UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

Karen de Jesus Nicácio

**Isolamento e identificação de metabólitos produzidos por linhagens de
microrganismos do ambiente marinho.**

Volume 1

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

Área de concentração: Química Orgânica e Biológica

Orientador: Prof. Dr. Roberto Gomes de Souza Berlinck

São Carlos

2017

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família, em especial à minha mãe, pelo apoio incondicional dedicado a todas as etapas de minha vida.

E, ao Odilon, pela compreensão e dedicação constante.

AGRADECIMENTOS

Ao orientador, Prof. Dr. Roberto G. S. Berlinck, pela atenção e paciência durante a realização deste trabalho que muito contribuiu para meu crescimento científico e intelectual.

Ao Prof. Dr. Fabiano L. Thompson (DG-IB-UFRJ), pela concessão das linhagens bacterianas.

À Prof. Dra. Lara D. Sette (CPQBA-UNICAMP), pela identificação da linhagem fúngica estudada.

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

Ao Prof. Dr. Vitor M. Deflon, e aos técnicos: Fabiana, Karin, André, Silvana, Aldimar, Guilherme (IQSC-USP) e José Tomaz (NPPNS-FCFRP-USP), pelo auxílio na obtenção de dados espectroscópicos.

À Prof. Dr. Sonia Jancar (ICB-USP) e seu aluno Ildefonso A. Silva Jr., pela realização dos bioensaios de inibição do PAF-R.

Ao Instituto de Química de São Carlos, pela infraestrutura disponibilizada.

À Silvia e à Andréia, da seção de pós-graduação, pela atenção.

À CAPES, pela bolsa de estudos concedida.

Aos amigos e colegas alunos e ex-alunos do Grupo QOSBio – IQSC: Karin, Fabiana, Miriam, Fábio, Eli, Marcos, Messias, Mário, Stela, Raquel, Laura, Julie, Ivan, Lizbeth, Mirele, Renata, Ariane, Vitor, Jairo, Juliano, Juliana e Luciane pelos anos de convivência que contribuíram para meu crescimento profissional e pessoal.

Aos amigos e familiares queridos, pelo apoio, companheirismo e bons momentos vividos ao longo desses anos.

À Deus pela minha existência e oportunidade de viver tudo isso.

RESUMO

NICÁCIO, Karen de Jesus. **Isolamento e identificação de metabólitos produzidos por linhagens de microrganismos do ambiente marinho**. 2017. 275 p. Tese (Doutorado Química Orgânica e Biológica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.

A investigação de produtos naturais tem sido cada vez mais direcionada para o estudo de microrganismos, com destaque para aqueles do ambiente marinho. Neste trabalho foram estudadas linhagens bacterianas isoladas de tecidos da esponja *Arenosclera brasiliensis*, como parte de um estudo que tinha o objetivo de encontrar novas moléculas bioativas. O cultivo da linhagem bacteriana *Pseudovibrio denitrificans* Ab134 permitiu o isolamento e identificação de três compostos derivados de dibromotirosina, a fistularina-3 (**26**), o ácido verongidoico (**27**) e a 11-hidroxiaerotionina (**28**). Outros cinco compostos derivados de dibromotirosina foram detectados, em frações ainda impuras, através de análises por CLUE-qTOF e tiveram suas estruturas propostas de acordo com os íons de fragmentação observados no espectro de EMAR: aerotionina (**29**), um éster do ácido purpurocerático B (**30**), purealidina L (**31**) e aplisinamisina II (**32**). Este é o primeiro relato da produção dos derivados de dibromotirosina a partir de uma linhagem bacteriana e representa um forte indício de que tais compostos, comumente isolados de esponjas, são na verdade produzidos pela microbiota associada destes animais. O cultivo da linhagem fúngica *Biatrispora* sp. permitiu o isolamento e identificação de nove compostos diterpênicos da classe das fomactinas, sendo seis deles inéditos. As fomactinas são conhecidas por apresentarem potente atividade como inibidoras de receptores do PAF. As fomactinas S, P, U e I apresentaram bons resultados na inibição da ligação do PAF aos seus receptores. As fomactinas S e P foram também avaliadas em ensaio de re-população tumoral pós irradiação e foram capazes de inibir o fenômeno de re-população em concentração molar equivalente a antagonistas comerciais. Tal resultado sugere que a associação da radioterapia com antagonistas do PAF-R pode ser uma nova e eficiente alternativa terapêutica para inibição do crescimento de tumores.

Palavras-chaves: Metabólitos secundários, bactérias, fungos, ambiente marinho, fomactinas, derivados de dibromotirosina.

ABSTRACT

NICÁCIO, Karen de Jesus. **Isolation and identification of metabolites produced by strains of microorganisms from the marine environment**. 2017. 275 p. Thesis (PhD in Organic and Biological Chemistry) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.

Research on natural products is increasingly focusing on the study of microorganisms, especially those from the marine environment. In the present investigation, bacterial strains isolated from tissues of the sponge *Arenosclera brasiliensis* were studied in order to find new bioactive molecules. Cultivation of the bacterial strain *P. denitrificans* allowed the isolation and identification of three dibromotyrosine-derived compounds: fistularin-3 (**26**), verongidoic acid (**27**) and 11-hydroxyaerotherionin (**28**). Another five dibromotyrosine-derived compounds were detected in still impure fractions by UPLC-qTOF analysis and had their structures proposed according to the fragmentation ions observed in the HRMS spectrum: aerotherionin (**29**), the methyl ester of purpuroceric acid B (**30**), purealidin L (**31**) and aplisinamysin II (**32**). This is the first report of the production of dibromotyrosine derivatives by a bacterial strain and represents a strong indication that such compounds, commonly isolated from sponges, are actually produced by the associated microbiota of these animals. Cultivation of the fungal strain *Biatriospora* sp. allowed the isolation and identification of nine phomactin diterpenes, six of which are new. Phomactins are known as inhibitors of PAF receptors. Phomactins S, P, U and I have shown good results in inhibiting the binding of PAF to their receptors. The phomactins S and P were also evaluated in the post-irradiation tumor re-population assay and were able to inhibit the re-population phenomenon at micromolar concentration equivalent to commercial antagonists. Such a result suggests that the association of radiotherapy with PAF-R antagonists may be a new and efficient therapeutic alternative in tumors.

Keywords: Secondary metabolites, bacteria, fungi, marine environment, phomactins, dibromotyrosine derivatives.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Metabólitos isolados de bactérias associadas à esponjas.....	19
Figura 2: Metabólitos isolados de fungos do ambiente marinho.....	20
Figura 3: Gráfico PCA dos dados adquiridos por CL-EM de onze extratos obtidos de diferentes métodos de cultivo da linhagem <i>Aspergillus terreus</i> (adaptado de ADPRESSA <i>et al.</i> , 2016)....	21
Figura 4: Metabólitos isolados no grupo QOSBio-IQSC.....	22
Figura 5: Metabólitos isolados <i>Vibrio</i> sp.....	23
Figura 6: Fluxogramas das separações cromatográficas da fração Ab134-C.....	30
Figura 7: Cromatograma de separação da fração Ab134-C23, monitorado no comprimento de onda de 254 nm.....	31
Figura 8: Fluxograma de separação da fração Ab134-FI.....	31
Figura 9: Cromatograma de separação da fração Ab134-FI13, monitorado no comprimento de onda de 254 nm.	32
Figura 10: Cromatograma de separação da fração Ab134-FI13-B, monitorado no comprimento de onda de 254 nm.....	33
Figura 11: Cromatograma de separação da fração Ab134-FI13-E, monitorado no comprimento de onda de 254 nm.....	33
Figura 12: Fluxograma da separação cromatográfica do extrato MeOH obtido do meio de cultura da linhagem fúngica D8.....	34
Figura 13: Cromatograma de separação da fração D8-M2, monitorado no comprimento de onda de 254 nm.....	35
Figura 14: Cromatograma de separação da fração D8-M2B, monitorado no comprimento de onda de 254 nm.....	35
Figura 15: Cromatograma de separação da fração D8-M2B, monitorado no comprimento de onda de 254 nm.....	36
Figura 16: Cromatograma de separação da fração D8-M2F, monitorado no comprimento de onda de 254 nm.....	36
Figura 17: Cromatograma de separação da fração D8-M3, monitorado no comprimento de onda de 254 nm.....	37
Figura 18: Cromatograma de separação da fração D8-M3B, monitorado no comprimento de onda de 254 nm.....	37
Figura 19: Cromatograma de separação da fração D8-M3D, monitorado no comprimento de onda de 254 nm.....	38

Figura 20: Cromatograma de separação da fração D8-M3E, monitorado no comprimento de onda de 254 nm.....	38
Figura 21: Cromatograma de separação da fração D8-M3F, monitorado no comprimento de onda de 254 nm.....	39
Figura 22: Fluxogramas da separação cromatográfica da fração D8-Ac-M4.....	40
Figura 23: Cromatograma de separação da fração D8-Ac-M4C, monitorado no comprimento de onda de 254 nm.....	40
Figura 24: Cromatograma de separação da fração D8-Ac-M4C24, monitorado no comprimento de onda de 254 nm.....	41
Figura 25: Cromatograma de separação da fração D8-Ac-M4C24B, monitorado no comprimento de onda de 220 nm.....	41
Figura 26: Fluxogramas da separação cromatográfica da fração D8-R.....	42
Figura 27: Cromatograma de separação da fração D8-R5, monitorado no comprimento de onda de 254 nm.....	43
Figura 28: Cromatograma de separação da fração D8-R5-C, monitorado no comprimento de onda de 254 nm.....	43
Figura 29: Cromatograma de separação da fração D8-R9, monitorado no comprimento de onda de 254 nm.....	44
Figura 30: Cromatograma de separação da fração D8-R9-B, monitorado no comprimento de onda de 254 nm.....	44
Figura 31: Cromatograma de separação da fração D8-R9-B2, monitorado no comprimento de onda de 254 nm.....	45
Figura 32: Cromatograma de separação da fração D8-R9-C, monitorado nos comprimentos de ondas de 254 (a) e 360 nm (b).....	46
Figura 33: Cromatograma de separação da fração D8-R9-C2, monitorado no comprimento de onda de 254 nm.....	46
Figura 34: Cromatograma de separação da fração D8-R9-C3, monitorado no comprimento de onda de 254 nm.....	47
Figura 35: Cromatograma de separação da fração D8-R9-D, monitorado no comprimento de onda de 254 nm.....	47
Figura 36: Perfil metabólico do experimento descrito na seção 3.2.1 item I (Cultivo em meio líquido Marine Broth, seguido de extração do meio de cultura com AcOEt). Método de análise CLAE-UV-EM: Coluna e eluição conforme descrito na seção 3.1.1. (Cromatograma de UV, λ = 254 nm).....	50

Figura 37: Perfil metabólico do experimento descrito na seção 3.2.1 item II (Cultivo em meio líquido Marine Broth, seguido de adição da mistura de resinas e extração da mistura de resinas com MeOH e acetona). Método de análise CLAE-UV-EM: Coluna e eluição conforme descrito na seção 3.1.1. (Cromatograma de UV, $\lambda = 254$ nm).....	50
Figura 38: Perfil metabólico do experimento descrito na seção 3.2.1 item III (Cultivo em meio líquido Marine Broth + mistura de resinas, seguido de extração da mistura de resinas com MeOH e acetona). Método de análise CLAE-UV-EM: Coluna e eluição conforme descrito na seção 3.1.1. (Cromatograma de UV, $\lambda = 254$ nm).....	51
Figura 39: Frascos Schott contendo camada de biofilme formado durante o período de cultivo da linhagem <i>P. denitrificans</i> Ab134 no meio de cultura Marine Broth.....	52
Figura 40: Espectros de massas de baixa resolução dos compostos com íons $[M+H]^+$ 538,3 e 488,3 observados para o extrato obtido do meio de cultura da linhagem bacteriana <i>E. montiporae</i> MC 227.....	52
Figura 41: Espectros de massas de baixa resolução dos compostos com íons $[M+H]^+$ 656,8 / 658,8 / 660,8 e 494,0 / 496,0 / 498,0 observados na fração Ab134-I.....	53
Figura 42: Compostos isolados do meio de cultura da linhagem bacteriana <i>P. denitrificans</i> Ab134.....	54
Figura 43: Compostos detectados no meio de cultura da linhagem bacteriana <i>P. denitrificans</i> Ab134.....	54
Figura 44: Espectro de massas de alta resolução (ESI+) da fistularina-3 (26 , fração Ab134-C23C).....	55
Figura 45: Espectro de absorção no UV da fistularina-3 (26 , fração Ab134-C23C, MeOH)....	56
Figura 46: Estrutura da fistularina-3 (26 , fração Ab134-C23C).....	57
Figura 47: Correlações COSY (—) e HMBC (→) observadas para a fistularina-3 (26 , fração Ab134-C23C).....	58
Figura 48: Espectro de dicroísmo circular da fistularina-3 (26 , fração Ab134-C23C) (MeOH, $c = 0.1$ mg/mL).....	60
Figura 49: Espectro de massas de alta resolução (ESI+) do ácido verongidoico (27 , fração Ab134- FI123-B2).....	61
Figura 50: Espectro de absorção no UV do ácido verongidoico (27 , fração Ab134-FI13-B2, MeOH).....	62
Figura 51: Estrutura do ácido verongidoico (27 , fração Ab134- FI13-B2).....	63

Figura 52: Correlações COSY (—) e HMBC (→) observadas para o ácido verongidoico (27, fração Ab134-FI13-B2).....	63
Figura 53: Espectro de dicroísmo circular do ácido verongidoico (27, fração Ab134- FI13-B2) (MeOH, c = 0.1 mg/mL).....	65
Figura 54: Espectro de massas de alta resolução (ESI+) da 11-hidroxiaerotionina (28, fração Ab134-FI13-E2).....	66
Figura 55: Espectro de absorção no UV da 11-hidroxiaerotionina (28, fração Ab134- FI13-E2, MeOH).....	66
Figura 56: Estrutura da 11-hidroxiaerotionina (28, fração Ab134- FI13-E2).....	67
Figura 57: Correlações COSY (—) e HMBC (→) observadas para a 11-hidroxiaerotionina (28, fração Ab134- FI13-E2).....	68
Figura 58: Espectro de dicroísmo circular da 11-hidroxiaerotionina (28, fração Ab134-FI13-E2) (MeOH, c = 0.1 mg/mL).....	70
Figura 59: Espectro CLUE-qTOF da aerotionina (29).....	71
Figura 60: Esquema de fragmentação observada para a aerotionina (29).....	71
Figura 61: Espectro CLUE-qTOF do éster metílico do ácido purpurocerático B (30).....	72
Figura 62: Esquema de fragmentação observada para o éster metílico do ácido purpurocerático B (30).....	72
Figura 63: Espectro CLUE-qTOF da purealidina L (31).....	73
Figura 64: Esquema de fragmentação observada para a purealidina (31).....	74
Figura 65: Espectro CLUE-qTOF da aplisinamisina II (32).....	75
Figura 66: Esquema de fragmentação observada para a aplisinamisina II (32).....	75
Figura 67: Biotransformação da aerofobina-2 em dienona. (Figura adaptada de PROKSCH <i>et al.</i> , 2010).....	76
Figura 68: Espectro de absorções no UV obtido para a descarboxicitrinona (54, fração D8-M3D2, MeOH).....	82
Figura 69: Espectros de massas de baixa resolução (ESI), no modo positivo e negativo respectivamente, obtidos para a descarboxicitrinona (54, fração D8-M3D2).....	82
Figura 70: Estrutura da descarboxicitrinona (54, fração D8-M3D2).....	83
Figura 71: Espectro de massas de alta resolução (ESI+) da fomactina R (55, fração D8-M2F2).....	84
Figura 72: Espectro de absorções no UV da fomactina R (55, Fração D8-M2F2, MeOH).....	85
Figura 73: Espectro de absorções no IV da fomactina R (55, Fração D8-M2F2, MeOH).....	85

Figura 74: Estrutura da fomactina R (55 , Fração D8-M2F2).....	91
Figura 75: Espectro de dicroísmo circular obtido para a fomactina R (55 , MeOH, fração D8-M2F2).....	91
Figura 76: Fomactinas isoladas do meio de cultura da linhagem fúngica <i>Biatrispora</i> sp. D8..	93
Figura 77: Espectro de massas de alta resolução (ESI+) da fomactina Q (56 , fração D8-Ac-M4C24-B2).....	94
Figura 78: Espectro de absorções no UV da fomactina Q (56 , Fração D8-Ac-M4C24-B2, MeOH).....	95
Figura 79: Espectro de absorções no IV da fomactina Q (56 , Fração D8-Ac-M4c24-B2, MeOH).....	95
Figura 80: Estrutura da fomactina Q (56 , Fração D8-Ac-M4C24-B2).....	100
Figura 81: Espectro de dicroísmo circular obtido para a fomactina Q (56 , MeOH, fração D8-Ac-M4C24-B2).....	100
Figura 82: Espectro de massas de alta resolução (ESI+) da fomactina S (57 , fração D8-R5-C1).....	102
Figura 83: Espectro de absorções no UV da fomactina S (57 , Fração D8-R5-C1, MeOH).....	103
Figura 84: Espectro de absorções no IV da fomactina S (57 , Fração D8-R5-C1, pastilha de silício).....	103
Figura 85: Representação ORTEP da estrutura da fomactina S (57 , fração D8-R5-C1) obtido por difração de Raios-X.....	108
Figura 86: Estrutura da fomactina S (57 , Fração D8-R5-C1).....	109
Figura 87: Espectro de dicroísmo circular obtido para a fomactina S (57 , MeOH, fração D8-R5-C1).....	109
Figura 88: Espectro de massas de alta resolução (ESI+) da fomactina T (58 , fração D8-R9-B2A).....	111
Figura 89: Espectro de absorções no UV da fomactina T (58 , Fração D8-R9-B2A, MeOH)..	112
Figura 90: Estrutura da fomactina T (58 , Fração D8-R9-B2A).....	117
Figura 91: Espectro de dicroísmo circular obtido para a fomactina T (58 , MeOH, fração D8-R9-B2A).....	117
Figura 92: Espectro de massas de alta resolução (ESI+) da fomactina U (59 , Fração D8-R9-C2A).....	119
Figura 93: Espectro de absorções no UV da fomactina U (59 , Fração D8-R9-C2A, MeOH)..	120
Figura 94: Espectro de absorções no IV da fomactina U (59 , Fração D8-R9-C2A, pastilha de silício).....	120

Figura 95: Estrutura da fomactina U (59 , Fração D8-R9-C2A).....	125
Figura 96: Espectro de dicroísmo circular obtido para a fomactina U (59 , MeOH, fração D8-R9-C2A).....	125
Figura 97: Espectro de massas de alta resolução (ESI+) da fomactina V (60 , Fração D8-R9-C3A).....	127
Figura 98: Espectro de absorções no UV da fomactina V (60 , Fração D8-R9-C3A, MeOH)..	128
Figura 99: Espectro de absorções no IV da fomactina V (60 , Fração D8-R9-C3A, pastilha de silício).....	128
Figura 100: Estrutura da fomactina V (60 , Fração D8-R9-C3A).....	133
Figura 101: Espectro de dicroísmo circular obtido para a fomactina V (60 , MeOH, fração D8-R9-C3A).....	133
Figura 102: Espectro de massas de alta resolução (ESI+) da fomactina P (61 , Fração D8-R5-C2).....	135
Figura 103: Espectro de absorções no UV da fomactina P (61 , Fração D8-R5-C2, MeOH)...	136
Figura 104: Espectro de absorções no IV da fomactina P (61 , Fração D8-R5-C2, pastilha de silício).....	136
Figura 105: Correlações COSY (—) e HMBC (→) observadas para a fomactina P (61 , Fração D8-R5-C2).....	138
Figura 106: Estrutura da fomactina P (61 , Fração D8-R5-C2).....	142
Figura 107: Espectro de dicroísmo circular obtido para a fomactina P (61 , MeOH, fração D8-R5-C2).....	142
Figura 108: Espectro de massas de alta resolução (ESI+) da fomactina F (62 , Fração D8-R9-C2B).....	143
Figura 109: Espectro de absorções no UV da fomactina F (62 , Fração D8-R9-C2B, MeOH).	144
Figura 110: Espectro de absorções no IV da fomactina F (62 , Fração D8-R9-C2B, pastilha de silício).....	144
Figura 111: Correlações COSY (—) e HMBC (→) observadas para a fomactina F (62 , Fração D8-R9-C2B).....	146
Figura 112: Estrutura da fomactina F (62 , Fração D8-R9-C2B).....	150
Figura 113: Espectro de dicroísmo circular obtido para a fomactina F (62 , MeOH, fração D8-R9-C2B).....	150
Figura 114: Espectro de massas de alta resolução (ESI+) da fomactina I (63 , Fração D8-R9-D4).....	151

Figura 115: Espectro de absorções no UV da fomactina I (63 , Fração D8-R9-D4, MeOH)....	152
Figura 116: Espectro de absorções no IV da fomactina I (63 , Fração D8-R9-D4, pastilha de silício).....	152
Figura 117: Correlações COSY (—) e HMBC (→) observadas para a fomactina I (63 , Fração D8-R9-D4).....	154
Figura 118: Estrutura da fomactina I (62 , Fração D8-R9-D4).....	158
Figura 119: Espectro de dicroísmo circular obtido para a fomactina I (63 , MeOH, fração D8-R9-D4).....	158
Figura 120: Metabólitos da classe das fomactinas.....	160
Figura 121: Esquema de formação biossintética das fomactinas e taxol (TOKIWANO <i>et al.</i> , 2005).....	161
Figura 122: Fomactinas avaliadas em bioensaios de inibição <i>In Vitro</i> de inibição do PAF.....	164
Figura 123: Efeito de antagonistas comerciais na re-população pós irradiação (doses de 4 e 8 Gy) de células tumorais TC-1.....	166
Figura 124: Efeito das fomactinas S e P na re-população pós irradiação (doses de 4 e 8 Gy) de células tumorais TC-1.....	166

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Linhagens de bactérias isoladas da esponja <i>A. brasiliensis</i>	28
Tabela 2: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da fistularina-3 (26 , Ab134-C23C).....	59
Tabela 3: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do ácido verongidoico (27 , Ab134-FI13-B2).....	64
Tabela 4: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da 11-hidroxiaerotionina (28 , Ab134- FI13-E2).....	69
Tabela 5: Comparação dos valores de deslocamento químico de sinais de hidrogênios nos espectros de RMN de ^1H obtidos nesse trabalho e na literatura.....	83
Tabela 6: Correlações observadas no espectro NOESY obtido para fomactina R (55 , Fração D8-M2F2).....	90
Tabela 7: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (^1H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz, DMSO- d_6) da fomactina R (55 , Fração D8-M2F2).....	92
Tabela 8: Correlações observadas no espectro NOESY obtido para fomactina Q (56 , Fração D8-Ac-M4C24-B2).....	99
Tabela 9: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (^1H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz, DMSO- d_6) da fomactina Q (56 , Fração D8-Ac-M4C24-B2).....	101
Tabela 10: Correlações observadas no espectro NOESY obtido para fomactina S (57 , Fração D8-R5C1).....	107
Tabela 11: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (^1H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz, MeOH- d_4) da fomactina S (57 , Fração D8-R5-C1).....	110
Tabela 12: Correlações observadas no espectro NOESY obtido para fomactina T (58 , Fração D8-R9B2A).....	116
Tabela 13: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (^1H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz, MeOH- d_4) da fomactina T (58 , Fração D8-R9-B2A).....	118
Tabela 14: Correlações observadas no espectro NOESY obtido para fomactina U (59 , Fração D8-R9C2A).....	124
Tabela 15: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (^1H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz, DMSO- d_6) da fomactina U (59 , Fração D8-R9-C2A).....	126
Tabela 16: Correlações observadas no espectro NOESY obtido para fomactina V (60 , Fração D8-R9C3A).....	132
Tabela 17: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (^1H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz, DMSO- d_6) da fomactina V (60 , Fração D8-R9-C3A).....	134
Tabela 18: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da fomactina P (61 , Fração D8-R5-C2).....	139

Tabela 19: Correlações observadas no espectro NOESY obtido para fomactina P (61 , Fração D8-R5C2).....	141
Tabela 20: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da fomactina F (62 , Fração D8-R9-C2B).....	147
Tabela 21: Correlações observadas no espectro NOESY obtido para fomactina F (62 , Fração D8-R9C2B).....	149
Tabela 22: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da fomactina I (63 , Fração D8-R9-D4)	155
Tabela 23: Correlações observadas no espectro NOESY obtido para fomactina I (63 , Fração D8-R9D4).....	157
Tabela 24: Ensaios de inibição do PAF por fomactinas (adaptado de CIESIELSKI & FRONTIER, 2014).....	163

LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS

[α]_D	Rotação Óptica
AcOEt	Acetato de Etila
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CH₂Cl₂	Diclorometano
CLAE-UV-EM	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Ultravioleta e Espectrometria de Massas
CL-EM	Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas
CLUE-qTOF-EM	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplado à Espectrometria de Massas com analisador híbrido quadrupolo-tempo de voo
COSY	Correlation Spectroscopy
DC	Dicroísmo circular
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNP	Dictionary of Natural Products
EMAR	Espectometria de Massas de Alta Resolução
ESI	<i>Electrospray ionization</i>
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Coherence Spectroscopy
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence Spectroscopy
IC₅₀	Concentração inibitória 50%
IDH	índice de deficiência de hidrogênios
IV	Infravermelho
<i>J</i>	constante de acoplamento
<i>m/z</i>	razão massa/carga
MeCN	Acetonitrila
MeOH	Metanol
NOESY	Nuclear Overhauser Spectroscopy
OSMAC	<i>One Strain, Many Compounds</i>
QOSBio	Grupo de Química Orgânica e Sistemas Biológicos
RMN de ¹H/¹³C	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio/Carbono
δ	Deslocamento químico
λ	Comprimento de onda

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1. Justificativa.....	21
2. OBJETIVOS.....	24
2.1. Geral.....	24
2.2. Específicos.....	24
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1. Generalidades.....	25
3.1.1. Técnicas espectroscópicas.....	26
3.2. Estudo químico da linhagem bacteriana <i>Pseudovibrio denitrificans</i> (Ab134).....	27
3.2.1. Seleção da linhagem bacteriana.....	28
3.2.2. Isolamento e identificação de metabólitos produzidos pela bactéria <i>Pseudovibrio denitrificans</i> (Ab134).....	30
3.3. Estudo químico da linhagem fúngica <i>Biatriospora</i> sp. (D8).....	33
3.3.1. Cultivo da linhagem fúngica <i>Biatriospora</i> sp. (D8) em 10 L de meio de cultura.....	34
3.3.2. Cultivo da linhagem fúngica <i>Biatriospora</i> sp. (D8) em 20 L de meio de cultura.....	39
3.3.3. Ensaio de inibição do PAF-R.....	48
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
4.1. Estudo químico da linhagem bacteriana <i>Pseudovibrio denitrificans</i> (Ab134).....	49
4.1.1. Isolamento e identificação da fistularina-3 (26 , fração Ab134-C23C).....	55
4.1.2. Isolamento e identificação do ácido verongidoico (27 , fração Ab134-FI13-B2).....	61
4.1.3. Isolamento e identificação da hidroxiaerotionina (28 , fração Ab134-FI13-E2).....	65
4.1.4. Outros derivados da dibromotirosina.....	70
4.2. Estudo químico da linhagem fúngica <i>Biatriospora</i> sp. (D8).....	81
4.2.1. Isolamento de metabólitos produzidos por <i>Biatriospora</i> sp. (D8) após cultivo em 10 L de meio de cultura.....	81
4.2.1.1. Isolamento e identificação da descarboxicitrinona (54 , fração D8-M3D2).....	81

4.2.1.2.	Identificação da fomactina R (55 , fração D8-M2F2).....	83
4.2.1.3.	Frações D8-M2B2, D8-M2D2, D8-M3B2, D8-M3E3, D8-M3E4 e D8-M3F4.....	93
4.2.2.	Cultivo da linhagem fúngica <i>Biatrispora</i> sp. (D8) em 20 L de meio de cultura.....	93
4.2.2.1.	Identificação da fomactina Q (56 , fração D8-Ac-M4C24-B2).....	93
4.2.2.2.	Identificação da fomactina S (57 , fração D8-R5-C1).....	102
4.2.2.3.	Identificação da fomactina T (58 , fração D8-R9-B2A).....	111
4.2.2.4.	Identificação da fomactina U (59 , fração D8-R9-C2A).....	119
4.2.2.5.	Identificação da fomactina V (60 , fração D8-R9-C3A).....	127
4.2.2.6.	Identificação da fomactina P (61 , fração D8-R5-C2).....	135
4.2.2.7.	Identificação da fomactina F (62 , fração D8-R9-C2B).....	143
4.2.2.8.	Identificação da fomactina I (63 , fração D8-R9-D4).....	151
4.2.3.	Ensaio de inibição do PAF-R.....	162
5.	CONCLUSÃO.....	167
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	169

1. INTRODUÇÃO

A investigação de produtos naturais tem sido cada vez mais direcionada para o estudo de microrganismos, com destaque para aqueles do ambiente marinho. Mais de 500 novos compostos isolados de microrganismos marinhos foram relatados em 2015, um aumento de 17% em relação a 2014 (BLUNT *et al.*, 2017). Estes metabólitos apresentam diversas atividades biológicas, como atividades citotóxica, anti-inflamatória, antimicrobiana, antiviral, entre outras.

O cultivo de microrganismos associados à macrorganismos marinhos possibilita o melhor entendimento sobre a origem de compostos comumente isolados de tecidos dos macrorganismos. Quando tais compostos podem ser isolados do meio de cultivo de microrganismos associados, é possível se investigar as rotas biossintéticas de tais compostos, bem como a obtenção de quantidades suficientes para estudos de atividade biológica.

A dificuldade do isolamento de linhagens bacterianas associadas à esponjas representa um grande desafio no entendimento da complexa interação bactéria-esponja. Diversas estratégias têm sido utilizadas para identificação da origem de metabólitos isolados de esponjas, como a purificação de culturas a partir de tecidos de esponjas axênicas ou mesmo a busca de metabólitos e microrganismos diretamente nos tecidos espongianos por microscopia eletrônica e micro-análise por energia dispersiva de Raios-X (PIEL, 2004). No entanto, tais estudos ainda são incipientes.

Bactérias heterotróficas associadas à esponja *Theonella swinhoei* são produtoras dos metabólitos previamente isolados da mesma esponja, swinholida A (**1**) (BEWLEY *et al.*, 1998; BEWLEY *et al.*, 1996) e teopaulamida (**2**) (SCHMIDT *et al.*, 1998; SCHMIDT *et al.*, 2000) (Figura 1).

A ecteinascidina 743 (ET-743, **3**), produzida pelo tunicado *Ecteinascidia turbinata*, teve seu agrupamento gênico encontrado através de análise metagenômica no genoma da γ -proteobactéria associada *Candidatus Endoecteinascida frumentensis* (SCHOFIELD *et al.*, 2015). A ET-743, também conhecida como trabectedina ou Yondelis®, apresenta potente atividade anticâncer. A ET-743 está clinicamente aprovada na Europa para o tratamento de sarcoma de tecido mole e cancro de ovário. Nos Estados Unidos encontra-se na fase III de ensaios clínicos como agente anticâncer (MCLAUGHLIN, 2015).

Os alcaloides saframicina A (**4**), saframicina Mx1 (**5**) e safracina (**6**), com estruturas semelhantes à ET-743, foram anteriormente isolados de três diferentes linhagens bacterianas cultiváveis (*Streptomyces lavendulae*, *Myxococcus xanthus* e *Pseudomonas fluorescens*,

respectivamente) o que endossa a hipótese de origem microbiana para a ET-743 (SCHOFIELD *et al.*, 2015).

Figura 1: Metabólitos isolados de bactérias associadas à esponjas.

Linhagens fúngicas derivadas do ambiente marinho também despertam interesse por serem uma fonte diferenciada de metabólitos secundários, uma vez que estão sujeitos à condições ambientais diferentes daquelas do ambiente terrestre. Na busca por moléculas

bioativas, diferentes abordagens tem sido implementadas visando maior diversidade de metabólitos secundários produzidos por microrganismos de origem marinha e terrestre.

Uma das abordagens implementadas foi nomeada OSMAC (uma linhagem - muito compostos, do inglês One Strain - Many Compounds) (BODE *et al.*, 2002). Bode e colaboradores (2002) investigaram a alteração sistemática de parâmetros de cultivo facilmente acessíveis (por exemplo, composição de meios, aeração, frasco de cultivo e adição de inibidores enzimáticos) para aumentar o número de metabólitos secundários disponíveis a partir de uma fonte microbiana. Assim conseguiram isolar mais de 20 diferentes metabólitos, com rendimento acima de $2,6 \text{ g.L}^{-1}$ a partir de uma única linhagem microbiana.

A linhagem fúngica do ambiente marinho *Cladosporium sphaerospermum* produz as cladosinas A – E (**7** – **11**, Figura 2) quando cultivada em meio de arroz, durante 30 dias em modo estático e 28°C (WU *et al.*, 2014). A linhagem foi re-cultivada em diferentes condições, seguindo a abordagem OSMAC, e produziu dois novos policetideos híbridos, as cladosinas F (**12**) e G (**13**) quando cultivada em meio de soja, durante 9 dias sob agitação de 180 RPM e 28°C (YU *et al.*, 2015).

Figura 2: Metabólitos isolados de fungos do ambiente marinho.

A abordagem OSMAC também foi utilizada em conjunto com análises de bioinformática. Adpressa *et al.* (2016) estudaram o perfil metabolômico do fungo de ambiente marinho *Aspergillus terreus* em onze diferentes métodos de cultivo, usando meios de cultivo sólidos, líquidos ou a base de grãos. A análise multivariada dos dados adquiridos por CL-EM revelou uma drástica diferença entre os perfis metabolômicos dos extratos obtidos dos meios de cultura. A análise de componente principal (PCA, Figura 3) apresenta os diferentes extratos obtidos dos

meios de cultura dispersos nos quatro quadrantes. As amostras de extratos diferentes estão distantes entre si e amostras do mesmo extrato (replicatas) estão próximas, indicando que as replicatas possuem compostos semelhantes e extratos diferentes possuem compostos diferentes entre si.

Tais resultados ilustram, dentre muitos outros, a versatilidade e a variedade de compostos produzidos por microrganismos do ambiente marinho em meio de cultura, que podem ser estudados para descoberta de novas moléculas bioativas que possam eventualmente servir como modelo para o desenvolvimento de novos fármacos.

Figura 3: Gráfico PCA dos dados adquiridos por CL-EM de onze extratos obtidos de diferentes métodos de cultivo da linhagem *Aspergillus terreus* (adaptado de ADPRESSA *et al.*, 2016)

1.1. Justificativa

O grupo QOSBio-IQSC deu início em 1999 ao primeiro programa brasileiro de isolamento de substâncias bioativas oriundas de microrganismos de origem marinha. Desde então inúmeras linhagens fúngicas foram estudadas quanto aos seus metabólitos secundários, atividades biológicas e origem biossintética dos mesmos. O ambiente marinho representa uma

fonte de metabólitos secundários pouco explorada, devido à dificuldade de acesso ao ecossistema e sua microbiota.

Os ex-alunos do grupo Eli F. Pimenta e Stelamar Romminger estudaram o metabolismo secundário da linhagem fúngica *Penicillium citrinum* F53 e o extrato obtido do meio de cultura de *P. citrinum* forneceu as citrinalinas B, C e a 11-hidroxicitrinalina B (**14** – **16**, Figura 4). Além da elucidação estrutural dos compostos isolados, foram realizados os estudos de origem biossintética e de síntese total da citrinalina C, em colaboração com o grupo do Professor Richmond Sarpong (MERCADO-MARIN *et al.*, 2014). Recentemente, o aluno do grupo Everton L. F. Ferreira isolou o roussoellatídeo (**17**) do meio de cultura da linhagem fúngica *Roussoella* sp. O roussoellatídeo teve sua origem biossintética investigada através de experimentos com precursores isotopicamente marcados (FERREIRA *et al.*, 2015).

As linhagens bacterianas de origem marinha foram pouco exploradas, já que são de difícil acesso, embora as esponjas das quais são isoladas tenham sido extensamente estudadas no grupo. As linhagens bacterianas investigadas neste trabalho foram isoladas da esponja *A. brasiliensis*, que por sua vez também foi objeto de estudo por ex-alunos do grupo.

Figura 4: Metabólitos isolados no grupo QOSBio-IQSC.

As bactérias associadas à esponjas tem despertado interesse por produzirem metabólitos comumente encontrados em esponjas. Tais metabólitos apresentam uma grande variedade de atividades biológicas e o isolamento dos mesmos a partir de linhagens bacterianas representa uma oportunidade de se obter material suficiente para os ensaios clínicos, além de permitir o estudo de suas rotas biossintéticas.

Entre as bactérias associadas à esponjas, as gram-negativas estão amplamente distribuídas. Bactérias gram-negativas são clinicamente relevantes por apresentarem resistência aos antibióticos corriqueiramente usados, no entanto também são capazes de produzir compostos biologicamente ativos (PIDOT *et al.*, 2014; MACHADO *et al.*, 2015). A δ -proteobactéria *Vibrio* sp., isolada de coral, produziu em meio de cultura seis novos derivados

de maleimida, aqabamicinas A – G (**18** – **25**, Figura 5). As aqabamicinas E, E' e F apresentaram alta atividade contra linhagens de *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli* e *Proteus vulgaris*, com valores de IC₅₀ entre 3 e 25 µg.ml⁻¹ (SCHINKE *et al.*, 2017).

O presente trabalho foi desenvolvido para melhor conhecer a diversidade química de linhagens fúngicas e bacterianas oriundas do ambiente marinho.

Figura 5: Metabólitos isolados *Vibrio* sp.

18 A - R₁ = H, R₂ = H, R₃ = H

19 B - R₁ = H, R₂ = OH, R₃ = NO₂

20 C - R₁ = NO₂, R₂ = H, R₃ = H

21 D - R₁ = NO₂, R₂ = OH, R₃ = NO₂

22 E - R₁ = NO₂, R₂ = OH, R₃ = H, R₄ = H

23 E' - R₁ = H, R₂ = H, R₃ = OH, R₄ = NO₂

24 F - R₁ = NO₂, R₂ = OH, R₃ = OH, R₄ = NO₂

25

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Isolar metabólitos secundários a partir de extratos obtidos do meio de cultura de microrganismos do ambiente marinho, ativos em ensaios de atividade biológica.

2.2. Específicos

- Selecionar linhagens de microrganismos do ambiente marinho para estudo dos metabólitos secundários, produzidos no meio de cultivo, por cromatografia líquida acoplada a detectores de ultravioleta e massas (CLAE-UV-EM) e comparar os dados obtidos aos dados presentes no Dictionary of Natural Products (DNP);
- Realizar o crescimento das linhagens de microrganismos selecionadas em meio líquido (sem ágar) em maior volume e fracionamento do extrato obtido do meio de cultura das linhagens selecionadas para isolamento dos metabólitos secundários;
- Identificar as substâncias puras por técnicas espectroscópicas e avaliar as mesmas em bioensaios de atividade biológica.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Generalidades

Extratos e frações obtidos dos meios de cultura das linhagens microbianas foram concentrados em evaporador rotativo da Fisaton 802D, sob pressão reduzida com auxílio de bomba de vácuo Brinkmann, modelo B-169, ou em speedvac da Thermo Scientific, modelo Savant SC 210A, acoplado a uma bomba de alto vácuo Edwards, modelo RV8.

O fracionamento por cromatografia em coluna de permeação em gel foi realizado em uma coluna de vidro com dimensões de 170 cm de comprimento e 2 cm de diâmetro de largura. A fase estacionária utilizada foi Sephadex® LH-20 (Pharmacia-Biotech®, 25-100 µm). Para eluição utilizou-se MeOH grau P.A. em modo isocrático.

O fracionamento em colunas pré-empacotadas foi realizado utilizando-se colunas de marcas Waters Sep-Pak® vac 35 cc e Phenomenex Strata® de diferentes dimensões (5 e 10 g) com as fases estacionárias: Sílica-gel ou sílica-gel derivatizada com grupos octadecilsilano (C₁₈), ou cianopropila, de acordo com a polaridade de cada fração. Os solventes utilizados foram de grau analítico: 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.

A avaliação por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) foi realizada utilizando-se hexano/AcOEt nas proporções 9:1 e 7:3 e CH₂Cl₂/MeOH nas proporções 9:1 e 7:3 como eluentes e cromatofolhas de sílica gel 60 sobre poliéster com indicador ultravioleta F254 (Aldrich, 20 x 20 cm). As cromatofolhas foram cortadas em placas de 7 x 7 cm, aproximadamente. Após aplicação e eluição das amostras, as placas foram observadas sob luz ultravioleta nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm, sob lâmpada Spectroline modelo ENF-240 C/FE, e reveladas em ácido fosfomolibdico para detecção de substâncias redutoras, ninidrina para grupos amina e Dragendorff para alcaloides.

Reveladores de CCD foram preparados com: a) solução de 20% de ácido fosfomolibdico em EtOH; b) solução de 0,2 g de ninidrina em 100 mL de EtOH (as placas borrifadas com soluções de ácido fosfomolibdico e ninidrina foram aquecidas por cinco minutos em placa de aquecimento); c) solução de Dragendorff (mistura 1:1 das soluções A e B diluída na proporção de 1 mL da mistura para cada 2 mL de ácido acético glacial e 10 mL de água. A: 0,85 g de nitrato básico de bismuto em 10 mL ácido acético glacial + 40 mL de água. B: 8 g de iodeto de potássio em 20 mL de água) borrifada na placa sem aquecimento.

Separações por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em escala analítica e semi-preparativa foram realizadas em cromatógrafo da Waters® com sistema quaternário de bombas e detector UV – visível de duplo feixe, modelo Waters 2489. Para as separações foram

utilizadas diferentes colunas de sílica gel derivatizadas com grupo C₁₈ e C₈: Inertsil ODS-3 (250 x 4,6 mm, 5 µm), Inertsil ODS-SP (250 x 4,6 mm, 5 µm), C₈ InertSustain (250 x 4,6 mm, 5 µm) analítica e C₈ InertSustain (250 x 10 mm, 5 µm) semi-preparativa, C₁₈ InertSustain (250 x 4,6 mm, 5 µm) analítica e C₁₈ InertSustain (250 x 10 mm, 5 µm) semi-preparativa, Delta-Pack (100 Å, 300 x 7,8 mm, 15 µm).

Meios de cultura utilizados para o crescimento microbiano foram: extrato de malte (Himedia), meio de batata e dextrose (PDA ou PDB, Himedia) e meio marinho (Marine Broth ou Marine Agar, Difco). As resinas de adsorção utilizadas foram XAD-2, XAD-4 e XAD-7 (Amberlite®). O armazenamento e crescimento das linhagens microbianas foram realizados em incubadoras de crescimento (BOD, Tecnal), modelo TE-371, ou com agitação orbital (Tecnal), modelo TE-421. A preparação dos inóculo foi realizada em capela de fluxo laminar da SPLabor, modelo Pa420.

3.1.1. Técnicas espectroscópicas

A obtenção dos espectros de massas de baixa resolução foi realizada em 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 e um detector de espectrometria de massas, modelo Waters Micromass ZQ 2000, operado utilizando plataforma Empower.

O detector de absorções no ultravioleta (UV) foi ajustado para detecção na faixa de λ_{max} 200 - 400 nm. O espectrômetro de massas (EM) foi ajustado para as seguintes condições: voltagem do capilar 3,00 kV, temperatura na fonte 100 °C, temperatura de dessolvatação 350 °C, ionização por eletrospray (ESI) operando nos modos positivo e negativo, detecção na faixa de 100-1200 Da, aquisição com cromatogramas de íons totais (TIC). O fluxo de gás no cone e de dessolvatação foram mantidos em 50 e 350 L/h, respectivamente. A aquisição dos dados e processamento foram realizados utilizando a plataforma Empower 2.0.

As análises CLAE-UV-EM foram realizadas utilizando uma coluna de fase reversa C₁₈ (Waters X-terra, 250 x 4,6 mm, 5 µm de tamanho de partículas) com fluxo da fase móvel de 1 mL.min⁻¹. A eluição foi realizada com fase móvel composta de (A) H₂O + 0,1% de ácido fórmico e (B) 1:1 (v/v) MeOH/MeCN + 0,1% de ácido fórmico. O gradiente foi aplicado da seguinte forma: 0-1,0 min mantido em 10% B, gradiente linear até 100% B de 1,0-22,0 min, de 22,0-30,0 min foi mantido 100% B, de 30,0-40,0 min foi mantido 10% B para condicionamento da coluna. O tempo total da análise foi de 40 min. O volume de injeção foi de 20 µL de uma solução 1,0 a 2,5 mg.mL⁻¹.

As análises de alta resolução foram realizadas por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplado à espectrometria de massas com analisador híbrido quadrupolo-tempo de voo CLUE-qTOF-EM utilizando o equipamento Waters UPLC Xevo G2-XS Q-TOF e uma coluna de fase reversa C18 (Waters ACQUITY UPLC BEH, 2,1 mm x 100 mm, 1,7 μ m). A eluição foi realizada com fase móvel composta de (A) H₂O + 0,1% de ácido fórmico e (B) MeCN + 0,1% de ácido fórmico. O gradiente foi aplicado da seguinte forma: 0-9,0 min gradiente linear de 10 a 100% B, de 9,0-10,0 min foi mantido 10% B para condicionamento da coluna. O espectrômetro de massas foi ajustado de acordo com os seguintes parâmetros: modo contínuo MS^E, faixa de detecção de m/z 300–1200 Da, modo de ionização por eletrospray ESI, tempo de aquisição de 0,2 s e rampa de energia de colisão de 20–30 V.

As frações purificadas foram submetidas à análise por RMN de ¹H em alíquotas diluídas em dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-*d*₆) ou metanol deuterado (MeOH-*d*₄), utilizando tetrametilsilano (TMS) ou o sinal do solvente deuterado como padrão interno. Após diluição em solvente, as amostras foram pipetadas através de algodão e inseridas em tubo de vidro de volume apropriado. Foram também realizadas análises por RMN de ¹³C, COSY ¹H-¹H, HSQC, HMBC e NOESY. As análises foram realizadas em equipamento Bruker, modelo AVANCE III 9,4 Tesla, de 400 MHz na frequência do ¹H e de 100 MHz na frequência do ¹³C, ou 14,1 Tesla, de 600 MHz na frequência do ¹H e de 150 MHz na frequência do ¹³C, equipado com cryo-sonda TCI (¹H/¹³C/¹⁵N) de 5 mm com ATMA® (Automatic Tuning Matching) e gradiente de campo em z.

As medidas de rotação óptica ([α]_D) foram realizadas em polarímetro Polartronic H Schmidt+Haensch polarimeter, as amostras foram solubilizadas em MeOH em concentrações de 0,05 a 2,0 mg.mL⁻¹. Os espectros de ultravioleta (UV) foram obtidas em equipamento Shimadzu UV-3600, amostras foram solubilizadas em MeOH em concentrações de 0,01 a 1,0 mg.mL⁻¹. Os espectros de dicroísmo circular (DC) foram obtidas em espectrômetro Jasco J-815, as amostras foram solubilizadas em MeOH em concentrações de 0,1 a 1,0 mg.mL⁻¹. Os espectros de infravermelho (IV) foram obtidos em equipamento Shimadzu, modelo IRAffinity, as amostras foram solubilizadas em MeOH, as soluções aplicadas em pastilhas de sílica e o solvente evaporado com nitrogênio gasoso (N₂).

3.2. Estudo químico da linhagem bacteriana *Pseudovibrio denitrificans* (Ab134).

A linhagem bacteriana Ab134 (*Pseudovibrio denitrificans*), investigada neste trabalho, foi isolada a partir da esponja *A. brasiliensis* como parte do programa de descoberta de novos metabólitos secundários biativos produzidos por microorganismos cultiváveis isolado do

ambiente marinho, desenvolvido em parceria com o Professor Fabiano Thompson (Departamento de Genética, Instituto de Biologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro).

3.2.1. Seleção da linhagem bacteriana.

Foram inicialmente avaliados extratos obtidos do meio de cultura de 29 linhagens bacterianas (tabela 1) fornecidas pelo Professor Fabiano Thompson Thompson (Depto. Genética, IB, UFRJ), por apresentarem atividade antimicrobiana. As linhagens bacterianas foram isoladas a partir de tecidos da esponja *A. brasiliensis* (ordem Haplosclerida), coletada à mão utilizando SCUBA na praia de João Fernandinho, Búzios/RJ (RUA *et al.*, 2014).

Tabela 1: Linhagens de bactérias isoladas da esponja *A. brasiliensis*.

Linhagem bacteriana (Identificação)	
Ab101 (<i>Shewanella</i> sp.)	Ab153 (<i>Bacillus pumilus</i>)
Ab105 (<i>Shewanella irciniae</i>)	Ab155 (<i>Micrococcus luteus</i>)
Ab107 (<i>Endozoicomonas montiporae</i>)	Ab158 (<i>Bacillus cereus</i>)
Ab109 (<i>Shewanella irciniae</i>)	Ab160 (<i>Bacillus cereus</i>)
Ab112 (<i>Endozoicomonas montiporae</i>)	Ab161 (<i>Bacillus pumilus</i>)
Ab114 (<i>Shewanella irciniae</i>)	Ab 164 (<i>Bacillus cereus</i>)
Ab126 (<i>Pseudovibrio ascidiaceicola</i>)	Ab202 (<i>Shewanella irciniae</i>)
Ab127 (<i>Pseudovibrio denitrificans</i>)	Ab213 (<i>Endozoicomonas montiporae</i>)
Ab132 (<i>Pseudovibrio ascidiaceicola</i>)	Ab216 (<i>Shewanella irciniae</i>)
Ab133 (<i>Pseudovibrio denitrificans</i>)	Ab232 (<i>Paenibacillus illinoiensis</i>)
Ab134 (<i>Pseudovibrio denitrificans</i>)	Ab233 (<i>Bacillus cereus</i>)
Ab137 (<i>Ruegeria atlântica</i>)	Ab238 (<i>Bacillus nanhaiensis</i>)
Ab138 (<i>Ruegeria atlantica</i>)	MC115 (<i>Endozoicomonas montiporae</i>)
Ab147 (<i>Bacillus pumilus</i>)	MC227 (<i>Endozoicomonas montiporae</i>)
Ab148 (<i>Bacillus pumilus</i>)	

As linhagens bacterianas foram reativadas inicialmente em placas de Petri contendo o meio semi-sólido Marine Agar (Difco). Após crescimento e verificação da pureza de cada linhagem, foram utilizados diferentes métodos com o objetivo de se determinar o modo de cultura e método de extração mais adequados para obtenção dos extratos dos meios de cultura das linhagens bacterianas:

- I. As linhagens bacterianas foram cultivadas em meio líquido Marine Broth (Difco). Após o período de cultivo, o meio de cultura foi centrifugado e o pellet separado do meio líquido. O meio líquido foi extraído com AcOEt. O pellet foi extraído com MeOH em banho de ultrassom por 30 minutos.
- II. As linhagens bacterianas foram cultivadas em meio líquido Marine Broth. Após o período de cultivo foram adicionados 15 g de uma mistura 1:1:1 de resinas de adsorção XAD-2, XAD-4 e XAD-7 ao meio de cultura. A mistura meio líquido + mistura de resinas foi deixada sob agitação por 24 horas. Depois deste período, a mistura de resinas foi filtrada e extraída com: a) MeOH 100%; b) MeOH:acetona 1:1 (v/v) e c) acetona (2 x 100 mL em banho de ultrassom por 30 minutos para cada mistura). As frações orgânicas obtidas da extração das resinas foram reunidas, evaporadas, secas e pesadas. Este extrato foi ressuspensionado em MeOH e filtrado em membrana Minisart RC 25 de 0,20 µm.
- III. As linhagens bacterianas foram cultivadas em meio líquido Marine Broth contendo 15 g da mistura 1:1:1 (m/m) de resinas XAD -2, -4 e -7. Após o período de cultivo, a mistura meio líquido + resinas foi filtrada. A mistura de resinas XAD foi extraída com: a) MeOH 100%; b) MeOH:acetona 1:1 (v/v) e c) acetona 100% (2 x 100 mL em banho de ultrassom por 30 minutos para cada mistura). As frações orgânicas obtidas da extração das resinas foram reunidas, evaporadas, secas e pesadas. O extrato orgânico obtido foi ressuspensionado em MeOH e filtrado em membrana Minisart RC 25 de 0,20 µm.

Para os três métodos de processamento dos meios de crescimento das linhagens bacterianas de origem marinha, o cultivo das bactérias seguiu o seguinte protocolo: as linhagens bacterianas foram transferidas para frascos Schotts de 500 mL contendo 100 mL do meio de cultura. As linhagens foram cultivadas durante 5 dias com agitação de 160 RPM e temperatura de 30 °C. Os extratos brutos obtidos dos meios de cultura das linhagens bacterianas foram particionados entre MeOH/H₂O 95:5 e hexano para serem desengordurados. As frações MeOH foram coletadas, evaporadas em evaporador rotativo, secas em dessecador e pesadas.

Os testes de processamento dos meios de cultura das linhagens bacterianas de origem marinhas foram realizados com 3 das linhagens bacterianas (Ab132, Ab133 e Ab134). O método de cultivo e extração considerado mais eficiente foi utilizado para as demais linhagens (26 linhagens). Após obtenção do extrato bruto do meio de cultura das linhagens bacterianas, todos foram analisados por CLAE-UV-EM.

3.2.2. Isolamento e identificação de metabólitos produzidos pela bactéria *Pseudovibrio denitrificans* (Ab134)

A linhagem bacteriana foi cultivada em 3,7 L do meio líquido Marine Broth + mistura 1:1:1 (m/m) das resinas XAD- 2, -4 e -7, de acordo com o protocolo descrito na seção 3.2.1 item III. Após crescimento da linhagem bacteriana e extração do meio de cultura, a fração MeOH (2.15 g), obtida da partição entre MeOH:hexano do extrato bruto, foi submetida a fracionamento cromatográfico em uma coluna empacotada com Sephadex® LH-20, eluída com MeOH 100%. Foram obtidas 10 frações (Ab134-A a Ab134-J). A fração Ab134-C foi submetida à fracionamento cromatográfico em uma coluna pré-empacotada com 10 g de sílica-gel, eluído em um gradiente de AcOEt em hexano seguido de um gradiente de MeOH em CH₂Cl₂ (Figura 6).

Figura 6: Fluxogramas das separações cromatográficas da fração Ab134-C.

Legenda: A – Coluna Sephadex® LH-20, MeOH, B – Coluna pré-empacotada com a fase estacionário sílica-gel, gradiente: hexano, hex:AcOEt 9:1, 8:2, 7:3, 1:1, CH₂Cl₂:MeOH 9:1, 8:2, 7:3, 1:1, MeOH.

As frações Ab134-C2 e C3 foram reunidas e purificadas por CLAE-UV. Foi utilizada uma coluna semi-preparativa com fase estacionária C₈ (InertSustain, 250 x 10 mm, 5 µm). A coluna foi eluída com fluxo de 2 mL.min⁻¹ da mistura de solventes H₂O:MeOH:MeCN na proporção 30:35:35 (v/v). Foram obtidas 6 frações (Ab134-C2A a C2F) (Figura 7).

Figura 7: Cromatograma de separação da fração Ab134-C23, monitorado no comprimento de onda de 254 nm.

As frações foram evaporadas e analisadas por CLAE-UV-EM. A fração Ab134-C23C (3,1 mg) apresentou grau de pureza satisfatório e foi analisada por RMN de ^1H , ^{13}C , COSY, HSQC e HMBC, EMAR, UV, IV, CD e $[\alpha]_D$.

As frações Ab134-F a Ab134-I, obtidas do fracionamento em coluna empacotada com a fase estacionária Sephadex® LH-20, foram reunidas e renomeadas como fração Ab134-FI. As frações reunidas foram submetidas a separação em coluna pré-empacotada com a fase estacionária sílica-gel derivatizada com grupo cianopropila, eluída com um gradiente de AcOEt em CH_2Cl_2 seguido de um gradiente de MeOH em AcOEt (Figura 8).

Figura 8: Fluxograma de separação da fração Ab134-FI.

Legenda: A – Coluna pré-empacotada com fase estacionária de sílica-gel derivatizada com grupo cianopropila (10 g), eluída com 80 mL da sequência de solventes: CH_2Cl_2 , CH_2Cl_2 :AcOEt (1:1 v/v), AcOEt, AcOEt:MeOH (1:1, v/v) e MeOH.

As frações obtidas Ab134-FI1 a Ab134-FI3 foram reunidas, renomeadas como Ab134-FI13 (153,2 mg) e submetidas a separação por CLAE-UV ($\lambda_{\text{max}} = 254$ e 280 nm), utilizando-se coluna semi-preparativa de fase reversa C8-4 (250 x 10 mm, 5 μm), eluída com 2 mL.min⁻¹ da mistura de solventes H₂O:MeOH:MeCN (4:3:3, v/v) (Figura 9).

As frações Ab134-FI13-B e Ab134-FI13-E obtidas da separação em coluna semi-preparativa foram purificadas por CLAE-UV ($\lambda_{\text{max}} = 254$ e 280 nm). A fração Ab134-FI13-B (9,3 mg) foi purificada em coluna de fase-reversa C8-4 (250 x 4,6 mm, 5 μm), eluída com 1 mL.min⁻¹ da mistura de solventes H₂O:MeOH:MeCN (70:19:11, v/v) (Figura 10).

A fração Ab134-FI13-E (4,8 mg) foi purificada em coluna de fase-reversa C8-4 (250 x 4,6 mm, 5 μm), eluída com 1 mL.min⁻¹ da mistura de solventes H₂O:MeOH:MeCN (50:28:22, v/v) (Figura 11).

As frações foram evaporadas e analisadas por CLAE-UV-EM. As frações Ab134-FI13-B2 (5,1 mg) e Ab134-FI13-E2 (2,8 mg) apresentaram grau de pureza satisfatório e foram analisadas por RMN de ¹H, ¹³C, COSY, HSQC e HMBC, EMAR, UV, IV, CD e $[\alpha]_D$.

Figura 9: Cromatograma de separação da fração Ab134-FI13, monitorado no comprimento de onda de 254 nm.

Figura 10: Cromatograma de separação da fração Ab134-FI13-B, monitorado no comprimento de onda de 254 nm.

Figura 11: Cromatograma de separação da fração Ab134-FI13-E, monitorado no comprimento de onda de 254 nm.

3.3. Estudo químico da linhagem fúngica *Biatriospora* sp. (D8).

A linhagem fúngica *Biatriospora* sp. foi isolada a partir da esponja *Dragmacidon reticulatum* coletada na Ilha de Búzios/RJ e depositada no banco de linhagem do Centro de Biologia Marinha da USP (CBMAR/USP) com o código CBMAI 1333 (PASSARINI *et al.*, 2013). Subsequentemente, a linhagem fúngica *Briatriospora* sp será referida pelo código D8.

3.3.1. Cultivo da linhagem fúngica *Biatriospora* sp. (D8) em 10 L de meio de cultura

A linhagem fúngica *Biatriospora* sp. (D8) foi cultivada em 40 frascos Schotts de 500 mL contendo 250 mL do meio malte 2%, com pH ajustado para 8, durante 15 dias à temperatura ambiente (25 °C). O meio de cultivo malte 2% foi preparado com 20 g de extrato de malte para cada litro de água do mar artificial (AMA: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1,36 g.L⁻¹; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 9,68 g.L⁻¹; KCl 0,61 g.L⁻¹; NaCl 30 g.L⁻¹; NaH_2PO_4 0,14 mg.L⁻¹; Na_2SO_4 3,47 g.L⁻¹; NaHCO_3 170 mg.L⁻¹; KBr 100 mg.L⁻¹; $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 40 mg.L⁻¹; ácido bórico 30 mg.L⁻¹ e completa para 1 L com água destilada)

Após o período de cultivo, foram adicionados 250 mL de AcOEt a cada frasco Schott contendo 250 mL do meio de cultivo. A mistura AcOEt + meio de cultivo foi mantida sob agitação esporádica por dois dias, filtrada em funil de Buchner através de uma camada de celite, particionada em funil de separação e a fração AcOEt foi evaporada em evaporador rotativo. A fração AcOEt foi ressuspensa em MeOH + 5% H₂O (500 mL) e particionada com igual quantidade de hexano (3 X). As frações MeOH e hexano foram secas e pesadas.

A fração MeOH (D8-M, 925 mg) foi misturada à igual quantidade de celite e aplicada em uma coluna contendo 40 g de sílica flash. A coluna foi eluída em um gradiente de AcOEt em hexano, seguido de um gradiente de MeOH em CH₂Cl₂. Foram coletadas frações de 8 mL. As frações obtidas foram agrupadas de acordo com seus perfis observados em análise por CCD e nomeadas de D8-M1 a D8-M6 (Figura 12).

Figura 12: Fluxograma da separação cromatográfica do extrato MeOH obtido do meio de cultura da linhagem fúngica D8.

Legenda: A – Coluna empacotada com Sílica flash, gradiente: hexano, hex:AcOEt 9:1, 7:3, 1:1, CH₂Cl₂:MeOH 9:1, 1:1, MeOH.

A fração D8-M2 (108,5 mg) foi submetida à separação por CLAE-UV ($\lambda_{\text{max}} = 254$ e 280 nm) em coluna de fase-reversa C18 (Delta-Pack, 100 Å, 300 x 7.8 mm, 15 µm), eluída com 3

mL.min⁻¹ da mistura de solventes H₂O:MeOH:MeCN (20:40:40, v/v, + 0,1% de ácido fórmico) (Figura 13).

Figura 13: Cromatograma de separação da fração D8-M2, monitorado no comprimento de onda de 254 nm.

A fração D8-M2B (13,6 mg) foi purificada por CLAE-UV ($\lambda_{\text{max}} = 254$ e 280 nm) em coluna de fase-reversa C18 (ODS-3, 250 x 4,6 mm, 5 μm), eluída com 1 mL.min⁻¹ da mistura de solventes H₂O:MeOH:MeCN (30:35:35, v/v, + 0,1% de ácido fórmico) (Figura 14).

Figura 14: Cromatograma de separação da fração D8-M2B, monitorado no comprimento de onda de 254 nm.

A fração D8-M2D (5,2 mg) foi purificada por CLAE-UV ($\lambda_{\text{max}} = 254$ e 280 nm) em coluna de fase-reversa C18 (ODS-3, 250 x 4,6 mm, 5 μm), eluída com 1 mL.min⁻¹ da mistura de solventes H₂O:MeOH:MeCN (30:35:35, v/v, + 0,1% de ácido fórmico) (Figura 15).

Figura 15: Cromatograma de separação da fração D8-M2B, monitorado no comprimento de onda de 254 nm.

A fração D8-M2F (4,0 mg) foi purificada por CLAE-UV ($\lambda_{\text{max}} = 254$ e 280 nm) em coluna de fase-reversa C18 (ODS-3, $250 \times 4,6$ mm, $5 \mu\text{m}$), eluída com $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ da mistura de solventes $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}:\text{MeCN}$ (20:40:40, v/v, + 0,1% de ácido fórmico) (Figura 16).

Figura 16: Cromatograma de separação da fração D8-M2F, monitorado no comprimento de onda de 254 nm.

As frações foram evaporadas e analisadas por CLAE-UV-EM. As frações D8-M2B2 (0,3 mg) e D8-M2D2 (0,6 mg) apresentaram grau de pureza satisfatório e foram analisadas por RMN de ^1H . A fração D8-M2F2 (2,1 mg) foi analisada por RMN de ^1H , ^{13}C , COSY, HSQC, HMBC e NOESY, EMAR, UV, IV, CD e $[\alpha]_{\text{D}}$.

A fração D8-M3 (184,1 mg) foi submetida à separação por CLAE-UV ($\lambda_{\text{max}} = 254$ e 280 nm) em coluna de fase-reversa C18 (Delta-Pack, 100 A, 300×7.8 mm, $15 \mu\text{m}$), eluída com $3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ da mistura de solventes $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}:\text{MeCN}$ (30:35:35, v/v, + 0,1% de ácido fórmico) (Figura 17).

Figura 17: Cromatograma de separação da fração D8-M3, monitorado no comprimento de onda de 254 nm.

A fração D8-M3B (16,2 mg) foi purificada por CLAE-UV ($\lambda_{\text{max}} = 254$ e 280 nm) em coluna de fase-reversa C18 (ODS-3, 250 x 4,6 mm, 5 μm), eluída com 1 mL.min⁻¹ da mistura de solventes H₂O:MeOH:MeCN (34:33:33, v/v, + 0,1% de ácido fórmico) (Figura 18).

Figura 18: Cromatograma de separação da fração D8-M3B, monitorado no comprimento de onda de 254 nm.

A fração D8-M3D (9,3 mg) foi purificada por CLAE-UV ($\lambda_{\text{max}} = 254$ e 280 nm) em coluna de fase-reversa C18 (ODS-3, 250 x 4,6 mm, 5 μm), eluída com 1 mL.min⁻¹ da mistura de solventes H₂O:MeOH:MeCN (34:33:33, v/v, + 0,1% de ácido fórmico) (Figura 19).

A fração D8-M3E (70,3 mg) foi purificada por CLAE-UV ($\lambda_{\text{max}} = 254$ e 280 nm) em coluna de fase-reversa C18 (ODS-3, 250 x 4,6 mm, 5 μm), eluída com 1 mL.min⁻¹ da mistura de solventes H₂O:MeOH:MeCN (34:33:33, v/v, + 0,1% de ácido fórmico) (Figura 20).

Figura 19: Cromatograma de separação da fração D8-M3D, monitorado no comprimento de onda de 254 nm.

Figura 20: Cromatograma de separação da fração D8-M3E, monitorado no comprimento de onda de 254 nm.

A fração D8-M3F (21 mg) foi purificada por CLAE-UV ($\lambda_{\text{max}} = 254$ e 280 nm) em coluna de fase-reversa C18 (ODS-3, 250 x 4,6 mm, 5 μm), eluída com 1 mL.min⁻¹ da mistura de solventes H₂O:MeOH:MeCN (34:33:33, v/v, + 0,1% de ácido fórmico) (Figura 21).

As frações foram evaporadas e analisadas por CLAE-UV-EM. As frações D8-M3B2 (1,4 mg), D8-M3D2 (2,9 mg), D8-M3E3 (13,1 mg), D8-M3E4 (28,8 mg) e D8-M3F4 (5,4 mg) apresentaram grau de pureza satisfatório e foram analisadas por RMN de ¹H.

Figura 21: Cromatograma de separação da fração D8-M3F, monitorado no comprimento de onda de 254 nm.

Alguns destes compostos sofreram degradação ao longo do processo de purificação ou de identificação de suas estruturas. Por este motivo, a linhagem fúngica D8 foi re-cultivada em 20 L do meio de cultura.

3.3.2. Cultivo da linhagem fúngica *Biatrispora* sp. (D8) em 20 L de meio de cultura

A linhagem fúngica *Biatrispora* sp. (D8) foi re-cultivada em 20 L do meio de cultura malte 2%, segundo o procedimento de cultivo, extração e partição descrito na seção 3.3.1.

A fração MeOH (1,39 g), obtida da etapa de partição MeOH:hexano, foi submetida a fracionamento em uma coluna empacotada com fase estacionária Sephadex® LH-20 eluída com MeOH. Foram coletadas frações de 8 mL. As frações obtidas foram agrupadas de acordo com seus perfis observados em análise por CCD e nomeadas D8-Ac-M1 a D8-Ac-M7.

A fração D8-Ac-M4 (446.8 mg) submetida à separação em uma coluna pré-empacotada com fase estacionária de sílica-gel. A coluna foi eluída em um gradiente de AcOEt em hexano, seguido de um gradiente de MeOH em CH₂Cl₂. Foram coletadas frações de 8 mL. As frações obtidas foram agrupadas de acordo com seus perfis observados em análise por CCD e nomeadas de D8-Ac-M4A a D8-Ac-M4J (Figura 22).

A fração D8-Ac-M4C (31,8 mg) foi submetida à separação por CLAE-UV ($\lambda_{\text{max}} = 254$ e 300 nm) em coluna de fase-reversa C18 (ODS-SP, 250 x 4,6 mm, 5 μm), eluída com 1 mL.min⁻¹ da mistura de solventes H₂O:MeOH (55:45, v/v) (Figura 23).

Figura 22: Fluxogramas da separação cromatográfica da fração D8-Ac-M4.

Legenda: A – Coluna Sephadex® LH-20, eluída com MeOH, B – Coluna empacotada com sílica-gel (10 g), gradiente: hexano, hex:AcOEt 9:1, 7:3, 1:1, 3:7, CH₂Cl₂:MeOH 9:1, 7:3, MeOH,.

Figura 23: Cromatograma de separação da fração D8-Ac-M4C, monitorado no comprimento de onda de 254 nm.

As frações D8-Ac-M4C2 (3,2 mg) e D8-Ac-M4C4 (4,0 mg) foram reunidas, renomeadas como fração D8-Ac-M4C24 e submetidas à separação por CLAE-UV ($\lambda_{\text{max}} = 254$ e 220 nm) em coluna de fase-reversa semi-preparativa C8 (InertSustain, 250 x 10 mm, 5 μm), eluída com 2 mL.min⁻¹ da mistura de solventes H₂O:MeOH:MeCN (34:33:33, v/v) (Figura 24).

Figura 24: Cromatograma de separação da fração D8-Ac-M4C24, monitorado no comprimento de onda de 254 nm.

A fração D8-Ac-M4C24B (1,9 mg) foi repurificada por CLAE-UV ($\lambda_{\text{max}} = 254$ e 220 nm) em coluna de fase-reversa semi-preparativa C8 (InertSustain, 250 x 10 mm, 5 μm), eluída com 2 mL.min⁻¹ da mistura de solventes H₂O:MeOH:MeCN (40:30:30, v/v) (Figura 25).

Figura 25: Cromatograma de separação da fração D8-Ac-M4C24B, monitorado no comprimento de onda de 220 nm.

As frações obtidas foram evaporadas e analisadas por CLAE-UV-EM. A fração D8-Ac-M4C24B2 (1,2 mg) apresentou grau de pureza satisfatório e foi analisada por RMN de ^1H , ^{13}C , COSY, HSQC, HMBC e NOESY, EMAR, UV, IV, CD e $[\alpha]_D$.

As frações resultantes do processo de fracionamento e purificação que não forneceram substâncias puras foram reunidas, renomeadas como fração D8-R e novamente submetidas a etapas sucessivas de fracionamento para obtenção de compostos puros adicionais.

As frações reunidas D8-R foram submetidas à separação em uma coluna pré-empacotada com fase estacionária de sílica-gel. A coluna foi eluída em um gradiente de AcOEt em hexano, seguido de um gradiente de MeOH em CH_2Cl_2 . As frações obtidas foram agrupadas de acordo com seus perfis observados em análise por CCD e nomeadas de D8-R1 a D8-R12 (Figura 26).

Figura 26: Fluxogramas da separação cromatográfica da fração D8-R.

Legenda: A – Coluna empacotada com sílica-gel, eluída com gradiente: hexano, hexano:AcOEt nas proporções 9:1, 8:2, 7:3, 6:4 e 1:1, CH_2Cl_2 , CH_2Cl_2 :MeOH nas proporções 9:1, 8:2, 7:3, 6:4 e 1:1 e MeOH.

A fração D8-R5 (164,2 mg) foi submetida à separação por CLAE-UV ($\lambda_{\text{max}} = 254$ e 280 nm) em coluna de fase-reversa semi-preparativa C8 (InertSustain, 250×10 mm, $5 \mu\text{m}$), eluída com $2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ da mistura de solventes H_2O :MeOH:MeCN (20:40:40, v/v) (Figura 27).

A fração D8-R5-C (42,2 mg) foi purificada por CLAE-UV ($\lambda_{\text{max}} = 254$ e 206 nm) em coluna de fase-reversa semi-preparativa C8 (InertSustain, 250×10 mm, $5 \mu\text{m}$), eluída com $2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ da mistura de solventes H_2O :MeOH:MeCN (60:20:20, v/v) (Figura 28).

As frações foram evaporadas e analisadas por CLAE-UV-EM. As frações D8-R5-C1 (9,4 mg) e D8-R5-C2 (5,3 mg) apresentaram grau de pureza satisfatório e foram analisadas por RMN de ^1H , ^{13}C , COSY, HSQC, HMBC e NOESY, EMAR, UV, IV, CD e $[\alpha]_D$.

Figura 27: Cromatograma de separação da fração D8-R5, monitorado no comprimento de onda de 254 nm.

Figura 28: Cromatograma de separação da fração D8-R5-C, monitorado no comprimento de onda de 254 nm.

A fração D8-R9 (579,5 mg) foi submetida a separação por CLAE-UV ($\lambda_{\text{max}} = 254$ e 270 nm) em coluna de fase-reversa semi-preparativa C18 (InertSustain, 250 x 10 mm, 5 μm), eluída com 2 mL.min⁻¹ da mistura de solventes H₂O:MeOH:MeCN (A - 50:25:25, v/v), (B - 40:30:30, v/v) e (C - 30:35:35, v/v), nas proporções A de 0 a 22 minutos, B de 22 a 38 minutos e C de 38 a 60 minutos (Figura 29).

Figura 29: Cromatograma de separação da fração D8-R9, monitorado no comprimento de onda de 254 nm.

A fração D8-R9-B (38,7 mg) foi submetida a separação por CLAE-UV ($\lambda_{\text{max}} = 254$ e 360 nm) em coluna de fase-reversa semi-preparativa C18 (InertSustain, 250 x 10 mm, 5 μm), eluída com 2 mL.min⁻¹ da mistura de solventes H₂O:MeOH:MeCN (50:25:25, v/v) (Figura 30).

Figura 30: Cromatograma de separação da fração D8-R9-B, monitorado no comprimento de onda de 254 nm.

A fração D8-R9-B2 (23,7 mg) foi purificada por CLAE-UV ($\lambda_{\text{max}} = 254$ e 360 nm) em coluna de fase-reversa semi-preparativa C18 (InertSustain, 250 x 10 mm, 5 μm), eluída com 2 mL.min⁻¹ da mistura de solventes H₂O:MeOH (60:40, v/v) (Figura 31).

Figura 31: Cromatograma de separação da fração D8-R9-B2, monitorado no comprimento de onda de 254 nm.

A fração D8-R9-C (36,0 mg) foi submetida à separação por CLAE-UV ($\lambda_{\text{max}} = 254$ e 360 nm) em coluna de fase-reversa semi-preparativa C8 (InertSustain, 250 x 10 mm, 5 μm), eluída com 2 mL.min⁻¹ da mistura de solventes H₂O:MeOH (50:50, v/v) (Figura 32).

A fração D8-R9-C2 (12,0 mg) foi purificada por CLAE-UV ($\lambda_{\text{max}} = 254$ e 330 nm) em coluna de fase-reversa semi-preparativa C18 (InertSustain, 250 x 10 mm, 5 μm), eluída com 2 mL.min⁻¹ da mistura de solventes H₂O:MeOH (45:55, v/v) (Figura 33).

Figura 32: Cromatograma de separação da fração D8-R9-C, monitorado nos comprimentos de ondas de 254 (a) e 360 nm (b).

Figura 33: Cromatograma de separação da fração D8-R9-C2, monitorado no comprimento de onda de 254 nm.

A fração D8-R9-C3 (4,9 mg) foi purificada por CLAE-UV ($\lambda_{\text{max}} = 254$ e 220 nm) em coluna de fase-reversa semi-preparativa C18 (InertSustain, 250 x 10 mm, 5 μm), eluída com 2 mL.min⁻¹ da mistura de solventes H₂O:MeOH (45:55, v/v) (Figura 34).

A fração D8-R9-D (35,5 mg) foi submetida à separação por CLAE-UV ($\lambda_{\text{max}} = 254$ e 330 nm) em coluna de fase-reversa semi-preparativa C18 (InertSustain, 250 x 10 mm, 5 μm), eluída com 2 mL.min⁻¹ da mistura de solventes H₂O:MeOH (50:50, v/v) (Figura 35).

As frações foram evaporadas e analisadas por CLAE-UV-EM. As frações D8-R9-B2A (2,7 mg), D8-R9-C2A (7,3 mg), D8-R9-C2B (2,0 mg), D8-R9-C3A (1,2 mg) e D8-R9-D4 (7,3 mg) apresentaram grau de pureza satisfatório e foram analisadas por RMN de ¹H, ¹³C, COSY, HSQC, HMBC e NOESY, EMAR, UV, IR, CD e $[\alpha]_D$.

Figura 34: Cromatograma de separação da fração D8-R9-C3, monitorado no comprimento de onda de 254 nm.

Figura 35: Cromatograma de separação da fração D8-R9-D, monitorado no comprimento de onda de 254 nm.

3.3.3. Ensaio de inibição do PAF-R

Células tumorais formadoras de queratina HeLa (KB) transduzidas com o receptor do PAF e que expressam receptores do PAF (KBP) e células resistentes, deficientes de receptores do PAF, transduzidas com vetor retroviral MSCV2.1 (KBM) foram transfectadas com o receptor do PAF (PAF-R). 1-hexadecil-2-N-metil carbamoil-glicerofosfocolina (cPAF) foi adicionada e células KBM/KBP incubadas por 6 h a 37 °C e 5% CO₂. Os sobrenadantes foram coletados e a concentração de Interleucina 8 (IL-8) foi determinada por ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA – do inglês, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) de acordo com as instruções do fabricante (R&D Systems, Minneapolis, EUA). Como controle positivo da produção de IL-8 por células KBP e KBM foi adicionado cPAF (10 nM) ou de um queratinócito que não sintetizam quantidades apreciáveis de IL-8 (PMA, 10 nM).

A linhagem de carcinoma de linfócitos (TC-1) foi cultivada no meio de cultura celular RPMI 10% SFB (Soro Fetal Bovino) a 37 °C e 5% CO₂ por 24 horas (2x10⁵ células/poço) e irradiadas com 2, 4 ou 8 Gy. Adicionalmente, 1000 células TC-1 Luc (que expressam o gene da luciferase) foram pré-tratadas ou não com antagonistas comerciais do receptor do PAF (WEB, PCA ou CV 10 uM ou com as fomactinas presentes nas frações D8-R9-C1 e D8-R9-C2) e adicionadas nas culturas de TC-1 irradiadas. Após 9 dias de cultura, o substrato D-luciferina foi adicionado em cada poço na concentração final de 150 µg.ml⁻¹ e, logo em seguida, foi iniciada a leitura no sistema IVis (imagem *In Vivo*, do inglês *In Vivo* imaging system).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Estudo químico da linhagem bacteriana *Pseudovibrio denitrificans* (Ab134).

As linhagens bacterianas fornecidas pelo Professor Fabiano Thompson foram isoladas de tecidos da esponja *A. brasiliensis*, como parte de estudo com o objetivo de produzir novas moléculas bioativas. As linhagens fornecidas apresentaram atividade antibiótica contra *B. subtilis* e *Vibrio sinaloensis* em ensaios realizados em placas de Petri (RUA *et al.*, 2014).

A investigação dos isolados de *A. brasiliensis* iniciou-se pelo estabelecimento dos modos de cultivo e extração mais adequados para obtenção dos extratos dos meios de cultura.

Três das linhagens bacterianas foram aleatoriamente selecionadas para os testes de determinação dos modos de cultivo e extração: *P. ascidiaceicola* Ab132 e *P. denitrificans* Ab133 e Ab134. As três linhagens selecionadas foram cultivadas em três diferentes métodos, utilizando-se como meio de cultura líquido Marine Broth. No primeiro método, as linhagens foram cultivadas em meio líquido. Após o período de cultivo, o meio de cultura e pellets obtidos após centrifugação foram separadamente extraídos com AcOEt e MeOH, respectivamente. Nos segundo e terceiro métodos as linhagens foram cultivadas sem ou com a mistura de resinas XAD -2, -4 e -7, respectivamente. As resinas foram previamente autoclavadas separadamente (seção 3.2.1 item II) ou junto com o meio de cultura (seção 3.2.1 item III). Após o período de cultivo, a mistura de resinas foi separada do meio de cultura por filtração e extraída com MeOH e acetona. Todos os extratos obtidos dos meios cultura foram desengordurados e filtrados para posterior análise por CLAE-UV-EM do perfil metabólico produzido pelas linhagens bacterianas.

Serão apresentados como exemplos os resultados observados para a linhagem Ab134. As demais linhagens apresentaram resultados semelhantes aos da linhagem Ab134. O primeiro método testado forneceu extrato AcOEt do meio de cultura com baixo rendimento (9,7 mg). O perfil metabólico obtido da análise por CLAE-UV-EM apresentou baixa diversidade de picos (Figura 36). Os picos observados também estavam presentes nos extratos obtidos pelos outros métodos. O extrato obtido da extração do pellet com MeOH, no mesmo experimento, não apresentou perfil metabólico com picos significativos.

Os experimentos com adição da mistura de resinas após ou antes do período de cultivo apresentaram extratos do meio de cultura com melhores rendimentos (17,3 e 23,4, respectivamente). O perfil metabólico obtido da análise por CLAE-UV-EM apresentou maior diversidade de picos tanto para o cultivo com adição da mistura de resinas após (Figura 37) ou antes (Figura 38) do período de cultivo.

Figura 36: Perfil metabólico do experimento descrito na seção 3.2.1 item I (Cultivo em meio líquido Marine Broth, seguido de extração do meio de cultura com AcOEt). Método de análise CLAE-UV-EM: Coluna e eluição conforme descrito na seção 3.1.1. (Cromatograma de UV, $\lambda = 254$ nm).

Figura 37: Perfil metabólico do experimento descrito na seção 3.2.1 item II (Cultivo em meio líquido Marine Broth, seguido de adição da mistura de resinas e extração da mistura de resinas com MeOH e acetona). Método de análise CLAE-UV-EM: Coluna e eluição conforme descrito na seção 3.1.1. (Cromatograma de UV, $\lambda = 254$ nm).

Figura 38: Perfil metabólico do experimento descrito na seção 3.2.1 item III (Cultivo em meio líquido Marine Broth + mistura de resinas, seguido de extração da mistura de resinas com MeOH e acetona). Método de análise CLAE-UV-EM: Coluna e eluição conforme descrito na seção 3.1.1. (Cromatograma de UV, $\lambda = 254$ nm).

A avaliação do perfil metabólico produzido pelas demais 26 linhagens bacterianas foi realizado de acordo com o método descrito na seção 3.2.1 item III. Este método apresentou maior diversidade de picos, de acordo com a análise por CLAE-UV-EM dos extratos obtidos, bem como um melhor rendimento em massa do extrato obtido do meio de cultura, quando comparado aos outros experimentos testados.

A mistura de resinas XAD -2, -4 e -7 utilizada neste trabalho apresenta variação na polaridade e propriedades de adsorção. Desta forma, o uso da mistura de resinas XAD -2, -4 e -7 pode contribuir para maximizar a extração dos metabólitos produzidos no meio de cultura e reduzir a concentração de tais metabólitos no meio de cultivo, propiciando a contínua produção dos mesmos pelas linhagens bacterianas. Além disso, algumas linhagens produzem uma camada fina de biofilme quando cultivadas em meio de cultura líquido, a exemplo da linhagem bacteriana *P. denitrificans* Ab134 (Figura 39). A presença da mistura de resinas durante o período de cultivo dificulta a formação do biofilme pela perturbação mecânica da resina contra a parede dos frascos contendo o meio de cultura. A produção de biofilmes por linhagens bacterianas é regulada por sinalização intercelular *quorum sensing*, também responsável por processos como a capacidade de habitar ambientes diversos, captar as informações de seu meio, comunicar-se com diferentes espécies, monitorar sua densidade populacional e principalmente regular a sua expressão gênica (BAI & RAI, 2011; MILLER & BASSLER, 2001).

Figura 39: Frascos Schott contendo camada de biofilme formado durante o período de cultivo da linhagem *P. denitrificans* Ab134 no meio de cultura Marine Broth.

Os extratos obtidos dos meios de cultura das demais linhagens bacterianas, quando cultivadas em meio líquido + mistura de resinas, apresentaram perfis metabólicos com compostos de razão m/z coincidentes mesmo em linhagem de espécies diferentes.

Os íons $[M+H]^+$ 538,3 com tempo de retenção 19,9 minutos e $[M+H]^+$ 488,3 com tempo de retenção 21,1 minutos, por exemplo, estão presentes nas linhagens MC227 (*E. montiporae*), Ab161 (*B. pumilus*), Ab137 (*R. atlântica*) e Ab107 (*E. montiporae*) (Figura 40).

Figura 40: Espectros de massas dos compostos com íons $[M+H]^+$ 538,3 e 488,3 observados para o extrato obtido do meio de cultura da linhagem bacteriana *E. montiporae* MC 227.

Diante desse quadro, foi realizado o cultivo de uma das linhagens bacterianas em maior volume com o objetivo de melhor conhecer o perfil metabólico produzido no meio de cultura líquido e verificar se o método de cultivo e extração escolhido foi eficiente para acessar o metabolismo secundário dessas linhagens.

A linhagem bacteriana *P. denitrificans* (Ab134) foi cultivada em 3,7 L do meio de cultura líquido Marine Broth, seguindo o método apresentado na seção 3.2.1 item III. O extrato obtido do meio de cultura foi desengordurado, filtrado e submetido à separação em coluna empacotada com a fase estacionária Sephadex® LH-20. A análise por CLAE-UV-EM, das frações obtidas da separação, indicou a presença de compostos bromados. A fração Ab134-I, por exemplo, apresentou íons com padrões isotópicos característicos de compostos bromados com tempos de retenção 18,4 minutos ($[M+H]^+$ 656,8 / 658,8 / 660,8) e 19,1 minutos ($[M+H]^+$ 494,0 / 496,0 / 498,0) (Figura 41). As frações foram submetidas à etapas sucessivas de separação e purificação e os metabólitos puros foram analisados por técnicas espectroscópicas para identificação de suas estruturas.

Figura 41: Espectros de massas de baixa resolução dos compostos com íons $[M+H]^+$ 656,8 / 658,8 / 660,8 e 494,0 / 496,0 / 498,0 observados na fração Ab134-I.

O isolamento e análise por técnicas espectroscópicas dos metabólitos bromados produzidos no meio de cultura da linhagem bacteriana *P. denitrificans* permitiu a identificação de três derivados de dibromotirosinas: a fistularina-3 (**26**), o ácido verongidoico (**27**) e a 11-hidroxi-aerotionina (**28**) (Figura 42). Além disso, análises por CLUE-qTOF-EMAR permitiram a detecção de outros quatro derivados de dibromotirosinas (aerotionina (**29**), um éster do ácido purpurocerático B (**30**), purealidina L (**31**), aplisinamisina II (**32**)) (Figura 43).

Neste trabalho, relatamos pela primeira vez o isolamento de derivados de dibromotirosina a partir de uma linhagem bacteriana. Tais compostos nunca foram isolados de *A. brasiliensis*, esponja a partir da qual foi obtida a linhagem bacteriana, no entanto são comumente observados em esponjas da ordem Verongida. A produção dos derivados de dibromotirosina a partir do cultivo de uma linhagem bacteriana é um forte indício de que tais compostos são na verdade biossintetizados pela microbiota associada às esponjas das quais foram previamente isolados.

Figura 42: Compostos isolados do meio de cultura da linhagem bacteriana *P. denitrificans* Ab134.

Figura 43: Compostos detectados no meio de cultura da linhagem bacteriana *P. denitrificans* Ab134.

4.1.1. Isolamento e identificação da fistularina-3 (26, fração Ab134-C23C).

O composto presente na fração Ab134-C23C foi analisado por CLUE-qTOF (Figura 44) e apresentou íon $[M+H]^+ = 1108,7085$ com padrão de distribuição isotópica típica para a presença de 6 átomos de bromo. No espectro de UV foram observadas bandas de absorção de maior intensidade nos comprimentos de ondas de 206, 232 e 286 nm (Figura 45). A análise dos espectros de massas de alta resolução e de absorções no UV do composto presente na fração Ab134-C23C e comparação com dados obtidos anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa (SILVA *et al.*, 2010) levou à identificação do mesmo como sendo a fistularina-3 (26).

Figura 44: Espectro de massas de alta resolução (ESI+) da fistularina-3 (26, fração Ab134-C23C).

Figura 45: Espectro de absorção no UV da fistularina-3 (**26**, fração Ab134-C23C, MeOH).

A análise dos espectros de RMN uni e bidimensionais (Apêndice 1 – 5) confirmou a identificação da estrutura da fistularina-3 (**26**, Figura 46). O espectro de RMN de ^1H (Apêndice 1), avaliado em conjunto com as correlações obtidas no espectro HSQC (Apêndice 3), apresenta dois sinais com deslocamentos químicos em δ 8,40 e 8,44 atribuídos a hidrogênios de grupos amida; um sinal em δ 7,57 atribuídos aos hidrogênios do anel aromático tetrasubstituído; dois sinais em δ 6,58 e 6,59 atribuídos aos hidrogênios dos anéis ciclohexadieno; dois sinais em δ 3,59 e 3,21 atribuídos aos quatro hidrogênios dos anéis oxazolidínicos; um sinal em δ 3,91 atribuído aos hidrogênios dos carbonos ligados às hidroxilas e um sinal em δ 3,65 atribuído aos hidrogênios de metoxilas de dois sistemas espiroxazolidínicos idênticos. Foram observados cinco sinais com deslocamentos químicos em δ 3,48, 3,91 e 4,06, 3,42 e 3,82 atribuídos à hidrogênios de grupos metileno funcionalizados; dois sinais em δ 6,38 e 4,67 atribuídos aos hidrogênios de carbonos ligados à hidroxilas e sinais em δ 5,74 e 5,29 atribuídos às hidroxilas das cadeias alifáticas centrais.

O espectro de RMN de ^{13}C (Apêndice 2) apresenta dois sinais com deslocamentos químicos em δ 159,1 e 159,0 atribuídos a carbonos de amidas; um sinal em δ 154,5 atribuídos aos carbonos ligados aos nitrogênios dos sistemas espiroxazolidínicos; dez sinais na faixa de δ 113 – 152 atribuídos aos carbonos sp^2 dos sistemas espiroxazolidínicos e do anel aromático tetrasubstituído. Também foram observados dois sinais em δ 90,3 e 90,2 e um sinal em δ 73,5

atribuídos aos carbonos ligados a oxigênio, sendo o último de hidrogênios de hidroxilas; dois sinais em δ 60,2 e 59,6 atribuídos às metoxilas e um sinal em δ 39,6, sobreposto ao sinal do solvente, atribuído aos carbonos metilênicos dos sistemas espiroxazolidínicos.

Os sinais observados em δ 72,3 e 68,0 foram atribuídos aos carbonos ligados a hidroxilas, e os sinais em δ 42,6, 46,3 e 75,4 foram atribuídos aos carbonos metilênicos, sendo o último aquele ligado à oxigênio do grupo éter, da cadeia alifática central.

As correlações observadas nos espectros COSY e HMBC são apresentadas na figura 47.

Figura 46: Estrutura da fistularina-3 (**26**, fração Ab134-C23C).

Figura 47: Correlações COSY (—) e HMBC (→) observadas para a fistularina-3 (**26**, fração Ab134-C23C).

A tabela 2 apresenta a comparação dos dados de RMN de ¹H e ¹³C obtidos para a fistularina-3 (**26**) presente na fração Ab134-C23C e dos dados apresentados pelo ex-aluno do nosso grupo de pesquisa Fábio R. Pereira (dissertação de mestrado).

Tabela 2: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da fistularina-3 (**26**, Ab134-C23C).

Fistularina-3 (26)				
Carbono	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$	δ_{H} (J em Hz) ^c	δ_{H} (J em Hz) ^d
1, 1'	73,5	74,5	3,91, 2H, sobrep.	3,90, 2H, s
2, 2'	120,9	120,8	-	-
3, 3'	147,1	147,1	-	-
4, 4'	113,1	113,0	-	-
5, 5'	131,1	131,2	6,58, 1H, s	6,57, 2H, s
	131,2		6,59, 1H, s	
6, 6'	90,2	90,3	-	-
7, 7'	39,6	39,6	3,21, 2H, d (18)	3,2, 2H, d (16,8)
			3,59, 2H, d (18)	3,6, 2H, d (16,8)
8, 8'	154,5	154,4	-	-
9, 9'	159, 0	159,1	-	-
	159, 1	158,2		
10	42,6	42,5	3,48, 2H, m	3,4, sobrep. Solvente
11	68,0	68,0	6,38, 1H, t (8,5)	4,07, 1H, m
12	75,4	75,4	3,91, 1H, m	3,88, 1H, m
			4,06, 1H. m	3,95, 1H, m
13	151,2	152,4	-	-
14, 14'	117,2	117,7	-	-
15, 15'	130,5	130,4	7,57, 2H, s	7,68, 2H, s
16	142,7	138,6	-	-
17	72,3	74,4	4,67, 1H, br s	5,57, 1H, t (7,6)
18	46,3	47,0	3,42, 1H, m	3,38, 1H, m
			3,82, 1H, m	3,80, 1H, m
O-Me	59,6	59,6	3,65, 6H, s	3,65, 6H, s
O-Me'	60,2			
11-OH	-	-	5,29, 1H, br s	5,26, 1H, s
17-OH	-	-	5,74, 1H, br s	6,37, 1H, d (7,8)
9,9'-NH			8,40, 1H, t (5,7)	7,74, 1H, s
			8,44, 1H, t (5,7)	8,36, 1H, d (5,7)

a - DMSO- d_6 , 100 MHz, b - DMSO- d_6 , 125 MHz, c - DMSO- d_6 , 600 MHz, d - DMSO- d_6 , 400 MHz.

b, d – PEREIRA, F. R. (Dissertação de mestrado, 2006)

A configuração absoluta dos dois sistemas espiroxazolidínicos da fistularina-3 (**26**) foi confirmada por comparação dos dados de $[\alpha]_D$ e de dicroísmo circular (Figura 48). Segundo estudo publicado por McMillan *et al.* (1981), a aerotionina (**29**) foi avaliada por espectrometria de Raios-X, DC, $[\alpha]_D$ e teve sua configuração absoluta assinalada como 1(*R*), 6(*S*), 1'(*R*), 6'(*S*). A análise por DC forneceu efeito Cotton positivo e $[\alpha]_D + 210^\circ$ (*c* 1,7, metanol). A fistularina-3 (**26**) isolada neste trabalho também apresentou na análise por DC efeito Cotton positivo e $[\alpha]_D + 120$ (*c* 1, MeOH), semelhantes aos relatados por McMillan *et al.* (1981) para a aerotionina (**29**). A configuração absoluta foi assim estabelecida como 1(*R*), 6(*S*), 1'(*R*), 6'(*S*).

Figura 48: Espectro de dicroísmo circular da fistularina-3 (**26**, fração Ab134-C23C) (MeOH, *c* = 0.1 mg/mL).

Fistularina-3 (**26**): pó amorfo branco; $[\alpha]_D^{23} + 120$ (*c* 1, MeOH), lit. (GOPICHAND & SCHMITZ, 1979) $[\alpha]_D + 100$ (*c* 1, MeOH); UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 206 (4,4), 232 (4,0), 286 (3,7) nm; DC (*c* 0,1, MeOH) $\lambda_{\max}$ ($\Delta\epsilon$) 293 (5,4), 292 (5,7); IR $\nu_{\max}$ 3315, 2938, 2841, 1657, 1586, 1432 cm^{-1} ; dados de RMN de ^1H (600 MHz) e ^{13}C (100 MHz), Tabela 2; EMAR-ESI m/z 1108,7085 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (calc. para $\text{C}_{31}\text{H}_{30}\text{Br}_6\text{N}_4\text{O}_{11}$, 1108,7084).

4.1.2. Isolamento e identificação do ácido verongidoico (27, fração Ab134-FI13-B2).

A análise por CLUE-qTOF (Figura 49) do composto presente na fração Ab134-FI13-B2 apresentou íon $[M]^+ = 380,9092$ com padrão de distribuição isotópica que indica a presença de 2 átomos de bromo. Foram observadas, no espectro de UV, bandas de absorção de maior intensidade nos comprimentos de ondas de 229 e 286 nm (Figura 50). A análise do espectro de massas de alta resolução e de absorções no UV do composto presente na fração Ab134-FI13-B2 e comparação com dados publicados na literatura (AIELLO *et al.*, 1995) levou a identificação do mesmo como sendo o ácido verongidoico (27).

Figura 49: Espectro de massas de alta resolução (ESI+) do ácido verongidoico (27, fração Ab134- FI123-B2).

Figura 50: Espectro de absorção no UV do ácido verongidoico (**27**, fração Ab134-FI13-B2, MeOH).

A estrutura do ácido verongidoico (**27**, Figura 51) foi confirmada pela análise dos espectros de RMN uni e bidimensionais (Apêndice 6 – 10). O espectro de RMN de ^1H (Apêndice 6), avaliado em conjunto com as correlações obtidas no espectro HSQC (Apêndice 8), apresenta um sinal com deslocamento químico em δ 6,56 atribuído ao hidrogênio do anel ciclohexadieno; dois sinais em δ 3,59 e 3,17 atribuídos aos hidrogênios do anel oxazolidínico; um sinal em δ 3,91 atribuído ao hidrogênio do carbono ligado à hidroxila; um sinal em 6,33 atribuído ao hidrogênio da hidroxila e um sinal em δ 3,64 atribuído ao hidrogênio de metoxila do sistema espiroxazolidínico.

O espectro de RMN de ^{13}C (Apêndice 7) apresenta sinal com deslocamento químico em δ 160,9 atribuído ao carbono carboxílico; um sinal em δ 154,7 atribuído ao carbono ligado ao nitrogênio do sistema espiroxazolidínico; quatro sinais na faixa de δ 113 – 148 atribuídos aos carbonos sp^2 do anel ciclohexadieno. Foram observado dois sinais em δ 90,5 e 73,8 atribuídos aos carbonos ligados a oxigênio, sendo o último ligado à oxigênio de hidroxila; um sinal em δ 59,8 atribuído à metoxila e um sinal em δ 39,9, sobreposto ao sinal do solvente, atribuído ao carbono metilênico do sistema espiroxazolidínico.

A correlações observadas nos espectros COSY e HMBC do ácido verongidoico (**27**) são apresentadas na figura 52.

Figura 51: Estrutura do ácido verongidoico (**27**, fração Ab134- FI13-B2).

Figura 52: Correlações COSY (—) e HMBC (—→) observadas para o ácido verongidoico (**27**, fração Ab134-FI13-B2).

A tabela 3 apresenta a comparação dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C obtidos para o ácido verongidoico (**27**) presente na fração Ab134-FI13-B2 e dos dados apresentados na literatura (AIELLO, et. al, 1995).

Tabela 3: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do ácido verongidoico (**27**, Ab134-FI13-B2).

Ácido verongidoico (27)				
Carbono	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$	δ_{H} (J em Hz) ^c	δ_{H} (J em Hz) ^d
1	73,8	75,8	3,91, 1H, d (7,8)	4,10, 1H, br s
2	113,3	114,9	-	-
3	147,3	149,1	-	-
4	120,9	123,5	-	-
5	131,5	133,8	6,56, 1H, s	6,40, 1H, br s
6	90,5	91,9	-	-
7	39,9	42,0	3,17, sobrep. solvente 3,59, 1H, d (18)	3,06, 1H, d (18) 3,80, 1H, d (18)
8	154,7	157,9	-	-
9	160,9	172,0	-	-
O-Me	59,8	60,0	3,64, 3H, s	3,80, 3H, s
1-OH	-	-	6,33, 1H. d (8,0)	

a – DMSO- d_6 , 100 MHz, b – MeOH- d_4 , 100 MHz, c - DMSO- d_6 , 600 MHz, d – MeOH- d_4 , 500 MHz.

b, d – AIELLO *et al.* (1995).

A configuração absoluta do ácido verongidoico (**27**) foi confirmada por comparação dos dados de $[\alpha]_{\text{D}}$ e de dicroísmo circular (Figura 53) (MCMILLAN *et al.*, 1981), e estabelecida como 1(*R*), 6(*S*). A estrutura isolada neste trabalho é um entantiômero da estrutura isolada por Aiello *et al.* (1995). Aiello *et al.* (1995) relata uma estrutura cujo espectro de DC apresenta efeito Cotton negativo e estereoquímica absoluta 1(*S*), 6 (*R*).

Acido verongidoico (27): pó amorfo branco; $[\alpha]_{\text{D}}^{23} +140$ (c 1,1, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 229 (3,6), 286 (3,3) nm; DC (c 0,1, MeOH) λ_{max} ($\Delta\epsilon$) 249 (9,4), 292 (5,3) [**1R**, **6S**], lit. (AIELLO *et al.*, 1995) λ_{max} ($\Delta\epsilon$) 245 (-9,1), 284 (-6,3) [**1S**, **6R**]; IV ν_{max} 3318, 2939, 2842, 1691, 1594, 1430 cm^{-1} ; dados de RMN de ^1H (600 MHz) e ^{13}C (100 MHz), Tabela 3; EMAR-ESI m/z 380,9092 $[\text{M}]^+$ (calc. para $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{Br}_2\text{NO}_5$, 380,8847).

Figura 53: Espectro de dicroísmo circular do ácido verongidoico (**27**, fração Ab134- FI13-B2) (MeOH, $c = 0.1$ mg/mL).

4.1.3. Isolamento e identificação da 11-hidroxiaerotionina (**28**, fração Ab134-FI13-E2).

O composto presente na fração Ab134-FI13-E2 foi analisado por CLUE-qTOF (Figura 54) e apresentou íon $[M+H]^+ = 830,8531$ com padrão de distribuição isotópica típica para a presença de 4 átomos de bromo. No espectro de UV foram observadas bandas de absorção de maior intensidade nos comprimentos de ondas de 200, 229 e 285 nm (Figura 55). A análise do espectro de massas de alta resolução e de absorções no UV do composto presente na fração Ab134-FI13-E2 e comparação com dados publicados na literatura (KERNAN & CAMBIE, 1990) levou à identificação do mesmo como sendo a 11-hidroxiaerotionina (**28**).

Figura 54: Espectro de massas de alta resolução (ESI+) da 11-hidroxiarotina (**28**, fração Ab134-FI13-E2).

Figura 55: Espectro de absorção no UV da 11-hidroxiarotina (**28**, fração Ab134- FI13-E2, MeOH).

A análise dos espectros de RMN uni e bidimensionais (Apêndice 11 – 15) confirmou a identificação da estrutura da 11-hidroxiaerotionina (**28**, Figura 56). O espectro de RMN de ^1H (Apêndice 11), avaliado em conjunto com as correlações obtidas no espectro HSQC (Apêndice 13), apresenta um sinal com deslocamento químico em δ 6,56 atribuído aos hidrogênios dos anéis ciclohexadieno; dois sinais em δ 3,60 e 3,18 atribuídos aos hidrogênios dos anéis oxazolidínicos; um sinal em δ 3,91 atribuído aos hidrogênios dos carbonos ligados às hidroxilas; um sinal em δ 6,35 atribuído aos hidrogênios das hidroxilas e um sinal em δ 3,64 atribuído aos hidrogênios das metoxilas dos sistemas espiroxazolidínicos idênticos. Foram observados três sinais com deslocamentos químicos em δ 3,18, 1,61 e 1,43 atribuídos aos hidrogênios metilênicos e um sinal em δ 3,60 atribuído ao hidrogênio metínico ligado à hidroxila da cadeia central.

No espectro de RMN de ^{13}C (Apêndice 12) foram observados dois sinais com deslocamentos químicos em δ 159,1 e 158,9 atribuídos aos carbonos de amidas; dois sinais em δ 154,7 atribuídos aos carbonos ligados ao nitrogênio dos sistemas espiroxazolidínicos; dez sinais na faixa de δ 113 – 148 atribuídos aos carbonos sp^2 dos sistemas. Foram observados dois sinais em δ 90,4 e 73,7 atribuídos aos carbonos ligados a oxigênio, sendo o último ligado à oxigênio de hidroxilas; um sinal em δ 59,8 atribuído às metoxilas e em sinal em δ 40,6, sobreposto ao sinal do solvente, atribuído aos carbonos metilênicos dos sistemas espiroxazolidínicos. O sinal observado em δ 67,1 foi atribuído ao carbono C11 ligado à hidroxila. Os três sinais em δ 45,4, 36,3 e 34,0 foram atribuídos aos carbonos metilênicos da cadeia alifática central.

Figura 56: Estrutura da 11-hidroxiaerotionina (**28**, fração Ab134- FI13-E2).

Figura 57: Correlações COSY (—) e HMBC (→) observadas para a 11-hidroxiaerotionina (**28**, fração Ab134- FI13-E2).

A correlações observadas nos espectros COSY e HMBC para a 11-hidroxiaerotionina (**28**) são apresentadas na figura 57.

A tabela 4 apresenta a comparação dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C obtidos para a 11-hidroxiaerotionina (**28**) presente na fração Ab134- FI13-E2 e dos dados apresentados na literatura.

Tabela 4: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da 11-hidroxiaerotionina (**28**, Ab134- FI13-E2).

11-hidroxiaerotionina (28)				
Carbono	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$	δ_{H} (J em Hz) ^c	δ_{H} (J em Hz) ^d
1	73,7	73,8	3,91, 2H, s	4,11, 2H, s
2	121,0	121,4 121,3	-	-
3	147,3	147,7	-	-
4	113,3	113,1	-	-
5	131,4	130,6	6,56, 2H, s	6,17, 2H, s
6	90,4	91,9 91,8	-	-
7	40,6	38,7	3,60, sobrep. 3,18, sobrep.	3,71, 2H, d (18) 2,85, 2H, d (18)
8	154,7	153,9	-	-
9	159,1 158,9	160,0	-	-
10	36,3	36,2	3,18, sobrep.	3,46, 1H, dd (14,3) 3,32, 1H, dd (14,7)
11	67,1	68,0	3,60, sobrep.	3,60, 1H, m
12	45,4	45,0	1,61, 1H, m 1,43, 1H, m	1,73, 1H, m 1,61, 1H, m
13	34,0	33,6	3,18, sobrep.	3,55, 1H, m 3,37, 1H, m
O-Me	59,8	60,0	3,64, 6H, s	3,59, 6H, s
1-OH	-	-	6,35, 2H, s	-
NH	-	-	8,26, 1H, t (5,7)	-
NH'	-	-	8,41, 1H, t (5,7)	-

a – DMSO- d_6 , 100 MHz, b – CDCl₃, 100 MHz, c - DMSO- d_6 , 600 MHz, d – CDCl₃, 400 MHz.
b, d – KERNAN & CAMBIE (1990)

A configuração absoluta da 11-hidroxiaerotionina (**28**) foi confirmada por comparação dos dados de $[\alpha]_{\text{D}}$ e de dicroísmo circular (Figura 58) (MCMILLAN *et al.*, 1981; KERNAN & CAMBIE, 1990), a configuração absoluta foi identificada como 1(*R*), 6(*S*), 1'(*R*), 6'(*S*).

Figura 58: Espectro de dicroísmo circular da 11-hidroxiaerotionina (**28**, fração Ab134-FI13-E2) (MeOH, $c = 0.1$ mg/mL).

11-hidroxiaerotionina (**28**): pó amorfo branco; $[\alpha]_D^{23} +200$ (c 0,5, MeOH), lit. (KERNAN & CAMBIE, 1990) $[\alpha]_D +190$ (c 0,5, MeOH); UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ ($\log \epsilon$) 229 (3,6), 285 (3,4) nm; DC (c 0,1, MeOH) $\lambda_{\max}$ ($\Delta\epsilon$) 250 (8,2), 291 (7,9); IV $\nu_{\max}$ 3336, 2939, 2835, 1657, 1587, 1546, 1427 cm^{-1} ; dados de RMN de ^1H (600 MHz) e ^{13}C (100 MHz), Tabela 4; EMAR-ESI m/z 830,8531 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (calc. para $\text{C}_{24}\text{H}_{27}\text{Br}_4\text{N}_4\text{O}_9$, 830,8506).

4.1.4. Outros derivados da dibromotirosina.

Outros quatro derivados da dibromotirosina foram detectados em frações obtidas a partir do extrato das resinas XAD -2, -4 e -7 adicionadas ao meio de cultura de *P. denitrificans* Ab134 por CLUE-qTOF. Esses compostos tiveram suas estruturas propostas de acordo com a análise de espectros de massas de alta resolução. São eles: aerotionina (**29**), um éster do ácido purpurocerático B (**30**), purealidina L (**31**) e aplisinamisina II (**32**).

A aerotionina (**29**) (MOODY *et al.*, 1972) apresentou íon quasi-molecular $[\text{M}+\text{H}]^+ = 814,8573$ e íon aduto de sódio $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 836,8323$ (Figura 59), com padrão de distribuição isotópica típica para a presença de 4 átomos de bromo. No espectro de massas de alta resolução é possível observar os íons fragmentos com $m/z = 477,9598$ e $292,8802$, que permitiram propor a fragmentação da molécula conforme esquema da figura 60. A primeira fragmentação ocorre pela perda de um dos sistemas espiroxazolidínico, gerando o íon 477, seguido pela perda da

cadeia central e rearranjo do sistema espiroxazolidínico remanescente, que gera o íon 292. A fragmentação observada está de acordo com a proposta para a aerotionina (**29**) por SILVA *et al.* (2010).

Figura 59: Espectro CLUE-qTOF da aerotionina (**29**).

Figura 60: Esquema de fragmentação observada para a aerotionina (**29**).

O éster metílico do ácido purpurocerático B (**30**) (KIJOA *et al.*, 2005) apresentou íon quasi-molecular $[M+H]^+ = 480,9595$ e íon aduto de sódio $[M+Na]^+ = 502,9421$ (Figura 61), com padrão de distribuição isotópica típica para a presença de 2 átomos de bromo. No espectro de massas de alta resolução é possível observar o íon fragmento com $m/z = 292,8813$, que permitiu propor a fragmentação da molécula conforme esquema da figura 62. A fragmentação ocorre pela perda da cadeia central e rearranjo do sistema espiroxazolidínico remanescente, que gera o íon 292.

Figura 61: Espectro CLUE-qTOF do éster metílico do ácido purpurocerático B (**30**).

A estrutura aqui apresentada para o éster do ácido purpurocerático (**30**) foi corrigida a partir da estrutura do ácido purpurocerático apresentada na literatura por Kijjoa *et al.* (2005). No artigo de Kijjoa *et al.* (2005) tal estrutura foi desenhada com uma metila ligada ao anel ciclohexadieno. Essa metila foi erroneamente desenhada uma vez que os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , obtidos no isolamento original, não apresentam os sinais característicos para uma metila na posição indicada pelos autores.

A purealidina L (**31**) (KOBAYASHI *et al.*, 1995) apresentou íon quasi-molecular $[\text{M}+\text{H}]^+ = 494,0033$ (Figura 63), com padrão de distribuição isotópica típica para a presença de 2 átomos de bromo. No espectro de massas de alta resolução é possível observar os íons fragmentos com $m/z = 434,9557$, $292,8813$ e $157,1078$, que permitiram propor a fragmentação da molécula conforme esquema da figura 64. A primeira fragmentação ocorre pela perda da porção guanidina, gerando o íon 434, seguido pela perda da cadeia central e rearranjo do sistema espiroxazolidínico remanescente, que gera o íon 292. O fragmento central ligado à porção guanidina representa o terceiro fragmento, que gera o íon 157.

Figura 63: Espectro CLUE-qTOF (modo MS^E) da purealidina L (**31**).

Figura 64: Esquema de fragmentação observada para a purealidina L (**31**).

A aplisinamisina II (**32**) (RODRIGUEZ & PINA, 1993) apresentou íon quasi-molecular $[\text{M}+\text{H}]^+ = 508, 0195$ (Figura 65), com padrão de distribuição isotópica típica para a presença de 2 átomos de bromo. No espectro de massas de alta resolução é possível observar o íon fragmento com $m/z = 171,1239$, que permitiu propor a fragmentação da molécula conforme esquema da figura 66. A fragmentação ocorre pela perda do sistema espiroxazolidínico, gerando o íon 171.

Os derivados da dibromotirosina constituem os primeiros metabólitos secundários descritos na literatura para esponjas marinhas. Estes compostos ainda despertam interesse por suas diversas atividades biológicas: antimicrobiana, anticâncer, antiincrustante, antiviral, regulatória da ATPase, moduladora de canal de cálcio, entre outras (PENG *et al.*, 2005, PUYANA *et al.*, 2015). A aeroplisinina-1, por exemplo, apresentou promissora atividade anti-inflamatória, antiangiogênica, antitumoral (HT-1080, HTC-116, HeLa, THP-1, NOMO-1, HL-60), antibiótica (contra *B. cereus*, *B. subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus albus*, *Vibrio anguillarum*, *Flexibacter* sp. e *Moraxella* sp.) e antiviral (HIV-1) (GARCÍA-VILAS *et al.*, 2016). Na natureza, a aeroplisinina-1 parece estar associada à defesa química de esponjas do gênero *Aplysina*, como intermediária na conversão de derivados de dibromotirosina de maior

peso molecular – inativos – em dienona – ativa (Figura 67) (THOMS & SCHUPP, 2008; PROKSCH *et al.*, 2010).

Figura 65: Espectro CLUE-qTOF da aplisinamisina II (32).

Figura 66: Esquema de fragmentação observada para a aplisinamisina II (32).

Figura 67: Biotransformação da aerofobina-2 em dienona. (Figura adaptada de PROKSCH *et al.*, 2010)

Comumente produzidos por diversas espécies de esponjas da ordem Verongida, os derivados de dibromotirosina já foram considerados marcadores taxonômicos para esponjas desta ordem. No entanto, o isolamento destes metabólitos a partir de esponjas de gêneros não-correlatos, como *Pachychalina* sp. (ordem Haplosclerida), e até mesmo de algas marinhas e crinoides, enfraquece a correlação quimio-taxonômica (OLIVEIRA *et al.*, 2006; MERAGELMAN *et al.*, 2002; SHAO *et al.*, 2007) e leva ao questionamento de se tais compostos são mesmo produzidos por esponjas, a partir das quais são isolados, ou se são produzidos por linhagens da microbiota associada a estas esponjas.

As esponjas pertencem ao reino Porífera, o mais antigo filo metazoário (MULLER, 1998). Os microrganismos associados às esponjas compreendem algas, cianobactérias, arqueias e bactérias. As bactérias podem representar mais de 60% da biomassa de esponjas em uma associação evolucionária antiga, largamente distribuída e, em alguns casos, específica. A função das bactérias na associação com esponjas ainda é desconhecida. Estas associações podem ser benéficas para o hospedeiro como fonte de nutrição, fixação de nitrogênio e nitrificação, proteção contra radiação UV e produção de metabólitos secundários (FRIEDRICH *et al.*, 2001). Bactérias associadas às esponjas são representadas por diversos filis, como as *Proteobacteria*, *Chloroflexi*, *Cyanobacteria*, *Actinobacteria*, *Acidobacteria* e *Bacteroidetes* (SACRISTÁN-SORIANO *et al.*, 2011). O estudo da diversidade simbiótica da microbiota

associada às esponjas é essencial para a compreensão da ecologia de esponjas marinhas e possíveis aplicações biotecnológicas (RUA *et al.*, 2014; SACRISTÁN-SORIANO *et al.*, 2011).

A hipótese da produção de derivados de dibromotirosina por esponjas foi evidenciada pela presença de compostos bromados em células esferulosas de *Aplysina aerophoba* (TURON *et al.*, 2000). No entanto, enzimas que podem estar envolvidas na produção dos compostos halogenados, as haloperoxidases, são de origem microbiana, indicando que tais compostos, ou seus precursores, podem ser produzidos pela microbiota associada e depois transferidos/estocados pelas esponjas (BUTLER & WALKER 1993; FRIEDRICH *et al.*, 2001, SACRISTÁN-SORIANO *et al.*, 2011). Além disso, segundo Sacristán-Soriano *et al.* (2011), localização não necessariamente indica produção, já que os microrganismos são conhecidos por excretarem seus metabólitos no meio circundante.

Por outro lado, a confirmação da produção de tais compostos por bactérias é prejudicada pela dificuldade de cultivar todas as linhagens associadas às esponjas, além do que tais linhagens podem expressar seu metabolismo de forma diferente após seu isolamento do hospedeiro e assim não produzirem os compostos de interesse (TURON *et al.*, 2000). No projeto que deu origem a este trabalho, foi possível o isolamento de diversas linhagens bacterianas a partir de tecidos da esponja *A. brasiliensis*, entre elas linhagens dos gêneros *Endozoicomonas*, *Shewanella*, *Ruegeria*, *Pseudovibrio*, *Bacillus*, e *Paenibacillus*, que apresentaram atividade antibiótica e podem estar envolvidas na defesa química da esponja hospedeira para controle de patógenos (RUA *et al.*, 2014). No entanto, comparações entre métodos dependentes e independentes de cultivo mostram que muitos dos microrganismos detectados por estudos de metagenoma não são cultivados em meio de cultura, o que indica a necessidade de novas abordagens de cultivo para cultivar a diversidade bacteriana associada a esponjas (LAVY *et al.*, 2014).

A possibilidade de se estabelecer microrganismos como os verdadeiros produtores de compostos comumente isolados por esponjas pode eventualmente facilitar a obtenção da quantidade necessária destes compostos para ensaios clínicos de metabólitos potencialmente ativos para a criação de novos medicamentos (SACRISTÁN-SORIANO *et al.*, 2011). Entre os exemplos de metabólitos encontrados em esponjas já isolados de microrganismos estão as dicetopiperazinas (**33** – **35**) isoladas de *Tedania ignis* e *Micrococcus* sp. (SCHMITZ *et al.*, 1983; STIERLE *et al.*, 1988); o fenol polibromado (**36**) isolado de *Dysidea fragilis* e *Vibrio* sp. (ELYAKOV *et al.*, 1991; AGARWAL *et al.*, 2014); a 13-dimetilisodisidenina (**37**) isolada de esponjas do gênero *Dysidea* e detectadas em células da cianobactéria *Oscillatoria spongelliae* associada à esponja *Dysidea herbacea* (UNSON & FAULKNER, 1993); a andrimida (**38**)

isolada de *Hyatella* sp. e *Vibrio* M22-1 (OCLARIT *et al.*, 1994) e o alcaloide manzamina A (**39**) isolado de *Haliclona* sp. e *Micromonospora* sp. (SAKAI & HIGA, 1986; WATERS *et al.*, 2014).

As linhagens bacterianas estudadas neste trabalho foram isoladas de tecidos da esponja *A. brasiliensis*. A esponja *A. brasiliensis* pertence à ordem Haplosclerida. É endêmica na região de Cabo Frio – RJ – e é fonte de alcaloides com atividades citotóxica e antibiótica, as arenosclerinas A – C (**40** – **42**) e haliclociclamina E (**43**) (TORRES *et al.*, 2000; TORRES *et al.*, 2002). Os alcaloides isolados de *A. brasiliensis* foram testados por Torres *et al.* (2002) contra uma série de microrganismos: *S. aureus*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* e 10 outras linhagens de *S. aureus* resistente a antibióticos. Todos os alcaloides testados apresentaram atividade antibiótica contra *S. aureus*, *P. aeruginosa* e uma das linhagens de *S. aureus* resistente a antibióticos. Nenhum dos alcaloides foram ativos contra *E. coli* e *Candida albicans*. Além dos microrganismos já mencionados, a haliclociclamina E e as arenosclerinas A e C apresentaram atividade frente aos outros microrganismos testados e a arenosclerina B apresentou atividade contra outras três linhagens de *S. aureus* resistente a antibióticos. Além da atividade antibiótica, os alcaloides isolados de *A. brasiliensis* também apresentaram atividade citotóxica contra as linhagens tumorais de HL-60 (leucemia), L929 (fibrosarcoma), B16 (melanoma), U138 (cólon) com valores de IC₅₀ na faixa de 1,5 – 7,1 µg.mL⁻¹.

As linhagens bacterianas estudadas neste trabalho foram isoladas da esponja *A. brasiliensis* com o intuito de conhecer a microbiota associada e a origem dos alcaloides cíclicos isolados desta esponja. Tais alcaloides não foram detectados nos extratos obtidos do meio de cultura das linhagens bacterianas que apresentaram atividade antibiótica, mas foram encontrados derivados de dibromotirosina que são comumente produzidos por esponjas da ordem Verongida e nunca foram isolados de esponjas do gênero *Arenosclera*.

Fatores como convergência evolutiva, transferência lateral de genes, migração de simbiontes ou troca de hospedeiro são conhecidos para esponjas dos gêneros *Agelas*, *Dysidea*, *Iotrochota*, *Jaspis*, *Oceanapia* e *Poecillastra* (NUNEZ *et al.*, 2008; TAYLOR *et al.*, 2007; THACKER & FREEMAN, 2012). Tais fatores podem ser possivelmente responsáveis pela ampla distribuição dos derivados de dibromotirosina. É possível que tais compostos, produzidos pela linhagem bacteriana estudada neste trabalho, também sejam produzidos por outras linhagens de bactérias. Ou ainda, é possível que a linhagem *P. denitrificans* Ab134 tenha uma distribuição muito ampla em grande diversidade de hospedeiros. Estudos futuros deverão contribuir para esclarecer tais hipóteses.

A linhagem *P. denitrificans* Ab134, apresentada neste trabalho como produtora dos derivados de dibromotirosina, pertence ao grupo *P. denitrificans* de bactérias marinhas obrigatórias, heterotrófica, Gram-positivas e pertence à classe das α -proteobactérias (SHIEH *et al.*, 2004). Bactérias das classes δ , Δ -proteobactérias e actinobactérias já são conhecidas por serem capazes de realizar reações de halogenação e desalogenação (PEE & UNVERSUCHT, 2003; PEE, 1996; AGARWAL *et al.*, 2017). As α -proteobactérias estão amplamente distribuídas na comunidade dominante de simbiontes de esponjas, incluindo esponjas dos gêneros *Aplysina* e *Arenosclera* (MUSCHOLL-SILBERHORN *et al.*, 2008; BONDAREV *et al.*, 2013, RUA *et al.*, 2014). Segundo Muscholl-Silberhorn *et al.* (2008) uma única α -proteobactéria, relacionada à espécie *P. denitrificans*, é dominante na comunidade bacteriana cultivável de pelo menos seis esponjas (*Chondrosia reniformis*, *Clathrina clathris*, *Agelas*

oroides, *Ircinia* sp., *Suberites domuncula* e *Acanthella acuta*). Ainda segundo os autores, a associação de α -proteobactérias e esponjas provavelmente é evolucionariamente jovem, facultativa e envolve a produção de metabólitos secundários bioativos, uma vez que estão presentes em esponjas saudáveis e ausentes em esponjas doentes. Apesar de demonstrarem transmissão vertical de genes através de gametas na esponja *Mycale laxissima*, as α -proteobactérias são encontradas em água superficiais indicando a possibilidade de que também ocorra transmissão horizontal.

Anterior ao isolamento dos alcaloides bromados relatados neste trabalho, o cultivo de *P. denitrificans* em meio de cultura permitiu o isolamento de oito alcaloides bis-indol (**44** – **51**), com atividade antiincrustante contra larvas da craca *Balanus amphitrite* e do briozoário *Bugula neritina* (EC_{50} na faixa de 1,2 – 5,8 μ M) (WANG *et al.*, 2015). Guzman *et al.* (2007) relataram o isolamento da heptilprodigiosina (**52**) a partir do extrato hexânico obtido do meio de cultura de *P. denitrificans*. O ácido tropoditiético (**53**) foi identificado como responsável pela atividade antibiótica da linhagem bacteriana *Pseudovibrio* sp. D323 e outras correlatas (PENESYAN *et al.*, 2011). Esses são os únicos trabalhos que relatam a produção de metabólitos secundários por bactérias da espécie *P. denitrificans*.

Este trabalho é o primeiro relato da produção dos derivados de dibromotirosina a partir de uma linhagem bacteriana (*P. denitrificans*). O resultado aqui obtido endossa a hipótese de que os microrganismos associados às esponjas são os verdadeiros produtores dos metabólitos bromados comumente isolados de tecidos de esponjas.

4.2. Estudo químico da linhagem fúngica *Biatriospora* sp. (D8).

A análise dos metabólitos produzidos pela linhagem fúngica *Biatriospora* sp., cultivada em 10 L do meio de cultura, revelou a presença de compostos terpênicos inéditos na literatura. No entanto, tais compostos sofreram degradação ao longo do trabalho e não puderam ser devidamente identificados.

Sendo assim, a linhagem fúngica *Biatriospora* sp. (D8) foi novamente cultivada, em 20 L do meio de cultura, para obtenção do extrato do meio de cultura e os compostos purificados para determinação de suas estruturas. Os processos de purificação e análises destes compostos foram realizados com muito cuidado de maneira a se evitar degradação dos mesmos. As frações foram purificadas por CLAE-UV, sem o uso de ácidos, e secas em evaporador sob vácuo (speedvac®) imediatamente após a purificação. Os compostos puros foram preparados, analisados e secos tão logo possível.

4.2.1. Isolamento de metabólitos produzidos por *Biatriospora* sp. (D8) após cultivo em 10 L de meio de cultura

As frações obtidas após o processo de separação cromatográfica do extrato bruto, obtido de 10 L meio de cultura, da linhagem fúngica *Biatriospora* sp. D8 foram submetidas à análise por CLAE-UV-EM para avaliação do grau de pureza de cada uma. As frações com maior grau de pureza foram analisadas por RMN uni e bidimensionais.

4.2.1.1. Descarboxicitrinona (54, Fração D8-M3D2)

O composto presente na fração D8-M3D2 foi identificado pela análise de seus dados espectroscópicos. Absorções no UV (Figura 68), seus espectros de massas (Figura 69) e de

RMN de ^1H (Apêndice 16), e comparação com dados já publicados na literatura possibilitaram a identificação da descarboxicitrinona (**54**, Figura 70) (WHYTE *et al.*, 1996). A tabela 5 apresenta os valores de deslocamento químico dos sinais de hidrogênios nos espectros de RMN de ^1H obtidos nesse trabalho e na literatura.

Figura 68: Espectro de absorções no UV obtido para a descarboxicitrinona (**54**, fração D8-M3D2, MeOH).

Figura 69: Espectros de massas de baixa resolução (ESI), no modo positivo e negativo respectivamente, obtidos para a descarboxicitrinona (**54**, fração D8-M3D2).

Figura 70: Estrutura da descarboxicitrinona (**54**, fração D8-M3D2). **Tabela 5:** Comparação dos valores de deslocamento químico de sinais de hidrogênios nos espectros de RMN de ^1H obtidos nesse trabalho e na literatura.

Descarboxicitrinona (54)		
Carbono	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{b}}$
7	6,38, 1H, s	6,48, 1H, s
11	2,25, 1H, s	2,24, 3H, s
12	2,31, 1H, s	2,31, 3H, s
13	2,38, 1H, s	2,38, 3H, s
6-OH	-	9,64, 1H, br s
8-OH	-	11,92, 1H, s

a – MeOH- d_4 , 400 MHz; b – acetona- d_6 , 300 MHz.

b – WHYTE *et al.* (1996).

A descarboxicitrinona (**54**) foi isolada pela primeira vez do meio de cultivo da linhagem fúngica *Cercophora areolata* (WHYTE *et al.*, 1996). Posteriormente foi também isolada do meio de cultivo de linhagens fúngicas de *Arthrimum* sp. (EBADA *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2017). Sua biossíntese foi proposta a partir de moléculas de acetato pela via policetídica, como é comum para compostos da mesma classe (WHYTE *et al.*, 1996). A descarboxicitrinona (**54**) foi testada por Whyte *et al.* (1996) em ensaio antimicrobiano contra as linhagens fúngicas *Sordaria fimicola* e *Ascobolus furfuraceus* e inibiu o crescimento radial de ambas as linhagens.

4.2.1.2. Identificação da fomactina R (**55**, fração D8-M2F2)

Os dados dos espectros de absorções no UV e de massas obtidos para a fração D8-M2F2 foram utilizados para pesquisa na base de dados DNP. Verificou-se a ausência de qualquer composto que apresente dados idênticos, sugerindo que se trata de um composto até o momento

desconhecido. Assim, foram realizadas análises de RMN de ^1H , ^{13}C , COSY, HMBC, HSQC e NOESY com o objetivo de determinar a estrutura do composto presente nesta fração. O composto inédito presente na fração D8-M2F2 foi identificado e nomeado como fomactina R (55).

O espectro de massas de alta resolução (Figura 71) apresentou íon aduto de sódio $[\text{M}+\text{Na}]^+$ m/z 323,1992 e dímero aduto de sódio $[2\text{M}+\text{Na}]^+$ m/z 623,4065. O espectro de absorções no UV (Figura 72) da fração D8-M2F2 apresentou absorções de maior intensidade nos comprimentos de onda de λ 222 e 268 nm. O espectro de absorções no IV (Figura 73) apresentou absorções nos comprimentos de onda:

- ✓ 3432 cm^{-1} – banda larga atribuída a estiramento de OH, provável presença de água na amostra,
- ✓ 2925 e 2851 cm^{-1} – atribuídos a estiramento de C-H alifático,
- ✓ 1676 cm^{-1} – conjugação de C=O com C=C,
- ✓ 1588 cm^{-1} – conjugação de C=C com C=O
- ✓ 1393 cm^{-1} – atribuído a dobramentos de grupos CH_3 .

Figura 71: Espectro de massas de alta resolução (ESI+) da fomactina R (55, fração D8-M2F2).

Figura 72: Espectro de absorções no UV da fomactina R (**55**, Fração D8-M2F2, MeOH).

Figura 73: Espectro de absorções no IV da fomactina R (**55**, Fração D8-M2F2, MeOH).

O espectro de RMN de ^1H da fração D8-M2F2 (Apêndice 17 – 19), analisado em conjunto com o espectro HSQC (Apêndice 21), apresenta nove sinais com deslocamento químico em δ 1,11, 1,30, 1,76, 1,89, 1,90, 2,02, 2,06, 2,08 e 2,68 atribuídos a hidrogênios metilênicos, um sinal em δ 1,60 atribuído a hidrogênio metínico sp^3 , um sinal em δ 4,03 atribuído a hidrogênio metínico próximo a oxigênio, quatro sinais em δ 4,99, 5,15, 5,25 e 5,99 atribuídos a hidrogênios vinílicos e quatro sinais em δ 0,70, 0,96, 1,00 e 1,50 atribuídos a hidrogênios de metilas.

O espectro de RMN de ^{13}C da fração D8-M2F2 (Apêndice 20) apresenta quatro sinais com deslocamentos químicos em δ 14,2, 16,4, 16,6 e 21,7 atribuídos aos carbonos de metilas, cinco sinais em δ 23,5, 31,2, 32,3, 32,9 e 37,9 atribuídos aos carbonos metilênicos, um sinal em δ 37,7 atribuído ao carbono metínico sp^3 , um sinal em δ 64,3 atribuído ao carbono metínico próximo a oxigênio, um sinal em δ 42,2 atribuído a carbono quaternário sp^3 , um sinal em δ 62,7 atribuído a carbono quaternário sp^3 próximo a oxigênio, seis sinais em δ 115,3, 121,8, 133,1, 136,3, 140,8, 143,8 atribuídos a carbonos vinílicos, sendo os três últimos quaternários, e um sinal em δ 198,4 atribuído a carbono de carbonila de cetona conjugada. A análise dos espectros de RMN de ^1H , ^{13}C e EMAR sugerem a fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_2$, com índice de deficiência de hidrogênios (IDH) igual a sete.

A análise dos espectros de RMN de ^1H , ^{13}C e HSQC em conjunto com os espectros COSY (Apêndice 22) e HMBC (Apêndice 23) permitiram observar correlações COSY entre os hidrogênios vicinais em δ 5,99 e 2,68, em δ 2,68/1,90 e 1,60 e em δ 1,60 e 0,70 que indicam a semi-estrutura:

No espectro HMBC foram observadas correlações carbono-hidrogênio entre os sinais em δ 133,1 e 1,60, em δ 31,2 e 0,70, em δ 140,8 e 1,90, 5,15, 5,24, em δ 42,2 e 0,70, 1,00, 1,60, 1,90, em δ 143,8 e 1,00, 1,60, 1,90, 5,99 e em δ 115,3 e 1,00, permitindo a determinação estrutural da semi-estrutura cíclica indicada a seguir

No espectro COSY foram observadas correlações entre os hidrogênios em δ 1,76/1,30 e 1,89/2,02, em δ 4,99 e 2,08 e em δ 2,08 e 1,11, além de correlações carbono-hidrogênio observadas no espectro HMBC entre os sinais em δ 32,3 e 1,00, 1,89, em δ 32,9 e 1,50, 4,99, em δ 16,4 e 4,99 e em δ 136,3 e 2,08, 1,76, 1,50, em δ 121,8 e 1,11 que sugerem a semi-estrutura:

No espectro HMBC é possível observar correlações carbono-hidrogênio entre os sinais em δ 32,7 e 0,96, 4,03, em δ 62,7 e 0,96, 1,11, 4,03, em δ 64,3 e 0,96, em δ 198,4 e 4,03, 5,99 e em δ 140,8 e 4,03, os valores de deslocamento químico dos carbonos em δ 62,7, 64,3 e 198,4 sugerem a presença de um anel epóxido e uma carbonila de cetona, que permitem fechar o anel dodecacíclico da estrutura:

A análise do espectro NOESY (Apêndice 24) da fomactina R (**55**) permite observar correlações entre os hidrogênios em δ 5,99 e 2,68, em δ 2,68, 0,70 e 1,60 e em δ 5,15, 0,70 e 1,00 que sugerem geometria *E* para a dupla ligação entre as posições C15-C16 e as duas metilas em δ 0,70 e 1,00 do mesmo lado do plano:

As correlações NOE entre os hidrogênios em δ 2,68 e 1,76/1,30, em δ 1,76 e 4,99, em δ 4,99, 1,11 e 4,03 e em δ 1,11 e 0,96 indicam que configuração relativa do epóxido é *cis*, com o oxigênio voltado para o lado do plano contrário ao das metilas em δ 1,00, 0,70 e 0,96. Além disso, a ausência de correlação entre os hidrogênios em δ 4,99 e 1,50, e presença das correlações entre os hidrogênios em δ 4,99 e 1,11 e em δ 1,50 e 2,02 indicam geometria *E* para a dupla ligação presente entre as posições C7 e C8. Correlações adicionais são apresentadas na tabela 6.

A análise conjunta dos espectros de RMN permitiram identificar a estrutura do diterpeno rearranjado inédito fomactina R (**55**, Figura 74), presente na fração D8-M2F2, com estereoquímica relativa 3(*S**), 4(*R**), 11(*S**), 12(*R**). A análise por dicroísmo circular (Figura 75) apresentou efeito Cotton positivo e a avaliação por $[\alpha]_D$ apresentou desvio do plano da luz polarizada para a direita (+, dextrógiro), tais dados poderão ser utilizados futuramente para determinação da configuração relativa de estruturas semelhantes. A tabela 7 sumariza os valores de deslocamento químico observados nos espectros de RMN de ¹H e ¹³C obtidos para a fração D8-M2F2.

Fomactina R (**55**): branco, pó amorfo; $[\alpha]_D^{23} +23,4$ (*c* 0,17, MeOH); UV (*c* 0,01, MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 222 (1,8), 268 (1,2) nm; DC (*c* 0,17, MeOH) $\lambda_{\max}$ ($\Delta\epsilon$) 220 (5,4), 228 (4,3), 260 (2,0); IV $\nu_{\max}$ 3432, 2925, 2851, 1676, 1588, 1393 cm^{-1} ; dados de RMN de ¹H (600 MHz) e ¹³C (150 MHz), Tabela 7; EMAR-ESI m/z 323,1992 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (calc. para C₂₀H₂₈NaO₂, 323,1982).

Tabela 6: Correlações observadas no espectro NOESY obtido para fomactina R (**55**, Fração D8-M2F2).

Fomactina R (55)		
Posição	δ_H	NOESY
3	4,03	5,15, 5,24, 4,99, 2,08, 1,11
5	1,11	4,99, 4,03, 0,96
	2,06	Sb
6	2,08	4,03
7	4,99	4,03, 1,76, 1,11
9	1,89	sb, 5,15, 2,68, 1,90, 1,30, 0,70
	2,02	1,50
10	1,30	1,89, 1,76, 1,00
	1,76	4,99, 2,68, 1,30, 1,00
12	1,60	2,68, 1,89, 0,70
13	1,90	sb
	2,68	5,99, 1,89, 1,76, 1,60
14	5,99	2,68
16	5,15	5,24, 4,03, 1,89, 1,00
	5,24	5,15, 4,03
17	1,50	2,02
18	1,00	5,15, 1,76, 1,30, 0,70
19	0,70	1,89, 1,60, 1,00
20	0,96	1,11

Legenda: sb – sinais sobrepostos

Figura 74: Estrutura da fomactina R (**55**, Fração D8-M2F2)

Figura 75: Espectro de dicroísmo circular obtido para a fomactina R (**55**, MeOH, fração D8-M2F2)

Tabela 7: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (^1H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) da fomactina R (**55**, Fração D8-M2F2).

Fomactina R (55)		
Posição	δ_{C} , tipo	δ_{H} (<i>J</i> em Hz)
1	140,8, C	
2	198,4, C	
3	64,3, CH	4,03, s
4	62,7, C	
5	37,9, CH_2	1,11, ddd (5,1, 12,6, 17,5); 2,06, m
6	23,5, CH_2	2,08, m
7	121,8, CH	4,99, dd (6,3, 7,0)
8	136,3, C	
9	32,9, CH_2	1,89, m; 2,02, m
10	32,3, CH_2	1,30, ddd (2,9, 10,9, 17); 1,76, ddd (14,0, 4,1, 4,1)
11	42,2, C	
12	37,7, CH	1,60, sex (7,1)
13	31,2, CH_2	1,90, m; 2,68, ddd (3,1, 7,8, 18)
14	133,1, CH	5,99, sl
15	143,8, C	
16	115,3, CH_2	5,15, s; 5,24, m
17	16,4, CH_3	1,50, s
18	21,7, CH_3	1,00, s
19	16,6, CH_3	0,70, d (7,0)
20	14,2, CH_3	0,96, s

4.2.1.3. Frações D8-M2B2, D8-M2D2, D8-M3B2, D8-M3E3, D8-M3E4 e D8-M3F4.

As frações, do extrato obtido de 10 L do meio de cultura, D8-M2B2 e D8-M2D2 não puderam ser identificadas por apresentar pouca quantidade de massa.

As frações D8-M3B2, D8-M3E3, D8-M3E4 e D8-M3F4 apresentaram compostos desconhecidos, de acordo com desreplicação realizada por CLAE-UV-EM e consulta no banco de dados DNP. Não foram encontrados compostos com massa molecular e padrões de absorção no UV semelhantes aos observados nas frações purificadas. Os espectros de RMN de ^1H (Apêndice 25 – 28) obtidos para tais frações mostram que tratam-se de compostos semelhantes à fomactina R (**55**). São observados sinais de hidrogênios nas regiões entre δ 5-5,4; δ 2,5-3,0 e δ 0,5-2,5, que sugerem estruturas com o mesmo arranjo. Infelizmente durante o processo de análises estas frações sofreram degradação, portanto não foi possível a obtenção de espectros de RMN adicionais para sua completa identificação. Assim, a linhagem fúngica D8 foi re-cultivada em 20 L do meio de cultura com o objetivo de isolar novamente os compostos e elucidar suas estruturas (Figura 76).

Figura 76: Fomactinas isoladas do meio de cultura da linhagem fúngica *Biatrispora* sp. D8.

4.2.2. Cultivo da linhagem fúngica *Biatrispora* sp. (D8) em 20 L de meio de cultura

4.2.2.1. Identificação da fomactina Q (**56**, fração D8-Ac-M4C24-B2)

O espectro de massas de alta resolução do composto presente na fração D8-Ac-M4C24-B2 (Figura 77) apresentou íon aduto de sódio $[\text{M}+\text{Na}]^+$ m/z 341.2078 e dímero aduto de sódio

$[2M+Na]^+$ m/z 659.4269. O espectro de absorções no UV (Figura 78) da fração D8-Ac- M4C24-B2 apresentou absorções de maior intensidade nos comprimentos de onda de λ 201 e 263 nm. O espectro de absorções no IV (Figura 79) apresentou absorções nos comprimentos de onda:

- ✓ 3472 cm^{-1} – banda larga atribuída a estiramento de OH,
- ✓ 2932 e 2851 cm^{-1} – atribuídos a estiramento de C-H alifático,
- ✓ 1710 cm^{-1} – conjugação de C=O com C=C,
- ✓ 1669 cm^{-1} – conjugação de C=C com C=O
- ✓ 1453 e 1385 cm^{-1} – atribuído a dobramentos de grupos CH_2 e CH_3 .

Os dados dos espectros de absorções no UV e de massas obtidos para a fração D8-Ac-M4C24-B2 foram utilizados para pesquisa na base de dados DNP. Verificou-se a ausência de qualquer composto que apresentasse dados idênticos, sugerindo que se trata de um composto até o momento desconhecido. Assim, foram realizadas análises de RMN de ^1H , ^{13}C , COSY, HMBC, HSQC e NOESY com o objetivo de determinar a estrutura do composto presente nesta fração. O composto inédito presente na fração D8-Ac-M4C24-B2 foi identificado e nomeado como fomactina Q (**56**).

Figura 77: Espectro de massas de alta resolução (ESI+) da fomactina Q (**56**, fração D8-Ac-M4C24-B2).

Figura 78: Espectro de absorções no UV da fomactina Q (**56**, Fração D8-Ac-M4C24-B2, MeOH).

Figura 79: Espectro de absorções no IV da fomactina Q (**56**, Fração D8-Ac-M4c24-B2, MeOH).

O espectro de RMN de ^1H da fração D8-Ac-M4C24-B2 (Apêndice 29 – 32), analisado em conjunto com o espectro HSQC (Apêndice 34), apresenta seis sinais com deslocamento químico em δ 1,36, 1,64, 1,83, 1,86, 1,90, 2,32 atribuídos a hidrogênios metilênicos; um sinal em δ 2,09 atribuído a hidrogênio metínico sp^3 ; dois sinais em δ 4,03 e 3,53 atribuídos a hidrogênios metínicos próximos a oxigênio; um sinal em δ 5,12 atribuído a hidrogênio vinílico; cinco sinais em δ 0,83, 0,84, 1,13, 1,58 e 1,59 atribuídos a hidrogênios de metilas e um sinal em δ 4,43 atribuído a hidrogênio de hidroxila.

O espectro de RMN de ^{13}C da fração D8-Ac-M4C24-B2 (Apêndice 33) apresenta cinco sinais com deslocamentos químicos em δ 15,4, 16,6, 16,7, 20,0 e 21,3 atribuídos aos carbonos de metilas; cinco sinais em δ 22,7, 30,1, 32,9, 34,3 e 36,4 atribuídos aos carbonos metilênicos; um sinal em δ 29,9 atribuído ao carbono metínico sp^3 ; dois sinais em δ 64,9 e 66,3 atribuídos aos carbonos metínicos substituído por oxigênio; um sinal em δ 40,8 atribuído a carbono quaternário sp^3 ; um sinal em δ 62,4 atribuído a carbono quaternário sp^3 metínicos substituído por oxigênio; quatro sinais em δ 127,7, 134,2, 137,6, 141,5 atribuídos a carbonos vinílicos, sendo os três últimos quaternários, e um sinal em δ 202,0 atribuído a carbono de carbonila de cetona. A análise dos espectros de RMN de ^1H ^{13}C e EMAR sugerem a fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_3$, com IDH igual a seis.

A análise dos espectros de RMN de ^1H , ^{13}C e HSQC em conjunto com os espectros COSY (Apêndice 35) e HMBC (Apêndice 36) permitiram identificar uma estrutura inédita de fomactina, semelhante à fomactina R (**55**) (seção 4.2.1.2). A fomactina Q (**56**) se diferencia da fomactina R (**55**) pela presença de uma hidroxila na posição C14, uma metila na posição C16 e uma dupla ligação entre os carbonos C1 e C15.

A presença da hidroxila na posição C14 pôde ser confirmada pelas correlações observadas no espectro COSY entre os hidrogênios vicinais em δ 4,43 e 4,03, em δ 4,03 e 1,64/1,36, em δ 2,09 e 1,36 e em δ 2,09 e 0,83 que indicaram a semi-estrutura:

A presença da metila na posição C16 e da dupla ligação entre as posições C1 e C15 puderam ser confirmadas pelas correlações carbono-hidrogênio observadas no espectro HMBC

entre os sinais em δ 66,3 e 0,83, em δ 36,4 e 0,83, 4,03 e 4,43, em δ 29,9 e 4,03, em δ 40,8 e 0,84, 1,64/1,36 e 2,09, em δ 145,1 e 0,84, 1,58 e 4,03, em δ 137,6 e 1,36, 1,58, 4,03 e 4,43 permitindo a determinação estrutural da semi-estrutura do ciclo:

A análise do espectro NOESY (Apêndice 37) da fomactina Q (**56**) permitiu observar correlações entre os hidrogênios em δ 2,09 e 0,83, 1,64 e 4,03, em δ 4,43, 1,64 e 4,03 e em δ 0,84 e 1,58 que indicam geometria *E* para a dupla ligação entre as posições C1-C15 e que as metilas em δ 0,83 e 0,84 e o grupo hidroxila (13-OH) estão do mesmo lado do plano:

As correlações em δ 2,09, 2,32 e 5,12, em δ 4,03, 3,53 e 5,12, em δ 3,53 e 1,13 e em δ 1,13 e 4,03 indicam geometria *E* para a dupla ligação entre as posições C7-C8 e grupo epóxido com configuração relativa *cis*, voltado para o lado contrário no plano das metilas em δ 0,84, 0,83 e 1,13. Correlações adicionais são apresentadas na tabela 8.

A análise conjunta dos espectros de RMN permitiu identificar a estrutura da fomactina Q (**56**), presente na fração D8-Ac-M4C24-B2, com estereoquímica relativa 3(*S**), 4(*R**), 11(*S**), 12(*R**), 14(*S**) (Figura 80). A análise por $[\alpha]_D$ apresentou desvio do plano da luz polarizada para a direita (+, dextrógiro) e a análise de dicroísmo circular (Figura 81) apresentou efeito Cotton positivo entre 200 e 300 nm e negativo entre 300 e 350 nm. A tabela 9 sumariza os valores de deslocamento químico observados nos espectros de RMN de ¹H e ¹³C obtidos para a fração D8-Ac-M4C24-B2.

Fomactina Q (56): branco, pó amorfo; $[\alpha]_D^{23} +49,2$ (*c* 0,58, MeOH); UV (*c* 0,01, MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 201 (1,6), 263 (1,2) nm; DC (*c* 0,58, MeOH) $\lambda_{\max}$ ($\Delta\epsilon$) 245 (3,8), 320 (-2,1); IV $\nu_{\max}$ 3472, 2932, 2851, 1710, 1669, 1453, 1385 cm⁻¹; dados de RMN de ¹H (600 MHz) e ¹³C (150 MHz), Tabela 9; EMAR-ESI *m/z* 341,2078 [M + Na]⁺ (calc. para C₂₀H₃₀NaO₃, 341,2087).

Tabela 8: Correlações observadas no espectro NOESY obtido para fomactina Q (**56**, Fração D8-Ac-M4C24-B2).

Fomactina Q (56)		
Posição	δ_H	NOESY
3	3,53	5,12, 1,83, 1,59, 1,13
5	1,86	sb, 4,03
6	1,83	Sb
7	5,12	4,03, 3,53, 2,32, 2,09, 1,86
9	1,90	Sb
	1,36	Sb
10	2,32	5,12, 4,03, 2,32, 0,83, 1,64
12	2,09	5,12, 4,03, 2,32, 0,83, 1,64
13	1,64	4,43, 4,03, 2,09
	1,36	Sb
14	4,03	5,12, 4,43, 2,09, 1,64, 1,36, 1,13
16	1,58	sb, 0,84
17	1,59	Sb
18	0,84	1,58
19	0,83	2,09, 2,32
20	1,13	4,03, 3,53
14-OH	4,43	4,03, 1,64, 1,36

Legenda: sb – sinais sobrepostos

Figura 80: Estrutura da fomactina Q (**56**, Fração D8-Ac-M4C24-B2)

Figura 81: Espectro de dicroísmo circular obtido para a fomactina Q (**56**, MeOH, fração D8-Ac-M4C24-B2).

Tabela 9: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (^1H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) da fomactina Q (**56**, Fração D8-Ac-M4C24-B2).

Fomactina Q (56)		
Posição	δ_{C} , tipo	δ_{H} (<i>J</i> em Hz)
1	137,6, C	
2	202,0, C	
3	64,9, CH	3,53, s
4	62,4, C	
5	32,9, CH ₂	1,86, m
6	22,7, CH ₂	1,83, m
7	127,7, CH	5,12, m
8	134,2, C	
9	34,3, CH ₂	2,32, t (14,5); 1,85, m
10	30,1, CH ₂	1,90, m; 1,36, m
11	40,8, C	
12	29,9, CH	2,09, ddq (2,0, 6,4, 6,5)
13	36,4, CH ₂	1,64, ddd (12,1, 5,7, 2,1); 1,36, m
14	66,3, CH	4,03, ddt (13,7, 7,7, 1,8)
15	141,5, C	
16	16,6, CH ₃	1,58, d (1,7)
17	16,7, CH ₃	1,59, s
18	21,3, CH ₃	0,84, s
19	15,4, CH ₃	0,83, d (7,0)
20	20,0, CH ₃	1,13, s
14-OH		4,43, d (7,5)

4.2.2.2. Identificação da fomactina S (57, fração D8-R5-C1)

A pesquisa na base de dados DNP foi realizada utilizando-se os dados dos espectros de absorções no UV e de massas obtidos para a fração D8-R5-C1. A ausência de qualquer composto que apresentasse dados idênticos sugeriu tratar-se de um composto inédito. Assim, foram realizadas análises de difração de Raio-X, RMN de ^1H , ^{13}C , COSY, HMBC, HSQC e NOESY com o objetivo de determinar a estrutura do composto presente nesta fração. O composto inédito presente na fração D8-R5-C1 foi identificado e nomeado como fomactina S (57).

O espectro de massas de alta resolução (Figura 82) apresentou íon quasi-molecular $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 319,1992 e íon aduto de sódio $[\text{M}+\text{Na}]^+$ m/z 341,2077. O espectro de absorções no UV (Figura 83) da fração D8-R5-C1 apresentou absorções de maior intensidade nos comprimentos de onda de λ 243 e 312 nm. O espectro de absorções no IV (Figura 84) apresentou absorções nos comprimentos de onda:

- ✓ 2957, 2926 e 2876 cm^{-1} – atribuídos a estiramento de C-H alifático,
- ✓ 1689 cm^{-1} – conjugação de C=O com C=C,
- ✓ 1621 cm^{-1} – conjugação de C=C com C=O
- ✓ 1465 e 1377 cm^{-1} – atribuído a dobramentos de grupos CH_3 .

Figura 82: Espectro de massas de alta resolução (ESI+) da fomactina S (57, fração D8-R5-C1).

Figura 83: Espectro de absorções no UV da fomactina S (**57**, Fração D8-R5-C1, MeOH).

Figura 84: Espectro de absorções no IV da fomactina S (**57**, Fração D8-R5-C1, pastilha de silício).

O espectro de RMN de ^1H da fração D8-R5-C1 (Apêndice 38 – 41), analisado em conjunto com o espectro HSQC (Apêndice 43), apresenta dez sinais com deslocamento químico em δ 0,97, 1,36, 1,56, 1,61, 1,87, 1,97, 2,16, 2,19, 2,27 e 2,56 atribuídos a hidrogênios metilênicos; dois sinais em δ 1,46 e 2,68 atribuídos a hidrogênios metínicos sp^3 ; dois sinais em δ 3,95 e 3,27 atribuídos a hidrogênios metínicos próximos a oxigênio; um sinal em δ 5,77 atribuído a hidrogênio vinílico e cinco sinais em δ 0,95, 1,09, 1,33, 1,34 e 1,45 atribuídos a hidrogênios de metilas.

O espectro de RMN de ^{13}C da fração D8-R5-C1 (Apêndice 42) apresenta cinco sinais com deslocamentos químicos em δ 15,0, 16,6, 19,5, 18,1 e 22,9 atribuídos aos carbonos de metilas; cinco sinais em δ 25,5, 29,4, 31,1, 33,1 e 36,2 atribuídos aos carbonos metilênicos; dois sinais em δ 41,0 e 36,0 atribuídos aos carbonos metínicos sp^3 ; dois sinais em δ 68,6 e 58,7 atribuídos aos carbonos metínicos substituídos por oxigênio; dois sinais em δ 64,2 e 62,5 atribuídos a carbonos quaternários sp^3 substituídos por oxigênio; um sinal em δ 38,9 atribuído a carbono quaternário sp^3 ; dois sinais em δ 131,3 e 147,5 atribuídos a carbonos vinílicos, sendo o último quaternário, e; um sinal em δ 203,3 atribuído a carbono de carbonila de cetona. A análise dos espectros de RMN de ^1H , ^{13}C e EMAR indicam a fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_3$, com IDH igual a seis.

A análise dos espectros de RMN de ^1H , ^{13}C e HSQC em conjunto com os espectros COSY (Apêndice 44) e HMBC (Apêndice 45) permitiram identificar uma estrutura inédita de fomactina, semelhante às fomactina Q (**56**) e R (**55**) (seção 4.2.1.2). A fomactina S (**57**) se diferencia da fomactina R (**55**) pela presença de uma metila na posição C16 e de um grupo epóxido entre os carbonos entre C7 e C8.

A presença da metila na posição C16 pôde ser confirmada pelas correlações observadas no espectro COSY entre os hidrogênios vicinais em δ 2,68 e 1,45 e correlações carbono-hidrogênio observadas no espectro HMBC entre os sinais em δ 38,9 e 1,45, em δ 147,5 e 1,45 e 2,68, em δ 36,0 e 5,77, 2,56 e 1,46 permitindo a determinação estrutural da semi-estrutura indicada a seguir.

A presença do grupo epóxido entre os carbonos C7 e C8 pôde ser confirmada pelas correlações carbono-hidrogênio observadas no espectro HMBC entre os sinais em δ 62,5 e 1,56/0,97, 2,19/1,97, 1,34, 3,27 e 1,61 e em δ 58,7 e 2,19/1,97, 1,34, 1,36/2,27 permitindo a determinação da estrutural da semi-estrutura:

A análise do espectro NOESY (Apêndice 46) da fomactina S (**57**) permitiu observar correlações entre os hidrogênios em δ 1,87, 2,68 e 0,95, em δ 2,68 e 1,09 e em δ 2,56 e 5,77 que indicam geometria *E* da dupla ligação entre os carbonos C1 e C14, como nas fomactinas anteriores, e metilas em δ 1,09 e 0,95 em lado oposto no plano em relação à metila em δ 1,45.

As correlações em δ 1,34, 1,36, 1,45, 3,27 e 3,95, em δ 1,56 e 2,56 e em δ 1,33, 1,56 e 3,27 indicam dois grupos epóxidos em posições opostas no plano, sendo que o hidrogênio em δ 3,95 está no mesmo plano da metila em δ 1,45. Tal conformação está de acordo com a observada na representação ORTEP (Figura 85) obtida da análise por difração de Raios-X, realizada em colaboração com o Professor Vitor M. Deflon do grupo de Grupo de Química Inorgânica Estrutural e Biológica (IQSC-USP). Correlações adicionais são apresentadas na tabela 10.

Tabela 10: Correlações observadas no espectro NOESY obtido para fomactina S (**57**, Fração D8-R5C1).

Fomactina S (57)		
Posição	δ_H	NOESY
3	3.95	3,27, 1,45, 1,36, 1,34
5	1.36	3,95, 2,27
	2,27	1,36
6	1.61	-
	2,16	Sb
7	3.27	3,95, 1,56, 1,33
9	1.97	-
	2,19	Sb
10	0.97	1,56
	1,56	3,27, 2,56, 0,97
12	1,46	Sb
13	1,87	5,77, 1,87, 1,56, 1,45, 0,95
	2,56	5,77, 1,87, 1,56, 1,45
14	5,77	2,56, 1,87, 1,34
15	2,68	1,45, 1,09, 0,95
16	1,45	Sb
17	1,34	5,77
18	1,09	2,68
19	0,95	2,68, 1,87
20	1,33	3,27

Legenda: sb – sinais sobrepostos

A estereoquímica relativa da fomactina S (**57**), presente na fração D8-R5-C1, foi estabelecida como 3(*S**), 4(*R**), 7(*S**), 8(*S**), 11(*S**), 12(*R**), 15(*S**) (Figura 86) pela análise conjunta dos espectros de RMN. A análise de dicroísmo circular (Figura 87) apresentou efeito Cotton positivo e a análise por $[\alpha]_D$ apresentou desvio do plano da luz polarizada para a direita (+, dextrógiro). A tabela 11 sumariza os valores de deslocamento químico observados nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C obtidos para a fomactina S (**57**).

A análise por difração de Raios-X (Figura 85) permitiu confirmar a estrutura da fomactina S (**57**) presente na fração D8-R5-C1, e estabelecer sua configuração absoluta: 3(*S*), 4(*R*), 7(*S*), 8(*S*), 11(*S*), 12(*R*), 15(*S*).

Figura 85: Representação ORTEP da estrutura da fomactina S (**57**, fração D8-R5-C1) obtido por difração de Raios-X.

Fomactina S (**57**): branco, pó amorfo; $[\alpha]_D^{23} +100,0$ (c 1,0, MeOH); UV (c 0,01, MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 243 (1,7), 312 (0,5) nm; DC (c 1,0, MeOH) $\lambda_{\max}$ ($\Delta\epsilon$) 204 (-3,0), 245 (3,1); IV $\nu_{\max}$ 2957, 2926, 2876, 1689, 1621, 1465, 1377 cm^{-1} ; dados de RMN de ^1H (600 MHz) e ^{13}C (150 MHz), Tabela 11; EMAR-ESI m/z 319,2266 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (calc. para $\text{C}_{20}\text{H}_{31}\text{O}_3$, 319,2268).

Figura 86: Estrutura da fomactina S (**57**, Fração D8-R5-C1)

Figura 87: Espectro de dicroísmo circular obtido para a fomactina S (**57**, MeOH, fração D8-R5-C1)

Tabela 11: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (^1H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz, $\text{MeOH-}d_4$) da fomactina S (**57**, Fração D8-R5-C1).

Fomactina S (57)		
Posição	δ_{C} , tipo	δ_{H} (<i>J</i> em Hz)
1	147,5, C	
2	203,3, C	
3	68,6, CH	3,95, s
4	64,2, C	
5	36,2, CH_2	1,36, m; 2,27 ddd (3,2, 5,2, 13,5)
6	25,5, CH_2	1,61, m; 2,16, m
7	58,7, CH	3,27, dd (11, 4)
8	62,5, C	
9	31,1, CH_2	1,97, ddd (6,6, 10,9, 16,2); 2,19, m
10	29,4, CH_2	0,97, ddd (0,78, 6,9, 10,9); 1,56, ddd (2,6, 6,9, 17,7)
11	38,9, C	
12	41,0, CH	1,46, m
13	33,1, CH_2	1,87, m; 2,56, dddd (3,8, 3,8, 6,9, 20,1)
14	131,3, CH	5,77, dd (3,5, 6,9)
15	36,0, CH	2,68, m
16	16,6, CH_3	1,45, d (4)
17	19,5, CH_3	1,34, s
18	22,9, CH_3	1,09, s
19	18,1, CH_3	0,95, d (7,0)
20	15,0, CH_3	1,33, s

4.2.2.3. Identificação da fomactina T (58, fração D8-R9-B2A)

Os dados dos espectros de absorções no UV e de massas obtidos para a fração D8-R9-B2A foram utilizados para pesquisa na base de dados DNP. A ausência de qualquer composto que apresente dados idênticos sugeriu que trata-se de um composto até o momento desconhecido. As análises de RMN de ^1H , ^{13}C , COSY, HMBC, HSQC e NOESY foram realizadas com o objetivo de se determinar a estrutura do composto presente nesta fração. O composto inédito presente na fração D8-R9-B2A foi identificado e nomeado como fomactina T (58).

O espectro de massas de alta resolução (Figura 88) apresentou íon quasi-molecular $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 363,1795, íon aduto de sódio $[\text{M}+\text{Na}]^+$ m/z 385,1616 e íon dímero aduto de sódio $[2\text{M}+\text{Na}]^+$ m/z 747,3334. O espectro de absorções no UV (Figura 89) da fração D8-R9-B2A apresentou absorções de maior intensidade nos comprimentos de onda de λ 220 e 285 nm

Figura 88: Espectro de massas de alta resolução (ESI+) da fomactina T (58, fração D8-R9-B2A).

Figura 89: Espectro de absorções no UV da fomactina T (**58**, Fração D8-R9-B2A, MeOH).

O espectro de RMN de ^1H da fração D8-R9-B2A (Apêndice 47 – 50), analisado em conjunto com o espectro HSQC (Apêndice 52), apresenta dez sinais com deslocamento químico em δ 1,56, 1,80, 1,85, 1,89, 2,08, 2,21, 2,41, 2,47, 2,55 e 2,87 atribuídos a hidrogênios metilênicos; um sinal em δ 2,28 atribuído a hidrogênio metínico sp^3 ; dois sinais em δ 3,82 e 4,20 atribuídos a hidrogênios metínicos próximos a oxigênio e quatro sinais em δ 1,10, 1,21, 1,27 e 1,42 atribuídos a hidrogênios de metilas.

O espectro de RMN de ^{13}C da fração D8-R9-B2A (Apêndice 51) apresenta quatro sinais com deslocamentos químicos em δ 16,5, 20,0, 22,5 e 22,6 atribuídos aos carbonos de metilas; cinco sinais em δ 30,3, 31,6, 33,0, 34,8 e 43,5 atribuídos aos carbonos metilênicos; um sinal em δ 39,4 atribuído ao carbono metínico sp^3 ; dois sinais em δ 64,7 e 71,0 atribuídos aos carbonos metínicos substituídos por oxigênio; dois sinais em δ 64,3 e 90,6 atribuídos a carbonos quaternários sp^3 substituídos por oxigênio; um sinal em δ 40,9 atribuído a carbono quaternário sp^3 ; dois sinais em δ 136,2 e 160,0 atribuídos a carbonos vinílicos quaternários, e dois sinais em δ 169,9, 195,3 atribuídos a carbonos de carbonilas de éster e cetona conjugada,

respectivamente. A análise dos espectros de RMN de ^1H , ^{13}C e EMAR sugerem a fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{O}_6$, com IDH igual a oito.

A análise dos espectros de RMN de ^1H , ^{13}C e HSQC em conjunto com os espectros COSY (Apêndice 53) e HMBC (Apêndice 54) permitiram identificar uma estrutura inédita de fomactina, semelhante à fomactina R (**55**, seção 4.2.1.2). A fomactina T (**58**) possui um esqueleto de carbono sem precedentes entre as fomactinas já descritas na literatura, são 3 anéis de 6, 7 e 12 membros e três carbonilas, sendo uma delas carbonila de éster presente no anel de 7 membros.

O espectro COSY apresenta correlações entre os hidrogênios vicinais em δ 1,10 e 2,28 e em δ 2,28 e 2,47. Além de correlações carbono-hidrogênio observadas no espectro HMBC entre os sinais em δ 195,3 e 2,47, em δ 16,5 e 2,47, 1,27, em δ 40,8 e 2,47, 1,27, 1,10 e em δ 160,0 e 1,27 que sugerem a semi-estrutura:

No espectro COSY é possível observar correlações entre os hidrogênios em δ 1,80/2,55 e 2,21/2,41 e correlações carbono-hidrogênio observadas no espectro HMBC entre os sinais em δ 20,0 e 1,80, em δ 40,8 e 1,80, 2,41, em δ 160,0 e 1,27, 1,80, em δ 169,9 e 1,42, em δ 90,6 e 1,42, 2,41, 1,80 e em δ 33,0 e 1,42 que sugerem a semi-estrutura:

No espectro COSY é possível observar correlações entre os hidrogênios em δ 4,20 e 1,56, e em δ 1,56/1,89 e 1,85/2,08 e correlações carbono-hidrogênio no espectro HMBC entre os sinais em δ 90,6 e 4,20, 1,89, em δ 71,0 e 1,42 e em δ 31,6 e 4,20 que sugerem a semi-estrutura:

O último ciclo da estrutura fecha-se em torno de um grupo epóxido e uma carbonila, semelhante às demais fomactinas já descritas neste trabalho. No espectro de HMBC é possível observar correlações carbono-hidrogênio entre os sinais em δ 31,6 e 1,21, 3,82, em δ 64,3 e 1,89, 1,21, 3,82, em δ 22,5 e 3,82 e em δ 136,2 e 195,3, 3,82, formando a estrutura:

A análise do espectro NOESY (Apêndice 55) da fomactina T (**58**) permite observar correlações entre os hidrogênios em δ 1,27 e 2,47 e em δ 2,47, 2,28 e 1,00 indicam que as metilas em δ 1,00 e 1,27 estão do mesmo lado do plano.

As correlações em δ 1,27, 1,42 e 2,21, em δ 1,21, 1,89 e 4,20 e em δ 3,82 e 1,89 sugerem estereoquímica relativa do epóxido 3(*S**) e 4(*R**), do grupo hidroxila 7(*S**) e da metila 8(*R**). Tal estereoquímica não pôde ser confirmada. O espectro adquirido com pouca massa da amostra não apresentou resolução suficiente para análise. Correlações adicionais são apresentadas na tabela 12.

Tabela 12: Correlações observadas no espectro NOESY obtido para fomactina T (**58**, Fração D8-R9B2A).

Fomactina T (58)		
posição	δ_H	NOESY
3	3,82	1,89
5	2,08	1,56, 1,21
	1,85	1,89, 1,56
6	1,89	4,20, 3,82, 1,85
	1,56	2,08, 1,85
7	4,20	1,89, 1,21
9	2,40	1,42
	2,21	1,80, 1,42, 1,27
10	2,55	1,80
	1,80	2,55, 2,21, 1,27
12	2,28	1,10
13	2,87	2,47
	2,47	2,87, 1,27, 1,10
16	1,21	4,20, 2,08
17	1,42	2,40, 2,21
18	1,27	2,47, 2,21, 1,80
19	1,10	2,47, 2,28

A análise de dicroísmo circular (Figura 91) apresentou efeito Cotton positivo nas regiões entre 200 – 250 nm e 300 – 400 nm e efeito Cotton negativo na região entre 250 – 300 nm. A avaliação por $[\alpha]_D$ apresentou desvio do plano da luz polarizada para a esquerda (-, levógiro). A análise conjunta dos espectros de RMN permitiram identificar a fomactina T (**58**), presente na fração D8-R9-B2A, com estereoquímica relativa sugerida 3(*S**), 4(*R**), 7(*S**), 8(*R**), 11(*S**),

12(*R**) (Figura 90). A tabela 13 sumariza os valores de deslocamento químico observados nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C obtidos para a fração D8-R9-B2A.

Fomactina T (**58**): branco, pó amorfo; $[\alpha]_{\text{D}}^{23}$ -22,2 (*c* 0,42, MeOH); UV (*c* 0,01, MeOH) λ_{max} (log ϵ) 220 (1,3), 285 (0,9) nm; CD (*c* 0,42, MeOH) λ_{max} ($\Delta\epsilon$) 226 (2,7), 273 (-5,0), 328 (0,8), 370 (1,2); dados de RMN de ^1H (600 MHz) e ^{13}C (150 MHz), Tabela 13; EMAR-ESI m/z 363,1795 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (calc. para $\text{C}_{20}\text{H}_{27}\text{O}_6$, 363,1802).

Figura 90: Estrutura da fomactina T (**58**, Fração D8-R9-B2A)

Figura 91: Espectro de dicroísmo circular obtido para a fomactina T (**58**, MeOH, fração D8-R9-B2A)

Tabela 13: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (^1H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz, $\text{MeOH-}d_4$) da fomactina T (**58**, Fração D8-R9-B2A).

Fomactina T (58)		
posição	δ_{C} , tipo	δ_{H} (<i>J</i> em Hz)
1	136,2, C	
2	195,0, C	
3	64,7, CH	3,82, s
4	64,3, C	
5	31,6, CH_2	2,08, m; 1,85, m
6	30,3, CH_2	1,89, m; 1,56, m
7	71,0, CH	4,20, d (8,4)
8	90,6, C	
9	33,0, CH_2	2,41, ddd (16,0, 6,0, 3,0); 2,21, m
10	34,8, CH_2	2,55, m; 1,80, ddd (14,7, 6,0, 3,0)
11	40,8, C	
12	39,4, CH	2,28, sl
13	43,5, CH_2	2,87, m; 2,47, dd (18,0, 6,0)
14	195,1, C	
15	159,8, C	
16	22,5, CH_3	1,21, s
17	22,6, CH_3	1,42, s
18	20,0, CH_3	1,27, s
19	16,5, CH_3	1,10, d (7,0)
20	170,1, C	

4.2.2.4. Identificação da fomactina U (59, fração D8-R9-C2A).

Os dados de massas de alta resolução, íon quasi-molecular $[M+H]^+$ m/z 335,2209 e íon aduto de sódio $[M+Na]^+$ m/z 357,2027 (Figura 92), bem como a banda de absorção no UV em λ 238 nm (Figura 93) da fração D8-R9-C2A foram utilizados para pesquisa na base de dados DNP. Verificou-se a ausência de qualquer composto que apresentasse dados idênticos, sugerindo que se trata de um composto até o momento desconhecido. Assim, foram realizadas análises de RMN de ^1H , ^{13}C , COSY, HMBC, HSQC e NOESY com o objetivo de determinar a estrutura do composto presente nesta fração. O composto inédito presente na fração D8-R9-C2A foi identificado e nomeado como fomactina U (59).

A análise do espectro de absorções no IV (Figura 94) apresentou absorções nos comprimentos de onda:

- ✓ 3372 – banda larga atribuída a estiramento de OH
- ✓ 2973, 2939 e 2871 cm^{-1} – atribuídos a estiramento de C-H alifático,
- ✓ 1690 cm^{-1} – conjugação de C=O com C=C,
- ✓ 1629 cm^{-1} – conjugação de C=C com C=O
- ✓ 1446 e 1385 cm^{-1} – atribuído a dobramentos de grupos CH_3 .

Figura 92: Espectro de massas de alta resolução (ESI+) da fomactina U (59, fração D8-R9-C2A).

Figura 93: Espectro de absorções no UV da fomactina U (**59**, Fração D8-R9-C2A, MeOH).

Figura 94: Espectro de absorções no IV da fomactina U (**59**, Fração D8-R9-C2A, pastilha de silício).

O espectro de RMN de ^1H da fração D8-R9-C2A (Apêndice 56 – 59), analisado em conjunto com o espectro HSQC (Apêndice 61), apresenta oito sinais com deslocamento químico em δ 1,00, 1,30, 1,34, 1,45, 1,78, 1,89, 2,05 e 2,10 atribuídos a hidrogênios metilênicos; dois sinais em δ 1,33 e 2,30 atribuídos a hidrogênios metínicos sp^3 ; três sinais em δ 2,84, 3,61 e 3,90 atribuídos a hidrogênios metínicos próximos a oxigênio; um sinal em δ 5,62 atribuído a hidrogênio vinílico; cinco sinais em δ 0,83, 0,91, 1,21, 1,23 e 1,27 atribuídos a hidrogênios de metilas e um sinal em δ 5,02 atribuído a hidrogênio de hidroxila.

O espectro de RMN de ^{13}C da fração D8-R9-C2A (Apêndice 60) apresenta cinco sinais com deslocamentos químicos em δ 13,3, 14,5, 15,4, 17,9 e 22,2 atribuídos aos carbonos de metilas; quatro sinais em δ 24,4, 30,6, 32,5 e 34,4 atribuídos aos carbonos metilênicos; dois sinais em δ 46,5 e 36,2 atribuídos aos carbonos metínicos sp^3 ; três sinais em δ 71,0, 66,7 e 57,7 atribuídos aos carbonos metínicos substituídos por oxigênio; dois sinais em δ 62,7 e 61,1 atribuídos a carbonos quaternários sp^3 substituídos por oxigênio; um sinal em δ 36,5 atribuído a carbono quaternário sp^3 ; dois sinais em δ 133,4 e 145,4 atribuídos a carbonos vinílicos, sendo o último quaternário; e um sinal em δ 200,3 atribuído a carbono de carbonila de cetona. A análise dos espectros de RMN de ^1H , ^{13}C e EMAR indicam a fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_4$, com IDH igual a seis.

A análise dos espectros de RMN de ^1H , ^{13}C e HSQC em conjunto com os espectros COSY (Apêndice 62) e HMBC (Apêndice 63) permitiram identificar uma estrutura inédita de fomactina, semelhante à fomactina R (**55**, seção 4.2.1.2). A fomactina U (**59**) se diferencia da fomactina R (**55**) pela presença de uma hidroxila na posição C13 e uma metila na posição C16, além do grupo epóxido entre as posições C7-C8 semelhante à fomactina S (**57**, seção 4.2.2.2).

No espectro de COSY foi possível observar as correlações ^1H - ^1H entre os hidrogênios vicinais em δ 0,83 e 1,33, em δ 1,33 e 3,61, em δ 3,61 e 5,02 e 5,62 e em δ 2,30 e 1,27 confirmando assim a presença da hidroxila e da metila nas posições C13 e C16, respectivamente. Além disso, os acoplamentos observados no espectro HMBC entre o sinal de δ 36,5, 46,5, 133,4, 145,4 e 2,30, em δ 46,5, 133,4 e 5,02, em δ 15,4, 145,4 e 3,61 e em δ 145,4 e 1,27 permitiram a determinação estrutural da semi-estrutura do ciclo:

A análise do espectro NOESY (Apêndice 64) da fomactina U (**59**) permitiu observar correlações entre os hidrogênios em δ 0,91, 0,83, 5,62, 3,61 e 2,30, em δ 3,61, 5,02 e 5,62, em δ 0,91 e 1,27, em δ 5,02 e 1,33 e em δ 0,91, 3,61 e 0,83 que indicam geometria *E* para a dupla ligação entre as posições C1-C14 e que as metilas em δ 0,83 e 0,91 estão em planos opostos aos grupos hidroxila e metila em δ 5,02 e 1,27.

As correlações em δ 1,00, 1,27, 2,84 e 3,90, em δ 1,21, 1,78, 5,62 e 2,84, em δ 1,78 e 0,91 e em δ 5,62 e 1,21 indicam estereoquímica dos grupos epóxidos semelhante à já apresentada para a fomactina S (**57**). Correlações adicionais são apresentadas na tabela 14.

A análise conjunta dos espectros de RMN permitiram identificar a estrutura da fomactina U (**59**), presente na fração D8-R9-C2A, com estereoquímica relativa 3(*S**), 4(*R**), 7(*S**), 8(*S**), 11(*R**), 12(*S**), 13(*S**), 15(*S**) (Figura 95). A análise de dicroísmo circular (Figura 96) apresentou efeito Cotton negativo na região entre 200-220 nm e positivo na região entre 220-350 nm. A avaliação por $[\alpha]_D$ apresentou desvio do plano da luz polarizada para a direita (+, dextrógiro). A tabela 15 sumariza os valores de deslocamento químico observados nos espectros de RMN de ¹H e ¹³C obtidos para a fração D8-R9-C2A.

Fomactina U (**59**): branco, pó amorfo; $[\alpha]_D^{23} +127,6$ (*c* 2,0, MeOH); UV (*c* 0,01, MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 238 (1,6) nm; DC (*c* 1,0, MeOH) $\lambda_{\max}$ ($\Delta\epsilon$) 209 (-1,1), 241 (2,5); IV $\nu_{\max}$ 3372, 2973, 2939, 2871, 1690, 1629, 1446, 1385 cm⁻¹; dados de RMN de ¹H (600 MHz) e ¹³C (150 MHz), Tabela 15; EMAR-ESI *m/z* 335,2209 [M + H]⁺ (calc. para C₂₀H₃₁O₄, 335,2217).

Tabela 14: Correlações observadas no espectro NOESY obtido para fomactina U (**59**, Fração D8-R9C2A).

Fomactina U (59)		
posição	δ_H	NOESY
3	3,90	5,32, 2,84, 1,27, 1,00
5	1,30	sb
	2,10	sb
6	1,34	sb
	2,05	sb
7	2,84	5,62, 3,90, 1,78, 1,21
9	1,45	1,78, 1,00
	1,89	1,27, 1,23, 1,00, 0,91
10	1,00	3,90, 1,89, 1,45
	1,78	2,84, 1,45, 1,00, 0,91
12	1,33	sb, 5,02
13	3,61	5,62, 5,02, 2,30, 0,83
14	5,62	5,02, 3,90, 3,61, 2,84, 2,30, 1,21
15	2,30	5,62, 3,61, 1,27, 0,91, 0,83
16	1,27	3,90, 2,30, 1,89, 0,91
17	1,23	1,89
18	0,91	2,30, 1,89, 1,78, 1,27, 0,83
19	0,83	3,60, 2,30, 0,91
20	1,21	5,62, 2,84
13-OH	5,02	5,62, 3,61, 1,33

Legenda: sb – sinais sobrepostos

Figura 95: Estrutura da fomactina U (**59**, Fração D8-R9-C2A)

Figura 96: Espectro de dicroísmo circular obtido para a fomactina U (**59**, MeOH, fração D8-R9-C2A)

Tabela 15: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (^1H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) da fomactina U (**59**, Fração D8-R9-C2A).

Fomactina U (59)		
posição	δ_{C} , tipo	δ_{H} (<i>J</i> em Hz)
1	145,4, C	
2	200,3, C	
3	66,7, CH	3,90, s
4	62,7, C	
5	34,4, CH_2	1,30, m; 2,10, m
6	24,4, CH_2	1,34, m; 2,05, m
7	57,7, CH	2,84, dd (11,0, 4,2)
8	61,1, C	
9	30,6, CH_2	1,45, ddd (14,7, 8,8, 7,5); 1,89 ddd (14,7, 9,3, 4,2)
10	32,5, CH_2	1,00, ddd (15,7, 8,7, 7,8); 1,78, ddd (14,5, 9,3, 4,0)
11	36,5, C	
12	46,5, CH	1,33, m
13	71,0, CH	3,61, m
14	133,4, CH	5,62, dd (3,4, 2,8)
15	36,2, CH	2,30, qt (12,0, 1,8)
16	13,3, CH_3	1,27, d (7,8)
17	17,9, CH_3	1,23, s
18	22,2, CH_3	0,91, s
19	15,4, CH_3	0,83, d (7,3)
20	14,5, CH_3	1,21, s
13-OH		5,02, d (5,0)

4.2.2.5. Identificação da fomactina V (**60**, fração D8-R9-C3A)

Os dados dos espectros de absorções no UV e de massas obtidos para a fração D8-R9-C3A foram utilizados para pesquisa na base de dados DNP. Verificou-se a ausência de qualquer composto que apresentasse dados idênticos, sugerindo ser um composto desconhecido. Assim,

foram realizadas análises de RMN de ^1H , ^{13}C , COSY, HMBC, HSQC e NOESY com o objetivo de determinar a estrutura do composto presente nesta fração. O composto inédito presente na fração D8-R9-C3A foi identificado e nomeado como fomactina V (**60**).

O espectro de massas de alta resolução (Figura 97) apresentou íon aduto de sódio $[\text{M}+\text{Na}]^+$ m/z 341,2086 e íon dímero aduto de sódio $[2\text{M}+\text{Na}]^+$ m/z 359,4278. O espectro de absorções no UV (Figura 98) da fração D8-R9-C3A apresentou absorção de maior intensidade nos comprimentos de onda de λ 204, 247 e 311 nm. O espectro de absorções no IV (Figura 99) apresentou absorções nos comprimentos de onda:

- ✓ 3445 – banda larga atribuída a estiramento de OH
- ✓ 2959 e 2925 cm^{-1} – atribuídos a estiramento de C-H alifático,
- ✓ 1676 cm^{-1} – conjugação de C=O com C=C,
- ✓ 1453 e 1385 cm^{-1} – atribuído a dobramentos de grupos CH_3 .

Figura 97: Espectro de massas de alta resolução (ESI+) da fomactina V (**60**, fração D8-R9-C3A).

Figura 98: Espectro de absorções no UV da fomactina V (**60**, Fração D8-R9-C3A, MeOH).

Figura 99: Espectro de absorções no IV da fomactina V (**60**, Fração D8-R9-C3A, pastilha de silício).

O espectro de RMN de ^1H da fração D8-R9-C3A (Apêndice 65 – 68), analisado em conjunto com o espectro HSQC (Apêndice 70), apresenta sete sinais com deslocamento químico em δ 1,02, 1,24, 1,73, 2,06, 2,13, 2,16 e 2,44 atribuídos a hidrogênios metilênicos; dois sinais em δ 1,33 e 2,38 atribuídos a hidrogênios metínicos sp^3 ; três sinais em δ 4,19, 3,61 e 3,90 atribuídos a hidrogênios metínicos próximos a oxigênio; dois sinais em δ 5,66 e 5,34 atribuídos a hidrogênios vinílicos; cinco sinais em δ 0,80, 0,96, 1,03, 1,29 e 1,60 atribuídos a hidrogênios de metilas e um sinal em δ 5,34 atribuído a hidrogênio de hidroxila.

O espectro de RMN de ^{13}C da fração D8-R9-C3A (Apêndice 69) apresenta cinco sinais com deslocamentos químicos em δ 12,4, 15,0, 15,7, 17,0 e 21,7 atribuídos aos carbonos de metilas; quatro sinais em δ 23,1, 31,2, 37,2 e 43,9 atribuídos aos carbonos metilênicos; dois sinais em δ 39,7 e 33,8 atribuídos aos carbonos metínicos sp^3 ; dois sinais em δ 71,7 e 66,8 atribuídos aos carbonos metínicos substituído por oxigênio; um sinal em δ 61,9 atribuído a carbonos quaternários sp^3 substituído por oxigênio; um sinal em δ 37,1 atribuído a carbono quaternário sp^3 ; quatro sinais em δ 121,1, 130,8, 140,4 e 145,5 atribuídos a carbonos vinílicos, sendo os dois últimos quaternários; e um sinal em δ 200,1 atribuído a carbono de carbonila de cetona. A análise dos espectros de RMN de ^1H , ^{13}C e EMAR sugerem a fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_3$, com IDH igual a seis.

A análise dos espectros de RMN de ^1H , ^{13}C e HSQC em conjunto com os espectros COSY (Apêndice 71) e HMBC (Apêndice 72) permitiram identificar uma estrutura inédita de fomactina, semelhante à fomactina R (**55**, seção 4.2.1.2). A fomactina V (**60**) se diferencia da fomactina R (**55**) pela presença de um grupo hidroxila na posição C9 e uma metila na posição C16.

A presença da hidroxila e da metila nas posições C9 e C16, respectivamente, puderam ser confirmadas pelas correlações observadas no espectro COSY entre os hidrogênios vicinais em δ 4,51 e 4,19, em δ 4,19 e 2,16/1,02 e em δ 2,38 e 1,29. Além das correlações carbono-hidrogênio observadas no espectro HMBC entre os sinais em δ 21,7, 39,7 e 2,38, em δ 37,1, 145,5 e 1,29, em δ 37,1, 12,4, 140,4 e 4,19, em δ 71,7 e 5,34 e em δ 43,9, 140,4 e 4,51, permitindo a determinação estrutural da semi-estrutura do ciclo:

Diagram illustrating the assignment of chemical shifts (in ppm) for the protons of a substituted cyclohexene derivative, showing correlations between protons and their corresponding chemical shifts (e.g., 0,80, 2,38, 1,73, 1,29, 5,66, 2,44, 1,03, 1,33). The diagram also includes a NOESY correlation arrow and a chemical structure of the molecule.

As correlações em δ 1,03, 1,29, 5,34, 1,60 e 4,19, em δ 1,29, 3,73 e 5,34, em δ 1,60, 3,73, 2,06 e 0,96, em δ 1,29, 1,24 e 3,73, em δ 2,16 e 2,44 e em δ 1,60, 1,02 e 4,51 indicam configuração relativa *cis* para o epóxido entre as posições C3-C4, geometria *E* para a dupla ligação entre as posições em C7-C8 e o grupo hidroxila voltado para o lado oposto do plano em relação ao grupo epóxido. Correlações adicionais são apresentadas na tabela 16.

A análise conjunta dos espectros de RMN permitiu identificar a fomactina V (**60**), presente na fração D8-R9-C3A, com estereoquímica relativa 3(*R**), 4(*S**), 9(*S**), 11(*S**), 12(*R**), 15(*S**) (Figura 100). A análise de dicroísmo circular (Figura 101) apresentou efeito Cotton positivo na região entre 200-250 nm e 250-300 nm e negativo na região entre 300-350 nm. A avaliação por $[\alpha]_D$ apresentou desvio do plano da luz polarizada para a direita (+, dextrógiro). A tabela 17 sumariza os valores de deslocamento químico observados nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C obtidos para a fração D8-R9-C3A.

Fomactina V (**60**): branco, pó amorfo; $[\alpha]_D^{23} +13,7$ (*c* 0,58, MeOH); UV (*c* 0,01, MeOH) λ_{max} (log ϵ) 204 (1,9), 247 (1,8), 311 (1,0) nm; DC (*c* 0,58, MeOH) λ_{max} ($\Delta\epsilon$) 223 (3,1), 265 (1,0), 318 (-0,5); IV ν_{max} 3445, 2959, 2925, 1676, 1453, 1385 cm^{-1} ; dados de RMN de ^1H (600 MHz) e ^{13}C (150 MHz), Tabela 17; EMAR-ESI m/z 341,2086 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{NaO}_3$, 341,2087).

Tabela 16: Correlações observadas no espectro NOESY obtido para fomactina V (**60**, Fração D8-R9C3A).

Fomactina V (60)		
Posição	δ_H	NOESY
3	3,73	5,34, 1,29, 1,24, 0,96
5	1,24	3,73, 2,06
	2,06	1,24, 0,96
6	2,13	Sb
7	5,34	4,19, 3,73, 2,16, 1,29
9	4,19	5,34, 4,47, 1,60, 1,03
10	1,02	sb, 4,51
	2,16	sb, 2,44
12	1,33	2,44, 1,03, 0,80
13	1,73	5,66, 2,44, 2,38, 0,80
	2,44	5,66, 2,16, 1,73, 1,33
14	5,66	2,44, 1,73
15	2,38	1,73, 1,29, 1,03, 0,80
16	1,29	5,34, 4,19, 3,73, 2,38
17	1,60	4,51, 4,19, 2,19
18	1,03	sb, 4,19, 2,38, 1,33, 0,80
19	0,80	2,38, 1,73, 1,33, 1,03
20	0,96	3,73, 2,06
9-OH	4,51	4,19, 1,60, 1,02

Legenda: sb – sinais sobrepostos

Figura 100: Estrutura da fomactina V (**60**, Fração D8-R9-C3A)

Figura 101: Espectro de dicroísmo circular obtido para a fomactina V (**60**, MeOH, fração D8-R9-C3A)

Tabela 17: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (^1H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz, DMSO- d_6) da fomactina V (**60**, Fração D8-R9-C3A).

Fomactina V (60)		
Posição	δ_{C} , tipo	δ_{H} (<i>J</i> em Hz)
1	145,5, C	
2	200,1 C	
3	66,8, CH	3,73, s
4	61,9, C	
5	37,2, CH ₂	1,24, ddd (12,8, 12,5, 6,2); 2,06, dt (13,1, 3,5)
6	23,1, CH ₂	2,13, m
7	121,5, CH	5,34, ddl (7,6, 6,5)
8	140,4, C	
9	71,7, CH	4,19, dd (4,1, 3,6)
10	43,9, CH ₂	1,02, m; 2,16, m
11	37,1, C	
12	39,7, CH	1,33, ddq (7,0, 7,0)
13	31,2 CH ₂	1,73, ddd (20,0, 8,0, 4,1); 2,44, m
14	130,8, CH	5,66, dt (3,4, 3,2)
15	33,8, CH	2,38, m
16	15,7, CH ₃	1,29, d (8,0)
17	12,4, CH ₃	1,60, s
18	21,7, CH ₃	1,03, s
19	17,0, CH ₃	0,80, d (7,0)
20	15,0, CH ₃	0,96, s
9-OH		4,51, d (4,6)

4.2.2.6. Identificação da fomactina P (**61**, fração D8-R5-C2).

Os dados dos espectros de absorções no UV e de massas obtidos para a fração D8-R5-C2 foram utilizados para pesquisa na base de dados DNP. O composto presente na fração D8-R5-C2 foi identificado como sendo a fomactina P (**61**). Para confirmação da estrutura e de sua estereoquímica, foram realizadas análises RMN de ^1H , ^{13}C , COSY, HMBC, HSQC e NOESY.

O espectro de massas de alta resolução (Figura 102) apresentou íon quasi-molecular $[M+H]^+$ m/z 317,2108 e íon aduto de sódio $[M+Na]^+$ m/z 339,1926. O espectro de absorções no UV (Figura 103) da fração D8-R5-C2 apresentou absorções de maior intensidade nos comprimentos de onda de λ 223 e 262 nm. O espectro de absorções no IV (Figura 104) apresentou absorções nos comprimentos de onda:

- ✓ 3432 – banda larga atribuída a estiramento de OH, provável presença de água na amostra,
- ✓ 2925, 2851 cm^{-1} – atribuídos a estiramento de C-H alifático,
- ✓ 1676 cm^{-1} – conjugação de C=O com C=C,
- ✓ 1588 cm^{-1} – conjugação de C=C com C=O
- ✓ 1393 cm^{-1} – atribuído a dobramentos de grupos CH_3 .

Figura 102: Espectro de massas de alta resolução (ESI+) da fomactina P (**61**, fração D8-R5-C2).

Figura 103: Espectro de absorções no UV da fomactina P (**61**, Fração D8-R5-C2, MeOH).

Figura 104: Espectro de absorções no IV da fomactina P (**61**, Fração D8-R5-C2, pastilha de silício).

A análise dos espectros de RMN uni e bidimensionais (Apêndice 74 – 79) confirmou a identificação da estrutura da fomactina P (**61**). O espectro de RMN de ^1H da fração D8-R5-C2 (Apêndice 74), analisado em conjunto com o espectro HSQC (Apêndice 76), apresenta dez sinais com deslocamento químico em δ 1,09, 1,17, 1,30, 1,52, 1,80, 2,02, 2,04, 2,17, 2,25 e 2,75 atribuídos a hidrogênios metilênicos; um sinal em δ 1,72 atribuído a hidrogênio metínico sp^3 ; dois sinais em δ 4,02 e 2,96 atribuídos a hidrogênios metínicos próximos a oxigênio; três sinais em δ 5,98, 5,29 e 5,20 atribuídos a hidrogênios vinílicos e quatro sinais em δ 0,88, 1,10, 1,29 e 1,32 atribuídos a hidrogênios de metilas.

O espectro de RMN de ^{13}C da fração D8-R5-C2 (Apêndice 75) apresenta quatro sinais com deslocamentos químicos em δ 14,2, 17,6, 19,5, e 21,9 atribuídos aos carbonos de metilas; cinco sinais em δ 25,5, 28,2, 30,2, 32,7 e 36,6 atribuídos aos carbonos metilênicos; um sinal em δ 39,1 atribuído ao carbono metínico sp^3 ; dois sinais em δ 66,1 e 57,6 atribuídos aos carbonos metínicos substituídos por oxigênio; dois sinais em δ 64,5 e 61,3 atribuídos a carbonos quaternários sp^3 substituídos por oxigênio; um sinal em δ 43,6 atribuído a carbono quaternário sp^3 ; quatro sinais em δ 117,5, 132,8, 143,2 e 145,8 atribuídos a carbonos vinílicos, sendo o último quaternário; e um sinal em δ 202,1 atribuído a carbono de carbonila de cetona. A análise dos espectros de RMN de ^1H , ^{13}C e EMAR sugerem a fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_3$, com IDH igual a sete.

A correlações observadas nos espectros COSY e HMBC são apresentadas na figura 105. A tabela 18 apresenta a comparação dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C obtidos para a fomactina P (**61**) presente na fração D8-R5-C2 e dos dados apresentados na literatura (ISHINO *et al.*, 2016).

Figura 105: Correlações COSY (—) e HMBC (↗) observadas para a fomactina P (**61**, fração D8-R5-C2).

Tabela 18: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da fomactina P (**61**, fração D8-R5-C2)

Fomactina P (61)				
Carbono	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$	δ_{H} (J em Hz) ^c	δ_{H} (J em Hz) ^d
1	143,2	141,7		
2	202,1	199,5		
3	66,1	64,5	4,02, s	3,87, s
4	64,5	62,8		
5	36,6	35,6	1,17, ddd (4,3, 13,5, 13,5) 2,25, ddd (3,2, 4,4, 13,2)	1,09, m 2,25, ddd (13,4, 4,4, 3,3)
6	25,5	24,3	1,52, m 2,17, tt (4, 14)	1,48, m 2,13, m
7	57,6	55,7	2,96, dd (3,8, 11)	2,87, dd (11, 3,9)
8	61,3	59,3		
9	30,2	29,1	1,80, ddd (1,3, 7,2, 15,7) 2,04, m	1,65, m 2,01, m
10	28,2	26,8	1,09, m 1,30, m	1,08, m 2,01, m
11	43,6	42,2		
12	39,1	37,6	1,72, qui (7)	1,65, m
13	32,7	31,4	2,02, m 2,75, ddd (2,6, 5,8, 20,6)	1,96, dd (20,6, 4,7) 2,70, ddd (20,7, 6,1, 2,7)
14	132,8	131,3	5,98, m	5,95, br s
15	145,8	144,2		
16	117,5	116,4	5,20, s 5,29, s	5,18, br s
17	19,5	19,0	1,32, s	1,27, s
18	21,9	21,1	1,10, s	1,03, s
19	17,6	17,0	0,88, d (7)	0,83, d (7,1)
20	14,2	13,6	1,29, s	1,28, s

a – MeOH- d_4 , 150 MHz, b – CDCl_3 , 125 MHz, c - MeOH- d_4 , 600 MHz, d – CDCl_3 , 400 MHz.b, d – ISHINO *et al.*, 2016.

A análise do espectro NOESY (Apêndice 79) da fomactina P (**61**) permite observar correlações entre os hidrogênios em δ 0,88 e 5,29 e em δ 2,75, 1,10 e 1,72 que indicam estereoquímica das metilas em δ 0,88 e 1,10 semelhantes às já apresentadas para as outras fomactinas.

As correlações em δ 2,75, 2,96 e 1,32, em δ 5,20, 2,96, 1,80, 1,17 e 4,02, em δ 2,75, 2,96 e 1,29 e em δ 1,80 e 110 indicam conformação dos epóxidos semelhante a determinada para a fomactina S (**57**). Correlações adicionais são apresentadas na tabela 19.

Tabela 19: Correlações observadas no espectro NOESY obtido para fomactina P (**61**, Fração D8-R5C2).

Fomactina P (61)		
Posição	δ_H	NOESY
3	4,02	5,20, 2,96, 1,80, 1,17, 1,30
5	1,17	4,02, 2,25, 1,52
	2,25	1,17
6	1,52	2,18, 1,17
	2,17	2,96, 1,52
7	2,96	4,02, 2,17, 1,32 1,29
9	1,80	4,02, 2,04, 1,10
	2,04	sb, 1,80
10	1,09	sb
	1,30	sb, 5,98
12	1,72	2,75, 1,10, 0,88
13	2,02	sb, 5,98, 2,75
	2,75	5,98, 2,02, 1,72, 1,32, 1,29
14	5,98	2,75, 2,02, 1,30
16	5,20	4,02, 0,88
	5,29	1,80, 1,10, 0,88
17	1,32	sb, 2,96, 2,75
18	1,10	sb, 5,29, 1,80, 1,72
19	0,88	5,29, 5,20, 1,72
20	1,29	Sb

Legenda: sb – sinais sobrepostos

A análise conjunta dos espectros de RMN (Apêndice 74 – 79) permitiram identificar a fomactina P (**61**) (ISHINO *et al.*, 2016), presente na fração D8-R5-C2, com estereoquímica relativa 3(*S**), 4(*R**), 7(*S**), 8(*S**), 11(*S**), 12(*R**) (Figura 106). A análise de dicroísmo circular (Figura 107) apresentou efeito Cotton positivo e a análise por $[\alpha]_D$ apresentou desvio do plano da luz polarizada para a direita (+, dextrógiro), com valor de desvio condizente com o valor

apresentado por Ishino *et al.* (2016). Tais dados poderão ser utilizados futuramente para determinação da configuração relativa de estruturas semelhantes.

Fomactina P (**61**): branco, pó amorfo; $[\alpha]_D^{23} +88,6$ (c 1,0, MeOH) (Lit.: [ISHINO *et al.*, 2016] +91,6, c 0,54, MeOH); UV (c 0,01, MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 223 (1,9), 262 (1,5) nm; CD (c 0,5, MeOH) $\lambda_{\max}$ ($\Delta\epsilon$) 219 (5,0), 259 (2,4); IR $\nu_{\max}$ 3432, 2925, 2851, 1676, 1588, 1393 cm^{-1} ; dados de RMN de ^1H (600 MHz) e ^{13}C (150 MHz), Tabela 18; EMAR-ESI m/z 317,2108 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (calc. para $\text{C}_{20}\text{H}_{29}\text{O}_3$, 317,2111).

Figura 106: Estrutura da fomactina P (**61**, Fração D8-R5-C2)

Figura 107: Espectro de dicroísmo circular obtido para a fomactina P (**61**, MeOH, fração D8-R5-C2)

4.2.2.7. Identificação da fomactina F (62, fração D8-R9-C2B)

A pesquisa na base de dados DNP foi realizada utilizando os dados dos espectros de absorções no UV e de massas obtidos para a fração D8-R9-C2B. O composto presente na fração D8-R9-C2B foi identificado como sendo a fomactina F (**62**). Para confirmar o resultado foram realizados os espectros de RMN de ^1H , ^{13}C , COSY, HMBC, HSQC e NOESY e comparados com os da literatura.

O espectro de massas de alta resolução (Figura 108) apresentou íon quasi-molecular $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 335,2209 e íon aduto de sódio $[\text{M}+\text{Na}]^+$ m/z 357,2028. O espectro de absorções no UV (Figura 109) da fração D8-R9-C2B apresentou absorções de maior intensidade nos comprimentos de onda de λ 202, 238 e 307 nm. O espectro de absorções no IV (Figura 110) apresentou absorções nos comprimentos de onda:

- ✓ 3432 – banda larga atribuída a estiramento de OH, provável presença de água na amostra.
- ✓ 2959, 2925, 2865 cm^{-1} – atribuídos a estiramento de C-H alifático,
- ✓ 1676 cm^{-1} – conjugação de C=O com C=C,
- ✓ 1622 cm^{-1} – conjugação de C=C com C=O
- ✓ 1460 e 1379 cm^{-1} – atribuído a dobramentos de grupos CH_3 .

Figura 108: Espectro de massas de alta resolução (ESI+) da fomactina F (**62**, fração D8-R9-C2B).

Figura 109: Espectro de absorções no UV da fomactina F (**62**, Fração D8-R9-C2B, MeOH).

Figura 110: Espectro de absorções no IV da fomactina F (**62**, Fração D8-R9-C2B, pastilha de silício).

A análise dos espectros de RMN uni e bidimensionais (Apêndice 80 – 85) confirmou a identificação da estrutura da fomactina F (**62**). O espectro de RMN de ^1H da fração D8-R9-C2B (Apêndice 80), analisado em conjunto com o espectro HSQC (Apêndice 82), apresenta nove sinais com deslocamento químico em δ 0,84, 1,43, 1,31, 1,32, 1,87, 1,92, 2,02, 2,06 e 2,34 atribuídos a hidrogênios metilênicos; um sinal em δ 1,58 atribuído a hidrogênio metínico sp^3 ; dois sinais em δ 3,99 e 2,57 atribuídos a hidrogênios metínicos próximos a oxigênio; um sinal em δ 5,68 atribuído a hidrogênio vinílico; um sinal em δ 4,64 atribuído a hidrogênio de hidroxila e cinco sinais em δ 1,02, 1,09, 1,19, 1,21 e 1,37 atribuídos a hidrogênios de metilas.

O espectro de RMN de ^{13}C da fração D8-R9-C2B (Apêndice 81) apresenta cinco sinais com deslocamentos químicos em δ 14,3, 15,8, 20,7, 21,6 e 22,6 atribuídos aos carbonos de metilas; cinco sinais em δ 24,2, 31,9, 33,8, 34,4 e 37,1 atribuídos aos carbonos metilênicos; um sinal em δ 32,4 atribuído ao carbono metínico sp^3 ; dois sinais em δ 66,0 e 60,0 atribuídos aos carbonos metínicos substituídos por oxigênio; três sinais em δ 74,6, 62,8 e 61,9 atribuídos a carbonos quaternários sp^3 substituídos por oxigênio; um sinal em δ 41,9 atribuído a carbono quaternário sp^3 ; dois sinais em δ 130,2 e 149,8 atribuídos a carbonos vinílicos, sendo o último quaternário; e um sinal em δ 200,7 atribuído a carbono de carbonila de cetona. A análise dos espectros de RMN de ^1H , ^{13}C e EMAR sugerem a fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_4$, com IDH igual a seis.

A correlações observadas nos espectros COSY e HMBC são apresentadas na figura 111. A tabela 20 apresenta a comparação dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C obtidos para a fomactina F (**62**) presente na fração D8-R9-C2B e dos dados apresentados na literatura (SUGANO *et al.*, 1995).

Figura 111: Correlações COSY (—) e HMBC (↗) observadas para a fomactina F (**62**, fração D8-R9-C2B).

Tabela 20: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da fomactina F (**62**, fração D8-R9-C2B)

Fomactina F (62)				
Carbono	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$	δ_{H} (J em Hz) ^c	δ_{H} (J em Hz) ^d
1	149,8	150,6		
2	200,7	202,6		
3	66,0	68,2	3,99, s	3,99, s
4	62,8	64,4		
5	33,8	35,5	1,32, m; 2,06, m	1,38, m 2,23, m
6	24,2	25,3	1,31, m; 2,02, m	1,48, m 2,21, m
7	60,0	62,5	2,57, dd (10,5, 3,6)	2,73, dd (10,5, 3,7)
8	61,9	64,0		
9	34,4	38,9	0,84, m; 1,87, m	1,59, m
10	37,1	35,6	1,43, m	1,03, m 1,99, m
11	41,9	43,7		
12	32,4	34,3	1,58, m	1,75, dq (9,3, 7,3
13	31,9	33,4	1,92, m; 2,34, m	2,10, dd (19,4, 2,7) 2,49, ddd (19,4, 9,3, 6,4)
14	130,2	133,4	5,68, dd (6,2, 2,6)	5,84, dd (6,4, 2,7)
15	74,6	76,5		
16	22,6	23,2	1,37, s	1,49, s
17	15,8	16,2	1,19, s	1,27, s
18	20,7	21,1	1,02, s	1,15, s
19	21,6	22,0	1,09, d (7,2)	1,18, d (7,3)
20	14,3	14,8	1,21, s	1,32, s
15-OH			4,64, s	

a – DMSO- d_6 , 150 MHz, b – MeOH- d_4 , 125 MHz, c - DMSO- d_6 , 600 MHz, d – MeOH- d_4 , 400 MHz.

b, d – SUGANO *et al.*, 1995.

A análise do espectro NOESY (Apêndice 85) da fomactina F (**62**) permite observar correlações entre os hidrogênios em δ 2,34 e 1,58, em δ 1,02, 1,37, 1,92, 1,09 e 4,64 que indicam que as metilas em δ 1,02, 1,09 e o grupo hidroxila em δ 4,64 estão voltadas para o mesmo lado do plano, enquanto a metila em δ 1,37 está voltada para o lado oposto.

As correlações em δ 2,57, 1,43 e 1,21, em δ 0,84, 1,19, 2,57, 1,21, 1,37 e 3,99, em δ 1,02, 1,19 e 1,87 e em δ 0,84, 1,43 e 2,57 indicam conformação *cis* para o epóxido entre as posições C3-C4 e *trans* para o epóxido entre as posições C7-C8, e que ambos os epóxidos estão voltados para o mesmo lado do plano, diferentemente da fomactina F (**62**) já publicada na literatura (SUGANO *et al.*, 1995). Correlações adicionais são apresentadas na tabela 21.

Tabela 21: Correlações observadas no espectro NOESY obtido para fomactina F (**62**, Fração D8-R9C2B).

Fomactina F (62)		
posição	δ_H	NOESY
3	3,99	2,57, 1,37, 1,21, 1,19, 0,84
5	1,32	sb
	2,06	sb
6	1,31	sb
	2,02	sb
7	2,57	5,68, 3,99, 1,43, 1,21, 0,84
9	0,84	3,99, 2,57, 2,34
	1,87	sb, 1,19, 1,02
10	1,43	2,57, 1,21
12	1,58	2,34, 1,92, 1,09
13	1,92	sb, 5,68, 4,64, 2,34, 1,58
	2,34	5,68, 1,92, 1,58, 1,09, 0,84
14	5,68	2,57, 2,34, 1,92, 1,21
16	1,37	4,64, 3,99
17	1,19	sb, 5,68, 3,99, 1,87
18	1,02	4,64, 1,87
19	1,09	4,64, 2,34, 1,58
20	1,21	sb, 5,68, 3,99, 2,57
15-OH	4,64	1,92, 1,37, 1,09, 1,02

Legenda: sb – sinais sobrepostos

A análise conjunta dos espectros de RMN (Apêndice 80 – 85) permitiram identificar a fomactina F (**62**) (SUGANO *et al.*, 1995), presente na fração D8-R9-C2B, com estereoquímica

relativa 3(*S**), 4(*R**), 7(*R**), 8(*R**), 11(*S**), 12(*R**), 15(*R**) (Figura 112) (Lit. [SUGANO *et al.*, 1995] 3(*S*), 4(*R*), 7(*S*), 8(*S*), 11(*S*), 12(*R*), 15(*R*)). A análise de dicroísmo circular (Figura 113) apresentou efeito Cotton positivo e a avaliação por $[\alpha]_D$ apresentou desvio do plano da luz polarizada para a direita (+, dextrogiro). Sugano *et al.* (1995) não apresentou as análises por dicroísmo circular e $[\alpha]_D$ para comparação dos dados.

Fomactina F (62): branco, pó amorfo; $[\alpha]_D^{23} +116,7$ (*c* 0,85, MeOH); UV (*c* 0,01, MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 202 (1,8), 238 (1,6), 307 (0,7) nm; CD (*c* 0,85, MeOH) $\lambda_{\max}$ ($\Delta\epsilon$) 268 (1,6), 298 (2,8); IV $\nu_{\max}$ 3432, 2959, 2925, 2865, 1676, 1622, 1460, 1379 cm^{-1} ; dados de RMN de ^1H (600 MHz) e ^{13}C (150 MHz), Tabela 20; EMAR-ESI m/z 335,2209 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (calc. para $\text{C}_{20}\text{H}_{31}\text{O}_4$, 335,2217).

Figura 112: Estrutura da fomactina F (**62**, Fração D8-R9-C2B)

Figura 113: Espectro de dicroísmo circular obtido para a fomactina F (**62**, MeOH, fração D8-R9-C2B)

4.2.2.8. Identificação da fomactina I (63, fração D8-R9-D4)

Os dados dos espectros de absorções no UV e de massas obtidos para a fração D8-R9-D4 foram utilizados para pesquisa na base de dados DNP. O composto presente na fração D8-R9-D4 foi identificado como sendo a fomactina I (**63**). Para confirmação da estrutura e de sua estereoquímica, foram realizadas análises RMN de ^1H , ^{13}C , COSY, HMBC, HSQC e NOESY.

O espectro de massas de alta resolução (Figura 114) apresentou íon quasi-molecular $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 333,2059 e íon aduto de sódio $[\text{M}+\text{Na}]^+$ m/z 355,1879. O espectro de absorções no UV (Figura 115) da fração D8-R9-D4 apresentou absorções de maior intensidade nos comprimentos de onda de λ 219 e 257 nm. O espectro de absorções no IV (Figura 116) apresentou absorções nos comprimentos de onda:

- ✓ 3493 e 3398 – banda larga atribuída a estiramento de OH, provável presença de água na amostra.
- ✓ 2932 e 2971 cm^{-1} – atribuídos a estiramento de C-H alifático,
- ✓ 1696 cm^{-1} – conjugação de C=O com C=C,
- ✓ 1622 cm^{-1} – conjugação de C=C com C=O
- ✓ 1453 e 1393 cm^{-1} – atribuído a dobramentos de grupos CH_3 .

Figura 114: Espectro de massas de alta resolução (ESI+) da fomactina I (**63**, fração D8-R9-D4).

Figura 115: Espectro de absorções no UV da fomactina I (**63**, Fração D8-R9-D4, MeOH).

Figura 116: Espectro de absorções no IV da fomactina I (**63**, Fração D8-R9-D4, pastilha de silício).

A análise dos espectros de RMN uni e bidimensionais (Apêndice 86 – 91) confirmou a identificação da estrutura da fomactina I (**63**). O espectro de RMN de ^1H da fração D8-R9-D4 (Apêndice 86), analisado em conjunto com o espectro HSQC (Apêndice 88), apresenta oito sinais com deslocamento químico em δ 1,11, 1,17, 1,50, 1,67, 1,88, 2,05, 2,19 e 2,25, atribuídos a hidrogênios metilênicos; um sinal em δ 1,76 atribuído a hidrogênio metínico sp^3 ; três sinais em δ 4,03, 3,96 e 3,03 atribuídos a hidrogênios metínicos próximos a oxigênio; três sinais em δ 5,89, 5,35 e 5,25 atribuídos a hidrogênio vinílicos e quatro sinais em δ 0,84, 1,12, 1,30 e 1,33 atribuídos a hidrogênios de metilas.

O espectro de RMN de ^{13}C da fração D8-R9-D4 (Apêndice 87) apresenta quatro sinais com deslocamentos químicos em δ 16,6, 18,4, 21,7 e 24,7 atribuídos aos carbonos de metilas; quatro sinais em δ 27,9, 32,0, 33,8 e 39,0 atribuídos aos carbonos metilênicos; um sinal em δ 49,2 atribuído ao carbono metínico sp^3 ; três sinais em δ 74,7, 68,4 e 60,0 atribuídos aos carbonos metínicos substituído por oxigênio; dois sinais em δ 66,8 e 63,3 atribuídos a carbonos quaternários sp^3 substituído por oxigênio; um sinal em δ 45,3 atribuído a carbono quaternário sp^3 ; quatro sinais em δ 121,4, 133,6, 145,5 e 148,1 atribuídos a carbonos vinílicos, sendo os dois últimos quaternários; e um sinal em δ 204,2 atribuído a carbono de carbonila de cetona. A análise dos espectros de RMN de ^1H , ^{13}C e EMAR sugerem a fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_4$, com IDH igual a sete.

A correlações observadas nos espectros COSY e HMBC são apresentadas na figura 117. A tabela 22 apresenta a comparação dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C obtidos para a fomactina I (**63**) presente na fração D8-R9-D4 e dos dados apresentados na literatura (ISHINO *et al.*, 2010).

Figura 117: Correlações COSY (—) e HMBC (→) observadas para a fomactina I (**63**, fração D8-R9-D4).

Tabela 22: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da fomactina I (**63**, fração D8-R9-D4)

Fomactina I (63)				
Carbono	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$	$\delta_{\text{H}} (J \text{ em Hz})^{\text{c}}$	$\delta_{\text{H}} (J \text{ em Hz})^{\text{d}}$
1	145,5	141,8		
2	204,2	199,5		
3	68,4	64,4	3,96, s	3,83, s
4	66,8	63,2		
5	39,0	35,7	1,17, ddd (4,5, 13,5, 14,7) 2,25, m	1,10, m 2,26, ddd (13,3, 4,3, 3,2)
6	27,9	24,4	1,50, m 2,19, tt (4,0, 13,9, 14,0)	1,47, m 2,16, m
7	60,0	55,7	3,03, dd (4,0, 10,8)	2,89, dd (10,7, 4,0)
8	63,3	58,9		
9	33,8	30,3	1,67, dqua (1,4, 7,7) 2,05, m	1,53, ddd (15,7, 7,3, 1,4) 2,05, ddd (15,7, 10,5, 7,3)
10	32,0	28,3	1,11, m 1,88, qua (7,6)	1,16, m 1,70, m
11	45,3	41,5		
12	49,2	46,1	1,76, qua (7,4)	1,73, m
13	74,7	71,5	4,03, d (4,3)	4,06, d (4,3)
14	133,6	129,5	5,89, m	5,92, d (4,3)
15	145,5	143,9		
16	148,1	118,5	5,25, s 5,35, d (1,6)	5,28, m
17	21,6	19,1	1,30, s	1,26, s
18	24,7	21,5	1,12, s	1,06, s
19	18,4	15,5	0,84, d (7,4)	0,81, d (7,3)
20	16,6	13,8	1,33, s	1,32, s

a – MeOH- d_4 , 150 MHz, b – CDCl_3 , 100 MHz, c - MeOH- d_4 , 600 MHz, d – CDCl_3 , 400 MHz.b, d – ISHINO *et al.*, 2010.

A análise do espectro NOESY (Apêndice 91) da fomactina I (**63**) permitiu observar correlações entre os hidrogênios em δ 0,84, 1,76, 5,89 e 4,03 e em δ 1,12 e 1,76 que indicam as metilas em δ 0,84 e 1,12 em lados opostos do plano em relação ao grupo hidroxila.

As correlações em δ 1,67, 1,17, 1,30, 3,03 e 3,96, em δ 1,17, 3,03, 5,89 e 1,33, em δ 1,67, 2,05 e 1,30 e em δ 1,88 e 3,03 indicam conformação dos epóxidos semelhante a determinada para a fomactina S (**57**). Correlações adicionais são apresentadas na tabela 23.

Tabela 23: Correlações observadas no espectro NOESY obtido para fomactina I (**63**, Fração D8-R9D4).

Fomactina I (63)		
Posição	δ_H	NOESY
3	3,96	1,30, 1,17, 3,03, 1,67
5	1,17	2,25, 3,96, 1,50, 1,33
	2,25	1,17
6	1,50	2,19
	2,19	1,50, 3,03, 1,33
7	3,03	2,19, 3,96, 5,89, 1,88, 1,33
9	1,67	5,25, 3,96, 1,12, 1,30, 2,05
	2,05	1,67, 1,30, 1,11
10	1,11	1,88, 2,05
	1,88	1,11, 3,03
12	1,76	0,84, 1,12, 4,03
13	4,03	0,84, 1,76, 5,89
14	5,89	4,03, 3,03, 1,33
16	5,25	5,35, 1,67
	5,35	5,25
17	1,30	3,96, 2,05, 1,67
18	1,12	1,76, 1,67
19	0,84	4,03, 1,76
20	1,33	5,89, 1,17, 2,19, 3,03

A análise conjunta dos espectros de RMN (Apêndice 86 – 91) permitiu identificar a fomactina I (**63**) (ISHINO *et al.*, 2010), presente na fração D8-R9-D4, com estereoquímica relativa 3(*S**), 4(*R**), 7(*S**), 8(*S**), 11(*S**), 12(*S**), 13(*R**) (Figura 118). A análise de dicroísmo circular (Figura 119) apresentou efeito Cotton positivo e a avaliação por $[\alpha]_D$ apresentou desvio

do plano da luz polarizada para a direita (+, dextrógiro), com valor de desvio condizente com o valor apresentado por (ISHINO *et al.*, 2010), tais dados poderão ser utilizados futuramente para determinação da configuração relativa de estruturas semelhantes.

Fomactina I (63): branco, pó amorfo; $[\alpha]_D^{23} +102,6$ (*c* 1, MeOH) (Lit.: [ISHINO *et al.* 2010] +133,6, *c* 0,42, MeOH); UV (*c* 0,01, MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 219 (1,9), 257 (1,5) nm; DC (*c* 1,0, MeOH) $\lambda_{\max}$ ($\Delta\epsilon$) 226 (2,0), 258 (1,9); IR $\nu_{\max}$ 3493, 3398, 2932, 2871, 1696, 1622, 1453, 1393 cm^{-1} ; dados de RMN de ^1H (600 MHz) e ^{13}C (150 MHz), Tabela 22; EMAR-ESI m/z 333,2059 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (calc. para $\text{C}_{20}\text{H}_{29}\text{O}_4$, 333,2060).

Figura 118: Estrutura da fomactina I (**63**, Fração D8-R9-D4)

Figura 119: Espectro de dicroísmo circular obtido para a fomactina I (**63**, MeOH, fração D8-R9-D4)

As fomactinas são compostos diterpênicos, isolados de linhagens fúngicas, caracterizados pela presença de um sistema biciclo[9.3.1]pentadecano (TOKIWANO *et al.*, 2005) (Figura 120). Compostos desta classe foram isolados inicialmente a partir do meio de cultura da linhagem fúngica *Phoma* sp.: as fomactinas A (**64**) (SUGANO *et al.*, 1991), B (**65**), B1 (**66**), B2 (**67**), D (**68**) (SUGANO *et al.*, 1994), C (**69**) (CHU *et al.*, 1992), E (**70**), F (**62**), G (**71**) (SUGANO *et al.*, 1995), Sch 49026 (**72**) e Sch 49027 (**73**) (CHU *et al.*, 1993). As demais foram isoladas do meio de cultura de uma linhagem fúngica não identificada: as fomactinas H (**74**) (KOYAMA *et al.*, 2004), I (**63**), 13-epi-fomactina I (**75**), fomactina J (**76**) (ISHINO *et al.*, 2010), K (**77**), L (**78**) e M (**79**) (ISHINO *et al.*, 2012), N (**80**), O (**81**), P (**61**) (ISHINO *et al.*, 2016).

A biossíntese das fomactinas foi demonstrada a partir da estrutura fomacta-1(14),3,7-trieno **82** (no esquema da Figura 121), considerada o precursor biossintético comum para diterpenos com este esqueleto de carbono (TOKIWANO *et al.*, 2004). Experimentos de incorporação com precursores isotopicamente marcados foram realizados utilizando-se [1-¹³C]acetato e [1,2-¹³C₂]acetato. Os resultados obtidos levaram à proposta da formação de **82** a partir da ciclização do geranyl-geranyl-difosfato (GGDP) e formação do cátion verticillenila como intermediário **A**⁺.

A biossíntese das fomactinas está relacionada à biossíntese do taxol pela formação do carbocátion (verticillenila) **A**⁺. A transferência de prótons intramolecular é simultânea à transanulação e eliminação, gerando o taxadieno (**83**), que após uma série de oxidações enzimáticas forma o taxol (**84**) (TOKIWANO *et al.*, 2005).

Fato notável, as fomactinas são produzidas exclusivamente por fungos obtidos do ambiente marinho.

Figura 120: Metabólitos da classe das fomactinas.

Figura 121: Esquema de formação biossintética das fomactinas e taxol (TOKIWANO *et al.*, 2005).

4.2.3. Ensaio de inibição do PAF-R

As fomactinas apresentam potente atividade como antagonista do fator de ativação de plaquetas (PAF, do inglês platelet activating factor). O PAF é um fosfolípídeo (**85**) cujas funções fisiológicas estão relacionadas a processos como a cicatrização de feridas, apoptose, angiogênese, potenciação a longo prazo e reprodução, além da indução da liberação de histaminas a partir de plaquetas para a agregação de plaquetas e dilatação dos vasos sanguíneos (CIESIELSKI & FRONTIER, 2014). Os inibidores de receptores do PAF (PAF-R) possuem potencial clínico no tratamento de diversas doenças, como diabetes, câncer, doenças renais, asma e Alzheimer (SINGH *et al.*, 2013). Segundo Singh *et al.* (2013), os antagonistas de receptores do PAF são capazes de reduzir ou eliminar efeitos indesejáveis induzidos pelo PAF, como a inflamação, que leva a diferentes doenças relacionadas ao sistema nervoso central e cardíaco e sistemas digestivos periféricos.

De acordo com resultados publicados na literatura, a fomactina D apresenta os melhores resultados tanto para a inibição do PAF-indutor de agregação de plaquetas ($IC_{50} = 0,8 \mu M$) quanto para a ligação do PAF aos seus receptores ($IC_{50} = 0,12 \mu M$) (SUGANO *et al.*, 1994). A fomactina G também apresentou ótimo resultado na ligação do PAF aos seus receptores ($IC_{50} = 0,38 \mu M$) (SUGANO *et al.*, 1995). A tabela 24 resume os resultados obtidos para ensaios *In Vitro* de inibição do PAF, por fomactinas (Figura 122), relatados na literatura (CIESIELSKI & FRONTIER, 2014).

Tabela 24: Ensaios de inibição do PAF por fomactinas (adaptado de CIESIELSKI & FRONTIER, 2014).

Fomactinas	Inibição da ligação do PAF aos seus receptores (IC₅₀, µM)	Inibição do PAF-indutor de agregação de plaquetas (IC₅₀, µM)
A	2,30	10,00
B	47,90	17,00
B1	20,00	9,80
B2	22,10	1,60
C	63,00	6,40
D	0,12	0,80
E	5,19	2,30
F	35,90	3,90
G	0,38	3,20
I*	3,20	-
P*	3,03	-
S*	2,87	-
Sch 49026	-	36,00
Sch 49027	-	1,68
U*	10,00	-

* fomactinas avaliadas no bioensaio de inibição do PAF aos seus receptores neste trabalho.

Figura 122: Fomactinas avaliadas em bioensaios de inibição *In Vitro* de inibição do PAF.

No presente trabalho, as fomactinas U (**59**, D8-R9-C2A), S (**57**, D8-R5-C1), P (**61**, D8-R5-C2), e I (**63**, D8-R9-D4) foram avaliadas em bioensaio de inibição do PAF aos seus receptores, realizados pelo grupo da Professora Sonia Jancar (ICB, USP). As fomactinas U (**59**), S (**57**), P (**61**) e I (**63**) apresentaram bons resultados na inibição da ligação do PAF aos seus receptores (IC_{50} = 10,00, 2,87, 3,03 e 3,20 μ M, respectivamente), sendo que as três últimas apresentaram os melhores resultados de inibição do receptor do PAF se comparados com os valores já relatados na literatura para as fomactinas.

Evidências da literatura mostram que a radiação UV induz a geração de uma série de lipídeos oxidados que tem afinidade pelo PAF-R. A irradiação gama é o tratamento de escolha

em carcinomas, e um dos problemas da rádio e quimioterapia é que as células cancerosas que sobrevivem ao tratamento têm um crescimento acelerado, re-populando a massa tumoral. Com esse conhecimento, investigamos se a irradiação gama de células de carcinoma (TC-1) também induz a geração de moléculas ligantes do PAF-R e quais as consequências no fenômeno de re-população.

As fomactinas S (**57**) e P (**61**) foram avaliadas no ensaio de re-população tumoral pós irradiação. Este ensaio baseia-se na irradiação de células tumorais (TC-1 que expressam PAF-R) e adição das células tumorais irradiadas às células não irradiadas que expressam o gene da luciferase (TC-1 luc). Após 9 dias em cultura, adiciona-se o substrato da luciferase e mede-se a fluorescência que reflete a proliferação das células TC-1 luc.

No modelo de re-população de tumores após radioterapia, antagonistas comerciais do PAF inibiram a proliferação das células tumorais e a re-população pós irradiação (Figura 123). As fomactinas S (**57**) e P (**61**) inibiram a re-população em concentração molar equivalente aos antagonistas comerciais (Figura 124). Estes resultados sugerem que ligantes do PAF-R, produzidos durante a exposição das células tumorais à radiação gama, tem a capacidade de proteger as células tumorais da morte induzida por radioterapia e que a associação da radioterapia com antagonistas do PAF-R pode ser uma nova e eficiente alternativa terapêutica em tumores.

Figura 123: Efeito de antagonistas comerciais na re-população pós irradiação (doses de 4 e 8 Gy) de células tumorais TC-1.

Legenda: CT – controle, CV e PCA – antagonistas comerciais do PAF.

Figura 124: Efeito das fomactinas S (57) e P (61) na re-população pós irradiação (doses de 4 e 8 Gy) de células tumorais TC-1.

Legenda: CT – controle, C1 – fomactina S (57), C2 – fomactina P (61).

5. CONCLUSÃO

Neste trabalho foram estudadas linhagens bacterianas isoladas de tecidos da esponja *A. brasiliensis*, com o objetivo de se descobrir novas moléculas bioativas, e que apresentaram atividade antibiótica contra *B. subtilis* e *V. sinaloensis*. A investigação metabólica dos isolados bacterianos de *A. brasiliensis* iniciou-se pela determinação do modo de cultivo e extração mais adequados para obtenção dos extratos dos meios de cultura.

O método de cultivo e extração selecionado foi o que utiliza a adição da mistura de resinas XAD -2, -4 e -7 ao meio de cultura antes do cultivo. Tal metodologia produz extratos com maior diversidade química e melhor rendimento em massa, quando comparada às outras metodologias de cultivo e extração testadas. A mistura de resinas, utilizada para cultivo das linhagens bacterianas, apresenta variação na polaridade e propriedades de adsorção, o que pode contribuir para maximizar a extração dos metabólitos produzidos no meio de cultura e reduzir a concentração de tais metabólitos no meio de cultura, propiciando a contínua produção dos mesmos durante o crescimento das linhagens bacterianas.

A linhagem bacteriana *P. denitrificans* foi selecionada para cultivo em maior volume, o que permitiu o isolamento e identificação três compostos derivados de dibromotirosina: a fistularina-3 (**26**), o ácido verongidoico (**27**) e a 11-hidroxiaerotionina (**28**). Outros cinco compostos derivados de dibromotirosina foram detectados, em frações ainda impuras, através de análises por CLUE-qTOF. Estes compostos tiveram suas estruturas propostas de acordo com os íons de fragmentação observados no espectro de massas de alta resolução: aerotionina (**29**), o éster metílico do ácido purpurocerático B (**30**), purealidina L (**31**) e aplisinamisina II (**32**).

Este é o primeiro relato da produção dos derivados de dibromotirosina a partir de uma linhagem bacteriana. A produção de derivados de dibromotirosina por uma linhagem bacteriana associada a esponja é um forte indício de que tais compostos, comumente isolados de esponjas, são na verdade produzidos por bactéria(s) associada(s).

O isolamento de compostos, comumente encontrados em esponjas, a partir de linhagens bacterianas representa uma vantagem na utilização destes compostos em bioensaios e para o estudo de biossíntese dos mesmos. Um dos gargalos no estudo das atividades biológicas dos metabólitos isolados de esponjas é a pequena quantidade material obtida a partir da fonte natural. O isolamento dos compostos a partir de linhagens bacterianas permite o cultivo da fonte natural e consequentemente a produção dos compostos de interesse em maior escala, sem interferência no meio ambiente. Além disso, facilita o estudo de biossíntese dos compostos, uma vez que a manipulação de microrganismos é de mais fácil acesso que a de esponjas.

Nove diterpenos da classe das fomactinas, sendo seis deles com estruturas inéditas na literatura, foram isolados do meio de cultura da linhagem fúngica *Biatriospora* sp. (D8). As fomactinas F (62), I (63) e P (61) são conhecidas, enquanto as fomactinas Q (56), S (57), R (55), T (58), U (59) e V (60) são descritas neste trabalho pela primeira vez. A fomactina T (58) apresentou quatro anéis cíclicos arranjados de forma diferente aos observados para as fomactinas já relatadas na literatura.

As fomactinas são conhecidas por apresentar biossíntese relacionada ao taxol, através do precursor comum verticillenila. Estes metabólitos apresentam potente atividade como inibidores de receptores do PAF. O PAF é um fosfolípídeo cujas funções fisiológicas estão relacionadas a diversos processos. Os inibidores de receptores do PAF possuem potencial clínico no tratamento de diversas doenças, como diabetes, câncer, doenças renais, asma e Alzheimer.

Neste trabalho, as fomactinas S (57), P (61), U (59) e I (63) apresentaram bons resultados na inibição da ligação do PAF aos seus receptores ($IC_{50} = 10,00, 2,87, 3,03$ e $3,20 \mu M$, respectivamente), sendo que as três últimas apresentam resultados muito bons se comparados com os valores já relatados na literatura para esta classe de compostos.

As fomactinas S (57) e P (61) foram também avaliadas no ensaio de re-população tumoral pós irradiação. Foram capazes de inibir o fenômeno de re-população em concentração molar equivalente aos antagonistas comerciais. A inibição do fenômeno de re-população tumoral pelas fomactinas S (57) e P (61) sugere que a associação da radioterapia com antagonistas do PAF-R pode ser uma nova e eficiente alternativa terapêutica de tumores.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADPRESSA, D. A.; LOESGEN, S. Bioprospecting chemical diversity and bioactivity in a marine derived *Aspergillus terreus*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 13, p. 253 – 259, 2016

AGARWAL, V.; EL GAMAL, A. A.; YAMANAKA, K.; POTH, D.; KERSTEN, R. D.; SCHORN, M.; ALLEN, E. E.; MOORE, B. S. Biosynthesis of polybrominated aromatic organic compounds by marine bacteria. **Nature Chemical Biology**, v. 10, p. 640 – 647, 2014.

AGARWAL, V.; MILES, Z. D.; WINTER, J. M.; EUSTAQUIO, A. S.; EL GAMAL, A. A.; MOORE, B. S. Enzymatic halogenation and dehalogenation reactions: pervasive and mechanistically diverse. **Chemical Reviews**, n. 117, p. 5619 – 5674, 2017.

AIELLO, A.; FATUROSSO, E.; MENNA, M.; PANSINIS, M. Chemistry of Verongida sponges – V. Brominated metabolites from the caribbean sponge *Pseudoceratina* sp.. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 23, n. 4, p. 377 – 381, 1995.

BAI, A. J.; RAI, V. R. Bacterial quorum sensing and food industry. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 3, n. 10, p. 183 – 193, 2011.

BERLINCK, R. G. S.; HAJDU, E.; ROCHA, R. M.; OLIVEIRA, J. H. H. L.; HERNANDEZ, I. L. C.; SELEGHIM, M. H. R.; GRANATO, A. C.; ALMEIDA, E. V. R.; NUNEZ, C. V.; MURICY, G.; PEIXINHO, S.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; CAVALCANTI, B. C.; NASCIMENTO, G. G. F.; THIEMANN, O.; SILVA, M.; SOUZA, A. O.; SILVA, C. L.; MINARINI, P. R. R. Challenges and rewards of research in marine natural products chemistry in Brazil. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 510 – 522, 2004.

BEWLEY, C. A.; FAULKNER, D. J. Lithistid sponges: star performers or hosts to the stars. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 37, p. 2162 – 2178, 1998.

BEWLEY, C. A.; HOLLAND, N. D., FAULKNER, D. J. Two classes of metabolites from *Theonella swinhoei* are localized in distinct populations of bacterial symbionts. **Experientia**, v. 52, p. 716 – 721, 1996.

BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; KEYZERS, R. A.; MUNRO, M. H. G.; PRINSEP, M. R. Marine natural products. **Natural Products Reports**, v. 34, n. 3, p. 235 – 294, 2017.

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

BONDAREV, V.; RICHTER, M.; ROMANO, S.; PIEL, J.; SCHWEDT, A.; SCHULZ-VOGT, H. N. The genus *Pseudovibrio* contains metabolically versatile bacteria adapted for symbiosis. **Environmental Microbiology**, v. 15, n. 7, p. 2095 – 2113, 2013.

BUTLER, A. AND WALKER, J.V. Marine haloperoxidases. **Chemical Reviews**, v. 93, p. 1937 – 1944, 1993.

CHU, M.; PATEL, M. G.; GULLO, V. P.; TRUUMES, I.; PUAR, M. S. Sch 47918: A novel PAF antagonist from the fungus *Phoma* sp. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 57, p. 5818 – 5822, 1992.

CHU, M.; TRUUMES, I.; GUNNARSSON, I.; BISHOP, R. W.; KREUTNER, W.; HORAN, A. C.; PATEL, M. G.; GULLO, V. P.; PUAR, M. S. A novel class of platelet activating factor antagonists from *Phoma* sp. **The Journal of Antibiotics**, v. 4, p. 554 – 563, 1993.

CIESIELSKI, J; FRONTIER, A; The phomactin natural products from isolation to total synthesis. A review. **Organic Preparations and Procedures International**, v. 46, p. 214-252, 2014.

EBADA, S. S.; SCHULZ, B.; WRAY, V.; TOTZKE, F.; KUBBUTAT, M. H. G.; MUELLER, W. E. G.; HAMACHER, A.; KASSACK, M. U.; LIN, W.; PROKSCH, P. Arthrins A-D: Novel diterpenoids and further constituents from the sponge derived fungus *Arthrimum* sp. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 15, p. 4644 – 4651, 2011.

ELYAKOV, G. B.; KUZNETSOVA, T.; MIKHAILOV, V. V.; MALTSEV, I. I.; VOINOV, V. G.; FEDOREYEV, S. A. Brominated diphenyl ethers from a marine bacterium associated with the sponge *Dysidea* sp. **Experientia**, v. 47, p. 632 – 633, 1991.

FERREIRA, E. L. F.; WILLIAMS, D. E.; ÍOCA, L. P.; MORAIS-URANO, R. P.; SANTOS, M. F. C.; PATRICK, B. O.; ELIAS, L. M.; LIRA, S. P.; FERREIRA, A. G.; PASSARINI, M. R. Z.; SETTE, L. D.; ANDERSEN, R. J.; BERLINCK, R. G. S. Structure and biogenesis of roussoellatide, a dechlorinated polyketide from the marine-derived fungus *Roussoella* sp. DLM33. **Organic Letters**, v. 17, p. 5152 – 5155, 2015.

FRIEDRICH, A. B.; FISCHER, I.; PROKSCH, P.; HACKER, J.; HENTSCHEL, U. Temporal variation of the microbial community associated with the mediterranean sponge *Aplysina aerophoba*. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 38, p. 105 – 113, 2001.

GARCÍA-VILAS, J. A.; MARTÍNEZ-POVEDA, B.; QUESADA, A. R.; MEDINA, M. A. Aeropylsinin-1, a sponge-derived multi-targeted bioactive marine drug. **Marine Drugs**, v. 14, p. 1 – 12, 2016.

GOPICHAND, Y.; SCHMITZ, F. J. Marine natural products: fistularin-1, -2 and -3 from the sponge *Aplysina fistularis* forma *fulva*. **Tetrahedron Letters**, v. 41, p. 3921 – 3924, 1979.

GUZMAN, A. A. S.; PREDICALA, R. Z.; BERNARDO, E. B.; NEILAN, B. A.; ELARDO, S. P.; MANGALINDAN, G. C.; TASDEMIR, D.; IRELAND, C. M.; BARRAQUIO, W. L.; CONCEPCION, G. P. *Pseudovibrio denitrificans* strain Z143-1, a heptylprodigiosin producing bacterium isolated from a Philippine tunicate. **FEMS Microbiology Letters**, v. 277, n. 2, p. 188 – 196, 2007.

ISHINO, M.; KINOSHITA, K.; TAKAHASHI, K.; SUGITA, T.; SHIRO, M.; HASEGAWA, K.; KOYAMA, K. Phomactins K e M, three novel phomactin-type diterpenes from a marine-derived fungus. **Tetrahedron**, v. 68, p. 8572 – 8576, 2012.

ISHINO, M.; KAMAUCHI, H.; TAKATORI, K.; KINOSHITA, K.; SUGITA, T.; KOYAMA, K. Three novel phomactin-type diterpenes from a marine-derived fungus. **Tetrahedron Letters**, v. 39, n. 57, p. 4341 – 4344, 2016.

ISHINO, M.; KIYOMICHI, N.; TAKATORI, K.; SUGITA, T.; SHIRO, M.; KINOSHITA, K.; TAKAHASHI, K.; KOYAMA, K. Phomactin I, 13-*epi*-Phomactin I, and Phomactin J, three novel diterpenes from a marine-derived fungus. **Tetrahedron**, v. 66, p. 2594 – 2597, 2010.

KERNAN, M. R.; CAMBIE, R. C. Chemistry of sponges, VII. 11,19-dideoxyfistularin 3 and 11-hydroxyaerotherionin, bromotyrosine derivatives from *Pseudoceratina durissima*. **Journal of Natural Products**, v. 53, n. 3, p. 615 – 622, 1990.

KIJJOA, A.; BESSA, J.; WATTANADILOK, R.; SAWANGWONG, P.; NASCIMENTO, M. S. J.; PEDRO, M.; SILVA, A. M. S.; EATON, G.; SOEST, R.; HERZH, W. Dibromotyrosine derivatives, a maleimide, aplysamine-2 and other constituents of the marine sponge *Pseudoceratina purpurea*. **Zeitschrift fur Naturforschung B**, v. 60, p. 904 – 908, 2005.

KOBAYASHI, J.; HONMA, K.; SASAKI, T.; TSUDO, M. Puralidins J – R, new bromotyrosine alkaloids from the Okinawan marine sponges *Psammaphysilla purea*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 43, n. 3, p. 403 – 405, 1995.

KOYAMA, K.; ISHINO, M.; TAKATORI, K.; SUGITA, T.; KINOSHITA, K.; TAKAHASHIA, K. Phomactin H, a novel diterpene from an unidentified marine-derived fungus. **Tetrahedron Letters**, v. 45, p. 6947 – 6948, 2004.

LAVY, A.; KEREN, R.; HABER, M.; SCHWARTZ, I.; ILAN, M. Implementing sponge physiological and genomic information to enhance the diversity of its culturable associated bacteria. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 87, p. 486 – 502, 2014.

LI, H.; ZHOU, Y.; CHEN, Y.; SUN, Z.; YAN, H.; GUO, X.; ZHANG, W. A new isocoumarin isolated from endophytic fungus *Arthrimum* sp. A092 derived from medicinal plant *Uvaria microcarpa*. **Zhongcaoyao**, v. 47, n. 3, p. 369 – 373, 2016.

LI, Y.; WANG, J.; HE, W.; LIN, X.; ZHOU, X.; LIU, Y. One Strain-Many Compounds method for production of polyketide metabolites using the sponge-derived fungus *Arthrimum arundinis* ZSDS1-F3. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 2, n. 53, p. 373 – 374, 2017.

MACHADO, H.; SONNENSCHIN, E. C.; MELCHIORSEN, J.; GRAM, L. Genome mining reveals unlocked bioactive potential of marine Gram-negative bacteria. **BMC Genomics**, v. 16, n. 158, p. 1 – 12, 2015.

MCLAUGHLIN, K. **U.S. FDA grants priority review for YONDELIS® (trabectedin) for the treatment of patients with advanced soft tissue sarcoma**. Johnson & Johnson, 2015. Disponível em: < <https://www.jnj.com/media-center/press-releases/us-fda-grants-priority-review-for-yondelis-trabectedin-for-the-treatment-of-patients-with-advanced-soft-tissue-sarcoma>>. Acesso em: 09 maio 2017.

MCMILLAN, J. A.; PAUL, I. C.; GOO, Y. M.; RINEHART, K. L.; KRUEGER, W. C.; PSCHIGODA, L. M. An X-Ray study of aerothionin from *Aplysina Fistularis* (Pallas). **Tetrahedron Letters**, v. 22, p. 39 – 42, 1981.

MERAGELMAN, K. M.; MCKEE, T. C.; BOYD, M. R. Neo-bastadin, the first bastadin, analogue isolated from algae. **43º Reunião Anual da Sociedade Americana de Farmacognosia e 3º Simpósio Monroe Wall**. New Brunswick, NJ, 2002.

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.

MILLER, M. B.; BASSLER, B. L. Quorum sensing in bacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 55, p. 165 – 199, 2001.

MULLER, W. E. G. Origin of metazoa: Sponges as living fossils. **Naturwissenschaften**, v. 85, p. 11 – 25, 1998.

MOODY, K.; THOMSON, R. H.; FATTORUSSO, E.; MINALE, L.; SODANO, G. Aerothionin and homoaerothionin: Two tetra bromo spirocyclohexadienylisoxazoles from *Verongia* sponges. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions**, v. 1, p. 18 – 24, 1972.

MUSCHOLL-SILBERHORN, A.; THIEL, V.; IMHOFF, J. F. Abundance and bioactivity of cultured sponge-associated bacteria from the Mediterranean sea. **Microbial Ecology**, v. 55, p. 94 – 106, 2008.

NUNEZ, C. V.; ALMEIDA, E. V. R.; GRANATO, A. C.; MARQUES, S. O.; SANTOS, K. O.; PEREIRA, F. R.; MACEDO, M. L.; FERREIRA, A. G.; HAJDU, E.; PINHEIRO, U. S.; MURICY, G.; PEIXINHO, S.; FREEMAN, C. J.; GLEASON, D. F.; BERLINCK, R. G. S. Chemical variability within the marine sponge *Aplysina fulva*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 36, p. 283 – 296, 2008.

OCLARIT, J. M.; OKADA, H.; OHTA, S.; KAMINURA, K.; YAMAOKA, Y.; IIZUKA, T.; MIYASHIRO, S.; IKEGAMI, S. Anti-bacillus substance in the marine sponge, *Hyatella* species, produced by an associated *Vibrio* species bacterium. **Microbios**, v. 78, p. 7 – 16, 1994.

OLIVEIRA, M. F.; OLIVEIRA, J. H. H. L.; GALETTI, F. C. S.; SOUZA, A. O.; SILVA, C. L.; HADJU, E.; PEIXINHO, S.; BERLINCK, R. G. S. Antimycobacterial brominated metabolites from two species of marine sponges. **Planta Medica**, v. 72, p. 437 – 441, 2006.

PASSARINI, M.R., SANTOS, C., LIMA, N., BERLINCK, R.G.S., SETTE, L.D. Filamentous fungi from the atlantic marine sponge *Drarmacidon reticulatum*. **Archives of Microbiology**, v. 195, p. 99 – 111, 2013.

PIDOT, S. J.; COYNE, S.; KLOSS, F.; HERTWECK, C. Antibiotics from neglected bacterial sources. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 304, p. 14 – 22, 2014.

PEE, K. H. Biosynthesis of halogenated metabolites by bacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 50, p. 375 – 99, 1996.

PEE, K. H.; UNVERSUCHT, S. Biological dehalogenation and halogenation reactions. **Chemosphere**, v. 52, p. 299 – 312, 2003.

PENESYAN, A.; TEBBEN, J.; LEE, M.; THOMAS, T.; KJELLEBERG, S.; HARDER, T.; EGAN, S. Identification of the antibacterial compound produced by the marine epiphytic bacterium *Pseudovibrio* sp. D323 and related sponge-associated bacteria. **Marine Drugs**, v. 9, p. 1391 – 1402, 2011.

PENG, J.; LI, J.; HAMANN, M. T. The marine bromotyrosine derivatives. **The Alkaloids: /**, v. 6, p. 59 – 262, 2005.

PEREIRA, F. R. **Avaliação da variação do metabolismo secundário da esponja marinha *Aplysina fulva* em função de sua distribuição geográfica.** 2006. 88 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

PIEL, J. Metabolites from symbiotic bacteria. **Natural Products Reports**, v. 21, p. 519 – 538, 2004.

PROKSCH, P.; PUTZ, A.; ORTLEPP, S.; KJER, J.; BAYER, M. Bioactive natural products from marine sponges and fungal endophytes. **Phytochemistry Reviews**, v. 9, p. 475 – 489, 2010.

PUYANA, M.; PAWLIK, J.; BLUM, J.; FENICAL, W. Metabolite variability in Caribbean sponges of the genus *Aplysina*. **Revista brasileira de farmacognosia**, v. 25, p. 592 – 599, 2015.

RODRIGUEZ, A. D.; PINA, I. C. The structures of aplysinamisines I, II, and III: new bromotyrosine-derived alkaloids from the Caribbean sponge *Aplysina cauliformis*. **Journal of Natural Products**, v. 6, n. 56, p. 907 – 914, 1993.

RUA, C. P. J.; TRINDADE-SILVA, A. E.; APPOLINARIO, L. R.; VENAS, T. M.; GARCIA, G. D.; CARVALHO, L. S.; LIMA, A.; KRUGER, R.; PEREIRA, R. C.; BERLINCK, R. G. S.; VALLE, R. A. B.; THOMPSON, C.C.; THOMPSON, F. Diversity and antimicrobial potential of culturable heterotrophic bacteria associated with the endemic marine sponge *Arenosclera brasiliensis*. **PeerJ**, v. 2, n. 419, p. 1 – 14, 2014.

SACRISTÁN-SORIANO, O.; BANAIGS, B.; CASAMAYOR, E. O.; BECERRO, M. A.

Exploring the links between natural products and bacterial assemblages in the sponge *Aplysina aerophoba*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 3, n. 77, p. 862 – 870, 2011.

SAKAI, R.; HIGA, T. Manzamine a, a novel antitumor alkaloid from a sponge. **Journal of American Chemical Society**, v. 108, p. 6404 – 6405, 1986.

SCHINKE, C.; MARTINS, T.; QUEIROZ, S. C. N.; MELO, I. S.; REYES, F. G. R.

Antibacterial compounds from marine bacteria, 2010–2015. **Journal of Natural Products**, v. 80, p. 1215 – 1228, 2017.

SCHMIDT, E. W.; BEWLEY, C. A.; FAULKNER, D. J. Theopalauamide, a bicyclic glycopeptide from filamentous bacterial symbionts of the lithistid sponge *Theonella swinhoei* from Palau and Mozambique. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 63, p. 1254 – 1258, 1998.

SCHMIDT, E. W.; OBRAZTSOVA, A. Y.; DAVIDSON, S. K.; FAULKNER, D. J.;

HAYGOOD, M. G. Identification of the antifungal peptide-containing symbiont of the marine sponge *Theonella swinhoei* as a novel δ -proteobacterium, “*Candidatus* Entotheonella palauensis”. **Marine Biology**, v. 136, p. 969 – 977, 2000.

SCHMITZ, F. J.; VANDERAH, D. J.; HOLLENBEAK, K. H.; ENWALL, C. E. L.;

GOPICHAND, Y.; SENGUPTA, P. K.; HOSSAIN, M. B.; VAN DER HELM, D. Metabolites from the marine sponge *Tedania ignis*. A new atisanediol and several known diketopiperazines. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 48, p. 3941 – 3945, 1983.

SCHOFIELD, M. M.; JAIN, S.; PORAT, D.; DICK, G. J.; SHERMAN, D. H. Identification

and analysis of the bacterial endosymbiont specialized for production of the chemotherapeutic natural product ET-743. **Environmental Microbiology**, v. 17, n. 10, p. 3964 – 3975, 2015.

SHAO, N.; YAO, G.; CHANG, L. C. Bioactive constituents from the marine crinoid

Himerometra magnipinna. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 869 – 871, 2007.

SHIEH, W. Y.; LIN, Y. T.; JEAN, W. D. *Pseudovibrio denitrificans* gen. nov., sp. nov., a marine, facultatively anaerobic, fermentative bacterium capable of denitrification.

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v. 54, p. 2307 – 2312, 2004.

SILVA, M. M.; LIRA, S. P.; BERGAMASCO, J.; LOPES, N. P.; HAJDU, E.; PEIXINHO, S.; BERLINCK, R. G. S. Dereplication of bromotyrosine-derived metabolites by LC-PDA-MS and analysis of the chemical profile of fourteen Aplysina species from the Brazilian coastline. **Australian Journal of Chemistry**, v. 63, n. 6, p. 886 – 894, 2010.

SINGH, P.; SINGH, I. N.; MONDAL, S. C.; SINGH, L.; GARG, V. K. Platelet-activating factor (PAF)-antagonists of natural origin. **Fitoterapia**, v. 84, p. 180 – 201, 2013.

STIERLE, A. C.; CARDELLINA, J. H.; SINGLETON, F. L. A marine *Micrococcus* produces metabolites ascribed to the sponge *Tedania ignis*. **Experientia**, v. 44, p. 1021, 1988.

SUGANO, M.; SATO, A.; IJIMA, A.; FURUYA, K.; HARUYAMA, H.; YODA, K.; HATA, T. Phomactins, novel PAF antagonists from marine fungus *Phoma* sp. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 59, p. 564 – 569, 1994.

SUGANO, M.; SATO, A.; ILJIMA, Y.; FURUYA, F.; KUWANO, H.; HATA, T. Phomactin E, F, and G: new phomactin-group PAF antagonists from a marine fungus *Phoma* sp. **Journal of Antibiotics**, v. 10, n. 48, 1188 – 1190, 1995.

SUGANO, M.; SATO, A.; IJIMA, Y.; OSHIMA, T.; FURUYA, K.; KUWANO, H.; HATA, T.; HANZAWAL, H. Phomactin A: A novel PAF antagonist from a marine fungus *Phoma* sp. **Journal of the American Chemical Society**, v. 113, p. 5463 – 5464, 1991.

TAYLOR, M. W.; RADAX, R.; STEGER, D.; WAGNER, M. Sponge-associated microorganisms: evolution, ecology, and biotechnological potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 2, n. 71, p. 295 – 347, 2007.

TOKIWANO, T.; ENDO, T.; TSUKAGOSHI, T.; GOTO, H.; FUKUSHIC, E.; OIKAWA, H. Proposed mechanism for diterpene synthases in the formation of phomactatriene and taxadiene. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 3, p. 2713 – 2722, 2005.

TOKIWANO, T.; FUKUSHI, E.; ENDO, T.; OIKAWA, H. Biosynthesis of phomactins: common intermediate phomactatriene and taxadiene. **Chemical Communications**, v. 11, p. 1324 – 1325, 2004.

TORRES, Y. R.; BERLINCK, R. G. S.; MAGALHÃES, A.; SCHEFER, A. B.; FERREIRA, A. G.; HAJDU, E.; MURICY, G. Arenosclerins A-C and Haliclonacyclamine E, new tetracyclic alkaloids from a brazilian endemic Haplosclerid sponge *Arenosclera brasiliensis*. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 8, p. 1098 – 1105, 2000.

TORRES, Y. R.; BERLINCK, R. G. S.; NASCIMENTO, G. G. F.; FORTIER, S. C.; PESSOA, C.; MORAES, M. O. Antibacterial activity against resistant bacteria and cytotoxicity of four alkaloid toxins isolated from the marine sponge *Arenosclera brasiliensis*. **Toxicon**, v. 40, p. 885 – 891, 2002.

THACKER, R. W.; FREEMAN, C. J. Sponge–microbe symbioses: recent advances and new directions. **Advances in Marine Biology**, v. 62, p. 57 – 112, 2012.

THOMS, C.; SCHUPP, P. J. Activated chemical defense in marine sponges - a case study on *Aplysinella rhax*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 34, p. 1242 – 1252, 2008.

TURON, X.; BECERRO, M. A.; URIZ, M. J. Distribution of brominated compounds within the sponge *Aplysina aerophoba*: coupling of X-ray microanalysis with cryofixation techniques. **Cell and Tissue Research**, v. 301, p. 311 – 322, 2000.

UNSON, M. D.; FAULKNER, D. J. Cyanobacterial symbiont biosynthesis of chlorinated metabolites from *Dysidea herbacea* (Porifera). **Experientia**, v. 49, p. 349 – 353, 1993.

WANG, K. L.; XU, Y.; LU, L.; LI, Y.; HAN, Z.; ZHANG, J.; SHAO, C. L.; WANG, C. Y.; QIAN, P. Y. Low-toxicity diindol-3-ylmethanes as potent antifouling compounds. **Marine Biotechnology**, v. 17, p. 624 – 632, 2015.

WATERS, A. L.; PERAUD, O.; KASANAHA, N.; SIMS, J. W.; KOTHALAWALA, N.; ANDERSON, M. A.; ABBAS, S. H.; RAO, K. V. JUPALLY, V. R.; KELLY, M.; DASS, A.; HILL, R. T.; HAMANN, M. T. An analysis of the sponge *Acanthostrongylophora igens*' microbiome yields an actinomycete that produces the natural product manzamine A.

Frontiers in Marine Science, v. 1, p. 1 – 15, 2014.

WHYTE, A. C.; GLOER, J. B.; SCOTT, J. A.; MALLOCH, D. Cercophorins A-C: novel antifungal and cytotoxic metabolites from the coprophilous fungus *Cercophora areolata*.

Journal of Natural Products, v. 59, p. 765-769, 1996.

WU, G.; SUN, X.; YU, G.; WANG, W.; ZHU, T.; GU, Q.; LI, D. Cladosins A–E, hybrid polyketides from a deep-sea-derived fungus, *Cladosporium sphaerospermum*. **Journal of Natural Products**, v. 77, p. 270–275, 2014.

YU, G.; WU, G.; ZHU, T.; GU Q.; LI, D. Cladosins F and G, two new hybrid polyketides from the deep-sea-derived *Cladosporium sphaerospermum* 2005-01-E3. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 17, n. 2, 120 – 124, 2015.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

Karen de Jesus Nicácio

**Isolamento e identificação de metabólitos produzidos por linhagens de
microrganismos do ambiente marinho.**

Volume 2

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

Área de concentração: Química Orgânica e Biológica

Orientador: Prof. Dr. Roberto Gomes de Souza Berlinck

São Carlos

2017

ÍNDICE

Apêndice 1: Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) obtido para a fistularina-3 (26 , fração Ab134-C23C).....	185
Apêndice 2: Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 150 MHz) obtido para a fistularina-3 (26 , fração Ab134-C23C).....	186
Apêndice 3: Espectro HSQC obtido para a fistularina-3 (26 , Fração Ab134-C23C).....	187
Apêndice 4: Espectro COSY obtido para a fistularina-3 (26 , Fração Ab134-C23C).....	188
Apêndice 5: Espectro HMBC obtido para a fistularina-3 (26 , Fração Ab134-C23C).....	189
Apêndice 6: Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) obtido para o ácido verongidoico (27 , fração Ab134-FI13-B2).....	190
Apêndice 7: Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 150 MHz) obtido para o ácido verongidoico (27 , fração Ab134-FI13-B2).....	191
Apêndice 8: Espectro HSQC obtido para o ácido verongidoico (27 , Fração Ab134-FI13-B2).....	192
Apêndice 9: Espectro COSY obtido para o ácido verongidoico (27 , Fração Ab134-FI13-B2).....	193
Apêndice 10: Espectro HMBC obtido para o ácido verongidoico (27 , Fração Ab134-FI13-B2).....	194
Apêndice 11: Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) obtido para a 11-hidroxiaerotionina (28 , fração Ab134-FI13-E2).....	195
Apêndice 12: Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 150 MHz) obtido para a 11-hidroxiaerotionina (28 , fração Ab134-FI13-E2).....	196
Apêndice 13: Espectro HSQC obtido para a 11-hidroxiaerotionina (28 , Fração Ab134-FI13-E2).....	197
Apêndice 14: Espectro COSY obtido para a 11-hidroxiaerotionina (28 , Fração Ab134-FI13-E2).....	198
Apêndice 15: Espectro HMBC obtido para a 11-hidroxiaerotionina (28 , Fração Ab134-FI13-E2).....	199
Apêndice 16: Espectro de RMN de ^1H (MeOH- d_4 , 400 MHz) obtido para a descarboxicitrinona (54 , fração D8-M3D2).....	200
Apêndice 17: Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) obtido para a fomactina R (55 , fração D8-M2F2).....	201

Apêndice 18: Expansão (0,7 – 1,4 ppm) do espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) obtido para a fomactina R (55 , fração D8-M2F2).....	202
Apêndice 19: Expansão (1,4 – 2,8 ppm) do espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) obtido para a fomactina R (55 , fração D8-M2F2).....	203
Apêndice 20: Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 150 MHz) obtido para a fomactina R (55 , fração D8-M2F2).....	204
Apêndice 21: Espectro HSQC obtido para a fomactina R (55 , Fração D8-M2F2).....	205
Apêndice 22: Espectro COSY obtido para a fomactina R (55 , Fração D8-M2F2).....	206
Apêndice 23: Espectro HMBC obtido para a fomactina R (55 , Fração D8-M2F2).....	207
Apêndice 24: Espectro NOESY obtido para a fomactina R (55 , Fração D8-M2F2).....	208
Apêndice 25: Espectro de RMN- ^1H (MeOD- d_4 - 400 MHz) da fração D8-M3B2.....	209
Apêndice 26: Espectro de RMN- ^1H (MeOD- d_4 - 400 MHz) da fração D8-M3E3.....	210
Apêndice 27: Espectro de RMN- ^1H (MeOD- d_4 - 400 MHz) da fração D8-M3E4.....	211
Apêndice 28: Espectro de RMN- ^1H (MeOD- d_4 - 400 MHz) da fração D8-M3F4.....	212
Apêndice 29: Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) obtido para a fomactina Q (56 , fração D8Ac-M4C24-B2).....	213
Apêndice 30: Expansão (3,2 – 5,3 ppm) do espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) obtido para a fomactina Q (56 , fração D8Ac-M4C24-B2).....	214
Apêndice 31: Expansão (1,7 – 2,7 ppm) do espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) obtido para a fomactina Q (56 , fração D8Ac-M4C24-B2).....	215
Apêndice 32: Expansão (0,8 – 1,7 ppm) do espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) obtido para a fomactina Q (56 , fração D8Ac-M4C24-B2).....	216
Apêndice 33: Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 150 MHz) obtido para a fomactina Q (56 , fração D8-Ac-M4C24-B2).....	217
Apêndice 34: Espectro HSQC obtido para a fomactina Q (56 , Fração D8-Ac-M4C24-B2)....	218
Apêndice 35: Espectro COSY obtido para a fomactina Q (56 , Fração D8-Ac-M4C24-B2)....	219
Apêndice 36: Espectro HMBC obtido para a fomactina Q (56 , Fração D8-Ac-M4C24-B2)...	220
Apêndice 37: Espectro NOESY obtido para a fomactina Q (56 , Fração D8-Ac-M4C24-B2).	221
Apêndice 38: Espectro de RMN de ^1H (MeOH- d_4 , 600 MHz) obtido para a fomactina S (57 , fração D8-R5-C1).....	222
Apêndice 39: Expansão (3,7 – 6,1 ppm) do espectro de RMN de ^1H (MeOH- d_4 , 600 MHz) obtido para a fomactina S (57 , fração D8-R5-C1).....	223

Apêndice 40: Expansão (2,1 – 3,4 ppm) do espectro de RMN de ^1H (MeOH- d_4 , 600 MHz) obtido para a fomactina S (57 , fração D8-R5-C1).....	224
Apêndice 41: Expansão (0,9 – 2,0 ppm) do espectro de RMN de ^1H (MeOH- d_4 , 600 MHz) obtido para a fomactina S (57 , fração D8-R5-C1).....	225
Apêndice 42: Espectro de RMN de ^{13}C (MeOH- d_4 , 150 MHz) obtido para a fomactina S (57 , fração D8-R5-C1).....	226
Apêndice 43: Espectro HSQC obtido para a fomactina S (57 , Fração D8-R5-C1).....	227
Apêndice 44: Espectro COSY obtido para a fomactina S (57 , Fração D8-R5-C1).....	228
Apêndice 45: Espectro HMBC obtido para a fomactina S (57 , Fração D8-R5-C1).....	229
Apêndice 46: Espectro NOESY obtido para a fomactina S (57 , Fração D8-R5-C1).....	230
Apêndice 47: Espectro de RMN de ^1H (MeOH- d_4 , 600 MHz) obtido para a fomactina T (58 , fração D8-R9-B2A).....	231
Apêndice 48: Expansão (3,8 – 4,4 ppm) do espectro de RMN de ^1H (MeOH- d_4 , 600 MHz) obtido para a fomactina T (58 , fração D8-R9-B2A).....	232
Apêndice 49: Expansão (2,1 – 3,1 ppm) do espectro de RMN de ^1H (MeOH- d_4 , 600 MHz) obtido para a fomactina T (58 , fração D8-R9-B2A).....	233
Apêndice 50: Expansão (1,6 – 2,1 ppm) do espectro de RMN de ^1H (MeOH- d_4 , 600 MHz) obtido para a fomactina T (58 , fração D8-R9-B2A).....	234
Apêndice 51: Espectro de RMN de ^{13}C (MeOH- d_4 , 150 MHz) obtido para a fomactina T (58 , fração D8-R9-B2A).....	235
Apêndice 52: Espectro HSQC obtido para a fomactina T (58 , Fração D8-R9-B2A).....	236
Apêndice 53: Espectro COSY obtido para a fomactina T (58 , Fração D8-R9-B2A).....	237
Apêndice 54: Espectro HMBC obtido para a fomactina T (58 , Fração D8-R9-B2A).....	238
Apêndice 55: Espectro NOESY obtido para a fomactina T (58 , Fração D8-R9-B2A).....	239
Apêndice 56: Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) obtido para a fomactina U (59 , Fração D8-R9-C2A).....	240
Apêndice 57: Expansão (4,9 – 5,7 ppm) do espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) obtido para a fomactina U (59 , Fração D8-R9-C2A).....	241
Apêndice 58: Expansão (1,7 – 2,9 ppm) do espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) obtido para a fomactina U (59 , Fração D8-R9-C2A).....	242
Apêndice 59: Expansão (0,7 – 1,5 ppm) do espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) obtido para a fomactina U (59 , Fração D8-R9-C2A).....	243

Apêndice 60: Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 150 MHz) obtido para a fomactina U (59 , Fração D8-R9-C2A).....	244
Apêndice 61: Espectro HSQC obtido para a fomactina U (59 , Fração D8-R9-C2A).....	245
Apêndice 62: Espectro COSY obtido para a fomactina U (59 , Fração D8-R9-C2A).....	246
Apêndice 63: Espectro HMBC obtido para a fomactina U (59 , Fração D8-R9-C2A).....	247
Apêndice 64: Espectro NOESY obtido para a fomactina U (59 , Fração D8-R9-C2A).....	248
Apêndice 65: Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) obtido para a fomactina V (60 , Fração D8-R9-C3A).....	249
Apêndice 66: Expansão (4,0 – 5,8 ppm) do espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) obtido para a fomactina V (60 , Fração D8-R9-C3A).....	250
Apêndice 67: Expansão (2,0 – 2,6 ppm) do espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) obtido para a fomactina V (60 , Fração D8-R9-C3A).....	251
Apêndice 68: Expansão (1,5 – 1,8 ppm) do espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) obtido para a fomactina V (60 , Fração D8-R9-C3A).....	252
Apêndice 69: Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 150 MHz) obtido para a fomactina V (60 , Fração D8-R9-C3A).....	253
Apêndice 70: Espectro HSQC obtido para a fomactina V (60 , Fração D8-R9-C3A).....	254
Apêndice 71: Espectro COSY obtido para a fomactina V (60 , Fração D8-R9-C3A).....	255
Apêndice 72: Espectro HMBC obtido para a fomactina V (60 , Fração D8-R9-C3A).....	256
Apêndice 73: Espectro NOESY obtido para a fomactina V (60 , Fração D8-R9-C3A).....	257
Apêndice 74: Espectro de RMN de ^1H (MeOH- d_4 , 600 MHz) obtido para a fomactina P (61 , Fração D8-R5-C2).....	258
Apêndice 75: Espectro de RMN de ^{13}C (MeOH- d_4 , 150 MHz) obtido para a fomactina P (61 , Fração D8-R5-C2).....	259
Apêndice 76: Espectro HSQC obtido para a fomactina P (61 , Fração D8-R5-C2).....	260
Apêndice 77: Espectro COSY obtido para a fomactina P (61 , Fração D8-R5-C2).....	261
Apêndice 78: Espectro HMBC obtido para a fomactina P (61 , Fração D8-R5-C2).....	262
Apêndice 79: Espectro NOESY obtido para a fomactina P (61 , Fração D8-R5-C2).....	263
Apêndice 80: Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) obtido para a fomactina F (62 , Fração D8-R9-C2B).....	264
Apêndice 81: Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 150 MHz) obtido para a fomactina F (62 , Fração D8-R9-C2B).....	265
Apêndice 82: Espectro HSQC obtido para a fomactina F (62 , Fração D8-R9-C2B).....	266

Apêndice 83: Espectro COSY obtido para a fomactina F (62 , Fração D8-R9-C2B).....	267
Apêndice 84: Espectro HMBC obtido para a fomactina F (62 , Fração D8-R9-C2B).....	268
Apêndice 85: Espectro NOESY obtido para a fomactina F (62 , Fração D8-R9-C2B).....	269
Apêndice 86: Espectro de RMN de ^1H (MeOH- d_4 , 600 MHz) obtido para a fomactina I (63 , Fração D8-R9-D4).....	270
Apêndice 87: Espectro de RMN de ^{13}C (MeOH- d_4 , 150 MHz) obtido para a fomactina I (63 , Fração D8-R9-D4).....	271
Apêndice 88: Espectro HSQC obtido para a fomactina I (63 , Fração D8-R9-D4).....	272
Apêndice 89: Espectro COSY obtido para a fomactina I (63 , Fração D8-R9-D4).....	273
Apêndice 90: Espectro HMBC obtido para a fomactina I (63 , Fração D8-R9-D4).....	274
Apêndice 91: Espectro NOESY obtido para a fomactina I (63 , Fração D8-R9-D4).....	275

Apêndice 1: Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) obtido para a fistularina-3 (**26**, fração Ab134-C23C).

Apêndice 2: Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 150 MHz) obtido para a fistularina-3 (**26**, fração Ab134-C23C).

Apêndice 3: Espectro HSQC obtido para a fistularina-3 (**26**, Fração Ab134-C23C).

Apêndice 4: Espectro COSY obtido para a fistularina-3 (**26**, Fração Ab134-C23C).

Apêndice 5: Espectro HMBC obtido para a fistularina-3 (**26**, Fração Ab134-C23C).

Apêndice 6: Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) obtido para o ácido verongidoico (**27**, fração Ab134-FI13-B2).

Apêndice 7: Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 150 MHz) obtido para o ácido verongidoico (**27**, fração Ab134-FI13-B2).

Apêndice 8: Espectro HSQC obtido para o ácido verongidoico (**27**, Fração Ab134-FI13-B2).

Apêndice 9: Espectro COSY obtido para o ácido verongidoico (**27**, Fração Ab134-FI13-B2).

Apêndice 10: Espectro HMBC obtido para o ácido verongidoico (**27**, Fração Ab134-FI13-B2).

Apêndice 11: Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) obtido para a 11-hidroxiaerotionina (**28**, fração Ab134-FI13-E2).

Apêndice 12: Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 150 MHz) obtido para a 11-hidroxiaerotionina (**28**, fração Ab134-FI13-E2).

Apêndice 13: Espectro HSQC obtido para a 11-hidroxiacetonina (**28**, Fração Ab134-FI13-E2).

Apêndice 14: Espectro COSY obtido para a 11-hidroxiacrotionina (**28**, Fração Ab134-FI13-E2).

Apêndice 15: Espectro HMBC obtido para a 11-hidroxiarotina (28, Fração Ab134-FI13-E2).

Apêndice 16: Espectro de RMN de ^1H (MeOH- d_4 , 400 MHz) obtido para a descarboxicitrinona (**54**, fração D8-M3D2).

Apêndice 17: Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) obtido para a fomactina R (**55**, fração D8-M2F2).

Apêndice 18: Expansão (0,7 – 1,4 ppm) do espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) obtido para a fomactina R (**55**, fração D8-M2F2).

Apêndice 19: Expansão (1,4 – 2,8 ppm) do espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) obtido para a fomactina R (**55**, fração D8-M2F2).

Apêndice 20: Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 150 MHz) obtido para a fomactina R (**55**, fração D8-M2F2).

Apêndice 21: Espectro HSQC obtido para a fomactina R (**55**, Fração D8-M2F2).

Apêndice 22: Espectro COSY obtido para a fomactina R (**55**, Fração D8-M2F2).

Apêndice 23: Espectro HMBC obtido para a fomactina R (**55**, Fração D8-M2F2).

Apêndice 24: Espectro NOESY obtido para a fomactina R (**55**, Fração D8-M2F2).

Apêndice 25: Espectro de RMN- ^1H (MeOD- d_4 - 400 MHz) da fração D8-M3B2.

Apêndice 26: Espectro de RMN- ^1H (MeOD- d_4 - 400 MHz) da fração D8-M3E3.

Apêndice 27: Espectro de RMN- ^1H (MeOD- d_4 - 400 MHz) da fração D8-M3E4.

Apêndice 28: Espectro de RMN- ^1H (MeOD- d_4 - 400 MHz) da fração D8-M3F4.

Apêndice 29: Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) obtido para a fomactina Q (**56**, fração D8Ac-M4C24-B2).

Apêndice 30: Expansão (3,2 – 5,3 ppm) do espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) obtido para a fomactina Q (**56**, fração D8Ac-M4C24-B2).

Apêndice 31: Expansão (1,7 – 2,7 ppm) do espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) obtido para a fomactina Q (**56**, fração D8Ac-M4C24-B2).

Apêndice 32: Expansão (0,8 – 1,7 ppm) do espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) obtido para a fomactina Q (**56**, fração D8Ac-M4C24-B2).

Apêndice 33: Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 150 MHz) obtido para a fomactina Q (**56**, fração D8-Ac-M4C24-B2).

Apêndice 34: Espectro HSQC obtido para a fomactina Q (**56**, Fração D8-Ac-M4C24-B2).

Apêndice 35: Espectro COSY obtido para a fomactina Q (**56**, Fração D8-Ac-M4C24-B2).

Apêndice 36: Espectro HMBC obtido para a fomactina Q (**56**, Fração D8-Ac-M4C24-B2).

Apêndice 37: Espectro NOESY obtido para a fomactina Q (**56**, Fração D8-Ac-M4C24-B2).

Apêndice 38: Espectro de RMN de ^1H (MeOH- d_4 , 600 MHz) obtido para a fomactina S (**57**, fração D8-R5-C1).

Apêndice 39: Expansão (3,7 – 6,1 ppm) do espectro de RMN de ^1H (MeOH- d_4 , 600 MHz) obtido para a fomactina S (**57**, fração D8-R5-C1).

Apêndice 40: Expansão (2,1 – 3,4 ppm) do espectro de RMN de ^1H (MeOH- d_4 , 600 MHz) obtido para a fomactina S (**57**, fração D8-R5-C1).

Apêndice 41: Expansão (0,9 – 2,0 ppm) do espectro de RMN de ^1H (MeOH- d_4 , 600 MHz) obtido para a fomactina S (**57**, fração D8-R5-C1).

Apêndice 42: Espectro de RMN de ^{13}C (MeOH- d_4 , 150 MHz) obtido para a fomactina S (**57**, fração D8-R5-C1).

Apêndice 43: Espectro HSQC obtido para a fomactina S (**57**, Fração D8-R5-C1).

Apêndice 44: Espectro COSY obtido para a fomactina S (**57**, Fração D8-R5-C1).

Apêndice 45: Espectro HMBC obtido para a fomactina S (**57**, Fração D8-R5-C1).

Apêndice 46: Espectro NOESY obtido para a fomactina S (**57**, Fração D8-R5-C1).

Apêndice 47: Espectro de RMN de ^1H (MeOH- d_4 , 600 MHz) obtido para a fomactina T (**58**, fração D8-R9-B2A).

Apêndice 48: Expansão (3,8 – 4,4 ppm) do espectro de RMN de ^1H (MeOH- d_4 , 600 MHz) obtido para a fomactina T (**58**, fração D8-R9-B2A).

Apêndice 49: Expansão (2,1 – 3,1 ppm) do espectro de RMN de ^1H (MeOH- d_4 , 600 MHz) obtido para a fomactina T (**58**, fração D8-R9-B2A).

Apêndice 50: Expansão (1,6 – 2,1 ppm) do espectro de RMN de ^1H (MeOH- d_4 , 600 MHz) obtido para a fomactina T (**58**, fração D8-R9-B2A).

Apêndice 51: Espectro de RMN de ^{13}C (MeOH- d_4 , 150 MHz) obtido para a fomactina T (**58**, fração D8-R9-B2A).

Apêndice 52: Espectro HSQC obtido para a fomactina T (**58**, Fração D8-R9-B2A).

Apêndice 53: Espectro COSY obtido para a fomactina T (**58**, Fração D8-R9-B2A).

Apêndice 54: Espectro HMBC obtido para a fomactina T (**58**, Fração D8-R9-B2A).

Apêndice 55: Espectro NOESY obtido para a fomactina T (**58**, Fração D8-R9-B2A).

Apêndice 56: Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) obtido para a fomactina U (**59**, Fração D8-R9-C2A).

Apêndice 57: Expansão (4,9 – 5,7 ppm) do espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) obtido para a fomactina U (**59**, Fração D8-R9-C2A).

Apêndice 58: Expansão (1,7 – 2,9 ppm) do espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) obtido para a fomactina U (**59**, Fração D8-R9-C2A).

Apêndice 59: Expansão (0,7 – 1,5 ppm) do espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) obtido para a fomactina U (**59**, Fração D8-R9-C2A).

Apêndice 60: Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 150 MHz) obtido para a fomactina U (**59**, Fração D8-R9-C2A).

Apêndice 61: Espectro HSQC obtido para a fomactina U (**59**, Fração D8-R9-C2A).

Apêndice 62: Espectro COSY obtido para a fomactina U (**59**, Fração D8-R9-C2A).

Apêndice 63: Espectro HMBC obtido para a fomactina U (**59**, Fração D8-R9-C2A).

Apêndice 64: Espectro NOESY obtido para a fomactina U (**59**, Fração D8-R9-C2A).

Apêndice 65: Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) obtido para a fomactina V (**60**, Fração D8-R9-C3A).

Apêndice 66: Expansão (4,0 – 5,8 ppm) do espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) obtido para a fomactina V (**60**, Fração D8-R9-C3A).

Apêndice 67: Expansão (2,0 – 2,6 ppm) do espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) obtido para a fomactina V (**60**, Fração D8-R9-C3A).

Apêndice 68: Expansão (1,5 – 1,8 ppm) do espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) obtido para a fomactina V (**60**, Fração D8-R9-C3A).

Apêndice 69: Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 150 MHz) obtido para a fomactina V (**60**, Fração D8-R9-C3A).

Apêndice 70: Espectro HSQC obtido para a fomactina V (**60**, Fração D8-R9-C3A).

Apêndice 71: Espectro COSY obtido para a fomactina V (**60**, Fração D8-R9-C3A).

Apêndice 72: Espectro HMBC obtido para a fomactina V (**60**, Fração D8-R9-C3A).

Apêndice 73: Espectro NOESY obtido para a fomactina V (**60**, Fração D8-R9-C3A).

Apêndice 74: Espectro de RMN de ^1H (MeOH- d_4 , 600 MHz) obtido para a fomactina P (**61**, Fração D8-R5-C2).

Apêndice 75: Espectro de RMN de ^{13}C (MeOH- d_4 , 150 MHz) obtido para a fomactina P (**61**, Fração D8-R5-C2).

Apêndice 76: Espectro HSQC obtido para a fomactina P (**61**, Fração D8-R5-C2).

Apêndice 77: Espectro COSY obtido para a fomactina P (**61**, Fração D8-R5-C2).

Apêndice 78: Espectro HMBC obtido para a fomactina P (**61**, Fração D8-R5-C2).

Apêndice 79: Espectro NOESY obtido para a fomactina P (**61**, Fração D8-R5-C2).

Apêndice 80: Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) obtido para a fomactina F (**62**, Fração D8-R9-C2B).

Apêndice 81: Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 150 MHz) obtido para a fomactina F (**62**, Fração D8-R9-C2B).

Apêndice 82: Espectro HSQC obtido para a fomactina F (**62**, Fração D8-R9-C2B).

Apêndice 83: Espectro COSY obtido para a fomactina F (**62**, Fração D8-R9-C2B).

Apêndice 84: Espectro HMBC obtido para a fomactina F (**62**, Fração D8-R9-C2B).

Apêndice 85: Espectro NOESY obtido para a fomactina F (**62**, Fração D8-R9-C2B).

Apêndice 86: Espectro de RMN de ^1H (MeOH- d_4 , 600 MHz) obtido para a fomactina I (**63**, Fração D8-R9-D4).

Apêndice 87: Espectro de RMN de ^{13}C (MeOH- d_4 , 150 MHz) obtido para a fomactina I (**63**, razão D8-R9-D4).

Apêndice 88: Espectro HSQC obtido para a fomactina I (**63**, Fração D8-R9-D4).

Apêndice 89: Espectro COSY obtido para a fomactina I (**63**, Fração D8-R9-D4).

Apêndice 90: Espectro HMBC obtido para a fomactina I (**63**, Fração D8-R9-D4).

Apêndice 91: Espectro NOESY obtido para a fomactina I (**63**, Fração D8-R9-D4).