UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

JULIE PAULÍN GARCÍA RODRÍGUEZ

IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS PRODUZIDOS NA DEGRADAÇÃO DO
CORANTE *REMAZOL BRILLIANT BLUE R* (RBBR) PELA AÇÃO DO FUNGO DO AMBIENTE
MARINHO *Tinctoporellus sp.*

São Carlos – SP

2013

JULIE PAULÍN GARCÍA RODRÍGUEZ

**IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS PRODUZIDOS NA DEGRADAÇÃO DO
CORANTE *REMAZOL BRILLIANT BLUE R* (RBBR) PELA AÇÃO DO FUNGO DO AMBIENTE
MARINHO *Tinctoporellus sp.***

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

Área de concentração: Química Analítica e Inorgânica

Orientador: Prof. Dr. Roberto Gomes de Souza Berlinck.

São Carlos – SP

2013

RESUMO

Rodríguez, J.P. **Identificação dos compostos produzidos na degradação do corante *Remazol Brilliant Blue R* (RBBR) pela ação do fungo do ambiente marinho *Tinctoporellus* sp.** 2013. 110 f. Dissertação de mestrado – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

No presente trabalho foram estudados os metabólitos gerados no processo de biodegradação do corante *Remazol brilliant blue R* (RBBR) pelo fungo *Tinctoporellus* sp. em meio líquido. Foi investigada a descoloração do meio de fermentação causada por o processo de degradação, monitorando-se a absorbância da solução durante 17 dias por espectrofotometria UV-Vis. Na presença do fungo *Tinctoporellus* sp. observou-se uma perda de 90% da coloração do meio de crescimento contendo RBBR 90% em um período de 12 dias. Um experimento de degradação do RBBR em 6 L foi realizado e, após 12 dias, o micélio foi filtrado do meio líquido e os analitos foram extraídos do meio de cultura utilizando-se técnicas de extração em fase sólida. O extrato obtido neste processo foi submetido a separações cromatográficas em gel de *Sephadex* LH-20, sílica gel derivatizada com grupo C18, assim como purificações por HPLC. Estas separações permitiram o isolamento e identificação de quatro produtos da degradação do corante, derivados antraquinônicos, dos quais três ainda não conhecidos. Além disso, três sesquiterpenos irregulares tremulanos, também inéditos, foram isolados e identificados, a partir do meio de cultura de degradação do RBBR.

Abstract

Rodríguez, J.P. **Identification of the compounds produced during the degradation of Remazol Brilliant Blue R (RBBR) by the marine-derived fungus *Tinctoporellus* sp.** 2013. 110 f. Dissertação de mestrado – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

In the present study we have investigated metabolites generated during the biodegradation process of the dye Remazol Brilliant Blue R (RBBR), by the action of the marine-derived fungus *Tinctoporellus* sp. in liquid medium. The decolorization of the fermentation medium caused by the degradation process was monitored by measuring the medium absorbance by UV-Vis during 17 days. The growth medium of *Tinctoporellus* sp. decolorized up to 90% after 12 days. RBBR degradation experiment with *Tinctoporellus* sp. performed in large scale during 12 days afforded four dye degradation products, identified as anthraquinone derivatives, three of which not yet new reported in the literature. These anthraquinone derivatives have been isolated by chromatography techniques and identified by spectroscopic analysis. Additionally, three novel tremulane terpenes have also been isolated and identified.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

	Pag.
1. INTRODUÇÃO	17
1.1 OS FUNGOS COMO MICROORGANISMOS DEGRADADORES	17
1.1.1 Fungos de podridão branca	18
1.1.2 Fungos do ambiente marinho	18
1.1.3 Fungo do ambiente marinho <i>Tinctoporellus sp.</i> (CBMAI 1061)	20
1.2 CORANTES SINTÉTICOS: <i>Remazol Brilliant Blue R</i> (RBBR)	21
1.3 CORANTES COMO MOLÉCULAS MODELOS EM PROCESSOS DE BIODEGRADAÇÃO	25
1.4 PRODUTOS METABÓLICOS E ROTAS DE BIODEGRADAÇÃO	27
2. JUSTIFICATIVA	29
3. OBJETIVOS	31
3.1 OBJETIVO GERAL	31
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
4. METODOLOGIA	32
4.1 CONSERVAÇÃO DA LINHAGEM FÚNGICA	32
4.2 CRESCIMENTO DO FUNGO EM MEIO SÓLIDO	32
4.3 INOCULAÇÃO DO MEIO LÍQUIDO	33
4.4 ADIÇÃO DO CORANTE	33
4.5 CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO	33
4.6 EXTRAÇÃO E ISOLAMENTO DOS COMPOSTOS PRODUZIDOS NO PROCESSO DE DEGRADAÇÃO	34
4.6.1 Crescimento a larga escala	34

4.6.2 Obtenção e limpeza dos extratos	34
4.6.3 Purificação e isolamento	37
4.6.4 Identificação dos produtos isolados por técnicas espectroscópicas	37
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1 CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO DO CORANTE <i>Remazol Brilliant Blue R</i>	40
5.2 PRODUÇÃO DO EXTRATO BRUTO DO MEIO DE FERMENTAÇÃO DO CORANTE RBBR EM MEIA ESCALA	43
5.3 EXTRAÇÃO, ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS ANALITOS DE INTERESSE	44
5.3.1 Isolamento e purificação dos compostos extraídos da fração F5_A	45
5.3.2 Elucidação e identificação do composto F5_A1	46
5.3.2.1 Análise do espectro de UV-Vis	46
5.3.2.2 Análise do espectro de massas ESI dos compostos isolados da fração F5_A	47
5.3.2.3 Elucidação estrutural dos compostos isolados	48
5.3.2.3.1 Grupos funcionais e estruturas parciais detectadas nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C para o composto F5_A1	48
5.3.2.3.2 Identificação dos compostos A2, A3 e A4 da fração F5_A	53
5.3.3 Isolamento e purificação dos compostos extraídos da fração 1061_F2	59
5.3.4 Elucidação estrutural e identificação do composto F2	61
5.3.4.1. Análise do espectro de infravermelho F2	61
5.3.4.2 Determinação da formula molecular F2	61
5.3.4.3 Grupos funcionais e estruturas parciais detectadas nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C .	62
5.3.4.4 Estrutura do esqueleto da molécula – Conectividade dos átomos	64
5.3.5 Elucidação estrutural do composto C2B	72
5.3.5.1 Análise do espectro de infravermelho C2B	72
5.3.5.2 Determinação da formula molecular	73
5.3.5.3 Grupos funcionais e estruturas parciais detectadas nos espectros de RMN de ^1H	73

e ^{13}C de C2B	
5.3.5.4 Estrutura do esqueleto de C2B – Conectividade dos átomos	75
5.3.6 Elucidação estrutural do composto G6	82
5.3.6.1 Análises do espectro de infravermelho	82
5.3.6.2 Determinação da formula molecular de G6	83
5.3.6.3 Grupos funcionais e estruturas parciais detectadas nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C de G6.	83
7. CONCLUSÕES	87
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
ANEXOS	92

LISTA DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1. Fragmento da Lignina.	19
Figura 2. Esponja marinha <i>Dragmacidon reticulata</i> que hospeda o fungo basidiomiceto CBMAI 1061.	21
Figura 3. Estrutura química do corante <i>Remazol Brilliant Blue R</i> . Fórmula molecular $C_{22}H_{16}N_2Na_2O_{11}S_3$. Massa molar $626.54 \text{ g mol}^{-1}$.	24
Figura 4. Estrutura molecular dos produtos da biotransformação do corante RBBR relatados na literatura.	28
Figura 5. Porcentagem de descoloração da solução do corante RBBR inoculada em relação ao tempo de degradação.	41
Figura 6. Degradação do corante <i>Remazol Brilliant Blue R</i> (RBBR) pelo fungo <i>Tinctoporellus</i> sp.(CBMAI 1061), após de 17 dias n. A. Variação do espectro de absorção do corante durante o período de degradação. B. Relação de absorbâncias 580nm/500nm para o meio de fermentação inoculado com o fungo <i>Tinctoporellus</i> sp. e o meio sem inocular	42
Figura 7. Mudança na cor da solução do RBBR devido à degradação do corante pelo fungo <i>Tinctoporellus</i> sp.	43
Figura 8. Fotografia da linhagem CBMAI 1061 crescida em meio sólido 2% extrato de malte e ágar bacteriológico, após sete dias de incubação a 28° C.	43
Figura 9. Fotografia da linhagem CBMAI 1061 crescida em meio líquido 2% extrato de malte, após sete dias de incubação a 28° C e agitação 160 RPM.	44
Figura 10. Cromatograma do fracionamento por HPLC_UV de F5_A ($\lambda = 254 \text{ nm}$). Eluição em modo isocrático; composição da fase móvel (MeCN):(0,02 M tampão acetato de amônio/ácido acético, pH 4,5) na proporção 24:76. Coluna analítica Inertsil Ph 5 μ m [4,6mm x 250mm].	46
Figura 11. Espectros UV-Vis dos compostos isolados da fração F5_A.	47
Figura 12. Espectro de RMN ^{13}C (126 MHz) do composto A1 em DMSO- d_6 .	48
Figura 13. Espectro de RMN ^1H (500 MHz) do composto A1 em DMSO- d_6 .	50
Figura 14. Espectro COSY do composto A1 em DMSO- d_6 .	51
Figura 15. Atribuição de todos os sinais dos espectros de ^1H e ^{13}C do composto F5_A1.	52
Figura 16. Correlações ^1H - ^1H observadas no espectro COSY.	52

Figura 17.	Apresentam-se as correlações ^{13}C - ^1H a longa distância, observadas no espectro HMBC	53
Figura 18.	Espectros de RMN- ^1H (500 MHz) obtidos para os compostos A1, A2, A3 e A4 isolados da Fração F5_A; solvente DMSO- d_6 .	56
Figura 19.	Estruturas moleculares propostas para os compostos A1, A2, A3 e A4 isolados da fração F5_A.	57
Figura 20.	Separação cromatográfica das frações F2_64, F2_65 e F2_85 A.Cromatograma da fração F2_64, eluída com Água/MeOH/MeCN 80:10:10. B.Cromatograma da fração F2_65 eluída com Água/MeCN 80:20. C. Cromatograma da fração F2_85 eluída com Água/MeCN 80:20	60
Figura 21.	Espectro infravermelho do composto F2 em KBr.	61
Figura 22.	Espectro de massas de alta resolução ESI em modo positivo do composto F2	62
Figura 23.	Espectro de RMN de ^{13}C (126 MHz) em mistura de solventes MeOH- d_4 /Benzeno- d_6 7:3, para o composto F2.	63
Figura 24.	Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em mistura de solventes MeOH- d_4 /Benzeno- d_6 7:3, para o composto F2.	63
Figura 25.	Estrutura molecular proposta e atribuição dos sinais de ^1H e ^{13}C para o composto F2.	67
Figura 26.	Esquema das correlações observadas no espectro COSY do composto F2.	67
Figura 27.	Esquema das correlações observadas no espectro HMBC do composto F2.	68
Figura 28.	Comparação dos espectros NOE diferencial com o espectro RMN- ^1H da amostra F2. Hidrogênios irradiados: — 4,13 ppm (H-3), — 4,00 ppm (H-4a), — 2,98 ppm (H-8), — 2,74 ppm (H-6).	68
Figura 29.	Correlações apresentadas pelos hidrogênios irradiados nos experimentos NOE diferencial para amostra F2.	69
Figura 30.	Configuração relativa proposta para o composto F2, a partir da análise das principais correlações apresentadas no espectro NOESY.	70
Figura 31.	A. Identificação do grupo químico característico dos tremulanos na estrutura do composto F2. B. Estrutura química do Tremulenediol A. Em vermelho ressalta-se a hidroxila presente no composto F2, ausente na estrutura do Tremulenediol A.	71
Figura 32.	Espectro infravermelho do composto C2B em KBr	72
Figura 33.	Espectro de RMN- ^{13}C (125 MHz) em DMSO- d_6 da amostra C2B	74

Figura 34.	Espectro de RMN- ¹ H (500 MHz) em DMSO- <i>d</i> ₆ da amostra C2B	74
Figura 35.	Estrutura molecular proposta e atribuição dos sinais de ¹ H e ¹³ C para o composto C2B.	79
Figura 36.	Esquema das correlações observadas no espectro COSY do composto C2B.	79
Figura 37.	Esquema das correlações observadas no espectro HMBC do composto C2B.	80
Figura 38.	Configuração relativa proposta para o composto C2B, a partir da análise das principais correlações apresentadas no espectro NOESY.	80
Figura 39.	A. Estrutura básica do sesquiterpeno tremuleno ressaltado em negrita. B. Unidades de isopreno presentes na estrutura da molécula do composto C2B.	81
Figura 40.	Espectro infravermelho do composto G6 em KBr.	82
Figura 41.	Espectro de RMN ¹ H (500 MHz) em DMSO- <i>d</i> ₆ da amostra G6.	83
Figura 42.	Estrutura molecular proposta e atribuição dos sinais de ¹ H e ¹³ C para o composto G6.	84
Figura 43.	Esquema das correlações observadas no espectro COSY do composto G6	84
Figura 44.	Esquema das correlações observadas no espectro HMBC do composto G6	84
Figura 45	Sesquiterpeno tremulano que contém nitrogênio (ressalta-se em vermelho) na estrutura (5R,12-dihidroxi-1-tremulen-11-il-2(S)-piroglutamato).Este composto foi isolado do meio de crescimento do fungo <i>Conocybe siliginea</i> .	86

LISTA DE TABELAS

	Pag.
Tabela 1. Estrutura molecular dos principais grupos cromóforos dos corantes	22
Tabela 2. Classificação dos corantes segundo sua fixação com as fibras têxteis	23
Tabela 3. Lista de alguns microrganismos que demonstraram ter capacidade para biodegradar o corante RBBR	26
Tabela 4. Frações obtidas após da separação por EFS da fração 1061-F5	45
Tabela 5. Iões $[M+H]^+$ do espectro de massas de alta resolução ESI em modo positivo dos compostos isolados da fração F5_A	47
Tabela 6. Deslocamentos químicos de RMN de 1H e ^{13}C e correlações apresentadas no HSQC para o composto A1	48
Tabela 7. Correlações observadas no espectro HSQC para o composto F2	63
Tabela 8. Correlações observadas no espectro HSQC para o composto C2B	74
Tabela 9. Correlações observadas no espectro HSQC para o composto G6	84

LISTA DE ANEXOS

	Pag.
Anexo 1. Espectro de massas de alta resolução ESI do composto A1, A2, A3 e A4.	92
Anexo 2. Espectro de HSQC do composto A1 da fração F5_A. Solvente DMSO- d_6	94
Anexo 3. Espectro de HMBC do composto A1 da fração F5_A. Solvente DMSO- d_6	95
Anexo 4. Espectro HSQC do composto F2 em MeOH- d_4 /Benzeno- d_6	97
Anexo 5. Espectro COSY ^1H - ^1H do composto F2 em MeOH- d_4 /Benzeno- d_6	98
Anexo 6. Espectro de HMBC do composto F2 em mistura de solventes MeOH- d_4 /Benzeno- d_6 7:3.	99
Anexo 7. Espectro de RMN-NOESY do composto F2.	101
Anexo 8. Espectro de massas de alta resolução ESI no modo positivo do composto C2B.	102
Anexo 9. Espectro de HSQC do composto C2B em DMSO- d_6	103
Anexo 10. Espectro COSY ^1H - ^1H do composto C2B em DMSO- d_6 .	104
Anexo 11. Espectro HMBC do composto C2B em DMSO- d_6 .	105
Anexo 12. Espectro de RMN-NOESY do composto C2B	106
Anexo 13. Espectro de massas de alta resolução ESI no modo positivo do composto G6.	107
Anexo 14. Espectro COSY ^1H - ^1H do composto G6 em DMSO- d_6	108
Anexo 15. Espectro de HMBC do composto G6 em DMSO- d_6	109
Anexo 16. Espectro de HSQC do composto G6 em DMSO- d_6	110

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

APCI	<i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i>
CCD	Cromatografia de camada delgada
CFG	Cromatografia de filtração em gel
CH₂Cl₂	Diclorometano
CPG	Cromatografia de permeação em gel
COSY	<i>Correlation Espectroscopy</i>
d	Dubleto
DMSO-<i>d</i>₆	Dimetilsulfóxido deuterado
EFS	Extração em Fase Sólida
EM	Espectrometria de massas.
ESI	<i>Electrospray Ionization</i>
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Coherence</i>
HPLC-UV	<i>High Performance Liquid Chromatography – Ultraviolet detection</i>
HPLC-UV-MS	<i>High Performance Liquid Chromatography – Ultraviolet – Mass Spectrometry</i>
HPLC-MS/MS	<i>High Performance Liquid Chromatography–Mass Spectrometry–Mass Spectrometry detection</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence spectroscopy</i>
<i>J</i>	Constante de Acoplamento em Hz
m	Multiplete
MeCN	Acetonitrila
MeOH	Metanol

MeOH-<i>d</i>₄	Metanol deuterado
<i>m/z</i>	Razão massa carga do íon no espectro de massas
PDA	<i>Photodiode Array Detector</i>
RMN	Ressonância magnética nuclear
RMN de ¹³C	Ressonância magnética nuclear de carbono
RMN de ¹H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
r.p.m.	Rotações por minuto
s	Singleto
t	Tripleto
THF	Tetrahidrofurano
u.m.a	Unidade de massa atômica
δ	Deslocamento Químico

1. INTRODUÇÃO

1.1 OS FUNGOS COMO MICRO-ORGANISMOS DEGRADADORES

Em qualquer ecossistema, os fungos estão entre os principais microrganismos decompositores de matéria orgânica como celulose, hemicelulose e lignina. Os fungos têm capacidade para bioacumular e mineralizar materiais tóxicos, assim como liberar e armazenar elementos e íons¹.

Os fungos biotransformam uma ampla gama de poluentes. Estima-se que o reino Fungi possa incluir aproximadamente 100.000 espécies, das quais as que têm apresentado maior atividade degradante de matéria orgânica pertencem aos filos *ascomiceto* e *basidiomiceto*. São conhecidos micro-organismos de 88 gêneros do filo *ascomiceto* e 53 do filo *basidiomiceto* que apresentaram habilidade de biodegradar alcanos, benzeno, tolueno, etilbenzeno, xilenos, cloroalifáticos, fenóis, hidrocarbonetos, pesticidas, fármacos, corantes sintéticos, TNT e outros compostos nitroaromáticos². Entre as espécies de fungos descritas, 34% pertencem ao filo *basidiomicetos* e estes são encontrados com maior frequência em meios terrestres do que em meios aquáticos^{3, 4}.

Para iniciar o processo de biodegradação dos poluentes, estes devem ser expostos aos catalisadores microbianos adequados. Geralmente, os fungos são usados para remover contaminantes que não podem ser degradados eficientemente por bactérias. As bactérias utilizam os contaminantes como substratos de crescimento, se estes microrganismos não têm quantidades mínimas de substrato, sua capacidade catabólica diminui. Isso ocorre quando as concentrações de poluentes são muito

baixas (compostos que se apresentam em traças), ou quando os contaminantes são pouco biodisponíveis (hidrocarbonetos de alto peso molecular) ou substâncias que contém muito pouca energia (compostos altamente oxidados, tais como substâncias cloradas ou nitradas) ⁵.

1.1.1 Fungos de podridão branca

A lignina é a macromolécula responsável pela rigidez da parede celular e o espessamento do tronco das plantas (**Figura 1**). Além disso, é um polímero recalcitrante e quimicamente complexo, considerando-se a heterogeneidade dos grupos funcionais presentes em sua estrutura⁶. Os fungos de podridão branca são os únicos micro-organismos capazes de biotransformar a lignina em CO₂ e H₂O. Estes micro-organismos têm sido muito estudados desde o século passado com o objetivo de aproveitar sua habilidade degradante e encontrar aplicações biotecnológicas, principalmente no tratamento de contaminantes emergentes.

A capacidade que estes fungos têm para interagir com diferentes substâncias orgânicas é pelo fato de produzirem exoenzimas oxidorreduções extracelulares com atividade inespecífica, tais como a peroxidase dependente de manganês (MnP), a peroxidase lignínica (LiP) e a lacase; isso faz com que ofereçam uma grande vantagem ecológica frente às bactérias na decomposição de poluentes^{7,8}.

1.1.2 Fungos do ambiente marinho.

No ambiente marinho podem ser encontrados dois tipos de fungos: fungos marinhos obrigatórios e fungos marinhos facultativos. Os fungos marinhos obrigatórios

são aqueles que crescem e esporulam exclusivamente no meio marinho; os fungos facultativos são de origem terrestre que também crescem em ambientes marinhos.

Figura 1. Fragmento da Lignina.

Fonte: <http://sci.waikato.ac.nz/farm/content/plantstructure.html>

Os fungos marinhos são conhecidos por serem diferentes na sua morfologia e fisiologia em comparação aos fungos de água doce. No entanto, os fungos marinhos ainda são considerados um grupo de micro-organismos apenas definido ecologicamente, mas não taxonomicamente⁹.

Linhagens de fungos marinhos isoladas recentemente têm mostrado ser mais efetivas no tratamento de descoloração de efluentes do que os fungos terrestres. Esta propriedade tem sido atribuída ao fato destes organismos estarem adaptados a condições marinhas como salinidade, alta pressão e alcalinidade¹⁰, que constitui um meio quimicamente mais complexo e com maior ação oxidativa. Assim, os fungos marinhos têm-se tornado espécies potencialmente aplicáveis na biorremediação de matrizes complexas, em presença de sais e numa ampla faixa de valores de pH¹¹.

A maior parte dos fungos encontrados até o momento em ambientes marinhos pertence principalmente aos filos *ascomycota* e *basidiomicota*, fungos que também são encontrados em grande diversidade no ambiente terrestre. Isto sugere que provavelmente as hifas fúngicas terrestres e esporos são transportados da terra ao oceano e se adaptam de forma gradual às condições extremas de salinidade e pH do mar⁹.

No entanto, vários relatos da literatura descrevem a existência de *basidiomicetos* em ecossistemas marinhos. Por exemplo, a presença de fungos pertencentes à ordem *Polyporales* em ambientes marinhos foi relatada pela primeira vez em 2008 a partir da identificação do fungo *Basidiomycete* sp. cepa LC5 isolado da esponja *Suberites zeteki*¹².

Além disso, a presença de fungos comuns, tais como espécies de *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium* e *Trichosporon* também têm sido registradas em ecossistemas marinhos⁹. Portanto, os oceanos são uma importante reserva de micro-organismos saprófitos que desempenham um papel importante nos ciclos biogeoquímicos sob condições extremas, constituindo uma grande reserva de linhagens microbianas com excelente potencial biotecnológico, ainda pouco explorado.

1.1.3 Fungo do ambiente marinho *Tinctoporellus* sp. (CBMAI 1061)

O fungo *Tinctoporellus* sp. (filo *basidiomiceto*, ordem *Polyporales*) foi isolado da esponja *Dragmacidon reticulata* (**Figura 2**), coletada na costa nordeste do estado de São Paulo, no município de São Sebastião. Esta linhagem apresentou atividade

enzimática característica dos fungos de podridão branca, apresentando produção de enzimas ligninolíticas como lacase, peroxidase lignínica (LiP) e peroxidase dependente de manganês (MgP)¹³, o que faz deste fungo um potencial candidato a ser utilizado em processos de biorremediação.

Figura 2. Esponja marinha *Dragmacidon reticulata* fonte do fungo basidiomiceto CBMAI 1061

O fungo CBMAI 1061 é considerado um fungo marinho facultativo, já que os fungos do gênero *Tinctoporellus* são encontrados com maior frequência em habitats terrestres¹⁴.

1.2 CORANTES SINTÉTICOS: *Remazol Brilliant Blue R* (RBBR) ou *Reactive Blue 19*.

Os corantes artificiais são compostos recalcitrantes, capazes de resistir ao ataque microbiano, à exposição à luz solar e ao tratamento com diferentes substâncias químicas. Apesar da dificuldade para serem removidos de efluentes industriais, os corantes sintéticos ainda são amplamente usados, especialmente devido a seu baixo

custo, à ampla gama de cores que fornecem e a sua alta estabilidade quando comparados com os corantes naturais^{15, 16}.

Quanto à sua estrutura molecular, os corantes sintéticos se classificam segundo o grupo cromóforo responsável pela cor do composto, sendo os mais comuns os azóicos, as antraquinonas, os indólicos, assim como os corantes derivados do triarilmetano (**Tabela 1**). Além do cromóforo, na estrutura molecular dos corantes também se encontram grupos eletrofílicos encarregados de reagir com grupos OH, SH e NH₂ das fibras têxteis, responsáveis pela sua fixação. Adicionalmente, os corantes podem ser classificados como ácidos, básicos, reativos e diretos (**Tabela 2**)¹⁷.

Tabela 1. Estrutura molecular dos principais grupos cromóforos dos corantes

Família	Grupo Cromóforo	Exemplo
Azóicos	Ar – N=N – Ar Grupo Azo	Amarelo disperso 3
Antraquinonas	Antraquinona	Tetraaminoantraquinona
Indólicos	Índigo	Púrpura do Tiro
Derivados do triarilmetano	Cátion trifenilmetilo	Violeta de cristal

Tabela 2. Classificação dos corantes segundo sua fixação com as fibras têxteis

Tipo de corante	Tipo de fixação	Uso
Direto	O corante é fixado à fibra através de ligações de hidrogênio com os grupos hidroxila da celulosa. A maioria deles são os corantes azóicos com grupos azo diferentes.	Tingir fibras celulósicas, naturais ou sintéticas.
Dispersos	Aderem-se às fibras por interações dipolares.	Coloração de fibras acrílicas, poliamidas, poliésteres e fibras acetato de celulosa.
Ácidos (aniônicos) ou Básicos (catiônicos)	O corante liga-se ao tecido por forças polares, formando sais. Os corantes ácidos geralmente são sais de sódio de grupos sulfônicos presentes em corantes azo. Os básicos são sais de amônio quaternário.	Tingir lã e seda.
Reativos	São fixados ao tecido através da formação de ligações covalentes, tornando-se altamente resistentes à lavagem.	Inicialmente foram utilizados para o tingimento de algodão e outras fibras celulósicas; agora, também são usados para tingir lã, seda e poliamidas sintéticas.

O *Remazol Brilliant Blue R* (RBBR), também conhecido como *Reactive Blue 19* é o corante cuja degradação foi estudada no presente trabalho. É um corante reativo antraquinônico e aniônico, sua estrutura é apresentada na **Figura 3**. Tal como outros corantes reativos, que apresentam a função antraquinona, o RBBR caracteriza-se por ser altamente solúvel em água e dar estabilidade à cor dos tecidos, devido à formação de ligações covalentes entre o corante e a fibra¹⁸. Por ser antraquinônico pertence ao segundo grupo de corantes mais utilizados, principalmente para tingir algodão e couro, já que fornece cores brilhantes, resistentes à luz e seu cromóforo é estável nos meios ácidos e básicos¹⁷. São reconhecidos por apresentarem tonalidades azuis, roxas e verdes¹⁹. O RBBR também é muito utilizado como material de partida para a síntese de

corantes poliméricos utilizados no tingimento de couro, de fibras naturais e artificiais, e de papel.

O RBBR é um composto derivado do antraceno, considerado um contaminante recalcitrante que apresenta uma alta toxicidade devido a que apresenta um comportamento químico similar à dos compostos que pertencem à família de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), os quais se caracterizam por ser compostos altamente lipossolúveis e muito difíceis de ser metabolizados. Além disso, a maior parte da toxicidade destes compostos se deve principalmente à formação de espécies reativas de oxigênio a partir da biotransformação dos HPAs, que podem produzir danos em diversas biomoléculas, como proteínas e incluso no DNA ²⁰.

Figura 3. Estrutura química do corante *Remazol Brilliant Blue R*. Fórmula molecular $C_{22}H_{16}N_2Na_2O_{11}S_3$. Massa molar $626.54 \text{ g mol}^{-1}$.

Devido às características mencionadas anteriormente, este corante é considerado um bom representante das substâncias xenobióticas e tem sido empregado em uma grande quantidade de estudos para avaliar a capacidade biorremediadora de diferentes fungos.

1.3 CORANTES COMO MOLÉCULAS MODELOS EM PROCESSOS DE BIODEGRADAÇÃO

Desde 1983, quando Glenn e Gold determinaram que a atividade de degradação ligninolítica do fungo *Phanerochaete chrysosporium* foi responsável pela descoloração de vários corantes sintéticos²¹, estas substâncias têm sido consideradas dentre os melhores substratos a serem degradados pelo sistema de enzimas produzidas pelos fungos de podridão branca. Atualmente, os corantes sintéticos são amplamente empregados como moléculas modelo na avaliação da capacidade degradante de micro-organismos.

Um grande número de antecedentes do uso de corantes como moléculas modelo na avaliação da capacidade biorremediadora de fungos pode ser encontrado na literatura. Existem vários exemplos sobre a capacidade de diversos fungos terrestres do gênero *Tinctoporellus* para degradar ou descolorir vários corantes sintéticos. Por exemplo, *Tinctoporellus epimiltinus* foi capaz de degradar os corantes têxteis azul ácido 62 em meio sólido e *Remazol Yellow RGB*, *Remazol Red RR* e *Remazol Black B 133* em meio líquido²².

Os corantes do grupo azo e antraquinônico pertencem aos principais corantes utilizados para avaliar a capacidade degradante de fungos e outros micro-organismos. O RBBR tem sido amplamente usado em estudos de descoloração e degradação utilizando diversos micro-organismos²³. Várias publicações relatam a utilização de várias leveduras e fungos filamentosos na degradação do RBBR (**Tabela 3**). Um estudo recente realizado com o fungo *Pleurotus pulmonarius* demonstrou que este micro-

organismo conseguiu descolorir 97% do corante em seis dias RBBR sob condições de fermentação sólida²⁴.

A biorremediação do RBBR por fungos do ambiente marinho tem sido pouco estudada. São conhecidos relatos por fungos do ambiente marinho²⁵ como *Schizophyllum commune* (pertencente à ordem *Agaricales*)¹² e *Peniophora* sp²⁶, que conseguiram degradar o RBBR em meios de fermentação sólidos e líquidos.

Tabela 3. Lista de alguns microrganismos que demonstraram ter capacidade para biodegradar o corante RBBR.

LEVEDURAS – Ascomycetas	
<i>Candida lipolytica</i>	Aksu e Donmez (2003) ²⁷
<i>Candida tropicalis</i>	Donmez (2002) ²⁸
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Aksu e Donmez (2003) ²⁴
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Aksu e Donmez (2003) ²⁴
<i>Ganoderma</i> sp.	Maximo et al. (2003) ²⁹
<i>Irpex lacteus</i>	Maximo et al. (2003) ²⁹
	Bhatt et al. (2000) ³⁰
	Kasinath et al. (2003) ³¹
FUNGOS FILAMENTOSOS – Basidiomycetos	
<i>Phanerochaete magnoliae</i>	Maximo et al. (2003) ²⁹
<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	Balan e Monteiro (2001) ³²
<i>Rigidoporus</i> sp.	Maximo et al. (2003) ²⁹
<i>Sclerotium rolfsii</i>	Nyanhongo et al. (2002) ³³
<i>Trametes modesta</i>	Nyanhongo et al. (2002) ³³
<i>Trametes versicolor</i>	Borchert y Libra (2001) ³⁴
	Minussi et al. (2001) ³⁵
	Nyanhongo et al. (2002) ²⁹
<i>Trametes villosa</i>	Minussi et al. (2001) ³⁵

Também, Bonugli-Santos et al., demonstraram que o fungo do ambiente marinho CBMAI 1061 apresenta alta efetividade na capacidade descolorante do RBBR em meio sólido, depois de três dias de incubação²⁵. No entanto, a capacidade biorremediadora do RBBR em meio líquido por este fungo ainda não foi estabelecida e este é um estudo importante, uma vez que o meio líquido é um modelo adequado para explorar a degradação de uma ampla gama de substâncias recalcitrantes que se encontram em solução.

1.4 PRODUTOS METABÓLICOS E ROTAS DE BIODEGRADAÇÃO

Uma grande quantidade de produtos da biodegradação de vários corantes sintéticos pode ser encontrada na literatura. Os produtos gerados na descoloração dos corantes *Reactive blue 15* e *Reactive blue 38* por *Bjerkandera adusta* foram identificados como sulfoftalimidas (SPIs)¹. A descoloração do corante Cm-s por *Trametes versicolor* levou à formação de ácido meta-hidroxibenzóico e álcool meta-benzílico¹.

Alguns estudos sobre a transformação do corante RBBR por métodos físico-químicos têm revelado alguns produtos gerados na sua degradação³⁶⁻³⁹; no entanto, pouca informação é conhecida sobre a natureza dos produtos metabólicos e as vias de biodegradação do corante RBBR por fungos. Só três trabalhos foram encontrados nas bases de dados *Scopus* e *Sciencedirect* a este respeito.

No primeiro destes, os autores propõem uma rota da biotransformação do RBBR utilizando a enzima lacase do fungo *Trametes pubescens* imobilizada sobre alumina. Os produtos formados foram analisados por HPLC-UV-MS²⁰. No segundo estudo foi proposta uma rota para o metabolismo do RBBR pela enzima lacase do fungo *Polyporus* sp. S133. Os produtos formados foram analisados por HPLC-MS¹¹. O terceiro trabalho relata o estudo dos produtos gerados na degradação de RBBR por três linhagens de fungos *Aspergillus* e por *Phanerochaete chrysosporium*, durante a validação de um método analítico de quantificação por HPLC-MS/MS para moléculas altamente tóxicas⁴⁰. Os produtos de decomposição relatados, nos três estudos anteriormente citados, são apresentados de forma esquemática na **Figura 4**.

Figura 4. Estrutura molecular dos produtos da biotransformação do corante RBBR. **1.** *Remazol Brilliant Blue R*. ($C_{22}H_{16}N_2Na_2O_{11}S_3$ massa: 626 g/mol)

2. JUSTIFICATIVA

Atualmente existe uma preocupação mundial crescente com relação à contaminação do meio ambiente, causada pela grande quantidade de águas residuais produzidas por diversos processos industriais. Consequentemente, o interesse no estudo de métodos alternativos de tratamento destes efluentes que permitam reutilização destas águas e a diminuição de sua toxicidade tem aumentado, com a finalidade de que esses efluentes retornem aos ecossistemas aquáticos sem gerar impactos negativos no meio ambiente e na saúde dos seres vivos.

Os tratamentos convencionais de efluentes industriais incluem processos que envolvem floculação, sedimentação, filtração, biossorventes, biorreatores, processos de oxidação avançada com radiação, como a fotólise e fotocátalise, e sem radiação, como os tratamentos eletroquímicos, ozonização, sonólise e processos Fenton⁴¹⁻⁴³. No entanto, estes processos apresentam várias desvantagens, relacionadas ao fato de que muitos poluentes podem passar por estes sistemas de tratamento sem que sejam degradados ou retidos, podendo ser acumulados nos resíduos finais. Além disso, estes procedimentos são custosos, de aplicação limitada e produzem grandes quantidades de resíduos que precisam de tratamentos posteriores.

Além dos métodos descritos anteriormente, o tratamento biológico ou biorremediação é considerado uma excelente opção para a degradação de contaminantes emergentes, por constituir tecnologias ecologicamente mais limpas e de baixo custo, quando comparado com os procedimentos convencionais^{14, 44}.

A biorremediação, ou decomposição microbiológica, faz uso de micro-organismos tais como fungos, bactérias e algas, que, por ação enzimática, podem biotransformar os poluentes em compostos de menor tamanho e baixa toxicidade.

Dentre a grande diversidade de micro-organismos que pode ser empregada nos processo de biorremediação, os fungos se destacam na degradação de uma grande variedade de substâncias tóxicas para o meio ambiente levando, em alguns casos, até a mineralização completa destas substâncias. Tal é o caso de fenóis, compostos organoclorados, hidrocarbonetos aromáticos, pesticidas, corantes sintéticos, polímeros e outros poluentes emergentes ^{5, 45-49}.

Diante do exposto, e, se considerando a necessidade do desenvolvimento de novos e melhores processos no tratamento de poluentes, o presente trabalho estudou a capacidade do fungo do ambiente marinho, *Tinctoporellus* sp., para degradar o corante RBBR, estudando-se a cinética deste processo e identificando-se os produtos finais desta biodegradação.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Identificar os produtos da degradação do corante *Remazol Brilliant Blue R* (RBBR) produzidos pela ação do fungo do ambiente marinho *Tinctoporellus* sp.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o tempo de degradação máxima do corante RBBR, monitorando-se a alteração do perfil do espectro de ultravioleta do RBBR no meio de fermentação de um experimento de pequena escala.
- Realizar o experimento de degradação do RBBR em maior escala.
- Obter os compostos de degradação isolados e purificados.
- Elucidar a estrutura molecular dos metabólitos produzidos após a degradação utilizando técnicas cromatográficas e espectroscópicas como RMN, IR, UV e EM.

4. METODOLOGIA

A linhagem do fungo *Tinctoporellus* sp. está depositada na Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria do CPQBA–UNICAMP, sob o número de acesso CBMAI 1061.

4.1 CONSERVAÇÃO DA LINHAGEM FÚNGICA.

Foi utilizado o repique contínuo como técnica para a conservação da linhagem. Esta técnica consiste em transferir células do fungo para um meio novo e após crescimento armazenar em baixas temperaturas.

A linhagem foi inoculada no centro de placas de *Petri* contendo meio de cultura constituído por ágar e extrato de malte 2% (M2) preparado com água deionizada. Como o fungo *Tinctoporellus* sp. não esporula em meio de crescimento, não foi necessário estriar o repique, sendo suficiente transferir dois *pellets* para sua conservação. O processo de conservação foi repetido cada três meses para evitar a perda da linhagem fúngica devido à morte celular por falta de nutrientes.

4.2 CRESCIMENTO DO FUNGO EM MEIO SÓLIDO

A linhagem do fungo foi recuperada sete dias antes da inoculação em meio líquido. Foram preparados e autoclavados meios de cultura sólidos constituídos por ágar, M2 e água deionizada em placas de *Petri* que posteriormente foram armazenadas a 28 °C.

4.3 INOCULAÇÃO DO MEIO LÍQUIDO

Depois de recuperadas as linhagens, dez *pellets* de 0,5 cm de diâmetro das margens das colônias cultivadas nas placas de *Petri* foram inoculados em frascos de 500 mL contendo 200 mL de caldo M2 preparado com água destilada. Os frascos foram incubados a 28°C e 160 r.p.m por 72 horas.

4.4 ADIÇÃO DO CORANTE

Após 72 horas de inoculação do fungo em meio líquido, foram adicionados 20 mL de uma solução aquosa do corante RBBR a uma concentração de 500 mgL⁻¹ previamente filtrada através de membrana de 0,22 µm (Millipore Corporation, Massachusetts, EE.UU.). Após a adição do corante, os frascos foram incubados a 28°C e 160 r.p.m.

4.5 CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO

A cada 24 horas, durante 17 dias, foram retiradas alíquotas de 1 mL dos experimentos de crescimento do fungo em meio líquido na presença de RBBR. Paralelamente foram realizados experimentos não inoculados (controle). As alíquotas foram filtradas com algodão para separar o micélio ou qualquer partícula sólida do meio líquido.

As alíquotas foram analisadas em espectrofotômetro UV-Vis JASCO V-630 (JASCO, Inc., Maryland, EE.UU), medindo-se a absorção em $\lambda_{\max}$ 580 nm. O ensaio de controle não inoculado foi utilizado como padrão de absorbância para medida da porcentagem de degradação do corante RBBR a cada dia.

4.6 EXTRAÇÃO E ISOLAMENTO DOS COMPOSTOS PRODUZIDOS NO PROCESSO DE DEGRADAÇÃO

4.6.1 Crescimento a larga escala

Após determinado o tempo de degradação máxima do experimento em pequena escala, foi realizado um experimento em maior escala para obter massa suficiente de meio de cultivo que permitisse o isolamento dos compostos produzidos na degradação.

Foram inoculados 30 frascos *Schott* de 500 mL contendo 200 mL de meio de cultura e incubados a 28°C e 160 r.p.m por 72 horas. Após este período, foi adicionada a solução de RBBR e os frascos foram incubados sob as mesmas condições durante 12 dias.

4.6.2 Obtenção e limpeza dos extratos

Após o período de fermentação, o micélio foi separado do meio líquido por filtração a vácuo, utilizando-se um funil de vidro sinterizado acoplado a um kitassato. Utilizou-se papel de filtro coberto por uma camada de 1 cm de celite.

Os meios de cultura livres de micélio foram submetidos a uma extração em fase sólida, utilizando-se uma mistura, em proporção 1:1:1 das resinas não iônicas Amberlite XAD-2, XAD-4 e XAD-7 (Sigma-Aldrich, Missouri, EE.UU), e sob agitação orbital por 24 horas. Após este período, as resinas foram separadas do meio de cultura por filtração a vácuo, utilizando-se um funil de Buchner acoplado a um kitassato. A fração aquosa foi descartada.

Para a recuperação dos analitos retidos nas resinas foi realizada uma extração exaustiva com uma mistura 1:1 MeOH-acetona. A fração orgânica foi evaporada em evaporador rotativo e transferida para um frasco previamente pesado e etiquetado.

O extrato obtido foi solubilizado em 4 mL de MeOH e dividido em duas partes, as quais foram fracionadas por cromatografia em coluna de *Sephadex* LH-20. Utilizou-se uma coluna de vidro com dimensões de 170 cm de comprimento e 2 cm de diâmetro. A eluição foi feita com MeOH grau analítico em modo isocrático. Foram coletadas frações de 8 mL.

Estas frações foram avaliadas por CCD utilizando folhas de sílica gel 60 sobre poliéster com indicador ultravioleta F₂₅₄ 20 x 20 cm (*Sigma Aldrich*, EE.UU). A eluição foi realizada utilizando uma mistura de CH₂Cl₂/MeOH na proporção 8:2 como eluente.

As placas cromatográficas foram observadas sob luz UV nos comprimentos de onda 254 e 365 nm, borrifadas com uma solução 20% de ácido fosfomolibdico em EtOH e submetidas a aquecimento. Após a análise por CCD as frações semelhantes foram reunidas, evaporadas em evaporador rotativo e transferidas para frascos previamente pesados e etiquetados.

As frações foram diluídas à concentração de 2 mgL⁻¹ e analisadas em um cromatógrafo líquido modelo Alliance 2695 (*Waters*®, Milford, MA, EEUU) acoplado a um detector de arranjo de fotodiodo modelo 2996 com varredura no UV-Vis entre 200 e 800 nm (*Waters*®, Milford, MA, EEUU) e a um espectrômetro de massas *Micromass* modelo ZQ 2000(*Waters*®, Milford, MA, EEUU), com *electrospray* como modo de ionização e analisador de quadrupolo com varredura entre 200 e 1000 Da. A

temperatura da fonte de ionização foi 100 °C e a temperatura de dessolvatação foi 300°C com fluxo de gás no cone de 50 Lh⁻¹.

Para esta análise foi empregada uma coluna analítica de sílica gel derivatizada com grupo fenila Inertsil Ph 5 µm [4,6mm x 250mm] (GL-Sciences Inc., Japan). As condições cromatográficas de análise utilizadas foram: modo de eluição por gradiente utilizando como solvente (A) MeOH + ácido fórmico, (B) MeCN + ácido fórmico e (C) solução tampão 30 mM de ácido acético/acetato de amônia (pH 4,5); iniciou-se com 20% de solvente A e 20 % do solvente B após aumento linear em 20 minutos até 40% de A e 40 % de B permanecendo neste último por 10 minutos com fluxo de 1 mL min⁻¹. O decréscimo de A e B até 20% foi mantido durante 5 minutos e mantida nesta última condição por 5 minutos para reequilibrar a coluna na condição inicial.

As frações a serem purificadas foram selecionadas considerando-se os seguintes critérios: a quantidade de compostos relacionada com o número de picos cromatográficos e a área sob a curva do cromatograma obtido para cada fração, bem como a presença de bandas de absorção no perfil do espectro de UV característica para compostos insaturados ou aromáticos.

As frações selecionadas para serem purificadas que apresentaram uma massa maior a 100 mg foram fracionadas em uma coluna pré-empacotada com sílica-gel derivatizada com C₁₈ (1 g), condicionada com 100% MeOH, 1:1 H₂O/MeOH e 100% H₂O. Após a aplicação do meio de cultura, a coluna foi lavada com 100% H₂O para se eliminar resíduos do meio de cultura.

Os analitos foram dessorbidos em modo gradiente utilizando-se uma mistura MeOH/H₂O e um volume de eluição de 40 mL. O solvente foi evaporado e as frações obtidas foram transferidas para frascos previamente pesados.

4.6.3 Purificação e isolamento

Para se obter os compostos puros oriundos da degradação do RBBR puros foi realizado um processo de fracionamento em um cromatógrafo líquido modelo Alliance 2695 (*Waters*[®], Milford, MA, EEUU) acoplado a um detector de UV-visível modelo 2487 (*Waters*[®], Milford, MA, EEUU) com leitura em dois comprimentos de onda. Foi utilizada uma coluna analítica de sílica gel derivatizada com grupo fenila Inertsil Ph5 µm [4,6mm x 250mm] (GL – Sciences Inc, Japan).

As substâncias obtidas no processo anterior foram secas em um sistema de centrifuga a vácuo Savant modelo *Speedvac*[®] Plus SC 210 (Savant Instruments, Inc., New York, EEUU). As condições cromatográficas foram otimizadas para cada fração, com o intuito de obter a melhor separação dos picos cromatográficos para garantir um maior grau de pureza das substâncias isoladas.

4.6.4 Identificação dos produtos isolados por técnicas espectroscópicas

Espectroscopia vibracional na região do infravermelho (IV)

Os espectros foram obtidos sobre pastilhas de composição 0,5% de brometo de potássio (KBr). Foi utilizado um espectrofotômetro de infravermelho com

transformada de Fourier da Bomen Michelson, MB – série FTIR, modelo MB – 102 FTIR, com 32 varreduras, em uma faixa espectral de 4000 a 400 cm^{-1} .

Rotação ótica $[\alpha]_D$

As medidas de rotação ótica foram obtidas em um polarímetro *Jasco P-2000*. As amostras foram dissolvidas em 2 mL de MeOH grau analítico e o experimento realizado a 25 °C.

Espectrometria de massas de alta resolução (EMAR)

Para a obtenção dos espectros de massas de alta resolução foi utilizado um espectrômetro de massas LTQ-Orbitrap Velos (*Thermo Fisher Scientific Inc.*, Waltham, MA, EE.UU.), modo de ionização ESI (*Electrospray Ionization*, por sua sigla em inglês) no modo do íon positivo. Infusão direta do padrão. Voltagem da descarga da fonte de ionização 3700 V e temperatura do capilar 350 °C.

Espectrometria por ressonância magnética nuclear (RMN)

As frações purificadas foram submetidas à análise por RMN- ^1H em alíquotas diluídas em metanol ($\text{MeOH-}d_4$), benzeno ($\text{Benzene-}d_6$) ou dimetilsulfóxido ($\text{DMSO-}d_6$) [*Cambridge Isotope Laboratories, Inc.*, Tewksbury, MA, EE. UU]. Também foram realizadas análises de RMN de ^{13}C , COSY $^1\text{H-}^1\text{H}$, HSQC e HMBC, quando necessário. As análises foram realizadas utilizando-se os seguintes aparelhos: Bruker DRX 400 (9,4 Tesla) operando a 400,25 MHz na frequência do hidrogênio (^1H) e 100,10 MHz na frequência do carbono (^{13}C) no Departamento de Química da Universidade de São

Carlos (UFSCar) e *Agilent Technologies 500/54 Premium Shielded* (Billerica, MA, EE.UU.), de 499,85 MHz na frequência do ^1H e de 125,70 MHz na frequência do ^{13}C na Central de Análises Químicas (CAQI) do Instituto de Química de São Carlos (IQSC–USP).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO DO *Remazol Brilliant Blue R* PELO FUNGO DO AMBIENTE MARINHO *Tinctoporellus* sp.

A descoloração do RBBR pelo fungo CBMAI 1061 foi estudada através da realização de experimentos de degradação do corante durante um período de 17 dias. Foi medida a variação da absorbância do meio de crescimento do fungo em relação ao tempo, a partir de alíquotas da solução de corante inoculada e do experimento de controle (solução do corante sem inocular).

A porcentagem de descoloração foi determinada segundo a **Equação 1**. A absorbância máxima a 580 nm do espectro de UV/Vis do experimento inoculado foi comparada com a absorbância máxima do espectro de UV/Vis do experimento controle no mesmo comprimento de onda.

$$Descoloração(\%) = \frac{100 - Abs_{Amostra}}{Abs_{Control}}$$

Equação 1. Determinação da porcentagem de descoloração do RBBR no meio de fermentação. $Abs_{amostra}$ e $Abs_{Control}$ são a absorbância do meio fermentado e do meio de cultura não inoculado a 580 nm.

Na **Figura 5** são apresentadas as porcentagens de descoloração calculadas. Pode-se observar que o fungo realizou a biotransformação de 90% do corante após 12 dias de fermentação. A porcentagem de descoloração entre os dias 13 e 17 foi aproximadamente 1% sugerindo que o processo de degradação tornou-se estável.

Figura 5. Porcentagem de descoloração da solução do corante RBBR inoculada em relação ao tempo de degradação. No décimo segundo dia observou-se 90% de degradação do corante. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Na **Figura 6A** observa-se a mudança do espectro de absorção no UV/Vis do corante durante a degradação, indicando que a concentração do corante no meio de cultura diminui com o transcorrer do tempo. Esta redução pode acontecer devido a dois processos: à biodegradação do corante ou à absorção deste pelo micélio do fungo.

Para determinar qual dos dois processos foi aquele que ocorreu durante a realização do experimento, foi medida a absorbância da solução do corante no meio de fermentação em dois comprimentos de onda e, avaliada a mudança no índice de absorção ($Abs_{\lambda 2}/Abs_{\lambda 1}$) como função do tempo. Um processo de absorção faz que os comprimentos de onda diminuam significativamente, mas a proporção de absorção permanece constante. Já no processo de degradação o índice de absorção muda com o tempo, uma vez que a variação da absorbância em cada um dos comprimentos de onda depende dos segmentos moleculares envolvidos na biotransformação.

Para a realização dos cálculos de porcentagem de descoloração do meio de crescimento foram selecionadas as absorvâncias nos comprimentos de onda 500 nm e 580 nm. O índice de absorção calculado a partir destes valores apresentou mudança em relação ao tempo, o que indica que a descoloração da solução é devida a um processo de degradação, uma vez que a biotransformação não afeta igualmente a absorção em todos os comprimentos de onda como se observa na **Figura 6B**.

Pode-se observar que o índice de absorção (Abs_{580}/Abs_{500}) calculado para o experimento de degradação diminuiu com o tempo, enquanto que o índice calculado para o meio de controle de corante sem inoculação do fungo permaneceu constante. Isto indica que o corante foi degradado, o que levou a uma mudança de coloração azul à laranja do meio de cultura durante o processo de degradação (**Figura 7**).

Figura 6. Degradação do RBBR pelo fungo *Tinctoporellus* sp. (CBMAI 1061), após 17 dias no meio de cultura M2, 20 mL de solução 500 ppm de RBBR, 28 °C agitação de 140 rpm. **A.** Variação do espectro de absorção no UV-Vis do corante durante o período de degradação. **B.** Relação de absorvâncias 580nm/500nm para o meio de fermentação inoculado com o fungo *Tinctoporellus* sp. e o meio sem inoculação do fungo.

Figura 7. Mudança na cor da solução do RBBR devido à degradação do corante pelo fungo *Tinctoporellus* sp.

5.2 PRODUÇÃO DO EXTRATO BRUTO DO MEIO DE FERMENTAÇÃO DO CORANTE RBBR PELO FUNGO *Tinctoporellus* sp. EM MAIOR ESCALA

A linhagem do fungo CBMAI 1061 crescida em meio sólido apresentou colônia característica de fungos filamentosos, textura algodonosa de coloração branca como se pode observar na **Figura 8**. O crescimento do fungo foi relativamente rápido, já que após sete dias o tamanho da colônia ocupava o área total da superfície das placas de cultivo.

Figura 8. Fotografia da linhagem CBMAI 1061 crescida em meio sólido, extrato de malte 2% (M2) e ágar bacteriológico, após sete dias de incubação a 28° C.

Uma vez crescido o fungo em meio sólido durante sete dias, este foi inoculado em meio líquido durante 72 horas, observando-se um crescimento esférico das colônias do fungo. Esta morfologia está ilustrada na fotografia apresentada na **Figura 9**.

Figura 9. Fotografia da linhagem CBMAI 1061 crescida em meio líquido extrato de malte 2%, após sete dias de incubação a 28° C e agitação 160 RPM.

Quando o fungo cresceu em meio líquido, foi adicionado o corante para ser degradado durante 12 dias, já que neste período foi obtida a maior porcentagem de descoloração do meio de fermentação.

5.3 EXTRAÇÃO E ISOLAMENTO DOS ANALITOS DE INTERESSE

Após realizar o procedimento descrito no item **4.1.6** para extrair os analitos de interesse do meio de cultura, foram obtidos 1,2 g de extrato bruto. Este extrato foi submetido a uma separação por cromatografia em coluna por exclusão de tamanho utilizando-se como fase estacionária a *Sephadex* LH-20 (eluente: MeOH), sendo coletadas 60 frações as quais foram avaliadas por CCD e reunidas de acordo com o perfil de separação observado. Foram obtidas 6 frações (**Esquema 1**), que em etapa seguinte foram analisadas por HPLC-UV-MS.

As frações foram designadas da seguinte forma:

Esquema 1. Frações obtidas após de fazer cromatografia em coluna por exclusão de tamanho. Legenda: Frações selecionadas para isolar os compostos de interesse.

O cromatograma obtido para a fração **1061-F5** apresentou picos cromatográficos cujos espectros de absorção UV-Vis indicaram a presença de possíveis produtos de degradação do RBBR, já que foram observados máximos de absorção entre 200-250 nm, 260-300 nm e na região dos 300-600 nm, sinais característicos para compostos antraquinônicos. Na fração **1061_F2** foram detectados compostos produzidos no meio de degradação do corante, possíveis metabólitos secundários de interesse, cujos espectros de UV-Vis apresentam máximos de absorção na região entre 290 e 300 nm. Por este motivo, estas duas frações foram selecionadas para isolamento e purificação de analitos por HPLC-UV.

5.3.1 Isolamento e purificação dos compostos extraídos da fração F5_A

Inicialmente, a fração **1061-F5** (21,1 mg) foi fracionada por extração em fase sólida (EFS) em modo gradiente com H₂O/MeOH, sendo obtidas 12 frações (**Tabela 1**). Estas frações foram analisadas por HPLC-UV-MS. Como os perfis cromatográficos das frações **1061_F5_10_D**, **1061_F5_10_E**, **1061_F5_10_F** e **1061_F5_30_A** apresentaram os mesmos picos cromatográficos, estas foram reunidas em uma nova fração chamada de **F5_A**.

A fração **F5_A** (7,7 mg) foi fracionada por HPLC-UV, sendo isolados quatro compostos puros (**Figura 10**), designados de **F5_A1** (3 mg), **F5_A2** (1 mg), **F5_A3** (1,2 mg) e **F5_A4** (1,9).

Tabela 4. Frações obtidas após da separação por EFS da fração 1061-F5. Legenda: Frações que apresentaram um perfil cromatográfico similar foram reunidas e a nova fração chamada F5_A

Amostra	Massa (mg)
F5_10_A	5,7
F5_10_B	4,5
F5_10_C	1,3
F5_10_D	2,0
F5_10_E	1,4
F5_10_F	2,5
F5_30_A	1,3
F5_30_B	0,5
F5_40_A	0,5
F5_40_B	5,5
F5_50_A	0,5
F5_60_A	1,6

Figura 10. Cromatograma do fracionamento por HPLC_UV de F5_A ($\lambda = 254$ nm). Eluição em modo isocrático; composição da fase móvel (MeCN):(0,02 M tampão acetato de amônio/ácido acético, pH 4,5) na proporção 24:76. Coluna analítica Inertsil Ph 5 μ m [4,6mm x 250mm].

5.3.2 Identificação dos compostos extraídos da fração F5_A

5.3.2.1 Análise do espectro de UV-Vis

Os espectros de ultravioleta de cada um dos compostos isolados apresentam máximos de absorção entre 200-250 nm, bandas atribuídas ao fragmento benzenóide do cromóforo do RBBR. Observaram-se também, bandas de absorção entre 260-300 nm, atribuídas à presença do agrupamento quinona, e outra banda na região dos 300-600 nm, característica de antraquinonas (**Figura 11**). Assim, pôde-se inferir que estes

compostos são derivados da antraquinona, possivelmente formados a partir da degradação do RBBR pelo fungo CBMAI 1061. As diferenças observadas nos máximos de absorção dos espectros de UV na **Figura 11** estão relacionadas com a presença de diferentes substituintes, uma vez que, estes podem induzir o deslocamento batocrômico das bandas de absorção.

Figura 11. Espectros UV-Vis dos compostos isolados da fração F5_A.

5.3.2.2 Análise dos espectros de massas por nebulização de elétrons dos compostos isolados da fração F5_A

Os espectros de massas de alta resolução em modo de ionização por nebulização de elétrons dos compostos isolados (**Anexo 1**) permitiram identificar o íon molecular no modo negativo $[M-H]^-$ para cada um dos compostos obtidos (**Tabela 5**). Observando-se a distribuição isotópica para cada íon molecular, conclui-se **A3** contém um átomo de cloro e **A4** um átomo de bromo.

Tabela 5. Íons $[M-H]^-$ do espectro de massas ESI dos compostos isolados da fração F5_A

Amostra	$[M+H]^+$, (% Abundância relativa)	Massa molecular/ u.m.a.
F5_A1	$m/z = 302$ (100)	$m/z = 303$
F5_A2	$m/z = 318$ (100)	$m/z = 319$
F5_A3	$m/z = 336$ (100) $m/z = 338$ (19)	$m/z = 337$
F5_A4	$m/z = 380$ (99) $m/z = 382$ (100)	$m/z = 381$

5.3.2.3 Elucidação estrutural dos compostos isolados

5.3.2.3.1 Grupos funcionais e estruturas parciais detectadas nos espectros de RMN de 1H e ^{13}C do composto F5_A1.

O espectro de RMN de ^{13}C do composto F5_A1 apresentado na **Figura 12** exibe 14 sinais de carbonos. Os sinais C-9 e C-10 encontram-se na faixa de deslocamentos químicos típicos para carbonilas que caracterizam um núcleo antraquinônico¹, enquanto que os 12 sinais restantes apresentam deslocamentos químicos característicos para carbonos aromáticos. Esta informação, complementada com a análise realizada para o espectro de UV-Vis no item 5.3.2.1, confirma a presença do núcleo antraquinônico no composto F5_A1.

Figura 12. Espectro de RMN- ^{13}C (126 MHz) do composto F5_A1 em DMSO- d_6 .

¹ http://sdb.srioddb.aist.go.jp/sdb/cgi-bin/cre_frame_disp.cgi?spectrum_type=cnmr&sdbno=123

A **Tabela 6** apresenta as correlações entre carbonos e hidrogênios observadas no espectro HSQC (**Anexo 2**) do composto F5_A1. Observa-se que a molécula apresenta oito carbonos quaternários, o que indica a presença de dois substituintes sobre o núcleo antraquinônico. Considerando-se a estrutura molecular do corante RBBR é de esperar que os substituintes amino e sulfonato do cromóforo possivelmente se encontrem presentes na estrutura do composto F5_A1.

Tabela 6. Deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C e correlações apresentadas no HSQC para o composto F5_A1

HSQC				
^{13}C δ / ppm	Posição	Tipo de carbono	^1H δ /ppm (mult., J/Hz, Integral)	Designação
148,56	C-1	Cq	----	----
138,16	C-2	Cq	----	----
132,85	C-3	Cq	7,94 (d, 7,7, 1H)	H-3
114,28	C-4	Cq	7,41 (d, 7,7, 1H)	H-4
126,3	C-5	Cq	8,14 (dd, 7,6 e 1, 1H)	H-5
133,53	C-6	Cq	7,85 (td, 7,7 e 1,2, 1H)	H-6
134,19	C-7	CH	7,91 (td, 7,7 e 1,2, 1H)	H-7
126,58	C-8	CH	8,23 (dd, 7,8 e 0,7, 1H)	H-8
184,09	C-9	CH	----	----
182,74	C-10	Cq	----	----
132,48	C-11	CH	----	----
134,59	C-12	CH	----	----
112,69	C-13	CH	----	----
134,56	C-14	Cq	----	----

No espectro de RMN- ^1H (**Figura 13**) observa-se um par dubletos dos hidrogênios H-3 ($J = 7,7$ Hz) e H-4 ($J = 7,7$ Hz) também se observa a presença de dois duplos dubletos dos hidrogênios em H-5 ($J = 7,6$ Hz e $J = 1$ Hz) e H-8 ($J = 7,8$ Hz e $J = 0,7$ Hz). Cada um destes sinais integra para um hidrôgenio e as constantes de acoplamentos são características para hidrogênios aromáticos com padrões de acoplamentos vicinal.

Figura 13. Espectro de RMN- ^1H (500 MHz) do composto F5_A1 em DMSO- d_6 .

No espectro de RMN- ^1H observa-se também um par de duplos triplete em H-6 ($J = 7,7\text{ Hz}$ e $J = 1,2\text{ Hz}$) e H-7 ($J = 7,7\text{ Hz}$ e $J = 1,2\text{ Hz}$) que, segundo o espectro COSY da **Figura 14**, acoplam com os hidrogênios H-5 e H-8, respectivamente, indicando que, estes quatro hidrogênios que acoplam sequencialmente são aqueles pertencentes ao anel aromático da antraquinona não substituído.

No espectro RMN- ^1H (**Figura 13**) também se observou que o sinal mais desblindado H-15 possivelmente corresponde ao próton ácido unido ao íon sulfonato, enquanto que o singlete em H-16 poderia corresponder aos hidrogênios do grupo amino. No espectro COSY da **Figura 14**, também se pode observar a correlação entre estes prótons, sugerindo a formação de uma ligação hidrogênio entre o grupo $-\text{NH}_2$ e o grupo $-\text{SO}_3\text{H}$.

Figura 14. Espectro COSY do composto F5_A1 em DMSO- d_6 .

No espectro HMBC (**Anexo 3**) a carbonila C-9 apresenta correlação com o hidrogênio H-8 e o carbono C-10 acopla com os hidrogênios H-4 e H-5, sugerindo que o sinal C-9 corresponde à carbonila mais próxima ao grupo amino, já que só tem um hidrogênio vizinho, como se observa na **Figura 15**. Além disso, o carbono da carbonila C-9 apresenta o carbono mais desblindado, o que pode ser explicado pela sua posição α ao grupo amino.

O espectro COSY da **Figura 14** mostra uma correlação entre H-3 e H-4. Os sinais destes hidrogênios se apresentam como dubleto, sendo H-3 o dubleto mais blindado no espectro de RMN- ^1H devido a sua proximidade ao grupo sulfonato eletro-atraente. Além disso, observa-se uma correlação entre os hidrogênios H-15 e H-16, o que indica a presença de uma ligação de hidrogênio entre H-15 e o nitrogênio do grupo amino. As posições destes hidrogênios na molécula poderiam ser atribuídas como na **Figura 15**.

Figura 15. Atribuição de todos os sinais dos espectros de ^1H e ^{13}C do composto F5_A1.

O sinal C-1, terceiro carbono mais desblindado, corresponderia ao carbono ligado ao grupo NH_2 , enquanto que o sinal C-2 seria o carbono ligado ao grupo sulfonato. O deslocamento químico de C-13 indica que este carbono possivelmente se encontra entre os carbonos C-1 e C-9. Os sinais correspondentes aos carbonos C-11, C-12 e C-14 foram atribuídos levando-se em conta que no espectro de HMBC (**Anexo 3**), estes sinais só correlacionam com os hidrogênios H-8 e H-6, H-5 e H-7, e H-3, respectivamente (**Figura 15**).

Na **Figura 16** apresentam-se as correlações ^1H - ^1H observadas no espectro COSY e na **Figura 17** as correlações ^{13}C - ^1H às longas distâncias observadas no espectro HMBC.

Figura 16. Correlações ^1H - ^1H observadas no espectro COSY

Figura 17. Apresentam-se as correlações ^{13}C - ^1H a longa distância, observadas no espectro HMBC.

A análise destes dados permitiu-nos estabelecer a estrutura do composto **F5_A1** como sendo a da antraquinona ácido 1-amino-9,10-dioxo-9,10-dihidroantracene-2-sulfônico.

5.3.2.3.2 Identificação dos compostos **F5_A2**, **F5_A3** e **F5_A4** da fração **F5_A**

A comparação dos espectros de $\text{RMN-}^1\text{H}$ dos compostos **F5_A2**, **F5_A3** e **F5_A4** com o espectro de $\text{RMN-}^1\text{H}$ obtido para o composto **F5_A1** (**Figura 18**) permite inferir suas estruturas devido à grande similaridade destes espectros.

COMPOSTO **F5_A4**

No espectro de $\text{RMN-}^1\text{H}$ para o composto **A4** da **Figura 18** observa-se que o dublete do sinal em δ 7,94 (H-3) do espectro de $\text{RMN-}^1\text{H}$ de **A1**, apresenta-se como um singlete e o sinal do hidrogênio em δ 7,41 (H-4) não está mais presente, o que sugere a entrada de um substituínte nesta posição. Segundo a distribuição isotópica do espectro de massas para **A4** (**Anexo 1D**), o substituínte na posição H-4 corresponde a um átomo de bromo, sendo formada a antraquinona ácido 1-amino-4-bromo-9,10-dioxo-9,10-dihidroantraceno-2-sulfônico, como se observa na **Figura 19**.

COMPOSTO F5_A3

A **Figura 18** mostra que o espectro de RMN-¹H da amostra **A3** é muito parecido com o espectro da amostra **A4**. Observa-se que o padrão do acoplamento observado para os hidrogênios em H-5 (dubleto), H-6 (triplete), H-7 (triplete) e H-8 (dubleto) de **A3** é similar ao padrão destes sinais no espectro de RMN-¹H do composto **A4** e não dos sinais do espectro de RMN-¹H para o composto **A2**. Por tanto, sugere-se que o hidrogênio que produz o sinal dubleto em H-4 também foi substituído na estrutura de **A1**, e por tanto, não está presente no espectro de RMN-¹H de **A3**.

Levando-se em conta o espectro de massas para o composto **A3** (**Anexo 1C**), pode-se sugerir que o hidrogênio que produz o sinal H-4 no composto **A1** foi substituído por um átomo de cloro para formar o composto **A3**, sendo formada a antraquinona ácido 1-amino-4-cloro-9,10-dioxo-9,10-dihidroantraceno-2-sulfônico, ilustrada na **Figura 19**.

COMPOSTO F5_A2

Na **Figura 18** observa-se que o dublete do sinal em δ 7,94 (H-3) presente no espectro do composto **A1** não aparece no espectro de RMN-¹H de **A2** o que pode sugerir que o hidrogênio que produz o sinal H-3 da molécula **A1** foi substituído. Levando-se em conta a análise realizada para o espectro de massas do composto **A2** (**Anexo 1B**), o hidrogênio H-3 da molécula **A1** deve ter sido substituído por uma hidroxila para formar o composto **A2** (**Figura 19**).

A hidroxila na posição meta em relação ao grupo amina pode formar uma ligação hidrogênio com o oxigênio do grupo -SO₃H, o que explica o fato de que o sinal

do espectro de RMN-¹H de **A1** em δ 7,48 (H-16), que corresponde aos hidrogênios da amina, apresente uma mudança do seu deslocamento químico sendo mais desblindado no espectro de RMN-¹H de **A2**, apresentando-se em δ 8,13.

O sinal dubleto em δ 7,41 (H-4) do espectro RMN-¹H do composto **A1** torna-se um singleto em δ 7,55 no espectro RMN-¹H do composto **A2**, indicando a ausência de H-3. O padrão de acoplamento observado para H-5 (dubleto), H-6 (triplete), H-7 (triplete) e H-8 (dubleto), indica que o anel benzeno dissustituído da antraquinona continua presente. Desta forma, se conclui que o composto F5_ **A2** corresponde à antraquinona ácido 1-amino-3-hidroxi-9,10-dioxo-9,10-dihidroantraceno-2-sulfônico.

Desta forma, pela análise dos espectros de massas de alta resolução e dos respectivos espectros de RMN-¹H dos produtos de degradação do RBBR, podemos indicar as estruturas destes como sendo as dos compostos **A1**, **A2**, **A3** e **A4**, que são apresentados na **Figura 19**.

Figura 18. Espectros de RMN- ^1H (500 MHz) obtidos para os compostos A1, A2, A3 e A4, isolados da Fração F5_A; solvente $\text{DMSO}-d_6$.

A1 Ácido 1-amino-9,10-dioxo-9,10-dihidroantraceno-2-sulfônico

A2 Ácido 1-amino-3-hidroxi-9,10-dioxo-9,10-dihidroantraceno-2-sulfônico

A3 Ácido 1-amino-4-cloro-9,10-dioxo-9,10-dihidroantraceno-2-sulfônico

A4 Ácido 1-amino-4-bromo-9,10-dioxo-9,10-dihidroantraceno-2-sulfônico

Figura 19. Estruturas moleculares propostas para os compostos **A1**, **A2**, **A3** e **A4** isolados da fração F5_A.

Pouca informação é conhecida sobre os produtos de degradação produzidos na degradação do RBBR pela ação de fungos. Na **Figura 4** foram apresentados os produtos de degradação do RBBR e monitorados por LC/MS. Porém, nenhum estudo relata a identificação de produtos de degradação fungica do RBBR por EM e RMN, após seu isolamento e purificação.

Dentre os compostos identificados neste trabalho como produtos de degradação do corante, somente é conhecido na literatura um isômero do composto **A2**, no qual a hidroxila se situa na posição *para* com respeito ao grupo amina. Os compostos **A1**, **A3** e **A4** são identificados por primeira vez como produtos de degradação do corante RBBR por fungos.

Um trabalho complementar a ser feito é o monitoramento do processo degradativo para estudar a formação dos produtos da biotransformação em meio salino, de maneira a tentar se obter quantidades adicionais dos compostos **A3** e **A4** e testa-los em bioensaios de atividade citotóxica.

5.3.3 Isolamento e purificação dos compostos extraídos da fração 1061_F2

A fração **1061_F2** foi submetida a duas separações por EFS (**Esquema 2**). As frações 1061-F2-60-40 (F2_64), 1062-F2-60-50 (F2_65) e 1062-F2-80-50 (F2_85) foram submetidas a separação por HPLC acoplado a detector de UV (**Figura 20**).

Esquema 2. Fracionamento por EFS das frações 1061-F2-60 e 1061-F2-80. Fase estacionária: sílica gel derivatizada com grupo C₁₈; eluição em modo gradiente com mistura de H₂O/MeOH. — Frações que foram separadas por HPLC-UV para isolar os metabólitos secundários.

Após a separação cromatográfica por HPLC das principais frações obtidas, foram obtidos três compostos puros, denominados de **F2** (17,4 mg), **C2B** (5 mg) e **G6** (3,3 mg). Estes compostos foram analisados por HPLC-UV-EM com o intuito de verificar o grau de pureza e enviados para análise por ressonância magnética nuclear para posterior caracterização estrutural.

Figura 20. Separação cromatográfica das frações F2_64, F2_65 e F2_85 realizadas numa coluna analítica de sílica gel derivatizada com grupo fenila Inertsil Ph 5 μ m [4,6mm x 250mm] **A.** Cromatograma da fração F2_64, eluída com H₂O/MeOH/MeCN 80:10:10. **B.** Cromatograma da fração F2_65 eluída com H₂O/MeCN 80:20. **C.** Cromatograma da fração F2_85 eluída com H₂O/MeCN 80:20. Os sinais dos cromatogramas ressaltados em roxo, vermelho e verde correspondem aos compostos majoritários que foram posteriormente identificados. Os sinais em azul correspondem a compostos isolados, mas não estavam puros e a massa obtida era pouca para sua purificação.

5.3.4 Elucidação estrutural e identificação do composto F2

O composto F2 foi obtido como um sólido branco opticamente ativo com $[\alpha]_D = +17,42$ (c 0,00155, MeOH). Seu espectro no ultravioleta apresentou $\lambda_{\text{máx}}$ em 293 nm.

5.3.4.1 Análise do espectro no infravermelho

Figura 21. Espectro infravermelho do composto F2 com KBr.

Alguns dos grupos funcionais presentes na estrutura molecular do composto F2, foram identificados a partir da análise do seu espectro no infravermelho (**Figura 21**). Observa-se a presença de uma banda forte característica da vibração de estiramento de OH de um álcool e uma banda característica da ligação C=C em cerca de 1500 cm^{-1} .

5.3.4.2 Determinação da formula molecular de F2

O espectro de massas de alta resolução ESI (**Figura 22**) apresentou o íon molecular $[M+Na]^+$ em m/z 277,17618 no modo positivo, o que permitiu estabelecer a massa do composto como sendo igual a 254,18641 u.m.a., que corresponde à fórmula molecular (FM) $C_{15}H_{26}O_3$, sendo três o índice de deficiência de hidrogênios (IDH) para esta FM.

Figura 22. Espectro de massas de alta resolução do composto F2. MS-Orbitrap em modo positivo.

5.3.4.3 Grupos funcionais e estruturas parciais detectadas nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C de F2.

O espectro de RMN- ^{13}C apresentado na **Figura 23** exibe os 15 carbonos da molécula, incluindo dois carbonos na faixa de deslocamento químicos para carbonos com hibridação sp^2 (C-1 e C-2) indicando a presença de uma dupla ligação na molécula. No espectro de RMN- ^{13}C não se observou nenhum outro sinal que indicasse a presença de insaturações adicionais. Assim, pôde-se inferir que a molécula deve possuir dois ciclos e uma dupla ligação, para completar o IDH = 3.

No espectro de RMN de ^{13}C também se observam três sinais na faixa de deslocamentos químicos para carbonos sp^3 unidos a átomos de oxigênio ($90 \text{ ppm} > \delta > 60 \text{ ppm}$).

Figura 23. Espectro de RMN- ^{13}C (126 MHz) em mistura de solventes $\text{MeOH-}d_4/\text{Benzeno-}d_6$ 7:3, para o composto F2.

No espectro de RMN- ^1H da **Figura 24** é possível observar a presença de três metilas com deslocamentos químicos em δ 0,87 (H-14, singlete), δ 0,97 (H-13, dubleto, $J = 6,7$ Hz) e em δ 1,07 (H-15, singlete) e quatro sinais de hidrogênios com deslocamentos químicos δ 3,76 (H-12), δ 3,99 (H-11a), δ 4,12 (H-11b) e δ 4,13 (H-4) característicos de hidrogênios próximos a átomos eletronegativos como oxigênio. Não se observam hidrogênios olefínicos; logo, a dupla ligação é tetrassubstituída.

Figura 24. Espectro de RMN- ^1H (400 MHz) em mistura de solventes $\text{MeOH-}d_4/\text{Benzeno-}d_6$ 7:3, para o composto F2.

5.3.4.4 Estrutura do esqueleto de F2 – Conectividade dos átomos

As correlações no espectro HSQC (**Anexo 4**) entre carbonos e hidrogênios apresentam-se resumidas na **Tabela 7**. Observa-se que a molécula apresenta três carbonos quaternários, sendo C-1 e C-2 os carbonos da dupla ligação.

A partir dos deslocamentos químicos de carbono e hidrogênio apresentados na **Tabela 7**, é possível confirmar que o composto possui 15 átomos de carbono e 23 hidrogênios. Os hidrogênios que faltam para completar os 26 previstos na fórmula molecular calculada segundo os dados do espectro de massas, devem corresponder aos hidrogênios ligados as hidroxilas presentes na estrutura da molécula.

Tabela 7. Correlações observadas no espectro HSQC para o composto F2

HSQC				
¹³ C δ / ppm	Posição	Tipo de carbono	¹ H δ/ppm (mult., J/Hz, Integral)	Posição
146,78	C-1	Cq	----	
130,72	C-2	Cq	----	
54,99	C-3	CH	2,69 (m, 1H)	H-3
70,59	C-4	CH	4,13 (m, 1H)	H-4
41,24	C-5	CH ₂	1,83 (m, 1H) e 1,90 (m, 1H)	H-5a e H-5b
33,28	C-6	CH	1,81 (m, 1H)	H-6
45,24	C-7	CH	3,02 (t, 8,9, , 1H)	H-7
44,65	C-8	CH ₂	1,46 (m, 2H)	H-8
38,5	C-9	Cq	----	---
48,6	C-10	CH ₂	1,96 (d, 14,7, 1H) e 2,27 (d, 14,3, 1H)	H-10a e H-10b
65,98	C-11	CH ₂	3,99 (d, 11,7, 1H) e 4,12 (d, 11,2, 1H)	H-11a e H-11b
62,98	C-12	CH ₂	3,76 (m, 2H)	H12
16,34	C-13	CH ₃	0,97 (d, 6,7, 3H)	H13
27,73	C-14	CH ₃	0,87 (s, 3H)	H14
29,05	C-15	CH ₃	1,07 (s, 3H)	H15

No espectro COSY (**Anexo 5**) os hidrogênios da metila em δ 0,97 (H-13) só apresentam correlação com o hidrogênio em δ 1,81 (H-6), pelo que se pode sugerir que esta metila encontra-se ligada ao carbono C-6. Além disso, o sinal em δ 3,02 (H-7)

mostra correlação com os hidrogênios em δ 1,81 (H-6) e δ 1,46 (H-8), o que sugere que o carbono δ 45,2 (C-7) encontra-se ligado entre os carbonos em δ 33,3 (C-6) e δ 44,7 (C-8).

Além disso, o espectro COSY apresenta correlação entre os hidrogênios das metilas em δ 0,87 (H-14) e δ 1,07 (H-15) e também a correlação de H-14 com o hidrogênio em δ 1,46 (H-8). No espectro HMBC (**Anexo 6**) observa-se a correlação do carbono em δ 44,7 (C-8) com os hidrogênios das metilas em δ 0,87 (H-14) e δ 1,07 (H-15) e a correlação das metilas H-14 e H-15 com o carbono em δ 38,50 (C-9), carbono quaternário ao qual estão ligadas. O espectro HMBC também mostra a correlação de C-9 com os hidrogênios em δ 1,96 (H-10a) e δ 2,27 (H-10b). Desta forma, chega-se a seguinte semi-estrutura (**1**)

Semi-estrutura (**1**)

Segundo o espectro de HMBC, o carbono da dupla ligação em δ 146,8 (C-1) tem correlação com os hidrogênios em δ 1,96 (H-10a), δ 2,27 (H-10b), δ 3,02 (H-7), δ 1,46 (H-8) e δ 1,81 (H-6). Assim, se propõe que C-1 encontra-se ligado aos carbonos em δ 48,6 (C-10) e δ 45,2 (C-7), formando o primeiro ciclo da estrutura. Além disso, observa-se que o carbono em δ 130,7 (C-2) está em correlação com H-10a e H-10b o que confirma a semi-estrutura (**2**).

Semi-estrutura (2)

No espectro HMBC observa-se que o carbono em δ 130,7 (C-2) apresenta correlação com os hidrogênios em 3,99 (H-11a) e 4,12 (H-11b). Por sua vez, estes hidrogênios no espectro COSY só apresentam correlação entre eles produzindo um duplete, pelo qual se sugere que o carbono em δ 66,0 (C-11) está ligado ao carbono C-2.

Além disso, no HMBC observa-se também uma correlação do carbono em C-2 com o hidrogênio em δ 2,69 (H-3). No espectro COSY observa-se um sinal intenso da correlação de H-3 com os hidrogênios em δ 4,13 (H-4) e δ 3,76 (H-12), levando-se à semi-estrutura (3). Devido ao deslocamento químico apresentado pelos carbonos em δ 65,9 (C-11), δ 62,9 (C-12) e δ 70,6 (C-4), estes se encontram ligados a hidroxilas.

Semi-estrutura (3)

O espectro HMBC indica que o carbono em δ 41,2 (C-5) tem correlação com os hidrogênios em δ 0,97 (H-13, $J = 6,7$ Hz), δ 1,81 (H-6) e δ 2,69 (H-3) e o carbono em δ 70,6 (C-4) com os hidrogênios δ 2,69 (H-3), δ 1,81 (H-6), δ 3,02 (H-7) e δ 3,76 (H-12),

mas não com δ 0,97 (H-13). Assim, se sugere que o carbono em δ 41,2 (C-5) está ligado aos carbonos δ 70,6 (C-4) e δ 33,3 (C-6) como ilustrado na estrutura da **Figura 25**, fechando o segundo ciclo presente na molécula da amostra F2.

Nas **Figuras 26 e 27** apresentam-se as correlações observadas no espectro COSY e HMBC, respectivamente, do composto F2.

Figura 25. Estrutura molecular proposta para o composto F2 e atribuição dos sinais de ^1H e ^{13}C .

Figura 26. Esquema das correlações observadas no espectro COSY do composto F2.

Figura 27. Esquema das correlações observadas no espectro HMBC do composto F2.

Na **Figura 28** observam-se os espectros NOE diferencial (NOEdiff) para os hidrogênios seletivamente irradiados, comparados com o espectro de RMN- ^1H do composto F2.

Figura 28. Comparação dos espectros NOE diferencial com o espectro RMN- ^1H da amostra F2. Hidrogênios irradiados: — 4,13 ppm (H-4), — 3,99 ppm (H-11a), — 3,02 ppm (H-7), — 2,69 ppm (H-3).

O espectro em amarelo mostra o resultado da irradiação do hidrogênio em δ 4,13 (H-4), observando-se um aumento na intensidade dos sinais em δ 3,76 (H-12), δ 2,69 (H-3), δ 3,02 (H-7), δ 1,83 (H-5a) e δ 1,90 (H-5b). O espectro em verde mostra o resultado da irradiação do hidrogênio em δ 3,99 (H-11a): os sinais dos hidrogênios em δ 3,02 (H-7), e δ 2,27 (H-10b) aumentam de intensidade. Da mesma forma, os espectros em rosa e roxo mostram os resultados das irradiações dos hidrogênios em δ 3,02 (H-7) e δ 2,69 (H-3), observando-se um aumento dos sinais δ 4,13 (H-4), δ 3,76 (H-12), δ 1,83 (H-5a), δ 1,90 (H-5b) e δ 1,46 (H-8), e em δ 4,13 (H-4), δ 3,76 (H-12), e δ 4,12 (H-11b), respectivamente.

Estes resultados são consistentes com a estrutura química proposta para o composto F2, já que o aumento da intensidade dos sinais no espectro da **Figura 28** depende da proximidade espacial do hidrogênio irradiado com os hidrogênios vizinhos. Na **Figura 29** podem-se observar de forma detalhada os acoplamentos que apresentaram os hidrogênios irradiados no experimento NOE diferencial, confirmando a posição proposta para estes hidrogênios dentro da molécula.

Figura 29. Correlações apresentadas pelos hidrogênios irradiados nos experimentos NOEdiff para amostra F2 . — 4,13 ppm (H-3), — 4,00 ppm (H-4a), — 2,98 ppm (H-8), — 2,74 ppm (H-6).

No espectro NOESY (**Anexo 7**) observa-se que o hidrogênio em δ 3,02 (H-7) apresenta correlação no espaço com os hidrogênio em δ 4,13 (H-4) e δ 1,81 (H-6), e por sua vez, o hidrogênio em δ 4,13 (H-4) apresenta correlação com os hidrogênios em δ 1,81 (H-6), δ 3,02 (H-7) e δ 2,69 (H-3). Por tanto, estes hidrogênios encontram-se no mesmo plano espacial, o que leva a propor a configuração relativa para o composto F2, como se apresenta na **Figura 30**.

Figura 30. Configuração relativa proposta para o composto F2, a partir da análise das principais correlações apresentadas no espectro NOESY.

A estrutura proposta para o composto F2 corresponde a uma classe de sesquiterpenos chamados de tremulanos. Os tremulanos são um grupo de sesquiterpenos relativamente novos, que se caracterizam por apresentar um esqueleto carbonado perhidroazuleno substituído como se mostra na **Figura 31A**.

Em busca realizada nas bases de dados *Dictionary of Natural Products* (DNP), disponível no endereço <http://dnp.chemnetbase.com>, e *ChemSpinder* disponível no endereço <http://www.chemspider.com/>, verificou-se que o composto chamado de F2 até agora não foi relatado na literatura, sendo assim denominado **tremulenotriol**.

O tremulenodiol A (**Figura 31B**), um sesquiterpeno da família dos tremulanos isolado do meio de cultura do fungo de podridão do álamo *Phellinus tremulae*⁵⁰,

apresenta uma estrutura química similar à proposta para o composto F2, sendo a única diferença uma hidroxila ligada ao carbono em δ 70,6 (C-4). Embora, o esqueleto carbonado da estrutura do composto F2 não seja inédito, a estrutura proposta corresponde a um novo composto até agora não descrito.

Este tipo de sesquiterpenos tem sido isolado principalmente de fungos basidiomicetos e têm apresentado atividade antibiótica e citotóxica.

Figura 31. A. Identificação do grupo químico característico dos tremulanos na estrutura do composto F2 (Tremulenotriol). **B.** Estrutura química do tremulenodiol A. Em vermelho ressalta-se a hidroxila presente no composto F2, ausente na estrutura do Tremulenodiol A.

5.3.5 Elucidação estrutural do composto C2B

O composto C2B foi obtido como um sólido amarelo opticamente ativo com $[\alpha]_D = +3,6$ (c 0,00175, MeOH). Seu espectro no ultravioleta apresentou $\lambda_{\text{máx}}$ em 298 nm.

5.3.5.1 Análise do espectro no infravermelho de C2B

Figura 32. Espectro infravermelho do composto C2B em KBr.

No espectro de infravermelho da **Figura 32**, pode-se observar as frequências de absorção características do estiramento da ligação **=C-H** representada pela fina banda da ligação **C=C** perto de 1500 cm^{-1} .

Além disso, observa-se uma banda em cerca de 3300 cm^{-1} , característica do alongamento da ligação **O-H** livre pela forma da banda e duas bandas em 1240 cm^{-1} e 1050 cm^{-1} característica da vibração de alongamento da ligação **C-O**. Assim, o composto C2B apresenta pelo menos uma dupla ligação e provavelmente uma hidroxila que não apresenta ligação de hidrogênio.

5.3.5.2 Determinação da formula molecular de C2B

O espectro de massas de alta resolução ESI no modo positivo (**Anexo 8**) apresentou o íon molecular $[M+H]^+$ em m/z 280,18945, e o íon sodiado em m/z 302,17120; esta informação permitiu estabelecer a massa do composto como sendo igual a 279,18335 u.m.a.

Sendo que a massa do composto é ímpar, a molécula deve apresentar um número ímpar de átomos de nitrogênio. A análise da massa molecular obtida indica a formula molecular $C_{16}H_{25}NO_3$. Assim, o índice de deficiência de hidrogênios (IDH) calculado para esta molécula é de cinco.

5.3.5.3 Grupos funcionais e estruturas parciais detectadas nos espectros de RMN 1H e ^{13}C de C2B

O espectro de RMN- ^{13}C apresentado na **Figura 33** revela a presença de 16 átomos de carbono na molécula. Observa-se a presença dos sinais em δ 139,8 (C-1), δ 122,3 (C-2), δ 133,5 (C-11) e δ 102,2 (C-12) os quais apresentam deslocamentos químicos característicos de carbonos sp^2 , o que confirma a presença de duas duplas ligações na molécula. Além disso, o carbono em δ 69,3 (C-4) apresenta um deslocamento químico característico para carbonos ligados a uma hidroxila.

Como o espectro de RMN- ^{13}C do composto C2B só apresenta sinais de duas duplas ligações, não se observam outros sinais característicos que indiquem a presença outras instaurações na estrutura molecular. Assim, verificou-se que a molécula do composto C2B apresenta duas duplas ligações e três ciclos, para completar o IDH = 5.

Figura 33. Espectro de RMN- ^{13}C (125 MHz) em $\text{DMSO}-d_6$ da amostra C2B.

O espectro de RMN- ^1H apresentado na **Figura 34** mostra 16 sinais de hidrogênios quimicamente diferentes. Observa-se a presença dos sinais em δ 0,88 (H-13, dubleto, $J = 7,4$ Hz), δ 0,94 (H-14, singlete) e δ 1,03 (H-15, singlete) atribuídos a hidrogênios de metilas que se encontram ligados a carbonos alifáticos. Além destes, observa-se um sinal em δ 3,66 (H-16, singlete) com deslocamento químico característico de hidrogênios de uma metila unida a um oxigênio (metoxila).

No espectro da **Figura 34** observa-se um sinal em δ 7,31 (H-11, singlete) que é atribuído a um hidrogênio ligado a carbono sp^2 de uma dupla ligação, e o hidrogênio em δ 5,92 (H-12, dubleto, $J = 6,3$ Hz) ligado a carbono metínico di-heterosubstituído.

Figura 34. Espectro de RMN- ^1H (500 MHz) em $\text{DMSO}-d_6$ da amostra C2B.

5.3.5.4 Estrutura do esqueleto de C2B – Conectividade dos átomos

As correlações no espectro HSQC (**Anexo 9**) entre carbonos e hidrogênios encontram-se resumidas na **Tabela 8**. Observa-se que a molécula apresenta três carbonos quaternários, sendo os carbonos em δ 139,8 (C-1) e δ 122,3 (C-2) de uma das duplas ligações.

Tabela 8. Correlações observadas no espectro de RMN de HSQC para o composto C2B

HSQC				
¹³ C δ / ppm	Designação	Tipo de carbono	¹ H δ /ppm (mult., J/Hz, Integral)	Designação
139,8	C-1	C _q	----	----
122,3	C-2	C _q	----	----
52,5	C-3	CH	2,70 (m, 1H)	H3
69,3	C-4	CH	3,87 (m, 1H)	H4
44,2	C-5	CH ₂	2,40 (m, 1H) e 2,30 (m, 1H)	H5a e H5b
28,8	C-6	CH	1,99 (s, 1H)	H6
44,7	C-7	CH	2,94 (m, 1H)	H7
45,2	C-8	CH ₂	1,36 (m, 1H) e 1,42 (m, 1H)	H8a e H8b
36,5	C-9	C _q	----	----
46,6	C-10	CH ₂	2,11 (m, 1H) e 2,25 (m, 1H)	H10a e H10b
133,5	C-11	CH	7,31 (s, 1H)	H11
102,2	C-12	CH	4,92 (d, 6,3, 1H)	H12
17,78	C-13	CH ₃	0,88 (d, 7,4, 3H)	H13
27,8	C-14	CH ₃	0,94 (s, 3H)	H14
29,3	C-15	CH ₃	1,03 (m, 3H)	H15
59,5	C-16	CH ₃	3,66 (s, 3H)	H16

No espectro COSY (**Anexo 10**) observa-se que os hidrogênios da metila em δ 0,88 (H-13) estão correlacionados somente com o hidrogênio em δ 1,99 (H-6) o que indica que esta metila encontra-se unida ao C-6. Observa-se também uma correlação do hidrogênio em δ 1,99 (H-6) somente com δ 2,30 (H-5b).

No espectro de HMBC (**Anexo 11**) observa-se a correlação existente entre δ 0,88 (H-13, singlete) com δ 28,8 (C-6) e δ 44,7 (C-7) e as correlações do hidrogênio em δ

1,99 (H-6, singleto) com δ 44,2 (C-5) e δ 17,8 (C-13) sugerindo a seguinte semi-estrutura (4):

Semi-estrutura (4)

No espectro HMBC observa-se que δ 69,3 (C-4) tem correlação com δ 2,30 (H-5b) e δ 1,99 (H-6). Como foi relatado anteriormente, o carbono em δ 69,3 (C-4) deve estar ligado com um átomo eletronegativo como oxigênio. Assim, sugere-se que o carbono em C-4 está ligado ao oxigênio de uma hidroxila presente nesta molécula. A partir de esta informação, pôde-se indicar a seguinte semi-estrutura (5):

Semi-estrutura (5)

O espectro COSY mostra que o hidrogênio em δ 2,70 (H-3) acopla com δ 3,87 (H-4) e δ 4,92 (H-12). Portanto, o carbono δ 52,5 (C-3) encontra-se entre δ 69,3 (C-4) e δ 102,2 (C-12). Além disso, o sinal em δ 2,70 (H-3, multipeto) tem correlação com os carbonos olefínicos em δ 139,8 (C-1) e δ 122,3 (C-2). A semi-estrutura (6) sugerida é apresentada a seguir:

Semi-estrutura (6)

Segundo o espectro de COSY, o hidrogênio em δ 2,94 (H-7) apresenta correlação com δ 1,42 (H-8b), δ 2,11 (H-10a) e δ 2,70 (H-3). Além disso, no espectro de HMBC o sinal em δ 44,7 (C-7) apresenta uma correlação com δ 1,36 (H-8a) e δ 1,42 (H-8b), e o carbono em δ 139,8 (C-1) tem correlação com δ 2,94 (H-7), δ 1,99 (H-6, singlete), δ 1,36 (H-8a, multipeto) e δ 1,42 (H-8b, multipeto), mas o carbono em δ 122,3 (C-2) não apresenta correlação com nenhum destes hidrogênios; porém, observa-se uma correlação de C-2 com δ 2,70 (H-3, multipeto). Portanto, se pode sugerir que C-7 está ligado aos carbonos C-8 e C-1, e o carbono em δ 122,3 (C-2) encontra-se ligado ao carbono em δ 52,5 (C-3). Assim, a semi-estrutura (7) sugerida é apresentada a seguir:

Semi-estrutura (7)

No espectro HMBC observa-se correlação entre os hidrogênios das metilas em δ 1,03 (H-15) e δ 0,94 (H-14) com o carbono quaternário em δ 36,5 (C-9). Além disso,

observa-se correlações entre C-9 e os hidrogênios em δ 1,36 (H-8a), δ 1,42 (H-8b), δ 2,11 (H-10a) e δ 2,25 (H-10b). Também o carbono em C-1 apresenta correlação com estes hidrogênios. Assim, observa-se a presença de um ciclo de cinco carbonos formado pelos carbonos em δ 139,8 (C-1), δ 44,7 (C-7), δ 45,2 (C-8), δ 36,5 (C-9) e δ 46,6 (C-10), como se observa na seguinte semi-estrutura (8).

No espectro de HMBC observa-se que H-11 apresenta correlação com os carbonos em δ 139,8 (C-1), δ 122,3 (C-2), δ 52,5 (C-3) e δ 102,2 (C-12). Portanto, se sugere que δ 133,5 (C-11) está ligado ao carbono δ 122,3 (C-2). O espectro também mostra que a metila em δ 3,66 (H-16) apresenta somente correlação com δ 102,2 (C-12), verificando-se que o carbono C-12 está ligado a uma metoxila, chegando-se à semi-estrutura (9).

Levando em conta que na semi-estrutura **(9)** o carbono δ 102,2 (C-12) não apresenta hibridação sp^2 que justifique seu deslocamento químico, surge a proposta de ligar este carbono a um átomo de nitrogênio. Por outro lado, o carbono em δ 133,5 (C-11) formaria uma dupla ligação com o nitrogênio para formar o terceiro ciclo, e assim completar o índice de deficiência de hidrogênio calculado para esta molécula. Para completar a fórmula molecular proposta para esta molécula falta um oxigênio que deve estar ligado ao nitrogênio, como se observa na estrutura final proposta para o composto C2B, apresentada na **Figura 35**.

Figura 35. Estrutura molecular proposta e atribuição dos sinais de ^1H e ^{13}C para o composto C2B.

Nas **Figuras 36 e 37** apresentam-se as correlações observadas no espectro COSY e HMBC do composto C2B, respetivamente.

Figura 36. Esquema das correlações observadas no espectro COSY do composto C2B.

Figura 37. Esquema das correlações observadas no espectro HMBC do composto C2B.

No espectro NOESY (**Anexo 12**) observa-se que o hidrogênio em δ 4,92 (H-12) apresenta correlação no espaço com os hidrogênio em δ 2,70 (H-3) e δ 3,87 (H-4), e por sua vez, o hidrogênio em δ 3,87 (H-4) apresenta correlação com os hidrogênios em δ 2,70 (H-3) δ 2,94 (H-7) e δ 4,92 (H-12). Também se observa uma correlação entre o hidrogênio em δ 1,99 (H-6) e δ 2,94 (H-7). Portanto, estes hidrogênios encontram-se no mesmo plano, o que leva a propor a configuração relativa para o composto C2B, como se apresenta na **Figura 38**.

Figura 38. Configuração relativa proposta para o composto C2B, a partir da análise das principais correlações apresentadas no espectro NOESY.

O composto C2B é um sesquiterpeno irregular que apresenta na sua estrutura um núcleo tremulano (**Figura 39**). Na busca realizada nas bases de dados *Dictionary of Natural Products* (DNP), disponível no endereço <http://dnp.chemnetbase.com> e *ChemSpinder* disponível no endereço <http://www.chemspider.com/>, verificou-se que o composto chamado de C2B até agora não foi relatado na literatura.

Figura 39. A. Estrutura básica do sesquiterpeno tremulano ressaltado em negrita. B. Em negrito as unidades de isopreno presentes na estrutura da molécula do composto C2B.

5.3.6 Elucidação estrutural do composto G6

Para o composto chamado de G6 não foi possível determinar sua rotação óptica pelo fato de que o composto degradou-se antes de realizar esta análise.

5.3.6.1 Análise do espectro no infravermelho de G6

O espectro de infravermelho para o composto G6 é apresentado na **Figura 40**.

Figura 40. Espectro infravermelho do composto G6 em KBr.

No espectro de infravermelho da **Figura 40** obtido para o composto G6, observa-se uma banda intensa e larga de absorção em 3300 cm^{-1} característica da ligação O-H; as frequências absorção características do estiramento da ligação =C-H são representadas pelas finas bandas de absorção perto de 3040 cm^{-1} e da ligação C=C perto de 1500 cm^{-1} .

Comparando os espectros no infravermelho do composto C2B (**Figura 32**) e G6 (**Figura 40**) observa-se que são semelhantes, a única diferença encontra-se na presença da banda mais larga do grupo OH no espectro do composto **G6**.

5.3.6.2 Determinação da formula molecular de G6

O espectro de massas de alta resolução ESI (**Anexo 13**) apresentou o íon molecular $[M+H]^+$ em m/z 266,17623 no modo positivo, o que permite identificar a massa do composto como sendo igual a 265,16843 u.m.a. Assim, a análise da massa molecular obtida fornece a formula molecular $C_{15}H_{22}NO_3$. O índice de deficiência de hidrogênio (IDH) para o esqueleto carbonado de esta FM é cinco, que coincide com o IDH do composto **C2B**.

5.3.6.3 Grupos funcionais e estruturas parciais detectadas nos espectros de RMN de 1H e ^{13}C do composto G6.

Uma comparação dos sinais do espectro de RMN- 1H (**Figura 41**) do composto **G6** com os sinais do espectro de RMN de 1H de C2B mostra que os dois compostos têm em comum quase todos os sinais protônicos, exceto o sinal que corresponde à metoxila.

Figura 41. Espectro de RMN- 1H (500 MHz) em $DMSO-d_6$ da amostra G6.

Os sinais foram atribuídos realizando uma análise similar aos apresentados anteriormente para os outros compostos elucidados, utilizando os espectros COSY (Anexo 14), HSQC (Tabela 11) e HMBC (Anexo 15).

Tabela 9. Correlações observadas no espectro de RMN de HSQC (Anexo 16) para o composto G6

HSQC				
¹³ C δ / ppm	Designação	Tipo de carbono	¹ H δ/ppm (m, J/Hz, Integral)	Designação
139,25	C-1	C _q	----	----
122,93	C-2	C _q	----	----
53,64	C-3	CH	2,69 (m, 1H)	H-3
69,7	C-4	CH	3,89 (m, 1H)	H-4
44,41	C-5	CH ₂	2,28 (m, 1H) e 1,39 (m, 1H)	H-5b e H-5a
28,84	C-6	CH	1,99(m, 1H)	H-6
44,6	C-7	CH	2,93 (m, 1H)	H-7
45,19	C-8	CH ₂	1,42 (m, 1H) e 1,34 (m – 1H)	H-8b – H-8a
36,55	C-9	C _q	----	----
46,53	C-10	CH ₂	2,24 (m, 1H) e 2,11 (dt, 17,3, 1H)	H-10b – H-10a
132,34	C-11	CH	7,27 (s, 1H)	H-11
94,76	C-12	CH	5,06 (d, 8,9, 1H)	H-12
17,78	C-13	CH ₃	0,88 (d, 7,4, 3H)	H-13
27,83	C-14	CH ₃	0,93 (s, 3H)	H-14
29,36	C-15	CH ₃	1,03 (s, 3H)	H-15

Os sesquiterpenos tremulanos são uma classe de produtos naturais isolados pela primeira vez do meio de cultura do fungo de podridão do álamo *Phellinus tremulae*⁵⁰, e recentemente do meio de crescimento dos fungos basidiomicetos *Conocybe siliginea*^{51, 52}, *Phellinus igniarius*⁵³ e *Ceriporia lacerate*⁵⁴.

Na literatura encontra-se somente relatado um sesquiterpeno tremulano, chamado de 5R,12-dihidroxi-1-tremulen-11-il-2(S)-piroglutamato, contendo nitrogênio na sua estrutura (Figura 45)⁵¹. Dentre as publicações encontradas nas bases de dados Scopus (Elsevier), disponível no endereço <http://www.scopus.com> e Sciencedirect disponível no endereço <http://www.sciencedirect.com> não foram relatados

tremulanos com duplas ligações conjugadas nas posições C-1, C-2, C-3, e também não compostos com nitrogênio envolvido numa dupla ligação na molécula. Assim, as estruturas dos compostos C2B e G6 isolados neste trabalho são uma novidade dentre os tremulanos isolados até hoje.

Figura 45. Sesquiterpeno tremulano que contém nitrogênio (ressalta-se em vermelho) na estrutura (5R,12-dihidroxi-1-tremulen-11-il-2(S)-piroglutamato). Este composto foi isolado do meio de crescimento do fungo *Conocybe siliginea*.

6. CONCLUSÕES

Determinou-se que o corante RBBR foi degradado pelo fungo *Tinctoporellus* sp. o que produz uma diminuição da concentração de corante no meio de fermentação deste fungo. A descoloração do meio de degradação foi monitorado durante 17 dias, observando-se que o fungo *Tinctoporellus* sp. biodegrada 90% do corante RBBR presente em solução em um período de 12 dias.

Foram extraídos, purificados e identificados quatro compostos antraquinônicos como produtos da degradação do corante por *Tinctoporellus* sp., todos inéditos na literatura. Além disso, foram isolados e identificados três metabolitos secundários do fungo *Tinctoporellus* sp. produzidos no meio de degradação do RBBR. Os três compostos são inéditos e classificados como sesquiterpenos irregulares pertencentes à família dos tremulanos.

Entre as perspectivas futuras, poderia-se realizar experimentos adicionais de degradação do RBBR, para monitorar por HPLC-UV-MS o processo de degradação. Assim, seria possível se determinar se o fungo mineraliza o corante ou se são produzidos produtos de degradação que não foram identificados.

Um trabalho complementar a ser feito é o monitoramento do processo degradativo para estudar a formação dos produtos da biotransformação em meio salino, de maneira a tentar se obter quantidades adicionais dos compostos **A3** e **A4** e testá-los em bioensaios de atividade citotóxica, de maneira a verificar se estes compostos são ou não tóxicos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ¹ SINGH, H. **Mycoremediation: fungal bioremediation**. New York: Wiley, 2006. p. 16-18
- ² CERNIGLIA, C. E.; SUTHERLAND, J. B. Degradation of polycyclic aromatic hidrocarbons by fungi. In: TIMMIS, K. N. **Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology**. Heidelberg: Springer-Verlag, 2010. p. 2079–2110.
- ³ STAJICH, J. E.; BERBEE, MARY L.; BLACKWELL, M.; HIBBETT, D. S.; JAMES, T. Y.; SPATAFORA, J. W.; TAYLOR, J. W. The fungi. **Current Biology**, v. 19, n. 18, 2009. p. R840-R845.
- ⁴ SHEARER, C. A.; DESCALS, E.; KOHLMAYER, B.; KOHLMAYER, J.; MARVANOVÁ, L.; PADGETT, D.; PORTER, D.; RAJA, H. A.; SCHMIT, J. P.; THORTON, H. A.; VOGLYMAYR, H. Fungal biodiversity in aquatic habitats. **Biodiversity and Conservation**, v. 16, n. 1, p. 49-67, 2007.
- ⁵ HARMS, H.; SCHLOSSER, D.; WICK, L. Y. Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 3, p. 177-192, 2011.
- ⁶ COHEN, R.; PERSKY, L.; HADAR, Y. Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 58, n. 5, p. 582-594, 2002.
- ⁷ RUIZ-DUEÑAS, F. J.; MORALES, M.; GARCÍA, E.; MIKI, Y.; MARTÍNEZ, M. J.; MARTÍNEZ, A. T. Substrate oxidation sites in versatile peroxidase and other basidiomycete peroxidases. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, n. 2, p. 441-452, 2009.
- ⁸ HOFRICHTER, M. Review: Lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, n. 4, p. 454-466, 2002.
- ⁹ SINGH, P.; WANG, X.; LENG, K.; WANG, G. 19 Diversity and ecology of marine-derived fungi. In: JONES, E. B. GARETH; PANG, KA-LAI. **Marine fungi and fungal-like organism**. Berlín: Walter de Gruyter, 2012. p.383-408.
- ¹⁰ HERNÁNDEZ-LUNA, C. E.; GUTIÉRREZ-SOTO, G.; SALCEDO-MARTÍNEZ, S. M. Screening for decolorizing basidiomycetes in Mexico: Screening and selection of ligninolytic basidiomycetes with decolorizing ability in Northeast Mexico. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 4, p. 465-473, 2008.
- ¹¹ HADIBARATA, T.; YUSOFF, A. R. M.; KRISTANTI, R. A. Decolorization and metabolism of anthraquinone-type dye by laccase of white-rot fungi *Polyporus* sp. S133. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 223, n. 2, p. 933-941, 2012.
- ¹² GAO, Z.; LI, B.; ZHENG, C.; WANG, G. Molecular detection of fungal communities in the hawaiian marine sponges *Suberites zeteki* and *Mycale armata*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 19, p. 6091-6101, 2008.
- ¹³ BONUGLI-SANTOS, R. C.; DURRANT, L. R.; SETTE, L. D. The production of ligninolytic enzymes by marine-derived basidiomycetes and their biotechnological potential in the biodegradation of recalcitrant pollutants and the treatment of textile effluents. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 223, n. 5, p. 2333-2345, 2012.
- ¹⁴ RAGHUKUMAR, C. Marine fungal biotechnology: An ecological perspective. **Fungal Diversity**, v. 31, p. 19-35, 2008.

- ¹⁵ HAO, O. J.; KIM, H.; CHIANG, P. C. Decolorization of wastewater. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 30, n. 4, p. 449-505, 2000.
- ¹⁶ PALMIERI, G.; CENAMO, G.; SANNIA, G. Remazol Brilliant Blue R decolourisation by the fungus *Pleurotus ostreatus* and its oxidative enzymatic system. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, n. 1, p. 17-24, 2005.
- ¹⁷ HUNGER, K.; HAMPRECHT, R.; MIEDERER, P.; HEID, C.; ENGEL, A.; KUNDE, K.; MENNICKE, W.; GRIFFITHS, J. Dye classes for principal applications. In: HUNGER, K. **Industrial dyes: chemistry, properties, applications**. New York: Wiley, 2007. p.119-130.
- ¹⁸ GUARATINI, C.C.I.; ZANONI, M.V.B. Textile dyes. **Corantes têxteis**, v. 23, n. 1, p. 71-78, 2000.
- ¹⁹ FONTENOT, E. J.; BEYDILLI, M. I.; LEE, Y. H.; PAVLOSTATHIS, S. G. Kinetics and inhibition during the decolorization of reactive anthraquinone dyes under methanogenic conditions. **Water Science and Technology**, v. 45, n. 10, p. 105-111, 2002.
- ²⁰ OSMA, J. F.; TOCA-HERRERA, J. L.; RODRÍGUEZ-COUTO, S. Transformation pathway of Remazol Brilliant Blue R by immobilised laccase. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 22, p. 8509-8514, 2010.
- ²¹ GLENN, J. K.; GOLD, M. H. Decolorization of several polymeric dyes by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 45, n. 6, p. 1741-1747, 1983.
- ²² SÁNCHEZ-LÓPEZ, M. I. ; VANHULLE, S. F.; MERTENS, V.; GUERRA, G.; FIGUEROA, S.; DECOCK, C. ;CORBISIER, A. ;PENNINGCKX, M. J. Autochthonous white rot fungi from the tropical forest: Potential of Cuban strains for dyes and textile industrial effluents decolourisation. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 12, 2008.
- ²³ ROBINSON, T.; MCMULLAN, G.; MARCHANT, R.; NIGAM, P. Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. **Bioresource Technology**, v. 77, n. 3, p. 247-255, 2001.
- ²⁴ TYCHANOWICZ, G. K.; ZILLY, A.; DE SOUZA, C.G.; PERALTA, R. Decolourisation of industrial dyes by solid-state cultures of *Pleurotus pulmonarius*. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 7, p. 855-859, 2004.
- ²⁵ MACHADO, K. M. G.; MATHEUS, D. R.; BONONI, V. L. R. Ligninolytic enzymes production and Remazol brilliant blue R decolorization by tropical brazilian basidiomycetes fungi. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 246-252, 2005.
- ²⁶ BONUGLI-SANTOS, R. C.; DURRANT, L. R.; SETTE, L. D. The Production of Ligninolytic Enzymes by Marine-Derived Basidiomycetes and Their Biotechnological Potential in the Biodegradation of Recalcitrant Pollutants and the Treatment of Textile Effluents. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 223, n. 5, p. 2333-2345, 2012.
- ²⁷ AKSU, Z.; DONMEZ, G. A comparative study on the biosorption characteristics of some yeasts for Remazol Blue reactive dye. **Chemosphere**, v. 50, n. 8, p. 1075-83, 2003.
- ²⁸ BOER, C.G.; OBICI, L.; DE SOUZA, C.; PERALTA, R.M. Decolorization of synthetic dyes by solid state cultures of *Lentinula (Lentinus)* edodes producing manganese peroxidase as the main ligninolytic enzyme. **Bioresource Technology**, v. 94, n. 2, p. 107-112, 2004.

- ²⁹ MÁXIMO, C.; AMORIM, M. T. P.; COSTA-FERREIRA, M. Biotransformation of industrial reactive azo dyes by *Geotrichum* sp. CCMI 1019. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, n. 1, p. 145-151, 2003.
- ³⁰ BHATT, M.; PATEL, M.; RAWAL, B.; NOVOTNÝ, Č.; MOLITORIS, H.; ŠAŠEK, V. Biological decolorization of the synthetic dye RBBR in contaminated soil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 195-198, 2000.
- ³¹ KASINATH, A.; NOVOTNÝ, Č.; SVOBODOVÁ, K.; PATEL, K. C. ; ŠAŠEK, V. Decolorization of synthetic dyes by *Irpex lacteus* in liquid cultures and packed-bed bioreactor. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, n. 1, p. 167-173, 2003.
- ³² BALAN, D. S. L.; MONTEIRO, R. T. R. Decolorization of textile indigo dye by ligninolytic fungi. **Journal of Biotechnology**, v. 89, n. 2-3, p. 141-145, 2001.
- ³³ NYANHONGO, G. S.; GOMES, J.; GUBITZ, G. M.; ZVAUYA, R.; READ, J.; STEINER, W. Decolorization of textile dyes by laccases from a newly isolated strain of *Trametes modesta*. **Water Resources**, v. 36, n. 6, p. 1449-56, 2002.
- ³⁴ BORCHERT, M.; LIBRA, J. A. Decolorization of reactive dyes by the white rot fungus *Trametes versicolor* in sequencing batch reactors. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 75, n. 3, p. 313-21, 2001.
- ³⁵ MINUSSI, R. C. ; DE MORAES, S. G. ; PASTORE, G. M. ; DURAN, N. Biodecolorization screening of synthetic dyes by four white-rot fungi in a solid medium: possible role of siderophores. **Letters in Applied Microbiology**, v. 33, n. 1, p. 21-5, 2001.
- ³⁶ SAQUIB, M.; MUNEEB, M. Semiconductor mediated photocatalysed degradation of an anthraquinone dye, Remazol Brilliant Blue R under sunlight and artificial light source. **Dyes and Pigments**, v. 53, n. 3, p. 237-249, 2002.
- ³⁷ FANCHIANG, J. M.; TSENG, D. H. Degradation of anthraquinone dye C.I. Reactive Blue 19 in aqueous solution by ozonation. **Chemosphere**, v. 77, n. 2, p. 214-21, 2009.
- ³⁸ HE, Z. SEARCH; LIN, L. SEARCH; SONG, S. SEARCH; XIA, M. SEARCH; XU, L. SEARCH; YING, H. SEARCH; CHEN, J. Mineralization of C.I. Reactive Blue 19 by ozonation combined with sonolysis: Performance optimization and degradation mechanism. **Separation and Purification Technology**, v. 62, n. 2, p. 376-381, 2008.
- ³⁹ SIDDIQUE, M.; FAROOQ, R.; KHALID, A.; FAROOQ, A.; MAHMOOD, Q.; FAROOQ, U.; RAJA, I. A.; SHAUKAT, S. F. Thermal-pressure-mediated hydrolysis of Reactive Blue 19 dye. **Journal of Hazardous Materials**, v. 172, n. 2-3, p. 1007-12, 2009.
- ⁴⁰ PERLATTI, B.; DA SILVA, MFDF; FERNANDES, J. B.; FORIM, M. R. Validation and application of HPLC-ESI-MS/MS method for the quantification of RBBR decolorization, a model for highly toxic molecules, using several fungi strains. **Bioresource Technology**, v. 124, p. 37-44, 2012.
- ⁴¹ NIDHEESH, P. V.; GANDHIMATHI, R.; RAMESH, S. T. Degradation of dyes from aqueous solution by Fenton processes: A review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 20, n. 4, p. 2099-2132, 2013.

- ⁴² PANG, Y. L.; ABDULLAH, A. Z.; BHATIA, S. Review on sonochemical methods in the presence of catalysts and chemical additives for treatment of organic pollutants in wastewater. **Desalination**, v. 277, n. 1-3, p. 1-14, 2011.
- ⁴³ SRINIVASAN, A.; VIRARAGHAVAN, T. Decolorization of dye wastewaters by biosorbents: A review. **Journal of Environmental Management**, v. 91, n. 10, p. 1915-1929, 2010.
- ⁴⁴ SINHA, S.; CHATTOPADHYAY, P.; PAN, I.; CHATTERJEE, S.; CHANDA, P.; BANDYOPADHYAY, D.; DAS, K.; SEN, S. K. Microbial transformation of xenobiotics for environmental bioremediation. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 22, p. 6016-6027, 2009.
- ⁴⁵ PINEDO-RIVILLA, C.; ALEU, J.; COLLADO, I. G. Pollutants Biodegradation by Fungi. **Current Organic Chemistry**, v. 13, n. 12, p. 1194-1214, 2009.
- ⁴⁶ JUNGHANNS, C.; KRAUSS, G.; SCHLOSSER, D. Potential of aquatic fungi derived from diverse freshwater environments to decolourise synthetic azo and anthraquinone dyes. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 5, p. 1225-1235, 2008.
- ⁴⁷ SHEARER, C. A.; DESCALS, E.; KOHLMAYER, B.; KOHLMAYER, J.; MARVANOVÁ, L.; PADGETT, D.; PORTER, D.; RAJA, H. A.; SCHMIT, J. P.; THORTON, H. A.; VOGLYMAYR, H. Fungal biodiversity in aquatic habitats. **Biodiversity and Conservation**, v. 16, n. 1, p. 49-67, 2007.
- ⁴⁸ SACK, U.; HEINZE, T. M.; DECK, J.; CERNIGLIA, C. E.; MARTENS, R.; ZADRAZIL, F.; FRITSCH, W. Comparison of phenanthrene and pyrene degradation by different wood-decaying fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 10, p. 3919-3925, 1997.
- ⁴⁹ STEFFEN, K. T.; HATAKKA, A.; HOFRICHTER, M. Removal and mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by litter-decomposing basidiomycetous fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 60, n. 1-2, p. 212-217, 2002.
- ⁵⁰ AYER, W. A.; CRUZ, E.R. The tremulanes, a new group of sesquiterpenes from the aspen rotting fungus *Phellinus tremulae*. **Journal Organic Chemistry**, v.58, p. 7529-7534, 1993.
- ⁵¹ ZHOU, Z.Y.; TANG, J.G.; WANG, F.; DONG, Z.J.; LIU, J.K. Sesquiterpenes and aliphatic diketones from cultures of the basidiomycete *Conocybe siliginea*. **Journal Natural Products**, v.71, p. 1423-1426, 2008.
- ⁵² LIU, D.Z.; WANG, F.; LIU, J.K. Sesquiterpenes from cultures of the basidiomycete *Conocybe siliginea*. **Journal Natural Products**, v.70, p. 1503-1506, 2007.
- ⁵³ WU, X.; LIN, S.; ZHU, C.; YUE, Z.; YU, Y.; ZHAO, F.; LIU, B.; DAI, J.; SHI, J. Homo- and heptanorsterols and tremulane sesquiterpenes from cultures of *Phellinus igniarius*. **Journal Natural Products**, v.73, p. 1294-1300, 2010.
- ⁵⁴ YING, Y.M.; SHAN, W.G.; ZHANG, L.W.; ZHAN, Z.J. Ceriponols A–K, tremulane sesquiterpenes from *Ceriporia lacerate* HS-ZJUT-C13A, a fungal endophyte of *Huperzia serrate*. **Phytochemistry**, v. 95, p. 360–367, 2013.

ANEXO 1

JulieA1_131028101332 #1 RT: 0.01 AV: 1 NL: 1.09E8
T: FTMS - p ESI Full ms [50.00-1000.00]

Anexo 1A. Espectro de massas de alta resolução ESI do composto A1. Ionização no modo negativo.

JulieA2_131028101332 #7 RT: 0.35 AV: 1 NL: 6.03E6
T: FTMS - p ESI Full ms [50.00-1000.00]

Anexo 1B. Espectro de massas de alta resolução ESI do composto A2. Ionização no modo negativo.

ANEXO 1

JulieA3_131028101332 #25 RT: 0.88 AV: 1 NL: 2.27E6
T: FTMS - p ESI Full ms [50.00-1000.00]

Anexo 1C. Espectro de massas de alta resolução ESI do composto A3. Ionização no modo negativo.

JulieA4_131028101332 #13 RT: 0.56 AV: 1 NL: 9.95E7
T: FTMS - p ESI Full ms [50.00-1000.00]

Anexo 1D. Espectro de massas de alta resolução ESI do composto A4. Ionização no modo negativo.

ANEXO 2

gHSQCAD_01.fid.esp

Anexo 2. Espectro de HSQC do composto A1 da fração F5_A. Solvente DMSO- d_6

ANEXO 3A

Anexo 3A. Espectro de HMBC do composto A1 da fração F5_A. Solvente $\text{DMSO-}d_6$

ANEXO 3B

gHMBCAD_01.fid.esp

Anexo 3B. Ampliações do espectro do HMBC do composto A1 da fração F5_A.

ANEXO 4

Anexo 4. Espectro HSQC do composto F2 em MeOH- d_4 /Benzeno- d_6 .

ANEXO 5

Anexo 5. Espectro COSY ¹H-¹H do composto F2 em MeOH-*d*₄/Benzeno-*d*₆.

ANEXO 6A

GHMBC_01.FID.ESP

Anexo 6A. Espectro de HMBC do composto F2 em mistura de solventes MeOH-*d*₄/Benzeno-*d*₆ 7:3.

ANEXO 6B

Anexo 6B. Ampliações do espectro do HMBC do composto F2.

ANEXO 7

Anexo 7. Espectro de RMN-NOESY do composto F2.

ANEXO 8

18 #6 RT: 0.20 AV: 1 NL: 2.33E8
F: FTMS + p ESI Full ms [100.00-800.00]

Anexo 8. Espectro de massas de alta resolução ESI no modo positivo do composto C2B

ANEXO 9

Anexo 9. Espectro de HSQC do composto C2B em $\text{DMSO}-d_6$.

ANEXO 10

Anexo 10. Espectro de COSY ^1H - ^1H do composto C2B em $\text{DMSO-}d_6$.

ANEXO 11

Anexo 11. Espectro de HMBC do composto C2B em DMSO- d_6 .

ANEXO 12

Anexo 12. Espectro de NOESY do composto C2B em DMSO- d_6 .

ANEXO 13

Anexo 13. Espectro de massas de alta resolução ESI no modo positivo do composto G6.

ANEXO 14

Anexo 14. Espectro de COSY ^1H - ^1H do composto G6 em $\text{DMSO}-d_6$.

ANEXO 15

Anexo 15. Espectro de HMBC do composto G6 em DMSO- d_6 .

Anexo 16. Espectro de HSQC do composto G6 em DMSO- d_6 .