacionados às curvularinas, mas contendo um anel tetrahidrotiofeno fundido à lactona, confirmando assim a importância em se otimizar as condições de crescimento de metabólitos minoritários.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Realizar o estudo químico e de atividades biológicas de metabólitos produzidos pelas linhagens *Roussoella* sp. DLM33 e *Annulohypoxylon moriforme* MA9.

2.2 Objetivos Específicos

- Isolar e identificar os compostos produzidos pelas linhagens *Roussoella* sp. DLM33 e *Annulohypoxylon moriforme* MA9.
- Avaliar as atividades biológicas dos extratos e compostos isolados;
- Utilizar do planejamento fatorial fracionado para otimizar a produção do roussoellatídeo produzido por *Roussoella* sp. DLM33;
- Investigar a biossíntese do roussoellatídeo, utilizando-se precursores marcados com ^{13}C .

3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 Solventes e equipamentos

Solventes utilizados na preparação dos extratos e nos fracionamentos cromatográficos foram de grau analítico da Panreac, QHemis e FMaia. A água purificada e deionizada foi obtida de sistema Milli-Q Millipore, equipado com resina de troca iônica e filtro biológico.

As linhagens foram armazenadas e crescidas em incubadoras de crescimento (BOD) da Tecnal, modelo TE-371. A preparação de inóculo foi realizada em capela de fluxo laminar da SPLabor, modelo Pa420.

Os extratos e frações foram concentrados em evaporador rotatório da Fisaton 802D, sob pressão reduzida com auxílio de bomba de vácuo Brinkmann, modelo B-169. A retirada da água residual do extrato e frações foi realizada em evaporador centrífugo de alto vácuo “speedvac” da Thermo Scientific, modelo Savant SC 210A acoplado a uma bomba de alto vácuo Edwards, modelo RV8.

Para auxiliar a dissolução do extrato e frações foi utilizado um banho ultrassom da Unique, modelo 1450. Utilizou-se refrigerador modelo Zyrium Frostfree 430 da Brastemp para conservação e armazenamento de extratos e frações. As massas de extratos, frações e compostos puros foram medidas em balança Mark 210A da Marconi.

O fracionamento por cromatografia em coluna por 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 Sephadex LH-20 (Pharmacia-Biotech®). Para eluição utilizou-se MeOH em modo isocrático.

3.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C foram obtidos em espectrômetro Bruker DRX 9,4 Tesla, operando a 400 MHz (^1H) e Bruker AVANCE III 14,1 Tesla, operando a 600 MHz (^1H), utilizando-se CDCl_3 , acetona- d_6 , MeOH- d_4 e DMSO- d_6 como solventes e TMS como referência interna.

3.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

As análises por cromatografia líquida de alta eficiência em escala analítica e semi-preparativa foram realizadas em cromatógrafo preparativo da Waters com sistema quaternário de bombas e detector UV – visível de duplo feixe, modelo Waters 2489.

As colunas utilizadas foram:

- Coluna de fase reversa C₁₈ X-terra da marca Waters® – (5 µm, 250 x 4,6 mm).
- Coluna de fase reversa C₁₈, Inertsil ODS-SP – (5 µm, 250 x 4,6 mm).
- Coluna de fase reversa C₁₈, InertSustain C₁₈ – (5 µm, 250 x 4,6 mm).
- Coluna de fase reversa C₁₈, InertSustain C₁₈ – (5 µm, 250 x 20 mm).

3.4 Análise por CLAE-UV-EM

Para a obtenção de espectros de massas de baixa resolução 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 de espectrometria de massas modelo Waters Micromass ZQ 2000 operado utilizando plataforma Empower. A sigla utilizada para este equipamento foi nomeada CLAE-UV-EM.

Para obtenção dos espectros de massas e de absorção na região do ultravioleta as amostras foram diluídas em uma concentração de 1,0 mg.mL⁻¹ em 0,5 mL de MeOH grau cromatográfico e 0,5 mL de H₂O e transferidas para frascos específicos (vials) do amostrador.

Para análises das frações obtidas por extração em fase sólida (EFS) foi utilizada uma coluna de fase reversa C₁₈ X-terra da marca Waters® – dimensões de 50 mm de comprimento por 2,1 mm de diâmetro com 3,5 µm de tamanho da partícula. A eluição foi realizada em modo gradiente de solventes orgânicos (MeOH/MeCN 1:1 + 0,1% de ácido fórmico) e H₂O + 0,1% de ácido fórmico (**Tabela 1**). Para as análises das frações obtidas no processo de purificação, a coluna e as condições cromatográficas foram as mesmas utilizadas no processo de separação e purificação.

Tabela 1 – Gradiente de eluição utilizado nas análises cromatográficas e obtenção dos espectros de massas e de bandas de absorção no UV das frações e extratos de *Roussoella* sp. DLM33

Tempo	Fluxo	MeOH	MeCN	H ₂ O
1 min	1,0	5	5	90
22 min	1,0	50	50	-
30 min	1,0	50	50	-
31 min	1,0	5	5	90
40 min	1,0	5	5	90

3.5 Análises por UPLC-QToF-HRMS

Análises foram realizadas em um UPLC-QToF-HRMS com uma interface eletrospray (ESI) acomodada ao sistema Acquity UPLC (Waters Corporation). Utilizou-se uma coluna BEH C₁₈ (dimensões: 2,1 x 100 mm, 1,7 µm; Waters Corporation), pré-coluna BEH C₁₈ (dimensões: 2,1 x 5 mm, 1,7 µm; Waters Corporation) e fase móvel constituída por H₂O Milli-Q + 0,1% de ácido fórmico (Panreac) e MeCN (Sigma) + 0,1% de ácido fórmico. O gradiente de eluição utilizado foi H₂O/MeCN 8:2 por 6 minutos, H₂O/MeCN 1:1 por 2,5 minutos, H₂O/MeCN 1:49 por 0,6 minuto e H₂O/MeCN (4:1) por 0,9 minuto, vazão de 0,5 mL/min. O volume de injeção utilizado foi de 10 µL. A coluna e pré-coluna foram mantidas a uma temperatura de 40 °C, enquanto as amostras foram mantidas a 15 °C. A detecção foi realizada em modo positivo e resolução, tempo de aquisição de 0 a 10 minutos, fonte ESI, intervalo de massa de 150 a 1000 Da, scan time de 0,2 s⁻¹, energia de colisão (alta energia) de 20 a 30 V. As condições do ESI no modo positivo foram: voltagem da capilaridade de 1,2 kV, voltagem do cone de 30 V, temperatura da fonte de 100 °C, temperatura de dessolvatação de 450 °C, vazão do gás no cone de 50 L h⁻¹ e vazão do gás de dessolvatação de 750 L h⁻¹. Para calibração interna, utilizou-se uma solução de leucina-encefalina (Sigma) 20 µg/mL, infundida pela sonda do lock-mass com vazão de 10 µL/min.

3.6 Obtenção e identificação da linhagem DLM33

A linhagem codificada como DLM33, foi isolada da ascídia *Didemnum ligulum* e inoculada em placas de Petri com malte 3%, água do mar artificial e pH 8. A linhagem foi identificada como *Roussoella* sp. DLM33. A identificação da linhagem foi realizada pela professora Dr^a Lara D. Sette no Departamento de Bioquímica e Microbiologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus Rio Claro.

3.7 *Roussoella* sp. DLM33

3.7.1 Obtenção e fracionamento do extrato do fungo *Roussoella* sp. DLM33

O fungo *Roussoella* sp. DLM33 foi inoculado em 10 L do meio de cultura de Malte 3% (30 g de malte/1L de água), com água do mar artificial e pH 8, durante 21 dias à temperatura ambiente (25 °C), em modo estático. Após o crescimento, o meio de cultura foi filtrado através de celite e o filtrado foi extraído com AcOEt, obtendo-se duas frações (AcOEt e H₂O). A fração AcOEt foi evaporada em evaporador rotativo a 35 °C e pressão reduzida. A fração AcOEt foi resuspendida em 95 % de MeOH e particionada com hexano.

O extrato MeOH (1,78 g) foi fracionado em coluna cromatográfica de Sephadex LH-20 com MeOH, obtendo-se um total de 60 frações. Estas foram analisadas por CCD e reunidas por similaridade em 4 grupos, conforme mostrado na Figura 5.

Figura 5 - Fracionamento do extrato AcOEt do meio de cultura da linhagem DLM33

3.6.2 Fracionamento da fração DLM33-A7

A fração DLM33-A7 foi parcialmente solubilizada em Hex/CH₂Cl₂ (1:9)/AcOEt/MeOH (95:5) em proporção 9:1. Durante a solubilização houve a formação de um precipitado denominado por DLM33-A7ppt. Este foi analisado por CCDA (eluente, hexano:AcOEt (7:3) e revelado com ácido fosfomolibdico). O precipitado foi filtrado em coluna de gel de sílica com hexano/AcOEt (8:2) para eliminar possíveis interferentes. A análise da fração resultante por CLAE-UV-EM e RMN de ¹H e ¹³C permitiu a identificação do composto **29**.

A fração solúvel de DLM33-A7 (**Figura 6**) foi fracionada por cromatografia em coluna de gel de sílica (5 g) utilizando-se Hex/CH₂Cl₂ (1:9)/AcOEt/MeOH (95:5) em proporção 9:1, rendendo um total de 20 frações, A7A1 – A7A20. A subfração A7A19 (155,0 mg) foi fracionada por CLAE-UV, utilizando-se uma coluna Inertsil ODS-SP (14 x 250 mm, 5 µm); fluxo: 1,0 mL/min; λ_{max} detecção: 254 nm. A separação foi realizada utilizando um gradiente de 10 a 50% de MeOH. O fracionamento rendeu um total de 15 subfrações, A7A19A – A7A19P.

A subfração A7A19M (37,0 mg) foi fracionada por CLAE-UV, utilizando-se uma coluna Inertsil C8-4 (14 x 250 mm, 5 µm); fluxo: 1,0 mL/min; λ_{max} detecção: 254 e

280 nm. O modo de eluição foi isocrático com H₂O/MeOH (4:6) + 0,1% ácido fórmico. Foram obtidas 5 subfrações, A7A19M1 - A7A19M5. A análise da fração A7A19M2 (9,0 mg) por CLAE-UV-EM e RMN ¹H e ¹³C permitiu a identificação do composto **30**.

A fração A7A4 (10,6 mg) foi fracionada por CLAE-UV (**Figura 6**), utilizando-se uma coluna X-Terra (14 x 250 mm, 5 µm); fluxo: 1,0 mL/min; λ_{max} detecção: 254 nm. A separação ocorreu utilizando uma condição isocrática de H₂O/MeOH (6:4). O fracionamento rendeu um total de 6 subfrações, A7A4A – A7A4F. A subfração A7A4B (5,0 mg) foi fracionada por CLAE-UV, utilizando-se uma coluna C8-3 (14 x 250 mm, 5 µm); fluxo: 1,0 mL/min; λ_{max} detecção: 254. O modo de eluição foi isocrático com H₂O/MeOH (3:7) – 0,1% ácido fórmico. Foram obtidas 2 subfrações, denominadas A7A4B2 (1,3 mg) e A7A4B3 (3,2 mg). A análise destas frações por CLAE-UV-EM e RMN ¹H e ¹³C permitiu a identificação dos compostos **31** e **32**.

Figura 6 – Fluxograma de fracionamento da fração DLM33-A7A

3.6.3 Fracionamento da fração DLM33-A6

A fração DLM33-A6 foi separado por cromatografia em cartucho preenchido com sílica-gel derivatizada com grupos cianopropila com dimensão de 10 g e eluídos com a mistura [Hex/CH₂Cl₂ (3:7)/AcOEt/MeOH (8:2)] nas proporções 8:2 e 7:3; AcOEt:MeOH e MeOH. Foram obtidas 4 frações, denominadas por DLM33-A6A - DLM33-A6D.

A subfração DLM33-A6A (530 mg) (**Figura 7**) foi fracionada em CLAE-UV, utilizando-se uma coluna Waters Inertsil C8-4 (14 x 250 mm, 5 µm); fluxo: 8,0 mL/min; λ_{max} detecção: 254 nm. O modo de eluição foi isocrático com MeOH/H₂O (4:6) – ambos acidificados com ácido fórmico 0,1%. O fracionamento rendeu um total de 20 subfrações, A6A1 - A6A20.

A subfração A6A10 (63,0 mg) foi fracionada em CLAE-UV, utilizando-se uma coluna Inertsil C8-3 (14 x 250 mm, 5 µm); fluxo: 1,0 mL/min; λ_{max} detecção: 254 e 280 nm. O modo de eluição foi isocrático com H₂O:MeOH:MeCN (52:24:24) – 0,1% ácido fórmico. Foram obtidas 8 subfrações, A6A10A - A6A10H.

A subfração A6A13 (79,7 mg), foi fracionada em CLAE-UV (**Figura 7**), utilizando-se uma coluna Inertsil C8-3 (14 x 250 mm, 5 µm); fluxo: 8,0 mL/min; λ_{max} detecção: 254 e 280 nm. O modo de eluição foi isocrático com MeOH:H₂O (1:1) – 0,1% ácido fórmico. Foram obtidas 5 subfrações A6A13A - A6A13E.

As subfrações A6A10E e A6A13D foram reunidas (32,3 mg) após análise por CLAE-UV-EM (conforme item 3.5). As amostras foram obtidas como um sólido amorfo branco. A análise dos espectros de RMN ¹H e ¹³C, HSQC, HMBC e gCOSY da fração A6A13D permitiu identificar o composto **33**.

Figura 7 – Fluxograma de fracionamento da fração DLM33-A6A

3.8 Metodologias de extração para obtenção do extrato de DLM33

Diferentes metodologias de extração foram realizadas com o fungo *Roussoella* sp. objetivando-se incrementar a obtenção do roussoellatídeo (**33**) e determinar a melhor metodologia a ser utilizada em experimentos de planejamento experimental e biossíntese. As metodologias de extração foram realizadas com meios de culturas do fungo obtidas em volumes de 500, 250 e 100 mL.

1. Extração do meio de cultura com AcOEt/MeOH/CH₂Cl₂ (3:2:1) com 1% de ácido fórmico;
2. Filtração e separação do meio de cultura e micélio e extração com AcOEt;
3. Extração do meio de cultura filtrado com AcOEt seguido de extração com a mistura das resinas de XAD 2, 4 e 7, com agitação em Shaker (overnight);
4. Filtração do meio de cultura e “clean-up” do meio filtrado por extração em fase sólida (EFS) em coluna cromatográfica de sílica derivatizada com grupos

C₁₈, utilizando-se fase móvel composta por H₂O/MeOH 1:0, 7:3, 1:1 e 0:1.

Extração do micélio com MeOH;

5. Extração do meio de cultura com CH₂Cl₂/MeCN (1:1);
6. Extração do meio de cultura com CH₂Cl₂.

3.9 Planejamento experimental e análise quimiométrica para o melhoramento na produção do composto 33

Foi utilizado planejamento fatorial fracionado (PFF) para incrementar a produção do composto (33). Foram selecionadas 5 variáveis independentes: concentração total de sais inorgânicos na preparação da água do mar artificial, parâmetro indicado por [sais]; concentração dos nutrientes do meio de cultura Malte 3%, indicado por [M3]; tempo de crescimento do fungo em dias; crescimento do fungo sob agitação ou em modo estático; temperatura de crescimento em °C. As variáveis foram testadas em dois níveis, +1 (máximo) e -1 (mínimo), como definido na Tabela 2. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Tabela 2 - Fatores e níveis do PFF para melhorar a produção do composto 33

Fator	Nível (l)	
	-1	+1
1 Concentração de sais no meio de cultura	10%	90%
2 Tempo de crescimento	14 dias	28 dias
3 Temperatura de crescimento	15 °C	30 °C
4 Com ou sem agitação	0 rpm	160 rpm
5 Concentração dos nutrientes no meio de cultura	20%	80%

Em um planejamento fatorial completo (2ⁿ), onde n = número de variáveis, teríamos 32 experimentos (Tabela 3). As condições de crescimento apresentadas na Tabela 3 foram atribuídas da seguinte maneira: na coluna 1 os níveis mínimo e máximo foram colocados de forma alternada, a coluna 2 alternou-se dois mínimos e dois máximos,

a coluna 3 entre quatro mínimos e quatro máximos, a coluna 4 entre oito mínimos e oito máximos, e a coluna 5 entre dezesseis mínimos e dezesseis máximos.

Tabela 3 – Condições de crescimento estabelecidas para o planejamento experimental

Experimentos	[sais]	t (dias)	T (°C)	rpm	[M3]
1	-	-	-	-	-
2	+	-	-	-	-
3	-	+	-	-	-
4	+	+	-	-	-
5	-	-	+	-	-
6	+	-	+	-	-
7	-	+	+	-	-
8	+	+	+	-	-
9	-	-	-	+	-
10	+	-	-	+	-
11	-	+	-	+	-
12	+	+	-	+	-
13	-	-	+	+	-
14	+	-	+	+	-
15	-	+	+	+	-
16	+	+	+	+	-
17	-	-	-	-	+
18	+	-	-	-	+
19	-	+	-	-	+
20	+	+	-	-	+
21	-	-	+	-	+
22	+	-	+	-	+
23	-	+	+	-	+
24	+	+	+	-	+
25	-	-	-	+	+
26	+	-	-	+	+
27	-	+	-	+	+
28	+	+	-	+	+
29	-	-	+	+	+
30	+	-	+	+	+
31	-	+	+	+	+
32	+	+	+	+	+

No entanto, em um planejamento fatorial fracionado, definido pela relação 2^{n-1} , o número de experimentos é reduzido à metade, correspondendo a 16 experimentos. A escolha dos experimentos no PFF foi realizada de forma aleatória (**Tabela 4**).

Tabela 4 - Matrix de planejamento para os experimentos de PFF

Experimentos	[sais]	t (dias)	T (°C)	rpm	[M3]
1	10	14	15	0	20
4	90	28	15	0	20
6	90	14	30	0	20
7	10	28	30	0	20
10	90	14	15	160	20
11	10	28	15	160	20
13	10	14	30	160	20
16	90	28	30	160	20
18	90	14	15	0	80
19	10	28	15	0	80
21	90	14	30	0	80
24	10	28	30	0	80
25	90	14	15	160	80
28	90	28	15	160	80
30	90	14	30	160	80
31	10	28	30	160	80

Cada experimento foi realizado em triplicata. Os meios de crescimento esterilizados (100 mL) foram adicionados em frascos Schott de 500 mL. A linhagem *Roussoella* sp. foi inoculada em placas de Petri com Malte 3%, e 4 discos (3 mm) das mesmas foram adicionados aos meios líquidos estéreis. Após o crescimento de cada experimento, foi adicionada ao meio de cultura a mistura AcOEt/MeOH/CH₂Cl₂ (6:3:1) com 1% de ácido fórmico. A mistura de solventes orgânicos e meio de cultura foram agitados em banho de ultrassom por 30 minutos, filtrada em celite e submetida à partição líquido-líquido em funil de separação. A fase orgânica foi evaporada e pesada. Alíquotas de 1,0 mg de cada extrato foram solubilizadas em MeOH e analisados por CLAE-UV-

EM utilizando coluna Waters C₁₈ X-Terra (5µm; 4,6 x 250 mm) e um gradiente de 40-100% de MeOH em H₂O durante 30 minutos, como especificado na figura 8.

3.10 Experimentos de incorporação com precursores marcados com ¹³C

Os experimentos de biossíntese utilizando [1-¹³C]acetato de sódio, [1,2-¹³C]acetato de sódio e [metil-¹³C]metionina, foram realizados cada um separadamente em 1500 mL de meio de cultura, distribuídos em 15 frascos de Schott com 100 mL de meio de crescimento, sob a condição de crescimento otimizada do experimento #19. Os experimentos foram realizados em triplicata. Os precursores isotopicamente marcados foram adicionados até uma concentração final de 1 g/L, distribuído em três vezes nos dias 10, 14 e 20 do crescimento do fungo. Após o 28º dia os meios de cultivo foram extraídos com AcOEt/MeOH/CH₂Cl₂ (6:3:1) com 1% de ácido fórmico. Alíquotas de 1,0 mg de cada extrato foram solubilizados em MeOH e analisados por CLAE-UV-EM para confirmar a incorporação de cada precursor (**Figura 8**).

3.11 Fracionamento dos extratos e isolamento do composto 33 isotopicamente marcado com ¹³C

O rendimento em massa dos extratos brutos obtidos a partir do meio de crescimento de cada experimento de incorporação com cada um dos precursores marcados foi: 1,5 g para o experimento com [1-¹³C] acetato de sódio, 1,6 g com [1,2-¹³C] acetato de sódio e 676,0 mg com [metil-¹³C] metionina. Alíquotas de 1,0 mg de cada extrato foram solubilizadas em MeOH e analisados por CLAE-UV-EM utilizando-se coluna Waters C₁₈ X-terra (5µm; 4,6 x 250 mm) e um gradiente de 40-100% MeOH em H₂O durante 30 minutos, ambos acidificados com 0,1% de ácido fórmico (**Figura 8**).

Figura 8 - Perfil cromatográfico por CLAE-UV dos extratos após adição dos precursores isotopicamente marcados. Detecção no $\lambda_{\text{max}} = 254$ nm. O pico indicado é do roussoellatídeo (**33**).

Os extratos dos meios de crescimento obtidos com cada um dos precursores marcados com ^{13}C foram fracionados em cartuchos de sílica derivatizados com grupos C_{18} (10 g), utilizando-se como eluente: H_2O , $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ (7:3/ 1:1/ 3:7) e MeOH . As frações obtidas com $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ (1:1 e 3:7) foram reunidas, evaporadas e fracionadas por CLAE-UV em duas etapas:

- I. Coluna semipreparativa de fase reversa InertSustain C_{18} ($5\mu\text{m}$; 20 x 250 mm), eluída com uma condição isocrática $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ (4:6), fluxo de 5,0 mL/min, tempo de 40 minutos, monitorando-se em $\lambda_{\text{max}} = 254$ nm (**Figura 9**).

Figura 9 - Análise de CLAE-UV da fração $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ (1:1 + 3:7)

- II. Coluna analítica de fase reversa InertSustain C_{18} ($5\mu\text{m}$; 4,6 x 250 mm), eluída com uma condição isocrática $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ (3:7), fluxo de 1,0 mL/min, tempo de 15 minutos, monitorando-se em $\lambda_{\text{max}} = 254$ nm (**Figura 10**).

Figura 10 - Perfil cromatográfico da fração proveniente da separação da etapa 1

3.12 Isolamento e identificação dos metabólitos de *Annulohypoxylon moriforme* MA9

3.12.1 Obtenção, identificação da linhagem e fracionamento do extrato de MA9

A linhagem codificada como MA9, foi isolada da planta *Anthurium loefgrenii* e identificada por ferramentas morfológicas e moleculares. A linhagem foi identificada como *Annulohypoxylon moriforme* MA9. A identificação da linhagem foi realizada pelo professor Dr. André Rodrigues do Laboratório de Ecologia e Sistemática de Fungos, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus Rio Claro.

O fungo *Annulohypoxylon moriforme* MA9 foi inoculado em 18L do meio de cultura PDB (potato dextrase broth; 24 g em 1L de água), durante 21 dias à temperatura ambiente (23 °C), em modo estático. Após o crescimento foi adicionado AcOEt ao meio de cultura com micélio deixando-se sob agitação por 1 noite. Após filtração através de celite e partição líquido-líquido obteve-se duas fases (AcOEt e H₂O). A fase AcOEt foi evaporada em evaporador rotativo a 35 °C e pressão reduzida. A fração AcOEt foi resuspensa em 95 % de MeOH e particionada com hexano.

A fração metanólica (2,74 g) foi fracionada em coluna cromatográfica de sílica-gel derivatizada com C18, com as misturas de solventes de H₂O/MeOH nas proporções de 9:1/ 8:2/ 7:3/ 6:4/ 1:1/ 3:7/ 0:1, obtendo-se um total de 7 frações. Estas foram analisadas por CLAE-UV-EM e apenas as quatro últimas frações foram selecionadas para fracionamento, conforme mostrado na Figura 11.

Figura 11 - Fracionamento da fração orgânica do meio de cultivo produzido pelo fungo *A. moriforme* MA9

3.12.2 Fracionamento da fração HM64

A fração HM64 (335,3 mg) foi fracionada em coluna de sílica-gel derivatizada com C18 (10 g), eluída com os solventes: H₂O, H₂O/MeOH (7:3), e MeOH. A fração aquosa foi descartada. As demais frações foram analisadas por CLAE-UV-EM. A fração H₂O/MeOH (3:7) foi codificada como HM64-B e fracionada em coluna semipreparativa C18 Delta Pak (15µm; 7,8 x 300 mm): fluxo: 2,0 mL/min; λ_{max} detecção: 254 nm. A separação ocorreu utilizando uma condição isocrática de H₂O/MeOH (7:3), como apresentado na figura 12. Foram obtidas 6 subfrações, denominadas HM64-B1 a HM64-B6. Após análise das frações por CLAE-UV-EM a fração HM64-B5 foi selecionada e analisada por UPLC-QToF-HRMS e RMN ¹H e ¹³C permitindo assim a identificação do composto **50** (Figura 12).

A fração obtida com MeOH foi codificada como HM64-C e fracionada em coluna semipreparativa C18 Delta Pak (15µm; 7,8 x 300 mm): fluxo: 2,0 mL/min; λ_{max} detecção: 254 nm. A separação ocorreu utilizando uma condição isocrática H₂O/MeOH (6:4), como apresentado na figura 12. Foram obtidas 6 subfrações, denominadas HM64-C1 a HM64-C6. As subfrações foram analisadas por CLAE-UV-EM. A fração HM64-C2

apresentou um perfil semelhante à fração HM64-B4. Estas frações foram reunidas e fracionadas utilizando-se coluna InertSustain C18 analítica (5µm; 4,6 x 250 mm) sob condição isocrática com H₂O/MeOH/MeCN (60:20:20). As frações HM64-B4B (6,9 mg) e HM64-B4E (4,0 mg) foram selecionadas e analisadas por UPLC-QToF-HRMS e RMN ¹H e ¹³C permitindo assim a identificação dos compostos **51** e **53** (**Figura 12**).

Figura 12 – Fluxograma de fracionamento da amostra HM64

3.12.3 Fracionamento da fração HM01

A fração HM01 (766,0 mg) foi fracionada em coluna de Sephadex LH-20, eluída em MeOH. A separação forneceu 50 frações, das quais foram reunidas por similaridade em 10 frações subsequentes. A subfração HM01-21 (43 mg) foi fracionada por CLAE-UV, utilizando-se uma coluna InertSustain C18 semipreparativa (5µm; 20 x 250 mm): fluxo: 3,0 mL/min; λ_{max} detecção: 254 nm. A separação ocorreu utilizando-se

uma condição isocrática de H₂O/MeOH/MeCN (40:30:30), como apresentado na Figura 13. Foram obtidas 4 subfrações, denominadas HM01-21A a HM01-21D. A subfração HM01-21B foi selecionada e após análise por CLAE-UV-EM e RMN ¹H e ¹³C, levando à identificação do composto **52**.

Figura 13 - Separação por CLAE-UV da amostra HM01-21. Condição de análise: coluna InertSustain C18 semipreparativa, método isocrático H₂O/MeOH/MeCN (40:30:30); λ_{max} = 254 nm.

3.12.4 Fracionamento da fração HM11

A fração HM11 foi fracionada em coluna de Sephadex LH-20, eluída com MeOH. Esta separação levou à obtenção de 80 frações, as quais foram reunidas em 9 subfrações (**Figura 16**). A subfração HM11-13 (60,5 mg) foi fracionada por CLAE-UV, utilizando-se uma coluna InertSustain C18 semipreparativa (5 μ m; 20 x 250 mm): fluxo: 3,0 mL/min; λ_{max} detecção: 254 nm. A separação ocorreu utilizando-se uma condição isocrática de H₂O/MeOH (48:52), como apresentado na Figura 14.

Figura 14 – Separação por CLAE-UV da amostra HM11-13. Condição de análise: coluna InertSustain C18 semipreparativa, método isocrático H₂O/MeOH (48:52); λ_{max} = 254 nm.

As frações HM11-13A (5,4 mg), HM11-13B (1,2 mg) e HM11-13C (3,0 mg) foram analisadas por CLAE-UV-MS e as duas primeiras foram repurificadas. A amostra HM11-13A foi fracionada utilizando-se uma coluna InertSustain C8 analítica (5 μ m; 4,6 x 250 mm) sob condição isocrática com H₂O/MeOH/MeCN (60:20:20). A fração HM11-13B foi purificada por CLAE utilizando-se coluna C18 X-Terra (5 μ m; 4,6 x 250 mm) sob condição isocrática com H₂O/MeOH (1:1) para as amostras. Mesmo procedimento foi utilizado para purificação da fração HM11-13C. A análise das frações repurificadas por CLAE-UV-EM e RMN ¹H e ¹³C, HMQC, HMBC e gCOSY permitiu identificar os compostos **36**, **43** e **44**.

A subfração HM11-32 (17,0 mg) foi fracionada por CLAE-UV, utilizando-se uma coluna InertSustain C18 semipreparativa (5 μ m; 20 x 250 mm): fluxo: 4,0 mL/min; λ_{max} detecção: 254 nm. A separação ocorreu utilizando-se uma condição isocrática de H₂O/MeOH/MeCN (62:20:18), como apresentado na Figura 15. O fracionamento rendeu um total de 6 subfrações, HM11-32A a HM11-32F. A análise das subfrações por CLAE-UV-EM mostrou que apenas as frações HM11-32A (0,7 mg) e HM11-32E (0,5 mg) estavam puras. Essa foram submetidas à análises de RMN 1D e 2D, permitindo assim identificar os compostos **49** e **57**, respectivamente.

Figura 15 – Separação por CLAE-UV da amostra HM11-32. Condição de análise: coluna InertSustain C18 semipreparativa, método isocrático H₂O/MeOH/MeCN (62:20:18); λ_{max} = 254 nm.

A subfração HM11-32C (8,6 mg) foi fracionada por CLAE-UV, utilizando-se uma coluna InertSustain C18 analítica (5 μ m; 4,6 x 250 mm): fluxo: 1,0 mL/min; λ_{max} detecção: 254 nm. Para a separação foi utilizada uma condição isocrática de H₂O/MeOH (1:1), como apresentado na Figura 15. O fracionamento rendeu um total de 3 subfrações, que foram analisadas por CLAE-UV-EM e RMN 1D e 2D, permitindo assim identificar os compostos **54**, **55** e **56**.

Figura 16 – Fluxograma de fracionamento da fração HM11.

- A CLAE - InertSustain C18
Isocrático - H₂O/MeOH (48:52)
5 frações
- B CLAE - InertSustain C18 semiprep
Isocrático
H₂O/MeOH/MeCN (62:20:18)
6 frações

- C CLAE - InertSustain C8
Isocrático
H₂O/MeOH/MeCN (60:20:20)
- D CLAE - InertSustain C18
Isocrático
H₂O/MeOH (1:1)

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estruturas das substâncias isoladas de *Roussuella* sp. DLM33

4.2 Identificação estrutural do composto 29

O composto **29** foi isolado como um cristal branco na subfração DLM33-A7ppt (9,5 mg) e identificado por meio da análise dos dados de CLAE-UV-EM e espectro de RMN ^1H e ^{13}C em comparação com dados da literatura.⁴⁵

A análise por CLAE-UV-EM apresentou espectro no UV com absorção em 248 e 322 nm característico de isocumarinas. O espectro de massas apresentou íon molecular protonado $[\text{M}+\text{H}]^+$ em m/z 193 (**Figura 17**).

Figura 17 - Espectro de massas e UV da subfração DLM33-A7ppt.

O espectro de RMN ^1H do composto **29** (**Figura 18**) apresentou dois dupletos em δ 7,25 e 6,81 correspondentes a dois hidrogênios com acoplamento *orto* ($J = 8,86$ e $8,89$ Hz), atribuídos a H-7 e H-6, característicos de anel aromático tetrassubstituído.

O espectro de RMN ^1H , também apresentou um sinal de hidrogênio em δ_{H} 4,64 (m; 1H), correspondente ao hidrogênio H-3. Os dois duplos dupletos em δ_{H} 2,92 e 2,68, foram atribuídos aos hidrogênios metilênicos atribuídos a CH_2 -4. Os sinais em δ_{H} 2,19 (s, 3H) e 1,54 (d, 3H) foram atribuídos aos hidrogênios metílicos CH_3 -5' e CH_3 -3', respectivamente.

O espectro de RMN ^{13}C de **29** (**Figura 19**) apresentou um sinal em δ_{C} 170,4 atribuído à carbonila de éster conjugado com anel benzeno, bem como seis sinais em δ_{C} 160,6, 137,1, 137,9, 124,9, 115,7 e 108,1, correspondentes aos carbonos benzênicos. Além destes, foram observados também um sinal em δ_{C} 75,4, atribuído ao carbono metínico C-3, um sinal em δ_{C} 31,9, correspondente ao carbono metilênico atribuído ao C-4 e dois sinais em δ_{C} 20,9 e 18,1, atribuídos às metilas C-5' e C-3', respectivamente. A atribuição dos deslocamentos químicos de RMN ^1H e ^{13}C encontra-se na Tabela 5 e foi realizado por comparação com dados da literatura.⁴⁵

Tabela 5 - Dados de RMN ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) de **29** em CDCl_3 .

Carbono	DLM33-A7ppt		5-metilmeleina ^a	
	δ_{C} de 29	δ_{H} de 29	δ_{C}	δ_{H}
1	170,4	-	169,2	-
2	-	-	-	-
3	75,4	4,64 m	77,8	4,68 m
3'	18,1	1,54 d (6,0 Hz)	19,7	1,56 d (6,5 Hz)
4	31,9	2,92 dd (16,8 e 3,5 Hz)	29,6	2,95 dd (16,5 e 3,7 Hz)
4	31,9	2,68 dd (16,8 e 11,3 Hz)	29,6	2,80 dd (16,5 e 10,7 Hz)
5	115,7	-	112,8	-
5'	20,9	2,19 s	20,8	2,18 s
6	137,1	6,81 d (8,9 Hz)	134,6	6,7 d (8,6 Hz)
7	124,9	7,25 d (8,9 Hz)	126,2	7,21 d (8,6 Hz)
8	160,6	-	154,4	-
9	108,1	-	106,4	-
10	137,9	-	140,6	-
OH	-	10,99 s	-	10,97 s

^aBI *et al.*, 2007 os dados foram obtidos em CDCl_3

Figura 18 - Espectro de RMN ^1H de **29** (CDCl_3 , 500 MHz).

Figura 19 - Espectro de RMN ^{13}C de **29** (CDCl_3 , 125 MHz).

4.3 Identificação estrutural do composto 30

O composto **30** foi isolado como um cristal branco na subfração A7A19M2 (9,0 mg) e identificado por meio da análise dos dados de CLAE-UV-EM e espectro de RMN ^1H e ^{13}C em comparação com dados da literatura.⁴⁶

A análise por CLAE-UV-EM apresentou espectro no UV com λ_{max} em 254 e 330 nm, característico de isocumarinas. O espectro de massas apresentou íon molecular desprotonado $[\text{M}-\text{H}]^-$ em m/z 275 (**Figura 20**).

Figura 20 - Espectro ESI⁻ e no UV da subfração A7A19M2.

Busca realizada com os dados de UV e EM nos bancos de dados da biblioteca virtual Dictionary of Natural Products (DNP) apresentou 5 possíveis resultados. No entanto, apenas um deles apresentava cloro em sua estrutura, um derivado clorado da 5-metilmeleína (**29**). Para confirmar a atribuição estrutural foram realizados os espectros de RMN ^1H e ^{13}C . Os dados obtidos foram comparados com dados da literatura.⁴⁶

O espectro de RMN ^1H de **30** (**Figura 21**), apresentou sinais semelhantes para o núcleo da lactona do composto **29**, com hidrogênio em δ_{H} 4,57 (m; 1H), correspondente ao hidrogênio metínico atribuído a H-3, dois duplos dupletos em δ_{H} 3,14 e 2,76, correspondentes aos hidrogênios metilênicos atribuídos a H-4 e o sinal em δ_{H} 1,40 (dd, 3H) atribuído aos hidrogênios da metila em $\text{CH}_3\text{-3'}$. Além destes, a presença do sinal em

δ_{H} 3,82 (s, 3H) foi atribuído a uma metila oxigenada. A ausência de sinais entre δ_{H} 6 e 8 sugeriu a presença de um núcleo benzênico totalmente substituído.

O espectro de RMN ^{13}C (**Figura 22**) apresentou um sinal em δ_{C} 160,5 atribuído à carbonila conjugada, bem como de seis sinais em δ_{C} 157,4, 154,4, 138,7, 116,1, 115,3 e 111,5, correspondentes aos carbonos benzênicos. Foi observado também um sinal em δ_{C} 72,9, atribuído ao carbono metínico C-3, um sinal em δ_{C} 32,9, correspondente ao carbono metilênico atribuído ao C-4 e um sinal em δ_{C} 20,2, atribuído a metila C-3'. A atribuição dos deslocamentos químicos de RMN ^1H encontra-se na Tabela 6 e foi realizado por comparação com dados do composto 5,7-dicloro-3-metil-6-metoxi-8-hidroxi-3,4-dihidroisocumarina relatados por McGahren e Mitscher.⁴⁶

Tabela 6 - Dados de RMN ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) de **30** em DMSO- d_6 .

Carbono	30		$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$
	δ_{C}	δ_{H} (m, J em Hz)	
1	160,5	-	-
2	-	-	-
3	72,9	4,57 (m)	4,58 (m)
3'	20,2	1,40 (d, 6,0)	1,55 (d, 6,0)
4	32,9	3,14 (dd, 17,1 e 3,1)	2,95 (dd, 17,0 e 3,0)
		2,77 (dd, 17,0 e 11,5)	2,80 (dd, 17,0 e 11,0)
5	116,1	-	-
6	157,4	-	-
7	115,3	-	-
8	154,4	-	-
9	111,5	-	-
10	138,7	-	-
OH	-	-	-
OMe	61,5	3,82 s	3,92

^a McGahren e Mitscher (1968) os dados foram obtidos em CDCl_3

Figura 21 - Espectro de RMN ^1H do composto **30** em $\text{DMSO}-d_6$ (400 MHz).

Figura 22 - Espectro de RMN ^{13}C do composto **30** em $\text{DMSO-}d_6$ (100 MHz).

4.4 Identificação estrutural de dois isômeros do cryptosporiopsinol, 31 e 32

Os compostos **31** e **32** foram obtidos inicialmente como uma mistura de isômeros. Após a separação, os compostos foram analisados por CLAE-UV-EM e apresentaram espectros no UV (característico de dieno conjugado) com λ_{max} em 244,8 e 247,2 nm, respectivamente. Ambos apresentaram espectros de massas com íons sodiados $[M+\text{Na}]^+$ em m/z 289/291/293 com razão isotópica 9:6:1, que indicou a presença de dois átomos de cloro (**Figuras 25 e 26**).

Figura 23 - Espectro no UV e ESI⁺ da subfração Ex4-B2.

Figura 24 – Espectro no UV e ESI⁺ da subfração Ex4-B3.

Quando realizada busca no banco de dados virtual *Dictionary of Natural Products* (DNP) utilizando-se os dados de UV, EM e a fonte biológica (Fungi), oito possíveis resultados foram obtidos. Desses apenas um resultado (cryptosporiopsinol) apresentava cloro em sua estrutura, o que está em concordância com os dados de massas observados para os compostos **31** e **32**. Para confirmar o resultado foram realizados os espectros de RMN ^1H e ^{13}C e comparados com os da literatura.⁴⁷

Cryptosporiopsinol

Os espectros de RMN ^1H de **31** e **32** (**Figuras 27 e 28**), apresentaram sinais entre δ_{H} 5,5 - 6,5 atribuídos aos hidrogênios olefinicos H-2 e H-3, os sinais entre δ_{H} 4,1 - 4,8 aos hidrogênios em carbono carbinólico (H-6) e em carbono ligado a halogênio (H-7). Os sinais em δ_{H} 1,70 (d) foram atribuídos à metila alílica CH_3 -1 e o singlete próximo de δ_{H} 3,70 à metoxila. O singlete em δ_{H} 3,30 corresponde ao hidrogênio de OH.

O espectro de RMN ^{13}C estar de acordo com os dados da literatura para o cryptosporiopsinol, apresentando sinal em δ_{C} 172 (C-9) atribuído a carbonila do grupo éster, sinais entre δ_{C} 120 - 139 correspondem aos carbonos sp^2 (C-2, C-3, C-4 e C-5). Os sinais em δ_{C} 68 (C-7), 76 (C-6) e 88 (C-8) atribuídos aos carbonos ligados à heteroátomos e os sinal em δ_{C} 19 atribuído a metila alílica (C-1), além do sinal em δ_{C} 54 ao grupo metoxila do éster (OCH_3).

Os dados de CLAE-UV-EM e RMN ^1H e ^{13}C permitiram identificar os compostos **31** e **32** como estereoisômeros do cryptosporiopsinol.⁴⁷

Figura 25 – Espectro de RMN ^1H do composto **31** (600 MHz, DMSO- d_6).

Figura 26 - Espectro de RMN ^1H do composto **32** (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$).

Figura 27 - Espectro de RMN ^{13}C do composto **31** (150 MHz, DMSO- d_6).

4.5 Identificação estrutural do roussoellatídeo, 33

O composto **33** foi identificado na subfração A6A13D (32,3 mg), obtido a partir do extrato MeOH do meio de cultura do fungo *Roussoella* sp. DLM33 (**Figura 7**), por meio da análise dos seus espectros de RMN ¹H e ¹³C, HMQC, HMBC e gCOSY.

O espectro no UV (**Figura 28**) apresentou duas bandas de absorção em $\lambda_{\max}$ 212 e 250 nm, indicando a existência um cromóforo de carbonila α,β -insaturada no composto e a análise de desvio do plano de luz polarizada apresentou uma rotação específica $[\alpha]_D^{25} = +9,69$.

Figura 28 –Espectro UV da subfração A6A13D

A análise por HREIMS (**Figura 29**) indicou a presença de um íon molecular $[M+H]^+$ em m/z 417,0870/419,0840/421,1027, com razão isotópica 8,1:5,1:1,0, correspondente à fórmula molecular C₁₉H₂₂O₆Cl₂, com índice de deficiência de hidrogênios (IDH) igual a oito.

Figura 29 – Espectro de massas de alta resolução (ESI⁺) do roussoellatídeo (**33**).

A análise dos espectros de RMN ¹H, ¹³C, gCOSY, gHSQC e gHMBC (**Figuras 30, 31, 41, 42 e 43**) indicou a presença de dois grupos carbonila de éster ou lactona ou carboxila de ácido em δ_C 168,6 (C-1), 167,9 (C-19). Além disso, o sinal de uma carbonila de cetona α,β -insaturada foi observado em δ_C 187,9 (C-4), bem como de três ligações duplas: uma dupla *trans*-dissubstituída em δ_H 5,30 (dq, $J = 15,3, 6,4$ Hz)/ δ_C 126,3 (CH-14) e δ_H 5,10 (ddq, $J = 15,3, 8,8, 1,4$ Hz)/ δ_C 132,2 (CH-13), uma ligação dupla trissubstituída em δ_H 6,84 (dd, $J = 6,6$ Hz)/ δ_C 142,3 (CH-10) e uma ligação dupla tetrassubstituída em δ_C 168,8 (C-6) e 131,6 (C-5).

A análise dos espectros de RMN também indicaram a presença de quatro grupos metila: a) em δ_H 1,50 (dd, $J = 6,4, 1,4$ Hz)/ δ_C 17,9 (CH₃-15) atribuída à metila ligada a carbono sp²; b) em δ_H 0,93 (d, $J = 7,1$ Hz)/ δ_C 12,9 (CH₃-18) e em δ_H 0,79 (d, $J = 6,9$ Hz)/ δ_C 16,5 (CH₃-17) correspondentes às metilas ligadas a carbono sp³, e; c) em δ_H 3,63 (s)/ δ_C 53,2 (CH₃-16) atribuída à metila ligada a um heteroátomo. Quatro grupo metínicos também foram observados em δ_H 2,76 (dd, $J = 12,1, 8,8$ Hz)/ δ_C 40,6 (CH-7); δ_H 2,25 (m)/ δ_C 32,1 (CH-8); δ_H 2,34 (m)/ δ_C 34,1 (CH-9); δ_H 3,50 (t, $J = 8,8$ Hz)/ δ_C 40,2 (CH-12), e em δ_H 5,20 (s)/ δ_C 67,1 (CH-3) atribuído a um grupo metínico ligado a um heteroátomo. Um carbono carbinólico quaternário foi observado em δ_C 84,8 (C-2).

A presença de 3 grupos carbonílicos e 3 ligações duplas estão em concordância com o cálculo do IDH, faltando apenas 2 insaturações para igualar a 8. Portanto, o composto **33** apresenta duas subestruturas cíclicas. A presença de 6 átomos de oxigênio deve ser atribuída aos grupos carbonílicos, no qual 4 destes pertencem aos grupos éster e ácido carboxílico, um a carbonila da cetona α,β -insaturada e o último oxigênio deve-se tratar de um álcool. A presença de um sinal em δ_H 7,36 (s) que não apresenta correlação com carbono no espectro de gHSQC, mas apresenta correlação com o carbono carbinólico em δ_C 84,8 (C-2), indicou tratar-se de um álcool terciário.

O espectro de gCOSY permitiu identificar um sistema cíclico de seis membros ligado a uma cadeia lateral alílica, conforme observado na Figura 30. Os acoplamentos à longa distância observados no espectro gHMBC entre C-10 (δ_C 142,3) e H-9 (δ_H 2,34), CH₃-18 (δ_H 0,93) e H-12 (δ_H 3,50), bem como entre C-11 (δ_C 132,1) e H-9 e H-10 confirmaram a presença do anel de seis membros. O grupo carboxílico C-19 (δ_C 167,9) apresentou acoplamento $^2J_{CH}$ com H-10 e foi conectado a C-11 (**Figura 30**).

A posição da cadeia ciclopentenona foi definida pelas correlações observadas no espectro gHMBC de C-6 (δ_C 168,8) com H-7, H-8 e H-12. Um acoplamento $^4J_{CH}$ foi observado entre H-7 e C-2 (δ_C 84,8), permitindo que o C-2 fosse ligado a C-6. Além desses, o hidrogênio da hidroxila em δ_H 7,36, apresentou um acoplamento com os carbonos C-2, C-1 (δ_C 168,6), C-3 (δ_C 67,0) e C-4 (δ_C 187,9). O acoplamento entre o H-3 (δ_H 5,20) e os carbonos C-2 e C-4 permitiu que os carbonos C-2 fosse ligado aos carbonos C-3 e C-4. A presença do ciclo ciclopentenona foi confirmada por comparação com dados da literatura.⁴⁷ Este composto foi denominado roussoellatídeo (**33**).

Figura 30 - Correlações gCOSY 1H - 1H e gHMBC 1H - ^{13}C no composto **33**.

A análise do espectro tROESY permitiu estabelecer que o anel de ciclohexeno estava em conformação *pseudo*-cadeira com os substituintes C-7, C-8 e C-12 em orientação *pseudo*-equatorial, enquanto que a metila (CH₃-18) em C-9 estava em *pseudo*-axial. As constantes de acoplamento vicinal observadas entre H-7 e H-8 (12,1 Hz) e entre H-7 e H-12 (8,8 Hz) confirmaram que H-7 encontra-se em posição *trans-pseudo* axial com relação a H-8 e H-12 (**Figura 31**). As correlações tROESY observadas entre 2-OH (δ 7,36), H-3 (δ 5,20) e CH₃-17 (δ 0,79), a metila (CH₃-16) e os hidrogênios H-13 (δ 5,10), H-14 (δ 5,30), e CH₃-15 (δ 1,51) e a metila singlete C-16 do éster (δ 3,63), estabeleceu que o grupo éster e o cloro ligado ao C-3 estavam *cis* entre si no anel de ciclopentenona. Os NOEs observados entre H-8 e H-12, bem como entre CH₃-17 e CH₃-18 com H-7 contribuíram para confirmar a estereoquímica relativa da molécula (**Figura 31**).

A configuração absoluta do composto **33** foi determinada por análise de difração de raios-X, de cristais obtidos em AcOEt/MeOH (4:1). A representação ORTEP apresentada na Figura 32 indicou que a proposta da estrutura do roussoellatídeo estabelecida pela análise de seus dados de RMN estava correta. A configuração absoluta foi determinada como sendo 2*S*, 3*S*, 7*R*, 8*S*, 9*R*, 12*S*.

Figura 31 – Correlações NOEs ¹H-¹H no composto **33**.

Figura 32 – Representação ORTEP do composto **33**, definido por cristalografia de raio-X.

O extrato MeOH da linhagem *Roussoella* sp. DLM33 foi avaliado e apresentou atividade anti-inflamatória moderada, conforme apresentado na Figura 33. Este bioensaio consiste em avaliar o nível de óxido nítrico (NO) produzido por uma célula, quando administrado diferentes concentrações do fármaco, e comparar com células não estimuladas (células normais). Como resultado compara-se a inibição da síntese de NO em uma concentração dependente, com os macrófagos estimulados com LPS (lipopolissacarídeo de *E. coli*) a 1 µg/mL (1mL).

Na Figura 33 observa-se a atividade anti-inflamatória do extrato MeOH nas concentrações de 3,13 a 25 µg/mL, comparada ao controle positivo (LPS). No entanto, o roussoellatídeo (**33**) apresentou atividade anti-inflamatória.

O roussoellatídeo (**33**) também foi avaliado contra linhagens de fungo fitopatogênicas de *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *F. verticillioides* e *Colletotrichum gloeosporioides*, porém sem atividade anti-fúngica. Em bioensaios de atividade citotóxica com linhagens de células tumorais A549, HeLa e GM 07492A, atividades antibacteriana e antiparasitária contra *Leishmania infantum* e *Trypanosoma cruzi* o composto também foi inativo.

Figura 33 - Efeito da atividade anti-inflamatória do extrato MeOH do meio de cultura do fungo *Roussoella* sp. DLM33 na produção de NO. *Significativo em relação ao Meio ($p < 0,05$) e # significativo em relação ao controle de LPS ($p < 0,05$).

Tabela 7 - Dados de RMN ¹H (600 MHz) e ¹³C (150 MHz) do composto **33**.

gHSQC				gHMBC
C	δ _C	Multip	δ _H (J em Hz)	
1	168,5	C	-	-
2	84,8	C	-	-
3	67,0	CH	5,20 (s)	C-1, C-2, C-4
4	187,9	C	-	-
5	131,6	C	-	-
6	168,8	C	-	-
7	40,6	CH	2,76 (dd; J = 6,1 e 8,0)	C-6
8	32,1	CH	2,25 (m)	C-9, C-12, C-17, C-18
9	34,1	CH	2,34 (sex; 4,3)	C-8, C-10, C-12, C-18
10	142,3	CH	6,83 (dd; J = 0,8 e 4,3)	C-16
11	132,1	C	-	-
12	40,2	CH	3,50 (t; J = 5,5)	C-13, C-14
13	132,2	CH	5,11 (ddd; J = 1,0, 5,5 e 10,2)	C-12, C-15
14	126,3	CH	5,31 (dq; J = 4,2 e 10,2)	C-12, C-15
15	17,9	CH ₃	1,50 (dd; J = 0,9 e 4,3)	C-12, C-13, C-14
16	53,2	CH ₃	3,63 (s)	C-1, C-2
17	16,5	CH ₃	0,78 (d; J = 4,5)	C-8, C-9, C-12
18	12,9	CH ₃	0,93 (d; J = 4,7)	C-8, C-9, C-10
19	167,9	C	-	-
2-OH	-	-	7,36 (s)	C-2, C-3, C-4, C-6

*Deslocamentos químicos em δ (ppm) obtidos em DMSO-*d*₆

Figura 34 – Espectro de RMN ^1H do composto **33** (600 MHz, DMSO- d_6).

Figura 35 – Espectro de RMN ^{13}C do composto **33** (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

O roussoellatídeo (**33**) apresenta esqueleto de carbono sem precedentes na literatura. O fragmento ciclopentenona diclorado de **33** corresponde estruturalmente à cryptosporiopsina (**19**).³³ Devido à sua estrutura incomum, em 1982 dois grupos de pesquisas apresentaram resultados da investigação da biossíntese do cryptosporiopsina, utilizando-se acetato de sódio marcado com ¹³C e ¹⁴C como precursores biossintéticos. Ambos grupos apresentaram resultados praticamente idênticos, indicando que o composto é formado por uma rota que envolve a formação prévia de deidroisocumarinas como intermediários na biossíntese, e que outras etapas como a descarboxilação oxidativa e halogenação antecedem a clivagem do anel aromático como apresentado no Esquema 1.^{49,50}

Esquema 1 - Proposta de biossíntese para o cryptosporiopsina

Considerando-se os estudos de biossíntese realizados com o cryptosporiopsina, postulamos que a biossíntese de roussoellatídeo (**33**) envolveria etapas de condensação de oito unidades de acetato, dando origem a um intermediário benzênico totalmente substituído. Este sofreria uma clivagem oxidativa, levando à formação de um anel de cinco carbonos, de maneira análoga à biossíntese do cryptosporiopsina.^{48,49} Esta possível rota de biossíntese deve ser regulada por enzimas do tipo policetídeo sintases (PKS), com o crescimento da cadeia poli-β-ceto e subsequente etapa de condensação intramolecular para a formação do anel ciclohexeno substituído com um radical alila (**Esquema 2**).

Esquema 2 - Proposta de biossíntese para o roussoellatídeo (**33**), a partir de uma única cadeia policetílica via metilação de C-2 de um grupo acetato

Porém, a posição do grupo metila H₃C-17 é muito intrigante, pois não se justifica em um processo de formação de cadeia policetílica, que provavelmente seria proveniente de um carbono C-2 de um grupo acetil-CoA, catalizada pela enzima HMG-CoA.²⁵ Esse tipo de reação foi observado até o momento apenas em dinoflagelados, bactérias e cianobactérias, mas não em fungos. A outra proposta de biossíntese, pouco usual, envolveria uma reação de Diels-Alder intermolecular entre dois intermediários provenientes da rota do acetato (**Esquema 3**).

Esquema 3 - Proposta de biossíntese para a formação do roussoellatídeo (**33**), envolvendo uma reação Diels-Alder intermolecular de duas cadeias policetílicas.

4.6 Metodologias de Extração e Planejamento Experimental para aumento da produção do roussoellatídeo (**33**)

Objetivando-se investigar a biossíntese do roussoellatídeo (**33**) foi necessário encontrar as condições favoráveis para a extração deste metabólito, bem como uma condição ótima para a sua produção. Inicialmente foram testadas seis metodologias de extração conforme citado no item 4.7. Todos os extratos obtidos foram analisados por CLAE-UV-EM. No entanto, apenas a metodologia 1 mostrou-se eficiente na extração do composto **33**, uma vez que não foi observado o sinal do íon molecular protonado $[M+H]^+$ em m/z 417 (**Figura 36**) para os extratos obtidos nas outras metodologias.

Figura 36 – Perfil cromatográfico do extrato do meio de cultura do fungo DLM33 obtido com a metodologia de extração do meio de cultura com AcOEt/MeOH/CH₂Cl₂ (3:2:1) com 1% de ácido fórmico. Pico 1: roussoelatídeo. (Condições de análise vide item 3.5)

A área do pico 1 correspondente ao composto **33** (**Figura 36**) foi utilizada como resposta do planejamento fatorial fracionado (PFF). Utilizando-se função de desejabilidade da metodologia multicritério, os valores das respostas foram convertidos em um valor adimensional, denominado de desejabilidade (d). A função de desejabilidade (d) permite somente valores entre 0 e 1, de forma que $d = 0$ é a resposta indesejável e $d = 1$ é a resposta totalmente desejável. A equação 1 mostra a equação utilizada no cálculo da desejabilidade.

$$d = \left(\frac{y - L}{T - L} \right) \quad \text{Equação 1}$$

O termo y corresponde a resposta para um experimento específico, e os valores de L e T correspondem ao menor e o maior valor entre todas as respostas. Os valores de desejabilidade (d) e dos níveis ($l = +1$ ou -1) foram utilizados para calcular os efeitos de 1ª e 2ª ordem (Equações 2 e 3).

$$Efi = R_i^+ - R_i^- \quad \text{Equação 2}$$

$$Efi^2 = T_i^+ - T_i^- \quad \text{Equação 3}$$

Onde R_i^+ e R_i^- correspondem a média dos resultados de ld_i positivos e negativos, respectivamente. T_i^+ e T_i^- são as médias dos valores de interação entre os níveis de dois fatores com o valor de desejabilidade $l_n l_{n'} d_i$. As médias foram realizadas utilizando o número 8, por se tratar de 16 experimentos: 8 positivos e 8 negativos. Por

exemplo, observando a tabela 9, a soma dos valores $R_i^+ = 0,606$ e $R_i^- = -1,177$ da variável 1 ([saís]) é igual a -0,571 (Equação 2). Este resultado dividido por 8 será -0,071 (valores em destaque na tabela 9). Esse é o valor do contraste da variável 1 no efeito de primeira ordem.

A equação 3 apresenta o cálculo do efeito de segunda ordem. Esta equação representa a interação entre os valores máximo e mínimo de duas variáveis multiplicados pelo valor de desejabilidade (D) para cada experimento. Por exemplo, o somatório da interação entre os fatores ([saís]xrpm) $T_i^+ = 0,83$ e $T_i^- = -0,954$ é igual a -0,124. Este resultado dividido por 8 será -0,015 (valores em destaque na Tabela 8). Os demais resultados para os efeitos de 1ª e 2ª ordem estão listados Tabela 9.

Aplicando-se a metodologia multicritério descrita no item 3.8 foi possível obter os valores de desejabilidade para a otimização da produção do composto **33**. A Tabela 8 apresenta os valores de desejabilidade para cada experimento do PFF. Nela pode-se observar que o experimento #19 foi o que forneceu a melhor resposta com valor de desejabilidade igual a 0,44.

Tabela 8 - Valores de desejabilidade (d) para cada experimento do PFF.

Experimentos	d	Experimentos	d
1	0,04	18	0,06
4	0,38	19	0,44
6	0,03	21	0,10
7	0,14	24	0,02
10	0,15	25	0,15
11	0,04	28	0,04
13	0,11	30	0,03
16	0,00	31	0,15

Tabela 9 - Efeitos de 1ª ordem e 2ª ordem no planejamento experimental para melhorar a produção do composto roussoellatideo (33).

Planejamento Experimental						Efeitos de 1ª ordem						Efeitos de 2ª ordem					
Exp.	1	2	3	4	5	d_i	$1d_i$	$2d_i$	$3d_i$	$4d_i$	$5d_i$	$14d_i$	$24d_i$	$34d_i$	$45d_i$		
1	-1	-1	-1	-1	-1	0,04	-0,04	-0,04	-0,04	-0,04	-0,04	0,04	0,04	0,04	0,04		
4	+1	+1	-1	-1	-1	0,38	0,38	0,38	-0,38	-0,38	-0,38	-0,38	-0,38	0,38	0,38		
6	+1	-1	+1	-1	-1	0,03	0,03	-0,03	0,03	-0,03	-0,03	-0,03	0,03	-0,03	0,03		
7	-1	+1	+1	-1	-1	0,14	-0,14	0,14	0,14	-0,14	-0,14	0,14	-0,14	-0,14	0,14		
10	+1	-1	-1	+1	-1	0,04	0,04	-0,04	-0,04	0,04	-0,04	0,04	-0,04	-0,04	-0,04		
11	-1	+1	-1	+1	-1	0,04	-0,04	0,04	-0,04	0,04	-0,04	0,04	-0,04	-0,04	-0,04		
13	-1	-1	+1	+1	-1	0,11	-0,11	-0,11	0,11	0,11	-0,11	-0,11	-0,11	0,11	-0,11		
16	+1	+1	+1	+1	-1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		
18	+1	-1	-1	-1	+1	0,06	0,06	-0,06	-0,06	-0,06	0,06	-0,06	0,06	0,06	-0,06		
19	-1	+1	-1	-1	+1	0,44	-0,44	0,44	-0,44	-0,44	0,44	0,44	-0,44	0,44	-0,44		
21	+1	-1	+1	-1	+1	0,10	-0,10	-0,10	0,10	-0,10	0,10	0,10	0,10	-0,10	-0,10		
24	+1	+1	+1	-1	+1	0,02	0,02	0,02	0,02	-0,02	0,02	-0,02	-0,02	-0,02	-0,02		
25	-1	-1	-1	+1	+1	0,15	-0,15	-0,15	-0,15	0,15	0,15	-0,15	-0,15	-0,15	0,15		
28	+1	+1	-1	+1	+1	0,04	0,04	0,04	-0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	-0,04	0,04		
30	+1	-1	+1	+1	+1	0,03	0,03	-0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	-0,03	0,03	0,03		
31	-1	+1	+1	+1	+1	0,15	-0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	-0,15	0,15	0,15	0,15		
							R_i^+	0,606	1,222	0,590	0,556	0,999	T_i^+	0,830	0,463	1,225	0,957
							R_i^-	-1,177	-	-1,194	-1,228	-0,784	T_i^-	-0,954	-1,321	-0,558	-0,826
							Efi	-0,071	0,083	-0,075	-0,084	0,027	Efi^2	-0,015	-0,107	0,083	0,016

Segundo o cálculo do efeito de 1ª ordem (**Tabela 9**) o valor do contraste de maior importância foi -0,084, correspondente ao fator 4 (modo de crescimento). 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). Neste caso o valor de maior importância é negativo e esta variável deve ser usada em seu nível mínimo (modo estático). Esta observação corrobora experimentos prévios, nos quais todos os experimentos com meio líquido sob agitação não produziram o composto **33**. Como este é o contraste de maior importância, seu valor deve ser multiplicado com os valores dos demais contrastes para o cálculo do efeito de segunda ordem. Desta forma, se os valores dos contrastes estiverem negativos para um efeito de segunda ordem, estes devem ser considerados no seu nível máximo, pois a interação entre eles vai reproduzir um valor positivo $[(-1) \times (-1) = +1]$.

Assim as variáveis 1 ([sais]) e 2 (tempo de crescimento) e as variáveis 3 (temperatura) e 5 ([M3]) que apresentaram valores de contrastes positivos devem ser usados no seu nível mínimo. Desta forma, os cálculos dos efeitos de 1ª e 2ª ordem indicam o experimento #4 como o experimento ótimo. Diferentemente da análise de desejabilidade, que indicou o experimento #19, ao observar a Tabela 8, nota-se que o experimento 4 detém o 2º maior valor para a desejabilidade.

Para confirmar este resultado, a variável 1 tinha que apresentar um sinal positivo, enquanto que, na verdade, é fracamente negativo (-0,015). Uma vez que a magnitude absoluta do efeito de 1ª ordem da variável 1 (-0,071) na produção de roussoellatídeo é quase o mesmo que a variável 4 (-0,084), presume-se que a variável 1 tem de ser negativa (-1, 10 % de concentração de sais). O mesmo raciocínio é atribuído à variável 5 ([nutrientes]), já o efeito de 2ª ordem com a variável 4 é fracamente positivo (0,016). Além disso, as análises por CLAE-UV mostraram que o valor da área média do pico 1 correspondente ao roussoellatídeo é mais elevado no experimento #19 (148,0) do que no experimento #4 (128,1) (**Figura 37**). Assim, este estabelece as condições de crescimento do fungo no experimento #19 deve incrementar a produção do roussoellatídeo (**33**).

Figura 37 - Análise comparativa de CLAE-UV ($\lambda_n = 254$ nm) do extrato produzido por *Roussoella* sp. DLM33 sob as condições dos experimentos #4 e #19.

Definida a condição de crescimento da linhagem *Roussoella* sp. DLM33 para a produção incrementada do roussoellatídeo, os experimentos de biossíntese com ^{13}C foram realizados, conforme descrito no item 3.11. A análise preliminar dos extratos por CLAE-UV-EM mostrou que o composto **33** sofreu incorporação de todos os precursores (**Figura 38**). Em seguida, o fracionamento dos extratos levou ao isolamento de 4,6 mg, 8,0 mg e 4,0 mg do composto **33** incorporado com $[1-^{13}\text{C}]$ acetato, $[1,2-^{13}\text{C}]$ acetato e $[\text{metil-}^{13}\text{C}]$ metionina, respectivamente, obtidos a partir de 1,5 L de meio de cultura.

Figura 38 - Espectros de massas (ESI^+) do roussoellatídeo (**33**) isotopicamente marcado, produzido na presença de diferentes precursores marcados com ^{13}C .

4.7 Proposta de biossíntese do composto 33

Os espectros de RMN de ^{13}C do composto **33** marcado com $[1-^{13}\text{C}]$ acetato de sódio, $[1,2-^{13}\text{C}]$ acetato de sódio e $[\text{metil-}^{13}\text{C}]$ metionina estão apresentados nas figuras 99 a 101. Todos os espectros foram obtidos em $\text{MeOH-}d_4$ + benzeno- d_6 e com 4,0 mg cada amostra. Os espectros foram obtidos com os mesmos parâmetros de aquisição para que as taxas de incorporação dos precursores na molécula pudessem ser calculadas (**Tabela 10**).

Tabela 10 - Taxa de incorporação dos experimentos marcados isotopicamente com $[1-^{13}\text{C}]$ acetato de sódio, $[1,2-^{13}\text{C}]$ acetato de sódio e $[\text{metil-}^{13}\text{C}]$ metionina.

Carbono	$\delta^{13}\text{C}$	$[1-^{13}\text{C}]$ acetato ^a	$[1,2-^{13}\text{C}]$ acetato ^a		$[\text{CH}_3-^{13}\text{C}]$ Met ^a
			%	$^1J_{\text{CC}}$ (Hz)	
1	169,3	19,0	4,8	ND	0,9
2	85,3	0,0	2,8	18,3	1,4
3	67,5	0,6	1,1	23,5	1,4
4	188,4	12,0	6,9	21,7	1,4
5	132,1	0,8	1,5	20,2	0,3
6	169,0	15,5	2,4	ND	1,4
7	40,6	0,8	6,5	19,6	1,0
8	32,6	16,6	6,6	17,3	0,9
9	34,6	3,3	2,4	15,8	1,0
10	142,7	0,9	3,4	18,7	0,9
11	132,6	0,7	7,4	20,6	0,4
12	40,4	3,8	2,3	19,9	1,7
13	132,7	0,3	7,3	27,4	3,4
14	126,8	4,1	1,9	42,4	1,0
15	18,4	0,5	2,5	19,9	1,4
16	53,7	0,5	1,2	ND	89,0
17	16,9	0,5	6,7	17,2	1,0
18	13,4	0,4	2,3	14,6	1,1
19	168,3	4,7	4,1	23,0	1,1

^aA taxa de incorporação = % abundância natural $\approx 1,1\%$ x área integrada do pico enriquecido/ altura do pico no espectro padrão sem marcação isotópica. ND = não determinado. Todos os dados foram obtidos em $\text{MeOH-}d_4$ + benzeno- d_6 (150 MHz)

A comparação entre os espectros de RMN ^{13}C do composto sem marcação isotópica e do composto marcado com $[1-^{13}\text{C}]$ acetato mostrou que os carbonos C-1, C-4,

C-6, C-8, C-9, C-12, C-14 e C-19 sofreram incorporação como apresentado na Figura 39. O grupo metila do grupo éster mostrou ser derivada da S-adenosilmetionina, com a incorporação de $[metil-^{13}C]$ metionina (**Figura 39**).

Figura 39 - Padrão de incorporação com $[1-^{13}C]$ acetato de sódio e $[metil-^{13}C]$ metionina.

A análise comparativa entre os espectros de RMN ^{13}C do composto **33** padrão (sem incorporação) com o experimento duplamente marcado $[1,2-^{13}C]$ acetato permitiu calcular a taxa de incorporação na molécula (**Tabela 10**). A análise do espectro de INADEQUATE permitiu indicar as unidades de acetato intactas que foram incorporadas como sendo C-4/C-5, C-6/C-7, C-8/C-17, C-9/C-18, C-12/C-11 e C-14/C-13 (**Figura 40**).

Figura 40 - Padrão de incorporação com $[1,2-^{13}C_2]$ acetato de sódio.

O padrão de incorporação observado na figura 40 está em desacordo com a proposta de biossíntese que envolve uma única cadeia policetílica (**Esquema 2**). No entanto, pode-se observar concordância com nossa segunda proposta, uma vez que a biossíntese que envolve o anel da ciclopentenona é similar ao relatado na literatura para o cryptoporiopsinol, que apresentou incorporação nos carbonos C-1, C-4 e C-6 para o experimento com $[1-^{13}C]$ acetato.

O experimento com $[1,2-^{13}\text{C}]$ acetato possibilita a incorporação de unidades intactas de acetato isotopicamente marcado (observada pelo acoplamento ^{13}C - ^{13}C de carbonos vicinais), tornando possível assim observar o desdobramento dos sinais de carbono e calcular as constantes de acoplamento (J) destes sinais. Por exemplo, os valores observados para H_3C -17 ($J = 17,2$ Hz) e para o carbono metínico C-8 ($J = 17,3$ Hz), indicam que estes carbonos derivam de uma mesma unidade de acetato, indicando a presença de um derivado do cryptoporiopsinol como intermediário na biossíntese do composto **33**.

O isolamento dos compostos **31** e **32** reforçam a presença do cryptoporiopsinol como intermediário na biossíntese do composto **33**. As etapas de clivagem oxidativa e perda de carbono da dehidroisocumarina levam a um estereoisômero *E* do cryptoporiopsinol via um intermediário benzênico totalmente substituído. A contração do anel benzênico ocorre por meio de um rearranjo de Favorskii, um rearranjo de α -halocetonas cíclicas (cloro, bromo ou iodo) na presença de bases ou de ácidos de Lewis.⁵¹

Figura 41 - Biossíntese de cryptosporiopsinol.

Fonte: Adaptação de Ferreira (2016) a partir de HOLKER e YOUNG, 1975, p.525.

Como proposto inicialmente, a formação do roussoellatídeo (**33**) deve envolver uma reação de cicloadição do tipo Diels-Alder intermolecular entre um derivado do cryptoporiopsinol e uma cadeia policetídica também proveniente da rota do acetato. Nesta cadeia policetídica, esperava-se que H_3C -15 fosse oriunda de uma unidade C-2 de acetato conectada a uma unidade C-1 de acetato em C-14. No entanto, estes carbonos não

No estudo de biossíntese realizado com a brevetoxina B (**34**) utilizando-se acetato e metionina marcados isotopicamente com ^{13}C , os autores observaram que a cadeia policetídica não era formada por sucessivas adições de unidades de acetato intactas. Assim foi proposto que a cadeia sofria incorporação de precursores como o succinato e α -cetoglutarato durante o processo de formação da cadeia. Esse trabalho foi utilizado como modelo para o estudo de biossíntese de outros policetídeos provenientes de dinoflagelados²². No entanto, com o estudo de biossíntese do ácido ocadáico (**35**), isolado do dinoflagelado *Prorocentrum lima*, os resultados obtidos foram similares aos da brevetoxina B (**34**) para a incorporação de acetato. Uma avaliação quantitativa desses experimentos mostrou que o enriquecimento de $[1-^{13}\text{C}]$ -acetato e $[1,2-^{13}\text{C}]$ -acetato na molécula ocorreu de forma semelhante. Assim os autores propuseram que unidades intactas de acetato eram incorporadas, porém perdas de grupos carboxila da cadeia por meio de rearranjos de Favorskii catalisados pelas enzimas P450 ou flavina mono-oxigenase.^{51,52}

Nas moléculas isoladas de dinoflagelados, a perda de carbonos por rearranjo de Favorskii são comuns, ocorrendo a deleção de vários carbonos em uma mesma molécula. A brevetoxina B (**34**), por exemplo, sofre a perda de 11 unidades de carbonos no rearranjo de Favorskii, o que é menos comum em fungos e bactérias.²²

Figura 43 – Estruturas da brevetoxina B (**34**), ácido ocadáico (**35**) e ambruticina (**36**).

A análise do gene cluster da mixobactéria *Sorangium cellulosum* para a molécula de ambruticina (**36**) não permitiu identificar o sítio catalítico no qual ocorre o

rearranjo. Contudo, o gene *ambI* mono-oxigenase flavina foi proposto como responsável pela descarboxilação na etapa que envolve o rearranjo de Favorskii⁷⁸. No trabalho realizado com a enterocina (**8**) os autores identificaram que os processos oxidativos, bem como o rearranjo de Favorskii, envolvidos na biossíntese desse composto são catalisados pela flavoenzima mono-oxigenase *EncM*.^{22,77}

As flavoproteínas identificadas nesses experimentos pertencem à classe das halogenases, enzimas que catalisam as reações de halogenação utilizando O₂ ativado por meio da formação de hidroperóxido ligado a flavina. Essas enzimas catalisam reações que se assemelham bastante com às haloperoxidasas eletrofílicas.²⁸

Por fim, a figura 44 mostra a reação de cicloadição de Diels-Alder intermolecular entre os dois intermediários policetílicos da biossíntese do roussoellatideo (**33**). Reações de cicloadição de Diels-Alder intramoleculares são bastantes comuns na formação de produtos naturais. Entretanto, poucos relatos são observados na literatura para ciclizações de Diels-Alder intermoleculares.⁵⁵

Figura 44 – Ciclização do tipo Diels-Alder intermolecular formando o roussoellatideo (**33**).

Hano e colaboradores, propuseram que as cumarinas diméricas kuwanona J (**34**) e chalcomoracina (**35**) isoladas de *Morus alba* são monômeros que se unem por cicloadição de Diels-Alder intermolecular.⁵⁶

Figura 45 – Estruturas das cumarinas diméricas kuwanona J (**34**) e chalcomoracina (**35**).

A primeira enzima Diels-Alderase cristalizada foi a do ácido macrofômico (**36**) isolado de *Macrophoma commelinae*.⁵⁸ Contudo, outra rota foi sugerida, envolvendo uma sequência de Michael-aldol, que por meio de cálculos computacionais provou ser menos energética.⁵⁸ Desta forma, estudos a nível molecular devem ser desenvolvidos com o objetivo de se obter maiores informações sobre as reações de Diels-Alder intermoleculares.

Figura 46 – Biossíntese do ácido macrofômico (**36**).⁵⁸

Fonte: BROCKSOM, T.L. *et al.*, p.2213, 2010.

A elucidação da rota de biossíntese do roussoellatídeo (**33**) ilustra que os processos bioquímicos de formação de metabólitos secundários são extremamente diversificados, e podem levar à descoberta de enzimas com funcionalidades muito particulares.

Estudo com as enzimas envolvidas na biossíntese da PKS do roussoellatídeo **(33)** a nível molecular se torna relevante, uma vez que o maquinário enzimático envolvido nas reações de Diels-Alder é ainda pouco conhecido na literatura. Possivelmente rearranjo de Favorskii é mediado por alguma enzima do tipo halogenase ainda não estudado.

4.8 Estruturas das substâncias isoladas de *A. moriforme* MA9

4.9 Identificação estrutural do composto 36

O composto **36** foi identificado na subfração HM11-13A1 (3,0 mg), e identificado por meio da análise dos dados de CLAE-UV-EM e HREIMS, e espectros de RMN 1D e 2D, em comparação com os dados da literatura.⁵⁹

A análise por HREIMS (**Figura 107**) indicou a presença de um íon molecular protonado $[M+H]^+$ em m/z 257,1295, correspondente à fórmula molecular $C_{15}H_{17}N_2O_2$,

com índice de deficiência de hidrogênios (IDH) igual a nove. O espectro de RMN ^{13}C apresentou 15 sinais de carbonos correspondentes a 2 carbonos carbonílicos, 2 carbonos quaternários, 1 carbono metílico, 3 carbonos metilênicos e 7 carbonos metínicos (**Tabela 11**).

De acordo com os espectros de RMN ^1H e gHMQC (**Figura 104**), os sinais correspondentes a 5 hidrogênios entre δ_{H} 7,37 – 7,43, indicam a presença de um anel aromático monosubstituído. Além desses, os sinais presentes nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C para a metila (δ_{H} 2,88, δ_{C} 35,4) e o carbono metilênico em δ_{H} 3,65/ δ_{C} 46,7 sugeriram que esses estivessem ligados a átomos de nitrogênio.

As correlações observadas no espectro gCOSY (**Figura 103**) entre os hidrogênios H-3, H-4, H-5 e H-6 permitiu conectar os quatro carbonos (δ_{C} 46,7, 23,9, 29,3, 60,4) no anel pirrolidínico de uma dicetopiperazina. O acoplamento entre o H-11 (δ_{H} 7,12) e os carbonos C-1, C-2' e C-6' no espectro gHMBC permitiu que o carbono C-11 fosse ligado aos carbonos C-9 e C-1', interligando assim o anel aromático ao núcleo da dicetopiperazina (**Figura 105**). O experimento de NOESY foi obtido para determinar a orientação espacial do anel benzênico ligado ao C-11, sendo observado ausência de NOE quando irradiada a metila em δ_{H} 2,88 (C-10), indicando que a metila esta espacialmente distante dos demais hidrogênios na molécula, assumindo assim que a ligação dupla possui a configuração (*E*) como apresentada na Figura 47.

Figura 47 – Correlações de COSY e HMBC observados para o composto **36** e derivado de dicipiperazina diidroxilada.

Os dados de RMN quando comparados com os da literatura sugerem tratar-se de um derivado de dicetopiperazina. A busca por esse composto no banco de dados do *dictionary of natural products* (DNP), retornou apenas um resultado para o esqueleto de dicetopiperazina dihidroxilado nas posições C-5 e C-6 (**Figura 47**).⁵⁹ Sendo este então o primeiro relato do isolamento da (*E*)-3-benzilideno-hexahidro-2-metilpirrolo[1,2-*a*]-pirazina-1,4-diona (**36**), uma dicetopiperazina inédita na literatura.

As dicetopiperazinas representam uma grande classe de metabolitos secundários amplamente produzidos por bactérias, fungos, invertebrados marinhos e organismos superiores⁸⁵. A biossíntese desses compostos consiste na condensação de dois aminoácidos, sendo os mais comuns: triptofano, prolina, histidina e fenilalanina.⁶⁰⁻⁶²

Muitos destes aminoácidos encontram-se *N*-metilados, como observado no estudo realizado com o fungo endofítico *Alternaria alternata*, onde os autores isolaram os compostos alternarizina A (37) e B (38), duas dicetopiperazinas com resíduos de fenilalanina *N*-metilada⁶¹.

As dicetopiperazinas (39) e (40) com o resíduo de aminoácido de leucina metilado foram isoladas da bactéria *Streptomyces* sp. SCSIO 04496⁶², e no trabalho desenvolvido por Sun e colaboradores foram isolados da bactéria *Nocardiopsis* sp. 6 dicetopiperazinas das quais 4 possuem resíduos de aminoácidos *N*-metilados, como a nocazina G (41) e o composto XR330 (42)⁶⁰.

Figura 48 – Dicetopiperazinas *N*-metiladas.

Tabela 11 - Dados de RMN ^1H (600 MHz) e ^{13}C (150 MHz) do composto **36**. Deslocamentos químicos em δ (ppm) obtidos em $\text{MeOH-}d_4$

HM11-13A1 (36)					3-benzilideno-8,8a-diidroxi-2- metil- hexahidro-pirrolol[1,2-a] pirazina-1,4-diona	
gHSQC				gHMBC		
C	δ_{C}	Multip	δ_{H} (J em Hz)		δ_{C}	δ_{H} (J em Hz)
1	170,3	C	-	-	168,7	-
2	-	-	-	-	-	-
3	135,2	CH_2	-	C-4, C-5	134,3	-
4	163,4	CH_2	-	C-6, C-7	164,7	-
5	-	CH_2	-	C-4, C-3	-	-
6	46,7	CH	3,65 (m)	C-5, C-7	41,7	3,69 (ddd, 11,5; 10; 2,5) 3,42 (ddd, 17; 9,5; 2,5)
7	23,9	C	2,01 - 2,16 (m)	-	28,8	2,25 (m) 2,02 (m)
8	29,3	-	2,18 (m) 2,41 (m)	-	73,8	4,50 (dd, 10,5; 7,5)
8a	60,4	C	4,44 (dd, $J = 7,0$ e $9,6$)	-	85,3	-
9	35,4	CH_3	2,88 (s)	C-7, C-9	35,0	2,84 (s)
10	122,5	CH	7,12 (s)	C-1, C-2', C-6'	122,6	7,09 (s)
1'	135,1	C	-	-	135,1	-
2'/6'	130,9	CH	7,37 – 7,43 (m)	C-4'	130,7	7,38 (m)
3'/5'	130,1	CH	7,37 – 7,43 (m)	-	129,7	7,41 (m)
4'	129,9	CH	7,37 – 7,43 (m)	-	129,9	7,35 (m)

Figura 49 - Espectro de RMN ^1H do composto **36** (600 MHz, $\text{MeOH-}d_4$).

Figura 50 - Espectro de RMN ^{13}C do composto **36** (150 MHz, $\text{MeOH-}d_4$).

4.10 Identificação estrutural dos compostos 43 e 44

Os compostos **43** e **44** foram identificados nas amostras HM11-13B (0,6 mg) e HM11-13C (3,0 mg), respectivamente. Esses compostos foram obtidos por isolamento bioguiado, utilizando-se a atividade de inibição do proteassomo 20S. Após separação e purificação, os compostos foram identificados por CLAE-UV, HREIMS e RMN 1D e 2D, por comparação com dados relatados por Kohno *et al.* (2000).

Todas as frações obtidas do fracionamento do extrato metanólico da linhagem MA9 (item 3.12.1), foram analisadas no bioensaio de inibição do proteassomo 20S (**Figura 51 - A**). As quatro últimas frações MA9-64 a MA9-01 conseguiram reduzir em 50% a atividade enzimática do proteassomo (todas as frações foram testadas na concentração de 200 μ M).

Na curva de concentração dose-resposta (**Figura 51 - B**) obtida para as frações mais ativas, pode-se observar que as frações MA9-37 e MA9-11 concentraram a maior parte do composto bioativo. Após análise por CLAE-UV observou-se que os perfis das mesmas eram semelhantes. Estas frações foram então reunidas e codificadas como HM11. Prosseguiu-se o fracionamento biomonitorado.

Figura 51 – Bioensaio de inibição do proteassomo 20S (**A**) e curva concentração-resposta (**B**).

O fracionamento da MA9-HM11 levou ao isolamento das subfrações HM11-13A (3,0 mg), HM11-13B (0,6 mg) e HM11-13C (3,0 mg) (**Figura 16**). Apenas aquelas com massa acima de 1,0 mg foram avaliadas no bioensaio de inibição do proteassomo. A figura 50 apresenta o resultado para a curva de concentração-resposta das amostras HM11-13A e HM11-13C. Apenas a fração HM11-13C apresentou inibição da atividade do proteassoma em baixas concentrações, conseguindo reduzir em 50% a atividade do proteassoma na concentração de 3 nM.

Figura 52 – Curva de concentração-resposta no ensaio de inibição do proteassoma para as amostras HM11-13A e HM11-13C e cristalografia de raio-X da amostra bioativa HM11-13C no sítio catalítico da enzima.

A amostra bioativa foi co-cristalizada no sítio catalítico da enzima e analisada por cristalografia de raio-X (**Figura 52**). O mapa da densidade eletrônica para a amostra indicou uma interação não covalente entre o composto e o resíduo catalítico (Thr1) da enzima (no sítio denominada “non-primed”). Contudo, Groll e colaboradores (2001) haviam reportado anteriormente que apenas uma molécula havia apresentado esse tipo de interação. Conhecida como TMC-95A (**43**), o composto é um potente inibidor reversível do proteassomo humano 20S. Os espectros de HREIMS e RMN ^1H e ^{13}C , bem como os espectros 2D da amostra HM11-13C foram analisados.

A análise por HREIMS dos compostos **43** e **44** (**Figura 108 e 105**), indicou um íon molecular protonado $[\text{M}+\text{H}]^+$ em m/z 679,2698, correspondente à fórmula molecular $\text{C}_{33}\text{H}_{38}\text{N}_6\text{O}_{10}$. A busca no DNP utilizando a massa exata dos compostos retornou 4 resultados, correspondentes ao composto TMC-95A e seus diastereoisômeros TMC-95B/C/D.

A análise dos espectros de RMN ^1H dos compostos **43** e **44** indicou tratar-se de moléculas isoméricas, uma vez que apresentaram sinais nos espectros de RMN ^1H semelhantes (**Tabela 12** e **13**). A análise dos espectros de RMN ^{13}C (**Figuras 56 e 57**) e HSQC (Anexo pag. 157) permitiu inferir que os 33 sinais de carbonos correspondem a 3 carbonos metílicos, 3 carbonos metilênicos, 13 carbonos metínicos, 7 carbonos quaternários e 7 carbonos carbonílicos.

A análise conjunta dos espectros de gCOSY e gHMBC (Anexo pag. 106 e 108) permitiu construir as subestruturas que permitiram a determinação estrutural dos compostos **43** e **44**. Na primeira subestrutura (**Figura 53**) observa-se a presença do anel aromático correspondente ao aminoácido tirosina *meta*-substituído, com correlações no espectro de gCOSY entre os hidrogênios H-18 e H-17 em δ_{H} 6,78 e 6,69, respectivamente. Observa-se também acoplamentos à longa distância no espectro gHMBC entre os hidrogênios H-14 (δ_{H} 4,66) e C-13 (δ_{C} 170,4), H-15 (δ_{H} 2,93 e 3,05) e C-16 (δ_{C} 125,2) e C-17 (δ_{C} 130,2), H-24 (δ_{H} 7,16) e C-15 (δ_{C} 36,9), H-17 (δ_{H} 6,69) e H-18 (δ_{H} 6,77) com o carbono C-19 (δ_{C} 153,4).

No espectro de gCOSY foi possível observar correlações ^1H - ^1H entre os hidrogênios que correspondem à 3-metil-2-oxopentanona. O espectro de gHMBC apresentou acoplamento entre os hidrogênios H-37 (δ_{H} 1,33 e 1,63) e H-39 (δ_{H} 1,06) com o carbono C-35 (δ_{C} 201,5), bem como, a correlação entre o hidrogênio da amida em δ_{H} 7,23 (NH-33) com os carbonos C-34 (δ_{C} 159,2) e C-13 (δ_{C} 170,4), de acordo com a subestrutura I (**Figura 53**).

Figura 53 – Subestrutura I do composto HM11-13BC1 (linhas sombreadas indicam correlações ^1H - ^1H observadas no espectro COSY; e flechas indicam correlações à longa distância ^1H - ^{13}C observadas no espectro HMBC).

Os espectros de gCOSY e gHMBC permitiram identificar a subestrutura II, como outro sistema bicíclico ligado a uma cadeia lateral alílica, conforme observado na figura 52. Os acoplamentos à longa distância observados no espectro HMBC entre H-2

(δ_H 7,23) e C-21 (δ_C 140,2), H-3 (δ_H 6,96) e C-5 (δ_C 129,4), bem como entre o hidrogênio da amida em δ_H 8,10 (NH-22) e os carbonos C-21 (δ_C 140,2), C-5 (δ_C 129,4) e C-6 (δ_C 77,8), confirmaram a presença do sistema do tipo 3-hidroxi-2-indolinona.

No espectro de gCOSY foram observadas correlações que permitiram construir os fragmentos na cadeia lateral da subestrutura II. Os fragmentos correspondem à estrutura do 2-amino-etanol e à cadeia de propenilamina (**Figura 54**). As correlações observadas no HMBC entre H-7 (δ_H 4,16) com os carbonos C-6 (δ_C 77,8) e C-5 (δ_C 129,4), bem como as correlações H-8 (δ_H 3,90) e NH-26 (δ_H 9,01) com C-25 (δ_C 167,5), permitiram confirmar a estrutura da cadeia lateral.

Figura 54 – Subestrutura II do composto **44** (linhas sombreadas indicam correlações 1H - 1H observadas no espectro COSY; e flechas indicam correlações à longa distância 1H - ^{13}C observadas no espectro HMBC).

A subestrutura III, foi identificada como uma unidade de asparagina, podendo ser observadas correlações no espectro gCOSY entre os hidrogênios H-30 (δ_H 2,37 e 2,43), H-11 (δ_H 4,61) e NH-12 (δ_H 9,03), e os acoplamentos a longa distância observados no gHMBC entre NH₂-32 (δ_H 7,32 e 6,95) com C-30 (δ_C 36,9) e o H-11 (δ_H 4,61) com C-10 (δ_C 170,6) que corroboram com a subestrutura III.

Figura 55 – Subestrutura III do composto **44** (linhas sombreadas indicam correlações 1H - 1H observadas no espectro COSY; e flechas indicam correlações à longa distância 1H - ^{13}C observadas no espectro HMBC).

As posições das subestruturas I e II podem ser conectadas por meio dos acoplamentos $^3J_{CH}$ observados no HMBC entre o H-2 com C-20 e H-24 com C-1. Além desses, o acoplamento entre os hidrogênios H-11 e NH-12 e o carbono C-13, e entre o H-8 e C-10 e NH-9 com C-10, permitiu que a subestrutura III fosse conectada às subestruturas I e II, respectivamente (**Figura 56**).

Figura 56 – Composto **44** (flechas indicam correlações à longa distância 1H - ^{13}C observadas no espectro HMBC, indicando as conectividades entre as subestruturas I, II e III).

Os dados apresentados nas tabelas 12 e 13, correspondem aos valores obtidos na análise por RMN 1H (**Figura 58 e 53**) das amostras HM11-13B (**43**) e HM11-13C (**44**). Comparação com os dados da literatura⁶³ permitiram confirmar que se tratar dos compostos TMC-95B e TMC-95A, respectivamente.

A abordagem inesperada utilizada neste trabalho encontra-se na detecção direta do produto natural bioativo (TMC-95A; **44**) no extrato bruto por meio da co-cristalização do extrato fúngico com o alvo biológico (proteassomo). Geralmente é necessário se isolar e identificar a estrutura do composto para depois se realizar a co-cristalografia. A utilização dessa metodologia diminuiu etapas para obtenção do composto bioativo, o que torna a técnica interessante em termos químicos e farmacológicos, uma vez que leva os pesquisadores a priorizarem extratos ativos e principalmente sítios e modo de ligação à enzima do proteassomo.

Os inibidores do proteassomo incluem moléculas que podem se dividir em diferentes classes, sendo elas: peptídeos (aldeídicos, vinilsulfonas, epoxicetonas, dentre outras), sirbactinas, beta-lactonas, flavonóides, triterpenóides, derivados do TMC-95, pseudo-peptídeos e compostos organo-metálicos⁶⁵. Estes compostos se diferenciam, além da sua estrutura, na forma de interação, atuando diretamente no sítio catalítico por

competitividade ou alostericamente, e podem ainda realizar ligações de tipo reversível ou irreversível.⁶⁵⁻⁶⁷

Existem diversos inibidores do proteassomo reportados na literatura. Contudo, apenas 3 são fármacos em uso clínico^{66,68}. O primeiro a ser aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*) como inibidor do proteassoma em tratamentos hematológicos foi o bortezomib (**45**; BTZ). Porém o desenvolvimento de resistência durante o tratamento, a toxicidade e o baixo potencial contra tumores sólidos estimularam a busca por outras alternativas de tratamentos e o desenvolvimento de inibidores de segunda e terceira geração⁷¹. Nesse sentido, os micro-organismos (procariotas, leveduras e fungos filamentosos) passaram a ser considerados como importantes fontes de novos inibidores de proteases com características únicas e, portanto, oferecem grande potencial para aplicações futuras.⁶⁷⁻⁷⁰

Outros compostos além do TMC-95A e seus diastereoisômeros também foram isolados de fungos. No estudo realizado com *Aspergillus japonicus*, o composto E64 (**46**) foi obtido como um potente inibidor de cisteína-protease, ligando-se de forma irreversível (covalentemente) ao sítio catalítico do proteassomo^{73,74}. O composto fellutamida B (**47**) isolado de *Penicillium fellutanum*, um peptídeo aldeídico, foi obtido inicialmente como um potente indutor do fator de crescimento neural (NGF). Contudo, mais tarde foi obtido por co-cristalização com o proteassomo 20S e mostrou-se como um potente inibidor da enzima protease⁷⁵. No trabalho realizado por Singh e colaboradores com a linhagem fúngica *Nodulisporium hinnuleum*, foi isolado o composto hinnuliquinona (**48**) com uma potente atividade de inibição da protease HIV-1.⁷⁶

Figura 57 – Inibidores do proteassomo isolados de fungos.

Todos esses compostos aqui apresentados possuem em comum cadeias substituídas por grupos polares (hidroxilas, aminas e amidas), merecendo assim destacar as técnicas utilizadas no isolamento para esses tipos de compostos. Por exemplo, compostos polares estão normalmente presentes em extratos alcóolicos e seu isolamento é melhor realizado utilizando HPLC com coluna de fase-reversa.⁷⁷

Considerando-se o perfil de isolamento para o fungo *Annulohypoxylon moriforme* MA9, a ordem de eluição obtida na cromatografia em fase reversa (C18) segue o esperado: os compostos **43** e **44** encontram-se na fração de média polaridade (fração HM11, obtida com H₂O/MeOH – 1:1; item 3.12). Estruturalmente diferentes dos demais compostos presentes no extrato, os compostos **43** e **44** apresentam em suas estruturas resíduos de aminoácidos substituídos por grupos hidroxilas garantindo-lhes uma maior natureza hidrofílica.

Na etapa subsequente, a fração HM11 foi fracionada utilizando-se Sephadex LH-20, um gel de natureza tanto hidrofílica quanto lipofílica, comumente utilizado em separações de produtos naturais de média polaridade por ser um gel de filtração, que atua com um mecanismo de adsorção. Além disso, o gel de Sephadex LH-20 também pode garantir a separação de compostos por partição e por diferença de peso molecular.^{77,78}

Comparando-se estruturalmente os compostos isolados do fungo *Annulohypoxylon moriforme* MA9, os compostos **43** e **44** são moléculas relativamente maiores que as demais, o que lhes garantiu um menor tempo de retenção na coluna. A escolha adequada das técnicas de fracionamento juntamente com os experimentos bioguiados diminuíram substancialmente o tempo de análise e obtenção dos resultados, bem como garantiram a reprodutibilidade dos experimentos do bioensaio de inibição do proteassomo.

Tabela 12 - Dados de RMN ^1H (600 MHz) da amostra HM11-13B (**43**) e TMC-95B⁶³.

n	HM11-13B (43)	TMC-95B
2	7,23 (1H, dd, 1,1 e 7,8)	7,24 (1H, dd, 0,9 e 7,5)
3	6,96 (1H, t, 7,5)	6,97 (1H, t, 7,5)
4	7,33 (1H, dd, 0,8 e 7,5)	7,35 (1H, dd, 0,9 e 7,5)
7	4,16 (1H, dd, 3,8 e 10,7)	4,17 (1H, dd, 4,4 e 10,7)
8	3,90 (1H, t, 10,1)	3,92 (1H, t, 10)
11	4,61 (1H, m)	4,64 (1H, m)
14	4,66 (1H, m)	4,66 (1H, m)
15a	2,93 (1H, dd, 4,8 e 13,7)	2,93 (1H, dd, 4,8 e 13,7)
15b	3,05 (1H, dd)	3,05 (1H, dd, ~2 e 13,7)
17	6,69 (1H, dd, 2,2 e 8,2)	6,70 (1H, dd, 2,2 e 8,1)
18	6,77 (1H, d, 8,1)	6,79 (1H, d, 8,1)
24	7,16 (1H, d, 2,2)	7,17 (1H, d, 2,2)
27	6,45 (1H, qt, 1,8 e 8,8)	6,46 (1H, qt, 1,7 e 10)
28	4,66 (1H, m)	4,66 (1H, m)
29	1,59 (3H, dd, 1,7 e 7,1)	1,60 (3H, dd, 1,7 e 7,0)
30a	2,37 (1H, dd, 11,2 e 15,7)	2,38 (1H, dd, 10,8 e 15,7)
30b	2,43 (1H, dd, 3,4 e 15,8)	2,45 (1H, dd, 3,6 e 15,7)
36	-	3,34 (1H, m)
37a	1,33 (1H, m)	1,35 (1H, m)
37b	1,63 (1H, m)	1,65 (1H, m)
38	0,81 (3H, t, 7,4)	0,82 (3H, t, 7,4)
39	1,06 (3H, d, 7,0)	1,07 (3H, d, 7,0)
9-NH	8,20 (1H, d, 9,9)	8,20 (1H, d, 9,8)
12-HN	9,03 (1H, d, 7,6)	9,01 (1H, d, 7,3)
22-NH	8,10 (1H, s)	8,10 (1H, s)
26-NH	9,01 (1H, d, 10,4)	9,01 (1H, d, 10,8)
32-NH	7,32, 6,95 (2H, brs)	7,29, 6,95 (2H, brs)
33-NH	-	7,23 (1H, d, 8,1)
6-OH	6,25 (1H, s)	6,18 (1H, s)
7-OH	5,85 (1H, s)	5,77 (1H, s)
19-OH	9,43 (1H, s)	9,35 (1H, s)

Deslocamentos químicos em δ (ppm) obtidos em DMSO- d_6

Tabela 13 - Dados de RMN ^1H (600 MHz) da amostra HM11-13C (**44**) e TMC-95A⁶³.

n	HM11-13C (44)	TMC-95A
2	7,23 (1H, dd, 1,0 e 7,7)	7,24 (1H, dd, 1,0 e 7,5)
3	6,97 (1H, t, 7,7)	6,97 (1H, t, 7,5)
4	7,34 (1H, d, 7,4)	7,35 (1H, dd, 0,9 e 7,5)
7	4,16 (1H, dd, 3,9 e 10,7)	4,17 (1H, dd, 4,4 e 10,7)
8	3,92 (1H, t, 10,3)	3,92 (1H, t, 10)
11	4,62 (1H, m)	4,64 (1H, m)
14	4,66 (1H, m)	4,66 (1H, m)
15a	2,94 (1H, dd, 4,8 e 13,8)	2,95 (1H, dd, 4,8 e 13,6)
15b	3,06 (1H, dd, 1,5 e 13,7)	3,07 (1H, dd, ~2 e 13,6)
17	6,65 (1H, dd, 2,0 e 8,1)	6,66 (1H, dd, 2,2 e 8,1)
18	6,77 (1H, d, 8,1)	6,77 (1H, d, 8,1)
24	7,17 (1H, d, 2,0)	7,17 (1H, d, 2,2)
27	6,46 (1H, qt, 1,6 e 10,4)	6,46 (1H, qt, 1,7 e 10)
28	4,66 (1H, m)	4,66 (1H, m)
29	1,60 (3H, dd, 1,5 e 7,1)	1,60 (3H, dd, 1,7 e 7,0)
30a	2,37 (1H, dd, 11,2 e 15,7)	2,38 (1H, dd, 11,0 e 15,9)
30b	2,44 (1H, dd, 3,1 e 15,8)	2,45 (1H, dd, 3,6 e 15,9)
36	3,36 (1H, m)	3,38 (1H, m)
37a	1,43 (1H, m)	1,44 (1H, m)
37b	1,69 (1H, m)	1,69 (1H, m)
38	0,87 (3H, t, 7,4)	0,87 (3H, t, 7,4)
39	1,01 (3H, d, 6,9)	1,01 (3H, d, 6,8)
9-NH	8,22 (1H, d, 9,8)	8,20 (1H, d, 9,8)
12-HN	9,05 (1H, d, 7,7)	9,01 (1H, d, 7,5)
22-NH	8,10 (1H, s)	8,10 (1H, s)
26-NH	9,02 (1H, d, 10,4)	9,01 (1H, d, 10,8)
32-NH	7,32, 6,97 (2H, brs)	7,28, 6,95 (2H, brs)
33-NH	-	7,23 (1H, d, 7,8)
6-OH	6,24 (1H, s)	6,18 (1H, s)
7-OH	5,84 (1H, d, 3,7)	5,77 (1H, d, 4,6)
19-OH	9,42 (1H, s)	9,35 (1H, s)

Deslocamentos químicos em δ (ppm) obtidos em DMSO- d_6

Tabela 14 - Dados de RMN ^{13}C (150 MHz) dos compostos **43** e **44** e TMC-95B e TMC-95A⁶³.

C	HM11-13B (43)	TMC-95B ⁵⁶	HM11-13C (44)	TMC-95A ⁵⁶
1	120,7	120,4	120,7	120,4
2	130,9	130,7	130,9	130,7
3	120,7	120,4	120,7	120,4
4	125,2	124,9	125,2	124,9
5	129,4	129,1	129,4	129,1
6	77,8	77,5	77,8	77,5
7	75,4	75,2	75,4	75,2
8	54,7	54,5	54,7	54,5
10	170,6	170,3	170,6	170,3
11	49,8	49,5	49,8	49,5
13	170,4	170,1	170,4	170,1
14	51,8	51,5	51,8	51,6
15	36,9	36,6	36,9	36,5
16	125,2	125,0	125,3	125,0
17	130,1	129,9	130,1	129,8
18	115,3	115,1	115,3	115,0
19	153,4	153,1	153,4	153,1
20	123,1	122,9	123,2	122,9
21	140,2	139,9	140,2	139,9
23	178,3	177,9	178,3	177,9
24	133,2	133,0	133,2	132,9
25	167,5	167,2	167,5	167,2
27	122,6	122,3	122,6	122,3
28	105,3	105,0	105,3	105,0
29	11,5	11,2	11,5	11,2
30	36,9	36,6	36,8	36,6
31	170,4	170,1	170,4	170,1
34	159,1	158,9	159,1	158,8
35	201,6	201,3	201,6	201,3
36	40,3	40,0	40,6	39,5
37	24,8	24,5	25,1	24,8
38	11,4	11,1	11,3	11,0
39	15,0	14,7	14,7	14,5

Deslocamentos químicos em δ (ppm) obtidos em DMSO- d_6

Figura 58 - Espectro de RMN ^1H do composto **44** (600 MHz, DMSO- d_6).

Figura 59 - Espectro de RMN ^{13}C do composto **44** (150 MHz, DMSO- d_6).

Figura 60 - Espectro de RMN ^1H do composto **43** (600 MHz, DMSO- d_6).

Figura 61 - Espectro de RMN ^{13}C do composto **43** (150 MHz, DMSO- d_6).

4.11 Identificação estrutural do composto 49

O composto **49** foi identificado na amostra HM11-32A (0,5 mg), por meio da análise de CLAE-UV-EM e HREIMS, e dos seus espectros de RMN ^1H e ^{13}C em comparação com dados relatados por Venkateswarlu *et al.* (2005).

O espectro no UV (**Figura 62**), apresentou absorção em 248 e 300 nm característico de flavonoides. A análise por HREIMS (Anexo pag. 162) indicou um íon molecular $[\text{M}+\text{H}]^+$ em 255,065, correspondente à fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_4$. A busca no DNP utilizando esses dados retornou 12 resultados, dos quais apenas 4 correspondiam a compostos da classe dos flavonoides. Para confirmar o resultado foram obtidos os espectros de RMN ^1H e ^{13}C da amostra HM11-32A e comparados com os da literatura.⁷⁷

Figura 62 – Espectros UV e ESI⁺ da fração HM11-32A (**49**).

O espectro de RMN ^1H de **49** (**Figura 64**) apresentou sinais na região de aromáticos, com dois dupletos em δ_{H} 7,91 e 6,90 correspondentes a dois hidrogênios com acoplamento *orto* ($J = 8,7$ Hz), atribuídos a H-5 e H-6 respectivamente, e o duplete em δ_{H} 6,82 com acoplamento *meta* ($J = 2,1$ Hz) atribuído ao H-8, no anel A.

Os dupletos em δ_{H} 7,36 e 7,65 correspondentes a dois hidrogênios com acoplamento *orto* ($J = 8,7$ Hz), atribuídos aos hidrogênios 2'/6' e 3'/5' caracterizam o padrão 1,4-dissubstituído para o anel B. Além desses, o espectro apresentou sinal em δ_{H}

8,25 (s) correspondente ao H-2, que foi atribuído a estrutura de uma isoflavona, uma vez que o carbono se encontra bastante desblindado em δ_C 152,9 (C-2).

O espectro de RMN ^{13}C (**Figura 65**) apresentou sinal em δ_C 174,9 (C-4) atribuído a carbonila de cetona α,β -insaturada, e sinais acima de δ 100 correspondentes aos carbonos sp^2 , além da ausência de sinais do tipo CH_2 e CH_3 . A análise desses dados em comparação com os da literatura permitiu identificar o composto como sendo o 4',7-dihidroxi-isoflavona (daidzeína).⁷⁹

A ocorrência da daidzeína é comumente observada em plantas, principalmente em espécies da família Fabaceae, como a soja (*Glycine max*)⁸⁰. No entanto, alguns estudos têm demonstrado a produção de isoflavonas por bactérias do gênero *Streptomyces*, a partir da biotransformação de componentes do meio de cultivo provenientes da soja^{81,82} e que fungos são capazes de produzir e metabolizar a daidzeína em 8-hidroxi-daidzeína.^{83,84}

Tabela 15 - Dados de RMN 1H (600 MHz) e ^{13}C (150 MHz) do composto **49**.

49			Daidzeína	
C	δ_C	δ_H (J em Hz)	δ_C	δ_H (J em Hz)
2	152,9	8,25 (s)	152,9	8,25 (s)
3	123,6	-	123,6	-
4	174,9	-	174,8	-
5	127,3	7,91 (d, 8,7)	127,3	7,94 (d, 8,5)
6	115,7	6,90 (dd, 2,1 e 8,7)	115,3	6,91 (d, 2,4 e 8,5)
7	163,6	-	162,8	-
8	102,3	6,82 (d, 2,1)	102,2	6,83 (d, 2,4)
9	157,7	-	157,6	-
10	116,4	-	116,6	-
1'	122,8	-	122,5	-
2'/6'	130,3	7,36 (d, 8,7)	130,1	7,36 (d, 8,5)
3'/5'	115,1	6,79 (d, 8,7)	115,0	6,79 (d, 8,5)
4'	157,4	-	157,2	-

Deslocamentos químicos em δ (ppm) obtidos em DMSO- d_6

Figura 63 - Espectro de RMN ^1H do composto **49** (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

Figura 64 – Expansão do espectro de RMN ^1H do composto **49** (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$).

Figura 65 – Espectro de RMN ^{13}C do composto **49** (150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$).

4.12 Identificação estrutural dos compostos **50**, **51** e **52**

Os compostos **50**, **51** e **52** foram identificados nas amostras HM64-B5 (9,3 mg), HM64-B4E (4,0 mg) e HM01-21B (15 mg), respectivamente. Após a separação, os compostos foram identificados por meio da análise dos dados de CLAE-UV-EM e espectros de RMN ^1H e ^{13}C , em comparação com os dados da literatura.⁶¹⁻⁶³

Os espectros no UV dos compostos **50** e **51**, indicaram tratar-se de compostos da mesma classe, uma vez que apresentaram bandas de absorção com λ_{max} em torno de 220, 250 e 310 nm, característicos de sistemas aromáticos conjugados à carbonilas de cetona (**Figura 66**).

Figura 66 – Espectros de UV das amostras HM64-B5 (**50**) e HM64-B4E (**51**).

A análise por HREIMS dos compostos **50**, **51** e **52** apresentou íons moleculares protonados $[\text{M}+\text{H}]^+$ em m/z 177,0795/ 179,0612/ 175,0747 correspondentes as fórmulas moleculares $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_2$, $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_3$ e $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{O}_2$, respectivamente. As fórmulas moleculares foram confirmadas com as análises de RMN ^1H e ^{13}C (**Figuras 64-72**).

Analisando-se os espectros de RMN ^{13}C dos compostos **50**, **51** e **52**, foi possível observar a presença de um sinal atribuído à carbonila de cetona α,β -insaturada em δ_c 197,7 e 205,3, para os compostos **50** e **51**, respectivamente, bem como a ausência de carbonos carbonílicos para o composto **52**.

Os espectros de RMN ^1H dos compostos **50** e **51** apresentaram sinais na região de δ_{H} 7,0 – 7,6, atribuídos aos hidrogênios aromáticos. A integração desses sinais e as multiplicidades observadas, correspondem à anéis aromáticos trissubstituídos. O sinal de hidrogênio em δ_{H} 12,4 para o composto **51** foi atribuído a presença de uma hidroxila *orto* à carbonila. Para o composto **50**, um dos substituintes do anel aromático corresponde a um grupo metóxi, uma vez que o composto apresenta um sinal mais desblindado em δ_{C} 156,7 e sinais em δ_{C} 55,8/ δ_{H} 3,85 (s) atribuídos a CH_3 ligado a um heteroátomo. A análise desses dados em comparação com obtidos no *Dictionary of Natural Products* (DNP) foi possível identificar os compostos **50** e **51** como sendo 5-hidroxi-3,4-dihidro-2*H*-naftalen-1-ona e 4,8-dihidroxi-3,4-dihidro-2*H*-naftalen-1-ona, respectivamente.

Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C do composto **52** diferente dos demais apresentou a ausência de sinais do tipo CH_2 , bem como a ocorrência apenas de sinais de hidrogênio de anel aromático e um grupo metoxila. A comparação dos dados com os observados no DNP, foi possível identificar o composto como sendo um derivado do naftaleno, conhecido por 4-metoxi-1-naftalenol.

Tabela 16 - Dados de RMN ^1H (600 MHz) e ^{13}C (150 MHz) dos compostos **50**, **51** e **52**.

N	50*		51*		52**	
	δ_{C}	δ_{H} (m)	δ_{C}	δ_{H} (m, J)	δ_{C}	δ_{H} (m, J)
1	197,7	-	205,3	-	154,5	-
2	58,3	5,10 (2H, dd)	66,12	2,69-2,80 (2H, m)	110,4	6,83 (1H, d, $J = 7,6$ Hz)
3	32,1	2,12-2,42 (1H, m)	35,3	1,94-2,00 (1H, m)	127,7	7,30 (1H, t, $J = 8,0$ Hz)
		2,93-2,96 (1H, m)		2,17-2,22 (1H, m)		
4	30,0	2,11 (2H, m)	31,6	4,75 (1H, brs)	156,1	-
5	156,7	-	117,6	6,84 (1H, d, $J = 13,9$ Hz)	121,8	7,37 (1H, d, $J = 8,3$ Hz)
6	115,9	7,26 (1H, d, $J = 12,6$ Hz)	136,9	7,54 (1H, t, $J = 13,0$ Hz)	125,5	7,24 (1H, d, $J = 8,0$ Hz)
7	117,4	7,40 (1H, t, $J = 13,1$ Hz)	115,9	7,07 (1H, d, $J = 12,6$ Hz)	118,8	7,24 (1H, d, $J = 8,0$ Hz)
8	128,7	7,44 (1H, d, $J = 11,6$ Hz)	161,6	-	103,9	6,72 (1H, d, $J = 7,7$ Hz)
9	133,0	-	115,2	-	115,0	-
10	132,1	-	148,8	-	136,7	-
1-OH	-	-	-	-	-	9,27 (1H, s)
8-OH	-	-	-	12,39 (1H, s)	-	-
4a	-	-	-	-	56,0	3,99 (3H,s)
5a	55,8	3,85 (s)	-	-	-	-

Deslocamentos químicos em δ (ppm) obtidos em *DMSO- d_6 e **CDCl₃

Figura 67 - Espectro de RMN ^1H do composto **50** (600 MHz, DMSO- d_6).

Figura 68 – Expansão do espectro de RMN ^1H do composto **50** (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$).

Figura 69 – Espectro de RMN ^{13}C do composto **50** (150 MHz, DMSO- d_6).

Figura 70 – Espectro de RMN ^1H do composto **51** (600 MHz, DMSO- d_6).

Figura 71 – Expansão do espectro de RMN ^1H do composto **51** (600 MHz, DMSO- d_6).

Figura 72 – Espectro de RMN ^{13}C do composto **51** (150 MHz, DMSO- d_6).

Figura 73 – Espectro de RMN ^1H do composto **52** (600 MHz, CDCl_3).

Figura 74 – Expansão do espectro de RMN ^1H do composto **52** (600 MHz, CDCl_3).

Figura 75 – Espectro de RMN ^{13}C do composto **52** (150 MHz, CDCl_3).

4.13 Identificação estrutural da dicetopiperazina **53**

A dicetopiperazina **53** foi identificada na amostra HM64-B4B2 (6,9 mg), por meio da análise de CLAE-UV-EM e HREIMS, e dos seus espectros de RMN ^1H e ^{13}C em comparação com dados relatados por Furtado *et al.* (2005).

O espectro UV (**Figura 76**), apresentou absorção em 218 e 256 nm e a análise por HREIMS (**Figura 118**) indicou um íon molecular protonado $[\text{M}+\text{H}]^+$ em 245,1286, correspondente à fórmula molecular $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_4$. A busca no DNP utilizando esses dados retornou 21 resultados, sendo necessária a obtenção dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C com o intuito de comparar com os dados da literatura.

Figura 76 – Espectros UV e EM da fração HM64-B4B2 (**53**).

O espectro de RMN ^{13}C (**Figura 79**) apresentou 12 sinais de carbonos, dos quais dois um em δ_{C} 165,2 (C-1) e outro em δ_{C} 169,2 (C-7) foram atribuídos a carbonilas de amida, e quatro sinais entre δ_{C} 126,5-137,4 atribuídos a seis carbonos do tipo sp^2 em anel aromático. A análise de RMN ^1H indicou a presença de sinais típicos de aminoácidos, como a prolina com a presença de multipletos entre δ_{H} 1,38-3,28, correspondentes à seis hidrogênios e os dois duplos dubletos em δ_{H} 3,01 e 3,07 (H-10) atribuídos ao grupo metilênico ligado a anel benzeno monossustituído, sugerindo tratar-se do aminoácido fenilalanina (**Figura 77 e 78**). A análise desses dados em comparação com os da literatura permitiu identificar o composto como sendo o 3-benzil-hexahidro-pirrol[1,2-a]pirazina-1,4-diona.⁸⁵

Tabela 17 - Dados de RMN ^1H (600 MHz) e ^{13}C (150 MHz) do composto **53**.⁸⁷

53*			Dicetopiperazina**	
C	δ_{C}	δ_{H} (m, <i>J</i> em Hz)	δ_{C}	δ_{H} (<i>J</i> em Hz)
1	165,2	-	167,3	-
3	44,7	3,24-3,28 (1H, m)	45,9	3,33-3,39 (1H, m)
		3,37-3,42 (1H, m)		3,48-3,56 (1H, m)
4	22,0	1,67-1,76 (2H, m)	23,1	1,75-1,83 (2H, m)
5	27,9	1,38-1,45 (1H, m)	29,7	1,15-1,24 (1H, m)
		1,98-2,03 (1H, m)		2,04-2,12 (1H, m)
6	55,8	4,06 (1H, dd, 8,5; 7,4 Hz)	60,4	4,06 (1H, ddd)
7	169,2	-	171,3	-
9	58,5	4,34 (1H, t, 5,0 Hz)	58,0	4,44 (1H, ddd)
10	35,5	3,01 (1H, dd, 5,0; 14,2 Hz)	38,6	3,14 (1H, dd, 5,0; 14,4 Hz)
		3,07 (1H, dd, 5,3; 14,2 Hz)		3,18 (1H, dd, 4,8; 14,4 Hz)
1'	137,4	-	137,6	-
2'/6'	129,9	7,17-7,28 (1H, m)	131,4	7,20-7,29 (1H, m)
3'/5'	128,1	7,17-7,28 (1H, m)	130,1	7,20-7,29 (1H, m)
4'	126,5	7,17-7,28 (1H, m)	128,5	7,20-7,29 (1H, m)

Deslocamentos químicos em δ (ppm) obtidos em *DMSO- d_6 e **MeOH- d_4

Figura 77 – Espectro de RMN ^1H do composto **53** (600 MHz, DMSO- d_6).

Figura 78 – Expansão do espectro de RMN ^1H do composto **53** (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

Figura 79 – Espectro de RMN ^{13}C do composto **53** (150 MHz, DMSO- d_6).

4.14 Identificação e elucidação estrutural dos compostos 54-57

Os compostos **54-57** foram obtidos nas amostras 21D5A, 21D5C, 21D5E e HM11-32E, conforme apresentado no item 3.12.4. Foram identificados por meio de análises por CLAE-UV-EM e dos seus espectros de RMN 1D e 2D em comparação com dados relatados por Fukai *et al.* (2012).

A semelhança entre os espectros no UV (**Figura 80**) dessas amostras indicou tratar-se de compostos de mesma classe química. A análise dos espectros de massas de alta resolução no modo negativo (Anexo pag. 168-171) indicou que as amostras 21D5C, 21D5E e HM11-32E possuem a mesma massa com íon molecular desprotonado $[M-H]^-$ em 349,1065, que corresponde à fórmula molecular $C_{21}H_{18}O_5$. Já a amostra 21D5A com massa $[M-H]^-$ em 335,0925, corresponde à perda de uma hidroxila com fórmula molecular igual a $C_{20}H_{18}O_5$.

Figura 80 - Espectros no UV das amostras 21D5A, 21D5C, 21D5E e HM11-32E.

A análise dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C (**Figuras 82-89**) dos compostos **54-57** confirmam o que foi observado nos espectros de UV e HREIMS. Observa-se um padrão com relação à região de ocorrência dos hidrogênios e carbonos nas moléculas. Devido à semelhança entre os dados espectrométricos, a determinação estrutural dos compostos será aqui discutida utilizando-se os dados obtidos para o composto **57**, uma vez que todos apresentam o mesmo esqueleto químico, mas o composto **57** é inédito na literatura.

A análise dos espectros de RMN ^1H , RMN ^{13}C (**Figuras 88 e 89**) e HSQC (Anexo pag. 166) permitiu verificar que os 21 sinais de carbonos correspondem a: 1 carbono metílico ligado a heteroátomo, 2 carbonos metínicos, 3 carbonos metilênicos do tipo sp^3 , dos quais 2 deles são oxigenados, 5 carbonos metilênicos do tipo sp^2 e 10 carbonos quaternários.

Os espectros de gCOSY e gHMBC permitiram identificar o esqueleto da molécula como um policetídeo policíclico do tipo benzo[*j*]fluoranteno. Um sistema formado por 4 anéis de seis membros e outro anel de cinco membros.

A análise do espectro de gCOSY (Anexo pag. 165) permitiu observar correlações ^1H - ^1H entre os grupos de hidrogênios: H-1/H-2/H-3 e H-5/H-6 que juntamente com os acoplamentos observados no gHMBC entre o hidrogênio H-1 (δ_{H} 2,82 e 2,98) com os carbonos C-12c (δ_{C} 132,7)/C-12d (δ_{C} 145,0), H-2 (δ_{H} 1,64 e 2,33) com os carbonos C-1 (δ_{C} 20,3)/C-2 (δ_{C} 28,4)/C-3a (δ_{C} 118,6), H-3 (δ_{H} 4,69) com C-3a/C-12d/C-4 (δ_{C} 56,1), H-5 (δ_{H} 6,72) com C-6a (δ_{C} 135,0) e H-6 (δ_{H} 7,38) com C-12d levaram a determinar a presença de um sistema do tipo hidronaftaleno (**Figura 81**).

Figura 81 - Sistema do tipo hidronaftaleno I (linhas sombreadas indicam correlações ^1H - ^1H observadas no espectro gCOSY; e flechas indicam correlações à longa distância ^1H - ^{13}C observadas no espectro gHMBC).

A presença de outro sistema do tipo hidronaftaleno também foi observado através das correlações no espectro gCOSY entre os hidrogênios H-6b/H-7 e H-10 a H-

12. Acoplamentos foram observadas no espectro do gHMBC entre o hidrogênio H-10 (δ_H 6,87) com o carbono C-9 (δ_C 162,4), H-11 (δ_H 7,61) e C-9/C-12a (δ_C 139,0), H-12 (δ_H 7,14) e C-8 (δ_C 206,5), H-6b (δ_H 3,97) e C-8/C-12b (δ_C 138,2) e H-7 (δ_H 3,80) e C-8 (Figura 82).

Figura 82 - Sistema do tipo hidronaftaleno II (linhas sombreadas indicam correlações 1H - 1H observadas no espectro gCOSY; e flechas indicam correlações à longa distância 1H - ^{13}C observadas no espectro gHMBC).

Os dois fragmentos de hidronaftaleno foram conectados através das correlações observadas no gHMBC entre os hidrogênios H-6 (δ_H 7,38) com os carbonos C-6b (δ_C 55,2) e C-12c (δ_C 132,7), H-1 (δ_H 2,82 e 2,98) e C-12b (δ_C 138,2) e H-12 (δ_H 7,14) com carbono C-12c (δ_C 132,7), como apresentado na figura 83.

Figura 83 – Junção entre os fragmentos de hidronaftaleno I e II na formação da cadeia do policetídeo policíclico do tipo benzo[*j*]fluoranteno.

As posições das hidroxilas foram definidas por meio dos acoplamentos observados no espectro de gHMBC. Os compostos **54**, **55** e **56**, possuem grupos OH ligados nos carbonos C-1, C-4 e C-9. Contudo, além desses sinais, o composto **54** apresenta um sinal em δ_H 5,21 atribuído a um grupo OH ligado ao carbono C-3 em substituição ao grupo metoxila observado nos compostos **55** e **56**. O sinal do hidrogênio da metoxila ligada ao C-3 ocorre em δ_H 3,44 e o carbono em δ_C 125,2, mas C-3 não é aromático justificando a diferença de 14 u.a. observada entre os espectros de massas.

Assim como os demais compostos, o composto **57** possui grupos OH ligados diretamente aos carbonos C-4 e C-9, contudo, a hidroxila na posição C-1 está ausente e um sinal em δ_H 6,05 foi atribuído ao grupo OH ligado ao carbono C-7. Este sinal pôde ser confirmado através da correlação entre a hidroxila OH-7 e o hidrogênio H-7 em δ_H 3,80 no espectro de gCOSY, bem como, com os acoplamentos no gHMBC entre o hidrogênio da OH-7 com os carbonos C-6b e C-8 (**Figura 84**).

Figura 84 – Estrutura do composto **53** (linhas sombreadas indicam correlações 1H - 1H observadas no espectro gCOSY; e flechas indicam correlações à longa distância 1H - ^{13}C observadas no espectro gHMBC).

Os dados obtidos para compostos **54**, **55** e **56** quando comparados com os dados da literatura permitiram identificar os compostos como hypoxylonol C, B e E, respectivamente.^{88,89} O composto **57** não foi reportado anteriormente na literatura, sendo, portanto, denominado por 4,7,9-trihidroxi-3-metoxi-2,3,6b,7-tetrahidro-1H-benzo[j]fluoranten-8-ona.

Compostos com esqueleto do tipo benzo[j]fluoranteno também foram isolados do meio de cultivo de outras linhagens fúngicas, como *Hypoxylon*⁸⁸⁻⁹⁰, *Annulohypoxylon*⁸⁸, *Daldinia*⁹², *Bulgaria*⁹⁴ e *Clardosporium*⁹⁵. Amplamente distribuídos, os compostos dessa classe apresentam atividades antiproliferativa⁸⁹, citotóxica⁹⁰⁻⁹² e antioxidante.⁹⁶

A origem biossintética desses compostos foi investigada e mostra que o esqueleto do tipo benzo[j]fluoranteno é formado por uma via policetídica derivada da rota do acetato. Os compostos formados por essa rota biossintética possuem o composto 1,8-dihidronaftaleno (**58**) em comum com a biossíntese da melanina⁹⁷, que após dimerizar com o naftol forma o intermediário BNT ([1,1'-binaftaleno]-4,4',5,5'-tetrol). A estrutura do BNT serve como base para a formação dos compostos do tipo benzo[j]fluoranteno, como pode ser observado na figura 82 para a biossíntese das daldinonas C (**59**), D (**54**), F

(55) e G (56)^{98,99}. Outras etapas, como adição conjugada, rearranjos, oxidação e redução levam à formação dos diferentes compostos desta classe⁹³.

Figura 85 – Biossíntese das daldinonas C, D, F e G.^{97,98}

Tabela 18 - Dados de RMN ^1H (600 MHz) e ^{13}C (150 MHz) da amostra 21D5A (**54**).

n	hypoxylonol C ⁸⁹		21D5A (54)	
	δ_{C}	δ_{H} (J em Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J em Hz)
1	62,7	5,59 dd (8,5 e 4,3)	62,3	5,59 brs
2	42,3	2a: 2,46 dt (13,1 e 4,3) 2b: 2,14 ddd (13,1; 8,5 e 3,2)	42,0	2a: 2,46 dt (13,0 e 4,7) 2b: 2,15 ddd (13,0; 8,4 e 3,2))
3	65,4	5,47 m	65,0	5,46 m
3a	120,5		120,3	
4	155,7		155,4	
5	114,3	6,67 d (8,0)	114,0	6,67 d (8,0)
6	123,4	7,28 d (8,0)	123,2	7,28 d (8,0)
6a	136,4		136,1	
6b	49,7	4,10 dd (13,9 e 5,6)	49,4	4,10 dd (13,9 e 5,6)
7	43,6	7a: 3,37 dd (16,4 e 5,6) 7b: 2,30 dd (16,4 e 13,9)	43,2	7a: 3,37 dd (16,3 e 5,6) 7b: 2,30 dd (16,3 e 13,9)
8	205,8		205,7	
8a	115,5		115,2	
9	163,5		163,5	
10	117,0	6,83 dd (7,9 e 1,2)	116,7	6,83 d (8,3 e 1,0)
11	137,4	7,54 t (7,9)	137,2	7,55 t (8,0)
12	118,8	7,48 dd (7,9 e 1,2)	118,6	7,49 dd (8,0 e 1,0)
12a	139,4		139,2	
12b	137,6		137,3	
12c	138,0		137,9	
12d	144,0		143,8	
1-OH		4,27 s		4,31 s
3-OH		5,14 brd (4,2)		5,22 s
4-OH		8,60 s		8,66 s
12-OH		12,59 s		

Deslocamentos químicos em δ (ppm) obtidos em acetona- d_6

Tabela 19 - Dados de RMN ^1H (600 MHz) e ^{13}C (150 MHz) da amostra 21D5C (**55**).

n	hypoxylonol B ⁸⁸		21D5C (55)	
	δ_{C}	δ_{H} (J em Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J em Hz)
1	63,6	5,51 dddd (8,8; 6,4; 4,6; 2,3)	63,5	5,38 m
2	39,8	2a: 2,41 ddd (13,1; 6,0; 4,6) 2b: 2,15 ddd (13,1; 8,8; 3,4)	39,5	2a: 2,40 ddd (13,1; 5,6; 4,6) 2b: 2,14 ddd (13,0; 8,9; 3,2)
3	73,1	4,98 dd (6,0; 3,4)	72,8	4,96 dd (5,6 e 3,2)
3a	119,1		118,9	
4	155,2		155,4	
5	114,3	6,75 d (8,0)	114,1	6,73 d (8,0)
6	124,1	7,32 dd (8,0; 0,7)	124,0	7,30 d (8,0; 0,6)
6a	137,0		136,9	
6b	50,0	4,08 ddd (13,9; 5,5; 2,3 e 0,7)	49,7	4,06 dddd (13,8; 5,5; 2,3 e 0,8)
7	43,8	3,39 dd (16,4; 5,5) 2,29 dd (16,4; 13,9)	43,6	7a: 3,36 dd (16,4; 5,5) 7b: 2,28 dd (16,4; 13,9)
8	206,1		205,8	
8a	115,8		115,7	
9	163,5		163,4	
10	117,0	6,83 dd (7,7; 1,7)	116,9	6,81 dd (8,0; 1,4)
11	137,1	7,54 t (7,7)	137,0	7,52 t (8,0)
12	120,8	7,51 dd (7,7; 1,7)	120,9	7,49 dd (8,0; 1,3)
12a	139,4		139,3	
12b	138,0		137,9	
12c	138,9		138,9	
12d	145,3		145,3	
1-OH		4,17 d (6,4)		4,17 d
4-OH		8,38 s		8,40 s
3-OCH ₃	56,6	3,46 s	56,4	3,44 s

Deslocamentos químicos em δ (ppm) obtidos em acetona-*d*₆

Tabela 20 - Dados de RMN ^1H (600 MHz) e ^{13}C (150 MHz) da amostra 21D5E (**56**).

n	hypoxylonol E ⁸⁹		21D5E (56)	
	δ_{C}	δ_{H} (J em Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J em Hz)
1	64,2	5,35 m	64,2	5,35 m
2	38,0	2a,b: 2,38 m	38,0	2a,b: 2,38 m
3	74,5	5,02 dd (5,9; 3,9)	74,4	5,03 dd (5,9; 3,9)
3a	118,4		118,5	
4	155,3		155,5	
5	114,3	6,72 d (8,1)	114,3	6,73 d (8,0)
6	124,1	7,31 d (8,1)	124,2	7,33 d (8,0)
6a	136,7		136,8	
6b	49,5	4,05 dddd (13,9; 5,5; 1,7; 0,7)	49,5	4,05 dddd (13,9; 5,5; 1,6; 0,8)
7	43,4	7a: 3,38 dd (16,4; 5,5)	43,4	7a: 3,40 dd (16,3; 5,5)
		7b: 2,35 dd (16,4; 13,9)		7b: -
8	205,7		205,7	
8a	115,6		115,6	
9	163,5		163,6	
10	117,0	6,82 dd (7,7; 1,5)	117,0	6,82 dd (8,0; 1,2)
11	137,1	7,35 t (7,7)	137,3	7,54 t (7,9)
12	119,7	7,49 dd (7,7; 1,5)	119,8	7,50 dd (7,9; 1,1)
12a	139,1		139,3	
12b	137,7		137,8	
12c	138,7		138,8	
12d	144,2		144,4	
1-OH		4,16 d (7,1)		4,16 d (9,2)
4-OH		8,50 s		8,47 s
3-OCH ₃	56,9	3,51 s	56,9	3,52 s

Deslocamentos químicos em δ (ppm) obtidos em acetona- d_6

Tabela 21 - Dados de RMN ^1H (600 MHz) e ^{13}C (150 MHz) da amostra HM11-32E (**57**).⁸⁹

n	hypoxylonol E*		HM11-32E**	
	δ_{C}	δ_{H} (J em Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J em Hz)
1	64,2	5,35 m	20,3	2,82 e 2,98 m
2	38,0	2a,b: 2,38 m	28,4	1,64 e 2,33 m
3	74,5	5,02 dd (5,9; 3,9)	68,3	4,69 t (2,8)
3a	118,4		118,6	
4	155,3		155,0	
5	114,3	6,72 d (8,1)	113,4	6,72 d (8,0)
6	124,1	7,31 d (8,1)	125,5	7,38 d (8,0)
6a	136,7		135,0	
6b	49,5	4,05 dddd (13,9; 5,5; 1,7; 0,7)	55,2	3,97 dd (12,3; 3,3)
7	43,4	7a: 3,38 dd (16,4; 5,5)	76,9	3,80 dd (12,4; 5,5)
		7b: 2,35 dd (16,4; 13,9)		
8	205,7		206,5	
8a	115,6		114,0	
9	163,5		162,4	
10	117,0	6,82 dd (7,7; 1,5)	116,0	6,87 d (7,7)
11	137,1	7,35 t (7,7)	137,5	7,61 t (8,0)
12	119,7	7,49 dd (7,7; 1,5)	117,8	7,14 d (7,7)
12a	139,1		139,0	
12b	137,7		138,2	
12c	138,7		132,7	
12d	144,2		145,0	
1-OH		4,16 d (7,1)		
4-OH		8,50 s		9,47 s
7-OH				6,05 d
9-OH		12,60 s		12,3 s
3-OCH ₃	56,9	3,51 s	56,1	3,30 s

Deslocamentos químicos em δ (ppm) obtidos em *acetona- d_6 e **DMSO- d_6

Figura 86 – Espectro de RMN ^1H do composto **54** (600 MHz, acetona- d_6).

Figura 87 – Espectro de RMN ^{13}C do composto **54** (150 MHz, acetona- d_6).

Figura 88 – Espectro de RMN ^1H do composto **55** (600 MHz, acetona- d_6).

Figura 89 – Espectro de RMN ^{13}C do composto **55** (150 MHz, acetona- d_6).

Figura 90 – Espectro de RMN ^1H do composto **56** (600 MHz, acetona- d_6).

Figura 91 – Espectro de RMN ^{13}C do composto **56** (150 MHz, acetona- d_6).

Figura 92 – Espectro de RMN ^1H do composto **57** (600 MHz, DMSO- d_6).

Figura 93 – Espectro de RMN ^{13}C do composto **57** (150 MHz, DMSO- d_6).

5 CONCLUSÕES

O estudo químico do meio de cultura produzido pelo fundo da linhagem *Roussoella* sp. DLM33, obtido da ascídia *Didemnum ligulum*, levou ao isolamento e identificação de 4 compostos conhecidos: 5-metilmeleina (**29**), 5,7-dicloro-6-metoxi-8-hidróxi-3-metil-dehidroisocumarina (**30**), diastereoisômeros do cryptoporiopsinol (**31**) e (**32**), e um composto inédito denominado roussoellatídeo (**33**).

A metodologia utilizada para extrair o composto (**33**) foi otimizada em vários experimentos, com a utilização da mistura dos solventes: AcOEt/MeOH/CH₂Cl₂ (6:3:1) com 1% de ácido fórmico. A aplicação do planejamento experimental e da metodologia multicritério, levou à escolha do experimento #19 como a melhor condição para a produção do composto (**33**).

Experimentos de biossíntese com [1-¹³C]acetato, [1,2-¹³C]acetato e [metil-¹³C]metionina permitiram propormos a biossíntese do roussoellatídeo (**33**), mostrando tratar-se do 1º metabólito secundário formado por dois rearranjos de Favorskii e uma cicloadição de Diels-Alder intermolecular. O isolamento dos compostos **29**, **30**, **31**, **32** e **33** ilustra o fato que o aparato biossintético de linhagens microbianas é capaz de expressar todos os intermediários de biossíntese de um produto final, estruturalmente mais complexo. Os resultados da investigação do metabolismo do fungo *Roussoella* sp. DLM33 é um excelente exemplo desta natureza, que permite vislumbrar diversas investigações futuras sobre a maquinaria policetídica desta linhagem fúngica.

O estudo químico do meio de cultura da linhagem *Annulohypoxylon moriforme* MA9, fungo endofítico da planta *Anthurium loefgrenii*, levou ao isolamento e identificação de dois compostos inéditos: a (*E*)-3-benzilideno-hexahidro-2-metilpirrolo[1,2-*a*]-pirazina-1,4-diona (**36**) e a 4,7,9-trihidroxi-3-metoxi-2,3,6b,7-tetrahidro-1H-benzo[*j*]fluoranten-8-ona (**57**), além de 10 compostos conhecidos: o TCM-95A (**43**), TMC-95B (**44**), daidzeína (**49**), 5-hidroxi-3,4-dihidro-2*H*-naftalen-1-ona (**50**), 4,8-dihidroxi-3,4-dihidro-2*H*-naftalen-1-ona (**51**), 4-metoxi-1-naftalenol (**52**), 3-benzil-hexahidro-pirrolo[1,2-*a*]-pirazina-1,4-diona (**53**), hypoxylonol C (**54**), hypoxylonol B (**55**) e hypoxylonol E (**56**). Os inibidores do proteassomo TMC-95A e TMC-95B puderam ser descobertos ainda quando no extrato bruto, uma vez que estes compostos co-cristalizaram com a enzima do proteassomo 20S, analisada por difração de Raios-X.

Como para o fungo *Roussoella* sp. DLM33, a investigação do metabolismo secundário do fungo *Annulohypoxylon moriforme* MA9 ilustra a expressão de diversos

produtos de uma mesma maquinaria policetídica, os compostos **46, 47, 48, 53, 54, 55, 56** e **57**. Fica evidente que a expressão do metabolismo fúngico é muitas vezes multifuncional, e que pequenas alterações nas condições de cultivo podem eventualmente favorecer a produção de determinados metabólitos, em detrimento de outros. A investigação de tais mecanismos regulatórios é de importância para melhor se conhecer o potencial de expressão de determinados metabólitos, e como estas mudanças ambientais influenciam a expressão gênica e enzimática de linhagens fúngicas.

6 REFERÊNCIAS

- 1 FLEMING, A. Classics in infectious diseases: on the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of B. influenza by Alexander Fleming, Reprinted from the British Journal of Experimental Pathology 10: 226–236, 1929. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 2, p. 129–139, 1980.
- 2 STROBEL, G.; DAISY, B.; CASTILLO, U.; HARPER, J. Natural products from endophytic microorganisms. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 2, p. 257-268, 2004.
- 3 HOLKER J. S. E.; SIMPSON, T. J. Studies on fungal metabolites. Part 2. Carbon-13 nuclear magnetic resonance biosynthetic studies on pentaketide metabolites of *Aspergillus melleus*: 3-(1,2-epoxypropyl)-5,6-dihydro-5-hydroxy-6-methylpyran-2-one and mullein. **Journal of Chemical Society, Perkin Transaction I**, p. 1397-1400, 1981. DOI: 10.1039/P198100FP001.
- 4 FUCHSER, J.; ZEECK, A. Secondary metabolites by chemical screening, 34. – aspinolides and aspinonene/aspyrone co-metabolites, new pentaketides produced by *Aspergillus ochraceus*. **Liebigs Annalen**, p. 87-95, 1997. DOI: 10.1002/jlac.199719970114
- 5 GREEN, D. M.; LONG, A. G.; MAY, P. J.; TURNER, A. F. α -Tetronic acids and the 3,6-dihydro-2H-1,3-thiazine ring. **Journal of the Chemical Society**, p. 766-783, 1964. DOI: 10.1039/JR9640000766.
- 6 OKANYA, P.W.; MOHR, K. I.; GERTH, K.; STEINMETZ, H.; HUCH, V.; JANSEN, R.; MÜLLER, R. Hyaladione, an S-methyl cyclohexadiene-dione from *Hyalangium minutum* **Journal of Natural Products**, v. 75, p. 768-770, 2012.
- 7 PETRINI, O. Fungal endophytic of tree leaves. In: ANDREWS, J. H.; HIRANO, S. S. **Microbiol ecology of leaves**. New York: Springer-Verlag, 1991. Cap. 9, p. 179-197.
- 8 AZEVEDO, J. L. Biodiversidade microbiana e potencial biotecnológico. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998. p. 116-137.
- 9 GUNATILAKA, A. A. L. Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implication of their occurrence. **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 509–526, 2006.
- 10 WANI, M. C.; TAYLOR, H. L.; WALL, M. E.; COGGON, P.; MCPHAIL, A. T. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from

Taxus brevifolia. **Journal of the American Chemical Society**, v. 93, p. 2325-2327, 1971.

11 STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D.; GROTHAUS, P.; BIGNAMI, G. The search for a taxol-producing microorganism among the endophytic fungi of the Pacific yew, *Taxus brevifolia*. **Journal of Natural Products**, v. 58, p.1315-1324, 1995.

12 HEINIG, U.; SCHOLZ, S.; JENNEWEIN, S. Getting to the bottom of Taxol biosynthesis by fungi. **Fungal Diversity**, v. 60, p.161-170, 2013.

13 ARNOLD, A. E. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. **Fungal Biology Reviews**, v. 21, n. 2-3, p. 51-66, 2007.

14 MOUSA, W. K.; RAIZADA, M. N. The diversity of anti-microbial secondary metabolites produced by fungal endophytes: an interdisciplinary perspective. **Frontiers in Microbiology**, v.4, p.1-18, 2013. DOI:10.3389/fmicb.2013.00065.

15 LI, C.; REN, G.; YANG, B.; MIKLOSSY, G.; TURKSON, J.; FEI, P.; DING, Y.; WALKER, L. A.; CAO, S. Meroterpenoids with antiproliferative activity from a Hawaiian-Plant Associated fungus *Peyronellaea coffeae-arabicae* FT238. **Organic Letters**, v. 18, p. 2335-2338, 2016.

16 ZHANG, D.; TAO, X.; LIU, J.; CHEN, R.; ZHANG, M.; LI, L.; FANG, X.; YU, L.; DAI, J. Periconiasin G, a new cytochalasan with unprecedented 7/6/5 tricyclic ring system from the endophytic fungus *Periconia* sp. **Tetrahedron Letters**, v. 57, p. 796-799, 2016.

17 RATEB, M. E.; EBEL, R. Secondary metabolites of fungi from marine habitats. **Natural Products Reports**, v. 22, p. 290-344, 2011.

18 BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; KEYZERS, R. A.; MUNRO, M. H. G.; PRINSEP, M. R. Marine natural products. **Natural Products Reports**, v. 32, p. 116-211, 2015.

19 CHEN, M.; SHAO, C.; MENG, H.; SHE, Z.; WANG, C. Anti-respiratory syncytial virus prenylated dihydroquinolone derivatives from the gorgonian-derived fungus *Aspergillus* sp. XS-20090B15. **Journal of Natural Products**, v.77, p. 2720-2724, 2014.

20 MERCADO-MARIN, E. V.; GARCIA-REYNAGA, P.; ROMMINGER, S.; PIMENTA, E. F.; ROMNEY, D. K.; LODEWYK, M. W.; WILLIAMS, D. E.; ANDERSEN, R. J.; MILLER, S. J.; TANTILLO, D. J.; BERLINCK, R. G. S.; SARPONG, R. Total synthesis and isolation of citrinalin and cyclopiamine congeners. **Nature**, v. 509, p. 318-324, 2014.

- 21 KENNEDY, J.; HUTCHINSON, C. R. Nurturing nature: engineering new antibiotics. **Nature Biotechnology**, v. 15, p. 538-539, 1999.
- 22 LARSEN, T. O.; SMEDSGAARD, J.; NIELSEN, K. F.; HANSEN, M. E.; FRISVAD, J. C. Phenotypic taxonomy and metabolite profiling in microbial drug discovery. **Natural product reports**, v. 22, p. 672-695, 2005.
- 23 RAY, L.; MOORE, B. S. Recent advances in the biosynthesis of unusual polyketide synthase substrates. **Natural Products Reports**, v 33, p. 150-161, 2015.
- 24 DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 3 ed. New York: John Wiley, 2009. 546 p.
- 25 WAGONER, R. M. V.; SATAKE, M.; WRIGHT, J. L.C. Polyketides biosynthesis in dinoflagellates: what makes it different? **Natural Product Reports**, v. 31, p. 1101-1137, 2014.
- 26 BIRCH AJ, MASSY-WESTROPP RA, MOYE CJ. Studies in relation to biosynthesis. Part VII. 2-Hydroxy-6-methylbenzoic acid in *Penicillium griseofulvum* Dierckx. **Australian Journal of Chemistry**, v. 8, p. 539-4427, 1955.
- 27 BIRCH, A. J. Biosynthesis of polyketides and related compounds. **Science**, v. 156, p. 202-206, 1967.
- 28 BUTLER, A.; SANDY, M. Mechanistic considerations of halogenating enzymes. **Nature**, v. 460, p. 848-854, 2009.
- 29 LITTLECHILD, J. Haloperoxidases and their role in biotransformation reactions. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 3, p. 28-34, 1999.
- 30 DRECHSEL, E. Contribution to the chemistry of a sea animal. **Zeitschrift fur Biologie**, v. 33, p. 85-107, 1896.
- 31 GRIBBLE, G. W. Natural organohalogens: a new frontier for medicinal agents? **Journal of Chemical Education**, v. 81, n. 10, p. 1441-1449, 2004.
- 32 STILLWELL, M. A.; WOOD, F. A.; STRUNZ, G. M. A broad-spectrum antibiotic produced by a species of *Cryptosporiopsis*. **Canadian Journal of Microbiology**, v.15, p. 501-507, 1969.
- 33 STRUNZ, G. M.; COURT, A. S.; KOMLOSSY, J.; STILLWELL, M. A. Structure of cryptosporiopsin: a new antibiotic substance produced by species of *Cryptosporiopsis*. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 47, p. 2087-2094, 1969.

- 34 MCGAHREN, W. J.; VAN DEN HENDE, J. H.; MITSCHER, L. A. Chlorinated cyclopentenone fungitoxic metabolites from fungus, *Sporormia affinis*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 91, p. 157-162, 1969.
- 35 GILES, D.; TURNER, W. B. Chlorine-containing metabolites of *Periconia macrospinos*. **Journal of the Chemical Society**, p. 2187-2189, 1969. DOI: 10.1039/J396900002187.
- 36 WALSH, C. T.; WENCEWICZ, T. A. Flavoenzymes: versatile catalysts in biosynthetic pathways. **Natural Product Reports**, v. 30, p. 175-200, 2013.
- 37 AGARWAL, V.; MILES, Z. D.; WINTER, J. M.; EUSTÁQUIO, A. S.; GAMAL, A. A. E.; MOORE, B. S. Enzymatic halogenation and dehalogenation reactions: pervasive and mechanistically diverse. **Chemical Reviews**, 2017. Doi:10.1021/acs.chemrev.6b00571
- 38 VARDHAMAN, A. K.; BARMAN, P.; KUMAR, S.; SASTRI, C. V.; KUMAR, D.; VISSE, S. P. Mechanistic insight into halide oxidation by non-heme iron complexes. Haloperoxidase versus halogenase activity. **Chemical Communications**, v. 49, p. 10926-10928, 2013.
- 39 SETO, H.; SATO, T.; URANO, S.; UZAWA, J.; YONEHARA, H. Utilization of ¹³C-¹³C coupling in structural and biosynthetic studies. VII. The structure and biosynthesis of vulgamycin. **Tetrahedron Letters**, v. 48, p. 4367-4370, 1976.
- 40 HERTWECK, C.; XIANG, L.; KALAITZIS, J. A.; CHENG, Q.; PALZER, M.; MOORE, B. S. Context-dependent behavior of the enterocin iterative polyketide synthase; a new model for ketoreduction. **Chemistry and Biology**, v. 11, p. 461-468, 2004.
- 41 HERTWECK, C.; LUZHETSKYY, A.; REBETS, Y.; BECHTHOLD, A. Type II polyketide synthases: gaining a deeper insight into enzymatic teamwork. **Natural Product Reports**, v. 24, p. 162-190, 2007.
- 42 TUEFEL, R.; MIYANAGA, A.; MICHAUDEL, Q.; STULL, F.; LOUIE, G.; NOEL, J. P.; BARAN, P. S.; PALFEY, B.; MOORE, B. S. Flavin-mediated dual oxidation controls an enzymatic Favorskii-type rearrangement. **Nature**, v. 503, p. 552-556, 2013.
- 43 PIMENTA, E. L.; VITA-MARQUES, A. M.; TININIS, A.; SELEGHIM, M. H. R.; STTE, 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. **Journal of Natural Products**, v. 73, p. 1821-1832, 2010.

- 44 CASTRO, M. V. Utilização de planejamento experimental para otimizar a produção de metabólitos secundários produzidos por *Penicillium* sp., isolado do ambiente marinho. 2015. 168f. Tese (Doutorado em Química Orgânica e Biológica). Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.
- 45 BI, Y.; BI, X.; ZHAO, Q. Metabolites from the fungus *Cephalosporium* sp. AL031. **Archives Pharmacal Research**, v. 3, p. 267-269, 2007.
- 46 MCGAHREN, W. J.; MITSCHER, L. A. Dihydroisocoumarins from a *Sporormia* fungus. **Journal of Organic Chemistry**, v. 33, p. 1577-1580, 1968.
- 47 GILES, D.; TURNER, W. B. Chlorine-containing metabolites of *Periconia macrospinos*. **Journal of the Chemical Society C: Organic**, p. 2187-2189, 1969.
- 48 MATSUMOTO, T.; HOSOYA, T.; TOMODA, H.; SHIRO, M.; SHIGEMORI, M. Palmaenones A and B, two new antimicrobial chlorinated cyclopentenones from discomycete *Lachnum palmae*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 59, p. 1559-1561, 2011.
- 49 HENDERSON G. H.; HILL, R. A. The biosynthesis of chlorine-containing metabolites of *Periconia macrospinos*. **Journal of the Chemical Society**, p. 3037-3039, 1982.
- 50 ZAMIR, L. O.; CHIN, C. C. Aromatic origin of cyclopentenoid metabolites. **Bioorganic Chemistry**, v. 11, p. 338-349, 1982.
- 51 WRIGHT, J. L. C.; HU, T.; MCLACHLAN, J. L.; NEEDHAM, J.; WALTER, J. A.. Biosynthesis of DTX-4: Confirmation of a polyketide pathway, proof of a Baeyer–Villiger oxidation step, and evidence for an unusual carbon deletion process. **Journal of American Chemical Society**, v. 118, p. 8757–8758, 1996.
- 52 SCHMITZ, F. J.; YASUMOTO, T.. The 1990 United States-Japan seminar on bioorganic marine chemistry, meeting report. **Journal of Natural Products**, v. 54, p. 1469–1490, 1991.
- 53 MACPHERSON, G. R.; BURTON, I. W.; LEBLANC, P.; WALTER, J. A.; WRIGHT, J. L. C.. Studies of the biosynthesis of DTX-5a and DTX-5b by the dinoflagellate *Prorocentrum maculosum*: regiospecificity of the putative Baeyer–Villigerase and insertion of a single amino acid in a polyketide chain. **Journal of Organic Chemistry**, v. 68, p. 1659–1664, 2003.
- 54 LIMA, M. E. F.; COELHO, F. A. S. Utilização de α,α -diclorociclobutanonas em síntese de produtos naturais. **Química Nova**, v. 20, p. 279-292, 1997.

- 55 STOCKING, E. M.; WILLIAMS, R. M. Chemistry and biology of biosynthetic Diels-Alder reactions. **Angewandte chemie**, v. 42, 3078-3115, 2003.
- 56 HANO, Y.; NOMURA, T.; UEDA, S. Biosynthesis of chalcomoracin and kuwanon j, the Diels-Alder type adducts, in *Morus alba* l. cell cultures. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 37, p. 554-556, 1989.
- 57 HOLKER, J. S. E.; YOUNG, K. Biosynthesis of metabolites of *Periconia macrospinos* from [1-¹³C]-, [2-¹³C]-, e [1,2-¹³C]acetate. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, p. 525-526, 1975.
- 58 BROCKSOM, T. J.; DONATONI, M. C.; ULIANA, M. P.; VIEIRA, Y. W. A reação de Diels-Alder no início do século vinte um. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2211-2218, 2010.
- 59 CHEN, Y.; SHAO, C.; HUANG, Z.; ZHANG, Y.; CAI, X.; SHE, Z.; ZHOU, S.; LIN, Y. Structure elucidation and NMR assignments for two amide alkaloids from a Mangrove endophytic fungus (No. ZZF-22). **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 47, p. 92-95, 2009.
- 60 SUN, M.; CHEN, X. LI, W.; LU, C.; SHEN, Y. New diketopiperazine derivatives with cytotoxicity from *Nocardiosis* sp. YIM M13066. **The Journal of Antibiotics**, p. 1-3, 2017. Doi:10.1038/ja.2017.46
- 61 GUO, D.; ZHAO, M.; XIAO, S.; XIA, B.; WAN, B.; GU, Y.; DING, L.; ZHOU, Y. Two new diketopiperazines and a new glucosyl sesterpene from *Alternaria alternata*, and endophytic fungi from *Ceratostigma griffithii*. **Phytochemistry Letters**, v. 14, p. 260-264, 2015.
- 62 LUO, M.; TANG, G.; JU, J.; LU, L.; HUANG, H. A new diketopiperazine derivative from a deep sea-derived *Streptomyces* sp. SCSIO 04496. **Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters**. Doi:0.1080/14786419.2015.1045509.
- 63 KOHNO, J.; KOGUCHI, Y.; NISHIO, M.; NAKAO, K.; KURODA, M.; SHIMIZU, R.; OHNUKI, T.; KOMATSUBARA, S. Structure of TMC-95A-D: Novel proteasome inhibitors from *Apiospora montagnei* Sacc. TC 1093. **Journal of Organic Chemistry**, v. 65, p. 990-995, 2000.
- 64 GROLL, M.; BAJOREK, M.; KOHLER, A.; MORODER, L.; RUBIN, D. M. HUBER, R.; GLICKMAN, M. H.; FINLEY, D. A gated channel into the proteasome core particle. **Nature Structural and Molecular Biology**, v. 7, p. 1062-1067, 2000.
- 65 MOMOSE, I.; KAWADA, M. The therapeutic potential of microbial proteasome inhibitors. **International Immunopharmacology**, v. 37, p. 23-30, 2016.

66 HUANG, L.; CHEN, C. H. Proteasome regulators: activators and inhibitors. **Current Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 931-939, 2009.

67 MOORE, B. S.; EUSTÁQUIO, A. S.; MCGLINCHEY, R. P. Advances in and applications of proteasome inhibitors. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 12, p. 434-440, 2008.

68 YANG, H.; LANDIS-PIWOWAR, K. R.; CHEN, D.; MILACIC, V.; DOU, Q. P. Natural compounds with proteasome inhibitory activity for cancer prevention and treatment. **Current Protein and Peptide Science**, v. 9, p. 227-239, 2008.

69 SABOTIC, J.; KOS, J. Microbial and fungal protease inhibitors – current and potential applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, p. 1351-1375, 2012.

70 LEE, H.; GOLDBERG, A. L. Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. **Cell Biology**, v. 8, p. 397-403, 1998.

71 DOU, Q. P.; ZONDER, J. A. Overview of proteasome inhibitor-based anti-cancer therapies perspective on bortezomib and second-generation proteasome inhibition *versus* future generation inhibitors of Ubiquitin-Proteasome system. **Current Cancer Drugs Targets**, v. 14, p. 517-536, 2014.

72 MEENA, R. C.; CHAKRABARTI, A. Proteasome and its inhibitors from bacteria and fungi. **Journal of Bacteriology and Mycology**, v. 2, p. 1-2, 2016.

73 HANADA, K.; TAMAI, M.; YAMAGISHI, M.; OHMURA, S.; SAWADA, J.; TANAKA, I. Isolation and characterization of E-64, a new thiol protease inhibitor. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 42, p. 523-528, 1978.

74 MATSUMOTO, K.; MIZOUE, K.; KITAMURA, K.; TSE, W.; HUBER, C. P.; ISHIDA, T. Structural basis of inhibition of cysteine proteases by E-64 and its derivatives. **Peptide Science**, v. 51, p. 99-107, 1999.

75 HINES, J.; GROLL, M.; FARNESTOCK, M.; CREWS, C. M. Proteasome inhibition by fellutamide B induces never growth factor synthesis. **Chemistry and Biology**, v. 15, p. 501-512, 2008.

76 SINGH, S. B.; ONDEYKA, J. G.; TSIPOURAS, N.; RUBY, C.; SARDANA, V.; SCHULMAN, M.; SANCHEZ, M.; PELAEZ, F.; STHLHUT, M. W.; MUNSHI, S.; OLSEN, D. B.; LINGHAM, R. B. Hinnuliquinone, a C₂-symmetric dimeric non-peptide fungal metabolite inhibitor of HIV-1 protease. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 324, p. 108-113, 2004.

77 SARKER, S. D.; NAHAR, L. Methods in molecular biology. In: SARKER, S. D.; NAHAR, L. **Natural products isolation**. New York: Humana Press, 2012. Cap. 1, p. 1-24.

78 EBADA, S. S.; EDRADA, R. A.; LIN, W.; PROKSCH, P. Methods for isolation, purification and structural elucidation of bioactive secondary metabolites from marine invertebrates. **Nature Protocols**, v. 3, p. 1820-1831, 2008.

79 VENKATESWARLU, S.; PANCHAGNULA, G. K.; GURIAIAH, M. B.; SUBBARAJU, G. V. Isoaurostatin: total synthesis and structural revision. **Tetrahedron**, v. 61, p. 3013-3017, 2005.

80 MURAKAMI, S.; NAKATA, R.; ABOSHI, T.; YOSHINAGA, N.; TERAISHI, M.; OKUMOTO, Y.; ISHIHARA, A.; MORISAKA, H.; HUFFAKER, A.; SCHMELZ, E. A.; MORI, N.. Insect-induced daidzein, formononetin and their conjugates in soybean leaves. **Metabolites**, v. 4, p. 532-546, 2014.

81 HUANG, R.; DING, Z.; LONG, Y.; ZHAO, J.; LI, M.; CUI, X.; WEN, M.. A new isoflavone derivative from *Streptomyces* sp. YIM GS3536. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 48, p. 966-969, 2013.

82 YANG, J.; REN, X.; ZHANG, H.; HE, J.. New aldose reductase inhibitors N99-596 A and B from *Streptomyces*. **The Journal of Antibiotics**, v. 58, p. 737-739, 2005.

83 CHANG, T. S.; DING, H. Y.; TAI, S. S.; WU, C. Y.. Metabolism of the soy isoflavones daidzein and genistein by fungi used in the preparation of various fermented soybean foods. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v. 71, p. 1330-1333, 2007.

84 MEDINA, R. P. Bioprospecção das algas vermelhas *Asparagopsis taxiformis* e *Pyropia spiralis* e de seus fungos endofíticos: potencial antimicrobiano e citotóxico. 2016. 422f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - UNESP, Araraquara, 2016.

85 TALAPATRA, S. K.; KARMACHARYA, B.; DE, S. C.; TALAPATRA, B. (-)-Regiolone, na α -tetralone from *Juglans regia*: structure, stereochemistry and conformation. **Phytochemistry**, v.27, p. 3929-3932, 1988.

86 BURNETT, A. R.; THOMSON, R. H. Naturally occurring quinones. Part XIII. Anthraquinones and related naphthalenic compounds in *Galium* spp. and in *Asperula odorata*. **Journal of Chemical Society (C)**, p. 854-857, 1968.

87 FURTADO, N. A. J. C.; PUPO, M. T.; CARVALHO, I.; CAMPO, V. L.; DUARTE, M. C. T.; BASTOS, J. K. Diketopiperazines produced by the *Aspergillus funigatus* Brazilian strain. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, p. 1448-1453, 2005.

88 KOYAMA, K.; KURAMOCHI, D.; KINOSHITA, K.; TAKAHASHI, K. Hypoxylonols A and B, novel reduced benzo[j]fluoranthene derivatives from the mushroom *Hypoxylon truncatum*. **Journal of Natural Products**, v. 65, p. 1489-1490, 2002.

89 FUKAI, M.; TSUKADA, M.; MIKI, K.; SUZUKI, T.; SUGITA, T.; KINOSHITA, K.; TAKAHASHI, K.; SHIRO, M.; KOYAMA, K. Hypoxylonols C-F, benzo[j]fluoranthenes from *Hypoxylon truncatum*. **Journal of Natural Products**, v. 75, p. 22-25, 2012.

90 GU, W.; GE, H. M.; SONG, Y. C.; DING, H.; ZHU, H. L.; ZHAO, X. A.; TAN, R. X. Cytotoxic benzo[j]fluoranthene metabolites from *Hypoxylon truncatum* IFB-18, an endophyte of *Artemisia annua*. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 114-117, 2007.

91 LIU, Y.; STUHLREIER, F.; KURTÁN, T.; MÁNDI, A.; ARUMUGAM, S.; LIN, W.; STORK, B.; WESSELBORG, S.; WEBER, H.; HENRICH, B.; DALETOS, G.; PROKSCH, P. Daldinone derivatives from the mangrove-derived endophytic fungus *Annulohypoxylon* sp.. **Royal Society of Chemistry Advances**, v. 7, p. 5381-5393, 2017.

92 WANG, G.; FAN, J.; ZHANG, W.; HUA, C.; CHEN, C.; YAN, W.; GE, H.; JIAO, R.; TAN, R. Polyketides from mantis-associated fungus *Daldinia eschscholzii* IFB-TL01. **Chemistry and Biodiversity**, v. 12, p. 1349-1354, 2015.

93 ZHANG, Y. L.; ZHANG, J.; JIANG, N.; LU, Y. H.; WANG, L.; XU, S. H.; WANG, W.; ZHANG, G. F.; XU, Q.; GE, H. M.; SONG, Y. C.; TAN, R. X. Immunosuppressive polyketides from mantis-associated *Daldinia eschscholzii*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 133, p. 5931-5940, 2011.

94 EDWARDS, R. L.; LOCKETT, H. J. J. Constituents of the higher fungi. Part XVI. Bulgarhodin and Bulgarein, novel benzofluoranthenequinones from the fungus *Bulgaria inquinans* (Fries). **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1**, v. 20, p. 2149-2155, 1976.

95 WRIGLEY, S. K.; AINSWORTH, A. M.; KAU, D. A.; MARTIN, S. M.; BAHL, S.; TANG, J. S.; HARDICK, D. J.; RAWLINS, P.; SADHEGHI, R.; MOORE, M. J. Novel reduced benzo[j]fluoranthene-3-ones from *Cladosporium* cf. *cladosporioides* with cytokine production and tyrosine kinase inhibitory properties. **The Journal of Antibiotics**, v. 54, p. 479-488, 2001.

- 96 DU, L.; KING, J. B.; CICHEWICZ, R. H. Chlorinated polyketide obtained from a *Daldinia* sp. treated with the epigenetic modifier suberoylanilide hydroxamic acid. **Journal of Natural Products**, v. 77, p. 2454-2458, 2014.
- 97 STADLER, M. Important of secondary metabolites in the Xylariaceae as parameters for assessment of their taxonomy, phylogeny, and functional biodiversity. **Current Research in Environmental and Applied Mycology**, v. 1, p. 75-133, 2011.
- 98 ZHANG, Y. L.; GE, H. M.; ZHAO, W.; DONG, H.; XU, Q.; LI, S. H.; LI, J.; ZHANG, J.; SONG, Y. C.; TAN, R. X. Unprecedented immunosuppressive polyketides from *Daldinia eschscholzii*, a mantis-associated fungus. **Angewandte Chemie**, v. 47, p. 5823-5826, 2008.
- 99 BARNES, E. C.; JUMPATHONG, J.; LUMYONG, S.; VOIGT, K.; HERTWECK, C. Daldionin, an unprecedented binaphthyl derivative, and diverse polyketide congeners from a fungal orchid endophyte. **Chemistry a European Journal**, v. 22, p. 4551-4555, 2016.
- 100 SETO, H.; SATO, T.; URANO, S.; UZAWA, J.; YONEHARA, H. Utilization of ^{13}C - ^{13}C coupling in structural and biosynthetic studies. vii. The structure and biosynthesis of vulgamycin. **Tetrahedron Letters**, v. 17, p. 4367-4370, 1976.
- 101 JULIEN, B.; TIAN, Z.-Q.; REID, R.; REEVES, C. D. Analysis of the ambruticin and jerangolid gene clusters of *Sorangium cellulosum* reveals unusual mechanisms of polyketide biosynthesis. **Chemistry and Biology**, v. 13, p. 1277-1286, 2006.

ANEXO A

Figura 95 - Espectro gHSQC do composto rousoellatídeo **33**, obtido em DMSO- d_6 (600 MHz).

Figura 97 – Espectro tROESY do composto rousoellatídeo **33** em DMSO- d_6 (600 MHz).

Figura 98 - Espectro de RMN ^{13}C do composto **33** em $\text{MeOH-}d_4$ + benzeno- d_6 (150 MHz).

Figura 99 - Espectro de RMN ^{13}C do composto **33** marcado com $[1-^{13}\text{C}]$ acetato em $\text{MeOH-}d_4$ + benzeno- d_6 (150 MHz).

Figura 100 - Espectro de RMN ^{13}C do composto **33** marcado com $[1,2-^{13}\text{C}]$ acetato em $\text{MeOH-}d_4$ + benzeno- d_6 (150 MHz).

Figura 101 - Espectro de RMN ^{13}C do composto **33** marcado com [metil- ^{13}C]metionina em $\text{MeOH-}d_4$ + benzeno- d_6 (150 MHz).

Figura 102 – Espectro INADEQUATE do composto **33** marcado com o precursor $[1,2-^{13}\text{C}]$ acetato em $\text{MeOH-}d_4$ + benzeno- d_6 (600 MHz).

Figura 103 - Espectro gCOSY do composto **36** em MeOH- d_4 (600 MHz).

Figura 104 – Espectro gHSQC do composto **36** em MeOH- d_4 (600 MHz).

Figura 105 – Espectro gHMBC do composto **36** em MeOH- d_4 (600 MHz).

Figura 106 – Expansão do espectro de HMBC do composto **36** em MeOH- d_4 (600 MHz).

Figura 107 – Espectro de massas de alta resolução do composto **36**.

Figura 108 – Espectro de massas de alta resolução do composto **43**.

Figura 109 – Espectro de massas de alta resolução do composto **44**.

Figura 110 – Espectro gCOSY do composto **43**, obtido em DMSO- d_6 (600 MHz).

Figura 111 – Espectro de HSQC do composto **43**, obtido em DMSO- d_6 (600 MHz).

Figura 112 - Espectro de gHMBC do composto **43**, obtido em DMSO- d_6 (600 MHz).

Figura 113 – Expansão I do espectro de gHMBC do composto **43**, obtido em DMSO- d_6 (600 MHz).

Figura 114 – Expansão II do espectro de gHMBC do composto **43**, obtido em DMSO- d_6 (600 MHz).

Figura 115 – Espectro de massas de alta resolução do composto **49**.

Figura 116 - Espectro de massas de alta resolução do composto **50**.

Figura 117 – Espectro de massas de alta resolução do composto **52**.

Figura 118 – Espectro de massas de alta resolução do composto **53**.

Figura 119 - Espectro de gCOSY do composto **57**, obtido em DMSO- d_6 (600 MHz).

Figura 120 - Espectro de HSQC do composto **57**, obtido em DMSO- d_6 (600 MHz).

Figura 121 - Espectro de gHMBC do composto **57**, obtido em DMSO- d_6 (600 MHz).

Figura 122 – Expansão do espectro de gHMBC do composto **57**, obtido em DMSO- d_6 (600 MHz).

Figura 123 – Expansão do espectro de gHMBC do composto **57**, obtido em DMSO- d_6 (600 MHz).

Figura 124 – Expansão do espectro de gHMBC do composto **57**, obtido em DMSO- d_6 (600 MHz).

Figura 125 - Espectro de massas de alta resolução do composto **55**.

Figura 126 - Espectro de massas de alta resolução do composto **54**.

Figura 127 - Espectro de massas de alta resolução do composto **56**.

Figura 128 - Espectro de massas de alta resolução do composto **57**.