UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

STELAMAR ROMMINGER

**Isolamento, identificação e investigação de rotas biossintéticas de produtos
naturais de micro-organismos marinhos**

Volume 1

São Carlos

2013

STELAMAR ROMMINGER

Isolamento, identificação e investigação de rotas biossintéticas de produtos naturais
de micro-organismos marinhos

Volume 1

Tese apresentada ao Instituto de Química
de São Carlos da Universidade de São Paulo
para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Química Orgânica e Biológica.

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

EXEMPLAR REVISADO

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

São Carlos

2013

Dedicatória

Dedico esta tese à minha família,
Romeo, Rosani, Raquel, Alfredo, Vitor e Vó Nita.

AGRADECIMENTOS

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

Ao Centro de Biologia Marinha (CEBIMAR – USP) pelo apoio logístico durante a coleta do material biológico.

À Profa. Dra. Mirna H. R. Seleglim, por disponibilizar o laboratório de microbiologia do Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva (DEBE – UFSCar) e à Darci C. D. Javarotti pelo apoio técnico.

À Dra. Lara D. Sette (CPQBA – UNICAMP) pela identificação das linhagens de micro-organismos.

Aos professores Dr. Antônio Gilberto Ferreira (DQ – UFSCar) e Dr. Raymond J. Andersen (Department of Chemistry, UBC, Canadá) pela obtenção dos espectros de RMN.

À Dra. Fabiana T. R. Martinelli e à Dra. Karin F. B. Camargo pelo apoio técnico.

A todos os colegas do Laboratório QOPN, em especial ao Dr. Eli F. Pimenta.

Aos amigos Raquel e Avelardo.

Ao CNPq e à FAPESP pelo auxílio financeiro.

"An expert is a man who has made all the mistakes which can be made, in a narrow field."

Niels Bohr

RESUMO

ROMMINGER, S. **Isolamento, identificação e investigação de rotas biossintéticas de produtos naturais de micro-organismos marinhos**. 2013. 2 v. Tese (Doutorado) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

O presente trabalho teve por objetivo realizar experimentos de incorporação de precursores isotopicamente marcados em produtos naturais isolados do meio de cultura de duas espécies de fungos do gênero *Penicillium*, de maneira a se verificar a rota de biossíntese dos compostos produzidos pelas linhagens *P. citrinum* F53 e *P. oxalicum* F30. Para tanto, os meios de cultura utilizados na fermentação das linhagens foram enriquecidos com os seguintes precursores: [1-¹³C₁]acetato de sódio, [1,2-¹³C₂]acetato de sódio, [2,3-¹³C₂]propionato de sódio, [metil-¹³C₁]metionina, [1-¹³C₁]glicose, [U-¹³C₅]ornitina, [U-¹³C₆]lisina, [U-¹³C₅]prolina, [U-¹³C₆]histidina, [2-indol-¹³C₁]triptofano e [U-¹³C₆]ácido antranílico, separadamente. Ao final do período de fermentação, as culturas foram separadamente submetidas à extração em fase sólida e analisadas por CLAE/UV/EM/IES. Os experimentos de incorporação que apresentaram resultados positivos tiveram seus produtos purificados por CLAE/UV e analisados por RMN de ¹³C. Os resultados obtidos mostraram que dois dihidropirris produzidos por *P. citrinum* F53 são formados por uma rota biossintética mista, oriunda de um resíduo de ornitina, um grupo metila derivado da metionina e uma cadeia policetídica derivada do acetato. Os alcaloides citrinalina B e 17-hidroxycitrinalina B, também produzidos por *P. citrinum* F53, são ambos derivados de dois resíduos de aminoácidos, ornitina e triptofano (via ácido antranílico), e dois grupos isopreno derivados da glicose (via mevalonato). Os alcaloides oxalina e meleagrina, produzidos por *P. oxalicum* F30, são formados a partir de uma via biossintética mista derivada de dois resíduos de aminoácidos, histidina e triptofano (via ácido antranílico), e grupos metila derivados da metionina.

Palavras-chave: Micro-organismos. Biossíntese mista. Precursores isotopicamente marcados.

Abstract

ROMMINGER, S. **Isolation, identification, and investigation of biosynthetic routes from marine-derived microbial natural products**. 2013. 2 v. Thesis (Ph. D.) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

The present investigation aimed to carry out feeding experiments for the incorporation of isotopic labeled precursors on natural products isolated from the culture media of two fungal species belonging to the *Penicillium* genus, in order to verify the biosynthetic pathway of the compounds produced by the *P. citrinum* F53 and *P. oxalicum* F30 fungal strains. Culture media used in the fermentation of the fungal strains were enriched with the following isotopic labeled precursors: [1- $^{13}\text{C}_1$]sodium acetate, [1,2- $^{13}\text{C}_2$]sodium acetate, [2,3- $^{13}\text{C}_2$]sodium propionate, [methyl- $^{13}\text{C}_1$]methionine, [1- $^{13}\text{C}_1$]glucose, [U- $^{13}\text{C}_5$]ornithine, [U- $^{13}\text{C}_6$]lysine, [U- $^{13}\text{C}_5$]proline, [U- $^{13}\text{C}_6$]histidine, [2-indol- $^{13}\text{C}_1$]tryptophan, and [U- $^{13}\text{C}_6$]anthranilic acid, separately. At the end of the fermentation period, culture media were separately subjected to solid phase extraction and analyzed by LC/UV/ESI/MS. The incorporation experiments that showed positive results were purified by HPLC/UV, and the pure compounds labeled in different positions were then analyzed by ^{13}C -NMR. The results demonstrated that two dihydropyrroles produced by *P. citrinum* F53 were formed *via* a mixed biosynthetic route, derived from ornithine, a methyl group derived from methionine, and a polyketide chain derived from acetate. The alkaloids citrinalin B and 17-hydroxycitrinalin B, also produced by *P. citrinum* F53, are both derived from two amino acid residues, ornithine and tryptophan (*via* anthranilic acid), and two isoprene units derived from glucose *via* the mevalonate pathway. The alkaloids oxaline and meleagrine, produced by *P. oxalicum* F30, are formed *via* a mixed biosynthetic pathway by two amino acid residues, histidine and tryptophan (*via* anthranilic acid), and methyl groups derived from methionine.

Keywords: Micro-organisms. Mixed biosynthesis. Isotopic labeled precursors.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1.1. Via de formação de policetídeos por condensação de Claisen.	25
Figura 1.2. Policetídeos biossintetizados a partir de unidades iniciadoras alternativas.	25
Figura 1.3. Possível rota de biossíntese de citrinina (5) por uma NR-FPKS modular.	27
Figura 1.4. Citrinina (5) e seus derivados.	28
Figura 1.5. Estrutura química da mevastatina (9) e da lovastatina (10).	29
Figura 1.6. Policetídeos produzidos por uma linhagem marinha de <i>P. citrinum</i> .	29
Figura 1.7. Policetídeos produzidos por uma linhagem marinha de <i>P. oxalicum</i> .	30
Figura 1.8. Formação de unidades isopreno a partir do mevalonato.	31
Figura 1.9. Formação de unidades isopreno através da Rota de Rohmer.	32
Figura 1.10. Terpenos produzidos por uma linhagem marinha de <i>P. citrinum</i> .	33
Figura 1.11. Possíveis precursores e rotas de formação de anéis pirrol, pirrolina e pirrolidina.	34
Figura 1.12. Incorporação de um anel pirrol em um policetídeo por ataque nucleofílico de carbono.	35
Figura 1.13. Alcaloides pirrolidínicos produzidos por uma linhagem marinha de <i>P. citrinum</i> .	36
Figura 1.14. Alcaloides produzidos por linhagens endofíticas de fungos do gênero <i>Penicillium</i> .	36
Figura 1.15. Formação do anel indol em triptofano.	37
Figura 1.16. Estrutura química dos alcaloides roquefortina C (29), meleagrina (30) e oxalina (31).	38

Figura 1.17. Alcaloides indólicos produzidos por linhagens endofíticas marinhas de <i>P. citrinum</i> .	39
---	----

METODOLOGIA

Figura 3.1. Aspecto macroscópico das linhagens <i>P. oxalicum</i> (F30) e <i>P. citrinum</i> (F53).	43
Figura 3.2. Produção de uma solução de esporos para a linhagem <i>P. citrinum</i> F53.	45
Figura 3.3. Fluxograma do experimento preliminar de toxicidade.	48
Figura 3.4. Extração das culturas da linhagem <i>P. citrinum</i> F53.	49
Figura 3.5. Fluxograma dos procedimentos gerais de pesquisa.	54

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Figura 4.1. Cromatograma padrão da fração 3 (F3) obtida da EFS do meio de cultura da linhagem <i>P. citrinum</i> F53 fermentada em meio MF [60%].	57
Figura 4.2. Espectro de massas padrão para o composto presente no pico 1. $[M+H]^+ = m/z\ 250,1$. $[M+Na]^+ = m/z\ 272$. Detecção: EM/IES ⁺ .	58
Figura 4.3. Espectro de massas padrão para o composto presente no pico 2. $[M+H]^+ = m/z\ 252$. $[M+Na]^+ = m/z\ 274$. Detecção: EM/IES ⁺ .	58
Figura 4.4. Espectro de RMN de ¹³ C (DMSO- <i>d</i> ₆ , 100 MHz) do composto isolado da purificação do pico 1 por CLAE/UV.	59
Figura 4.5. Estrutura química dos dihidropiróis 27 e 28 .	61
Figura 4.6. Cadeia lateral dos dihidropiróis 27 e 28 .	62
Figura 4.7. Espectro de massas do dihidropirrol 28 isolado do experimento de fermentação de <i>P. citrinum</i> F53 com adição do precursor [1- ¹³ C ₁]acetato de sódio. Detecção: EM/IES ⁺ .	63

Figura 4.8. Espectro de massas do dihidropirrol 27 isolado do experimento de fermentação de <i>P. citrinum</i> F53 com adição do precursor [1- ¹³ C ₁]acetato de sódio. Detecção: EM/IES ⁺ .	63
Figura 4.9. Espectro de massas do dihidropirrol 28 isolado do experimento de fermentação de <i>P. citrinum</i> F53 com adição do precursor [1,2- ¹³ C ₂]acetato de sódio. Detecção: EM/IES ⁺ .	64
Figura 4.10. Espectro de massas do dihidropirrol 27 isolado do experimento de fermentação de <i>P. citrinum</i> F53 com adição do precursor [1,2- ¹³ C ₂]acetato de sódio. Detecção: EM/IES ⁺ .	64
Figura 4.11. Espectro de RMN de ¹³ C (DMSO- <i>d</i> ₆ , 100 MHz) do dihidropirrol 28 enriquecido com [1- ¹³ C ₁]acetato de sódio.	65
Figura 4.12. Espectro de RMN de ¹³ C (DMSO- <i>d</i> ₆ , 100 MHz) do dihidropirrol 28 enriquecido com [1,2- ¹³ C ₂]acetato de sódio.	66
Figura 4.13 Expansão do espectro de RMN de ¹³ C (DMSO- <i>d</i> ₆ , 100 MHz) do dihidropirrol 28 enriquecido com [1,2- ¹³ C ₂]acetato de sódio.	66
Figura 4.14. Substituinte metila presente nos dihidropirrols 27 e 28 .	67
Figura 4.15. Espectro de massas do dihidropirrol 28 isolado do experimento de fermentação de <i>P. citrinum</i> F53 com adição do precursor [<i>metil</i> - ¹³ C ₁]metionina. Detecção: EM/IES ⁺ .	68
Figura 4.16. Espectro de massas do dihidropirrol 27 isolado do experimento de fermentação de <i>P. citrinum</i> F53 com adição do precursor [<i>metil</i> - ¹³ C ₁]metionina. Detecção: EM/IES ⁺ .	68
Figura 4.17. Espectro de RMN de ¹³ C (DMSO- <i>d</i> ₆ , 100 MHz) do dihidropirrol 28 enriquecido com [<i>metil</i> - ¹³ C]metionina.	69
Figura 4.18. Anel dihidropirrólico presente nos compostos 27 e 28 .	71
Figura 4.19. Espectro de massas do dihidropirrol 28 isolado do experimento de fermentação de <i>P. citrinum</i> F53 com adição do precursor [U- ¹³ C ₅]ornitina. Detecção: EM/IES ⁺ .	71

Figura 4.20. Espectro de massas do dihidropirrol 27 isolado do experimento de fermentação de <i>P. citrinum</i> F53 com adição do precursor [U- ¹³ C ₅]ornitina. Detecção: EM/IES ⁺ .	72
Figura 4.21. Espectro de RMN de ¹³ C (DMSO- <i>d</i> ₆ , 100 MHz) do dihidropirrol 28 enriquecido com [U- ¹³ C ₅]ornitina.	73
Figura 4.22. Expansão do espectro de RMN de ¹³ C (DMSO- <i>d</i> ₆ , 100 MHz) do dihidropirrol 28 enriquecido com [U- ¹³ C ₅]ornitina	73
Figura 4.23. Proposta de via biossintética de formação do dihidropirrol 28 .	76
Figura 4.24. Estrutura química da brevigelina (36) e do pigmento 37 .	77
Figura 4.25. Cromatograma padrão da fração 3 (F3) obtida da EFS do meio de cultura da linhagem <i>P. citrinum</i> F53 fermentada em meio MFA1.	78
Figura 4.26. Cromatograma padrão da fração 3 (F3) obtida da EFS do meio de cultura da linhagem <i>P. citrinum</i> F53 fermentada em meio MFA2.	79
Figura 4.27. Espectro de massas padrão para o composto correspondente ao pico 1 do cromatograma da figura 4.25. [M+H] ⁺ = <i>m/z</i> 470. Detecção: EM/IES ⁺ .	80
Figura 4.28. Espectro de massas padrão para o composto correspondente ao pico 2 do cromatograma da figura 4.25. [M+H] ⁺ = <i>m/z</i> 450. Detecção: EM/IES ⁺ .	80
Figura 4.29. Espectro de massas padrão para os compostos correspondentes aos picos 3 e 4 do cromatograma da figura 4.25. [M+H] ⁺ = <i>m/z</i> 454. Detecção: EM/IES ⁺ .	80
Figura 4.30. Espectro de RMN de ¹³ C (MeOH- <i>d</i> ₄ , 150 MHz) do composto isolado a partir da purificação do pico 4 por CLAE/UV do cromatograma da figura 4.25.	81
Figura 4.31. Estrutura química das citrinalinas A (34) e B (35).	84
Figura 4.32. Espectro de RMN de ¹³ C (Acetona- <i>d</i> ₆ , 150 MHz) do composto isolado da purificação do pico 2 (composto 38) por CLAE/UV do cromatograma da figura 4.25.	85
Figura 4.33 Estrutura química do composto 38 .	87

Figura 4.34. Espectro de RMN de ^{13}C ($\text{MeOH-}d_4$, 150 MHz) do composto isolado da purificação do pico 1 (composto 39) por CLAE/UV do cromatograma da figura 4.25.	88
Figura 4.35. Estrutura química da 17-hidroxicitrinalina B (39).	91
Figura 4.36. Estrutura química da equinocandina B (40).	91
Figura 4.37. Anel tetrahidropirrol presente na citrinalina B (35) e na 17-hidroxicitrinalina B (39).	93
Figura 4.38. Espectro de massas da citrinalina B (35) isolada do experimento de fermentação de <i>P. citrinum</i> F53 com adição do precursor $[\text{U-}^{13}\text{C}_5]\text{prolina}$. Detecção: EM/IES $^+$.	94
Figura 4.39. Espectro de massas da 17-hidroxicitrinalina B (39) isolada do experimento de fermentação de <i>P. citrinum</i> F53 com adição do precursor $[\text{U-}^{13}\text{C}_5]\text{prolina}$. Detecção: EM/IES $^+$.	94
Figura 4.40. Espectro de massas da citrinalina B (35) isolada do experimento de fermentação de <i>P. citrinum</i> F53 com adição do precursor $[\text{U-}^{13}\text{C}_5]\text{ornitina}$. Detecção: EM/IES $^+$.	94
Figura 4.41. Espectro de massas da 17-hidroxicitrinalina B (39) isolada do experimento de fermentação de <i>P. citrinum</i> F53 com adição do precursor $[\text{U-}^{13}\text{C}_5]\text{ornitina}$. Detecção: EM/IES $^+$.	95
Figura 4.42. Formação de prolina e ornitina a partir do ciclo da ureia.	96
Figura 4.43. Espectro de RMN de ^{13}C ($\text{MeOH-}d_4$, 150 MHz) da 17-hidroxicitrinalina B (39) enriquecida com $[\text{U-}^{13}\text{C}_5]\text{ornitina}$.	97
Figura 4.44. Expansão de espectro de RMN de ^{13}C ($\text{MeOH-}d_4$, 150 MHz) da 17-hidroxicitrinalina B (39) enriquecida com $[\text{U-}^{13}\text{C}_5]\text{ornitina}$.	97
Figura 4.45. Unidades isopreno presentes nas citrinalinas 35 e 39 .	98
Figura 4.46. Espectro de massas da citrinalina B (35) isolada do experimento de fermentação de <i>P. citrinum</i> F53 com adição do precursor $[\text{1-}^{13}\text{C}_1]\text{glicose}$. Detecção: EM/IES $^+$.	99

Figura 4.47. Espectro de massas da 17-hidroxicitrinalina B (39) isolada do experimento de fermentação de <i>P. citrinum</i> F53 com adição do precursor [1- ¹³ C ₁]glicose. Detecção: EM/IES ⁺ .	99
Figura 4.48. Espectro de RMN de ¹³ C (MeOH- <i>d</i> ₄ , 150 MHz) da 17-hidroxicitrinalina B (39) enriquecida com [1- ¹³ C ₁]glicose.	100
Figura 4.49. Padrão esperado de incorporação de ¹³ C em unidades isopreno.	101
Figura 4.50. Formação do ácido chiquimico através da glicose.	102
Figura 4.51. Formação de serina através da glicose.	103
Figura 4.52. Fragmento oxindólico presente na estrutura das citrinalinas 35 e 39 .	104
Figura 4.53. Espectro de massas da citrinalina B (35) isolada do experimento de fermentação de <i>P. citrinum</i> F53 com adição do precursor [U- ¹³ C ₆]ácido antranílico. Detecção: EM/IES ⁺ .	104
Figura 4.54. Espectro de massas da 17-hidroxicitrinalina B (39) isolada do experimento de fermentação de <i>P. citrinum</i> F53 com adição do precursor [U- ¹³ C ₆]ácido antranílico. Detecção: EM/IES ⁺ .	105
Figura 4.55. Espectro de RMN de ¹³ C (MeOH- <i>d</i> ₄ , 150 MHz) da 17-hidroxicitrinalina B (39) enriquecida com [U- ¹³ C ₆]ácido antranílico.	106
Figura 4.56. Expansão do espectro de RMN de ¹³ C (MeOH- <i>d</i> ₄ , 150 MHz) da 17-hidroxicitrinalina B (39) enriquecida com [U- ¹³ C ₆]ácido antranílico.	106
Figura 4.57. Catabolismo de ácido antranílico em fungos pela via do β-cetoadipato.	107
Figura 4.58. Via biossintética de formação da brevianamida F (41), notoamida S (42), notoamida T (43) e stefacidina A (44).	110
Figura 4.59. Proposta de via biossintética de formação da citrinalina B (35) e da 17-hidroxicitrinalina B (39).	111
Figura 4.60. Cromatograma padrão da fração 3 (F3) obtida da EFS do meio de cultura da linhagem <i>P. oxalicum</i> F30 fermentada em meio MF [60%].	113
Figura 4.61. Espectro de massas padrão para o composto correspondente ao pico 1. [M+H] ⁺ = <i>m/z</i> 434. Detecção: EM/IES ⁺ .	114
Figura 4.62. Espectro de massas padrão para o composto correspondente ao pico 2. [M+H] ⁺ = <i>m/z</i> 448. Detecção: EM/IES ⁺ .	114

Figura 4.63. Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz) do composto isolado da purificação do pico 2 por CLAE/UV.	115
Figura 4.64. Estrutura química da meleagrina (30) e da oxalina (31).	117
Figura 4.65. Substituintes metila presentes na meleagrina (30) e na oxalina (31).	119
Figura 4.66. Espectro de massas da oxalina (31) isolada do experimento de fermentação de <i>P. oxalicum</i> F30 com adição do precursor [metil- $^{13}\text{C}_1$]metionina. Detecção: EM/IES $^+$.	120
Figura 4.67. Espectro de massas da meleagrina (30) isolada do experimento de fermentação de <i>P. oxalicum</i> F30 com adição de [metil- $^{13}\text{C}_1$]metionina. Detecção: EM/IES $^+$.	120
Figura 4.68. Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz) da oxalina (31) enriquecida com [metil- $^{13}\text{C}_1$]metionina.	121
Figura 4.69. Unidade isopreno presente na meleagrina (30) e na oxalina (31).	122
Figura 4.70. Espectro de massas da oxalina (31) isolada do experimento de fermentação de <i>P. oxalicum</i> F30 com adição do precursor [1- $^{13}\text{C}_1$]glicose. Detecção: EM/IES $^+$.	123
Figura 4.71. Espectro de massas da meleagrina (30) isolada do experimento de fermentação de <i>P. oxalicum</i> F30 com adição do precursor [1- $^{13}\text{C}_1$]glicose. Detecção: EM/IES $^+$.	123
Figura 4.72. Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz) da oxalina (30) isolada a partir do experimento de fermentação de <i>P. oxalicum</i> F30 em meio enriquecido com [1- $^{13}\text{C}_1$]glicose.	124
Figura 4.73. Resíduo de histidina presente na meleagrina (30) e na oxalina (31).	125
Figura 4.74. Espectro de massas da oxalina (31) isolada do experimento de fermentação de <i>P. oxalicum</i> F30 com adição do precursor [U- $^{13}\text{C}_6$]histidina. Detecção: EM/IES $^+$.	125
Figura 4.75. Espectro de massas da meleagrina (29) isolada do experimento de fermentação de <i>P. oxalicum</i> F30 com adição do precursor [U- $^{13}\text{C}_6$]histidina.	126

Detecção: EM/IES⁺.

- Figura 4.76. Espectro de RMN de ¹³C (DMSO-*d*₆, 100 MHz) da oxalina (**31**) enriquecida com [U-¹³C₆]histidina. 127
- Figura 4.77. Expansão do espectro de RMN de ¹³C (DMSO-*d*₆, 100 MHz) da oxalina (**31**) enriquecida com [U-¹³C₆]histidina. 127
- Figura 4.78. Fragmento indol presente na meleagrina (**30**) e na oxalina (**31**). 128
- Figura 4.79. Espectro de massas da oxalina (**31**) isolada do experimento de fermentação de *P. oxalicum* F30 com adição do precursor [U-¹³C₆]ácido antranílico. Detecção: EM/IES⁺. 129
- Figura 4.80. Espectro de massas da meleagrina (**30**) isolada do experimento de fermentação de *P. oxalicum* F30 com adição do precursor [U-¹³C₆]ácido antranílico. Detecção: EM/IES⁺. 129
- Figura 4.81. Espectro de RMN de ¹³C (DMSO-*d*₆, 100 MHz) da oxalina (**31**) enriquecida com [U-¹³C₆]ácido antranílico. 130
- Figura 4.82. Expansão do espectro de RMN de ¹³C (DMSO-*d*₆, 100 MHz) da oxalina (**31**) enriquecida com [U-¹³C₆]ácido antranílico. 131
- Figura 4.83. Via de biossíntese de meleagrina (**30**) e oxalina (**31**) a partir de roquefortina C (**29**). 134
- Figura 4.84. Proposta de via biossintética de formação de oxalina (**31**). 135
- Figura 4.85. Esquema de quadros de leitura ao longo do genoma de *Penicillium chrysogenum*. 136

LISTA DE TABELAS

METODOLOGIA

Tabela 3.1 – Componentes do meio de cultura MF	44
Tabela 3.2 – Componentes do meio de cultura MFA1	46
Tabela 3.3 – Componentes do meio de cultura MFA2	46

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 4.1 - Valores de deslocamento químico (RMN de ^{13}C) da <i>N</i> -(2-metil-3-oxodec-8-enoil)-2-pirrolina (28) e do composto isolado da purificação do pico 1	60
Tabela 4.2 - Lista de precursores isotopicamente marcados e resultados dos experimentos de incorporação em pequena escala para os dihidropirrolis 27 e 28	61
Tabela 4.3 - Taxas de incorporação específica (%) para cada sinal de carbono do dihidropirrol 28	75
Tabela 4.4 - Valores de deslocamento químico (RMN de ^{13}C) das citrinalinas A (34) e B (35) e do composto representado pelo pico 4	82
Tabela 4.5 - Valores de deslocamento químico (RMN de ^{13}C , ^{15}N e ^1H) para o composto isolado da purificação do pico 2 (composto 38)	85
Tabela 4.6 - Valores de deslocamento químico (RMN de ^{13}C) para a citrinalina B (35) e para o composto isolado da purificação do pico 1 (composto 39)	89
Tabela 4.7 - Lista de precursores isotopicamente marcados e resultados dos experimentos de incorporação em pequena escala para as citrinalinas 35 e 39	92
Tabela 4.8 - Taxas de incorporação específica (%) para cada sinal de carbono da 17-hidroxicitrinalina B (39)	108

Tabela 4.9 - Valores de deslocamento químico (RMN de ^{13}C) da oxalina (**31**) e 115
do composto isolado da purificação do pico 2

Tabela 4.10 - Lista de precursores isotopicamente marcados e resultados dos 118
experimentos de incorporação em pequena escala para os alcaloides **30** e **31**

Tabela 4.11 - Taxas de incorporação específica (%) para cada sinal de 132
carbono da oxalina (**31**)

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ASW	<i>Artificial Sea Water</i>
CDCl₃	Clorofórmio Deuterado
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLAE	Cromatografia Líquida De Alta Eficiência
CLAE/UV	Cromatografia Líquida De Alta Eficiência Acoplada a um Detector de Ultravioleta
CLAE/UV/EM	Cromatografia Líquida De Alta Eficiência Acoplada a um Detector de Ultravioleta e a um Detector de Espectrometria de Massas
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
d	Dubleto
Da	Dalton
DMSO-<i>d</i>₆	Dimetilsulfóxido Deuterado
ED₅₀	Dose Efetiva Média (50%)
EFS	Extração em Fase Sólida
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Coherence Spectroscopy</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence Spectroscopy</i>
IC₅₀	Concentração Inibitória Média (50%)
IES⁺	Ionização por Electrospray em Modo Positivo
<i>J</i>	Constante de Acoplamento em Hz
m	Multiplete
MeCN	Acetonitrila

MeOH	Metanol
MeOH-<i>d</i>₄	Metanol Deuterado
MF	Meio Fungo Marinho
<i>m/z</i>	Razão Massa Carga do Pico do Íon Quase-Molecular
n.d.	Não Definido
n.o.	Não Observado
RMN de ¹³C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
RMN de ¹H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
s	Singlete
t	Triplete
TFA	Ácido Trifluoroacético
TMS	Tetrametilsilano
tROESY	<i>Transverse Rotating Frame Overhauser Enhancement Spectroscopy</i>
U	Molécula Uniformemente Marcada com ¹³ C
δ	Deslocamento Químico

SUMÁRIO

Resumo	vi
<i>Abstract</i>	vii
Lista de Figuras	viii
Lista de Tabelas	xvi
Lista de Abreviaturas e Símbolos	xviii

INTRODUÇÃO

1.1. Formação de policetídeos	24
1.2. Formação de unidades isopreno	30
1.3. Formação de pirróis e derivados	33
1.4. Formação de metabólitos a partir de vias biossintéticas mistas	37

OBJETIVOS 41

METODOLOGIA

3.1. Recuperação das linhagens F30 e F53	43
3.2. Condições ótimas de cultura	45
3.3. Teste de toxicidade	47
3.4. Extração das culturas	48
3.5. Análises cromatográfica das frações	50
3.6. Experimentos de incorporação em pequena escala	50
3.7. Experimentos de incorporação em maior escala	51
3.8. Purificação das frações	52
3.9. Ressonância magnética nuclear	53

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Teste de toxicidade	56
4.2. Condições ótimas de cultura	56

4.3. Biossíntese de dihidropirrois por *P. citrinum*

4.3.1. Condições ótimas para a produção de dihidropirrois	57
4.3.2. Experimentos de incorporação de [1- ¹³ C ₁]acetato de sódio e [1,2- ¹³ C ₂]acetato de sódio nos dihidropirrois 27 e 28	62
4.3.3. Experimentos de incorporação de [2,3- ¹³ C ₂]propionato de sódio e [metil- ¹³ C ₁]metionina nos dihidropirrois 27 e 28	67
4.3.4. Experimentos de incorporação de [U- ¹³ C ₅]prolina, [U- ¹³ C ₆]lisina e [U- ¹³ C ₅]ornitina nos dihidropirrois 27 e 28	70
4.3.5. Taxas de incorporação específicas de ¹³ C no dihidropirrol 28	74

4.4. Biossíntese de citrinalinas por *P. citrinum*

4.4.1. Condições ótimas para a produção de citrinalinas	78
4.4.2. Determinação estrutural dos novos derivados de citrinalina	84
4.4.2.1. Determinação estrutural do composto de <i>m/z</i> 450	84
4.4.2.2. Determinação estrutural do composto de <i>m/z</i> 470	87
4.4.3. Experimentos de incorporação em pequena escala nas citrinalinas 35 e 39	92
4.4.4. Experimentos de incorporação de [U- ¹³ C ₅]prolina e [U- ¹³ C ₅]ornitina nas citrinalinas 35 e 39	93
4.4.5. Experimentos de incorporação de [1,2- ¹³ C ₂]acetato de sódio e [1- ¹³ C ₁]glicose nas citrinalinas 35 e 39	98
4.4.6. Experimentos de incorporação de [indol-2- ¹³ C ₁]triptofano e [U- ¹³ C ₆]ácido antranílico nas citrinalinas 35 e 39	103
4.4.7 Taxas de incorporação específicas de ¹³ C na 17-hidroxicitrinalina B (39)	107

4.5. Biossíntese de alcaloides por *P. oxalicum*

4.5.1. Condições ótimas de cultura	113
4.5.2. Experimentos de incorporação de [metil- ¹³ C ₁]metionina nos alcaloides 30 e 31	119
4.5.3. Experimentos de incorporação de [1,2- ¹³ C ₂]acetato de sódio e [1- ¹³ C ₁]glicose nos alcaloides 30 e 31	122
4.5.4. Experimentos de incorporação de [U- ¹³ C ₆]histidina nos alcaloides 30 e 31	125

4.5.5. Experimentos de incorporação de [indol-2- ¹³ C ₁]triptofano e [U- ¹³ C ₆]ácido antranílico nos alcaloides 30 e 31	128
4.5.6. Taxas de incorporação específicas de ¹³ C na oxalina (31)	131
CONCLUSÕES	138
REFERÊNCIAS	141
ANEXO	150

Introdução

1. Introdução

Aspectos principais da biossíntese de metabólitos de micro-organismos

1.1. Formação de policetídeos

Os policetídeos representam um grupo altamente diversificado de produtos naturais, com esqueletos de carbono estruturalmente diversos e que compreendem macrolídeos, polifenóis, polienos e poliéteres. Embora, na maioria das vezes, as funções biológicas destes metabólitos ainda não sejam conhecidas, acredita-se que possam atuar como pigmentos, fatores de virulência, transmissores de sinais, ou ainda na defesa química dos organismos que os produzem ou acumulam (BAERSON e RIMANDO, 2007; HERTWECK, 2009).

Policetídeos são biossintetizados por reações repetitivas de condensação de Claisen seguida de descarboxilação, de uma unidade acil ativada com unidades extensoras de malonil-CoA (Figura 1.1). Nesta rota, os ciclos de alongamento são repetidos até que um comprimento de cadeia definido seja obtido, quando então o substrato é liberado do complexo enzimático. Uma vez livre, o esqueleto de carbono resultante pode sofrer ciclização, clivagem C–C e reações de rearranjo. Finalmente, reações adicionais modificam a estrutura do policetídeo, como as biotransformações de glicosilação, alquilações, hidroxilações e epoxidações (HERTWECK, 2009).

Figura 1.1. Via de formação de policetídeos por condensação de Claisen.

Além das biotransformações citadas, a diversidade de estruturas presentes na classe dos policetídeos é, pelo menos em parte, aumentada modificando-se a natureza da unidade acil iniciadora. Ou seja, utilizando outro tipo de “carboxilato”CoA que não o acetilCoA comumente observado, mas ainda utilizando o malonilCoA como unidade extensora de cadeia (DEWICK, 2002). Uma unidade hexanoatoCoA iniciadora, por exemplo, é utilizada na formação das aflatoxinas, um grupo de metabólitos tóxicos produzidos por *Aspergillus flavus*. Destas, a aflatoxina B₁ (1) é tanto a mais comum, quanto a mais tóxica (MINTO e TOWNSEND, 1997).

Figura 1.2. Policetídeos biossintetizados a partir de unidades iniciadoras alternativas.

Outro exemplo de unidade iniciadora de policetídeos é o propionilCoA. Embora o propionato possa exercer um efeito inibitório em fungos, pela inibição competitiva da enzima piruvato desidrogenase (BROCK e BUCKEL, 2004), ainda é possível encontrar relatos na literatura de linhagens de fungos que biossintetizam policetídeos derivados de propionato. A asteltoxina (2), produzida pelo fungo *Emericella varicolor* (STEYN e VLEGGAAR, 1984), e as aurovertinas B (3) e D (4), originalmente isoladas da linhagem de fungo *Calcarisporium arbuscula* (STEYN *et al.*, 1981), são exemplos de micro-organismos capazes de utilizar propionilCoA como unidade iniciadora de formação de policetídeos.

A asteltoxina (2) e as aurovertinas B (3) e D (4) podem ser formadas por meio de duas vias biossintéticas que diferem quanto à origem de C1-C3. A primeira via envolve a C-metilação de um precursor policetídeo, seguido da perda da unidade acetato final. Desta forma, o C-1 nestes compostos é derivado da metionina, e C-2 e C-3 são derivados do malonato. A segunda via de formação envolve um precursor policetídeo formado a partir de uma unidade iniciadora propionilCoA e unidades extensoras de malonato. Nesta via, o C1-C3 são derivados do propionato (STEYN *et al.*, 1981; STEYN e VLEGGAAR, 1984).

Policetídeos de fungos são biossintetizados por enzimas modulares conhecidas como policetídeo-sintases (PKS), que normalmente possuem um único módulo, usado iterativamente na montagem da cadeia policetídeo. Estas FPKS modulares podem ser subdivididas em três classes, de acordo com o nível de redução apresentado pela cadeia do policetídeo formado.

A primeira classe é a das PKS não-redutoras (NR-FPKS), que sintetizam compostos aromáticos e policíclicos. Na figura 1.3 pode-se observar o esquema de uma NR-FPKS responsável pela biossíntese da citrinina (5). Este tipo de PKS apresenta os domínios de iniciação (SAT), de β -cetoacil-sintase (CAS), de acil-transferase (AT), de proteína carreadora de acil (PCA) e de C-metilação (C-Met), necessários à formação da molécula.

Figura 1.3. Possível rota de biossíntese de citrinina (5) por uma NR-FPKS modular (COX, 2007).

Além de biossintetizar a citrinina propriamente dita, fungos da espécie *Penicillium citrinum* podem utilizar a citrinina como um precursor na biossíntese de outros metabólitos. Desta forma, uma linhagem de *P. citrinum* isolada a partir de uma amostra de sedimento marinho produziu três derivados da citrinina, os penicitrinóis C - E (6 - 8). Os compostos 6 e 8 mostraram citotoxicidade fraca contra

células de leucemia HL-60, com valores de IC_{50} de 52,8 e 41,2 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente (CHEN *et al.*, 2011).

Figura 1.4. Citrinina (5) e seus derivados.

As demais classes de FPKS são a da PKS parcialmente-redutora (PR-FPKS), que aparenta sintetizar compostos cíclicos, mas pouco se sabe sobre suas funções; e a da PKS altamente-redutora (HR-FPKS), que sintetiza compostos complexos não aromáticos como a mevastatina (9) (ZHU *et al.*, 2008).

A mevastatina (9), também conhecida por compactina, foi concomitantemente isolada por dois grupos de pesquisa, por Endo *et al.* (1976) a partir de uma linhagem de *P. citrinum* e por Brown *et al.* (1976), a partir de uma linhagem de *P. brevicompactum*. Este composto, pertencente à classe das estatinas, recebeu atenção devido à sua atividade hipocolesterolêmica pela inibição da enzima que catalisa a produção de mevalonato, o precursor do colesterol. Dentre as estatinas, a lovastatina (10), originalmente isolada a partir do fungo *Aspergillus terreus*, foi a primeira a ser comercializada como medicamento hipocolesterolêmico (ALBERTS, 1988).

Figura 1.5. Estrutura química da mevastatina (9) e da lovastatina (10).

Dentre outros compostos pertencentes à classe dos policetídeos, podemos citar as coniocetonas C e D (**11** e **12**), o (3*R*,4*S*)-6,8-dihidroxi-1,1-dimetil-3,4,5-trimetilisocromano (**13**), e as penicilantraninas A e B (**14** e **15**). Estes compostos foram produzidos por uma linhagem marinha de *P. citrinum*, isolada a partir de uma gorgônia do gênero *Annella* sp., sendo que o composto **14** exibiu atividade antibacteriana moderada contra *Staphylococcus aureus* ATCC25923 e contra MRSA (*methicillin-resistant Staphylococcus aureus*) com valores de CIM iguais a 16 µg/mL (KHAMTHONG *et al.*, 2012).

Figura 1.6. Policetídeos produzidos por uma linhagem marinha de *P. citrinum*.

Ademais, uma linhagem marinha de *P. oxalicum*, isolada a partir de uma gorgônia da espécie *Dichotella gemmacea*, produziu três cromonas nomeadas de oxalicumonas A - C (**16** - **18**). Embora cromonas ocorram naturalmente em plantas e fungos, o núcleo condensado dihidrotiofeno é raro em produtos naturais. Ainda, a oxalicumona A (**16**) apresentou citotoxicidade moderada contra células de melanoma humano e de adenocarcinoma do cólon, com valores de IC₅₀ de 11,7 e 22,6 µM, respectivamente (SUN *et al.*, 2012).

Figura 1.7. Policetídeos produzidos por uma linhagem marinha de *P. oxalicum*.

1.2. Formação de unidades isopreno

Compostos isoprenoides, ou terpenos, estão presentes em todos os organismos vivos, sendo representados principalmente por esteróis estabilizadores de membrana na maioria dos eucariotos, precursores de carotenoides em organismos fotossintetizantes, e como ácidos mono-, sesqui- e diterpenos, na forma de metabólitos secundários. Formalmente, terpenos são derivados de um esqueleto de carbono C₅ ramificado do tipo pirofosfato de dimetilalila (DMAPP) ou pirofosfato de isopentenila (IPP), e o número de repetições destes motivos, as reações de ciclização, rearranjos e oxidações adicionais do esqueleto de carbono são os responsáveis pela enorme diversidade de estruturas (ROHMER, 1999).

Existem duas vias metabólicas principais para a formação de unidades isopreno. A via do mevalonato (Figura 1.8) consiste na condensação de Claisen de

duas unidades de acetilCoA, de modo a formar o acetoacetilCoA. A partir daí, uma terceira unidade de acetilCoA é adicionada através de uma reação aldol, seguido da hidrólise de um dos ésteres de tior, formando o hidroximetilglutarilCoA (HMG-CoA). O HMG-CoA é reduzido a ácido mevalônico e subsequentemente fosforilado para ácido mevalônico 5-pirofosfato (MVA-5PP). Este substrato é então fosforilado e descarboxilado, com perda concomitante de fosfato inorgânico, dando origem ao esqueleto do pirofosfato de isopentenila (IPP). O IPP é posteriormente isomerizado para DMAPP por uma isomerase (WILLIAMS *et al.*, 2000).

Figura 1.8. Formação de unidades isopreno a partir do mevalonato.

A segunda via de formação de unidades isopreno, também chamada de Rota de Rohmer (Figura 1.9), ocorre a partir da condensação descarboxilativa de uma unidade piruvato com uma unidade tiamina pirofosfato. O esqueleto de carbono formado a partir desta reação inicial sofre um rearranjo, seguido de condensação

com uma unidade de gliceraldeído-3-fosfato, levando ao D-1-deoxi-xilulose-5P. Etapas sucessivas de redução e isomerização do D-1-deoxi-xilulose-5P levam às unidades básicas do pirofosfato de isopentenila (IPP) e do pirofosfato de dimetilalila (DMAPP) (ROHMER, 1999; WILLIAMS *et al.*, 2000).

Figura 1.9. Formação de unidades isopreno através da Rota de Rohmer.

Como exemplos de produtos naturais pertencentes à classe dos terpenos, temos que uma linhagem marinha de *P. citrinum* isolada a partir de um coral da ordem ZOANTHARIA, produziu quatro sesquiterpenos: o JBIR-27 (**19**), o petasol (**20**), o sporogeno AO-1 (**21**) e o dihidrosporogeno AO-1 (**22**). Destes, o sporogeno AO-1 (**21**) apresentou atividade antifúngica contra *Candida albicans* (CIM = 4,0 mM) e ambos o sporogeno AO-1 (**21**) e o dihidrosporogeno AO-1 (**22**) apresentaram citotoxicidade contra células do carcinoma de Ehrlich, com valores de ED₅₀ de 0,9 e 0,4 mM, respectivamente (YURCHENKO *et al.*, 2013).

Figura 1.10. Terpenos produzidos por uma linhagem marinha de *P. citrinum*.

1.3. Formação de pirrois e derivados

Existem muitas vias biossintéticas distintas que levam à formação de anéis de pirrol, dihidropirrol (pirrolina) e tetrahidropirrol (pirrolidina). Anéis pirrol e seus derivados podem ser formados a partir de precursores como acetato, prolina, glicina e serina (CERDENO *et al.*, 2001), prolina (CLARK e MURPHY, 2008), tirosina (BRAHME *et al.*, 1984), e triptofano (PEARCE *et al.*, 1988; MEKSURIYEN e CORDELL, 1988), de tal forma que parte dos aminoácidos assimilados pelos organismos sejam desviados da rota de formação de proteínas para a rota de formação de metabólitos secundários (PESCHKE *et al.*, 2005).

Figura 1.11. Possíveis precursores e rotas de formação de anéis pirrol, pirrolina e pirrolidina.

Uma vez que o esqueleto pirrol é construído, este pode ser incorporado em produtos naturais por diversas reações, como hidrólise, ataque nucleofílico de um álcool, ataque nucleofílico de carbono, ou por formação de amida (WALSH *et al.*, 2006).

Figura 1.12. Incorporação de um anel pirrol em um policetídeo por ataque nucleofílico de carbono (DEWICK, 2002).

O fungo *P. citrinum*, isolado a partir do gastrointestino do peixe *Scalus ovifrons*, foi capaz de biossintetizar diferentes alcaloides pirrolidínicos. A perinadina A (**23**) mostrou citotoxicidade fraca contra a leucemia murina (IC₅₀ = 20 µg/mL) e atividade antibacteriana contra *Micrococcus luteus* (CIM = 33,3 µg/mL) e *Bacillus subtilis* (CIM = 66,7 µg/mL) (SASAKI *et al.*, 2005). Já dentre as scalusamidas A - C (**24** - **26**), produzidas pela mesma linhagem, apenas a scalusamida A (**24**) apresentou atividade biológica contra *Micrococcus luteus* (CIM = 33,3 µg/mL) e atividade antifúngica contra *Cryptococcus neoformans* (CIM = 16,7 µg/mL) (TSUDA *et al.*, 2005).

Figura 1.13. Alcaloides pirrolidínicos produzidos por uma linhagem marinha de *P. citrinum*.

Podemos citar ainda os compostos inseticidas *N*-(2-metil-3-oxodecanoil)-2-pirrolina (**27**) e *N*-(2-metil-3-oxodec-8-enoil)-2-pirrolina (**28**), originalmente produzidos por uma linhagem endofítica de *P. brevicompactum* (MOYA *et al.*, 1998; CANTIN *et al.*, 1999). Mais recentemente, Pimenta *et al.* (2010) isolaram estes mesmos compostos de uma linhagem endofítica marinha de *P. citrinum* isolada a partir de uma alga do gênero *Caulerpa*.

Figura 1.14. Alcaloides produzidos por linhagens endofíticas de fungos do gênero *Penicillium*.

1.4. Formação de metabólitos a partir de vias biossintéticas mistas

Um exemplo clássico de metabólitos produzidos a partir de vias de biossíntese mistas são os alcaloides indólicos prenilados. Estes alcaloides são produtos naturais híbridos distribuídos em plantas e micro-organismos, terrestres e marinhos, e que muitas vezes possuem atividades biológicas claramente distintas de seus precursores não-prenilados (LI, 2009).

Além das unidades isopreno, o triptofano é considerado um precursor chave para a biossíntese de alcaloides indólicos prenilados, sendo normalmente responsável pela origem biogenética do anel indol ou oxindol (Figura 1.15). A maioria destes alcaloides, entretanto, contém um segundo aminoácido e formam dipeptídeos cíclicos com uma estrutura do tipo dicetopiperazina ou análoga (STEFFAN *et al.*, 2009).

Figura 1.15. Formação do anel indol em triptofano (McMURRY e BEGLEY, 2005).

Como exemplo desta classe de alcaloides podemos citar a roquefortina C (**29**), um metabólito neurotóxico derivado de mevalonato, triptofano e histidina, isolado a partir de uma linhagem de *P. roqueforti* (SCOTT *et al.*, 1976; BARROW *et al.*, 1979) e a meleagrina (**30**), originalmente isolada a partir de uma linhagem de *P. meleagrinum* (NOZAWA e NAKAJIMA, 1979; KAWAI *et al.*, 1983).

Linhagens de fungos da espécie *P. oxalicum* também são capazes de biossintetizar a roquefortina C (**29**) e a meleagrina (**30**). Estudos demonstraram que linhagens de *P. oxalicum* utilizam a roquefortina C (**29**) como um precursor para produzir outros alcaloides, como a meleagrina (**30**) e a oxalina (**31**) (STEYN e VLEGGAR, 1983; OVERY *et al.*, 2005).

Figura 1.16. Estrutura química dos alcaloides roquefortina C (**29**), meleagrina (**30**) e oxalina (**31**).

A oxalina (**31**) foi primeiramente isolada por Nagel *et al.* (1974) e recebeu atenção devido às suas características estruturais até então únicas, como o acoplamento entre os resíduos de triptofano e histidina, a presença de uma unidade isopreno ligada de forma reversa ao átomo de carbono C-3 do triptofano, e a presença de três funcionalidades nitrogenadas (NAGEL *et al.*, 1974; NAGEL *et al.*, 1976). Mais recentemente, pesquisadores determinaram o modo de ação da atividade inibitória da proliferação celular da oxalina, que inibe a polimerização da tubulina, resultando na parada do ciclo celular na fase M (KOIZUMI *et al.*, 2004).

Alcaloides indólicos prenilados também podem ser encontrados em linhagens de fungos da espécie *P. citrinum*. As citrinadinas A (**32**) e B (**33**), por exemplo, são produzidas por uma linhagem endofítica marinha de *P. citrinum* isolada a partir da

alga vermelha *Actinotriquia fragilis*. A citrinadina A (**32**) apresentou citotoxicidade contra células de leucemia murina e carcinoma de epiderme, com IC_{50} de 6,2 e 10 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Já a citrinadina B (**33**) mostrou citotoxicidade moderada contra a leucemia murina ($IC_{50} = 10 \mu\text{g/mL}$) (TSUDA *et al.*, 2004; MUGISHIMA *et al.*, 2005). Recentemente, Pimenta *et al.* (2010) isolaram os compostos citrinalinas A (**34**) e B (**35**) também a partir de uma linhagem endofítica marinha de *P. citrinum*.

Figura 1.17. Alcaloides indólicos produzidos por linhagens endofíticas marinhas de *P. citrinum*.

Objetivos

2. Objetivos

O objetivo deste projeto foi realizar experimentos de incorporação com precursores isotopicamente marcados em metabólitos secundários isolados do meio de cultura de dois fungos do gênero *Penicillium* (*P. citrinum* e *P. oxalicum*) de maneira a se verificar a rota de biossíntese dos compostos produzidos por estes fungos.

Como objetivos específicos propôs-se:

- a) Realizar experimentos de toxicidade com os precursores para verificar a viabilidade das linhagens.
- b) Realizar experimentos de otimização das condições de fermentação para a máxima produção de moléculas de interesse.
- c) Realizar experimentos de incorporação com precursores isotopicamente marcados ([1-¹³C₁]acetato de sódio, [1,2-¹³C₂]acetato de sódio, [2,3-¹³C₂]propionato de sódio, [metil-¹³C₁]metionina, [1-¹³C₁]glicose, [U-¹³C₅]ornitina, [U-¹³C₆]lisina, [U-¹³C₅]prolina, [U-¹³C₆]histidina [2-indol-¹³C₁]triptofano e [U-¹³C₆]ácido antranílico) em pequena escala para se atribuir possíveis precursores e rotas de formação para as moléculas de interesse.
- d) Realizar experimentos de incorporação com precursores isotopicamente marcados em maior escala para a purificação dos compostos isotopicamente marcados.
- e) Identificar e analisar os compostos puros, de maneira a confirmar a incorporação dos precursores isotopicamente marcados e propor rotas de biossíntese para os produtos formados.

Metodologia

3. Metodologia

3.1. Recuperação das linhagens F30 e F53

Ambas linhagens *Penicillium oxalicum* F30 (Currie e Thom, 1915) e *Penicillium citrinum* F53 (Hetherington e Raistrick, 1931) foram isoladas, respectivamente, a partir de uma amostra de sedimento marinho e de uma alga marinha do gênero *Caulerpa* sp. por Vita-Marques (2003). Estas linhagens estão depositadas na Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria (CBMAI) sob os números de acesso: CBMAI 1185 para *P. oxalicum* e CBMAI 1186 para *P. citrinum*.

Figura 3.1. Aspecto macroscópico das linhagens *P. oxalicum* (F30) e *P. citrinum* (F53).

Para recuperá-las, as linhagens foram inoculadas em placas de Petri contendo meio de cultura MF (Tabela 3.1).

Tabela 3.1 - Componentes do meio de cultura MF

Componente	Quantidade
Glicose	20 g
Amido solúvel	10 g
Peptona A	20 g
Peptona S	5 g
Extrato de levedura	5 g
Extrato de carne	0,3 g
ASW* (<i>Artificial Sea Water</i>)	1 L
Agar	20 g

*ASW (CaCl₂ 1,36 g/L; MgCl₂ 9,68 g/L; KCl 0,61 g/L; NaCl 30 g/L; Na₂HPO₄ 0,14 mg/L; Na₂SO₄ 3,47 g/L; NaHCO₃ 0,17 g/L; KBr 100 mg/L; SrCl₂ 40 mg/L; H₃BO₃ 30 mg/L).

Uma vez presentes nas placas, as linhagens foram novamente repicadas para tubos de ensaio contendo meio de cultura MF inclinado. Os tubos de ensaio foram incubados até que o fungo esporulasse. Após detectada a presença de esporos, adicionou-se 5 mL de uma solução de Tween 80 a 0,5% aos tubos de ensaio contendo o fungo. Em seguida, o micélio foi raspado da superfície do agar e a mistura Tween + micélio agitada em um vortex, e posteriormente filtrada em fibra de vidro. O filtrado foi centrifugado, a solução de Tween foi descartada, e o pellet contendo os esporos foi diluído em água destilada estéril (Figura 3.2). Os esporos assim adquiridos foram contados utilizando-se um hemocitômetro (câmara de Neubauer) e a solução estoque teve sua concentração ajustada para 10⁵ esporos/mL.

Este procedimento foi realizado para ambas as linhagens, *P. oxalicum* F30 e *P. citrinum* F53, em condições estéreis.

Figura 3.2. Produção de uma solução de esporos para a linhagem *P. citrinum* F53.

3.2. Condições ótimas de cultura

Para a produção de metabólitos secundários por parte da linhagem *P. citrinum* F53, observou-se que as condições ótimas de cultura para a produção dos dihidropiróis **27** e **28** foram: 60% da concentração inicial de nutrientes do meio MF (Tabela 3.1), 20% da concentração inicial de sais de ASW (Tabela 3.1), pH inicial 8,0, temperatura de 30 °C e 14 dias de fermentação estática, como estabelecido na literatura (PIMENTA *et al.*, 2010).

Para a produção de citrinalina B (**35**) por parte da linhagem *P. citrinum* F53, observou-se que as condições ótimas variaram de acordo com o precursor utilizado. Desta forma, devido à dificuldade em se incorporar os precursores de interesse na citrinalina B (**35**), foram desenvolvidos dois meios de cultura MF alternativos, MFA1 (Tabela 3.2) e MFA2 (Tabela 3.3).

Tabela 3.2 - Componentes do meio de cultura MFA1

Componente	Quantidade
Glicose	20 g
Extrato de levedura	5 g
Extrato de carne	0,3 g
ASW*	1 L

*ASW 20% (CaCl₂ 0,27 g/L; MgCl₂ 1,94 g/L; KCl 0,12 g/L; NaCl 6,0 g/L; Na₂HPO₄ 0,03 g/L; NaSO₄ 0,64 g/L; NaHCO₃ 0,034 g/L; KBr 0,020 g/L; SrCl₂ 0,008 g/L; H₃BO₃ 0,006 g/L).

Tabela 3.3 - Componentes do meio de cultura MFA2

Componente	Quantidade
Amido solúvel	10 g
Extrato de levedura	5 g
Extrato de carne	0,3 g
ASW*	1 L

*ASW 20% (CaCl₂ 0,27 g/L; MgCl₂ 1,94 g/L; KCl 0,12 g/L; NaCl 6,0 g/L; Na₂HPO₄ 0,03 g/L; NaSO₄ 0,64 g/L; NaHCO₃ 0,034 g/L; KBr 0,020 g/L; SrCl₂ 0,008 g/L; H₃BO₃ 0,006 g/L).

As demais condições ótimas de fermentação foram estabelecidas como sendo 20% da concentração inicial de sais de ASW, pH inicial 8,0, temperatura de 28 °C e 28 dias de fermentação estática, utilizando-se o meio otimizado MFA1 para os experimentos de incorporação com precursores derivados de aminoácidos, e o meio MFA2 para os experimentos de incorporação utilizando [1-¹³C₁]glicose.

A utilização dos meios de cultura MFA1 e MFA2 resultaram em uma mudança no perfil metabólico geral da linhagem *P. citrinum* F53 e permitiram a purificação de dois novos compostos, **38** e **39**, derivados da citrinalina B (tópico 4.4.2).

As condições ótimas de cultura para a produção dos compostos meleagrina (30) e oxalina (31) pela linhagem *P. oxalicum* F30 foram previamente estabelecidas como sendo: 60% da concentração inicial de nutrientes do meio MF (Tabela 3.1), 20% da concentração inicial de sais de ASW (Tabela 3.1), pH inicial 8,0, temperatura de 30 °C e 14 dias de fermentação estática (PIMENTA *et al.*, 2010).

3.3. Teste de toxicidade

Foram realizados experimentos de fermentação adicionando-se quantidades crescentes de acetato de sódio não-marcado isotopicamente (AcONa) às culturas, de maneira a se observar uma eventual toxicidade deste precursor sobre os fungos.

Para tanto foram utilizados 14 inóculos crescidos em 50 mL de meio de cultura MF líquido (Tabela 3.1). Destes 14 inóculos, 12 foram enriquecidos com AcONa em concentrações de 0,5, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 e 5,0 g/L, sendo que em seis inóculos o AcONa foi adicionado no primeiro dia de crescimento. Para os seis inóculos restantes, adicionou-se o AcONa no quarto dia de crescimento. Os últimos dois inóculos não foram enriquecidos com AcONa, sendo considerados como experimento padrão (Figura 3.3). Os inóculos foram fermentados em modo estático por 14 dias a 30 °C, extraídos como descrito no tópico 3.4 e analisados como descrito no tópico 3.5.

Estes experimentos foram realizados em duplicata.

Figura 3.3. Fluxograma do experimento preliminar de toxicidade.

3.4. Extração das culturas

Após o período estipulado de fermentação, o micélio de cada cultura foi separado do meio líquido por filtração a vácuo, utilizando-se um funil sinterizado acoplado a um kitassato (Figura 3.4). Como filtro utilizou-se papel de filtro recoberto com uma camada de celite.

Figura 3.4. Extração das culturas da linhagem *P. citrinum* F53.

Os meios de cultura livres de micélio foram submetidos a uma extração em fase sólida (EFS) em coluna de sílica gel derivatizada com C₁₈ e eluída com:

1. 35 mL de H₂O, para a retirada de sais, açúcares, aminoácidos, etc.;
2. 35 mL de MeOH/H₂O (1:1);
3. 35 mL de MeOH.

A fração 1 foi descartada e as frações 2 e 3 foram coletadas em tubos de ensaio de 50 mL e secas em um equipamento de evaporação sob alto vácuo (SpeedVac). Depois de seco, o conteúdo dos tubos foi rediluído e transferido para frascos etiquetados e pesados. Os frascos foram então colocados em um SpeedVac para a total evaporação do solvente, originando as frações dos meios de cultura de cada experimento de fermentação.

3.5. Análise cromatográfica das frações

As frações 2 e 3 obtidas a partir da EFS de cada experimento de fermentação foram analisadas por cromatografia líquida acoplada a detectores de ultravioleta e espectrômetro de massas (CLAE/UV/EM/IES). Este sistema é composto por: um cromatógrafo líquido de alta eficiência Waters[®], modelo Alliance 2695; acoplado a um detector espectrofotométrico UV-Vísivel Waters[®], modelo 2996 de arranjo de fotodiodos; e um espectrômetro de massas Waters[®], modelo ZQ 2000. Todos gerenciados por um sistema Empower 2.0.

Para a análise das frações obtidas do meio de cultura de *P. oxalicum* F30 e *P. citrinum* F53, cerca de 2 mg de cada amostra foram diluídos em 1 mL de MeOH grau cromatográfico e transferidos para os vials do amostrador. Foram realizadas análises de 23 minutos, em uma coluna de fase reversa C₁₈ Waters[®] XTerra MS (dimensões 2,1 x 50 mm, 3,5 µm), utilizando-se um gradiente de eluição (iniciando-se em 90% de H₂O, seguido de um gradiente linear durante 12 minutos até MeOH/MeCN (1:1), permanecendo neste último por 5 minutos) com fluxo de 0,5 mL/min.

3.6. Experimentos de incorporação em pequena escala

Para a produção dos dihidropirrois **27** e **28**, após um período inicial de quatro dias de incubação, inóculos de 50 mL da linhagem *P. citrinum* F53 foram separadamente enriquecidos com os precursores isotopicamente marcados: [1-¹³C₁]acetato de sódio, [1,2-¹³C₂]acetato de sódio, [2,3-¹³C₂]propionato de sódio, [metil-¹³C₁]metionina, [U-¹³C₅]ornitina, [U-¹³C₆]lisina e [U-¹³C₅]prolina, a uma concentração final de 1 mg/mL. Ao fim do período de 14 dias de fermentação, os inóculos foram extraídos como descrito no tópico 3.4 e analisados como descrito no tópico 3.5.

Para a produção das citrinalinas **35** e **39**, após seis dias de incubação, inóculos de 50 mL da linhagem *P. citrinum* F53 foram separadamente enriquecidos com os precursores isotopicamente marcados: [1,2- $^{13}\text{C}_2$]acetato de sódio, [1- $^{13}\text{C}_1$]glicose, [U- $^{13}\text{C}_5$]prolina, [U- $^{13}\text{C}_5$]ornitina, [2-indol- $^{13}\text{C}_1$]triptofano e [U- $^{13}\text{C}_6$]ácido antranílico, a uma concentração final de 1 mg/mL. Estas culturas foram fermentadas por um tempo total de 28 dias. Após o período de fermentação, as culturas foram processadas como descrito no tópico 3.4 e analisadas como descrito no tópico 3.5.

Para a produção de meleagrina (**30**) e oxalina (**31**) pela linhagem *P. oxalicum* F30, foram preparados inóculos de 50 mL nas condições ótimas descritas no tópico 3.2. Após um período inicial de oito dias de fermentação, os inóculos foram enriquecidos com os precursores isotopicamente marcados: [1,2- $^{13}\text{C}_2$]acetato de sódio, [metil- $^{13}\text{C}_1$]metionina, [1- $^{13}\text{C}_1$]glicose, [U- $^{13}\text{C}_5$]ornitina, [U- $^{13}\text{C}_6$]lisina, [U- $^{13}\text{C}_5$]prolina, [U- $^{13}\text{C}_6$]histidina, [2-indol- $^{13}\text{C}_1$]triptofano e [U- $^{13}\text{C}_6$]ácido antranílico, a uma concentração final de 1 mg/mL. Ao fim do período de 14 dias de fermentação, as culturas foram extraídas como descrito no tópico 3.4 e analisadas como descrito no tópico 3.5.

Todos os experimentos de incorporação em pequena escala foram realizados em duplicata.

3.7. Experimentos de incorporação em maior escala

Uma vez constatada a incorporação de um precursor através das análises por CLAE/UV/EM/IES, os experimentos foram novamente repetidos em maior escala para a produção de compostos puros para as análises por RMN de ^{13}C .

Para tanto, foram preparados inóculos de 100 mL de meio de cultura líquido, totalizando 2 litros de meio de cultura. Estes inóculos foram enriquecidos com os precursores isotopicamente marcados a uma concentração final de 1 mg/mL, seguindo os parâmetros ótimos de cultura descritos no tópico 3.2. Finalmente, após

o fim do período de fermentação, os inóculos foram processados como descrito no tópico 3.4 e analisados como descrito no tópico 3.5.

3.8. Purificação das frações

As frações das replicatas dos experimentos em maior escala foram reunidas e purificadas por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector de ultravioleta (CLAE/UV). Este sistema cromatográfico é composto por uma bomba para gradiente quaternário Waters® 600 e um detector espectrofotométrico UV-Vísivel Waters®, modelo 2996, gerenciado por um sistema Waters® Millenium 32.

Para realizar a purificação dos dihidropiróis **27** e **28** foi utilizada uma coluna analítica de fase reversa Inertsil C₁₈ ODS-3 (dimensões 4,6 x 250 mm, 5 µm), eluída isocraticamente com MeOH/H₂O (7:3), fluxo de 1 mL/min, e monitorada no comprimento de onda de 254 nm.

Para realizar a separação das citrinalinas **35**, **38** e **39** foi utilizada uma coluna analítica de fase reversa Inertsil C₁₈ EP (dimensões 4,6 x 250 mm, 5 µm), eluída com um gradiente (iniciando-se em 80% de H₂O contendo 0,1% de TFA, seguido de um gradiente linear durante 20 minutos até MeOH/MeCN (1:1) permanecendo neste último por 5 minutos), fluxo de 1 mL/min, e monitorada no comprimento de onda de 254 nm. As frações resultantes desta separação foram exaustivamente purificadas por CLAE/UV, utilizando-se uma coluna analítica de fase reversa InertSustain C₁₈ (dimensões 4,6 x 250 mm, 5 µm), eluída com MeOH/H₂O(0,05% de TFA) (1:1) e monitorada no comprimento de onda de 254 nm.

Para realizar a purificação da meleagrina (**30**) e da oxalina (**31**) foi utilizada uma coluna analítica de fase reversa Inertsil C₁₈ ODS-3 (dimensões 4,6 x 250 mm, 5 µm), eluída isocraticamente com MeOH/H₂O (6:4), fluxo de 1 mL/min, e monitorada no comprimento de onda de 254 nm.

3.9. Ressonância Magnética Nuclear

Após obtidos na sua forma purificada, o dihidropirrol **28** e a oxalina (**31**) foram submetidos à análises por RMN de ^{13}C para a obtenção de dados que indicassem a incorporação dos precursores isotopicamente marcados oriundos dos diferentes experimentos de fermentação. Para tanto, aproximadamente 3 mg de cada amostra foram diluídos em 200 μL de DMSO deuterado ($\text{DMSO-}d_6$), utilizando-se TMS como padrão de referência interna. O equipamento de RMN utilizado foi um Bruker DRX 400 (9,4 Tesla), operando a 100 MHz na frequência do Carbono (^{13}C).

Para as análises de RMN das citrinalinas, os compostos **35** e **39** foram diluídos em metanol deuterado ($\text{MeOH-}d_4$), e o composto **38**, diluído em acetona deuterada ($\text{Acetona-}d_6$). O equipamento de RMN utilizado foi um Bruker AV-600 com um crioprobe de 5 mm, operando a 600 MHz na frequência do Hidrogênio (^1H) e a 150 MHz na frequência do Carbono (^{13}C).

Os espectros de RMN de ^{13}C (Anexo) foram utilizados para o cálculo das taxas de incorporação específica para cada carbono (adaptado de KUBANEK e ANDERSEN, 1999). Assim, determinou-se as áreas dos singletos para cada carbono da molécula padrão por integração dos sinais, utilizando-se o software Topspin 2.0. Estes valores foram utilizados como referência, totalizando 1,1% (indicativo da abundância natural de ^{13}C em qualquer molécula). A seguir, determinou-se a soma das áreas dos singletos centrais e multipletos adjacentes para as moléculas que sofreram incorporação com precursores marcados com ^{13}C . Estes valores foram calculados em relação aos valores obtidos para a molécula padrão, resultando na taxa de incorporação específica (%).

Os procedimentos experimentais gerais estão resumidos na figura 3.5 a seguir.

Figura 3.5. Fluxograma dos procedimentos gerais de pesquisa.

Resultados e Discussão

4. Resultados e Discussão

4.1. Teste de toxicidade

Não foi possível observar nenhum efeito visível de toxicidade pela adição de quantidades crescentes de acetato de sódio às colônias de *P. citrinum* e *P. oxalicum*, indicando que a adição de AcONa ao meio de cultura não ocasionou nenhuma alteração morfológica ou de crescimento aos fungos. Também não foi possível observar qualquer alteração no perfil metabólico geral, ou na produção específica dos compostos de interesse em qualquer dos experimentos de toxicidade.

4.2. Condições ótimas de cultura

Experimentos de modificação do meio de cultura MF foram realizados para se determinar a melhor condição de fermentação. Embora mudanças nos componentes do meio de cultura tenham alterado o perfil cromatográfico dos extratos brutos produzidos pelos fungos, a presença dos compostos de interesse permaneceu inalterada.

4.3 Biossíntese de dihidropirrois por *P. citrinum*

4.3.1. Condições ótimas para a produção de dihidropirrois

As condições ótimas de cultura para a produção de dihidropirrois pela linhagem *P. citrinum* F53 (descritas no tópico 3.2) levaram à produção de extratos brutos que, após uma purificação preliminar por EFS, forneceram frações metanólicas cujo perfil cromatográfico geral está ilustrado na Figura 4.1.

Figura 4.1. Cromatograma padrão da fração 3 (F3) obtida da EFS do meio de cultura da linhagem *P. citrinum* F53 fermentada em meio MF [60%]. Condições de análise: coluna C₁₈ Waters® XTerra MS (dimensões 2,1 x 50 mm, 3,5 µm), gradiente de eluição (H₂O/MeOH/MeCN), fluxo de 0,5 mL/min, detecção por EM/IES⁺.

A partir de 75 mg do extrato bruto F53 padrão foram purificadas aproximadamente 9 mg e 0,3 mg dos compostos representados pelos picos 1 e 2, cujos espectros EM/IES⁺ estão ilustrados nas figuras 4.2 e 4.3.

Figura 4.2. Espectro de massas padrão para o composto presente no pico 1. $[M+H]^+$ = m/z 250,1. $[M+Na]^+$ = m/z 272. Detecção: EM/IES⁺.

Figura 4.3. Espectro de massas padrão para o composto presente no pico 2. $[M+H]^+$ = m/z 252. $[M+Na]^+$ = m/z 274. Detecção: EM/IES⁺.

A determinação estrutural do composto originário da purificação do pico 1 por CLAE/UV foi feita por RMN de ¹³C (Figura 4.4) e por comparação com os valores

presentes na literatura (CANTIN *et al.*, 1999) para a *N*-(2-metil-3-oxodec-8-enoil)-2-pirrolina (**28**) (Tabela 4.1).

Figura 4.4. Espectro de RMN de ^{13}C ($\text{DMSO-}d_6$, 100 MHz) do composto isolado da purificação do pico 1 por CLAE/UV.

Tabela 4.1 - Valores de deslocamento químico (RMN de ^{13}C) da *N*-(2-metil-3-oxodec-8-enoil)-2-pirrolina (**28**) e do composto isolado da purificação do pico 1

Carbono	CANTIN <i>et al.</i> (1999)	Pico 1
	$^*\text{CDCl}_3$	$^*\text{DMSO}-d_6$
1	-	-
2	129,5 e 128,5	129,5
3	113,1 e 111,6	112,1
4	28,2	27,9
5	45,5	45,1
6	165,9	166,3
7	53,4	50,7
8	207,2	206,5
9	39,2	n.o.
10	23,1	22,7
11	29,0	28,4
12	32,3	31,9
13	131,0	131,2
14	125,2	124,7
15	17,9	17,9
16	13,2	12,8

*Solvente utilizado para a realização das análises por RMN de ^{13}C .

Figura 4.5. Estrutura química dos dihidropirrois **27** e **28**.

Uma vez determinadas as estruturas dos compostos presentes no extrato bruto como sendo os dihidropirrois **27** e **28**, foram realizados experimentos de incorporação em pequena escala com os precursores marcados listados na tabela 4.2.

Tabela 4.2 - Lista de precursores isotopicamente marcados e resultados dos experimentos de incorporação em pequena escala para os dihidropirrois **27** e **28**

Precursor	Resultado
[1- ¹³ C ₁]acetato de sódio	(+)
[1,2- ¹³ C ₂]acetato de sódio	(+)
[2,3- ¹³ C ₂]propionato de sódio	(-)
[<i>metil</i> - ¹³ C ₁]metionina	(+)
[U- ¹³ C ₅]ornitina	(+)
[U- ¹³ C ₆]lisina	(-)
[U- ¹³ C ₅]prolina	(-)

(+) Apresentou incorporação quando analisado por CLAE/UV/EM/IES.

(-) Não apresentou incorporação quando analisado por CLAE/UV/EM/IES.

Os experimentos realizados com adição dos precursores [2,3-¹³C₂]propionato de sódio, [U-¹³C₆]lisina e [U-¹³C₅]prolina, não levaram a modificações nos espectros

de EM/IES⁺ dos dihidropirrois **27** e **28** quando comparados com os espectros para os dihidropirrois padrão (sem incorporação). Portanto, os compostos **27** e **28** não apresentaram incorporação destes precursores. Já os experimentos com adição dos precursores [1-¹³C₁]acetato de sódio, [1,2-¹³C₂]acetato de sódio, [metil-¹³C₁]metionina e [U-¹³C₅]ornitina, levaram a mudanças significativas nos espectros de EM/IES⁺ dos dihidropirrois **27** e **28** e foram, portanto, selecionados para dar continuidade aos experimentos de incorporação em maior escala.

4.3.2. Experimentos de incorporação de [1-¹³C₁]acetato de sódio e [1,2-¹³C₂]acetato de sódio nos dihidropirrois **27** e **28**

Para se determinar a via biossintética de formação da cadeia lateral dos dihidropirrois **27** e **28** (em destaque na Figura 4.6), foram realizados experimentos de incorporação com [1-¹³C₁]acetato de sódio e [1,2-¹³C₂]acetato de sódio.

Figura 4.6. Cadeia lateral dos dihidropirrois **27** e **28**.

As análises por CLAE/UV/EM/IES indicaram a incorporação destes precursores através de um incremento na massa dos sinais dos íons [M+H]⁺ dos compostos **27** e **28**. Também foi possível observar um aumento significativo na intensidade dos sinais em [M+2]⁺, [M+3]⁺, [M+4]⁺, [M+5]⁺ e [M+6]⁺, de acordo com o padrão de incorporação de uma, duas, três, quatro ou cinco unidades de [1-¹³C₁]acetato de sódio nestes dois compostos.

Figura 4.7. Espectro de massas do dihidropirrol **28** isolado do experimento de fermentação de *P. citrinum* F53 com adição do precursor $[1-^{13}\text{C}_1]$ acetato de sódio. Detecção: EM/IES⁺.

Figura 4.8. Espectro de massas do dihidropirrol **27** isolado do experimento de fermentação de *P. citrinum* F53 com adição do precursor $[1-^{13}\text{C}_1]$ acetato de sódio. Detecção: EM/IES⁺.

O experimento de incorporação com adição de $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ acetato de sódio ao meio de cultura da linhagem *P. citrinum* F53 também apresentou um resultado positivo. Como pode ser observado no espectro de massas da figura 4.9, o composto **28** apresenta um sinal correspondente à molécula protonada $[\text{M}+\text{H}]^+$ em m/z 250 e também, mas de intensidades decrescentes, sinais em m/z 252 (resultante da incorporação de uma unidade de acetato duplamente marcada), em

m/z 254 (resultante da incorporação de duas unidades de acetato duplamente marcadas), em m/z 256 (três unidades de acetato duplamente marcadas), em m/z 258 (quatro unidades de acetato duplamente marcadas) e em m/z 260 (cinco unidades de acetato duplamente marcadas).

O mesmo resultado pode ser observado para o composto **27** (Figura 4.10).

Figura 4.9. Espectro de massas do dihidropirrol **28** isolado do experimento de fermentação de *P. citrinum* F53 com adição do precursor $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ acetato de sódio. Detecção: EM/IES⁺.

Figura 4.10. Espectro de massas do dihidropirrol **27** isolado do experimento de fermentação de *P. citrinum* F53 com adição do precursor $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ acetato de sódio. Detecção: EM/IES⁺.

Após o crescimento em maior escala e a purificação dos compostos de interesse, apenas o dihidropirrol majoritário **28** apresentou massa suficiente para a realização de análises por RMN de ^{13}C . A análise do espectro de RMN de ^{13}C do composto **28** marcado com $[1-^{13}\text{C}_1]$ acetato de sódio (Figura 4.11) e do composto **28** marcado com $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ acetato de sódio (Figura 4.12) indicaram os carbonos onde ocorreu a incorporação.

Figura 4.11. Espectro de RMN de ^{13}C ($\text{DMSO}-d_6$, 100 MHz) do dihidropirrol **28** enriquecido com $[1-^{13}\text{C}_1]$ acetato de sódio.

De acordo com o espectro de RMN de ^{13}C apresentado na figura 4.11, pode-se observar um aumento significativo na intensidade dos sinais C-6 (δ 166,3), C-8 (δ 206,5), C-10 (δ 22,7), C-12 (δ 31,9) e C-14 (δ 124,7), em um padrão correspondente à formação de uma cadeia policetídica derivada do acetato.

Já nos espectros de RMN de ^{13}C apresentados nas figuras 4.12 e 4.13, para o experimento de incorporação de $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ acetato de sódio, podemos observar um aumento na intensidade e na multiplicidade dos sinais dos carbonos C-6, C-7, C-8, C-10, C-11, C-12, C-13, C-14 e C-15.

Figura 4.12. Espectro de RMN de ^{13}C ($\text{DMSO-}d_6$, 100 MHz) do dihidropirrol **28** enriquecido com $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ acetato de sódio.

Figura 4.13. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C ($\text{DMSO-}d_6$, 100 MHz) do dihidropirrol **28** enriquecido com $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ acetato de sódio.

Na figura 4.13, além dos sinais originais dos carbonos C-10, C-11 e C-12, pode-se observar a presença de sinais múltiplos flanqueando estes carbonos. Estes sinais são chamados de satélites de acoplamento ^{13}C - ^{13}C , e são um fenômeno que ocorre quando um ^{13}C acopla mutuamente com um segundo ^{13}C adjacente.

4.3.3 Experimentos de incorporação de $[2,3\text{-}^{13}\text{C}_2]$ propionato de sódio e $[\text{metil-}^{13}\text{C}_1]$ metionina nos dihidropirróis **27** e **28**

Para se determinar a origem do substituinte metila presente nos dihidropirróis **27** e **28** (em destaque na Figura 4.14), foram realizados experimentos de incorporação de $[2,3\text{-}^{13}\text{C}_2]$ propionato de sódio e $[\text{metil-}^{13}\text{C}_1]$ metionina.

Figura 4.14. Substituinte metila presente nos dihidropirróis **27** e **28**.

Os experimentos de incorporação realizados com $[2,3\text{-}^{13}\text{C}_2]$ propionato de sódio não forneceram resultados positivos, uma vez que não se observou qualquer alteração nos espectros de massas dos dihidropirróis **27** e **28** após o experimento de fermentação. Já o experimento utilizando $[\text{metil-}^{13}\text{C}_1]$ metionina indicou claramente a incorporação deste precursor no composto **28**, como pode ser observado pelo aumento da intensidade do sinal da molécula protonada $[\text{M}+\text{H}]^+$ em m/z 251 no espectro de EM/IES⁺ do composto **28** (Figura 4.15). Resultados análogos foram observados para o composto **27** (Figura 4.16).

Figura 4.15. Espectro de massas do dihidropirrol **28** isolado do experimento de fermentação de *P. citrinum* F53 com adição do precursor [metil- $^{13}\text{C}_1$]metionina. Detecção: EM/IES $^+$.

Figura 4.16. Espectro de massas do dihidropirrol **27** isolado do experimento de fermentação de *P. citrinum* F53 com adição do precursor [metil- $^{13}\text{C}_1$]metionina. Detecção: EM/IES $^+$.

Após o crescimento em maior escala e a purificação dos compostos de interesse, apenas o dihidropirrol majoritário **28** foi submetido à análises por RMN de ^{13}C . O espectro de RMN de ^{13}C do composto **28** marcado com [metil- $^{13}\text{C}_1$]metionina (Figura 4.17) indica que o carbono que sofreu incorporação é o carbono do substituinte metila C-16.

Figura 4.17. Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz) do dihidropirrol **28** enriquecido com [metil- ^{13}C]metionina.

A incorporação de [metil- ^{13}C]metionina no substituinte metila do dihidropirrol **28** indica que este não é formado a partir de uma unidade iniciadora do tipo propionato.

Fungos filamentosos são capazes de crescer lentamente na presença de propionato, o qual é oxidado a acetilCoA através dos intermediários de reação propionilCoA, metilcitrato e piruvato. Estudos publicados na literatura, entretanto, determinaram que o propionato possui atividade anti-fúngica, causada pelo propionilCoA, que atua como um inibidor da enzima piruvato-desidrogenase (BROCK *et al.*, 2000; BROCK e BUCKEL, 2004). Ainda assim, a toxicidade do propionato não impede que fungos utilizem este precursor para a biossíntese de seus metabólitos secundários, como ocorre com a asteltoxina (**2**) (STEYN e VLEGGAAR, 1984) e com os compostos aurovertinas B (**3**) e D (**4**) (STEYN *et al.*, 1981).

Desta forma, a incorporação de propionato em **27** e **28** não poderia ser excluída, levando a duas vias distintas para a formação do substituinte metila na posição C-16. Na primeira hipótese, o substituinte metila dos dihidropirrols **27** e **28** seria formado pela C-metilação de uma unidade acetato. Na segunda hipótese, o substituinte metila seria originário do carbono C-3 de uma unidade propionato.

Os resultados obtidos a partir dos experimentos de incorporação de precursores isotopicamente marcados indicam que a primeira hipótese é a correta, sendo esta a mais amplamente observada durante a biossíntese de policetídeos por fungos.

4.3.4. Experimentos de incorporação de [U-¹³C₅]prolina, [U-¹³C₆]lisina e [U-¹³C₅]ornitina nos dihidropirrols **27** e **28**

Embora metabólitos secundários produzidos por micro-organismos e que apresentem anéis pirrol, dihidropirrol ou tetrahidropirrol em sua estrutura possam ser biossintetizados a partir dos mais diversos aminoácidos, observa-se o aminoácido prolina como sendo um dos mais comumente utilizados (CERDENO *et al.*, 2001; BURKE *et al.*, 2007; CLARK e MURPHY, 2009).

Apesar de uma revisão da literatura não apresentar estudos acerca da utilização de ornitina como um precursor, a prolina e a ornitina compartilham um precursor biossintético comum, o glutamato/ α -cetoglutarato no ciclo da ureia (McMURRY e BEGLEY, 2005). Alternativamente, a ornitina pode ser convertida em prolina em um único passo pela ação das ciclodeaminases (GOODMAN *et al.*, 2004). Desta forma, a possibilidade de utilização de ornitina para a formação de metabólitos secundários contendo anéis pirrol e derivados não pode ser descartada.

Para se determinar a origem biossintética do anel dihidropirrólico dos compostos **27** e **28** (em destaque na figura 4.18) foram realizados experimentos de incorporação com os resíduos de aminoácidos isotopicamente marcados: [U-¹³C₅]prolina, [U-¹³C₆]lisina e [U-¹³C₅]ornitina.

Figura 4.18. Anel dihidropirrólico presente nos compostos **27** e **28**.

Os experimentos de incorporação realizados com [U- $^{13}\text{C}_5$]prolina e [U- $^{13}\text{C}_6$]lisina não forneceram resultados positivos, uma vez que não se observou qualquer alteração nos espectros de massas dos dihidropirrolis **27** e **28** obtidos a partir dos experimentos realizados com estes precursores.

Já o experimento de fermentação de *P. citrinum* F53 em meio enriquecido com [U- $^{13}\text{C}_5$]ornitina forneceu, após EFS e purificação por CLAE/UV, os dihidropirrolis **27** e **28** com a incorporação do aminoácido marcado. Estes resultados podem ser observados nos espectros de massas das figuras 4.19 e 4.20.

Figura 4.19. Espectro de massas do dihidropirrol **28** isolado do experimento de fermentação de *P. citrinum* F53 com adição do precursor [U- $^{13}\text{C}_5$]ornitina. Detecção: EM/IES⁺.

Figura 4.20. Espectro de massas do dihidropirrol **27** isolado do experimento de fermentação de *P. citrinum* F53 com adição do precursor [U-¹³C₅]ornitina. Detecção: EM/IES⁺.

De acordo com a figura 4.19, observa-se que o espectro de massas do dihidropirrol **28**, oriundo do experimento de incorporação com [U-¹³C₅]ornitina, apresenta, além do sinal da molécula protonada [M+H]⁺ em *m/z* 250 (composto não marcado), um sinal em *m/z* 254, que indica a incorporação de uma unidade de [U-¹³C₅]ornitina que teria perdido o grupo ácido carboxílico (–¹³CO₂H). Resultados análogos foram obtidos para o dihidropirrol **27**.

O espectro de RMN de ¹³C do dihidropirrol **28** marcado com [U-¹³C₅]ornitina (Figuras 4.21 e 4.22) indica os carbonos onde ocorreu a incorporação.

Figura 4.21. Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz) do dihidropirrol **28** enriquecido com $[\text{U-}^{13}\text{C}_5]\text{ornitina}$.

Figura 4.22. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz) do dihidropirrol **28** enriquecido com $[\text{U-}^{13}\text{C}_5]\text{ornitina}$.

Nos espectros de RMN de ^{13}C apresentados nas figuras 4.21 e 4.22 para o experimento de incorporação de $[\text{U-}^{13}\text{C}_5]\text{ornitina}$, podemos observar um aumento na intensidade e na multiplicidade dos sinais dos carbonos C-2, C-3, C-4 e C-5, correspondentes aos carbonos do anel dihidropirrol. Novamente, o acoplamento mútuo de carbonos ^{13}C adjacentes explica o aparecimento de sinais múltiplos, os chamados satélites de acoplamento $^{13}\text{C-}^{13}\text{C}$, e indica a incorporação de unidades íntegras de $[\text{U-}^{13}\text{C}_5]\text{ornitina}$ nos dihidropirrols **27** e **28**.

4.3.5. Taxas de incorporação específicas de ^{13}C no dihidropirrol **28**

A partir das análises dos espectros RMN de ^{13}C (Anexo) foram calculadas as taxas de incorporação específicas de ^{13}C (tópico 3.9) para cada sinal de carbono do dihidropirrol majoritário **28** (Tabela 4.3)

Tabela 4.3 - Taxas de incorporação específicas (%) para cada sinal de carbono do dihidropirrol **28**

Posição	Carbono	Padrão	[1- ¹³ C ₁] AcONa	[1,2- ¹³ C ₂] AcONa	[<i>metil</i> - ¹³ C ₁] metionina	[U- ¹³ C ₅] ornitina
1	-	-	-	-	-	-
2	129,5	1,10	1,31	1,50	1,08	23,75
3	112,1	1,10	1,10	1,10	1,10	23,06
4	27,9	1,10	0,95	0,81	0,89	15,69
5	45,1	1,10	1,50	0,91	0,96	22,08
6	166,3	1,10	13,72	22,15	1,70	1,36
7	50,7	1,10	0,99	11,78	0,54	0,99
8	206,5	1,10	12,79	23,80	1,28	1,49
9	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
10	22,7	1,10	10,06	12,30	0,87	0,78
11	28,4	1,10	1,07	13,93	0,91	0,93
12	31,9	1,10	11,25	10,72	0,53	0,63
13	131,2	1,10	1,13	10,08	0,67	0,61
14	124,7	1,10	9,04	8,90	0,77	0,69
15	17,9	1,10	1,23	9,25	0,71	0,53
16	12,8	1,10	1,06	0,89	53,98	2,46

n.d. = não foi possível determinar o valor da integral.

Considerando-se os resultados obtidos a partir das análises por EM/IES⁺, por RMN de ¹³C e as taxas de incorporação específica para os experimentos de

incorporação com $[1-^{13}\text{C}_1]$ acetato de sódio, $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ acetato de sódio, $[\text{metil-}^{13}\text{C}_1]$ metionina e $[\text{U-}^{13}\text{C}_5]$ ornitina, propõe-se que a biossíntese do dihidropirrol **28** procede como indicado na figura 4.23.

Figura 4.23. Proposta de via biossintética de formação do dihidropirrol **28**.

Os resultados obtidos pelas análises de EM/IES⁺ demonstram que o dihidropirrol **27** apresentou os mesmos padrões de incorporação do dihidropirrol **28** e, portanto, consideramos que ambos os compostos são formados a partir da mesma rota de biossíntese.

Apesar de produtos naturais contendo anéis pirrol e derivados serem comuns na natureza, compostos que apresentam anéis dihidropirrol são extremamente raros em fungos. Os únicos exemplos encontrados na literatura incluem o peptídeo brevigelina (**36**), produzido por uma linhagem do fungo *P. brevicompactum* (McCORKINDALE e BAXTER, 1981), o pigmento **37**, produzido por uma linhagem do fungo *P. marneffe* (BHARDWAJ *et al.*, 2007) e os dihidropirrois **27** e **28**, os quais tiveram sua biossíntese elucidada neste trabalho.

Figura 4.24. Estrutura química da brevigelina (36) e do pigmento 37.

4.4 Biossíntese de citrinalinas por *P. citrinum*

4.4.1. Condições ótimas para a produção de citrinalinas

As condições ótimas de cultura para a produção de citrinalinas pela linhagem *P. citrinum* F53 (descritas no tópico 3.2) possibilitaram a obtenção de extratos brutos que, após um fracionamento por EFS, apresentaram dois perfis cromatográficos gerais, de acordo com cada meio de cultura utilizado, listados nas tabelas 3.2 e 3.3.

Figura 4.25. Cromatograma padrão da fração 3 (F3) obtida da EFS do meio de cultura da linhagem *P. citrinum* F53 fermentada em meio MFA1. Condições de análise: coluna C₁₈ Waters® XTerra MS (dimensões 2,1 x 50 mm, 3,5 µm), gradiente de eluição (H₂O/MeOH/MeCN), fluxo de 0,5 mL/min, detecção EM/IES⁺.

Figura 4.26. Cromatograma padrão da fração 3 (F3) obtida da EFS do meio de cultura da linhagem *P. citrinum* F53 fermentada em meio MFA2. Condições de análise: coluna C₁₈ Waters® XTerra MS (dimensões 2,1 x 50 mm, 3,5 µm), gradiente de eluição (H₂O/MeOH/MeCN), fluxo de 0,5 mL/min, detecção EM/IES⁺.

A partir de 140 mg do extrato bruto obtido após a fermentação da linhagem *P. citrinum* F53 crescida em meio MFA1, foram obtidas aproximadamente 2,7 mg, 1 mg e 2 mg dos compostos puros representados pelos picos 1, 2 e 4, cujos espectros EM/IES⁺ estão ilustrados nas figuras 4.27 (pico 1), 4.28 (pico 2) e 4.29 (picos 3 e 4).

Figura 4.27. Espectro de massas padrão para o composto correspondente ao pico 1 do cromatograma da figura 4.25. $[M+H]^+ = m/z$ 470. Detecção: EM/IES⁺.

Figura 4.28. Espectro de massas padrão para o composto correspondente ao pico 2 do cromatograma da figura 4.25. $[M+H]^+ = m/z$ 450. Detecção: EM/IES⁺.

Figura 4.29. Espectro de massas padrão para os compostos correspondentes aos picos 3 e 4 do cromatograma da figura 4.25. $[M+H]^+ = m/z$ 454. Detecção: EM/IES⁺.

Os compostos representados pelos picos 3 e 4 nas figuras 4.25 e 4.26 apresentaram o mesmo espectro de EM/IES⁺, mas tempos de retenção (t_R) ligeiramente distintos, propriedades que podem ser atribuídas a compostos isoméricos.

A determinação estrutural do composto correspondente ao pico 4, do qual se obteve uma maior quantidade de massa em relação ao composto correspondente ao pico 3, foi feita por RMN de ^{13}C (Figura 4.30), por RMN bidimensionais (Anexo) e por comparação com os valores presentes na literatura (PIMENTA *et al.*, 2010) para as citrinalinas A (**34**) e B (**35**) (Tabela 4.4).

Figura 4.30. Espectro de RMN de ^{13}C (MeOH- d_4 , 150 MHz) do composto isolado a partir da purificação do pico 4 por CLAE/UV do cromatograma da figura 4.25.

Tabela 4.4 - Valores de deslocamento químico (RMN de ^{13}C) das citrinalinas A (**34**) e B (**35**) e do composto representado pelo pico 4

Carbono	PIMENTA <i>et al.</i> (2010) Citrinalina A *DMSO - d_6	PIMENTA <i>et al.</i> (2010) Citrinalina B *DMSO- d_6	Pico 4 *MeOH- d_4
1	57,5	58,3	60,6
2	182,9	182,4	184,1
3	-	-	-
4	79,3	79,2	80,9
5	48,0	48,0	n.o.
6	192,6	192,6	195,0
7	105,2	104,9	107,0
8	158,8	158,7	161,5
9	109,6	108,8	111,3
10	132,4	132,7	134,0
11	120,9	119,5	120,3
12	142,6	142,8	144,6
13	46,1	48,7	n.o.
14	45,8	43,9	47,1
15	19,8	26,8	25,9
16	61,1	61,3	66,2
17	26,1	30,9	30,1
18	20,0	20,8	21,0
19	55,5	52,9	55,2

Continuação Tabela 4.4 -

Carbono	PIMENTA <i>et al.</i> (2010) Citrinalina A *DMSO -<i>d</i>₆	PIMENTA <i>et al.</i> (2010) Citrinalina B *DMSO-<i>d</i>₆	Pico 4 *MeOH-<i>d</i>₄
20	-	-	-
21	55,4	64,1	61,3
22	92,4	94,6	93,9
23	41,0	41,3	42,7
24	25,8	26,0	27,0
25	26,5	26,3	26,9
26	20,3	22,7	23,0
27	23,4	22,9	22,9

*Solvente utilizado para a realização das análises por RMN de ¹³C. n.o. = não observado.

A partir das análises de RMN de ¹³C e da análise do espectro de tROESY (Anexo), determinou-se que o composto oriundo da purificação do pico 4 do cromatograma da figura 4.25 é a citrinalina B (**35**), e que o composto presente no pico 3, de mesma massa, mas de tempo de retenção distinto, é o seu estereoisômero, a citrinalina A (**34**).

Figura 4.31. Estrutura química das citrinalinas A (34) e B (35).

As condições de fermentação utilizando os meios de cultura alternativos MFA1 e MFA2 levaram ainda à formação de dois novos compostos derivados da citrinalina B (35), com picos para as moléculas protonadas $[M+H]^+$ em m/z 450 (Figura 4.28) e m/z 470 (Figura 4.27). Estes compostos tiveram sua estrutura determinada a partir da análise dos seus dados espectroscópicos.

4.4.2 Determinação estrutural dos novos derivados de citrinalina

4.4.2.1. Determinação estrutural do composto de m/z 450

A fermentação da linhagem *P. citrinum* F53 em meio de cultura MFA1 levou à formação de um novo composto que, após purificação por CLAE/UV, apresentou um espectro de EM/IES⁺ com pico para a molécula protonada $[M+H]^+$ em m/z 450 (Figura 4.28), correspondente a uma massa molecular de 449 Da. Este composto teve sua estrutura determinada por RMN de ¹H (Anexo), RMN de ¹³C (Figura 4.32) e RMN bidimensionais (Anexo).

Figura 4.32. Espectro de RMN de ^{13}C (Acetona- d_6 , 150 MHz) do composto isolado da purificação do pico 2 (composto **38**) por CLAE/UV do cromatograma da figura 4.25.

Tabela 4.5 - Valores de deslocamento químico (RMN de ^{13}C , ^{15}N e ^1H) para o composto isolado da purificação do pico 2 (composto **38**)

Posição	$\delta^{13}\text{C} / ^{15}\text{N}$	$\delta \text{H mult (J em Hz)}$
1	62,5	
2	183,0	
3-NH	- 246,3	9,48 (bs)
4	80,1	
5	48,9	2,81 (d, 16,8 Hz) / 2,76 (d, 16,8 Hz)
6	194,0	
7	105,9	
8	160,5	

Continuação Tabela 4.5 -

Posição	$\delta^{13}\text{C} / ^{15}\text{N}$	$\delta \text{H mult (J em Hz)}$
9	110,0	6,56 (d, 8,4 Hz)
10	133,4	7,49 (d, 8,4 Hz)
11	121,6	
12	143,9	
13	47,5	
14	48,5	3,46 (t, 8,5 Hz)
15	28,5	2,50 (dd, 8,5 e 13,4 Hz) / 1,93 (dd, 8,5 e 13,4 Hz)
16	72,3	
17	25,9	2,80 / 1,83 (m)
18	23,0	2,15 (m)
19	54,1	3,84 (m) / 2,75
20-NH	- 311,5	
21	62,7	4,01 (bd, 9,6 Hz) / 3,22 (bd, 9,6 Hz)
22	62,6	8,18 (bs)
23	39,0	2,53 (d, 15,6 Hz) / 2,40 (d, 15,6 Hz)
24	26,5	1,45 (s)
25	26,7	1,48 (s)
26	20,6	1,09 (s)
27	22,7	0,78 (s)
28	168,3	
28-NH	- 249,9	8,18 (s)

Pelas análises de RMN de ^{13}C e ^{15}N realizadas para o composto **38**, não foi possível observar o C-22 ($\delta \sim 93$) funcionalizado com um grupo nitro e nem o metino C-16 ($\delta \sim 61$), presentes nas citrinalinas A (**34**) e B (**35**). Observou-se, entretanto, um sinal para uma carbonila adicional em $\delta 168,3$ no espectro de RMN de ^{13}C e um NH de amida em $\delta -249,9$ no espectro de gHMBC ^1H - ^{15}N (Anexo). As correlações presentes no gHMBC (Anexo) entre a carbonila em $\delta 168,3$ e os átomos de hidrogênio do C-15 ($\delta 1,93$ e $\delta 2,50$), bem como as correlações do carbono quaternário N-substituído em $\delta 72,3$ com os átomos de hidrogênio do C-17 ($\delta 1,83$ e $\delta 2,80$) possibilitaram atribuir o substituinte carbonila em C-16.

A correlação $g^{15}\text{NlrHMQC}$ (Anexo) entre o H-23b ($\delta 2,53$) e o nitrogênio da amida em $\delta -249,9$ confirma a formação de uma ponte amida entre os carbonos C-16 e C-22, levando à estrutura representada na figura 4.33.

Figura 4.33. Estrutura química do composto **38**.

4.4.2.2. Determinação estrutural do composto de m/z 470

A primeira hipótese proposta para a estrutura do composto de m/z 470 (Figura 4.27) foi feita com base na diferença de massa entre a citrinalina B (**35**), que possui massa molecular de 453 Da, e o composto de m/z 470, que possui massa molecular

de 469 Da. A diferença de 16 Da sugere a inclusão de um átomo de oxigênio na molécula.

A análise dos espectros de RMN de ^{13}C (Figura 4.34) e de RMN bidimensionais (Anexo) corroborou esta hipótese, além de indicar a posição correta do substituinte hidroxila no composto de m/z 470, chamado de 17-hidroxycitralina B (**39**).

Figura 4.34. Espectro de RMN de ^{13}C (MeOH- d_4 , 150 MHz) do composto isolado da purificação do pico 1 (composto **39**) por CLAE/UV do cromatograma da figura 4.25.

Tabela 4.6 - Valores de deslocamento químico (RMN de ^{13}C) para a citrinalina B (**35**) e para o composto isolado da purificação do pico 1 (composto **39**)

Carbono	Citrinalina B (35)	Composto 39
	*MeOH- d_4	*MeOH- d_4
1	60,6	60,6
2	184,1	184,2
3	-	-
4	80,9	80,9
5	n.o.	n.o.
6	195,0	195,0
7	107,0	107,0
8	161,5	161,5
9	111,3	111,3
10	134,0	133,9
11	120,3	120,2
12	144,6	144,6
13	n.o.	51,0
14	47,1	45,9
15	25,9	20,0
16	66,2	69,4
17	30,1	70,1
18	21,0	32,5
19	55,2	54,2
20	-	-

Continuação Tabela 4.6 -

Carbono	Citrinalina B (35)	Composto 39
21	61,3	61,0
22	93,9	93,7
23	42,7	43,2
24	27,0	27,0
25	26,9	26,9
26	23,0	23,0
27	22,9	23,0

*Solvente utilizado para a realização das análises por RMN de ^{13}C . n.o. = não observado.

A análise dos espectros de RMN obtidos para a 17-hidroxicitrinalina B (**39**) indicam uma alteração no deslocamento químico dos sinais dos carbonos C-16, C-17, C-18 e C-19, dos quais o C-17 apresentou a alteração mais significativa. O carbono C-17 da citrinalina B (**35**) possui um deslocamento químico em cerca de δ 30,1 (Figura 4.30). Entretanto, no espectro de RMN da figura 4.34, o carbono C-17 tem um deslocamento químico de δ 70,1. Ainda, a correlação entre um hidrogênio metínico em δ 4,47 e um carbono oximetínico em δ 70,1 presente no gHSQC (Anexo), indica a hidroxilação do carbono C-17 (Figura 4.35).

Figura 4.35. Estrutura química da 17-hidroxicitrinalina B (39).

A presença do grupo hidroxila na 17-hidroxicitrinalina B (39) é incomum. Existem apenas alguns exemplos de compostos que apresentam esta estrutura, como é o caso do aminoácido 4*R*,5*R*-dihidroxi-L-ornitina presente nas equinocandinas, uma família de lipohexapeptídeos cíclicos produzidos por fungos filamentosos. Estes lipohexapeptídeos são biossintetizados por peptídeos-sintase não-ribossomais (NRPS) e têm um mecanismo único de ação anti-fúngica, atuando como inibidores não-competitivos do complexo enzimático β -1,3-glucana sintase, que produz componentes da parede celular dos fungos (EMRI *et al.*, 2013).

Figura 4.36. Estrutura química da equinocandina B (40).

4.4.3. Experimentos de incorporação em pequena escala nas citrinalinas **35** e **39**

Uma vez determinadas as estruturas dos alcaloides citrinalina B (**35**) e 17-hidroxicitrinalina B (**39**), foram realizados experimentos de incorporação em pequena escala com os precursores listados na tabela 4.7.

Tabela 4.7 - Lista de precursores isotopicamente marcados e resultados dos experimentos de incorporação em pequena escala para as citrinalinas **35** e **39**

Precursor	Resultado
[1,2- ¹³ C ₂]acetato de sódio	(-)
[1- ¹³ C ₁]glicose	(+)
[U- ¹³ C ₅]ornitina	(+)
[U- ¹³ C ₅]prolina	(+)
[2-indol- ¹³ C ₁]triptofano	(-)
[U- ¹³ C ₆]ácido antranílico	(+)

(+) Apresentou incorporação quando analisado por CLAE/UV/EM/IES.

(-) Não apresentou incorporação quando analisado por CLAE/UV/EM/IES.

Os experimentos de fermentação de *P. citrinum* F53 realizados com adição dos precursores [1,2-¹³C₂]acetato de sódio e [2-indol-¹³C₁]triptofano não levaram a modificações nos espectros de EM/IES⁺ das citrinalinas **35** e **39** quando comparados com os espectros para as citrinalinas padrão (sem incorporação). Já os experimentos com adição dos precursores [1-¹³C₁]glicose, [U-¹³C₅]prolina, [U-¹³C₅]ornitina e [U-¹³C₆]ácido antranílico levaram a mudanças significativas nos espectros de EM/IES⁺ das citrinalinas **35** e **39** e foram, portanto, selecionados para dar continuidade aos experimentos de incorporação em maior escala.

4.4.4. Experimentos de incorporação de [U-¹³C₅]prolina e [U-¹³C₅]ornitina nas citrinalinas 35 e 39

Para se determinar a origem biossintética do anel tetrahidropirrol da citrinalina B (**35**) e da 17-hidroxicitrinalina B (**39**) (em destaque na Figura 4.37), foram realizados experimentos de incorporação com os aminoácidos isotopicamente marcados [U-¹³C₅]prolina e [U-¹³C₅]ornitina.

Figura 4.37. Anel tetrahidropirrol presente na citrinalina B (**35**) e na 17-hidroxicitrinalina B (**39**).

Os experimentos de incorporação realizados com [U-¹³C₅]prolina indicaram a incorporação deste aminoácido nas citrinalinas **35** e **39** (Figuras 4.38 e 4.39). Já o experimento de fermentação de *P. citrinum* F53 em meio de cultura enriquecido com [U-¹³C₅]ornitina também resultou em uma alta taxa de incorporação na citrinalina B (**35**) e na 17-hidroxicitrinalina B (**39**) (Figuras 4.40 e 4.41).

Figura 4.38. Espectro de massas da citrinalina B (**35**) isolada do experimento de fermentação de *P. citrinum* F53 com adição do precursor [U-¹³C₅]prolina. Detecção: EM/IES⁺.

Figura 4.39. Espectro de massas da 17-hidroxycitrinalina B (**39**) isolada do experimento de fermentação de *P. citrinum* F53 com adição do precursor [U-¹³C₅]prolina. Detecção: EM/IES⁺.

Figura 4.40. Espectro de massas da citrinalina B (**35**) isolada do experimento de fermentação de *P. citrinum* F53 com adição do precursor [U-¹³C₅]ornitina. Detecção: EM/IES⁺.

Figura 4.41. Espectro de massas da 17-hidroxycitrinalina B (**39**) isolada do experimento de fermentação de *P. citrinum* F53 com adição do precursor [U-¹³C₅]ornitina. Detecção: EM/IES⁺.

Os espectros de massas obtidos para a citrinalina B (**35**) enriquecida com [U-¹³C₅]prolina (Figura 4.38) e com [U-¹³C₅]ornitina (Figura 4.40) apresentam um sinal para a molécula protonada [M+H]⁺ em *m/z* 454 e um sinal [M+H]⁺ em *m/z* 458, que indica a incorporação de unidades de [U-¹³C₅]prolina e/ou [U-¹³C₅]ornitina que teriam perdido o grupo ácido (–¹³CO₂H). O mesmo padrão de incorporação pode ser observado para a 17-hidroxycitrinalina B (**39**).

Os resultados obtidos pela análise dos espectros de EM/IES⁺ indicam que, quando em meio de cultura pobre em nutrientes, a linhagem *P. citrinum* F53 pode utilizar os aminoácidos prolina e ornitina alternativamente na via de biossíntese das citrinalinas.

A prolina e a ornitina compartilham um precursor biossintético comum, o glutamato/α-cetoglutarato no ciclo da ureia (Figura 4.42). A prolina é frequentemente considerada como o precursor inicial em estudos sobre biossíntese de anéis pirrol e derivados, sendo formada a partir da redução do glutamato à semialdeído, seguido de ciclização espontânea e redução (McMURRY e BEGLEY, 2005).

Figura 4.42. Formação de prolina e ornitina a partir do ciclo da ureia (McMURRY e BEGLEY, 2005).

Embora o glutamato, o intermediário entre a prolina e a ornitina, tenha sido considerado como o ponto de ramificação de aminoácidos entre o metabolismo primário e o secundário, estudos recentes confirmaram que é a ornitina que atua como ponto de ramificação para o metabolismo secundário (NEUMANN *et al.*, 2012). Desta forma, utilizou-se o aminoácido isotopicamente marcado [U-¹³C₅]ornitina para dar continuidade ao estudo da via de biossíntese das citrinalinas. Vale ressaltar ainda que a ornitina nunca foi observada, ou mesmo proposta, como um precursor na biossíntese de alcaloides prenizados de origem fúngica.

As análises por RMN de ¹³C realizadas para a 17-hidroxicitrinalina B (**39**) (Figuras 4.43 e 4.44), da qual se obteve uma maior quantidade de massa, indicaram a posição dos carbonos que sofreram a incorporação do aminoácido marcado [U-¹³C₅]ornitina.

Figura 4.43. Espectro de RMN de ^{13}C (MeOH- d_4 , 150 MHz) da 17-hidroxicitrinalina B (39) enriquecida com $[\text{U-}^{13}\text{C}_5]\text{ornitina}$.

Figura 4.44. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (MeOH- d_4 , 150 MHz) da 17-hidroxicitrinalina B (39) enriquecida com $[\text{U-}^{13}\text{C}_5]\text{ornitina}$.

O espectro de RMN de ^{13}C da 17-hidroxicitrinalina B (**39**) (Figuras 4.43), obtida a partir do experimento de incorporação com ornitina marcada, indica uma alteração na intensidade dos sinais em C-16, C-17, C-18 e C-19, correspondentes aos carbonos do anel tetrahidropirrol, quando comparados aos sinais no espectro de RMN de ^{13}C obtido para a 17-hidroxicitrinalina B (**39**) contendo apenas a abundância natural de ^{13}C (Figura 4.34). Além disso, observa-se também a presença de sinais satélites de acoplamento ^{13}C - ^{13}C , que indicam a incorporação de unidades íntegras de ornitina na 17-hidroxicitrinalina B (**39**).

4.4.5. Experimentos de incorporação de $[1,2\text{-}^{13}\text{C}_2]$ acetato de sódio e $[1\text{-}^{13}\text{C}_1]$ glicose nas citrinalinas **35** e **39**

Considerando-se que os experimentos realizados com $[1,2\text{-}^{13}\text{C}_2]$ acetato de sódio apresentaram resultados negativos, foram realizados testes adicionais de incorporação com glicose isotopicamente marcada ($[1\text{-}^{13}\text{C}_1]$ glicose) para se determinar a via biossintética de formação das unidades isopreno presentes nas citrinalinas **35** e **39** (em destaque na Figura 4.45).

Figura 4.45. Unidades isopreno presentes nas citrinalinas **35** e **39**.

A análise dos espectros de massas obtidos para o experimento de fermentação de *P. citrinum* F53 em meio enriquecido com $[1-^{13}\text{C}_1]\text{glicose}$ indicou a incorporação deste precursor nos alcaloides citrinalina B (**35**) e 17-hidroxicitrinalina B (**39**), como pode ser observado nas figuras 4.46 e 4.47.

Figura 4.46. Espectro de massas da citrinalina B (**35**) isolada do experimento de fermentação de *P. citrinum* F53 com adição do precursor $[1-^{13}\text{C}_1]\text{glicose}$. Detecção: EM/IES⁺.

Figura 4.47. Espectro de massas da 17-hidroxicitrinalina B (**39**) isolada do experimento de fermentação de *P. citrinum* F53 com adição do precursor $[1-^{13}\text{C}_1]\text{glicose}$. Detecção: EM/IES⁺.

O espectro de massas da citrinalina B (**35**) (Figura 4.46), oriunda do experimento de incorporação com $[1-^{13}\text{C}_1]\text{glicose}$, apresenta, além do sinal padrão $[\text{M}+\text{H}]^+$ em m/z 454, pelo menos três sinais adicionais em m/z 455, 456 e 457, que indicam a incorporação de carbonos ^{13}C oriundos da $[1-^{13}\text{C}_1]\text{glicose}$ em pelo menos 3 posições distintas. O mesmo padrão de incorporação pode ser observado para a 17-hidroxycitrinalina B (**39**) (Figura 4.47).

Após a purificação por CLAE/UV, foram realizadas análises de RMN de ^{13}C para a 17-hidroxycitrinalina B (**39**) (Figura 4.48).

Figura 4.48. Espectro de RMN de ^{13}C (MeOH- d_4 , 150 MHz) da 17-hidroxycitrinalina B (**39**) enriquecida com $[1-^{13}\text{C}_1]\text{glicose}$.

O espectro de RMN de ^{13}C da figura 4.48, obtido para a 17-hidroxycitrinalina B (**39**) a partir de experimentos de incorporação com $[1-^{13}\text{C}_1]\text{glicose}$, demonstra um aumento na intensidade dos sinais dos carbonos C-14, C-24, C-25, C-26 e C-27; quando comparados aos sinais no espectro de RMN de ^{13}C obtido para a 17-hidroxycitrinalina B (**39**) contendo apenas a abundância natural de ^{13}C (Figura 4.34).

O padrão de incorporação de ^{13}C oriundos do carbono 1 da $[1-^{13}\text{C}_1]\text{glicose}$ observado para a unidade isopreno contendo os carbonos C-14, C-26 e C-27, indica que as unidades isopreno são formadas via mevalonato, de acordo com o padrão de incorporação apresentado na figura 4.49.

Figura 4.49. Padrão esperado de incorporação de ^{13}C em unidades isopreno.

A análise por RMN de ^{13}C também indica um aumento na intensidade do sinal do carbono aromático C-10, quando comparado ao espectro de RMN de ^{13}C padrão, indicando que houve incorporação de uma unidade de carbono ^{13}C oriundo da $[1-$

$^{13}\text{C}_1$]glicose no anel aromático. A incorporação de ^{13}C observada no C-10 pode ser explicada pela utilização de uma unidade de fosfoenolpiruvato, produzido na via glicolítica, ou de uma unidade de eritrose-4-fosfato, formada na via das pentoses, ambas biossintetizadas a partir da $[1-^{13}\text{C}_1]$ glicose. A combinação destas duas vias produz o ácido chiquímico, que é um precursor natural do triptofano (Figura 4.50).

Figura 4.50. Formação do ácido chiquímico através da glicose.

A incorporação significativa de $[1-^{13}\text{C}_1]$ glicose no C-23 pode ser explicada através da via de formação do triptofano (Figura 1.15), que se dá a partir da

condensação entre o indol e um resíduo de serina, a qual também é biossintetizada a partir de glicose (McMURRY e BEGLEY, 2005).

Figura 4.51. Formação de serina através da glicose (McMURRY e BEGLEY, 2005).

4.4.6. Experimentos de incorporação de [indol-2-¹³C₁]triptofano e [U-¹³C₆]ácido antranílico nas citrinalinas 35 e 39

Para se determinar a origem biossintética do fragmento oxindólico e sua cadeia contendo o grupo nitro (em destaque na figura 4.52), foram realizados

experimentos de incorporação de resíduos de aminoácidos [indol-2- $^{13}\text{C}_1$]triptofano e [U- $^{13}\text{C}_6$]ácido antranílico em culturas da linhagem *P. citrinum* F53.

Figura 4.52. Fragmento oxindólico presente na estrutura das citrinalinas **35** e **39**.

Os experimentos realizados com [indol-2- $^{13}\text{C}_1$]triptofano não levaram à incorporação deste aminoácido nas citrinalinas. Foi então testada a incorporação de [U- $^{13}\text{C}_6$]ácido antranílico, que é o precursor natural do triptofano pela via do ácido chiquímico. Os experimentos de incorporação de [U- $^{13}\text{C}_6$]ácido antranílico, por sua vez, geraram resultados positivos, como pode ser observado nas figuras 4.53 e 4.54.

Figura 4.53. Espectro de massas da citrinalina B (**35**) isolada do experimento de fermentação de *P. citrinum* F53 com adição do precursor [U- $^{13}\text{C}_6$]ácido antranílico. Detecção: EM/IES⁺.

Figura 4.54. Espectro de massas da 17-hidroxycitralinalina B (**39**) isolada do experimento de fermentação de *P. citrinum* F53 com adição do precursor [U- $^{13}\text{C}_6$]ácido antranílico. Detecção: EM/IES $^+$.

Na figura 4.53 pode-se observar que o espectro de massas da citralinalina B (**35**), oriunda do experimento de incorporação realizado com [U- $^{13}\text{C}_6$]ácido antranílico, apresenta, além do sinal $[\text{M}+\text{H}]^+$ em m/z 454, pelo menos seis sinais adicionais (m/z 455, 456, 457, 458, 459 e 460), indicando a incorporação de pelo menos uma unidade de [U- $^{13}\text{C}_6$]ácido antranílico na molécula. Um padrão análogo de incorporação pode ser observado para a 17-hidroxycitralinalina B (**39**) (Figura 4.54).

O espectro de RMN de ^{13}C da figura 4.55, obtido para a 17-hidroxycitralinalina B (**39**) a partir do experimento de incorporação com [U- $^{13}\text{C}_6$]ácido antranílico, mostra principalmente um aumento na intensidade dos sinais dos carbonos aromáticos C-9 e C-10, quando comparados ao espectro de RMN de ^{13}C obtido para a 17-hidroxycitralinalina B (**39**) padrão (Figura 4.34). Este resultado é indicativo da utilização de triptofano na biossíntese das citralinalinas **35** e **39**, a partir de sua formação via ácido antranílico (Figura 1.15).

Figura 4.55. Espectro de RMN de ^{13}C (MeOH- d_4 , 150 MHz) da 17-hidroxicitrinalina B (39) enriquecida com $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$ ácido antranílico.

Figura 4.56. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (MeOH- d_4 , 150 MHz) da 17-hidroxicitrinalina B (39) enriquecida com $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$ ácido antranílico.

O aumento na intensidade dos sinais dos carbonos C-24/25 e C-26/27, correspondentes às metilas, e dos carbonos C-16 e C-17, correspondentes ao anel tetrahidropirrol, pode ser explicado pela via de catabolismo do ácido antranílico, que é degradado em acetilCoA (Figura 4.57). Uma vez presente no meio celular, o acetilCoA pode ser transformado em isopreno, ou reincorporado ao ciclo do ácido cítrico, que é, por sua vez, a via de formação da ornitina (McMURRY e BEGLEY, 2005).

Figura 4.57. Catabolismo de ácido antranílico em fungos pela via do β-cetoadipato (HARWOOD e PARALES, 1996).

4.4.7. Taxas de incorporação específicas de ^{13}C na 17-hidroxicitrinalina B (39)

A partir das análises de RMN de ^{13}C dos compostos obtidos através dos experimentos de incorporação com $[\text{U-}^{13}\text{C}_5]$ ornitina, $[1\text{-}^{13}\text{C}_1]$ glicose e $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$ ácido

antranílico, foram calculadas as taxas de incorporação específica de ^{13}C (tópico 3.9) para cada carbono da 17-hidroxycitrinalina B (39).

Tabela 4.8 - Taxas de incorporação específica (%) para cada sinal de carbono da 17-hidroxycitrinalina B (39)

Posição	Carbono	Padrão	[1- $^{13}\text{C}_1$] glicose	[U- $^{13}\text{C}_5$] ornitina	[U- $^{13}\text{C}_6$] ácido antra.
1	60,6	-	n.d.	n.d.	n.d.
2	18,2	1,10	1,10	1,10	1,10
3	-	-	-	-	-
4	80,9	1,10	3,46	3,35	3,98
5	49,0	1,10	n.o.	n.o.	n.o.
6	195,0	1,10	1,24	1,87	2,84
7	107,0	1,10	1,35	1,47	2,36
8	161,5	1,10	0,93	1,22	2,26
9	111,3	1,10	1,66	1,38	4,99
10	133,9	1,10	7,79	1,28	5,85
11	120,2	1,10	1,19	1,40	2,51
12	144,6	1,10	4,56	1,15	3,24
13	51,0	-	8,60	7,42	8,22
14	45,9	1,10	13,82	2,60	3,80
15	20,0	-	6,58	2,72	5,48
16	69,4	1,10	9,47	87,25	16,43
17	70,1	1,10	6,90	74,39	12,35

Continuação Tabela 4.8 -

Posição	Carbono	Padrão	[1- ¹³ C ₁] glicose	[U- ¹³ C ₅] ornitina	[U- ¹³ C ₆] ácido antra.
18	32,5	1,10	10,95	73,58	4,91
19	54,2	1,10	4,70	90	6,90
20	-	-	-	-	-
21	61,0	1,10	16,94	7,46	2,79
22	93,7	1,10	2,09	2,27	n.o.
23	43,2	1,10	14,99	3,14	3,44
24	27,0	1,10	9,92	2,90	4,04
25	26,9	1,10	9,42	2,30	3,74
26	23,0	1,10	16,94	2,40	6,02
27	23,0	1,10	16,94	1,96	6,02

n.d. = não definido. n.o. = não observado.

Os resultados obtidos indicam que as citrinalinas têm como precursores a ornitina, o triptofano (via ácido antranílico), e o pirofostato de isopentenila/pirofosfato de dimetilalila a partir da glicose (via mevalonato).

Uma revisão da literatura sobre estudos de biossíntese realizados para compostos da classe dos alcaloides indólicos prenilados mostra que sua biossíntese procede através de algumas etapas gerais, exemplificadas na figura 4.58. Considerando-se a rota de biossíntese da brevianamida F (**41**), notoamidas S (**42**) e T (**43**), até a stefacidina A (**44**), temos a condensação inicial dos resíduos de aminoácidos, seguido de uma hidroxilação, uma prenilação direta e uma prenilação reversa. A partir daí ocorre à redução e enolização da dicetopiperazina, seguido de uma reação Diels-Alder intramolecular e formação do anel pirano (BIRCH e WRIGHT, 1969 e 1970; BIRCH e RUSSELL, 1972; DING *et al.*, 2010).

Figura 4.58. Via biossintética de formação da brevianamida F (41), notoamida S (42), notoamida T (43) e stefacidina A (44).

Desta forma, considerando as análises por EM/IES⁺ e por RMN de ¹³C para a 17-hidroxicitrinalina B (39) a partir dos experimentos de incorporação, propõe-se que a biossíntese da citrinalina B (35) e da 17-hidroxicitrinalina B (39) procede através da via geral indicada na figura 4.59.

Figura 4.59. Proposta de via biossintética de formação da citrinalina B (35) e da 17-hidroxycitrinalina B (39).

Na figura 4.59 podemos observar as etapas de biossíntese que levam à formação das citrinalinas. Primeiramente, propõe-se que uma NRPS bimodular catalise a condensação dos precursores ornitina e triptofano. Na etapa **B** observa-se uma hidroxilação, seguida de prenilação (**C**). Na etapa **D** ocorre a formação do anel pirano, seguida da reação Diels-Alder intramolecular (**E**) para formar a ponte amida. As etapas de oxidação (**F**) e de rearranjo pinacol (**G**) levam a formação do intermediário **38**. Finalmente, as etapas de hidrólise da lactama, descarboxilação e oxidação do grupo amino a grupo nitro (**H**) produzem as citrinalinas A (**34**), B (**35**) e a 17-hidroxicitrinalina B (**39**).

O isolamento do intermediário **38**, de citrinalina B (**35**) e de 17-hidroxicitrinalina B (**39**), é o primeiro exemplo de produção concomitante destes alcaloides biossinteticamente relacionados, e proporciona uma evidência experimental de que o esqueleto biciclo[2.2.2]diazaoctano é um intermediário avançado na biossíntese de citrinalinas. Além disso, a reação Diels-Alder intramolecular, o rearranjo pinacol, e a formação e oxidação do anel pirano devem ocorrer antes da hidrólise da ponte amida, seguida de descarboxilação e oxidação do grupo amino para o grupo nitro, como proposto para o composto estruturalmente relacionado citrinadina B (**33**) (MUGISHIMA *et al.*, 2005; FINEFIELD *et al.*, 2012).

4.5. Biossíntese de alcaloides por *P. oxalicum*

4.5.1. Condições ótimas de cultura

As condições ótimas de cultura para produção de metabólitos pela linhagem *P. oxalicum* F30 (descritas no tópico 3.2) levaram à produção de extratos brutos que, após uma purificação preliminar por EFS, forneceram frações metanólicas cujo perfil cromatográfico geral está ilustrado na Figura 4.60.

Figura 4.60. Cromatograma padrão da fração 3 (F3) obtida da EFS do meio de cultura da linhagem *P. oxalicum* F30 fermentada em meio MF [60%]. Condições de análise: coluna C₁₈ Waters® XTerra MS (dimensões 2,1 x 50 mm, 3,5 µm), gradiente de eluição (H₂O/MeOH/MeCN), fluxo de 0,5 mL/min, detecção EM/IES⁺.

A partir de 93 mg do extrato bruto F30 padrão foram purificados aproximadamente 2,5 mg e 11 mg dos compostos representados pelos picos 1 e 2, cujos espectros EM/IES⁺ estão ilustrado nas figuras 4.61 e 4.62.

Figura 4.61. Espectro de massas padrão para o composto correspondente ao pico 1. $[M+H]^+ = m/z$ 434. Detecção: EM/IES⁺.

Figura 4.62. Espectro de massas padrão para o composto correspondente ao pico 2. $[M+H]^+ = m/z$ 448. Detecção: EM/IES⁺.

A determinação estrutural do composto originário da purificação por CLAE/UV do pico 2, do qual se obteve a maior quantidade de massa, foi feita por RMN de ¹³C (Figura 4.63) e por comparação com os valores presentes na literatura (NAGEL *et al.*, 1976) para a oxalina (**31**) (Tabela 4.9).

Figura 4.63. Espectro de RMN de ^{13}C ($\text{DMSO-}d_6$, 100 MHz) do composto isolado da purificação do pico 2 por CLAE/UV.

Tabela 4.9 - Valores de deslocamento químico (RMN de ^{13}C) da oxalina (**31**) e do composto isolado da purificação do pico 2

Carbono	NAGEL <i>et al.</i> (1976)	Pico 2
	Oxalina * CDCl_3	* $\text{DMSO-}d_6$
1	-	-
2	101,6	101,3
3	52,6	52,4
3a	146,5	145,9
4	124,7	125,1
5	123,3	123,4
6	128,4	128,3

Continuação Tabela 4.9 -

Carbono	NAGEL <i>et al.</i> (1976)	
	Oxalina *CDCl ₃	Pico 2 *DMSO- <i>d</i> ₆
7	112,0	111,8
7a	146,6	146,6
8	107,0	107,3
9	126,0	125,7
10	157,3	157,0
11	-	-
12	123,1	n.o.
13	166,1	165,2
14	-	-
15	109,7	108,0
16	126,2	126,1
17	-	-
18	136,6	137,9
19	-	-
20	133,8	134,5
21	42,5	42,0
22	142,8	n.o.
23	113,9	113,2
24	24,1	n.o.
25	23,7	23,5
26	55,7	55,7
27	65,2	65,0

*Solvente utilizado para a realização das análises por RMN de ¹³C. n.o. = não observado.

Considerando-se as análises de RMN de ^{13}C , a estrutura do composto correspondente ao pico 2 foi determinada como sendo a oxalina (**31**).

A determinação estrutural do composto correspondente ao pico 1 foi feita com base na diferença de massa entre a oxalina (m/z 448) e o composto referente ao pico 1 (m/z 434). A diferença de 14 Da pode ser representada pela perda de um grupo metila. Uma revisão da literatura (OVERY *et al.*, 2005) demonstra que linhagens de *P. oxalicum* são capazes de biossintetizar a meleagrina (**30**), composto com massa molecular de 433 Da e cuja única diferença estrutural quando comparada com a oxalina (**31**) é a substituição do radical metila de uma das metoxilas por hidrogênio.

Figura 4.64. Estrutura química da meleagrina (**30**) e da oxalina (**31**).

Uma vez determinadas as estruturas dos alcaloides, foram realizados experimentos de incorporação em pequena escala tanto para a meleagrina (**30**) como para a oxalina (**31**), com os precursores isotopicamente marcados listados na tabela 4.10.

Tabela 4.10 - Lista de precursores isotopicamente marcados e resultados dos experimentos de incorporação em pequena escala para os alcaloides **30** e **31**

Precursor	Resultado
[1,2- ¹³ C ₂]acetato de sódio	(-)
[1- ¹³ C ₁]glicose	(+)
[<i>metil</i> - ¹³ C ₁]metionina	(+)
[U- ¹³ C ₅]ornitina	(-)
[U- ¹³ C ₆]lisina	(-)
[U- ¹³ C ₅]prolina	(-)
[U- ¹³ C ₆]histidina	(+)
[2-indol- ¹³ C ₁]triptofano	(-)
[U- ¹³ C ₆]ácido antranílico	(+)

(+) Apresentou incorporação quando analisado por CLAE/UV/EM/IES.

(-) Não apresentou incorporação quando analisado por CLAE/UV/EM/IES.

Os experimentos de fermentação de *P. oxalicum* F30 realizados com adição dos precursores [1,2-¹³C₂]acetato de sódio, [U-¹³C₅]ornitina, [U-¹³C₆]lisina, [U-¹³C₅]prolina e [2-indol-¹³C₁]triptofano não levaram a alterações nos espectros de EM/IES⁺ da meleagrina (**30**) e da oxalina (**31**) quando comparados aos espectros padrão (sem incorporação). Já os experimentos com adição dos precursores [1-¹³C₁]glicose, [*metil*-¹³C₁]metionina, [U-¹³C₆]histidina e [U-¹³C₆]ácido antranílico levaram a mudanças significativas nos espectros de EM/IES⁺ da meleagrina (**30**) e da oxalina (**31**) e foram, portanto, selecionados para dar continuidade aos experimentos de incorporação em maior escala.

4.5.2. Experimentos de incorporação de [*metil*- $^{13}\text{C}_1$]metionina nos alcaloides **30** e **31**

Para se verificar a origem biossintética dos substituintes metila nos alcaloides **30** e **31** (em destaque na figura 4.65), foram realizados experimentos de incorporação com [*metil*- $^{13}\text{C}_1$]metionina.

Figura 4.65. Substituintes metila presentes na meleagrina (**30**) e na oxalina (**31**).

Através das análises de EM/IES⁺ foi possível observar a incorporação de [*metil*- $^{13}\text{C}_1$]metionina na oxalina (**31**) e na meleagrina (**30**). Para a oxalina (**31**) observou-se, além do sinal da molécula protonada [M+H]⁺ em *m/z* 448, um sinal [M+2] em *m/z* 449 e um sinal [M+3] em *m/z* 450 (Figura 4.66). Já para a meleagrina (**30**) foi possível observar apenas o aumento na intensidade do sinal [M+2]⁺ em *m/z* 435 (Figura 4.67).

Figura 4.66. Espectro de massas da oxalina (**31**) isolada do experimento de fermentação de *P. oxalicum* F30 com adição do precursor [*metil*-¹³C₁]metionina. Detecção: EM/IES⁺.

Figura 4.67. Espectro de massas da meleagrina (**30**) isolada do experimento de fermentação de *P. oxalicum* F30 com adição de [*metil*-¹³C₁]metionina. Detecção: EM/IES⁺.

A análise por RMN de ¹³C realizada para a oxalina (**31**) (Figura 4.68), da qual se obteve uma maior quantidade de massa, indicou a posição dos carbonos que sofreram a incorporação de [*metil*-¹³C₁]metionina.

Figura 4.68. Espectro de RMN de ^{13}C ($\text{DMSO}-d_6$, 100 MHz) da oxalina (**31**) enriquecida com $[metil-^{13}\text{C}_1]\text{metionina}$.

O espectro de RMN de ^{13}C da figura 4.68, obtido a partir do experimento de fermentação da linhagem *P. oxalicum* F30 em meio de cultura enriquecido com $[metil-^{13}\text{C}_1]\text{metionina}$, mostra um aumento na intensidade dos sinais dos carbonos C-26 e C-27 (correspondentes aos substituintes metila) quando comparados aos sinais no espectro de RMN de ^{13}C obtido para a oxalina (**31**) contendo apenas a abundância natural de ^{13}C (Figura 4.63), indicando a incorporação do precursor marcado nestas posições.

4.5.3. Experimentos de incorporação de [1,2- $^{13}\text{C}_2$]acetato de sódio e [1- $^{13}\text{C}_1$]glicose nos alcaloides **30** e **31**

Considerando-se que os experimentos realizados com [1,2- $^{13}\text{C}_2$]acetato de sódio apresentaram resultados negativos, foram realizados testes adicionais de incorporação com glicose isotopicamente marcada ([1- $^{13}\text{C}_1$]glicose) para se observar a via de biossíntese da unidade isopreno presente na meleagrina (**30**) e na oxalina (**31**).

Figura 4.69. Unidade isopreno presente na meleagrina (**30**) e na oxalina (**31**).

No espectro de EM/IES⁺ da oxalina (**31**) oriunda do experimento de incorporação com [1- $^{13}\text{C}_1$]glicose (Figura 4.70) pode-se observar, além do sinal padrão para a molécula protonada [M+H]⁺ em m/z 448, um sinal intenso em m/z 449 e um sinal de menor intensidade em m/z 450, o que indica a incorporação de [1- $^{13}\text{C}_1$]glicose. Entretanto, este padrão de incorporação não pode ser observado no espectro de EM/IES⁺ da meleagrina (**30**) (Figura 4.71).

Figura 4.70. Espectro de massas da oxalina (**31**) isolada do experimento de fermentação de *P. oxalicum* F30 com adição do precursor [1-¹³C₁]glicose. Detecção: EM/IES⁺.

Figura 4.71. Espectro de massas da meleagrina (**30**) isolada do experimento de fermentação de *P. oxalicum* F30 com adição do precursor [1-¹³C₁]glicose. Detecção: EM/IES⁺.

A análise do espectro de RMN de ¹³C da oxalina (**31**) (Figura 4.72), obtida a partir do experimento de fermentação de *P. oxalicum* F30 em meio enriquecido com [1-¹³C₁]glicose, não indicou qualquer alteração na intensidade dos sinais de carbono quando comparados aos sinais no espectro de RMN de ¹³C padrão (Figura 4.63) para este alcaloide.

Figura 4.72. Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz) da oxalina (**30**) isolada a partir do experimento de fermentação de *P. oxalicum* F30 em meio enriquecido com $[1-^{13}\text{C}_1]\text{glicose}$.

O resultado obtido a partir da análise do espectro de RMN de ^{13}C da figura 4.72 é discrepante. Estudos de biossíntese realizados para a roquefortina C (**29**) demonstram a incorporação de $[2,3-^{13}\text{C}_2]$ ácido mevalônico nesta molécula (ALLMAN *et al.*, 1982). Uma vez que a roquefortina C (**29**) é formada pela rota de biossíntese que leva à meleagrina (**30**) e a oxalina (**31**), a incorporação de $[1-^{13}\text{C}_1]\text{glicose}$ deve ser observada. A discordância entre o resultado apresentado no espectro de EM/IES $^+$ da oxalina (**31**) e no espectro de RMN de ^{13}C pode ser devido à qualidade do espectro de RMN de ^{13}C , que não evidencia sinais bem definidos na região das metilas (entre δ 25 e δ 20).

4.5.4. Experimentos de incorporação de $[U-^{13}C_6]$ histidina nos alcaloides 30 e 31

Para se verificar a origem biossintética do fragmento em destaque indicado na figura 4.73, foram realizados experimentos de incorporação de histidina isotopicamente marcada ($[U-^{13}C_6]$ histidina).

Figura 4.73. Resíduo de histidina presente na meleagrina (30) e na oxalina (31).

Os experimentos de fermentação em meio de cultura enriquecido com $[U-^{13}C_6]$ histidina resultaram na incorporação de unidades íntegras deste aminoácido em ambas a oxalina (31) e a meleagrina (30), como pode ser observado nas figuras 4.74 e 4.75.

Figura 4.74. Espectro de massas da oxalina (31) isolada do experimento de fermentação de *P. oxalicum* F30 com adição do precursor $[U-^{13}C_6]$ histidina. Detecção: EM/IES⁺.

Figura 4.75. Espectro de massas da meleagrina (**30**) isolada do experimento de fermentação de *P. oxalicum* F30 com adição do precursor [U- $^{13}\text{C}_6$]histidina. Detecção: EM/IES $^+$.

Na figura 4.74 podemos observar que o espectro de massas da oxalina (**31**) apresenta, além do sinal padrão para a molécula protonada $[\text{M}+\text{H}]^+$ em m/z 448, um sinal adicional em m/z 454, o que indica a incorporação de um resíduo íntegro de [U- $^{13}\text{C}_6$]histidina (que possui seis unidades ^{13}C) no alcaloide. O mesmo padrão de incorporação pode ser observado para a meleagrina (**30**), que sofreu um incremento de massa de 6 Da, de m/z 434 para m/z 440 (Figuras 4.75).

A análise por RMN de ^{13}C (Figuras 4.76 e 4.77) do alcaloide majoritário oxalina (**31**), obtido a partir do experimento de incorporação de [U- $^{13}\text{C}_6$]histidina, indica a posição dos carbonos que sofreram incorporação.

Figura 4.76. Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz) da oxalinala (31) enriquecida com $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$ histidina.

Figura 4.77. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz) da oxalinala (31) enriquecida com $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$ histidina.

No espectro de RMN de ^{13}C da figura 4.76 pode-se observar apenas o aumento na intensidade do sinal do C-18, indicando que este carbono sofreu incorporação, mas não está ligado a nenhum outro carbono ^{13}C . Já para os demais sinais, C-13, C-15, C-16 e C-20, observa-se a presença de satélites de acoplamento ^{13}C - ^{13}C , que indicam a incorporação de unidades íntegras de $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{histidina}$ na oxalina (**31**).

Estes resultados estão de acordo com estudos publicados na literatura acerca da incorporação de $[\text{2-}^{14}\text{C}_1]\text{histidina}$ na roquefortina C (**29**) (BARROW *et al.*, 1979; STEYN e VLEGGAAR, 1983), que é formada pela mesma rota de biossíntese que leva à meleagrina (**30**) e a oxalina (**31**).

4.5.5. Experimentos de incorporação de $[\text{indol-2-}^{13}\text{C}_1]\text{triptofano}$ e $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{ácido antranílico}$ nos alcaloides **30** e **31**

Para se determinar a origem biossintética do fragmento indol presente na meleagrina (**30**) e na oxalina (**31**) (em destaque na figura 4.78), foram realizados experimentos de incorporação de resíduos de aminoácidos $[\text{indol-2-}^{13}\text{C}_1]\text{triptofano}$ e $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{ácido antranílico}$ em culturas da linhagem *P. oxalicum* F30.

Figura 4.78. Fragmento indol presente na meleagrina (**30**) e na oxalina (**31**).

Assim como o observado para as citrinalinas **35** e **39**, os experimentos de incorporação realizados para a meleagrina (**30**) e para a oxalina (**31**) com [indol-2- $^{13}\text{C}_1$]triptofano apresentaram resultados negativos. Já o experimento de fermentação de *P. oxalicum* F30 em meio de cultura enriquecido com [U- $^{13}\text{C}_6$]ácido antranílico, resultou na incorporação deste precursor na oxalina (**31**) (Figura 4.79) e na meleagrina (**30**) (Figura 4.80).

Figura 4.79. Espectro de massas da oxalina (**31**) isolada do experimento de fermentação de *P. oxalicum* F30 com adição do precursor [U- $^{13}\text{C}_6$]ácido antranílico. Detecção: EM/IES $^+$.

Figura 4.80. Espectro de massas da meleagrina (**30**) isolada do experimento de fermentação de *P. oxalicum* F30 com adição do precursor [U- $^{13}\text{C}_6$]ácido antranílico. Detecção: EM/IES $^+$.

Na figura 4.79 pode-se observar que o espectro de EM/IES⁺ da oxalina (**31**) oriunda do experimento de incorporação com [U-¹³C₆]ácido antranílico apresenta, além do sinal padrão [M+H]⁺ em *m/z* 448, um sinal adicional em *m/z* 454, o que indica a incorporação de uma unidade íntegra de [U-¹³C₆]ácido antranílico no alcaloide. O mesmo padrão de incorporação pode ser observado para a meleagrina (**30**), que sofreu um incremento de massa de 6 Da, de *m/z* 434 para *m/z* 440 (Figura 4.80).

O espectro de RMN de ¹³C da oxalina (**31**) (Figuras 4.81 e 4.82), oriunda do experimento de incorporação de [U-¹³C₆]ácido antranílico, indica a posição dos carbonos que sofreram incorporação.

Figura 4.80. Espectro de RMN de ¹³C (DMSO-*d*₆, 100 MHz) da oxalina (**31**) enriquecida com [U-¹³C₆]ácido antranílico.

Figura 4.81. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz) da oxalina (31) enriquecida com $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$ ácido antranílico.

Nos espectros de RMN de ^{13}C provenientes do experimento de incorporação de $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$ ácido antranílico (Figuras 4.80 e 4.81), pode-se observar tanto o aumento na intensidade dos sinais dos carbonos aromáticos C-4, C-5, C-6, C-7 e C-7a, como a presença de satélites de acoplamento $^{13}\text{C-}^{13}\text{C}$, indicativa da incorporação de unidades íntegras de $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$ ácido antranílico.

4.5.6. Taxas de incorporação específicas de ^{13}C na oxalina (31)

A partir das análises de RMN de ^{13}C dos alcaloides obtidos através dos experimentos de incorporação com $[\text{metil-}^{13}\text{C}_1]$ metionina, $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$ histidina e $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$ ácido antranílico, foram calculadas as taxas de incorporação específica de ^{13}C (tópico 3.9) para cada carbono da oxalina (31).

Tabela 4.11 - Taxa de incorporação específica (%) para cada sinal de carbono da oxalina (31)

Posição	Carbono	Padrão	[<i>metil</i> - $^{13}\text{C}_1$] metionina	[1- $^{13}\text{C}_1$] glicose	[U- $^{13}\text{C}_6$] histidina	[U- $^{13}\text{C}_6$] ácido antr.
1	-	-	-	-	-	-
2	101,3	1,10	n.d.	1,72	1,99	1,95
3	52,4	1,10	1,09	1,10	2,30	1,80
3a	145,9	-	1,02	1,03	1,99	1,35
4	125,1	1,10	0,92	1,79	4,56	8,44
5	123,4	1,10	0,93	0,93	15,31	10,36
6	128,3	1,10	1,09	1,11	1,69	9,78
7	111,8	1,10	1,04	1,01	1,72	9,96
7a	146,6	1,10	1,00	1,69	1,72	9,22
8	107,3	1,10	0,91	0,62	33,58	1,04
9	125,7	1,10	1,85	1,03	19,76	9,03
10	157,0	1,10	1,00	1,07	2,33	1,43
11	-	-	-	-	-	-
12	-	1,10	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
13	165,2	1,10	1,10	1,10	37,99	1,10
14	-	-	-	-	-	-
15	108,0	1,10	1,17	1,66	7,10	1,46
16	126,1	1,10	1,00	n.d.	8,01	14,61
17	-	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Continuação Tabela 4.11 -

Posição	Carbono	Padrão	[metil- ¹³ C ₁] metionina	[1- ¹³ C ₁] glicose	[U- ¹³ C ₆] histidina	[U- ¹³ C ₆] ácido antr.
18	137,9	1,10	1,03	0,98	31,95	1,04
19	-	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
20	134,5	1,10	0,94	0,78	39,48	0,90
21	42,0	1,10	1,05	1,05	2,02	1,49
22	-	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
23	113,2	1,10	0,91	1,19	2,42	2,81
24	-	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
25	-	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
26	55,7	1,10	13,44	1,48	9,37	1,42
27	65,0	1,10	12,84	1,41	9,27	1,36

n.d. = não foi possível definir o valor da integral.

Os resultados obtidos indicam que os alcaloides meleagrina (**30**) e oxalina (**31**) têm como precursores a metionina, a histidina e o triptofano (via ácido antranílico).

Uma revisão da literatura mostra que a meleagrina (**30**) e a oxalina (**31**) são formadas a partir da roquefortina C (**29**) pela hidroxilação do intermediário roquefortina, seguido de um rearranjo do esqueleto de carbono, redução, fechamento do anel e metilações (Figura 4.83) (OVERY *et al.*, 2005). Nossos resultados estão em concordância com a literatura no que diz respeito a condensação inicial dos resíduos de aminoácidos, neste caso triptofano e histidina, e propomos ainda a metilação por S-adenosilmetionina (SAM).

Figura 4.83. Via de biossíntese de meleagrina (30) e oxalina (31) a partir de roquefortina C (29) (OVERY *et al.*, 2005).

Assim, de acordo com as análises por EM/IES⁺ e RMN de ¹³C realizadas para a oxalina (31) obtida a partir dos experimentos de incorporação com precursores isotopicamente marcados, propomos que sua biossíntese procede como na figura 4.84. Os resultados obtidos pelas análises de EM/IES⁺ demonstram que a meleagrina (30) apresentou os mesmos padrões de incorporação da oxalina (31) e, portanto, consideramos que ambos os alcaloides são formados a partir da mesma rota de biossíntese.

Figura 4.84. Proposta de via biossintética de formação de oxalina (31).

A meleagrina (30) e a oxalina (31) também estão relacionadas a classe de alcaloides fúngicos do tipo biciclo[2.2.2]diazaoctano. Poucos estudos biossintéticos foram realizados para compreender as vias que conduzem a estes alcaloides, sendo que investigações iniciais revelaram que estes dois metabólitos são derivados da transformação da dicetopiperazina roquefortina C (29) (OVERY *et al.*, 2005).

Mais recentemente, identificou-se um único agrupamento de genes em *Penicillium chrysogenum* que codifica a biossíntese de roquefortina C (29) e de meleagrina (30). Ao utilizar abordagens de biologia molecular, cinco quadros de leitura abertos ao longo de uma região contígua do genoma de *P. chrysogenum*

foram identificados. Estes quadros de leitura codificam a enzima NRPS que produz a dicetopiperazina (ciclo-His-Trp) como um precursor putativo para a biossíntese de ambas **29** e **30**, uma prenilttransferase e ainda uma metiltransferase (GARCIA-ESTRADA *et al.*, 2011).

Figura 4.85. Esquema de quadros de leitura ao longo do genoma de *Penicillium chrysogenum* (GARCIA-ESTRADA *et al.*, 2011).

Conclusão

5. Conclusões

Os resultados obtidos para os experimentos realizados com o fungo *P. citrinum*, levam a conclusão de que os dihidropirrois **27** e **28** são produzidos através de uma via biossintética mista, sendo derivados de um resíduo de aminoácido (ornitina), um grupo metila derivado da metionina e uma cadeia policetídica derivada do acetato. Considerando-se que a cadeia policetídica se encontra altamente reduzida e que ela sofre uma C-metilação por S-adenosilmetionina (SAM), propõem-se ainda que estes compostos são biossintetizados por uma enzima do grupo HR-FPKS. Ademais, este é o primeiro trabalho a ser realizado sobre a biossíntese de dihidropirrois produzidos por fungos.

Conclui-se que a citrinalina B (**35**) e a 17-hidroxicitrinalina B (**39**) são formadas a partir de uma rota biossintética mista, sendo derivadas de dois resíduos de aminoácidos, ornitina e triptofano (via ácido antranílico), e unidades isopreno derivadas da glicose. Os resultados obtidos para a formação de citrinalina B (**35**) e 17-hidroxicitrinalina B (**39**) ficaram dentro do esperado no que se refere à incorporação de glicose nos carbonos isoprenóides C-14, C-24/25 e C-26/27, uma vez que a via de formação de unidades isopreno a partir de mevalonato é a mais comumente observada em fungos. Já a incorporação de ^{13}C oriundos da glicose no resíduo de triptofano provavelmente ocorreu via fosfoenolpiruvato/eritrose-4-fosfato para o carbono aromático C-10, e a partir da formação de serina para o carbono C-23.

O isolamento do intermediário **38**, da citrinalina B (**35**) e da 17-hidroxicitrinalina B (**39**) é o primeiro exemplo de produção concomitante destes alcaloides biossinteticamente relacionados e proporciona, pela primeira vez, uma evidência experimental de que o esqueleto biciclo[2.2.2]diazaoctano é um intermediário avançado na biossíntese de citrinalinas e compostos relacionados. Ademais, o resíduo de ornitina presente na citrinalina B (**35**) e na 17-hidroxicitrinalina B (**39**) nunca foi observado, ou mesmo proposto, como um precursor na biossíntese de alcaloides prenilados de origem fúngica.

Para os experimentos realizados com o fungo *P. oxalicum*, conclui-se que os alcaloides meleagrina (**30**) e oxalina (**31**) são formados a partir de uma via biossintética mista, sendo derivados de dois resíduos de aminoácidos, histidina e triptofano (via ácido antranílico) e grupos metila derivados da metionina. Os experimentos realizados com [1-¹³C₁]glicose para estes alcaloides não produziram resultados conclusivos e, portanto, serão refeitos.

Referências

REFERÊNCIAS

ALBERTS, A. W. Discovery, biochemistry and biology of lovastatin. **The American Journal of Cardiology**, v. 62, p. 10-15, 1988.

ALMANN, C. P. G.; STEYN, P. S.; VLEGGAAR, R. The biosynthesis of roquefortine. An investigation of acetate and mevalonate incorporation using high field N.M.R. spectroscopy. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, p. 652-653, 1982.

ASAO, T.; BÜCHI, G.; ABDEL-KADER, M. M.; CHANG, S. B.; WICK, E. L.; WOGAN, G. N. The structures of aflatoxins B and G1. **Journal of the American Chemical Society**, v. 87, n. 4, p. 882-886, 1965.

BAERSON, S. R.; RIMANDO, A. A plethora of polyketides: structures, biological activities, and enzymes. In: RIMANDO, A. M.; BAERSON, S. R. **Polyketides: biosynthesis, biological activity, and genetic engineering**. Washington: ACS, 2007. p. 2-12. (ACS Symposium Series, 955).

BARROW, K. D.; COLLEY, P. W.; TRIBE, D. E. Biosynthesis of the neurotoxin alkaloid roquefortine. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, p. 225-226, 1979.

BHARDWAJ, S.; SHUKLA, A.; MUKHERJEE, S.; SHARMA, S.; GUPTASARMA, P.; CHAKRABORTI, A. K.; CHAKRABARTI, A. Putative structure and characteristics of a red water-soluble pigment secreted by *Penicillium marneffe*. **Medical Mycology**, v. 45, p. 419-427, 2007.

BIRCH, A. J.; WRIGHT, J. J. The brevianamides: a new class of fungal alkaloid. **Journal of the Chemical Society D, Chemical Communications**, p. 644b-645, 1969.

BIRCH, A. J.; WRIGHT, J. J. Studies in relation to biosynthesis - XLII: The structural elucidation and some aspects of the biosynthesis of the brevianamides -A and -E. **Tetrahedron**, v. 26, n. 10, p. 2329-2344, 1970.

BIRCH, A. J.; RUSSELL, R. A. Studies in relation to biosynthesis - XLIV : Structural elucidations of brevianamides -B, -C, -D and -F. **Tetrahedron**, v. 28, n. 11, p. 2999-3008, 1972.

BRAHME, N. M.; GONZALEZ, J. E.; ROLLS, J. P.; HESSLER, E. J.; MIZSAK, S.; HURLEY, L. H. Biosynthesis of the lincomycins. 1. Studies using stable isotopes on the biosynthesis of the propyl- and ethyl-L-hygric acid moieties of lincomycins A and B. **Journal of the American Chemical Society**, v. 106, p. 7873-7878, 1984.

BROCK, M.; FISCHER, R.; LINDER, D.; BUCKEL, W. Methylcitrate synthase from *Aspergillus nidulans*: implications for propionate as an antifungal agent. **Molecular Microbiology**, v. 35, n. 5, p. 961-973, 2000.

BROCK, M.; BUCKEL, W. On the mechanism of action of the antifungal agent propionate. Propionyl-CoA inhibits glucose metabolism in *Aspergillus nidulans*. **European Journal of Biochemistry**, v. 271, p. 3227-3241, 2004.

BROWN, A. G.; SMALE, T. C.; KING, T. J.; HASENKAMP, R.; THOMPSON, H. Cristal and molecular structure of compactin, a new antifungal metabolite from *Penicillium brevicompactum*. **Journal of the Chemical Society, Perkin**, v. 11, p. 1165-1170, 1976.

BURKE, C.; THOMAS, T.; EGAN, S.; KJELLEBERG, S. The use of functional genomics for the identification of a gene cluster encoding for the biosynthesis of an antifungal tambjamine in the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicate*. **Environmental Microbiology**, v. 9, n. 3, p. 814-818, 2007.

CANTIN, A.; MOYA, P.; MIRANDA, M. A.; PRIMO, J.; PRIMO-YUFERA, E. Isolation of *N*-(2-Methyl-3-oxodecanoyl)pyrrole and *N*-(2-Methyl-3-oxodec-8-enoyl)pyrrole, two new natural products from *Penicillium brevicompactum*, and synthesis of analogues with insecticidal and fungicidal activity. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 46, p. 4748-4753, 1998.

CERDENO, A. M.; BIBB, M. J.; CHALLIS, G. I. Analysis of the prodiginine biosynthesis gene cluster of *Streptomyces coelicolor* a3(2): new mechanisms for chain initiation and termination in modular multienzymes. **Chemistry & Biology**, v. 8, p. 817-829, 2001.

CHEN, L.; LIU, W.; HU, X.; HUANG, K.; WU, J.; ZHANG, Q. Citrinin derivatives from the marine-derived fungus *Penicillium citrinum*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 59, n. 4, p. 515-517, 2011.

CLARK, B. R.; MURPHY, C. D. Biosynthesis of pyrrolylpolyenes in *Auxarthron umbrinum*. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 7, n. 1, p. 111-116, 2009.

COX, R. J. Polyketides, proteins and genes in fungi: programmed nano-machines begin to reveal their secrets. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 5, p. 2010-2026, 2007.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products**: a biosynthetic approach. 2.ed. Chichester: John Wiley, 2002. 515 p.

DING, Y.; de WET, J. R.; CAVALCOLI, J.; LI, S.; GRESHOCK, T. J.; MILLER, K. A.; FINEFIELD, J. M.; SUNDERHAUS, J. D.; MCAFOOS, T. J.; TSUKAMOTO, S.; WILLIAMS, R. M.; SHERMAN, D. H. Genome-based characterization of two prenylation steps in the assembly of the stephacidin and notoamide anticancer agents in a marine-derived *Aspergillus* sp. **Journal of the American Chemical Society**, v. 132, n. 36, p. 12733-12740, 2010.

ENDO, A.; KURODA, M.; TSUJITA, Y. ML-236A, ML-236B, and ML-236C, new inhibitors of cholesterologenesis produced by *Penicillium citrinum*. **The Journal of Antibiotics**, v. 29, p. 1346-1348, 1976.

EMRI, T.; MAJOROS, L.; TÓTH, V.; PÓCSI, I. Echinocandins: production and applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p. 3267–3284, 2013.

FINEFIELD, J. M.; FRISVAD, J. C.; SHERMAN, D. H.; WILLIAMS, R. M. Fungal origins of the bicyclo[2.2.2]diazaoctane ring system of prenylated indole alkaloids. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 4, p. 812-833, 2012.

GARCIA-ESTRADA, C.; ULLÁN, R. V.; ALBILLOS, S. M.; FERNANDEZ-BODEGA, M. A.; DUREK, P.; VON DÖHREN, H.; MARTÍN, J. F. A single cluster of coregulated genes encodes the biosynthesis of the mycotoxins roquefortine C and meleagrin in *Penicillium chrysogenum*. **Chemistry & Biology**, v. 18, p. 1499-1512, 2011.

GOODMAN, J. L.; WANG, S.; ALAM, S.; RUZICKA, F. J.; FREY, P. A.; WEDEKIND, J. E. Ornithine cyclodeaminase: structure, mechanism of action, and implications for the μ -crystallin family. **Biochemistry**, v. 43, n. 44, p. 13884-13891, 2004.

HERTWECK, C. The biosynthetic logic of polyketide diversity. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 48, p. 4688-4716, 2009.

KAWAI, K.; NOZAWA, K.; NAKAJIMA, S.; IITAKA, Y. Studies on fungal products. VII. The structure of meleagrins and 9-O-p-bromobenzoylmeleagrins. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 32, n. 1, p. 94-98, 1984.

KHAMTHONG, N.; RUKACHAISIRIKUL, V.; PHONGPAICHIT, S.; PREEDANON, S.; SAKAYAROJ, J. Bioactive polyketides from the sea fan-derived fungus *Penicillium citrinum* PSU-F51. **Tetrahedron**, v. 68, p. 8245-8250, 2012.

KOIZUMI, Y.; ARAI, M.; TOMODA, H.; OMURA, S. Oxaline, a fungal alkaloid, arrests the cell cycle in M phase by inhibition of tubulin polymerization. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1693, p. 47-55, 2004.

KUBANEK, J.; ANDERSEN, R. J. Evidence for de novo biosynthesis of the polyketide fragment of dialulsterol A by the northeastern Pacific dorid nudibranch *Dialula sandiegensis*. **Journal of Natural Products**, v. 62, n. 5, p. 777-779, 1999.

LI, S.M. Evolution of aromatic prenyltransferases in the biosynthesis of indole derivatives. **Phytochemistry**, v. 70, p. 1746-1757, 2009.

McCORKINDALE, N. J.; BAXTER, R. L. Brevigellin, a benzoylated cyclodepsipeptide from *Penicillium brevicompactum*. **Tetrahedron**, v. 37, p. 1795-1801, 1981.

McMURRY, J.; BEGLEY, T. **The organic chemistry of biological pathways**. Englewood: Roberts and Company, 2005. 490 p.

MEKSURIYEN, D.; CORDELL, G. A. Biosynthesis of staurosporine, 2. Incorporation of tryptophan. **Journal of Natural Products**, v. 51, n. 5, p. 893-899, 1988.

MINTO, R. E.; TOWNSEND, C. A. Enzymology and molecular biology of aflatoxin biosynthesis. **Chemical Reviews**, v. 97, p. 2537-2555, 1997.

MOYA, P.; CANTIN, A.; CASTILLO, M. A.; PRIMO, J.; MIRANDA, M. A.; PRIMO-YÚFERA, E. Isolation, structural assignment, and synthesis of *N*-(2-methyl-3-oxodecanoyl)-2-pyrroline, a new natural product from *Penicillium brevicompactum* with *in vivo* anti-juvenile hormone activity. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 63, p. 8530-8535, 1998.

MUGISHIMA, T.; TSUDA, M.; KASAI, Y.; ISHIYAMA, H.; FUKUSHI, E.; KAWABATA, J.; WATANABE, M.; AKAO, K.; KOBAYASHI, J. Absolute stereochemistry of citrinadins A and B from marine-derived fungus. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 70, p. 9430-9435, 2005.

NAGEL, D. W.; PACHLER, K. G. R.; STEYN, P. S.; WESSELS, P. L.; GAFNER, G.; KRUGER, G. J. X-Ray structure of oxaline: a novel alkaloid from *Penicillium oxalicum*. **Chemical Communications**, p. 1021-1022, 1974.

NAGEL, D. W.; PACHLER, K. G. R.; STEYN, P. S.; VLEGGAR, R.; WESSELS, P. L. The chemistry and ¹³C NMR assignments of oxaline, a novel alkaloid from *Penicillium oxalicum*. **Tetrahedron**, v. 32, p. 2625-2631, 1976.

NEUMANN, C. S.; JIANG, W.; HEEMSTRA, J. R. JR.; GONTANG, E. A.; KOLTER, R.; WALSH, C. T. Biosynthesis of piperazic acid via N5-hydroxy-ornithine in *Kutzneria* spp. **European Journal of Chemical Biology**, v. 13, p. 972-976, 2012.

NOZAWA, K.; NAKAJIMA, S. Isolation of radicicol from *Penicillium luteo-aurantium*, and meleagrin, a new metabolite from *Penicillium meleagrinum*. **Journal of Natural Products**, v. 42, n. 4, p. 374-377, 1979.

OVERY, D. P.; NIELSEN, K. F.; SMEDSGAARD, J. Roquefortine/oxaline biosynthesis pathway: metabolites in *Penicillium* SER. Corymbifera, *in* Planta production and implications for competitive fitness. **Journal of Chemical Ecology**, v. 31, n. 10, p. 2373-2390, 2005.

PEARCE, C. J.; DOYLE, T. W.; FORENZA, S.; LAM, K. S.; SCHROEDER, D. R. The biosynthetic origins of rebeccamycin. **Journal of Natural Products**, v. 51, n. 5, p. 937-940, 1988.

PESCHKE, J. D.; HANEFELD, U.; LAATHSC, H. Biosynthesis of the marine antibiotic pentabromopseudilin. 2. The pyrrole ring. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 69, n. 3, p. 628-630, 2005.

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

ROHMER, M. The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants. **Natural Product Reports**, v. 16, p. 565-574, 1999.

SASAKI, M.; TSUDA, M.; SEKIGUCHI, M.; MIKAMI, Y.; KOBAYASHI, J. Perinadine A, a novel tetracyclic alkaloid from marine-derived fungus *Penicillium citrinum*. **Organic Letters**, v. 7, n. 19, p. 4261-4264, 2005.

SCOTT, P. M.; MERRIEN, M.; POLONSKY, J. Roquefortine and isofumigaclavine A, metabolites from *Penicillium roqueforti*. **Experientia**, v. 32, n. 2, p. 140-142, 1976.

STEFFAN, N.; GRUNDMANN, A.; YIN, W.; KREMER, A.; LI, S. Indole prenyltransferases from fungi: a new enzyme group with high potential for the production of prenylated indole derivatives. **Current Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 218-231, 2009.

STEYN, P. S.; VLEGGAAR, R.; WESSELS, P. L. Biosynthesis of the aurovertins B and D. The role of methionine and propionate in the simultaneous operation of two independent biosynthetic pathways. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1**, p. 1298-1308, 1981.

STEYN, P. S.; VLEGGAR, R. Roquefortine, an intermediate in the biosynthesis of oxaline in cultures of *Penicillium oxalicum*. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, p. 560-561, 1983.

STEYN, P. S.; VLEGGAR, R. Biosynthesis of asteltoxin by cultures of *Emericella variecolor* - the role of propionate in the biosynthesis and evidence for a 1,2-bond migration in the formation of the bistetrahydrofuran moiety. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, n. 15, p. 977-979, 1984.

SUN, Y.; HE, F.; LIU, K.; ZHANG, X.; BAO, J.; WANG, Y.; NONG, X.; XU, X.; QI, S. Cytotoxic dihydrothiophene condensed chromones from marine-derived fungus *Penicillium oxalicum*. **Planta Medica**, v. 78, p. 1957-1961, 2012.

TSUDA, M.; KASAI, Y.; KOMATSU, K.; SONE, T.; TANAKA, M.; MIKAMI, Y.; KOBAYASHI, J. Citrinadin A, a novel pentacyclic alkaloid from marine-derived fungus *Penicillium citrinum*. **Organic Letters**, v. 6, n. 18, p. 3087-3089, 2004.

TSUDA, M.; SASAKI, M.; MUGISHIMA, T.; KOMATSU, K.; SONE, T.; TANAKA, M.; MIKAMI, Y.; KOBAYASHI, J. Scalusamides A-C, new pyrrolidine alkaloids from the marine-derived fungus *Penicillium citrinum*. **Journal of Natural Products**, v. 68, p. 273-276, 2005.

VITA-MARQUES, A. M. **Isolamento, atividade biológica e análises do perfil químico de fungos coletados no litoral do Estado de São Paulo**. 2003. 179 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

WALSH, C. T.; GARNEAU-TSODIKOVA, S.; HOWARD-JONES, A. R. Biological formation of pyrroles: nature's logic and enzymatic machinery. **Natural Products Reports**, v. 23, p. 517-531, 2006.

WILLIAMS, R. M.; STOCKING, E. M.; SANZ-CERVERA, J. F. Biosynthesis of prenylated alkaloids derived from tryptophan. **Topics in Current Chemistry**, v. 209, p. 97-173, 2000.

YURCHENKO, A. N.; SMETANINA, O. F.; KALINOVSKII, A. I.; KIRICHUK, N. N.; YURCHENKO, E. A.; AFIYATULLOV, Sh. Sh. Biologically active metabolites of the facultative marine fungus *Penicillium citrinum*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 48, n. 6, p. 996-998, 2013.

ZHU, XIANG-CHENG; HUFFMAN, J.; GERBER, R.; LOU, LI-LI; XIE, YUN-XUAN; LIN, TING; JORGENSEN, J.; MARESCH, A.; VOGELER, C.; WANG, QIAO-MEI; SHEN, YUE-MAO; DU, LIANG-CHENG. Biosynthesis and genetic engineering of polyketides. **Acta Botanica Yunnanica**, v. 30, n. 3, p. 249-278, 2008.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

STELAMAR ROMMINGER

**Isolamento, identificação e investigação de rotas biossintéticas de produtos
naturais de micro-organismos marinhos**

Volume 2

São Carlos

2013

Anexo

ANEXO

Tabela A.1 - Parâmetros de aquisição dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear para o dihidropirrol 28	155
Figura A.1. Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz) do dihidropirrol 28 padrão.	156
Figura A.2. Expansão 1 do espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz) do dihidropirrol 28 padrão.	157
Figura A.3. Expansão 2 do espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz) do dihidropirrol 28 padrão.	158
Figura A.4. Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz) do dihidropirrol 28 enriquecido com $[1-^{13}\text{C}_1]$ acetato de sódio.	159
Figura A.5. Expansão 1 do espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz) do dihidropirrol 28 enriquecido com $[1-^{13}\text{C}_1]$ acetato de sódio.	160
Figura A.6. Expansão 2 do espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz) do dihidropirrol 28 enriquecido com $[1-^{13}\text{C}_1]$ acetato de sódio.	161
Figura A.7. Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz) do dihidropirrol 28 enriquecido com $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ acetato de sódio.	162
Figura A.8. Expansão 1 do espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz) do dihidropirrol 28 enriquecido com $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ acetato de sódio.	163
Figura A.9. Expansão 2 do espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz) do dihidropirrol 28 enriquecido com $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ acetato de sódio.	164
Figura A.10. Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz) do dihidropirrol 28 enriquecido com $[metil-^{13}\text{C}]$ metionina.	165
Figura A.11. Expansão 1 do espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz) do dihidropirrol 28 enriquecido com $[metil-^{13}\text{C}]$ metionina.	166

Figura A.12. Expansão 2 do espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz) do dihidropirrol 28 enriquecido com [<i>metil</i> - ^{13}C]metionina.	167
Figura A.13. Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz) do dihidropirrol 28 enriquecido com [U- $^{13}\text{C}_5$]ornitina.	168
Figura A.14. Expansão 1 do espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz) do dihidropirrol 28 enriquecido com [U- $^{13}\text{C}_5$]ornitina.	169
Figura A.15. Expansão 2 do espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz) do dihidropirrol 28 enriquecido com [U- $^{13}\text{C}_5$]ornitina.	170
-	
Tabela A.2 - Parâmetros de aquisição dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear para a citrinalina B (35)	171
Figura A.16. Espectro de RMN de ^{13}C (MeOH- d_4 , 150 MHz) da citrinalina B (35) padrão.	172
-	
Tabela A.3 – Parâmetros de aquisição dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear para o composto 38	173
Figura A.17. Espectro de RMN de ^1H (Acetona- d_6 , 150 MHz) do composto 38 .	174
Figura A.18. Espectro de RMN de ^{13}C (Acetona- d_6 , 150 MHz) do composto 38 .	175
Figura A.19. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (Acetona- d_6 , 150 MHz) do composto 38 .	176
Figura A.20. Espectro de gHMBC (Acetona- d_6 , 150 MHz) do composto 38 .	177
Figura A.21. Espectro de $g^{15}\text{N}$ lrHMQC (Acetona- d_6 , 150 MHz) do composto 38 .	178
Figura A.22. Espectro de HSQC (Acetona- d_6 , 150 MHz) do composto 38 .	179

Figura A.23. Espectro de COSY (Acetona- d_6 , 150 MHz) do composto 38 .	180
Figura A.24. Espectro de tROESY (Acetona- d_6 , 150 MHz) do composto 38 .	181
-	
Tabela A.4 - Parâmetros de aquisição dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear para a 17-hidroxicitrinalina B (39)	182
Figura A.25. Espectro de RMN de ^{13}C (MeOH- d_4 , 150 MHz) da 17-hidroxicitrinalina B (39) padrão.	183
Figura A.26. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (MeOH- d_4 , 150 MHz) da 17-hidroxicitrinalina B (39) padrão.	184
Figura A.27. Espectro de HSQC (MeOH- d_4 , 150 MHz) da 17-hidroxicitrinalina B (39) padrão.	185
Figura A.28. Espectro de HMBC (MeOH- d_4 , 150 MHz) da 17-hidroxicitrinalina B (39) padrão.	186
Figura A.29. Espectro de COSY (MeOH- d_4 , 150 MHz) da 17-hidroxicitrinalina B (39) padrão.	187
Figura A.30. Espectro de tROESY (MeOH- d_4 , 150 MHz) da 17-hidroxicitrinalina B (39) padrão.	188
Figura A.31. Espectro de RMN de ^{13}C (MeOH- d_4 , 150 MHz) da 17-hidroxicitrinalina B (39) enriquecida com [U- $^{13}\text{C}_5$]ornitina.	189
Figura A.32. Expansão 1 do espectro de RMN de ^{13}C (MeOH- d_4 , 150 MHz) da 17-hidroxicitrinalina B (39) enriquecida com [U- $^{13}\text{C}_5$]ornitina.	190
Figura A.33. Expansão 2 do espectro de RMN de ^{13}C (MeOH- d_4 , 150 MHz) da 17-hidroxicitrinalina B (39) enriquecida com [U- $^{13}\text{C}_5$]ornitina.	191
Figura 4.34. Espectro de RMN de ^{13}C (MeOH- d_4 , 150 MHz) da 17-hidroxicitrinalina B (39) enriquecida com [1- $^{13}\text{C}_1$]glicose.	192

Figura A.35. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C ($\text{MeOH-}d_4$, 150 MHz) da 17-hidroxicitrinalina B (**39**) enriquecida com $[1-^{13}\text{C}_1]\text{glicose}$. 193

Figura A.36. Espectro de RMN de ^{13}C ($\text{MeOH-}d_4$, 150 MHz) da 17-hidroxicitrinalina B (**39**) enriquecida com $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{ácido antranílico}$. 194

Figura A.37. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C ($\text{MeOH-}d_4$, 150 MHz) da 17-hidroxicitrinalina B (**39**) enriquecida com $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{ácido antranílico}$. 195

-

Tabela A.5 - Parâmetros de aquisição dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear para a oxalina (**31**) 196

Figura A.38. Espectro de RMN de ^{13}C ($\text{DMSO-}d_6$, 100 MHz) da oxalina (**31**) padrão. 197

Figura A.39. Expansão 1 do espectro de RMN de ^{13}C ($\text{DMSO-}d_6$, 100 MHz) da oxalina (**31**) padrão. 198

Figura A.40. Expansão 2 do espectro de RMN de ^{13}C ($\text{DMSO-}d_6$, 100 MHz) da oxalina (**31**) padrão. 199

Figura A.41. Espectro de RMN de ^{13}C ($\text{DMSO-}d_6$, 100 MHz) da oxalina (**31**) enriquecida com $[\text{metil-}^{13}\text{C}_1]\text{metionina}$. 200

Figura A.42. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C ($\text{DMSO-}d_6$, 100 MHz) da oxalina (**31**) enriquecida com $[\text{metil-}^{13}\text{C}_1]\text{metionina}$. 201

Figura A.43. Espectro de RMN de ^{13}C ($\text{DMSO-}d_6$, 100 MHz) da oxalina (**31**) enriquecida com $[1-^{13}\text{C}_1]\text{glicose}$. 202

Figura A.44. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C ($\text{DMSO-}d_6$, 100 MHz) da oxalina (**31**) enriquecida com $[1-^{13}\text{C}_1]\text{glicose}$. 203

Figura A.45. Espectro de RMN de ^{13}C ($\text{DMSO-}d_6$, 100 MHz) da oxalina (**31**) enriquecida com $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{histidina}$. 204

Figura A.46. Expansão 1 do espectro de RMN de ^{13}C ($\text{DMSO-}d_6$, 100 MHz) da oxalina (**31**) enriquecida com $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{histidina}$. 205

- Figura A.47.** Expansão 2 do espectro de RMN de ^{13}C ($\text{DMSO-}d_6$, 100 MHz) da oxalina (**31**) enriquecida com $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{histidina}$. 206
- Figura A.48.** Espectro de RMN de ^{13}C ($\text{DMSO-}d_6$, 100 MHz) da oxalina (**31**) enriquecida com $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{ácido antranílico}$. 207
- Figura A.49.** Expansão 1 do espectro de RMN de ^{13}C ($\text{DMSO-}d_6$, 100 MHz) da oxalina (**31**) enriquecida com $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{ácido antranílico}$. 208
- Figura A.50.** Expansão 2 do espectro de RMN de ^{13}C ($\text{DMSO-}d_6$, 100 MHz) da oxalina (**31**) enriquecida com $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{ácido antranílico}$. 209

Tabela A.1 - Parâmetros de aquisição dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear para o dihidropirrol **28**

Parâmetros de aquisição	
INSTRUM	spect
PROBHD	2.5 mm BBO_2,5
PULPROG	zg30
TD	65536
SOLVENTE	DMSO
NS	16
SWH	8223.685 Hz
AQ	3.9846387 sec
D1	1.00000000 sec
CHANNEL f1	
P1	11.20 usec
Parâmetros de processamento	
SI	65536
LB	0.30 Hz

Figura A.1. Espectro de RMN de ^{13}C ($\text{DMSO}-d_6$, 100 MHz) do dihidropirrol **28** padrão.

Figura A.2. Expansão 1 do espectro de RMN de ^{13}C ($\text{DMSO-}d_6$, 100 MHz) do dihidropirrol **28** padrão.

Figura A.3. Expansão 2 do espectro de RMN de ^{13}C ($\text{DMSO}-d_6$, 100 MHz) do dihidropirrol **28** padrão.

Figura A.4. Espectro de RMN de ^{13}C ($\text{DMSO}-d_6$, 100 MHz) do dihidropirrol **28** enriquecido com $[1-^{13}\text{C}_1]\text{acetato de sódio}$.

Figura A.5. Expansão 1 do espectro de RMN de ^{13}C ($\text{DMSO-}d_6$, 100 MHz) do dihidropirrol **28** enriquecido com $[1\text{-}^{13}\text{C}_1]\text{acetato de sódio}$.

Figura A.6. Expansão 2 do espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz) do dihidropirrol **28** enriquecido com $[1-^{13}\text{C}_1]$ acetato de sódio.

Figura A.7. Espectro de RMN de ^{13}C ($\text{DMSO}-d_6$, 100 MHz) do dihidropirrol **28** enriquecido com $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ acetato de sódio.

Figura A.8. Expansão 1 do espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz) do dihidropirrol **28** enriquecido com $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ acetato de sódio.

Figura A.9. Expansão 2 do espectro de RMN de ^{13}C ($\text{DMSO-}d_6$, 100 MHz) do dihidropirrol **28** enriquecido com $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ acetato de sódio.

Figura A.10. Espectro de RMN de ^{13}C ($\text{DMSO-}d_6$, 100 MHz) do dihidropirrol **28** enriquecido com $[metil-^{13}\text{C}]metionina$.

Figura A.11. Expansão 1 do espectro de RMN de ^{13}C ($\text{DMSO}-d_6$, 100 MHz) do dihidropirrol **28** enriquecido com [metil- ^{13}C]metionina.

Figura A.12. Expansão 2 do espectro de RMN de ^{13}C ($\text{DMSO}-d_6$, 100 MHz) do dihidropirrol **28** enriquecido com [*metil*- ^{13}C]metionina.

Figura A.13. Espectro de RMN de ^{13}C ($\text{DMSO-}d_6$, 100 MHz) do dihidropirrol **28** enriquecido com $[\text{U-}^{13}\text{C}_5]\text{ornitina}$.

Figura A.15. Expansão 2 do espectro de RMN de ^{13}C ($\text{DMSO-}d_6$, 100 MHz) do dihidropirrol **28** enriquecido com $[\text{U-}^{13}\text{C}_5]\text{ornitina}$.

Tabela A.2 - Parâmetros de aquisição dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear para a citrinalina B (35)

Parâmetros de aquisição	
INSTRUM	av600cp
PROBHD	5 mm CPTCI 1H-
PULPROG	carbon_spinecho_sp
TD	32768
SOLVENTE	MeOD
NS	560
SWH	31746.031 Hz
AQ	0.5161617 sec
D1	1.00000000 sec
CHANNEL f1	
P1	15.00 usec
Parâmetros de processamento	
SI	32768
LB	1.00 Hz

Figura A.16. Espectro de RMN de ^{13}C ($\text{MeOH-}d_4$, 150 MHz) da citrinalina B (35) padrão.

Tabela A.3 - Parâmetros de aquisição dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear para o composto **38**

Parâmetros de aquisição	
INSTRUM	av600cp
PROBHD	5 mm CPTCI 1H-
PULPROG	carbon_spinecho_sp
TD	32768
SOLVENTE	Acetona- d_6
NS	560
SWH	31746.031 Hz
AQ	0.5161617 sec
D1	1.00000000 sec
CHANNEL f1	
P1	15.00 usec
Parâmetros de processamento	
SI	32768
LB	1.00 Hz

Figura A.17. Espectro de RMN de ^1H (Acetona- d_6 , 150 MHz) do composto **38**.

Figura A.18. Espectro de RMN de ^{13}C (Acetona- d_6 , 150 MHz) do composto **38**.

Figura A.19. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (Acetona- d_6 , 150 MHz) do composto **38**.

Figura A.20. Espectro de gHMBC (Acetona- d_6 , 150 MHz) do composto **38**.

Figura A.21. Espectro de $g^{15}\text{NlrHMQC}$ (Acetona- d_6 , 150 MHz) do composto **38**.

Figura A.22. Espectro de HSQC (Acetona- d_6 , 150 MHz) do composto **38**.

Figura A.23. Espectro de COSY (Acetona- d_6 , 150 MHz) do composto **38**.

Figura A.24. Espectro de tROESY (Acetona- d_6 , 150 MHz) do composto **38**.

Tabela A.4 - Parâmetros de aquisição dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear para a 17-hidroxycitrinalina B (**39**)

Parâmetros de aquisição	
INSTRUM	av600cp
PROBHD	5 mm CPTCI 1H-
PULPROG	zg30
TD	32768
SOLVENTE	MeOD
NS	78
SWH	15015.015 Hz
AQ	1.0912577 sec
D1	0.50000000 sec
CHANNEL f1	
P1	9.20 usec
Parâmetros de processamento	
SI	32768
LB	0.30 Hz

Figura A.25. Espectro de RMN de ^{13}C (MeOH- d_4 , 150 MHz) da 17-hidroxicitralinalina B (39) padrão.

Figura A.26. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (MeOH-d_4 , 150 MHz) da 17-hidroxicitralinalina B (39) padrão.

Figura A.27. Espectro de HSQC (MeOH- d_4 , 150 MHz) da 17-hidroxicitralinalina B (39) padrão.

Figura A.28. Espectro de HMBC (MeOH- d_4 , 150 MHz) da 17-hidroxicitralina B (**39**) padrão.

Figura A.29. Espectro de COSY (MeOH- d_4 , 150 MHz) da 17-hidroxicitrinalina B (39) padrão.

Figura A.30. Espectro de tROESY (MeOH- d_4 , 150 MHz) da 17-hidroxicitrinalina B (39) padrão.

Figura A.31. Espectro de RMN de ^{13}C (MeOH- d_4 , 150 MHz) da 17-hidroxicitralinala B (**39**) enriquecida com $[\text{U}-^{13}\text{C}_5]\text{ornitina}$.

Figura A.32. Expansão 1 do espectro de RMN de ^{13}C (MeOH- d_4 , 150 MHz) da 17-hidroxicitralinalina B (**39**) enriquecida com $[\text{U-}^{13}\text{C}_5]\text{ornitina}$.

Figura A.33. Expansão 2 do espectro de RMN de ^{13}C (MeOH- d_4 , 150 MHz) da 17-hidroxicitrinalina B (**39**) enriquecida com $[\text{U-}^{13}\text{C}_5]\text{ornitina}$.

Figura 4.34. Espectro de RMN de ^{13}C (MeOH- d_4 , 150 MHz) da 17-hidroxycitralinalina B (39) enriquecida com $[1-^{13}\text{C}_1]\text{glicose}$.

Figura A.35. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (MeOH- d_4 , 150 MHz) da 17-hidroxicitralinalina B (**39**) enriquecida com $[1-^{13}\text{C}_1]\text{glucose}$.

Figura A.36. Espectro de RMN de ^{13}C (MeOH- d_4 , 150 MHz) da 17-hidroxicitralinalina B (**39**) enriquecida com $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$ ácido antranílico.

Figura A.37. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (MeOH-d_4 , 150 MHz) da 17-hidroxicitrinalina B (**39**) enriquecida com $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{ácido antranílico}$.

Tabela A.5 - Parâmetros de aquisição dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear para a oxalina (**31**)

Parâmetros de aquisição	
INSTRUM	spect
PROBHD	5 mm CPTCI 1H-
PULPROG	zgpg30
TD	32588
SOLVENTE	DMSO
NS	71680
SWH	34722.223 Hz
AQ	0.4693172 sec
D1	0.10001000 sec
CHANNEL f1	
P1	10.10 usec
Parâmetros de processamento	
SI	32768
LB	3.00 Hz

Figura A.38. Espectro de RMN de ¹³C (DMSO-d₆, 100 MHz) da oxalina (31) padrão.

Figura A.39. Expansão 1 do espectro de RMN de ^{13}C ($\text{DMSO}-d_6$, 100 MHz) da oxalina (**31**) padrão.

Figura A.40. Expansão 2 do espectro de RMN de ^{13}C ($\text{DMSO}-d_6$, 100 MHz) da oxalina (31) padrão.

Figura A.41. Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz) da oxalina (31) enriquecida com [metil- $^{13}\text{C}_1$]metionina.

Figura A.42. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz) da oxalina (31) enriquecida com $[\text{methyl-}^{13}\text{C}_1]\text{metionina}$.

Figura A.43. Espectro de RMN de ^{13}C ($\text{DMSO}-d_6$, 100 MHz) da oxalina (31) enriquecida com $[1-^{13}\text{C}_1]\text{glicose}$.

Figura A.44. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C ($\text{DMSO}-d_6$, 100 MHz) da oxalina (31) enriquecida com $[1-^{13}\text{C}_1]\text{glicose}$.

Figura A.45. Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz) da oxalina (**31**) enriquecida com $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{histidina}$.

Figura A.47. Expansão 2 do espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz) da oxalina (**31**) enriquecida com $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{histidina}$.

Figura A.49. Expansão 1 do espectro de RMN de ^{13}C ($\text{DMSO-}d_6$, 100 MHz) da oxalina (**31**) enriquecida com $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{ácido antranílico}$.

Figura A.50. Expansão 2 do espectro de RMN de ^{13}C ($\text{DMSO}-d_6$, 100 MHz) da oxalina (**31**) enriquecida com $[\text{U}-^{13}\text{C}_6]$ ácido antranílico.