

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Instituto de Química de São Carlos

CAROLINE RODRIGUES DE OLIVEIRA

**Isolamento, Identificação e Derivatização de Metabólitos
Secundários de Fungos Marinheiros**

São Carlos

2023

CAROLINE RODRIGUES DE OLIVEIRA

Exemplar revisado

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

**Isolamento, Identificação e Derivatização de Metabólitos
Secundários de Fungos Marinhos**

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 Ciências.

Área de concentração: Química Orgânica e Biológica

Orientador: Prof. Dr. Roberto Gomes de Souza Berlinck

São Carlos

2023

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Assinatura: *Caroline R. Oliveira*
Data: 25/09/2023

Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Referência e Atendimento ao Usuário do SBI/IQSC

Oliveira, Caroline Rodrigues de
Isolamento, identificação e derivatização de metabólitos secundários de fungos marinhos / Caroline Rodrigues de Oliveira. — São Carlos, 2023.
112 f.

Dissertação (Mestrado em Química Orgânica e Biológica) — Instituto de Química de São Carlos / Universidade de São Paulo, 2023.
Edição revisada

Orientador: Prof. Dr. Roberto Gomes de Souza Berlinck

1. Metabólitos secundários. 2. Fungos marinhos. 3. Semi-síntese. I. Título.

Sonia Alves - CRB: 4280/8



DEDICATÓRIA

*A minha família,
Eduardo, Vianey e Yasmim.*

AGRADECIMENTOS

A Deus por plantar em meu coração o sonho de realizar um mestrado, por me dar forças e suporte para realizar essa conquista.

De modo especial ao meu pai Eduardo por apoiar-me nessa jornada de pós-graduação, agradeço a minha mãe Vianey por sempre confortar-me com suas palavras de amor, paciência e força todas as vezes que as coisas ficam difíceis e agradeço a minha irmã Yasmim por trazer felicidade ao meu coração quando mais preciso.

A minha pessoa, Gabriel, por me ouvir, compreender, confortar, aconselhar e ajudar quando mais preciso, obrigada por sempre estar ao meu lado.

Ao Pedro, Anderson e Reneid por embarcar nessa jornada de mestrado comigo e sempre estar ao meu lado me ensinando coisas novas, auxiliando e dando conselhos.

Agradeço particularmente, e muito, ao Dr. Marcelo de Rodrigues Amorim por me ensinar e ajudar a realizar minha pesquisa.

E agradeço meu orientador por sempre me desafiar cientificamente, orientar e por me dar a oportunidade de realizar o mestrado.

EPÍGRAFE

"Peçam, e será dado; busquem, e encontrarão; batam, e a porta será aberta. Pois tudo o que pede recebe; o que busca encontra; e àquele que bate, a porta será aberta" (Mateus 7, 7-8).

RESUMO

Micro-organismos isolados de ambientes restritos podem apresentar um potencial metabólico secundário diferenciado, produzindo em meio de cultivo substâncias que podem ser bioativas e de interesse farmacológico. O objetivo deste projeto foi investigar o metabólito secundário palitantina, originalmente isolado a partir de meios de cultivo do fungo *Penicillium palitans*. A linhagem fúngica *Geomyces* sp. AMF1, proveniente da Antártica, produz a (-)-palitantina em meio de cultura. A realização de um planejamento experimental fracionário permitiu estabelecer condições de crescimento do fungo que melhoraram a produção da palitantina, possibilitando obter quantidades significativas da palitantina para a sua derivatização. Dois estereoisômeros do palitanol foram obtidos por redução da palitantina com borohidreto de sódio e triacetoxiborohidreto de sódio. Os produtos da redução foram separados por HPLC e identificados por análise espectroscópica. A palitantina e os dois estereoisômeros do palitanol foram enviados para avaliação em bioensaios de atividade citotóxica, antiplamodial, antileishmania e antimicrobiana, mas nenhuma atividade biológica foi observada. A segunda parte desta pesquisa objetivou o isolamento e identificação de metabólitos produzidos em cultura pela linhagem fúngica *Peroneutypa* sp, M16, isolado de um pepino-do-mar. A fração orgânica desengordurada obtida a partir do meio de crescimento do fungo foi submetida a uma série de separações cromatográficas. Frações selecionadas para serem investigadas foram M16As44, M16As51 e M16As54, foram submetidas a separações e purificação por HPLC-UV, levando ao isolamento das substâncias **38-44**. Estas foram completamente identificadas pela análise de seus dados espectroscópicos, sendo que as substâncias **40** e **43** são inéditas na literatura.

ABSTRACT

Microorganisms isolated from restricted environments may have a differentiated secondary metabolic potential, producing substances in the culture medium that may be bioactive and of pharmacological interest. The objective of this project was to investigate the secondary metabolite palitantin, originally isolated from culture media of the fungus *Penicillium palitans*. The fungal strain *Geomyces* sp. AMF1, from Antarctica, produces (-)-palitantine in culture medium. The realization of a fractional experimental design allowed establishing fungal growth conditions that improved palitantin production, making it possible to obtain significant amounts of palitantin for its derivatization. Two stereoisomers of palitantomol were obtained by reduction of palitantin with sodium borohydride and sodium triacetoxyborohydride. Reduction products were separated by HPLC and identified by spectroscopic analysis. Palitantin and the two stereoisomers of palitantomol were sent for evaluation in bioassays for cytotoxic, antiplasmodial, antileishmania and antimicrobial activity, but no biological activity was observed. The second part of this research aimed at isolating and identifying metabolites produced in culture by the fungal strain *Peroneutypa* sp, M16, isolated from a sea cucumber. The defatted organic fraction obtained from the fungus growth medium was subjected to a series of chromatographic separations. Fractions selected to be investigated were M16As44, M16As51 and M16As54, which were submitted to separations and purification by HPLC-UV, leading to the isolation of substances **38-44**. These were completely identified by analyzing their spectroscopic data, and substances **40** and **43** are unpublished in the literature.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Potencial de utilização dos fungos.	22
Figura 2: Aplicações da pesquisa em metabólitos secundários produzidos por fungos.	23
Figura 3: Compostos reportados entre 2000 e 2018 com atividade citotóxica ou anti-tumoral.	25
Figura 4: Derivatização da matrina.	26
Figura 5: Derivatização do rottlein.	27
Figura 6: Pré-cultivo e inoculação do <i>Geomyces</i> sp.	34
Figura 7: Interrupção do crescimento do <i>Geomyces</i> sp.	35
Figura 8: Cromatogr LCMS e Espectro de massas em modo ESI-positivo da (-)-palitantina.	46
Figura 9: Espectro de RMN de ^1H (600 MHz) da (-)-palitantina em CDCl_3 .	47
Figura 10: Espectro de RMN de ^1H (125 MHz) da (-)-palitantina em CDCl_3 .	47
Figura 11: Espectro COSY (600 MHz) da (-)-palitantina em CDCl_3 .	48
Figura 12: Mecanismo de redução da (-)-palitantina com NaBH_4 .	51
Figura 13: Cromatograma de separação dos produtos de redução da palitantina com NaBH_4 .	52
Figura 14: Espectro de RMN de ^1H (125 MHz) do palitanol em CD_3OD .	52
Figura 15: Cromatograma de UV e espectro de massas em modo ESI-positivo do produto minoritário de redução da palitantina.	53
Figura 16: Cromatograma de UV e espectro de massas em modo ESI-positivo do produto majoritário de redução da palitantina.	53
Figura 17: Espectro de RMN de ^1H (600 MHz) do palitanol minoritário em CD_3OD .	55
Figura 18: Espectro de RMN de ^1H (600 MHz) do palitanol majoritário em CD_3OD .	55
Figura 19: Espectro NOESY (600 MHz) do palitanol minoritário em CD_3OD .	56
Figura 20: Correlações NOESY observadas para o estereoisômero minoritário do palitanol em CD_3OD .	56
Figura 21: Cromatograma por HPLC-UV semipreparativo da amostra M16As44B.	67
Figura 22: Cromatograma por HPLC-UV semipreparativo da amostra M16As51.	68
Figura 23: Cromatograma por HPLC-UV semipreparativo da amostra M16As51C.	68
Figura 24: Cromatograma por HPLC-UV semipreparativo da amostra M16As51D.	69
Figura 25: Cromatograma por HPLC-UV semipreparativo da amostra M16As54.	69
Figura 26: Espectro de RMN de ^1H (14,1 T; CD_3OD) do composto M16As44B3.	70
Figura 27: Espectro de RMN de ^1H (14,1 T; CD_3OD) de M16As51C1.	72

Figura 28: Substância M16As51D1 e suas correlações de HMBC e COSY.	74
Figura 29: Espectro de RMN de ^1H da substância M16As51D1 (600 MHz, CD_3OD).	75
Figura 30: Espectro de RMN de ^{13}C da substância M16As51D1 (150 MHz, CD_3OD).	75
Figura 31: Espectro HSQC da substância M16As51D1 (14,1 T, CD_3OD).	76
Figura 32: Espectro HMBC da substância M16As51D1 (14,1 T, CD_3OD).	76
Figura 33: Espectro COSY da substância M16As51D1 (14,1 T, CD_3OD).	77
Figura 34: Espectro de massas de alta resolução em modo ESI netativo da substância M16As51D1.	78
Figura 35: Espectro de IV (pastilha Si) da substância M16As51D1.	78
Figura 36: Comparação dos espectros de ECD e UV da estrutura estabelecida para a substância M16As51D1.	79
Figura 37: Espectro de RMN de ^1H da substância M16As54F (600 MHz, CD_3OD).	81
Figura 38: Espectro de RMN de ^{13}C da substância M16As54F (150 MHz, CD_3OD).	81
Figura 39: Espectro de massas de alta resolução da substância M16As54F.	82
Figura 40: Comparação dos espectros de ECD e UV da estrutura da substância M16As54F.	83
Figura 41: Espectro de RMN de ^1H da substância M16As54L (600 MHz, CD_3OD).	84
Figura 42: Espectro de RMN de ^1H da substância M16As54N (600 MHz, CDCl_3).	87
Figura 43: Espectro de RMN de ^{13}C da substância M16As54N (150 MHz, CDCl_3).	87
Figura 44: Espectro HSQC da substância M16As54N (14,1 T, CDCl_3).	88
Figura 45: Espectro HMBC da substância M16As54N (14,1 T, CDCl_3).	88
Figura 46: Espectro COSY da substância M16As54N (14,1 T, CDCl_3).	89
Figura 47: Espectro de massas de alta resolução da substância M16As54N.	89
Figura 48: Espectro no IV (pastilha de Si) da substância M16As54N.	90
Figura 49: Comparação dos espectros de ECD e UV da estrutura da substância M16As54N.	91
Figura 50: Espectro de RMN de ^1H da substância M16As54O (600 MHz, DMSO-d_6).	92
Figura 51: Cromatograma por HPLC-DAD monitorado em 254 nm.	102
Figura 52: Espectro de absorção na região do UV por HPLC-UV.	102
Figura 53: Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização.	103
Figura 54: Cromatograma por HPLC-DAD monitorado em 254nm.	103
Figura 55: Espectro de absorção na região do UV por HPLC-UV.	104
Figura 56: Espectro de ESI-MS em modo negativo de ionização.	104

Figura 57: Espectro de RMN de HSQC (14,1 T, CD ₃ OD).	105
Figura 58: Espectro de RMN de HMBC (14,1 T, CD ₃ OD).	105
Figura 59: Espectro de RMN de COSY (14,1 T, CD ₃ OD).	106
Figura 60: Cromatograma por HPLC-DAD monitorado em 254 nm.	106
Figura 61: Espectro de absorção na região do UV por HPLC-UV	107
Figura 62: Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização.	107
Figura 63: Cromatograma por HPLC-DAD monitorado em 254 nm.	108
Figura 64: Espectro de absorção na região do UV por HPLC-UV.	108
Figura 65: Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização.	109
Figura 66: Cromatograma por HPLC-DAD monitorado em 254nm.	109
Figura 67: Espectro de absorção na região do UV por HPLC-UV.	110
Figura 68: Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização.	110
Figura 69: Cromatograma por HPLC-DAD monitorado em 254 nm.	111
Figura 70: Espectro de absorção na região do UV por HPLC-UV.	111
Figura 71: Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização.	112

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Tabela de Experimentos que foram realizados pelo Planejamento Experimental Fracionário (PEF)	33
Tabela 2: Tabela com os valores codificados	34
Tabela 3: Análises de cada experimento de crescimento da linhagem <i>Geomyces</i> sp. e respectiva resposta de produção da (-)-palitantina (22).	42
Tabela 4: Dados de RMN ¹ H e ¹³ C da palitantina (600 MHz, CDCl ₃)	48
Tabela 5: Dados de RMN ¹ H do palitanol minoritário (600 MHz, CD ₃ OD).	55
Tabela 6: Distribuição das massas das frações após cromatografia em Sephadex LH-20 do extrato M16.	67
Tabela 7: Dados de RMN de ¹ H do composto M16As44B3 (14,1 T; CD ₃ OD).	71
Tabela 8: Dados de RMN de ¹ H (14,1 T; CD ₃ OD).	73
Tabela 9: Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C (14,1 T) para a substância M16As51D1.	74
Tabela 10: Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C da substância M16As54F (14,1 T, CD ₃ OD).	80
Tabela 11: Dados de RMN de ¹ H da substância M16As54L (14,1 T, CD ₃ OD).	84
Tabela 12: Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C da substância M16As54N (14,1 T, CDCl ₃).	86
Tabela 13: Dados de RMN de ¹ H da substância M16As54O (14,1 T).	93

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Fármacos desenvolvidos e aprovados (1981-2019)	20
Gráfico 2: Gráfico de Pareto dos efeitos principais para a produção de (-)-palitantina pelo fungo <i>Geomyces</i> sp.	43
Gráfico 3: Gráfico de cubo em resposta a área ajustada	44
Gráfico 4: Gráfico de efeitos principais para médias ajustadas das respostas dos experimentos de PFF para a produção da (-)-palitantina pelo fungo <i>Geomyces</i> sp.	45
Gráfico 5: Classes de compostos encontrados em fungos marinhos.	60
Gráfico 6: Metabólitos secundários isolados de culturas de micro-organismos associados a pepinos-do-mar entre 2000 a 2021.	61
Gráfico 7: Distribuição percentual das bioatividades dos produtos naturais isolados de culturas de micro-organismos associados ao pepino-do-mar.	62

LISTA DE ABREVIÇÕES

AcOEt – Acetato de Etila

ASW – Artificial Sea Water

CCD – Cromatografia de Camada Delgada

CH₂Cl₂ – Diclorometano

DBO – Demanda Bioquímica de Oxigênio

DoE – Design of Experiment

HPLC – High Performance Liquid Chromatography

MA – Marine Agar

MDPN – Método de Derivação de Produtos Naturais

MeCN – Acetonitrila

MeOH – Metanol

MS – Espectrometria de Massas

NOESY - Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy

PDA – Potate Dextrose Agar

PFF – Planejamento Fatorial Fracionário

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

UPLC – Ultra Performance Liquid Chromatography

UV – Ultravioleta

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
CAPÍTULO 1	18
PANORAMA DA PESQUISA EM PRODUTOS NATURAIS DE MICRO-ORGANISMOS	18
1.1 <i>PERSPECTIVA ATUAL DA PESQUISA EM PRODUTOS NATURAIS DE MICRO-ORGANISMOS</i>	19
1.2 <i>FUNGOS: IMPORTANTES PRODUTORES DE MOLÉCULAS BIOATIVAS</i>	21
CAPÍTULO 2	24
ELABORAÇÃO DE DERIVADOS DA PALITANTINA PARA A OBTENÇÃO DE ANÁLOGOS BIOATIVOS	24
2.1 <i>DERIVATIZAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS E SUA IMPORTÂNCIA</i>	25
2.3 <i>PALITANTINA</i>	27
2.4 <i>JUSTIFICATIVA</i>	29
2.5 <i>OBJETIVOS</i>	30
2.5.1 <i>OBJETIVOS GERAIS</i>	30
2.5.2 <i>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</i>	30
2.6 <i>EQUIPAMENTOS E GENERALIDADES</i>	31
2.6.1 <i>ESPECTROMETRIA DE MASSAS E ULTRAVIOLETA – TÉCNICAS HIFENADAS</i>	31
2.6.2 <i>RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR</i>	32
2.6.3 <i>TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS</i>	32
2.7 <i>METODOLOGIA</i>	32
2.7.1 <i>OTIMIZAÇÃO DE PRODUÇÃO DA PALITANTINA</i>	32
2.7.2 <i>REDUÇÃO DA PALITANTINA COM BORO HIDRETO DE SÓDIO: FORMAÇÃO DO PALITANTOL</i>	38

2.7.3 REDUÇÃO DA PALITANTINA COM TRIACETOXIBOROHIDRETO DE SÓDIO	38
2.8 RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
2.8.1 DESIGN OF EXPERIMENTS: OTIMIZAÇÃO DE PRODUÇÃO DA PALITANTINA	39
2.8.2 REDUÇÃO DA PALITANTINA COM BORO HIDRETO DE SÓDIO E COM TRIACETOXIBOROHIDRETO DE SÓDIO: FORMAÇÃO DE DOIS ESTEREOISÔMEROS DO PALITANTOL	49
CAPÍTULO 3	58
ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS PRODUZIDO PELO FUNGO <i>Peroneutypa</i> sp.	58
3.1 POTENCIAL FARMACOLÓGICO DE FUNGOS MARINHOS	59
3.2 MICROBIOMAS DE PEPINOS-DO-MAR (HOLOTÚRIAS, ECHINODERMATA)	60
3.2.1 O FUNGO <i>Peroneutypa</i> sp.	63
3.4 OBJETIVOS	64
3.4.1 OBJETIVO GERAL	64
3.4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	64
3.5 MATERIAIS E MÉTODOS	64
3.5.1 PROCEDIMENTOS GERAIS PARA REATIVAÇÃO, CULTIVO E OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DA LINHAGEM M16 (<i>Peroneutypa</i> sp)	64
3.6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
3.6.1 IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA SUBSTÂNCIA M16As44B3	70
3.6.2 IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS PRESENTES NA FRAÇÃO M16As51	71
3.6.3 IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS PRESENTES NA FRAÇÃO M16As54	79
3.6.4 RESUMO DO FLUXO DE TRABALHO E IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS	94

CAPÍTULO 4	95
CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS	95
5 REFERÊNCIAS	97
6 ANEXOS:	102
6.1 <i>DADOS ESPECTROSCÓPICOS REFERENTE A M16As51C1</i>	102
6.2 <i>DADOS ESPECTROSCÓPICOS REFERENTE A M16As51D1</i>	103
6.3 <i>DADOS ESPECTROSCÓPICOS REFERENTE A M16As54F</i>	105
6.4 <i>DADOS ESPECTROSCÓPICOS REFERENTE A M16As54L</i>	108
6.5 <i>DADOS ESPECTROSCÓPICOS REFERENTE A M16As54N</i>	109
6.6 <i>DADOS ESPECTROSCÓPICOS REFERENTE A M16As54O</i>	111

CAPÍTULO 1

PANORAMA DA PESQUISA EM PRODUTOS NATURAIS DE MICRO-ORGANISMOS

*"Nada na vida deve ser temido, somente compreendido [...]"
(Marie Curie)*

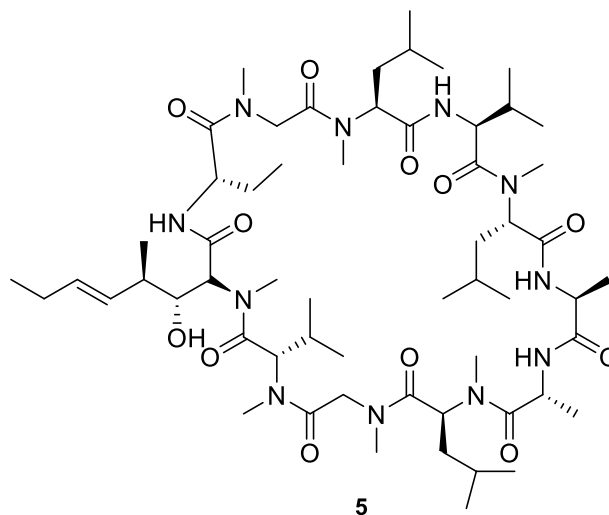
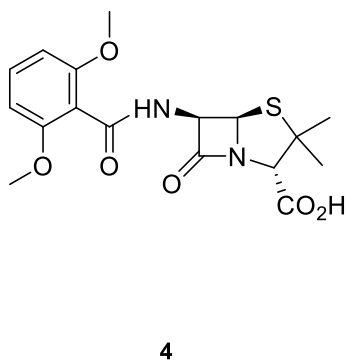
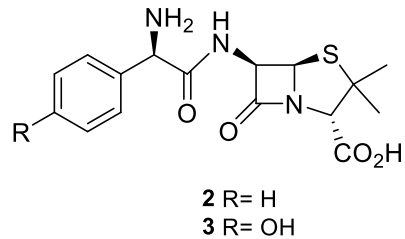
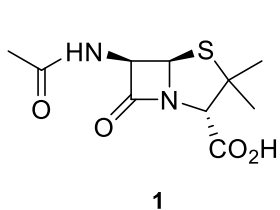
1.1 PERSPECTIVA ATUAL DA PESQUISA EM PRODUTOS NATURAIS DE MICRO-ORGANISMOS

Os metabólitos secundários (também conhecidos por produtos naturais) são utilizados desde a antiguidade para o tratamento de diversas doenças. Metabólitos secundários isolados de plantas são conhecidos há muito como agentes terapêuticos (CHOPRA; DHINGRA, 2021) e desempenharam um papel fundamental na descoberta de novos medicamentos.

Metabólitos secundários são em geral substâncias extracelulares, as quais não exercem funções vitais no organismo de origem. Metabólitos secundários de plantas, micro-organismos e organismos marinhos são moléculas de baixo peso molecular (< 3.000 Da) que apresentam uma grande diversidade estrutural e potentes atividades biológicas, apresentando diversas aplicações, como fármacos, uso na agricultura como herbicidas e inseticidas, além de outras aplicações úteis (KATZ; BALTZ, 2016)

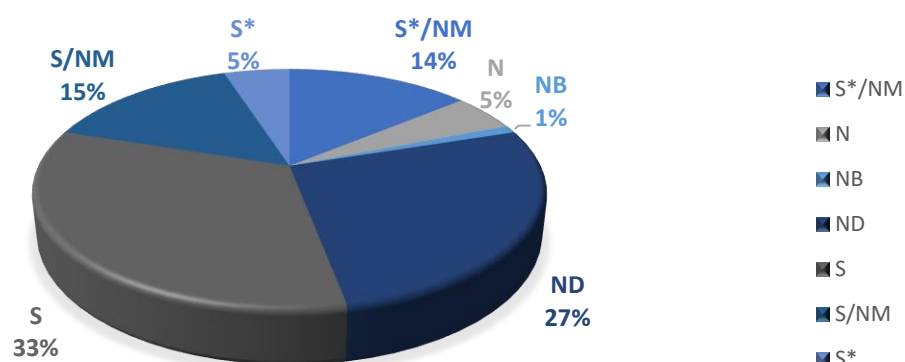
A descoberta da penicilina (1) em 1929 por Alexandre Fleming revolucionou o século XX, pois proporcionou que inúmeras vidas fossem salvas principalmente durante a Segunda Guerra Mundial. Conseqüentemente, a indústria farmacêutica fez da estrutura química da penicilina modelo para desenvolver novos antibióticos como a ampicilina (2), amoxicilina (3) e metecilina (4).

Outro metabólito secundário, a ciclosporina (5), produzida pelo fungo *Tolypocladium inflatum*, é um imunossupressor que viabilizou transplantes e foi fundamental para diminuir a rejeição de órgãos em pacientes transplantados (TAKAHASHI et al., 2017). Esses são apenas alguns metabolitos secundários que deram origem a fármacos importantes para a manutenção da saúde.



Os metabólitos secundários tornaram-se promissores para a produção de fármacos. Considera-se que 30% dos medicamentos atuais são metabólitos secundários ou derivados de metabólitos secundários (NEWMAN; CRAGG, 2020).

Gráfico 1: Fármacos desenvolvidos e aprovados (1981-2019)



Fonte: IÓCA (2020, p. 19), adaptado de Newman e Cragg (2020). Legenda – N: produtos naturais inalterados, NB: mistura de compostos de plantas, ND: derivados de produtos naturais, S: compostos sintéticos, S*: compostos sintéticos baseado em modelo farmacofórico de PN, /NM: composto que adquirem um PN.

Newman e Cragg (2020) relatam 1394 fármacos aprovados entre os anos 1981 a 2019 (Gráfico 1). O gráfico indica que grande parte dos fármacos hoje produzido tem origem em metabólitos secundários, impulsionando os pesquisadores dessa grande área investir esforços na descoberta de metabólitos bioativos, uma vez que a diversidade da flora, de micro-organismos e de organismos marinhos é extremamente diversificada possibilitando a descoberta de novos metabólitos secundários bioativos.

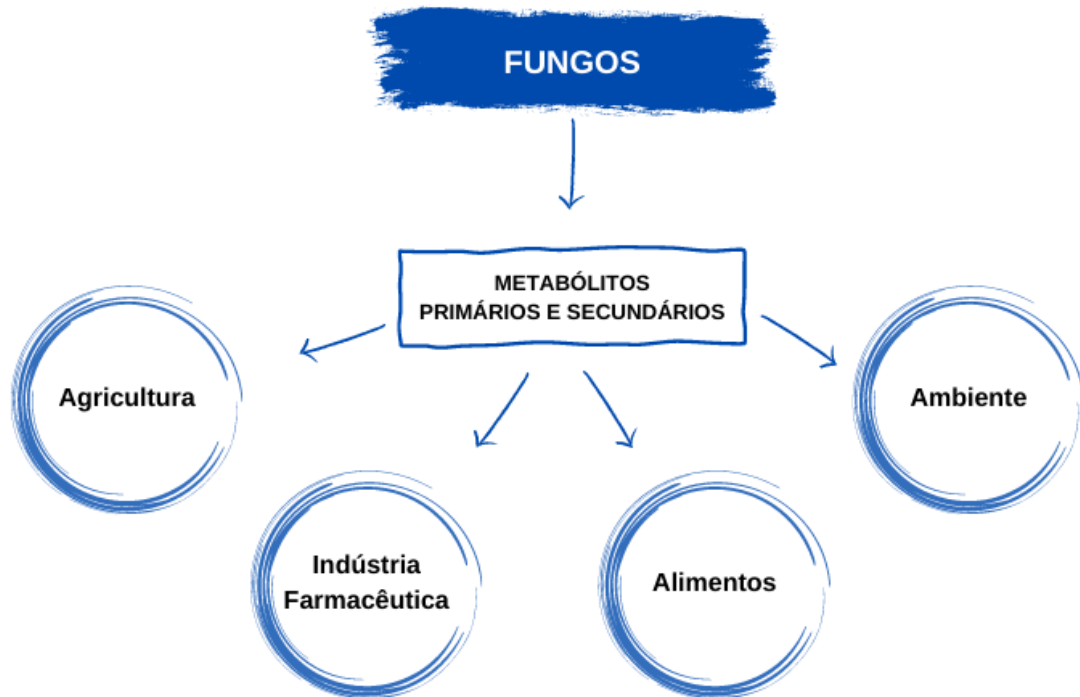
A interação entre a química e a microbiologia é extremamente importante e promissora, propiciando aos pesquisadores que atuam em projetos colaborativos e interdisciplinares a buscarem compostos para serem desenvolvidos como novos medicamentos mais eficazes (CHOPRA; DHINGRA, 2021).

1.2 FUNGOS: IMPORTANTES PRODUTORES DE MOLÉCULAS BIOATIVAS

Os fungos são seres eucarióticos eficientes na degradação de substratos. Apresentam-se como leveduras, pseudomicélios ou podem construir hifas. No entanto, nunca formam um tecido verdadeiro (ESPOSITO; AZEVEDO, 2010). Com diversos papéis ecológicos e modos nutricionais, os fungos apresentam uma enorme diversidade de espécies (CHETHANA et al., 2021). São um grupo heterogêneo, sendo possível encontrá-los em diversos nichos ecológicos. Estima-se que o reino Fungi possua cerca de 2,2 a 3,8 milhões de espécies; contudo, somente 10% dessas são nomeadas e classificadas (CHETHANA et al., 2021).

Os fungos desempenham papéis cruciais na estabilidade de diversos ambientes ecológicos, bem como em diversas aplicações industriais (HYDE et al., 2019). São responsáveis pela produção de alguns ácidos orgânicos, como o ácido cítrico; pela produção de fármacos, como antibióticos; enzimas de interesse industrial, bem como de substâncias que podem ser utilizadas no controle biológico de pragas na agricultura, bem como na indústria de alimentos, como na fabricação de diferentes tipos de queijos (como camembert, roquefort, gorgonzola, brie, dentre muitos outros) (ESPOSITO; AZEVEDO, 2010).

Figura 1: Potencial de utilização dos fungos.

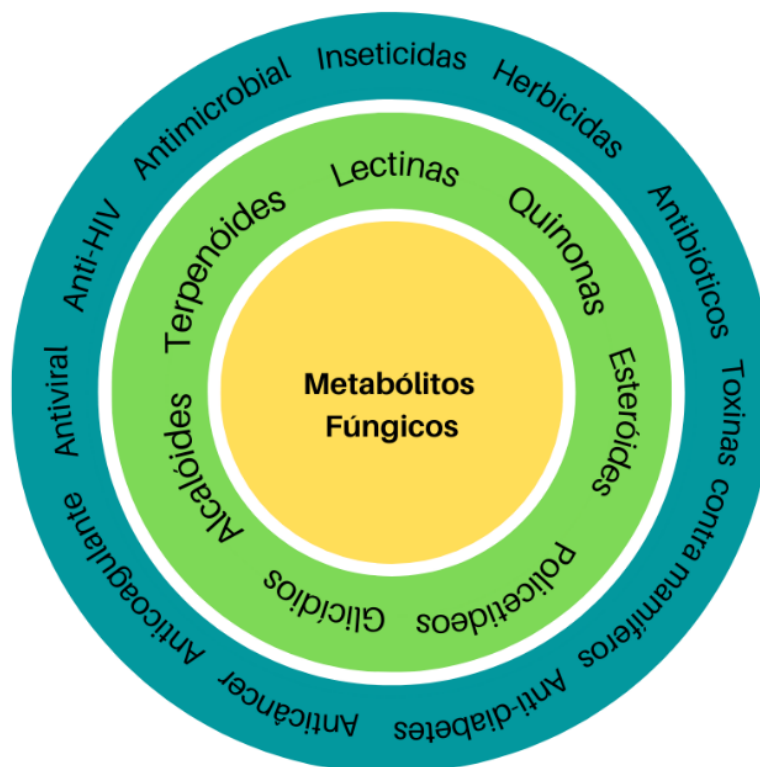


Fonte: A autora.

Os metabólitos secundários de fungos são produzidos a partir de componentes do meio de cultivo quando o crescimento se encontra em fase estacionária, após a fase exponencial de crescimento. As condições de cultivo e composição do meio influenciam a formação desses metabólitos, sendo possível ampliar a produção de metabólitos variando-se as condições de cultivo dos fungos.

Para os fungos, os metabólitos secundários podem ser ionóforos e micotoxinas contra bactérias, amebas e insetos, mas não são essenciais para as funções vitais. Vários metabólitos secundários fúngicos apresentam efeitos tóxicos, como as micotoxinas. Outros apresentam atividade como antibióticos, inibidores tumorais e imunossupressores (Figura 2).

Figura 2: Aplicações da pesquisa em metabólitos secundários produzidos por fungos.



Fonte: GHOLAMI-SHABANI; SHAMS-GHAHFAROKHI; RAZZAGHI-ABYANEH (2019, p198). Adaptado.

O projeto dessa dissertação de mestrado teve como objetivo cultivar e explorar os metabólitos secundários produzidos pelos fungos *Geomyces* sp. e *Peroneutypa* sp. descritos com maior atenção em capítulos posteriores.

CAPÍTULO 2

ELABORAÇÃO DE DERIVADOS DA PALITANTINA PARA A OBTENÇÃO DE ANÁLOGOS BIOATIVOS

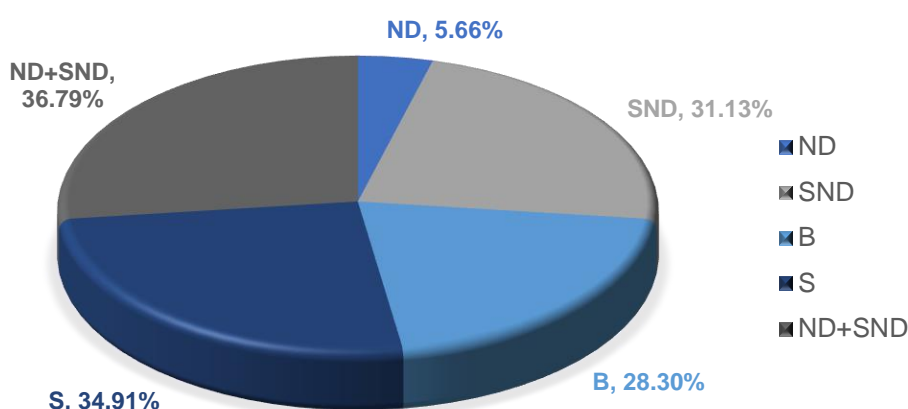
"O senhor me diz quando e onde quer que aterrisse (a nave), e eu lhe direi onde, quando e como lançá-la." (Katherine Johnson)

2.1 DERIVATIZAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS E SUA IMPORTÂNCIA

Os metabólitos secundários apresentam diversos grupos funcionais, centros estereogênicos e proporções relativas de heteroátomos/átomos de carbono que os tornam biologicamente ativos. Por isso, metabólitos secundários vêm sendo empregados como bom ponto de partida em projetos de síntese de análogos, uma vez que modificações estruturais são muitas vezes necessárias para o desenvolvimento de derivados ainda mais ativos (MAJHI; DAS, 2021). Entre 1981 e 2014 os metabólitos secundários e seus derivados semissintéticos constituíram 25% de todos os medicamentos aprovados pela indústria farmacêutica (MAJHI; DAS, 2021).

Com intuito de exemplificar a importância do Método de Derivatização de Produtos Naturais (MDPN), Liu et al. (2019) indicam o valor dos PNs servindo como medicamento para tratamento de um amplo espectro de doenças desde a China antiga. O MDPN foi definido como método de desenvolvimento de modelos de fármacos, baseando-se em farmacóforos de produtos naturais, com o objetivo de descobrir novos agentes antitumorais. Entre 2000 e 2018 foram contabilizados 106 novos compostos com atividade citotóxica ou anti-tumoral (em tecidos cancerígenos) sobre células de diferentes tipos de câncer (LIU et al., 2019) (Figura 3).

Figura 3: Compostos reportados entre 2000 e 2018 com atividade citotóxica ou anti-tumoral.



Fonte: LIU et al., 2019. Legenda: Natural Product Derivative (ND), Natural compounds ou compounds semi-synthesized from natural products; Synthetic Natural Derived (SND), Natural Product Pharmacophore; Biological (B) e biological macromolecule; synthetic (S).

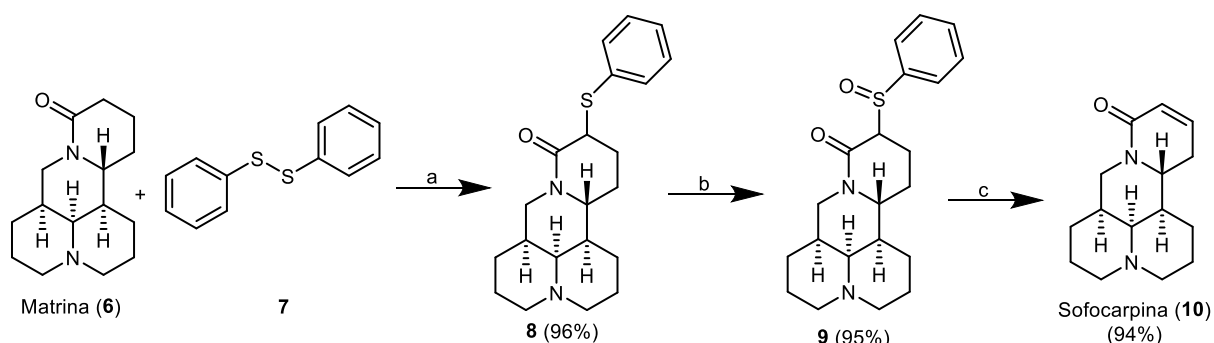
A presente análise das categorias ND e SND indica que a derivatização de produtos naturais desempenha um papel importante na descoberta e desenvolvimento de novos agentes anticancerígenos. Considerando-se as novas entidades moleculares, 36,79% (ND+SND) são projetados por MDPN.

Exemplo de aplicações de semi-síntese é aumentar a lipofilicidade dos compostos, inserção de átomos de halogênio e modificação de grupos funcionais que potencializam a atividade biológica dos metabólitos originalmente isolados de diferentes fontes biológicas. O objetivo principal de uma semi-síntese é amplificar a seletividade da atividade biológica, incrementar a ação terapêutica, bem como melhorar as características físico-químicas e farmacocinéticas de metabólitos secundários bioativos (HYDE et al., 2019).

Dois exemplos para ilustrar a aplicabilidade de reações químicas de derivatização de metabólitos secundários de maneira a melhorar suas propriedades biológicas são a matrina (**6**) e o rottlerin (**11**).

A planta *Sophora alopercuroides* L. é a principal fonte do alcaloide matrina (**6**), o qual foi utilizado como material de partida para a semi-síntese de sofocarpina (**10**), com diversas aplicações clínicas na fitoterapia chinesa. A substituição em posição α da carbonila da matrina por sulfeto de fenila (**7**), seguido de oxidação do tioéter formado (**8**) para sulfóxido (**9**) (MAJHI; DAS, 2021), seguido de eliminação do fenilsulfóxido para formação da amida α,β -insaturada levou à formação da sofocarpina com 86% de rendimento total. O produto (**10**) apresentou atividades anticancerígena, antiinflamatória e antivírus.

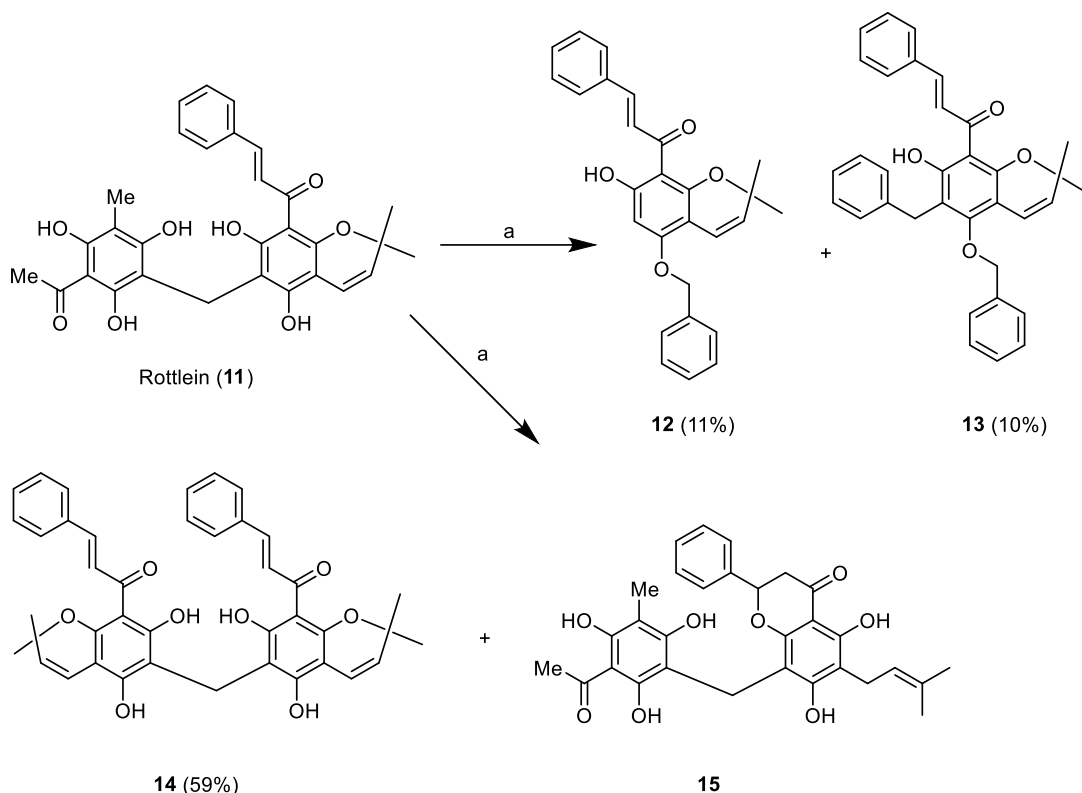
Figura 4: Derivatização da matrina.



Fonte: MAJHI; DAS, 2021. Legenda: (a) Di-isopropilamida de lítio, (b) Ácido 2-iodoxibenzoico, H₂O, HCl, (c) K₂CO₃, tolueno, refluxo.

No caso do rottlein (**11**), inicialmente isolado da planta *Mallotus philippensis*, este foi reagido em temperatura ambiente com brometo de benzila na presença de carbonato de potássio, fornecendo quatro produtos (**12-15**) (MAJHI; DAS, 2021). O rottlein e seus derivados apresentaram atividade citotóxica em linhagens celulares de câncer. O composto (**11**) exibiu citotoxicidade contra células HL-60 e MIAPaCa-2 com valores de IC₅₀ de 9 e 8 µM, respectivamente. Já o produto (**15**) apresentou IC₅₀ entre 16 e 9 µM para as mesmas células (MAJHI; DAS, 2021).

Figura 5: Derivatização do rottlein.



Fonte: MAJHI; DAS, 2021. Legenda: (a) brometo de benzila, K₂CO₃, acetona, temperatura ambiente.

Os exemplos anteriores de semi-síntese de metabólitos secundários apresentam diversas utilidades, desde formar análogos bioativos como também ampliar a quantidade de um composto para posteriores estudos de mecanismo-de-ação farmacológica e outras aplicações.

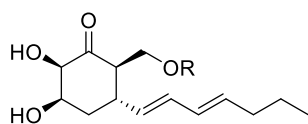
2.3 PALITANTINA

A palitantina (**16**) é um metabólito secundário originalmente isolado do meio de cultura do fungo *Penicillium palitans* (BIRKINSHAW; RAISTRICK, 1936). A frequentina (**17**) foi subsequentemente isolada, cuja estrutura se assemelha à da palitantina (CURTIS, 1952)(CURTIS; HEMMING; SMITH, 1951).

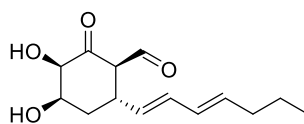
Quando avaliada em ensaios biológicos, a frequentina (**17**) apresentou atividade antifúngica (CURTIS; HEMMING; SMITH, 1951), inibindo o crescimento de *Botrytis alli*, *Penicillium gladioli*, *Stachybotrys atra*, *Mucor mucedo*, *Absidia gluca*, *Aspergillus niger* e o crescimento das bactérias *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*.

As estruturas da palitantina e da frequentina foram estabelecidas em 1959 por degradação química (BIRKINSHAW; RAISTRICK, 1936; BOWDEN; LYTHGOE; MARSDEN, 1959; CURTIS, 1952).

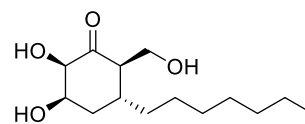
Subsequentemente, diversos derivados da palitantina foram isolados (**18-26**) (LIU et al., 2013; XU et al., 2014). O composto **20** foi o que apresentou mais potente atividade citotóxica em diversas linhagens de células tumorais. Os derivados **23-26** não apresentaram atividade citotóxica, mas os compostos **23** e **25** apresentaram atividade antifúngica moderada contra linhagens de fungos do gênero *Candida*, *Cryptococcus neoformans* e *Trichophyton rubrum* (XU et al., 2014). Em 2018 a (-)-palitantina foi novamente isolada de culturas do fungo *Aspergillus fumigatiaffinis*, e demonstrou inibir o crescimento das bactérias *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus pneumoniae* (OLA et al, 2018).



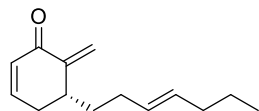
16 R = H
19 R = Ac
20 R = (CO)H



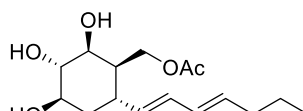
17



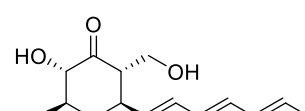
18



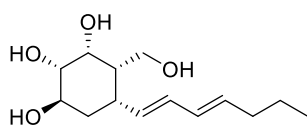
21



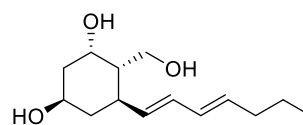
22



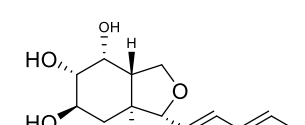
23



24



25



26

Recentemente a palitantina (**16**) foi isolada do meio de crescimento de uma linhagem de fungo, *Geomyces* sp., pelo Dr. Afif Felix Monteiro, no laboratório coordenado pelo Professor Roberto G. S. Berlinck.

Os fungos pertencentes a este gênero produzem esporos pequenos, unicelulares, ovais ou em forma de artroconidia por meio de hifas existentes em aglomerados ramificados os quais podem ser descritos como semelhantes a árvores apoiadas em conidióforos (HAYES, 2012).

A sua reprodução é assexuada, na qual propágulos – estruturas que são dispersas pelo vento, água ou animais e formam novas massas fúngicas – são formados quando as pontas das hifas se separam ao longo das paredes celulares (LARONE, 1987). As espécies de *Geomyces* são em pequeno número, comumente encontrados em solos de ecossistemas temperados de alta latitude e propagados em ambientes antárticos marinhos.

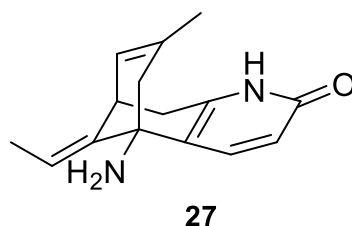
Em outras palavras, são micro-organismos adeptos a ambientes frios, denominando-se psicrófilas (HAYES, 2012). Espécies de *Geomyces* são tolerantes a alta salinidade. Algumas espécies utilizam celulose como fonte de nutrientes. Estão presentes em diversos ecossistemas, sendo corriqueiramente em ambientes frios, tais como em solos de campos de trigo na Alemanha (DOMSCH et al, 2007), permafrost do Ártico (OZERSKAYA et al, 2009), solos antárticos, associados a macroalgas antárticas e associados em ecossistemas de águas profundas (ARENZ et al, 2006). De acordo com Ozerskaya et al (2009), espécies de *Geomyces* ocorrem frequentemente em permafrost (regiões com solo permanentemente congelado), indicando que vivem em ambientes de temperaturas baixas.

2.4 JUSTIFICATIVA

Estudos de atividade biológica com a palitantina (**18**) indicaram que essa substância inibe o crescimento de *Leishmania brasiliensis*, mas não o crescimento do parasita *Trypanozoma cruzi* (causador da doença de Chagas), da alga *Euglena gracilis*, do fungo *Candida pseudotropicalis*, bem como das bactérias *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli* (FUSKA et al, 1970). Já a frequentina (**17**) inibiu efetivamente o crescimento do fungo *Botrytis cinerea*, enquanto que a palitantina inibiu mais efetivamente o crescimento dos fungos *Cladosporium cucumerinum*, *Epicoccum nigrum* e *Trichothecium roseum*. Os dois compostos inibiram de maneira idêntica o crescimento dos fungos *Ascochyta pisi*, *Fusarium solani*, *Monilinia laxa*, *Penicillium*

expansum, *Verticillium dahliae*, *Aspergillus flavus*, *Nitchea sp.*, *Phoma glomerata* e *Trichoderma viride* (DE CAL; SAGASTA; MELGAREJO, 1988).

Mais recentemente observou-se que a palitantina exerce atividades de inibição da enzima acetilcolinesterase, com potência quase idêntica à da substância controle, huperzina (**27**), fármaco utilizado para mitigar os sintomas e a progressão da doença de Alzheimer (HUANG et al., 2014).



Tendo em vista a atividade de inibição da enzima AChE pela palitantina, a preparação de derivados desse metabólito poderia incrementar ainda mais esta atividade. Além disso, é inviável a produção desse metabólito por síntese total (MAHAPATRA; NANDA, 2009).

Logo a produção da palitantina por via fermentativa oferece a oportunidade de preparar derivados deste composto, tendo em vista seus vários grupos funcionais: carbonila de cetona, álcool primário, álcoois secundários e sistema de duas duplas ligações conjugadas.

A primeira parte desse projeto de mestrado objetivou obter derivados da palitantina e avaliar suas atividades antifúngica, antimicrobiana, anti-*Leishmania* e anti-plasmodial.

2.5 OBJETIVOS

2.5.1 OBJETIVOS GERAIS

Ampliar a produção da palitantina sob condições melhoradas de crescimento e produção. Em um segundo momento preparar derivados da palitantina e avaliar suas atividades biológicas.

2.5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Crescer o fungo *Geomyces sp* produtor da palitantina e realizar um Planejamento Experimental Fracionário e analisar os dados obtidos de maneira a se encontrar uma condição ótima para a produção da palitantina;

2. Realizar a purificação da palitantina por métodos cromatográficos;
3. Caracterizar a palitantina e seus derivados utilizando-se dados espectroscópicos;
4. Avaliar as atividades biológicas dos derivados obtidos em testes de atividade antifúngica, antimicrobiana, anti-*Leishmania* e anti-plasmodial.

2.6 EQUIPAMENTOS E GENERALIDADES

2.6.1 ESPECTROMETRIA DE MASSAS E ULTRAVIOLETA – TÉCNICAS HIFENADAS

Análises por cromatografia líquida acoplada a detectores por arranjo de diodos, espalhamento de luz e de espectrometria de massa (HPLC-PDA-MS/ESI) foram realizadas em sistema constituído de um cromatógrafo líquido de alta eficiência da marca Waters, modelo Alliance 2695, acoplado a um detector espectrofotométrico de varredura UV-Visível Waters modelo 2696, entre os comprimentos de onda 200 e 800 nm, por sua vez conectado a um espectrômetro de massas marca Waters, modelo Micromass ZQ2000.

Os seguintes parâmetros de fonte de ionização do espectrômetro de massas foram utilizados: voltagem capilar 3,0 kV, temperatura da fonte 100 °C, temperatura de dessolvatação 350 °C, o qual opera em modo de ionização por *electrospray* (*Electrospray Ionization*, ESI) estando em modo positivo e negativo de 300 à 1500 Da e fluxo de gás no cone à 50 L/h.

Análises por espectrometria de massas de alta resolução (UPLC-QTOF-MS/MS) foram realizadas em sistema constituído por um cromatógrafo líquido de ultra eficiência (*Ultra Performance Liquid Chromatography*, UHPLC) Waters, modelo Acquity UPLC H-class, acoplado a um espectrômetro de massas de alta resolução quadrupolar e tempo de vôo (*Quadrupole-Time of Flight Mass Spectrometry*, QTOF-MS) Waters Xevo G2-XS QTOF, com ionização por *electrospray* (ESI) em modo positivo, utilizando os seguintes parâmetros: voltagem do capilar de 1,2 kV, voltagem do cone 30 V, temperatura da fonte 100 °C, temperatura de dessolvatação 450 °C, fluxo de gás no cone 50 L/h e dessolvatação 750 L/h, varrendo 200-1500 Da, intervalo de varredura de 0,2 s, energia de colisão de 30-50 V.

As amostras para a análise foram preparadas em concentração de 2 a 5 mg/mL em MeOH e filtradas utilizando-se filtros de seringa de 10 mm.

2.6.2 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Os espectros de RMN foram obtidos utilizando-se equipamento Bruker Advance III (14,1 T), operando a 600 MHz na frequência do hidrogênio (^1H) e a 150 MHz na frequência do carbono (^{13}C). Os dados foram obtidos e processados utilizando-se o software TopSpin.

2.6.3 TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

Separações cromatográficas em colunas pré-empacotadas (Waters Sep-Pack vac 35cc e Phenomenex Strata) foram realizadas em colunas contendo 5 ou 10 g de fase estacionária de sílica-gel derivatizada com grupos cianopropila. A fase móvel utilizada foi: 100% diclorometano (CH_2Cl_2), 9:1 CH_2Cl_2 /acetato de etila (AcOEt), 8:2 CH_2Cl_2 /AcOEt, 7:3 CH_2Cl_2 /AcOEt, 6:4 CH_2Cl_2 /AcOEt, 1:1 CH_2Cl_2 /AcOEt, 4:6 CH_2Cl_2 /AcOEt, 3:7 CH_2Cl_2 /AcOEt, 2:8 CH_2Cl_2 /AcOEt, 1:9 CH_2Cl_2 /AcOEt e 100% AcOEt, em modo gradiente de eluição.

Também foi utilizada separação por cromatografia por exclusão de tamanho (size-exclusion chromatography), realizada em coluna de vidro com 170 cm de comprimento e 2 cm de diâmetro de largura, utilizando-se Sephadex-LH20 como fase estacionária e MeOH como fase móvel, em modo isocrático.

Análises por cromatográfica em camada delgada (CCD) foram realizadas utilizando-se cromatofolhas de sílica gel 60 sobre poliéster e CH_2Cl_2 /MeOH 9:1 como eluente. Após eluição, as placas de CCD foram observadas sob luz ultravioleta no comprimento de onda de 225 nm, sob lâmpada Spectroline modelo ENF-240 C/FE.

Separações cromatográficas em sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência analítico/semi-preparativo foram realizadas com um detector UV, marca Waters, utilizando-se diferentes colunas de sílica gel derivatizadas com grupo C_{18} com solventes grau HPLC (MeOH e MeCN) e água MILI-Q. Frações provenientes das separações por HPLC foram secas em um sistema de centrífuga a vácuo Savant, modelo Speedvac Plus SC 210.

2.7 METODOLOGIA

2.7.1 OTIMIZAÇÃO DE PRODUÇÃO DA PALITANTINA

Com o intuito de aumentar o rendimento da produção da palitantina, foi realizado um Planejamento Experimental Fatorial Fracionário (PFF). Assim, foram avaliadas cinco variáveis no crescimento do fungo *Geomyces* sp. e produção da

palitantina (Tabela 1): temperatura de incubação, tempo de incubação, concentração dos componentes do meio de cultura, solvente e rotação da incubação.

A linhagem fúngica do gênero *Geomyces sp.* cultivada neste estudo foi isolada de um anfípode (um tipo de crustáceo), coletado na Antártica pelo grupo da Prof^a Lara D. Sette (IB – UNESP | Rio Claro-SP). O fungo foi inoculado em placas de Petri contendo ágar dextrose de batata (PDA) e incubado por 14 dias, a 15 °C. Elaborou-se a matriz de experimentos utilizando-se o software Minitab, utilizando-se as variáveis acima descritas, obtendo-se as tabelas 1 e 2.

Tabela 1: Tabela de Experimentos que foram realizados pelo Planejamento Experimental Facionário (PEF)

Experimento	Temperatura de incubação (°C)	Tempo de incubação (dias)	Concentração do meio/malte 2,0 g/100 mL (%)	Água para preparo do meio (Solvente)	Rotação de incubação (rpm)
1	15	28	20	ASW ¹	160
2	30	28	20	ASW	0
3	15	14	20	ASW	0
4	30	14	20	ASW	160
5	15	28	80	ASW	0
6	30	28	80	ASW	160
7	15	14	80	ASW	160
8	30	14	80	ASW	0
9	15	28	20	Destilada	0
10	30	28	20	Destilada	160
11	15	14	20	Destilada	160
12	30	14	20	Destilada	0
13	15	28	80	Destilada	160
14	30	28	80	Destilada	0
15	15	14	80	Destilada	0

¹ Artificial Sea Water (ASW): 13,6 g/L NaCl, 4,53 g/L MgCl₂.6H₂O, 1,3 g/L CaCl₂.2H₂O, 0,64 g/L KCl, 5,94 g/L MgSO₄.7H₂O, 0,01 g/L Na₂HPO₄.2H₂O, 0,0021 g/L NH₄NO₃

16	30	14	80	Destilada	160
----	----	----	----	-----------	-----

Fonte: A autora.

Tabela 2: Tabela com os valores codificados

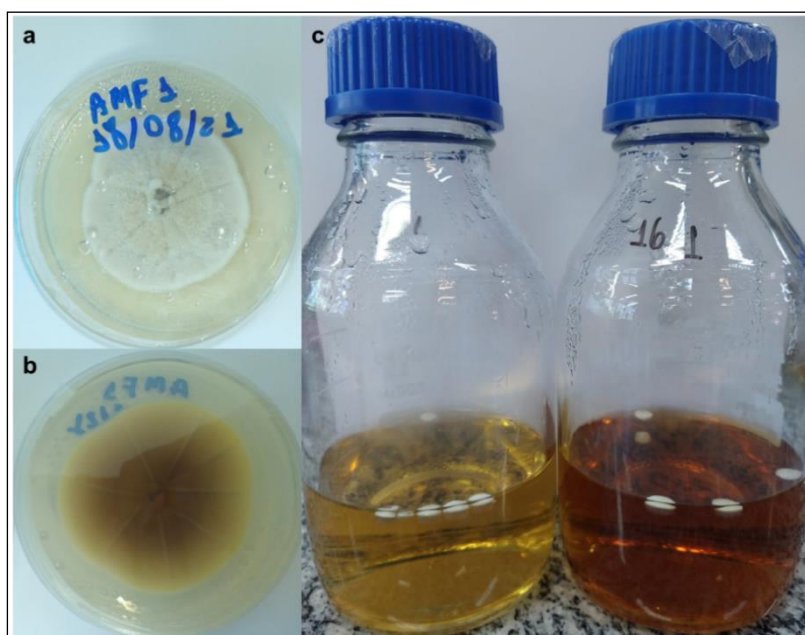
	Variáveis	Temperatura (°C)	Tempo (dias)	Concentração do meio/malte 2,0 g/100 mL (%)	Água para preparo do meio (Solvente)	Rotação (rpm)
Níveis	-1	15	28	20	ASW	0
	1	30	14	80	Destilada	160

Fonte: A autora.

Após pré-cultivo do fungo *Geomyces* sp. durante 14 dias em placas de Petri, cinco discos de ágar contendo o fungo foram transferidos para frascos Schott 500 mL, contendo cada um 200 mL de meio de cultivo.

Com o fungo inoculado nos meios de crescimento nos frascos Schott foram realizados 16 experimentos distintos, todos em triplicatas, totalizando 48 experimentos.

Figura 6: Pré-cultivo e inoculação do *Geomyces* sp.



Fonte: A autora. (a) pré-inoculação imagem da frente da placa de Petri. (b) pré-inoculação imagem do verso da placa de Petri. (c) inoculação em meio de 20% e 80% de malte 2%, respectivamente.

Para interromper o crescimento do fungo adicionou-se acetato de etila (AcOEt) ao meio de crescimento em volume igual ao volume do meio de crescimento. Após agitação manual da mistura AcOEt + meio de crescimento, a mistura de cada Schott foi deixada em repouso durante uma noite.

Figura 7: Interrupção do crescimento do *Geomyces sp.*



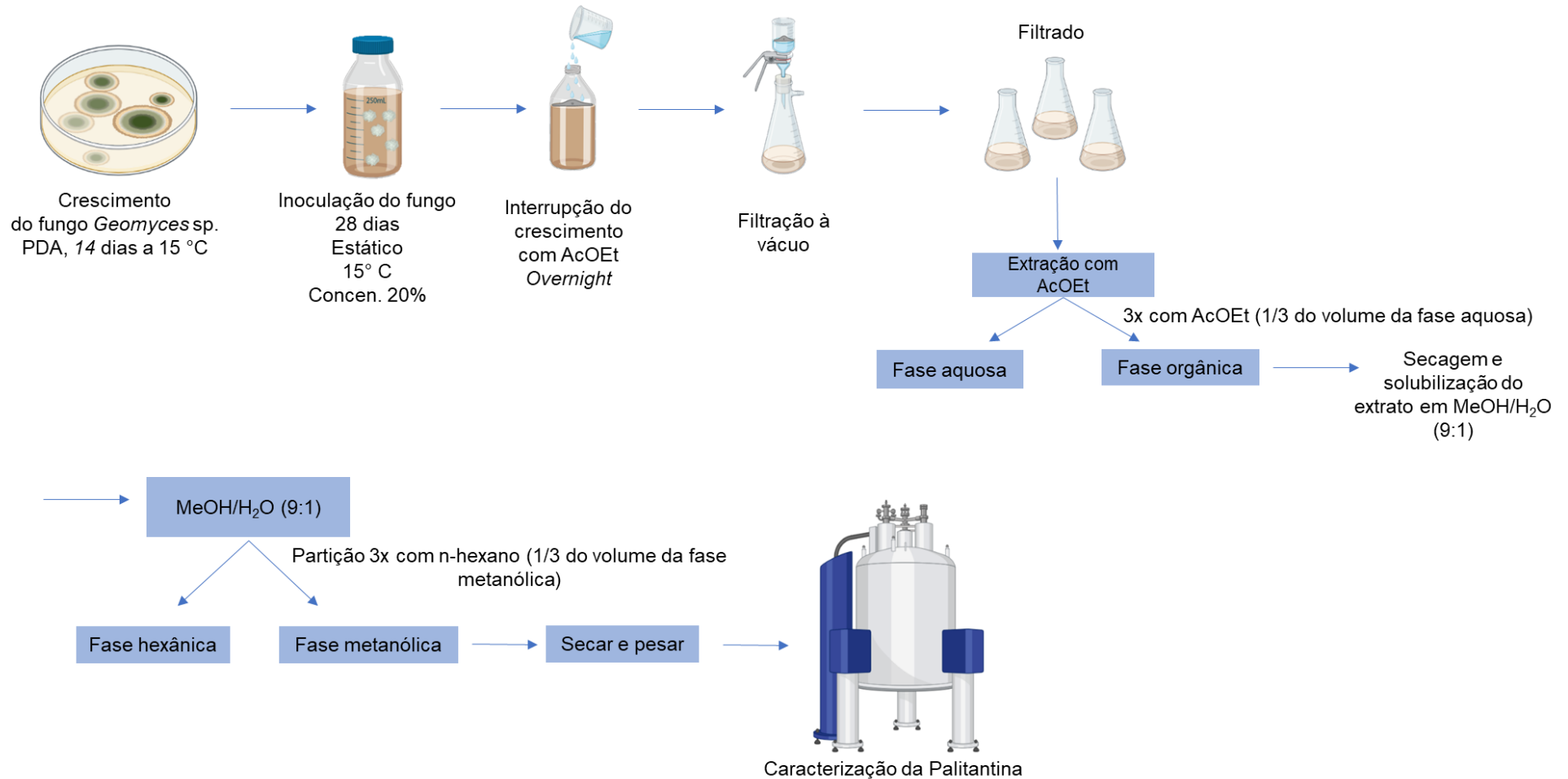
Fonte: A autora.

Em seguida realizou-se uma filtração a vácuo do meio de crescimento + AcOEt em funil de Buchner contendo papel de filtro, para separação do micélio. A mistura meio de crescimento + AcOEt filtrada foi então submetida a uma separação líquido-líquido. Após a separação e coleta da fração orgânica, foram realizadas mais 2 partições da fração aquosa com AcOEt. A fração aquosa foi descartada. A fração AcOEt foi reunida e evaporada até a secura. Este procedimento foi realizado para cada um dos Schotts de crescimento do fungo, individualmente.

Cada extrato AcOEt de cada um dos Schotts de crescimento foi então dissolvido em MeOH/H₂O 9:1 e esta mistura foi particionada com n-hexano (3 x o mesmo volume da fração MeOH/H₂O), para desengordurar o extrato bruto AcOEt.

A fração MeOH/H₂O 9:1 foi coletada e evaporada completamente. Após evaporação e completa secagem da fração MeOH/H₂O 9:1, estas foram pesadas e armazenadas em geladeira.

Fluxograma 1: Procedimento realizado para obter melhor condição de produção da palitantina.



Fonte: Metodologia de extração e fracionamento desenvolvida pelo grupo QOSBio. Legenda: Cultivo, inoculação e interrupção de crescimento do fungo, obtenção e análise do extrato.

Posteriormente, as frações foram novamente solubilizadas em MeOH ultrapuro para espectro de massas. Alíquotas das frações foram submetidos para a filtração de material particulado, utilizando-se filtros PTFE 13 mm de diâmetro 0,45 µm. Foram preparadas amostras em triplicatas técnicas, totalizando 144 amostras as quais foram injetadas no sistema UHPLC – MS/MS de modo aleatório monitorando-se os íons da palitantina observados em m/z 401,2 e m/z 237,07. Foram anotadas as áreas dos picos das massas apresentadas anteriormente como variável resposta do planejamento experimental fracionário e esses dados foram tratados no software Minitab.

Após selecionar a ótima condição de trabalho por meio do tratamento dos dados utilizando-se o software Minitab, a linhagem *Geomyces* sp foi cultivada em escala ampliada para se obter a maior quantidade possível de palitantina, segundo a condição de crescimento melhorada do fungo *Geomyces* sp estabelecida por PFF. A linhagem foi inoculada em placas de Petri contendo ágar dextrose de batata (PDA) e as placas foram incubadas por 14 dias a 15 °C. Após o pré-cultivo em meio sólido, cinco discos de ágar contendo o fungo foram transferidos para frascos Schott de 500 mL de capacidade, contendo 200 mL de meio (20% de malte e água destilada) em cada frasco, em um volume total de 10 litros. Posteriormente esses foram incubados em modo estático, a 15 °C e por 28 dias.

O meio de cultivo de todos os Schotts foi extraído com AcOEt. A fração AcOEt foi reunida e evaporada até a secura. A fração AcOEt foi solubilizada em MeOH/H₂O 9:1 e particionada com n-hexano. A fração polar foi evaporada até a secura e submetida a um fracionamento por extração em fase sólida, empregando-se colunas pré-empacotadas de sílica-gel derivatizada com grupos cianopropila, eluídas em modo gradiente de polaridade para fornecer cinco frações 1-5 (1) 100% (CH₂Cl₂); (2) 1:1 (CH₂Cl₂/AcOEt); (3) 100% (AcOEt); (4) 1:1 (AcOEt/MeOH) e (5) 100% (MeOH).

A presença da (-)-palitantina nas frações eluídas foi analisada por CCD com eluente CH₂Cl₂/MeOH 9:1, por comparação com o padrão do composto previamente isolado e identificado pelo Dr. Afif Felix Monteiro. Observou-se que a palitantina foi eluída nas frações 1 (CH₂Cl₂) e 2 1:1 (CH₂Cl₂/AcOEt). Estas frações foram reunidas e evaporadas. O material obtido (936,4 mg) foi submetido a uma cromatografia de exclusão por Tamanho em coluna empacotada com Sephadex LH-20, utilizando-se como fase móvel MeOH 100%. As frações coletadas foram analisadas por CCD, e as

frações que apresentavam a palitantina foram reunidas. A palitantina obtida foi submetida às análises por espectrometria de massas e Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

2.7.2 REDUÇÃO DA PALITANTINA COM BORO HIDRETO DE SÓDIO: FORMAÇÃO DO PALITANTOL

Diluiu-se 100 mg (0,293 mmol) de (-)-palitantina em 5 mL de MeOH a temperatura ambiente. Adicionou-se 15 mg (0,396 mmol) de NaBH₄ e deixou-se a reação durante uma noite sob agitação. Após o tempo de reação, adicionou-se uma solução aquosa de 10% de Na₂CO₃, seguido de extração com AcOEt três vezes de 20 mL. A fração orgânica foi separada e seca com Na₂SO₄ anidro, filtrada e evaporada até a obtenção sólido branco. Obteve-se um rendimento de 40%. O produto foi analisado em HPLC-UV-MS, para averiguar a formação do mesmo.

Após a confirmação da formação do produto, esse foi purificado por HPLC. Utilizou-se uma coluna Waters X-Terra, utilizando-se uma mistura MeCN/MeOH/H₂O 15:15:70 como fase móvel em modo isocrático e em fluxo de 2 mL/min. Observou-se a formação de um produto minoritário e outro produto majoritário. Ambos foram coletados. Após a purificação obteve-se 14 mg do produto majoritário e 3 mg do produto minoritário. Estas frações foram analisadas por Ressonância Magnética Nuclear (RMN), espectrometria de massas, UV e rotação específica. Os produtos foram submetidos à análise antimicrobiana e antiplasmodial.

2.7.3 REDUÇÃO DA PALITANTINA COM TRIACETOXIBOROHIDRETO DE SÓDIO

Solubilizou-se 50 mg (0,197 mmol) de (-)-palitantina e 166,75 mg (0,787 mmol) de triacetoxiborohidreto de sódio em 30 mL tetraidrofurano (THF) a temperatura ambiente. A reação ficou sob agitação durante uma noite. Posteriormente, adicionou-se 50 mL de solução aquosa de 10% de Na₂CO₃, seguido de extração com AcOEt três vezes de 20 mL. A fase orgânica foi separada e seca com Na₂SO₄ anidro, filtrada e evaporada até a obtenção sólido branco. Obteve-se um rendimento de 80%.

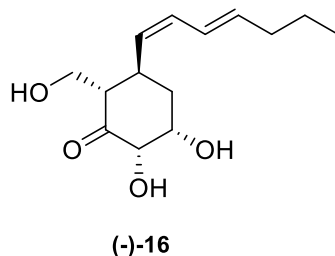
O produto foi submetido a análise por HPLC-UV-MS para a obter a confirmação da formação do palitantol. O produto da reação foi purificado utilizando-se a mesma condição cromatográfica por HPLC para purificação dos produtos formados pela reação com NaBH₄. Também observou-se a formação de um produto minoritário e majoritário. Ambos foram coletados. Após a purificação obteve-se uma

massa de 2,4 mg do produto majoritário e 1,9 mg do produto minoritário. Alíquotas destas frações foram analisadas por Ressonância Magnética Nuclear (RMN).

2.8 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.8.1 DESIGN OF EXPERIMENTS: OTIMIZAÇÃO DE PRODUÇÃO DA PALITANTINA

Uma linhagem de fungo do gênero *Geomyces* oriunda da Antártica que produz a (-)-palitantina (**16**) foi descoberta no grupo de pesquisa de Química Orgânica de Sistemas Biológicos. Do ponto de vista estrutural, a palitantina é um composto de baixa massa molecular, mas elaborada do ponto de vista estrutural por apresentar 4 centros estereogênicos, duas duplas ligações conjugadas, um grupo carbonila do tipo cetona, um álcool primário e dois álcoois secundários. A palitantina apresenta estrutura bastante versátil para ser utilizada como substrato para diversas derivatizações químicas. No entanto, para poder ser utilizada em diversas reações, é necessário que seja obtida em quantidades apreciáveis, de pelo menos várias centenas de miligramas.



Desta forma, foi necessário realizar um procedimento denominado *Design of Experiments* (DoE), para que a produção desse metabólito secundário fosse incrementada para se ampliar a escala de produção em uma melhor condição de crescimento do fungo *Geomyces* sp.

A metodologia *Design of Experiments* (DoE) foi desenvolvida por Fisher em 1935 a fim de solucionar a ineficiência do planejamento de experimentos em uma pesquisa agrícola (FISHER, 1960). A metodologia DoE ainda é pouco utilizada, pois suas vantagens não são popularmente conhecidas, uma vez que seus modelos apresentam certa complexidade matemática (ARTYMOWICZ et al., 2021).

Não obstante, o DoE traz benefícios ao avaliar e otimizar processos, sendo o seu primeiro passo o planejamento fatorial completo (a) ou fracionário (b) – (a),

utilizado para quando se têm de 2 ou 3 variáveis e (b) utilizada para quando se têm 4 ou 5 variáveis. Este primeiro passo é utilizado para realizar uma triagem, ou seja, verificar quais as variáveis serão testadas e posteriormente por meio dos dados averiguar aquelas que são mais importantes para otimizar o processo (PEREIRA FILHO, 2021).

Este processo supera a abordagem empírica tradicional no qual somente se avalia uma variável por vez. Já o DoE é uma determinação sistemática das relações entre fatores e respostas que afetam um processo ou sistema analítico.

O DoE envolve o planejamento, a execução do experimento e análise dos dados experimentais. Inicialmente seleciona-se o sistema a ser investigado e reconhece-se o problema de investigação, estabelecendo-se os objetivos a serem alcançados com base a selecionar a melhor variável de resposta à qual é sempre uma medida quantitativa do comportamento do processo (PEREIRA FILHO, 2021).

A segunda etapa é a execução experimental que consiste em seguir a matriz projetada e a coleta de dados para, na última etapa, realizar análise dos dados por meio de ferramentas estatísticas e interpretação dos resultados, possibilitando o melhor entendimento do comportamento do sistema e, assim, maximizando os resultados a serem obtidos (JANKOVIC; CHAUDHARY; GOIA, 2021).

Os autores anteriormente citados discorrem sobre o impacto de vários fatores e interações que são alterados em cada experimento favorecendo avaliar os efeitos principais, considerados nessa etapa da pesquisa. O *DoE* é uma ferramenta poderosa, pois fornece uma visão mais ampla sobre o comportamento do sistema sob investigação. Assim, têm-se k fatores e n níveis; logo, o número total de experimentos será n^k . No caso da otimização da produção da palitantina, os fatores considerados foram: temperatura, tempo, concentração do meio de cultivo, solvente para preparação do meio de cultivo e agitação; para os níveis utilizou-se o nível alto e baixo que foram codificados em +1 e -1, respectivamente (Tabela 1).

O *DoE* para a palitantina foi realizado utilizando-se 5 variáveis. Desta forma, o número de experimentos a ser realizado foi de um Planejamento Experimental Fracionário (PEF): para $n = 5$ variáveis (número de experimentos para um PEF é 2^{n-1}): $2^{5-1} = 16$ experimentos.

Optou-se por realizar o planejamento experimental fracionário (PEF), devido ao número de experimentos que deveriam ser realizados caso se empregasse um

planejamento experimental completo utilizando-se 5 variáveis. No caso do planejamento experimental completo, seria necessário a realização de 32 experimentos em triplicata, ou seja, 96 experimentos de crescimento. Como foi realizado um PEF, foi necessário se realizar triplicatas de 16 experimentos em diferentes condições de crescimento (ou seja, 48 experimentos de crescimento no total). O PEF supriu a necessidade do estudo proposto.

A metodologia utilizada possibilitou averiguar a significância dos efeitos principais de cada variável na produção da palitantina. Utilizando-se gráfico gerado pelo software Minitab foi possível calcular, por meio de cada resposta, a significância de um efeito. A Tabela 3 indica as condições utilizadas para cada experimento (em triplicata) e as respostas obtidas (área do pico da (-)-palitantina, obtida por UHPLC-MS).

Tabela 3: Análises de cada experimento de crescimento da linhagem *Geomyces* sp. e respectiva resposta de produção da (-)-palitantina (22).

Experimento	Temperatura de incubação (° C)	Tempo de incubação (Dias)	Concentração do meio/malte 2 g/100 mL (%)	Água para preparo do meio (Solvente)	Rotação de incubação (rpm)	Resposta (Área do pico)
1	15	28	20	ASW	160	368265.65
2	30	28	20	ASW	0	8776.04
3	15	14	20	ASW	0	155842.93
4	30	14	20	ASW	160	0
5	15	28	80	ASW	0	684342.95
6	30	28	80	ASW	160	0
7	15	14	80	ASW	160	86064.41
8	30	14	80	ASW	0	85594.14
9	15	28	20	Destilada	0	584645.51
10	30	28	20	Destilada	160	0
11	15	14	20	Destilada	160	744722.88
12	30	14	20	Destilada	0	10578.95
13	15	28	80	Destilada	160	178935.75
14	30	28	80	Destilada	0	0
15	15	14	80	Destilada	0	666305.94
16	30	14	80	Destilada	160	0

Legenda:



Fragmento monitorado *m/z* 401.2



Fragmento monitorado *m/z* 237.04

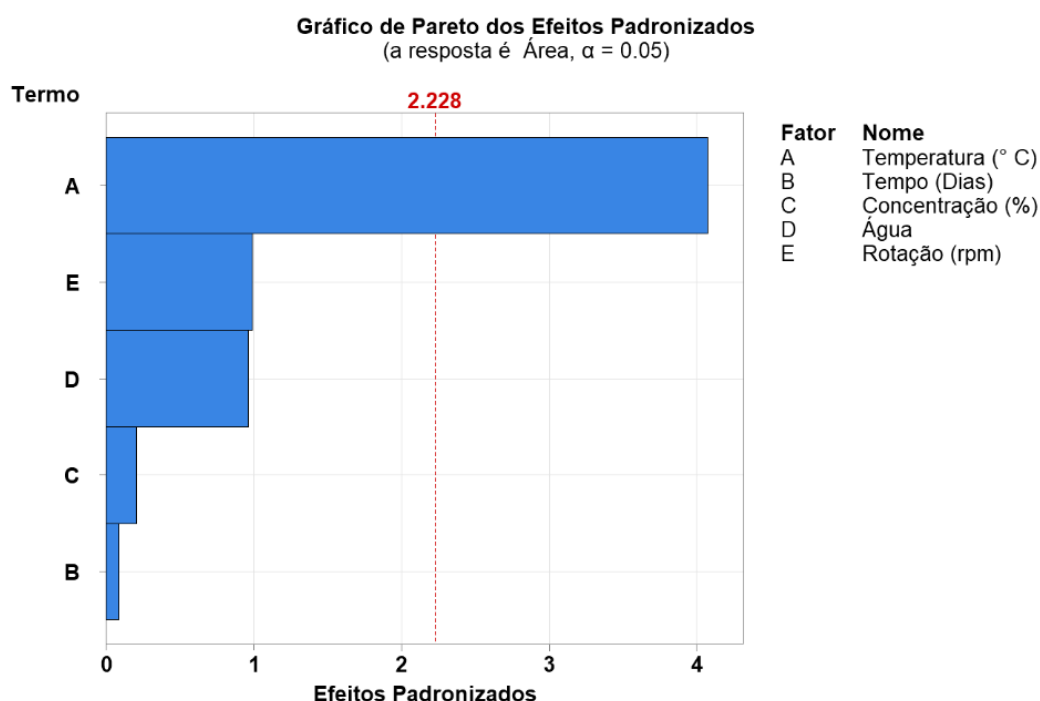


Ausência de palitantina

Fonte: A autora.

Com os dados da Tabela 3, foi possível obter um gráfico de Pareto com confiabilidade de 95% o qual apresenta a(s) variável(eis) de maior significância para os experimentos de crescimento e produção da palitantina. Foi possível concluir que a temperatura exerce o maior efeito nos experimentos de crescimento, se sobressaindo das outras variáveis.

Gráfico 2: Gráfico de Pareto dos efeitos principais para a produção de (-)-palitantina pelo fungo *Geomyces* sp.



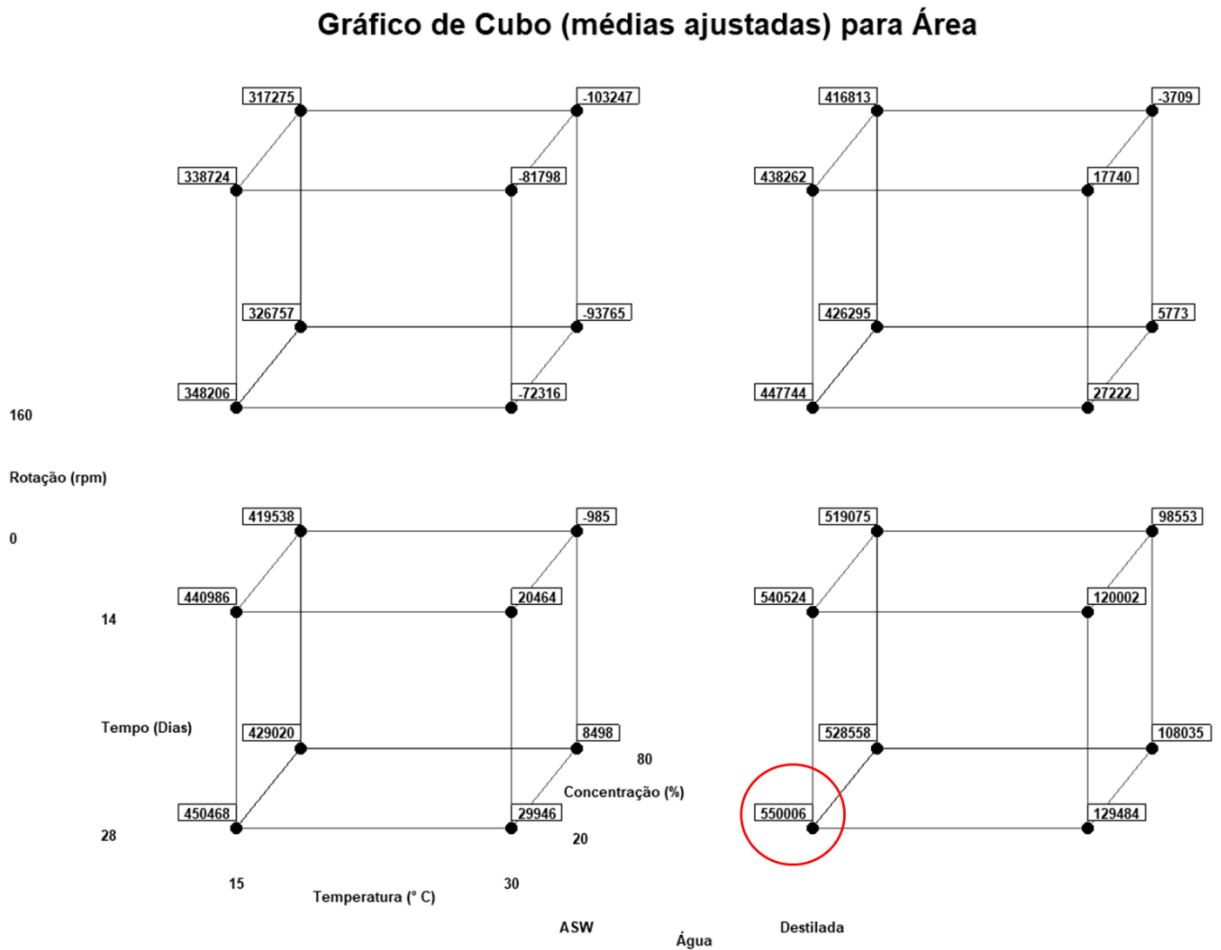
Fonte: A autora.

Também foi possível obter gráficos de cubos, os quais possibilitam visualizar o efeito de interações entre as variáveis. O gráfico de cubo é usualmente utilizado quando se têm um experimento fatorial de dois níveis, mostrando-se a relação entre os fatores e uma resposta. Desse modo, os cubos exibem todas as combinações de definições de fatores e a média ajustada para cada combinação.

Os cubos à direita indicam as combinações possíveis utilizando-se como para o preparo do meio de cultivo a água destilada, enquanto os cubos à esquerda indicam as combinações utilizando-se água do mar artificial (ASW). Observando-se os cubos de modo horizontal, os cubos em posição superior demonstram a incubação sob rotação de 160 rpm e os em posição inferior em modo estático. Nas arestas estão representadas e indicadas em tempo (dias), temperatura (°C) e concentração do meio de cultivo (%). Analisando-se os gráficos de cubos e suas possíveis combinações de

fatores é possível se verificar que a melhor resposta apresentada (de maior valor numérico) é a combinação: meio de cultivo – concentração de malte 20%; solvente: água destilada; incubação – tempo (dias) 28; temperatura 15 °C e modo estático.

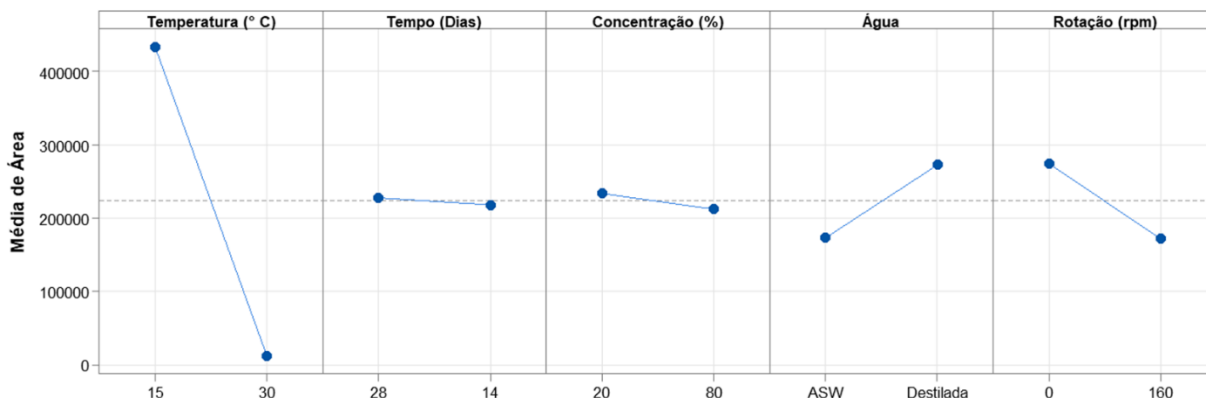
Gráfico 3: Gráfico de cubo em resposta a área ajustada



Fonte: A autora.

Em seguida avaliou-se a importância de cada fator de modo individual e obteve-se o Gráfico 4.

Gráfico 4: Gráfico de efeitos principais para médias ajustadas das respostas dos experimentos de PFF para a produção da (-)-palitantina pelo fungo *Geomyces* sp.



Fonte: A autora.

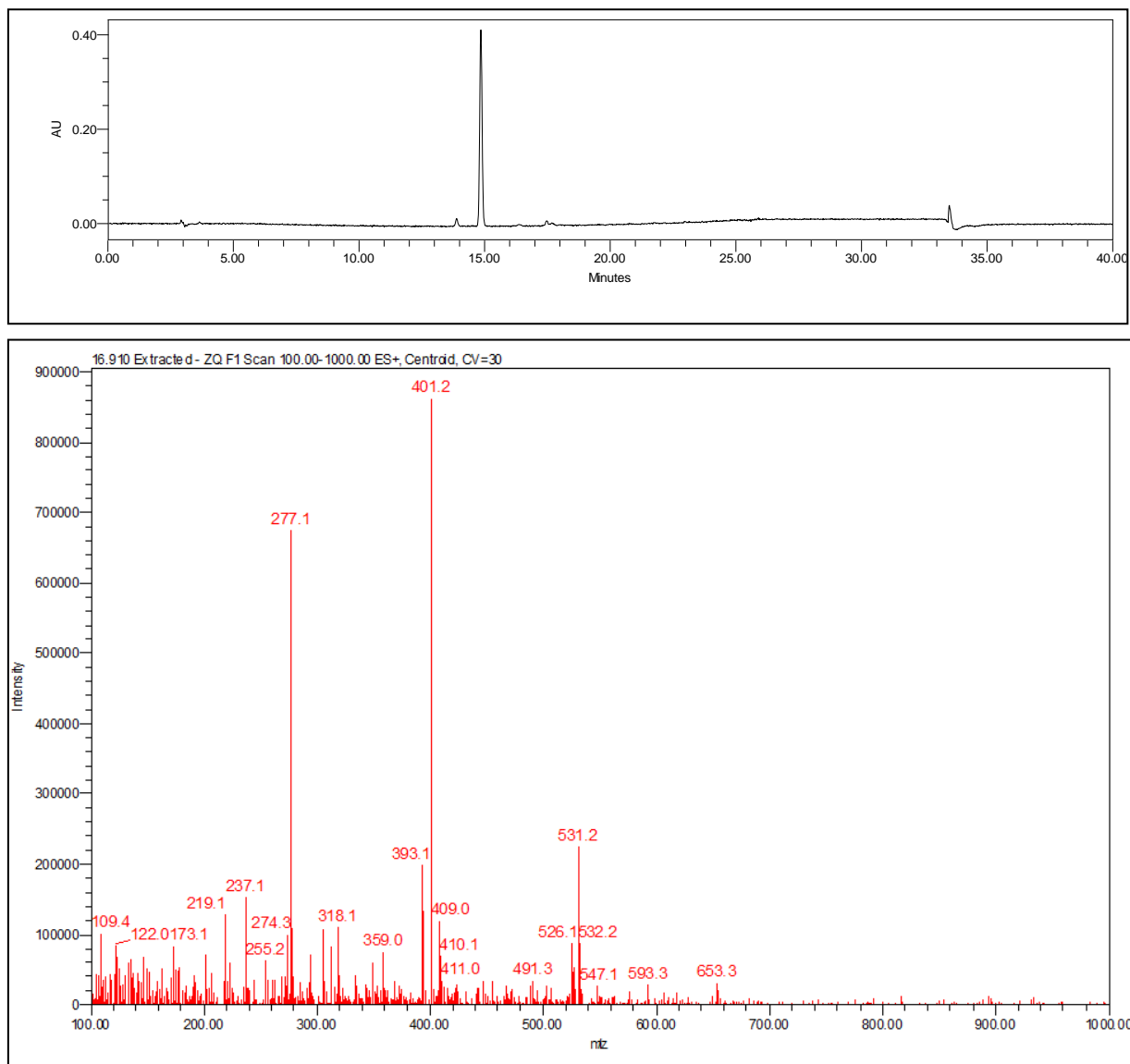
Como pode-se observar, os fatores que se encontram em níveis altos são a temperatura em 15 °C, tempo em 28 dias, concentração em 20%, solvente água destilada e modo estático, de acordo com os resultados obtidos pela análise dos gráficos de cubos assim, justificando o gráfico de cubos.

Após a análise e tratamento dos dados dos experimentos de DoE utilizando-se Planejamento Experimental Fracionário, verificou-se que o experimento 9 da tabela 3 é aquele que proporciona a melhor condição para a produção da palitantina.

Com a condição ótima de trabalho estabelecida, realizou-se o crescimento do fungo em maior escala, para obtenção da palitantina em quantidade suficiente para realização dos experimentos de caracterização do metabólito secundário e experimentos de derivatização. Após o tempo estabelecido de incubação, o crescimento foi interrompido pela adição de AcOEt. A mistura meio de crescimento + AcOEt foi filtrada à vácuo, o filtrado foi particionado, a fase orgânica foi evaporada, dissolvida em MeOH e purificada por cromatografia em coluna de Sephadex LH-20.

A (-)-palitantina obtida foi analisada por HPLC-UV-MS, verificando-se o cromatograma e respectivo espectro de massas apresentados na Figura 8.

Figura 8: Cromatograma LCMS e Espectro de massas em modo ESI-positivo da (-)-palitantina.



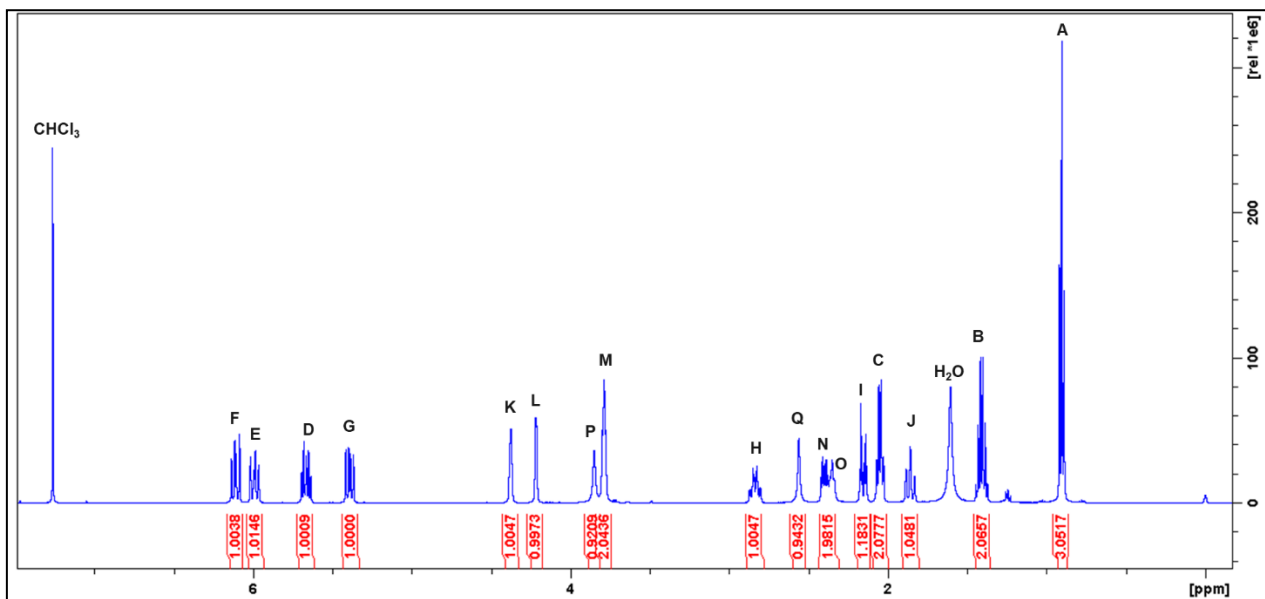
Fonte: A autora.

A palitantina analisada por HPLC-UV-MS apresentou tempo de retenção de aproximadamente 14,5 minutos, observando-se sinais em m/z 401,2 ($[2M-6H_2O+H]^+$), m/z 277,1 ($[M+Na]^+$) e m/z 531,2 ($[2M+Na]^+$).

Obteve-se também os espectros de RMN para a palitantina. Os valores de deslocamento químico de 1H e de ^{13}C se encontram atribuídos na Tabela 4.

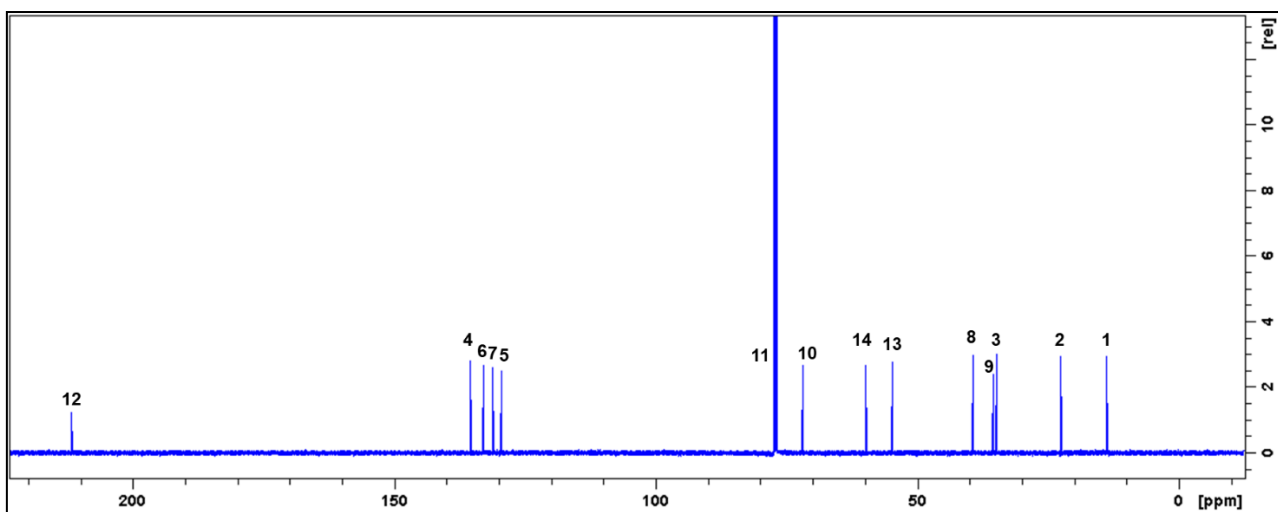
A atribuição dos sinais dos hidrogênios da (-)-palitantina foi realizada utilizando-se o espectro de RMN COSY.

Figura 9: Espectro de RMN de ^1H (600 MHz) da (-)-palitantina em CDCl_3 .



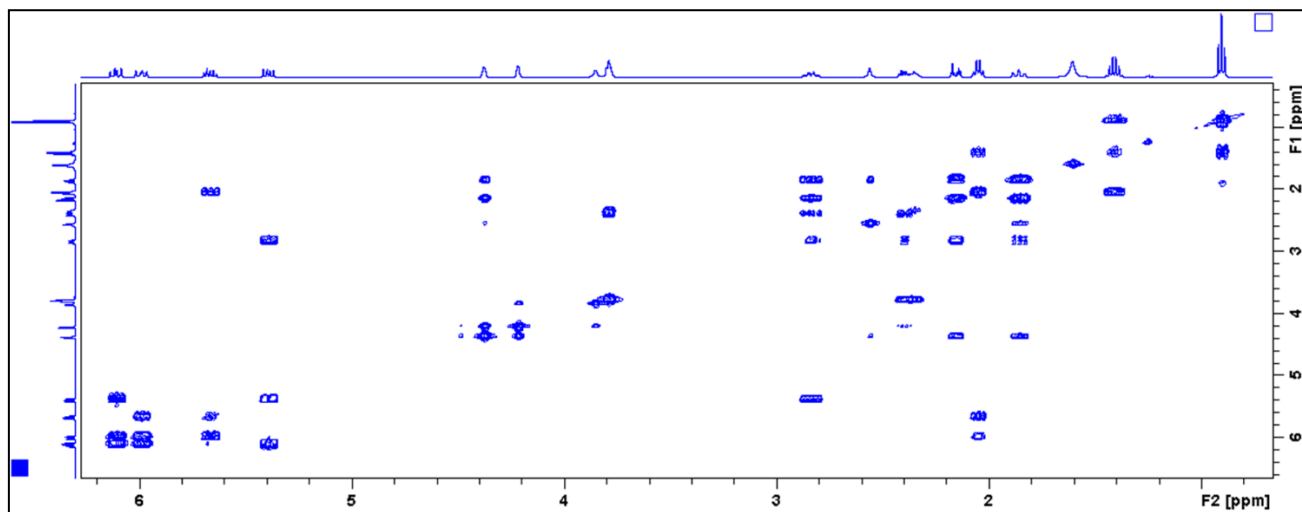
Fonte: A autora.

Figura 10: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz) da (-)-palitantina em CDCl_3 .



Fonte: A autora.

Figura 11: Espectro COSY (600 MHz) da (-)-palitantina em CDCl₃.

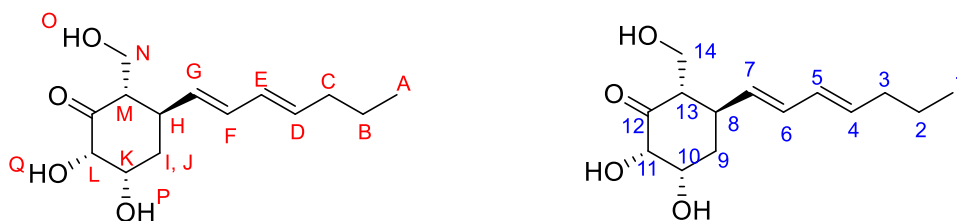


Fonte: A autora.

Tabela 4: Dados de RMN ¹H e ¹³C da palitantina (600 MHz, CDCl₃)

Hidrogênio	δ_H	J(Hz)	Multiplicidade	C	δ_C
H _A	0,90	7,38 (H _A H _B)	t	1	13,9
H _B	1,41	7,38 (H _B H _A /H _B H _C)	st	2	22,5
H _C	2,05	7,28 (H _C H _B /H _C H _D)	q	3	34,9
H _D	5,66	7,28 (H _D H _C) e 15,10 (H _D H _E)	dt	4	135,4
H _E	5,99	15,10 (H _E H _D) e 10,43 (H _E H _F)	dd	5	129,5
H _F	6,11	14,99 (H _F H _G) e 10,43 (H _F H _E)	dd	6	132,9
H _G	5,39	15,99 (H _G H _F) e 9,13 (H _G H _H)	dd	7	131,1
H _H	2,84	-	m	8	39,3
H _I	2,15	3,27 (H _I H _K /H _I H _H) e 14,34 (H _I H _J)	dt	9	35,5
H _J	1,86	14,34 (H _J H _I), 1,18 (H _J H _K) e 12,32 (H _J H _H)	td	-	-
H _K	4,37	-	m	10	71,9
H _L	4,21	2,78 (H _L H _K)	d	11	77,2
H _M	2,39	5,56 (H _M H _N) e 11,92 (H _M H _H)	dt	12	211,6
H _N	3,79	5,56 (H _N H _M) e 6,69 (H _N H _O)	dd	13	54,8
H _O	2,35	6,69 (H _O H _N)	t	14	59,9
H _P	2,56	-	s	-	-
H _Q	3,85	-	s	-	-

Fonte: A autora.

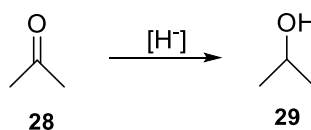


De acordo com os valores de constantes de acoplamento observadas foi atribuída a configuração *E* às duplas ligações conjugadas, uma vez que a constante de acoplamento observada para os hidrogênios vinílicos $H_D H_E$ e $H_G H_F$ são próximos a 15 Hz. Além disso, os valores de constantes de acoplamento para hidrogênios vicinais do ciclohexano possibilitou indicar a configuração relativa dos centros estereogênicos da (-)-palitantina. a configuração S^* é atribuído aos carbonos 13 e 8, pois apresentam valores de constante de acoplamento de 11,92 Hz representado por um acoplamento $H_{axial} - H_{axial}$.

O carbono 10 também apresenta uma configuração S^* e o carbono 11 possível configuração S^* por não apresentar acoplamento ($J = 0$ Hz) entre os hidrogênios H_L e H_I .

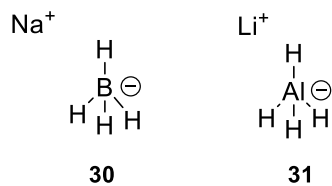
2.8.2 REDUÇÃO DA PALITANTINA COM BORO HIDRETO DE SÓDIO E COM TRIACETOXIBOROHIDRETO DE SÓDIO: FORMAÇÃO DE DOIS ESTEREOISÔMEROS DO PALITANTOL

Os álcoois podem ser obtidos por redução de grupos carbonila do tipo cetona ou aldeído (OUELLETE; RAWN, 2014).

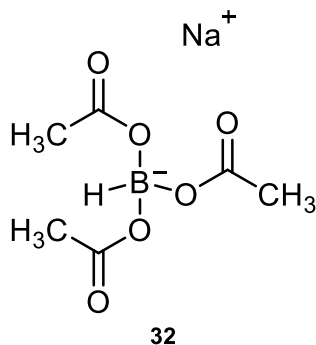


Esta reação de redução ocorre pela transferência de hidreto do agente redutor para os átomos de oxigênio e carbono, ou seja, a ligação π da carbonila, produzindo-se um álcool primário no caso de aldeídos e secundário no caso de cetonas (ZEYNIZADEH; BEHYAR, 2005).

Os redutores mais comumente utilizados são aqueles que não possuem a carga negativa concentrada no hidrogênio, mas que podem liberar hidretos *in situ*, como borohidreto de sódio (**30**, $NaBH_4$) ou hidreto de lítio e alumínio (**31**, $LiAlH_4$).

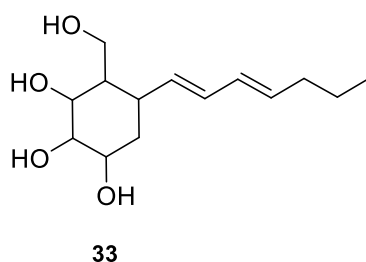


O LiAlH_4 (**31**) apresenta o cátion Li^+ com maior eletropositividade, o qual permite reduzir não apenas cetonas e aldeídos, mas também carbonilas de ésteres e amidas, reatividade que não se observa para o NaBH_4 , o qual possibilita uma redução mais branda (SALLES; DREKENER; PASTRE, 2016). O NaBH_4 é utilizado para redução de grupos funcionais reativos em solventes próticos (ZEYNIZADEH; BEHYAR, 2005). Além da redução com NaBH_4 , a (-)-palitantina foi também submetida à redução com triacetoxiborohidreto de sódio ($\text{Na}(\text{CH}_3\text{COO})_3\text{BH}$) (**32**).



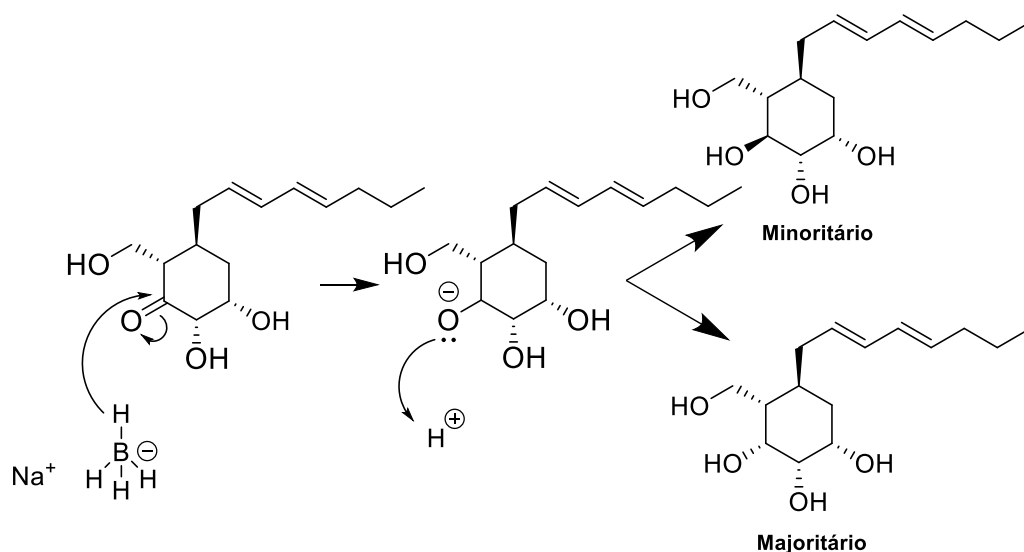
Assim como o borohidreto de sódio, o triacetoxiborohidreto de sódio é um reagente suave e exibe uma seletividade notável como agente redutor (ABDEL-MAGID et al., 1996). A redução do grupo cetona é preferencial desse reagente, os efeitos estéricos e de retirada de elétrons dos três grupos acetoxi estabilizam a ligação boro-hidrogênio sendo responsável por suas propriedades redutoras suaves, utilizando-se o mecanismo similar ao da figura 12.

Nesse estudo utilizou-se a palitantina como substrato, reduzindo-se o grupo cetona para a obtenção do palitantomol (**33**), utilizando-se como agente redutor o NaBH_4 e com $(\text{Na}(\text{CH}_3\text{COO})_3\text{BH})$.



De acordo com as reações realizadas, deverá ser observada a formação de dois diastereoisômeros, provavelmente um produto majoritário e o outro minoritário. A reação com NaBH_4 como reagente redutor favoreceu a formação do produto com controle cinético, pois a reação que ocorre rapidamente, obtendo-se uma proporção dos diastereoisômeros significativamente diferente (Figura 13). Já a reação com $\text{Na}(\text{CH}_3\text{COO})_3\text{BH}$ é termodinamicamente controlada. Pelo fato do agente redutor ser mais volumoso, a formação dos produtos é lenta, e a proporção dos diastereoisômeros formados foi de aproximadamente 1:1 como observa-se na figura 14.

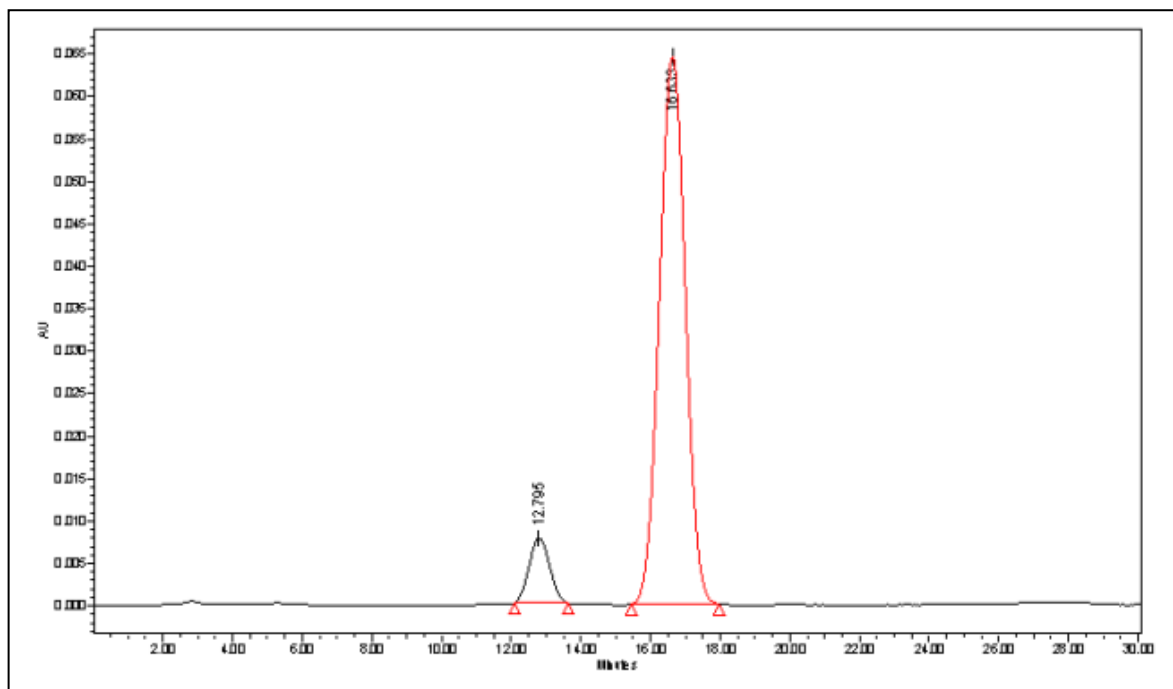
Figura 12: Mecanismo de redução da (-)-palitantina com NaBH_4 .



Fonte: A autora.

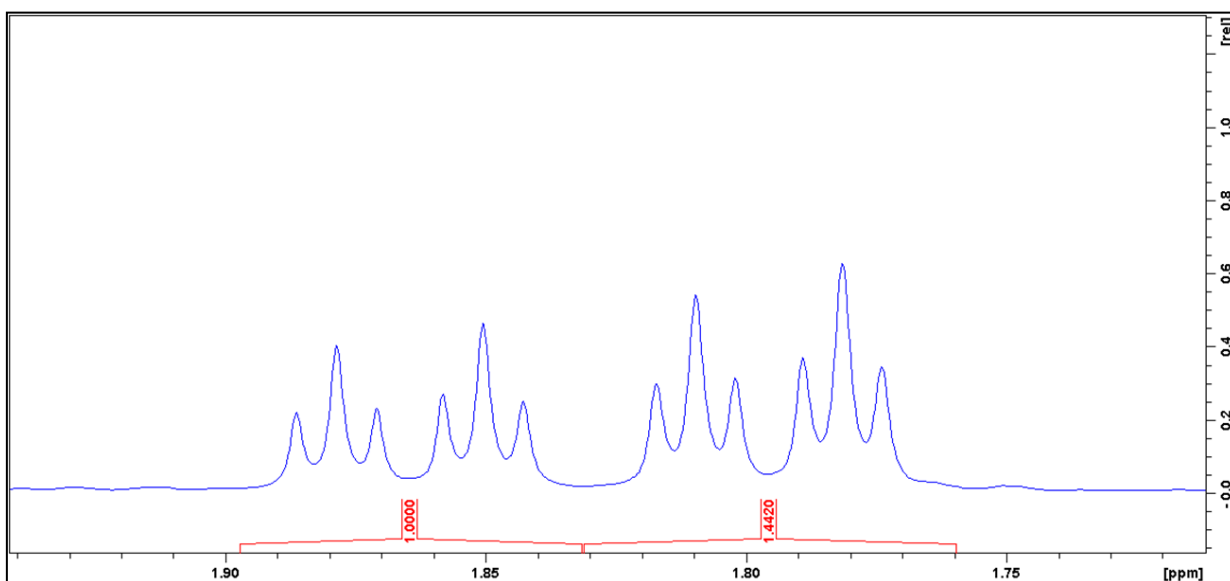
Os produtos obtidos de cada reação foram purificados por HPLC, de acordo com a separação cromatográfica indicada na figura 13.

Figura 13: Cromatograma de separação dos produtos de redução da palitantina com NaBH₄.



Fonte: A autora. Legenda: Isocrático MeCN/MeOH/H₂O 15:15:70, coluna X-terra, fluxo 2 ml/min.

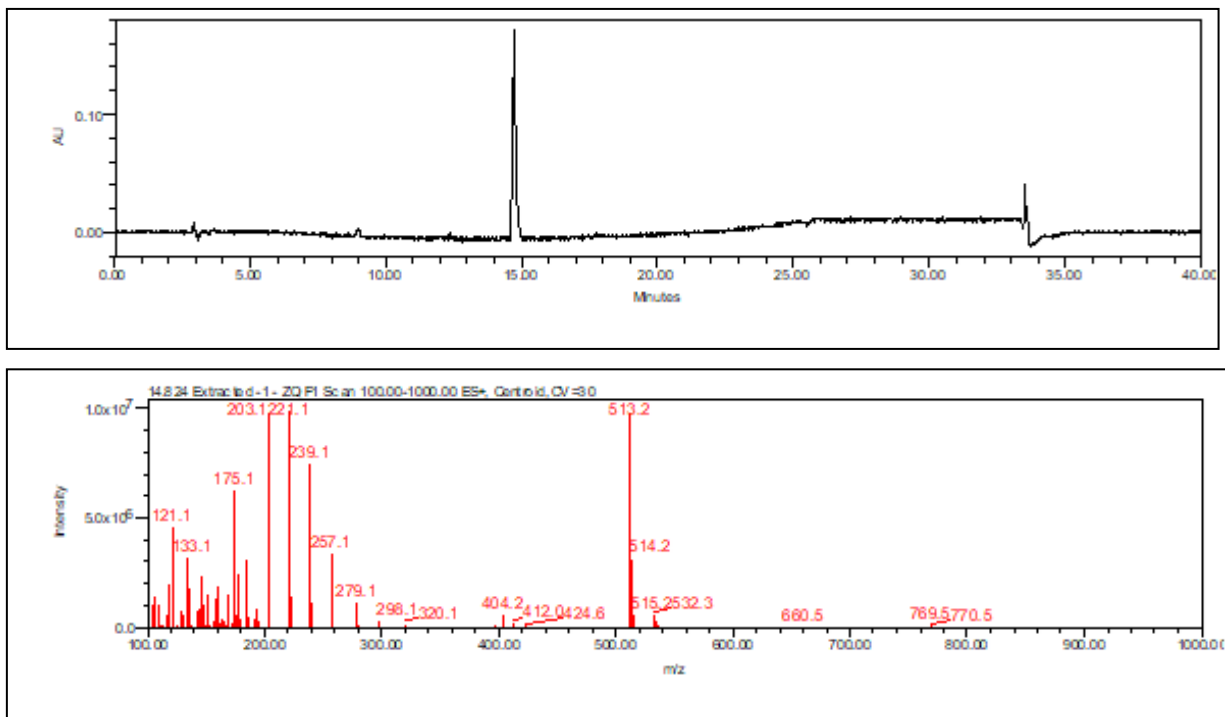
Figura 14: Espectro de RMN de ¹H (125 MHz) do palitantomol em CD₃OD.



Fonte: A autora. Legenda: Reação de redução da palitantina com Na(CH₃COO)₃BH. Expansão dos sinais dos H_i de cada um dos dois estereoisômeros do palitantomol formados, antes da separação por HPLC.

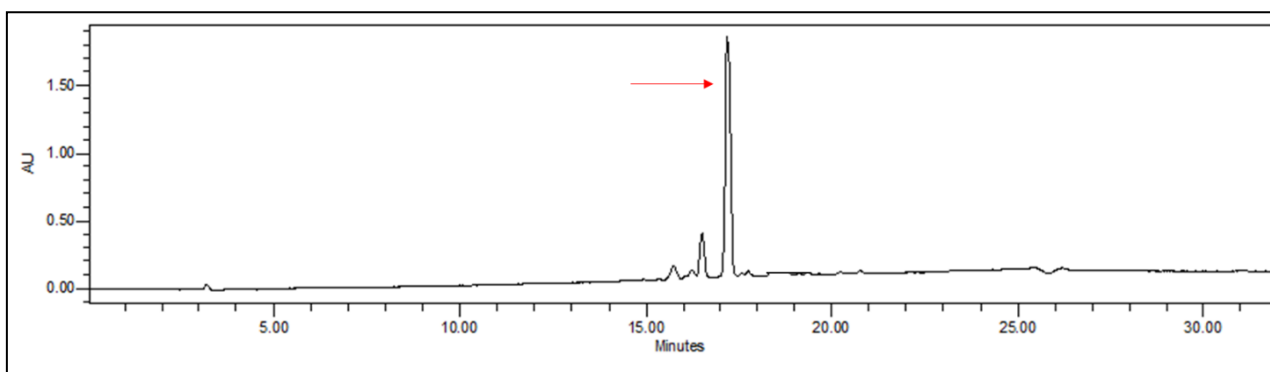
Os produtos minoritário e majoritário foram analisados por HPLC-UV-MS, o qual possui um tempo de retenção de aproximadamente 15 e 17 minutos, respectivamente. Obtendo-se os seguintes sinais em *m/z* 257 ([M+H]⁺), *m/z* 239 ([M-H₂O+H]⁺), *m/z* 221 ([M-2H₂O+H]⁺), *m/z* 203 ([M-3H₂O+H]⁺) e *m/z* 279 ([M+Na]⁺).

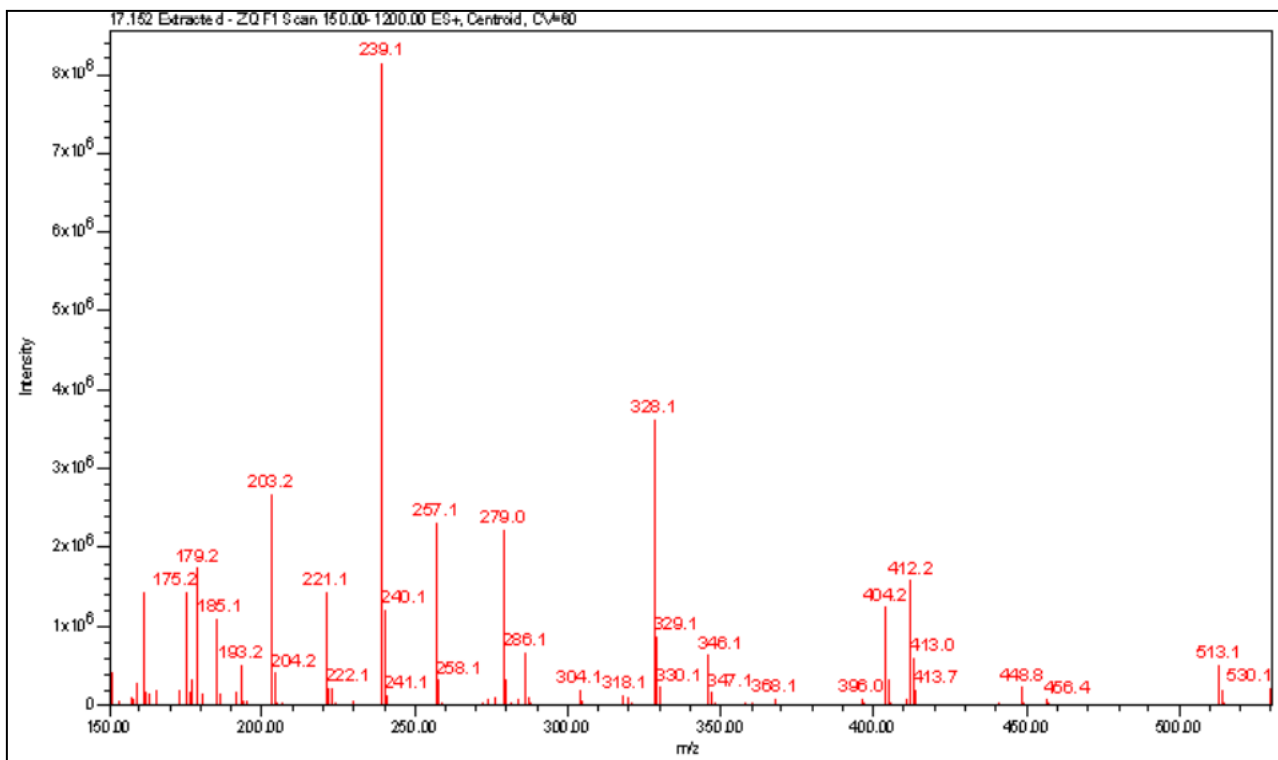
Figura 15: Cromatograma de UV e espectro de massas em modo ESI-positivo do produto minoritário de redução da palitantina.



Fonte: A autora.

Figura 16: Cromatograma de UV e espectro de massas em modo ESI-positivo do produto majoritário de redução da palitantina.





Fonte: A autora.

A configuração relativa do estereoisômero minoritário do palitantonol obtido por redução da palitantina com NaBH₄ é 2S*, 3R*, 4S*, 5S*, 6R* e a configuração relativa do produto majoritário é 2S*, 3S*, 4S*, 5S*, 6R*. Estas configurações foram estabelecidas pela análise dos espectros NOESY de cada um dos estereoisômeros obtidos.

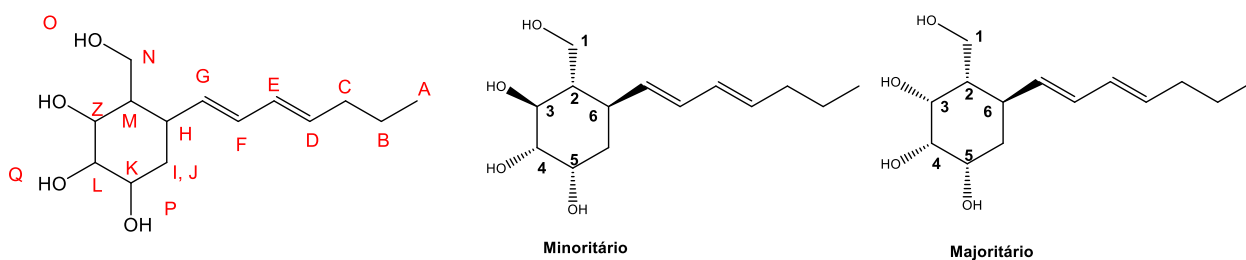
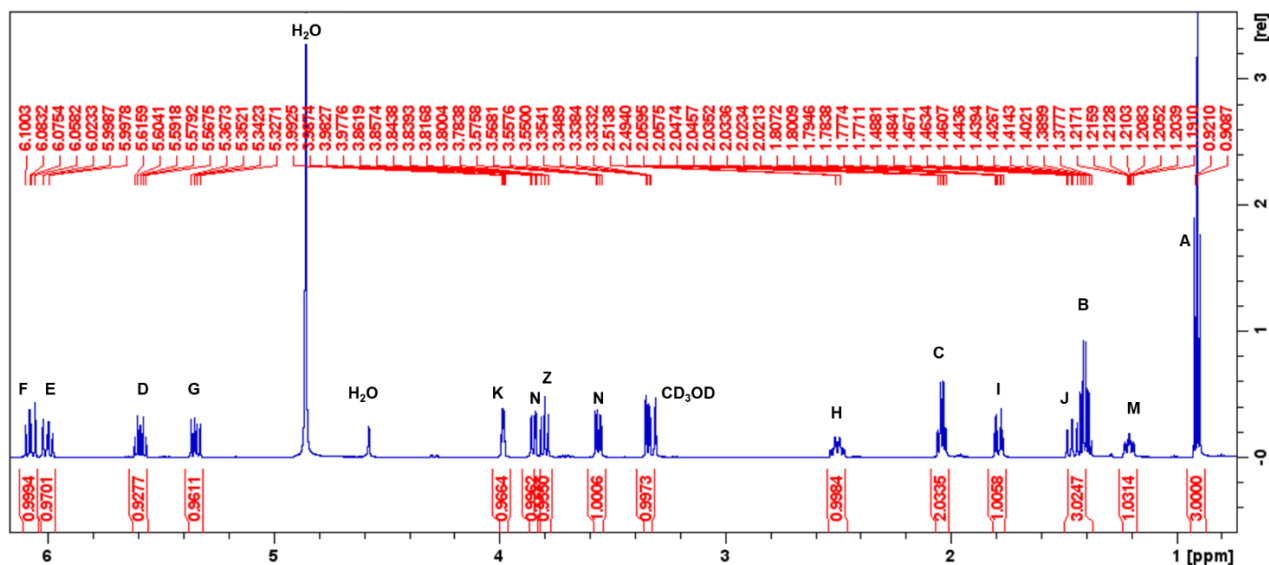
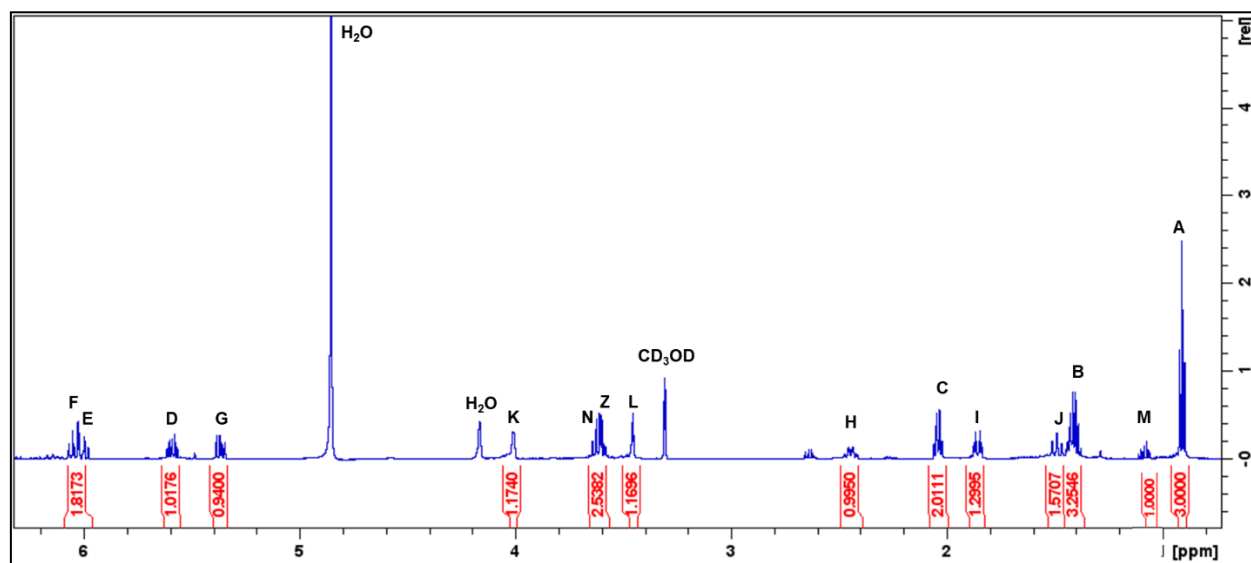


Figura 17: Espectro de RMN de ^1H (600 MHz) do palitantal minoritário em CD_3OD .



Fonte: A autora.

Figura 18: Espectro de RMN de ^1H (600 MHz) do palitantal majoritário em CD_3OD .



Fonte: A autora.

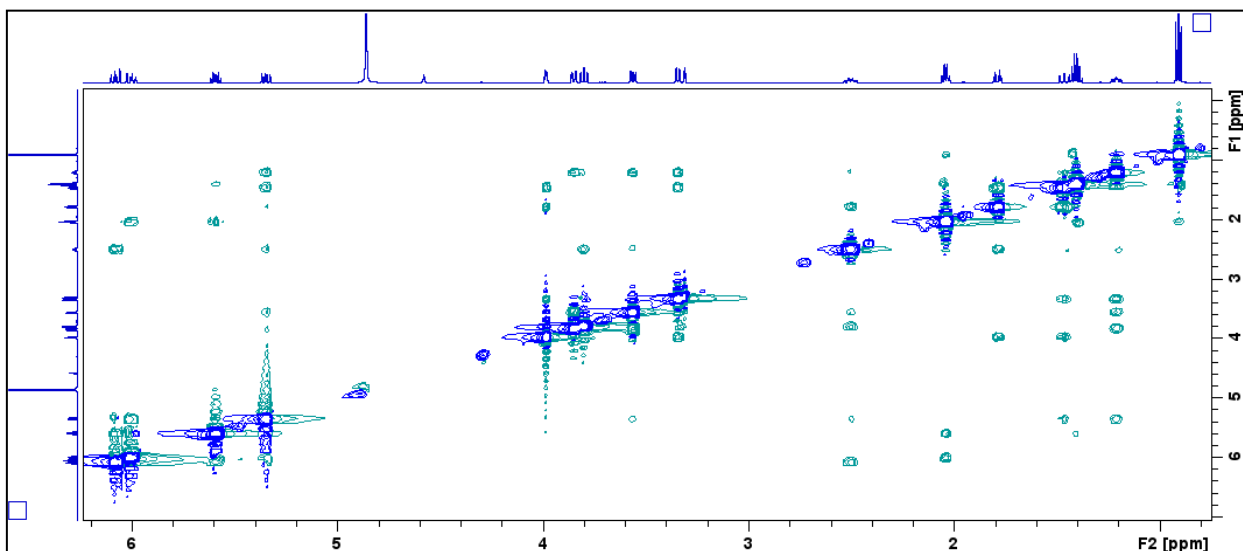
Tabela 5: Dados de RMN ^1H do palitantal minoritário (600 MHz, CD_3OD).

H	δ_{H}	J (Hz)	Multiplicidade	COSY
A	0.90	7.38	t	$\text{H}_\text{A}-\text{H}_\text{B}$
B	1.41	-	st	$\text{H}_\text{B}-\text{H}_\text{A} / \text{H}_\text{B}-\text{H}_\text{C}$
C	2.04	7.35	q	$\text{H}_\text{C}-\text{H}_\text{B} / \text{H}_\text{C}-\text{H}_\text{D}$
D	5.59	7.10 / 14.92	dt	$\text{H}_\text{D}-\text{H}_\text{C} / \text{H}_\text{D}-\text{H}_\text{E}$
E	6.00	10.50 / 14.92	dd	$\text{H}_\text{E}-\text{H}_\text{C} / \text{H}_\text{E}-\text{H}_\text{D}$
F	6.10	10.36 / 4.65	dd	$\text{H}_\text{F}-\text{H}_\text{G}$

G	5.35	9.12 / 5.85	dd	H _G -H _H / H _G -H _F
H	2.50	-	m	H _H -H _M / H _H -H _J / H _H -H _I / H _H -H _G
I	1.80	3.82 / 14.10	dt	H _I -H _H / H _I -H _J / H _I -H _K
J	1.46	2.44 / 12.50 / 14.18	td	H _J -H _I / H _J -H _H / H _J -H _K
K	4.00	-	m	H _K -H _J / H _K -H _I / H _K -H _L
L	3.35	3.18 / 6.36	dd	H _L -H _K / H _L -H _Z
M	1.21	-	m	H _M -H _H / H _M -H _N / H _M -H _Z
N	3.85 / 3.56	2.67 ; 8.22 / 4.60 ; 6.32	dd / dd	H _N -H _M
Z	3.80	9.91	t	H _Z -H _M / H _Z -H _L

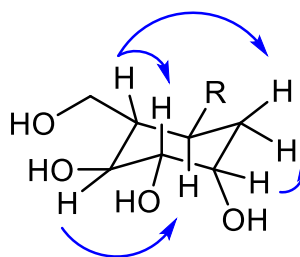
Fonte: A autora.

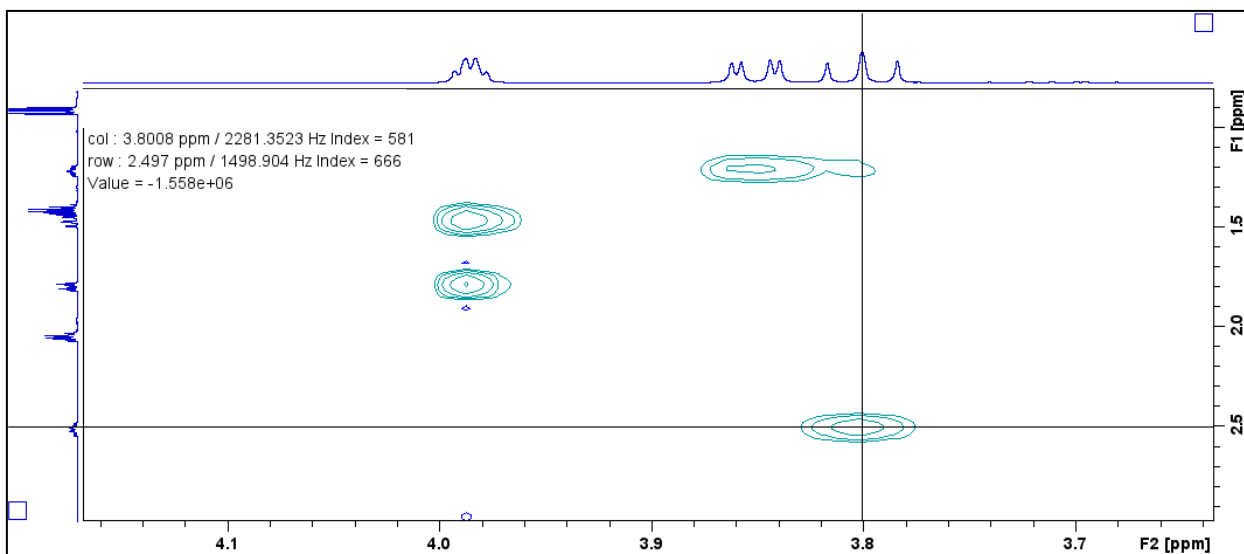
Figura 19: Espectro NOESY (600 MHz) do palitantor minoritário em CD₃OD.



Fonte: A autora.

Figura 20: Correlações NOESY observadas para o estereoisômero minoritário do palitantor em CD₃OD.





Fonte: A autora.

De acordo com a caracterização por RMN da (-)-palitantina juntamente com os espectros de ^1H dos diastereoisômeros foi possível distingui-los utilizando-se dos dados de acoplamento e NOESY. Utilizando-se da literatura disposta por (BOOTH, 1964; HUITRIC et al., 1963) sobre os valores de diferentes tipos de acoplamentos que ocorrem entre hidrogênios axiais e equatoriais em um ciclo hexano substituído tem-se que quando $J_{\text{ax-ax}} \cong 9$ a 12 Hz, $J_{\text{eq-ax}} \cong 3$ a 5 Hz e $J_{\text{eq-eq}} \cong 1$ a 3 Hz.

Da análise dos espectros NOESY verifica-se que carbono 3 apresenta configuração R^* para o palitantomol minoritário. Para o estereoisômero majoritário do palitantomol observou-se que o acoplamento dos hidrogênios em posição 3 é do tipo $\text{H}_{\text{equatorial}}\text{-H}_{\text{axial}}$ indicando uma configuração relativa S^* .

Apesar da reação de redução ocorrer da maneira esperada, o rendimento dos produtos obtidos foi baixo uma vez que os produtos tiveram que ser purificados diversas vezes. Após a purificação alíquotas foram enviados a colaboradores do Grupo de Pesquisa de Química Orgânica e Sistemas Biológicos para análises biológicas: antifúngica, antimicrobiana, anti-*Leishmania* e anti-plasmódial. Infelizmente nenhum dos diastereoisômeros apresentou atividade significativa nos testes realizados.

CAPÍTULO 3

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE METABÓLITOS
SECUNDÁRIOS PRODUZIDO PELO FUNGO *Peroneutypa* sp.

*“A ciência, para mim, explica parte da vida. Até onde chega, se baseia em acontecimentos, experiências e experimentos.”
(Rosalind Franklin)*

3.1 POTENCIAL FARMACOLÓGICO DE FUNGOS MARINHOS

Os fungos marinhos tem sido estudados desde 1846 quando Durieu e Montagne isolou *Sphaeria posidoniae* do rizoma de uma alga marinha (SHIN, 2020). De acordo com este mesmo autor, existem mais de 10.000 espécies de fungos marinhos, mas somente 10% desses foram identificados.

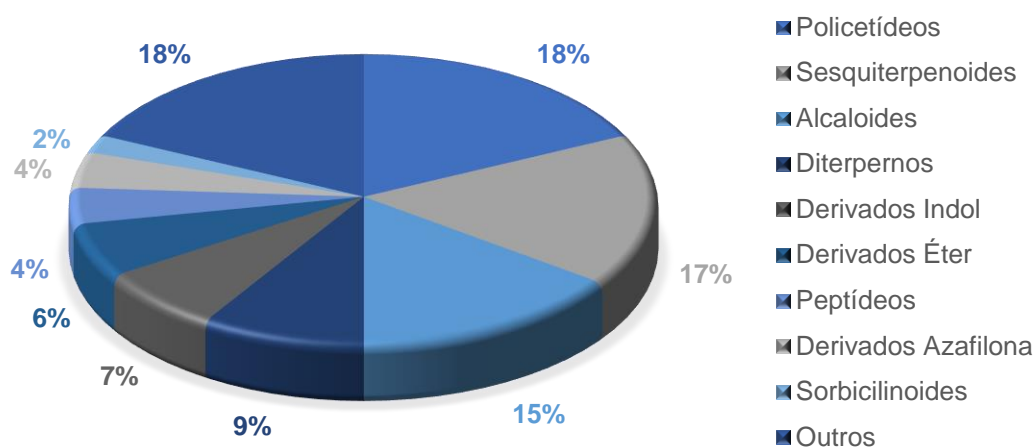
Tais fungos foram encontrados em quase todos os habitats marinhos examinados, incluindo sedimentos, troncos, invertebrados sésseis e móveis, algas e mamíferos marinhos. Aos que vivem em habitats novos e extremos possibilita a identificação de novas espécies, e podem levar ao isolamento de novos metabólitos secundários bioativos.

Considerando-se que 38% dos aproximadamente 22.000 metabólitos microbianos bioativos são de origem fúngica, e que somente 5% dos táxons fúngicos do mundo foram descritos, os fungos marinhos exibem um grande potencial para a descoberta de novos metabólitos secundários biativos (SCHULZ et al., 2008).

Para Butler; Robertson; Cooper (2014), fungos marinhos são uma riquíssima fonte metabólitos secundários úteis para a descoberta de fármacos. No entanto, esses ainda são explorados com menos frequência que seus homólogos terrestres. Nos últimos metabólitos secundários isolados de culturas de fungos marinhos apresentaram diversas atividades biológicas, como agentes antibacterianos, antivirais e anticancerígenos.

A produção de metabólitos secundários por fungos após sua fase de crescimento em meio de cultura é resultado da depleção de nutrientes e outros tipos de estresse metabólico. Os compostos são produzidos por diferentes vias de biossíntese e podem apresentar diversas atividades farmacológicas. Shabana; Lakshmi; Satya (2020) realizaram um levantamento de metabólitos secundários isolados de fungos marinhos, o qual indicou a maior produção de policetídeos, sesquiterpenoides e alcaloides, como indica o gráfico 5.

Gráfico 5: Classes de compostos encontrados em fungos marinhos.



Fonte 1: SHABANA; LAKSHMI; SATYA, 2020.

Rateb; Ebel (2011) indicaram que que 21% dos fungos marinhos são isolados de algas, seguindo por 18% de esponjas e apenas 4% outros invertebrados marinhos. Como este levantamento data de mais de 10 anos, seria necessário se realizar novo levantamento para verificar se as principais fontes de fungos marinhos ainda são as mesmas.

3.2 MICROBIOMAS DE PEPINOS-DO-MAR (HOLOTÚRIAS, ECHINODERMATA)

Os pepinos-do-mar são animais marinhos invertebrados pertencentes à classe Holothuroidea, do filo Echinodermata. Até o momento existem cerca de 1.500 espécies descritas de pepinos-do-mar, ou holotúrias, divididos em três classes e seis ordens (CHEN et al., 2021). Os pepinos-do-mar são encontrados no fundo do mar em todo o mundo, desempenhando papéis importantes nos ecossistemas marinhos.

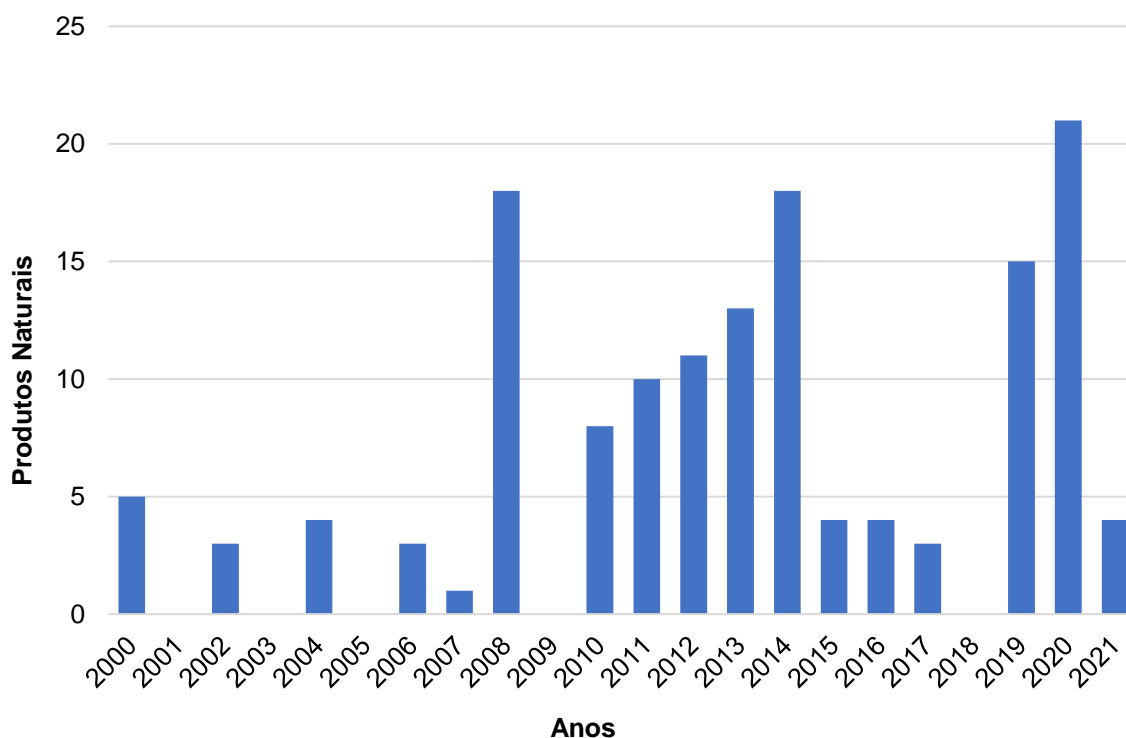
Compostos produzidos em cultura por micro-organismos isolados de pepinos-do-mar comumente apresentam grande variedade de atividades biológicas, como anticancerígena, anticoagulantes, antimicrobianas, dentre outros (GOZARI et al., 2018; KANG et al., 2023; KHOTIMCHENKO, 2018; PANGESTUTI; ARIFIN, 2018).

Nas últimas décadas pesquisadores vem empenhando esforços no isolamento de compostos bioativos produzidos por micro-organismos associados a pepinos-do-mar. O isolamento de micro-organismos associados a esse invertebrado são obtidas principalmente da superfície interna da pele do animal (que é

extremamente rígida), da superfície externa do corpo, bem como de tecido internos, fluido celômido, estômago, intestino e tecidos gastrointestinais (CHEN et al., 2021). CHEN et al. (2021) indicam que os fungos associados pepino-do-mar pertencem a 29 gêneros em 24 famílias, todos eles no filo Ascomycota, sendo o gênero dominante *Aspergillus* e *Penicillium*.

Entre 2000 a 2021 foi possível isolar 145 metabólitos secundários produzidos em cultura por micro-organismos associados aos pepinos-do-mar, que incluem policetídeos, alcaloides e terpenóides (SUN et al., 2013; XIA et al., 2014).

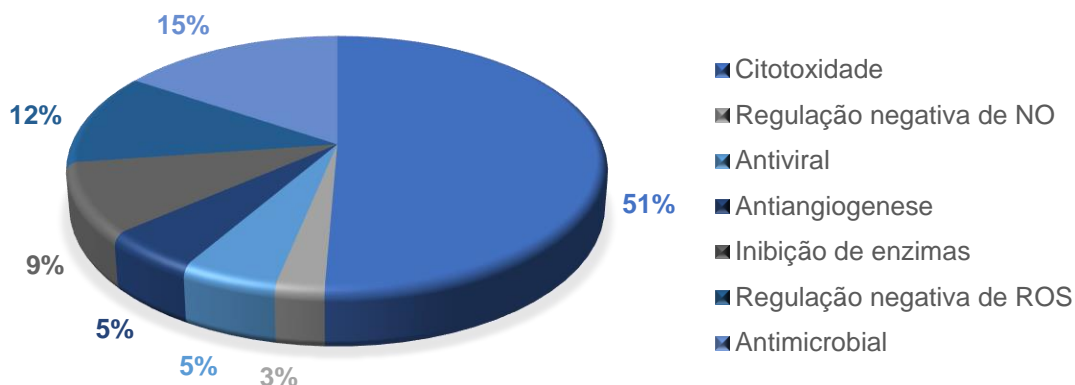
Gráfico 6: Metabólitos secundários isolados de culturas de micro-organismos associados a pepinos-do-mar entre 2000 a 2021.



Fonte: CHEN et al., 2021.

Chen et al. (2021) também mencionam que 32% e 28% do total de compostos isolados de culturas de fungos isolados de holotúrias são terpenóides e policetídeos, respectivamente. A maior parte dos compostos apresentou atividades citotóxicas, antimicrobianas, inibidoras de enzimas, antivirais e antiangiogênicas e a regulação negativa de produção de ROS (espécies reativas de oxigênio, *reactive oxygen species*) e NO (óxido nítrico) (Gráfico 7).

Gráfico 7: Distribuição percentual das bioatividades dos produtos naturais isolados de culturas de micro-organismos associados ao pepino-do-mar.



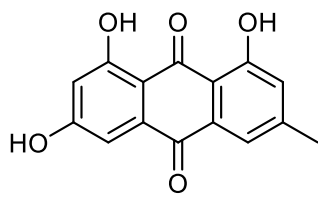
Fonte: CHEN et al., 2021.

A emodina (**34**) foi produzida em cultura pelo fungo marinho *Aspergillus terreus*, associado ao pepino-do-mar *A. japonicus*. O composto **34** apresentou efeito citotóxico em células de câncer epitelial oral humano com IC_{50} de 32,97 (CHEN et al., 2021).

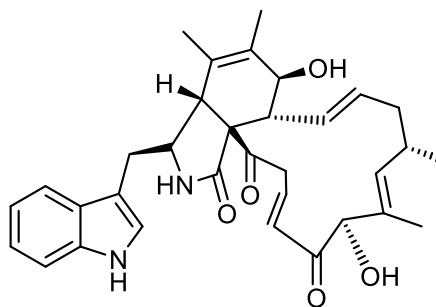
Os compostos **35**, **36** e **37** são alcaloide, terpenoide e (+)-butirolactona IV, respectivamente. Os alcaloides são uma classe de compostos orgânicos nitrogenados comumente isolados de plantas. O composto **35** é uma citocalasana que apresentou alguns efeitos inibitórios contra *Staphylococcus aureus* com um valor de MIC de 47,3 μ M (CHEN et al., 2021).

Já o composto **36** um terpenoide amplamente encontrado na natureza, exibiu citotoxicidade em célula KB com valor de IC_{50} de 20,74.

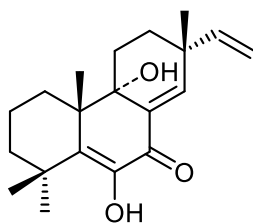
O composto **37** apresentou uma atividade antiangiogênica moderada quando avaliados em peixe-zebra, com uma taxa de inibição de 43,4% na concentração de 100 μ g/mL.



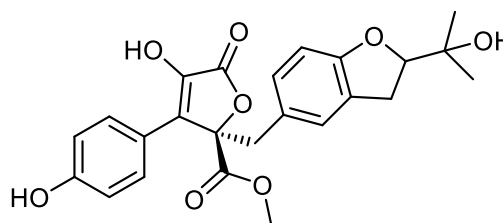
34



35



36



37

Em resumo, os pepinos-do-mar têm sido de grande importância ao fornecer micro-organismos capazes de sintetizar uma ampla variedade de compostos com atividades farmacológicas.

3.2.1 O FUNGO *Peroneutypa* sp.

Poucas informações são relatadas com relação a fungos do gênero *Peroneutypa* Shang et al. (2017) descrevem que este gênero é da família *Diatrypaceae*, relatada pela primeira vez por Berlese em 1902 para três espécies diferentes, sem a designação de um tipo. Somente em 2006 foi possível descrever o gênero com base em características morfológicas e dados filogenéticos (CARMARÁN; ROMERO; GIUSSANI, 2006). O gênero *Peroneutypa* é caracterizado por longas projeções proeminentes, ascos com ápices pequenos e truncados e ascósporos alantóides.

No presente estudo a linhagem de fungo *Peroneutypa* sp. investigada foi isolada de um pepino-do-mar coletado no litoral de Espírito Santo, Brasil.

3.4 OBJETIVOS

3.4.1 OBJETIVO GERAL

O presente sub-projeto tem por objetivo a descoberta de compostos bioativos de origem fúngica, que sejam ativos em pelo menos um dos bioensaios de atividade antiparasitária contra *P. falciparum*, *Leishmania* spp. e *T. cruzi*, atividade antibacteriana contra bactérias do grupo ESKAPE, atividade antifúngica contra os fungos fitopatogênicos *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* spp. e *Pratylenchus brachyurus*, ou atividade citotóxica em células tumorais. Este segundo sub-projeto aqui apresentado foi realizado sob a supervisão direta do Dr. Marcelo Rodrigues de Amorim.

3.4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Realizar o crescimento em escala ampliada (10 a 30 litros) de culturas do fungo *Peroneutypa* sp. para a produção de quantidade suficiente de cultura para o isolamento de metabólitos bioativos;
2. Realização do isolamento e purificação, monitorados por bioensaio, das substâncias ativas produzidas pela linhagem fúngica selecionada. Para tanto serão realizadas diferentes etapas de separação cromatográfica e purificação por HPLC;
3. Realizar a completa identificação estrutural dos metabólitos bioativos isolados e purificados, utilizando-se técnicas espectroscópicas e espectrométricas.

3.5 MATERIAIS E MÉTODOS

3.5.1 PROCEDIMENTOS GERAIS PARA REATIVAÇÃO, CULTIVO E OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DA LINHAGEM M16 (*Peroneutypa* sp)

A linhagem foi inoculada em placas de Petri contendo Marine Agar (MA), na ausência de luz, mantidas em estufas incubadoras de Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) por 7 dias e a 28 °C.

Após o pré-cultivo em meio sólido, discos de ágar contendo micélio foram utilizados para inocular frascos Schott de 500 mL contendo 100 mL de meio líquido de dextrose de batata e água do mar artificial (ASW: NaCl 13,6 g/L; CaCl₂.2H₂O 1,30 g/L; MgCl₂.6H₂O 4,53 g/L; KCl 0,64 g/L; MgSO₄.7H₂O 5,94 g/L; Na₂HPO₄ 10,0 mg/L; NH₄NO₃ 2,1 mg/L), incubados em DBO em modo estático a 28 °C. O nível de glicose no meio de cultivo líquido foi monitorado por tiras de glicose (Uriscan®). No dia em que a glicose foi esgotada, as culturas foram filtradas. Os filtrados foram particionados com

AcOEt, as porções orgânicas foram evaporadas, obtendo-se o extrato AcOEt. Este foi solubilizado em MeOH/H₂O (9:1) e esta fração foi particionada com n-hexano, com a finalidade de remover compostos lipídicos.

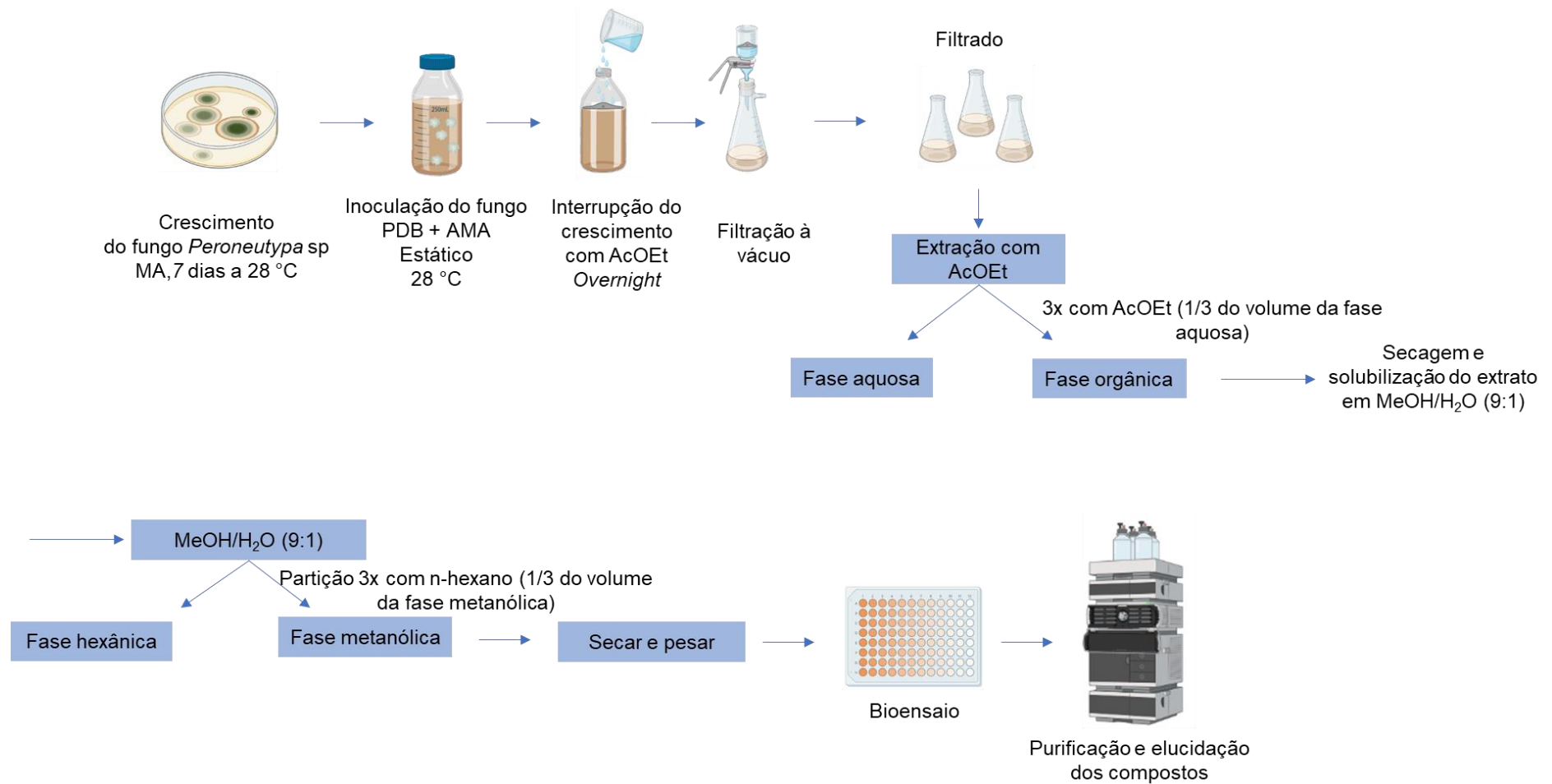
A fração desengordurada obtido foi evaporada e seca, obtendo-se a quantidade de 2,2 g. A fração total foi solubilizada em MeOH (8 mL) em banho ultrassom por alguns minutos, centrifugada e filtrada. A amostra solúvel em MeOH foi submetida a uma cromatografia em coluna de permeação em gel (200 x 2,5 cm d.i.) utilizando-se Sephadex LH-20 como fase estacionária, eluída com MeOH. As frações foram coletadas utilizando-se um coletor automático, obtendo-se 167 frações. As frações foram analisadas por HPLC-UV-MS de 5 em 5 e reunidas em 11 frações finais (Tabela 6).

Alíquotas das frações obtidas foram enviadas para a avaliação de sua atividade antiplasmodial. As frações M16As44, M16As51 e M16As54 apresentaram atividade anti-plasmodial e foram submetidas a isolamento de seus constituintes, utilizando-se as técnicas descritas na sessão 2.6.

A fração M16As44 foi fracionada por extração em fase sólida (SPE), utilizando-se colunas pré-empacotadas com fase reversa (octadecilsilano C₁₈; 5 g) e eluída em modo gradiente, fornecendo 5 subfrações (100% H₂O; A: H₂O/MeOH (3:1); B: H₂O/MeOH (1:1); C: H₂O/MeOH (1:3); e D: MeOH). A fração 100% H₂O foi descartada.

As frações M16As44A, M16As44B, M16As44C e M16AS44D foram analisadas por HPLC-UV-MS. Após uma cuidadosa avaliação, selecionou-se a fração M16As44B para prosseguir com o fracionamento e purificação por HPLC-UV, utilizando-se eluição em modo gradiente de 10-100% de MeOH:MeCN (1:1) em 30 minutos, monitorando-se em 237 e 279 nm (Figura 12). Assim, foram obtidas 7 subfrações (M16As44B0, M16As44B1, M16As44B2, M16As44B3, M16As44B4, M16As44B5 e M16As44B6). Destas, apenas a subfração M16As44B3 foi purificada e caracterizada; as outras frações foram descartadas por apresentarem componentes do meio de cultivo ou por não fornecerem massa o suficiente para sua caracterização.

Fluxograma 2: Fracionamento do meio de cultura obtidos em escala ampliada da linhagem fúngica M16. Os bioensaios avaliados foram de atividade antiplasmodial, atividade antibacteriana e atividade citotóxica para células tumorais.

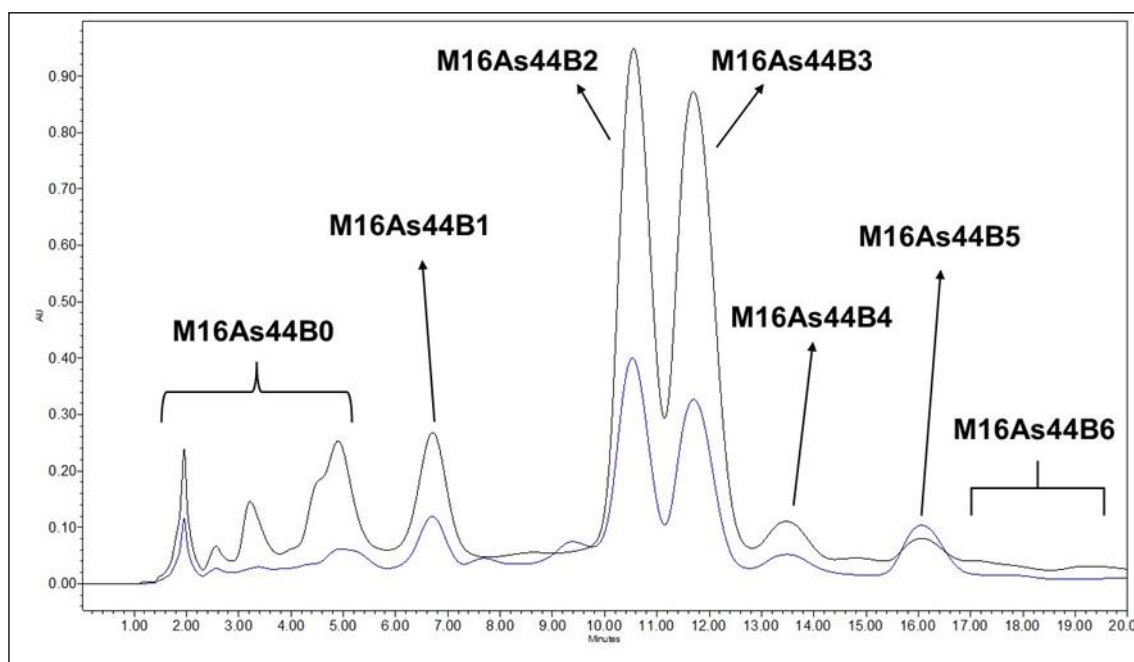


Fonte: A autora.

Tabela 6: Distribuição das massas das frações após cromatografia em Sephadex LH-20 do extrato M16.

Frações	Agrupamento	Massa (mg)
M16As1	01-37	125,1
M16As38	38-43	380,2
M16As44	44-50	147,7
M16As51	51-53	93,2
M16As54	54-59	188,0
M16As60	60-63	80,3
M16As64	64-73	88,2
M16As74	74-90	336,1
M16As91	91-121	50,7
M16As122	122-139	78,7
M16As140	140-167	20,3
Total		1588,5 mg

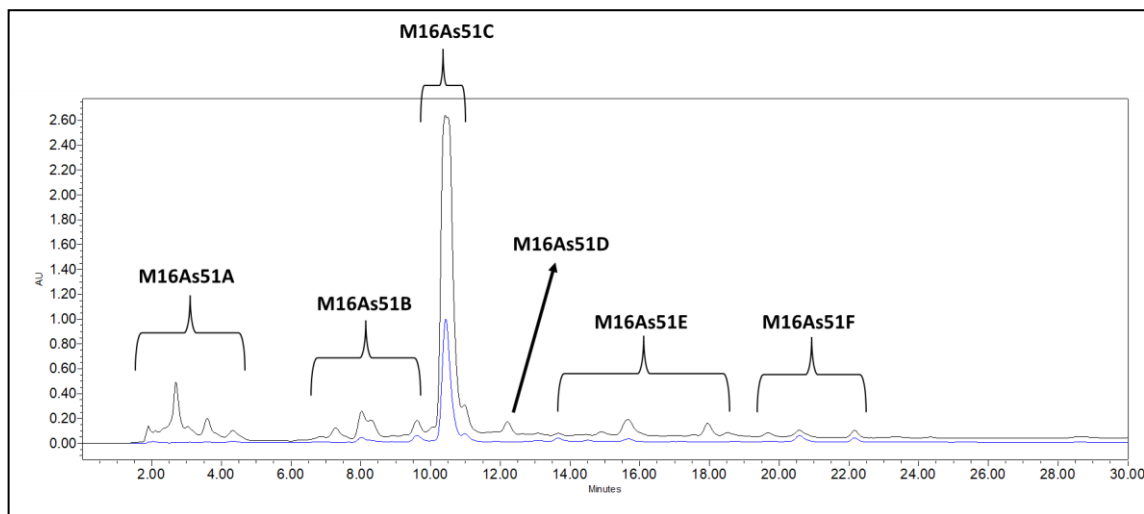
Figura 21: Cromatograma por HPLC-UV semipreparativo da amostra M16As44B.



Fonte: A autora. Legenda: Condições cromatográficas – coluna X-terra (Waters – C₁₈, 7,8 × 150 mm, 5 µm), com vazão de 2,5 mL/min, fracionamento e purificação por HPLC-UV utilizando eluição gradiente de 10-100% de MeOH:ACN (1:1, v/v) em 30 minutos monitorado em 237 e 279 nm.

A fração M16As51 foi submetida ao fracionamento e purificação por HPLC-UV, eluindo-se em modo gradiente de 16-100% de MeOH:MeCN (1:1) em 30 min, monitorando-se em 221 e 315 nm. Essa por sua vez forneceu 6 subfrações (Figura 22).

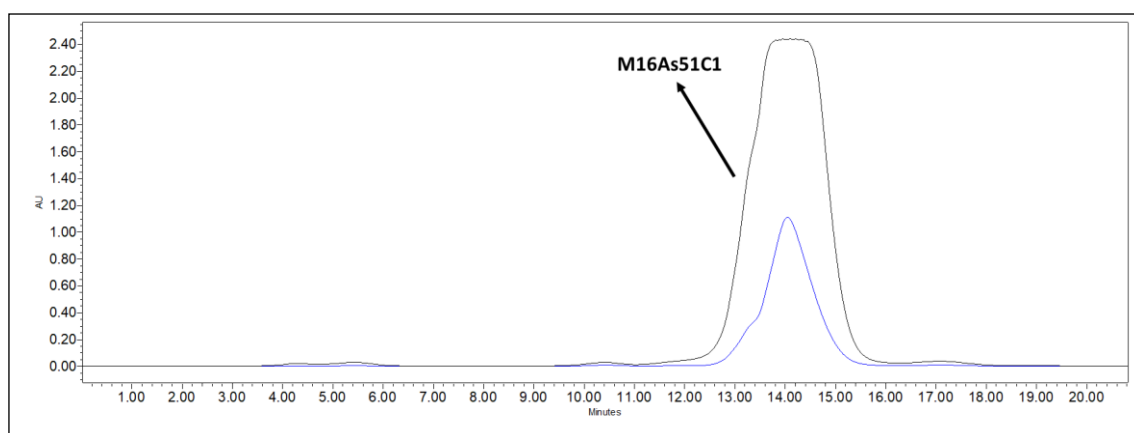
Figura 22: Cromatograma por HPLC-UV semipreparativo da amostra M16As51.



Fonte: A autora. Legenda: Condições cromatográficas – coluna X-terra (Waters – C₁₈, 7,8 × 150 mm, 5 μm), com vazão de 2,5 mL/min, fracionamento e purificação por HPLC-UV utilizando eluição gradiente de 16-100% de MeOH:ACN (1:1, v/v) em 30 minutos monitorado em 221 e 315 nm.

A subfração M16As51C foi purificada por HPLC-UV, fornecendo a substância M16As51C1 utilizando-se eluição em modo isocrático de 22% de MeOH:MeCN (1:1) em 20 minutos, monitorando-se o UV em 221 e 315 nm.

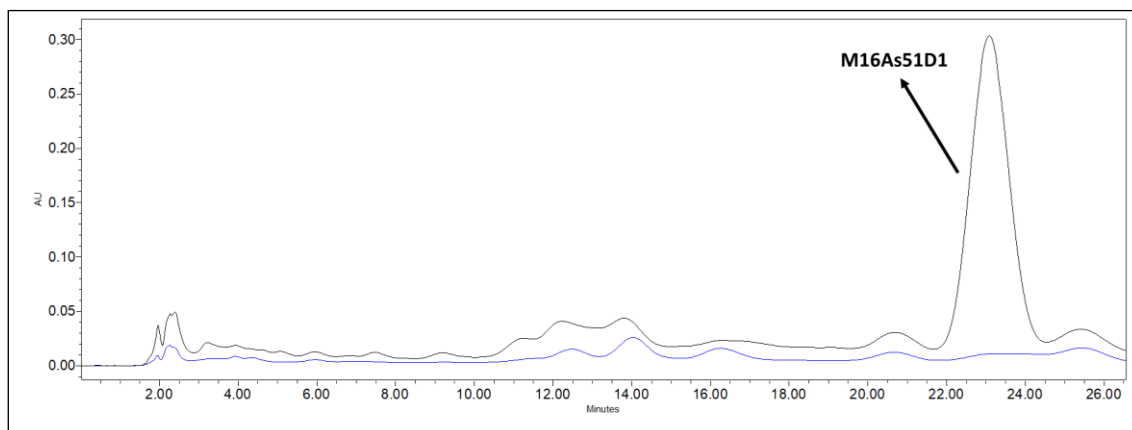
Figura 23: Cromatograma por HPLC-UV semipreparativo da amostra M16As51C.



Fonte: A autora. Legenda: Condições cromatográficas – coluna X-terra (Waters – C₁₈, 7,8 × 150 mm, 5 μm), com vazão de 2,5 mL/min, se eluição em modo isocrático de 22% de MeOH:MeCN (1:1) em 20 minutos, monitorando-se o UV em 221 e 315 nm.

A subfração M16As51D foi purificada por HPLC-UV utilizando-se eluição em modo isocrático de 30% de MeOH:MeCN (1:1) durante 22,6 minutos, monitorado-se em 221 e 254 nm, fornecendo a substância M16As51D1.

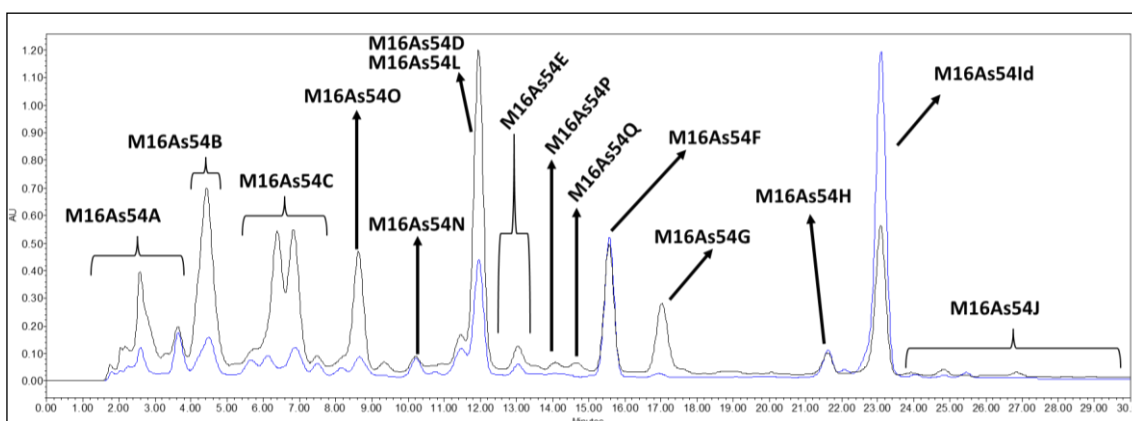
Figura 24: Cromatograma por HPLC-UV semipreparativo da amostra M16As51D.



Fonte: A autora. Legenda: Condições cromatográficas – coluna X-terra (Waters – C₁₈, 7,8 × 150 mm, 5 μm), com vazão de 2,5 mL/min, eluição em modo isocrático de 30% de MeOH:MeCN (1:1) durante 22,6 minutos, monitorado-se em 221 e 254 nm.

A fração M16As54 foi fracionada e purificada utilizando-se HPLC-UV, eluindo-se em modo gradiente de 30-80% de MeOH:MeCN (1:1) em 30 minutos, utilizando-se o monitoramento em 254 e 315 nm. Essa fração originou 4 novas subfrações (M16As54F, M16As54L, M16As54N, M16As54O) com massa o suficiente para repurificação e caracterização.

Figura 25: Cromatograma por HPLC-UV semipreparativo da amostra M16As54.



Fonte: A autora. Legenda: Condições cromatográficas – coluna X-terra (Waters – C₁₈, 7,8 × 150 mm, 5 μm), com vazão de 2,5 mL/min, fracionamento e purificação por HPLC-UV, eluindo-se em modo gradiente de 30-80% de MeOH:MeCN (1:1) em 30 minutos, utilizando-se o monitoramento em 254 e 315 nm.

As frações M16As44B3, M16As51C1, M16As51D1, M16As54F, M16As54L, M16As54N e M16As54O foram encaminhadas para a realização de RMN e análises por espectrometria de massas, com a finalidade de elucidar e caracterizar as estruturas. Alíquotas dessas frações foram posteriormente enviadas para colaboradores para avaliação em ensaios antibacteriano, antiplasmodial e citotóxico.

3.6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

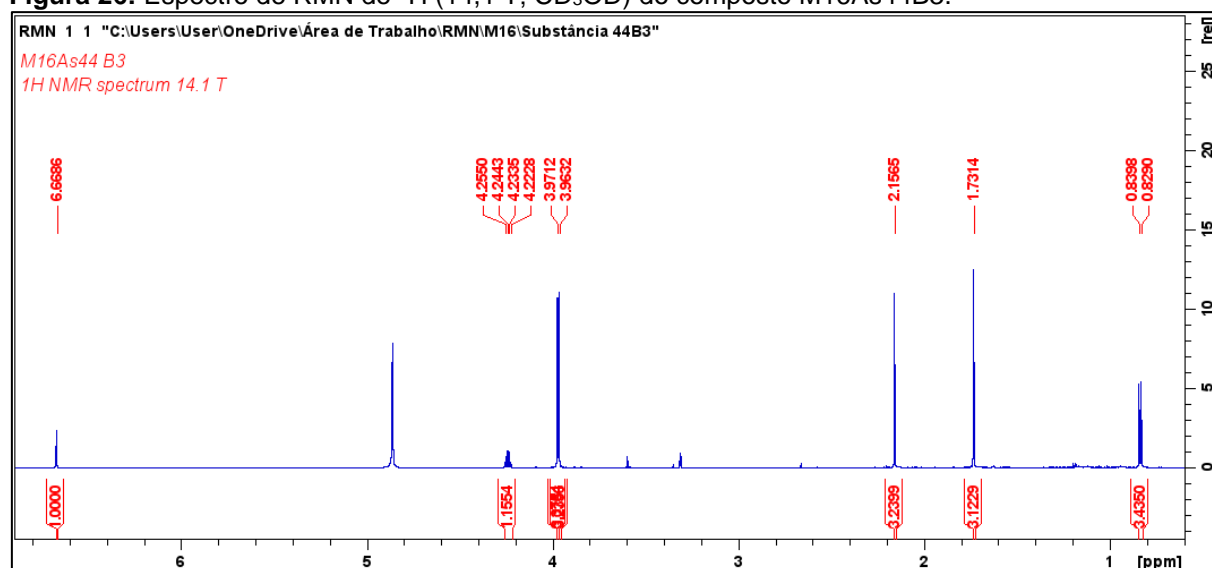
3.6.1 IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA SUBSTÂNCIA M16As44B3

Como mencionado anteriormente (objetivos), este segundo sub-projeto da dissertação foi realizado sob a supervisão direta do Dr. Marcelo Rodrigues de Amorim, incluindo o procedimento de isolamento e a análise dos dados espectroscópicos dos compostos isolados.

A substância M16As44B3 foi identificada por análise dos dados de RMN de ^1H e do espectro de massas obtidos pelo HPLC-MS: m/z 267,1243 $[\text{M}+\text{H}]^+$. O espectro de ^1H RMN revelou a presença de um single de um próton aromático δ_{H} 6,67, um quarteto de um próton em carbono oximetínico em δ_{H} 1,73, dois singletos de grupo metoxila em δ_{H} 3,97 e δ_{H} 3,98, um quarteto de grupo metila em δ_{H} 4,23 e um duplete δ_{H} 0,84, indicando um anel benzeno pentassubstituído.

A estrutura foi estabelecida por desreplcação com o banco de dados *Dictionary of Natural Products*, e confirmada por comparação com dados da literatura (PROMPANYA et al., 2016). Foi identificada como sendo a 3-(1-hidroxietil)-5,7-dimetoxi-3,4-dimetil-2-benzofuran-1(3H)-ona.

Figura 26: Espectro de RMN de ^1H (14,1 T; CD_3OD) do composto M16As44B3.



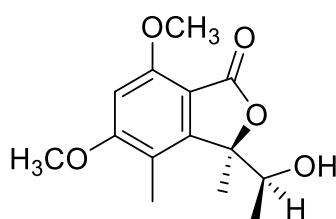
Fonte: A autora.

Tabela 7: Dados de RMN de ^1H do composto M16As44B3 (14,1 T; CD_3OD).

M16As44B3		3-(1-hidroxietil)-5,7-dimetoxi-3,4-dimetil-2-benzofuran-1(3H)-ona (CDCl_3)*
Posição	δ_{H} (J in Hz)	δ_{H} (J in Hz)
1	-	-
3	-	-
4	-	-
5	-	-
6	6,67 (1H, s)	6,41(1H, s)
7	-	-
8	4,23 (1H, q 6,5)	2,12 (1H, q 6,4)
9	0,84 (3H, d 6,5)	1,76 (3H, d 6,4)
10	1,73 (3H, s)	4,22 (3H, s)
11	2,16 (3H, s)	0,87 (3H, d 6,4)
3a	-	-
7a	-	-
C-5 OCH ₃	3,97 (3H, s)	3,92 (3H, s)
C-7 OCH ₃	3,98 (3H, s)	3,97 (3H, s)

Fonte: A autora. *Prompanya et al. (2016).

A quadricinctona (PROMPANYA et al., 2016) por nós isolada foi avaliada contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, e sua atividade antifúngica. Porém, não apresentou atividade antibacteriana ou antifúngicas significativas.



38

3.6.2 IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS PRESENTES NA FRAÇÃO M16As51

A partir da fração M16As51 foi possível isolar a substância M16As51C1 e M16As51D1.

A substância M16As51C1 se apresentou como um sólido branco amorfo, com rotação específica $[\alpha]_{\text{D}}^{22} - 28,7$ (c 0,08; EtOH). Os dados de RMN- ^1H deste composto são apresentados na tabela 7. Observou-se o sinal de metila dublete em δ_{H} 0,86, um

sinal característico de grupo metino de anel benzeno em δ_H 6,40, o sinal de uma metila de grupo metoxila em δ_H 3,88, além de sinal de hidrogênio em δ_H 4,22 característicos de um próton vizinho de um álcool. O composto apresentou íon molecular protonado em m/z 253,1071 evidenciando a fórmula molecular como $C_{13}H_{16}O_5$.

Utilizando-se dos dados obtidos e do banco de dados disponibilizados em *Dictionary of Natural Products* foi possível a identificação da substância como (*R*)-7-hidroxi-3-((*S*)-1-hidroxietil)-5-metoxi-3,4-dimetilisobenzofurano-1(3H)-ona (39) (TAYONE et al., 2011b). Tayone et al. (2011) descrevem que esse composto foi submetido a um ensaio antifúngico contra *Cochliobolus miyabeanus* mas não apresentou atividade anti-fúngica.

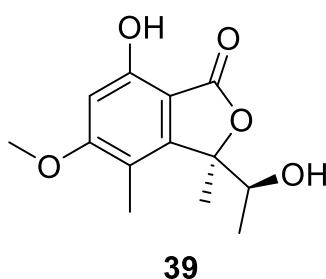
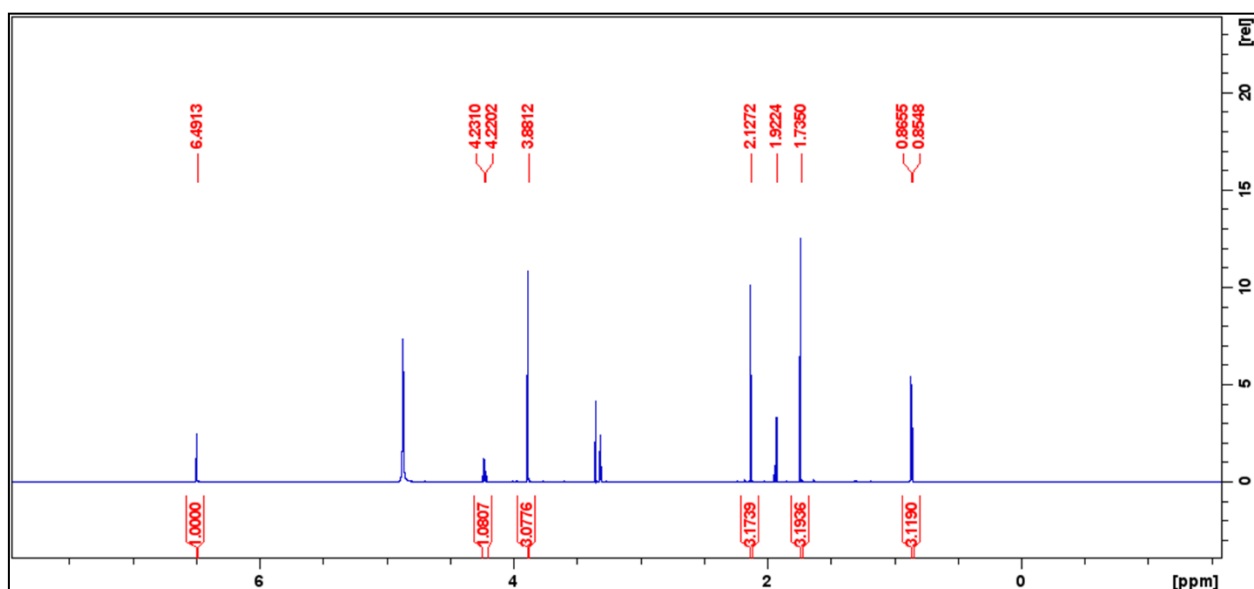


Figura 27: Espectro de RMN de 1H (14,1 T; CD_3OD) de M16As51C1.



Fonte: A autora.

Tabela 8: Dados de RMN de ^1H (14,1 T; CD_3OD).

M16As51C1		<i>(R)</i> -7-hidroxi-3-((<i>S</i>)-1-hidroxi-etil)-5-metoxi-3,4-dimetilisobenzofurano-1(3H)-ona CDCl_3^*	
Posição	δ_{H} (J in Hz)		δ_{H} (J in Hz)
1	-		-
3	-		-
4	-		-
5	-		-
6	6,40 (1H, s)		6,43 (1H, s)
7	-		-
8	4,23 (1H, q 6,5)		4,22 (1H, m)
9	0,86 (3H, d 6,5)		0,93 (3H, d, 6,8)
10	1,74 (3H, s)		1,81 (3H, s)
11	2,13 (3H, s)		2,11 (3H, s)
3a	-		-
7a	-		-
C-5 OCH_3	3,88 (3H, s)		3,88 (3H, s)
C-7 OH	-		7,88 (s)
C-8 OH	-		1,97 (d 10,3)

Fonte: A autora. *Tayone et al. (2011b).

O composto M16As51D1 foi isolado como um óleo incolor, o qual apresentou uma rotação óptica $[\alpha]_{\text{D}}^{23} + 38,6$ (c 0,1; MeOH). A análise por espectrometria de massas de alta resolução apresentou um íon desprotonado em m/z 237,1138 $[\text{M} - \text{H}]^-$ o qual possibilitou supor a fórmula molecular de $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}_4$. O espectro no infravermelho exibiu bandas correspondentes ao estiramento de O-H (3333 cm^{-1}), C-H (2980 cm^{-1}) e de C=O (1699 e 1765 cm^{-1}).

A análise dos espectros de RMN de ^1H e HSQC da substância M16As51D1 apresentou sinais referentes a de metino em δ_{H} 4,05, metino olefínico em δ_{H} 6,09, três grupos metilenos em δ_{H} 5,01 e δ_{H} 5,03, em δ_{H} 4,58 e δ_{H} 4,91, e em δ_{H} 2,54 (1H, e δ_{H} 2,64; e três grupos metila em δ_{H} 1,12, δ_{H} 1,13 e δ_{H} 0,98 (Tabela 9). A análise do espectro de RMN de ^{13}C indicou a presença de 13 sinais (Tabela 9). A análise do espectro COSY possibilitou observar que a metila H₃-14 e o metileno H₂-13 se encontram em posições vicinais, da mesma forma como o metino olefínico H-8 com o metileno H₂-9.

Analisando os dados do espectro de HMBC, as correlações do H₂-9 com C-7, de H-6 com C-7, C-10 e C-11, e das metilas H₃-10 e H₃-11 com C-7 e C-6, permitiu posicionar a cadeia ao grupo metino CH-6. As correlações HMBC de H-6 com C-3, C-4 e C-12, e de H₂-13 e H₃-12 com C-12, proporcionou considerar um grupo propionila também ligado em CH-6. As correlações do metileno H₂-5 com C-3, C-4 e C-2, e de H-5 com C-2 permitiu concluir o estabelecimento da estrutura química planar desta substância.

A configuração absoluta em C-6 foi determinada a partir da comparação dos espectros experimental e simulado de ECD. Os resultados permitiram determinar a configuração absoluta em C-6 como S.

Tabela 9: Dados de RMN de ¹H e ¹³C (14,1 T) para a substância M16As51D1.

M16As51D1			
Posição	δ _H (J in Hz)	δ _C	HMBC
2	-	171,6	-
3	-	142,0	-
4	-	127,9	-
5	4,58 (1H, d 16,8) 4,91 (1H, d 16,8 e 0,5)	71,1	127,9; 142,0; 171,6
6	4,05 (1H, s)	58,9	24,9; 27,9; 71,1; 127,9; 142,0; 146,6; 211,6
7	-	42,8	-
8	6,09 (1H, dd 17,4 e 10,8)	146,6	24,9; 27,2; 42,8
9	5,01 (1H, dd 17,4 e 1,2) 5,03 (1H, dd 10,8 e 1,2)	113,4	42,8; 146,6
10	1,12 (3H, s)	27,2	24,9; 42,8; 58,9; 146,6
11	1,13 (3H, s)	24,9	27,2; 42,8; 58,9; 146,6
12	-	211,6	-
13	2,54 (1H, dq 18,5 e 7,1) 2,64 (1H, dq 18,5 e 7,1)	40,1	7,7; 211,6
14	0,98 (3H, t 7,1)	7,7	40,1; 211,6

Fonte: A autora.

Figura 28: Substância M16As51D1 e suas correlações de HMBC e COSY.

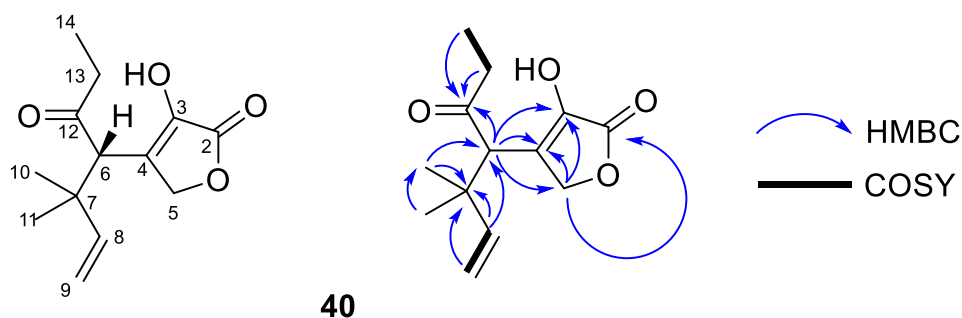
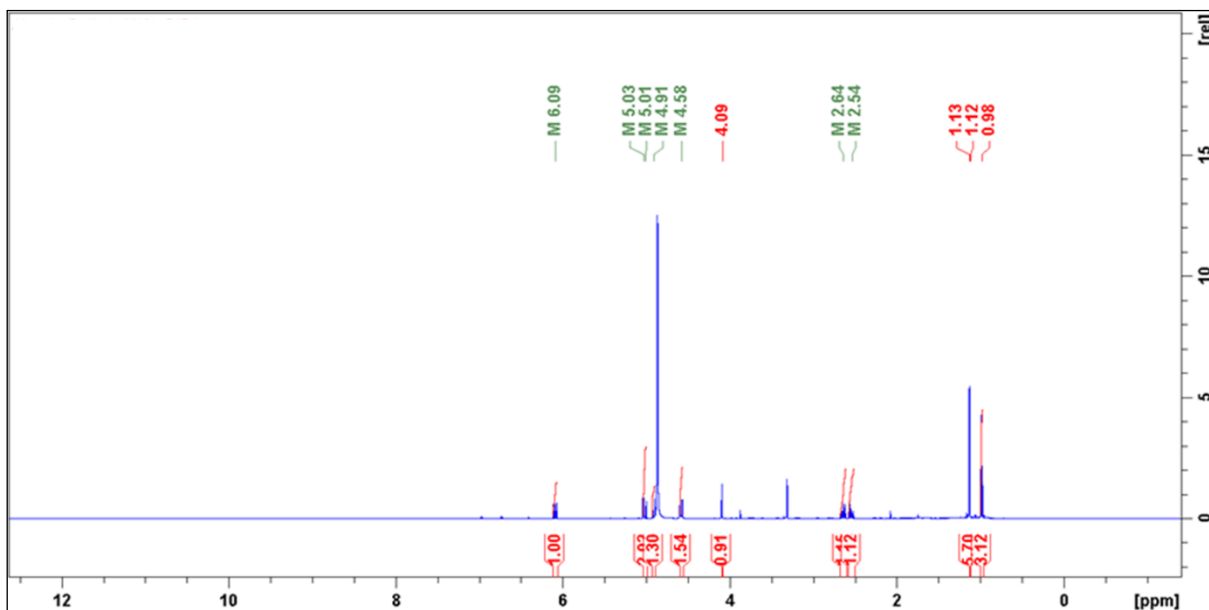
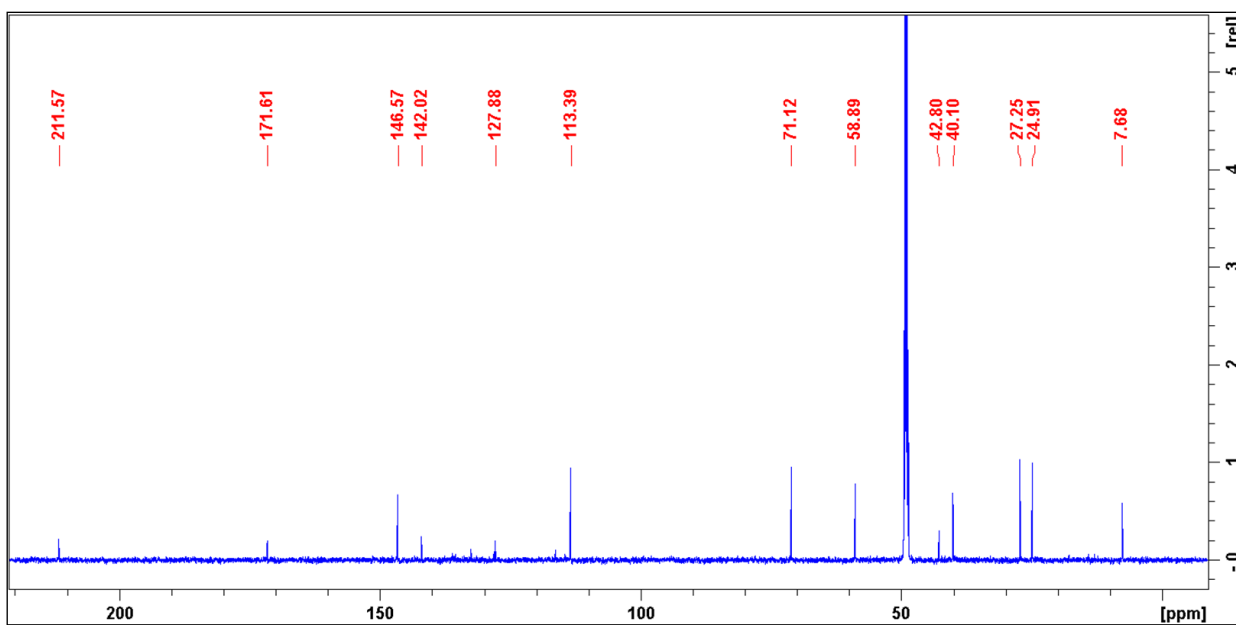


Figura 29: Espectro de RMN de ^1H da substância M16As51D1 (600 MHz, CD_3OD).



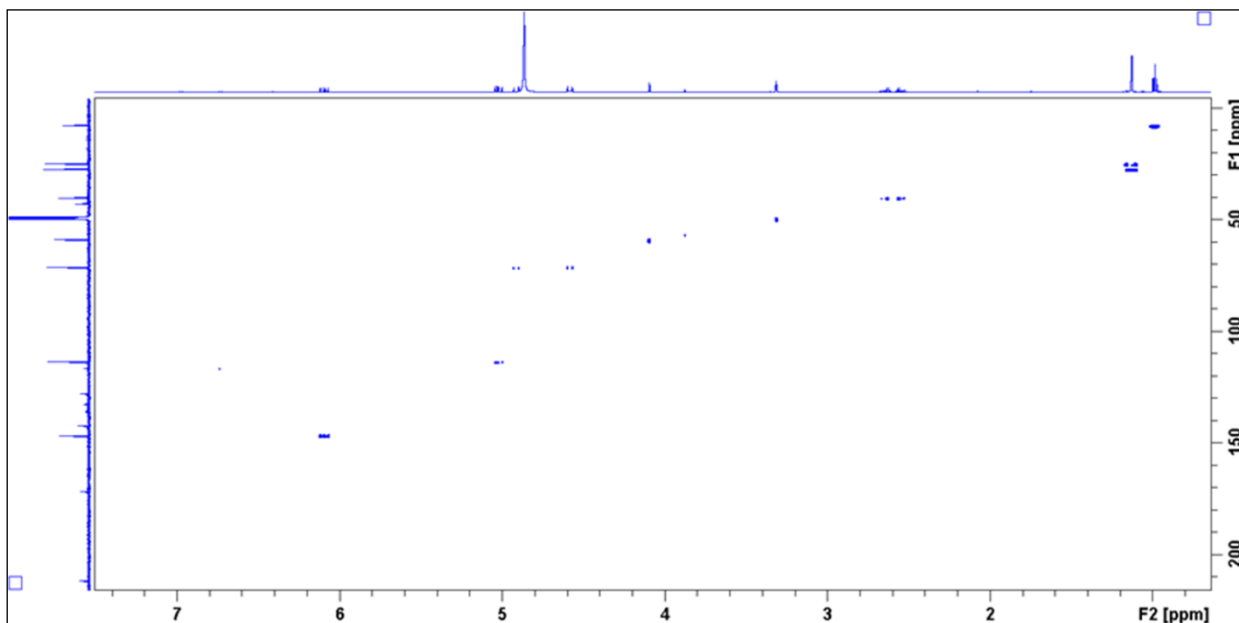
Fonte: A autora.

Figura 30: Espectro de RMN de ^{13}C da substância M16As51D1 (150 MHz, CD_3OD).



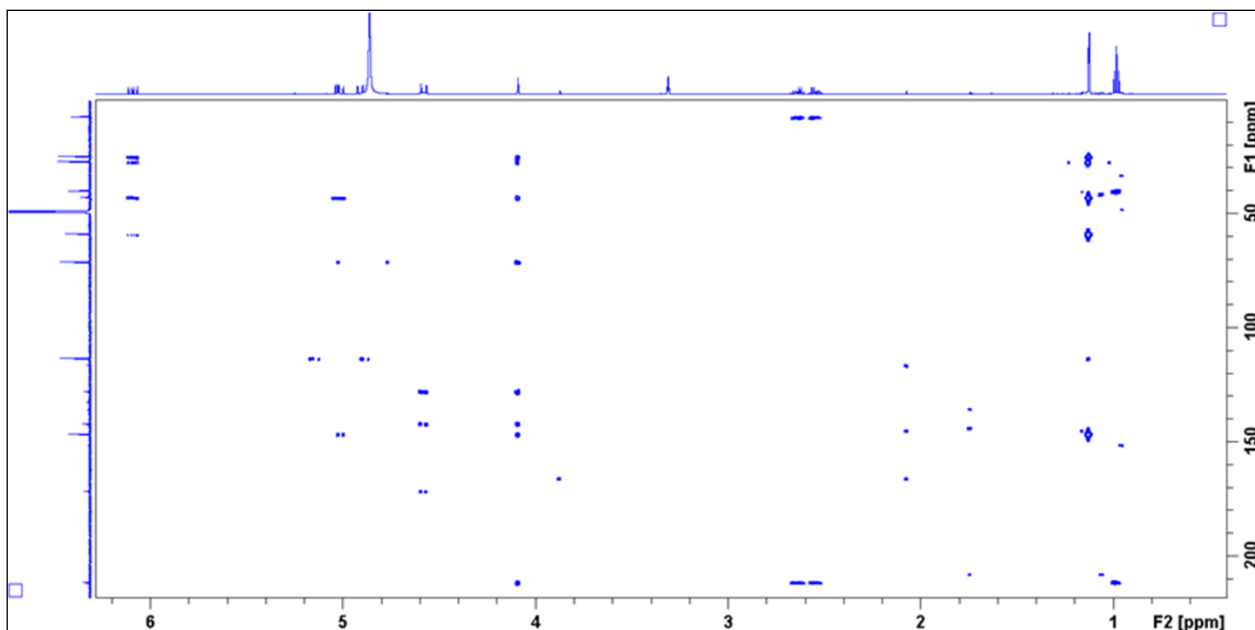
Fonte: A autora.

Figura 31: Espectro HSQC da substância M16As51D1 (14,1 T, CD₃OD).



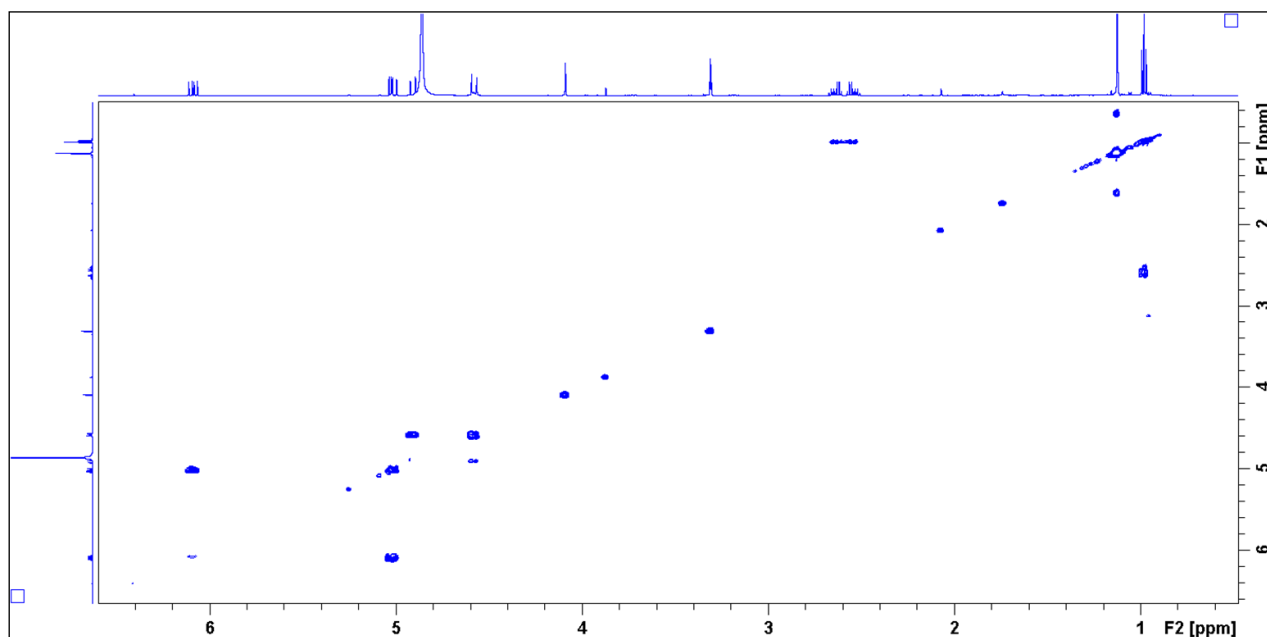
Fonte: A autora.

Figura 32: Espectro HMBC da substância M16As51D1 (14,1 T, CD₃OD).



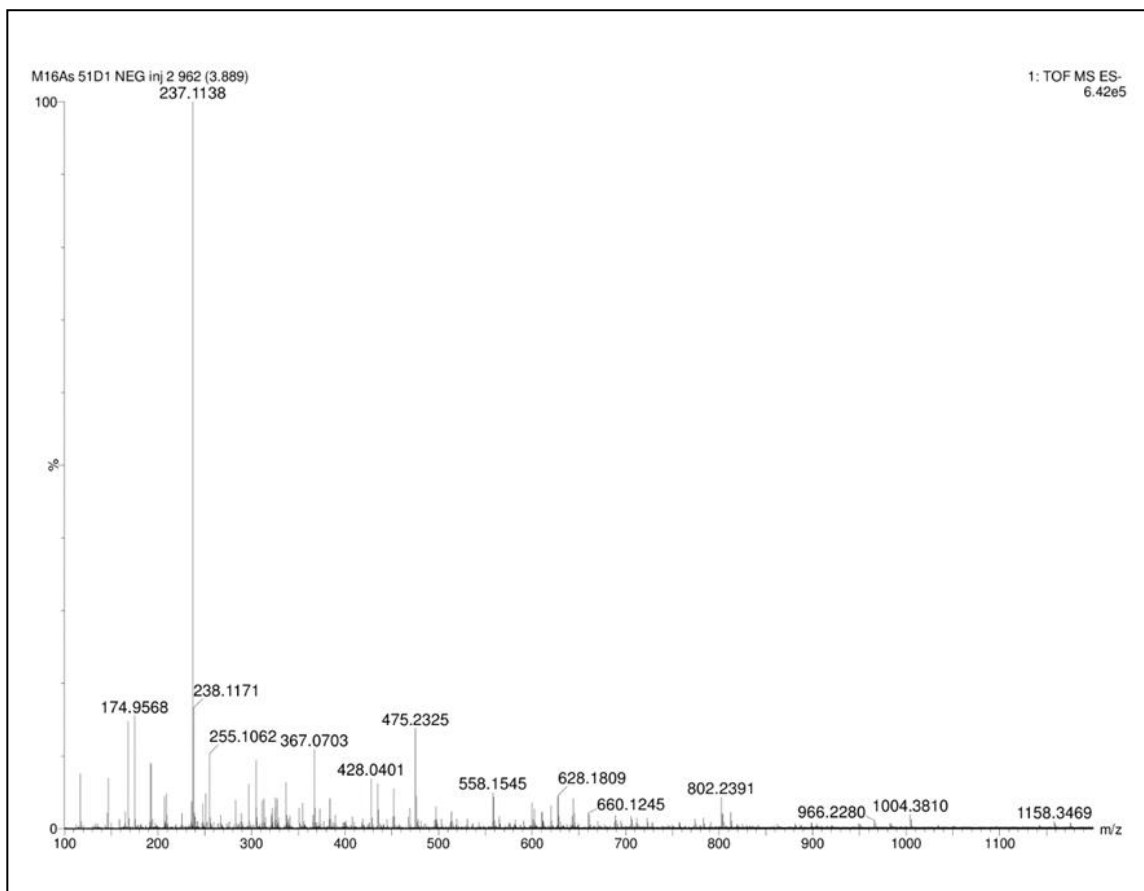
Fonte: A autora.

Figura 33: Espectro COSY da substância M16As51D1 (14,1 T, CD₃OD).



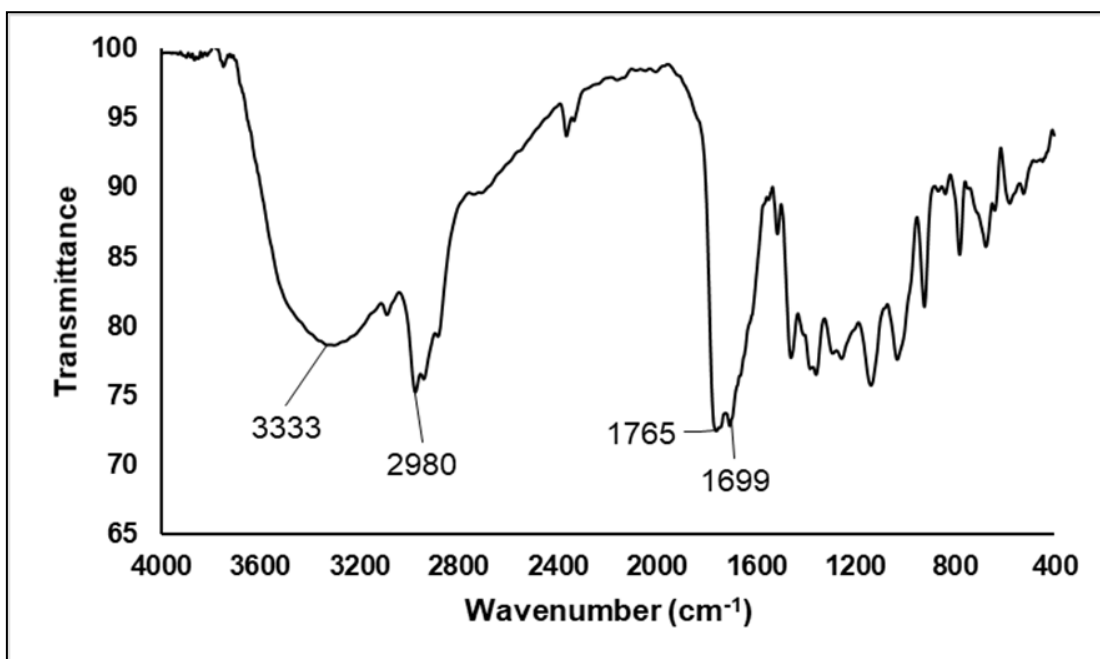
Fonte: A autora.

Figura 34: Espectro de massas de alta resolução em modo ESI negativo da substância M16As51D1.



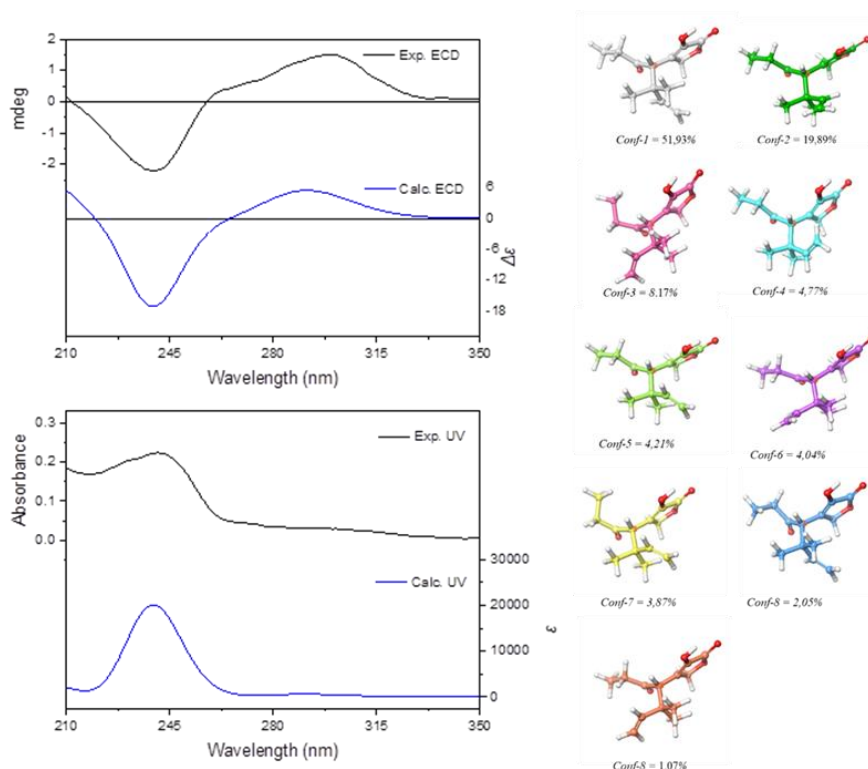
Fonte: A autora.

Figura 35: Espectro de IV (pastilha Si) da substância M16As51D1.



Fonte: A autora.

Figura 36: Comparação dos espectros de ECD e UV da estrutura estabelecida para a substância M16As51D1.



Fonte: A autora. Legenda: **(Esquerda)** Comparação dos espectros de ECD e UV observados de (+)-M16As51D1 (60 µg/mL; MeOH) (traço preto) com o espectros de ECD e UV calculados em [PCM(MeOH)-CAM-B3LYP/TZVP//PCM(MeOH)-ωB97X-D/6-31G+(d,p)] da média de Boltzmann dos conformêros de menor energia identificados para (S) (traço azul). **(Direita)** Estrutura, energia livre de Gibbs relativa e população de Boltzmann (%) dos conformêros de energia mais baixa de (S)-M16As51D1.

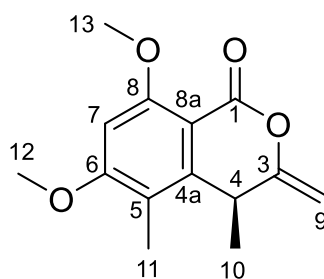
3.6.3 IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS PRESENTES NA FRAÇÃO M16As54

O composto M16As54F foi isolado como um óleo amarelado e apresentou rotação específica $[\alpha]_D^{21} + 188$ (c 0,19; MeOH). O seu espectro de massas de alta resolução apresentou íon molecular protonado em m/z 249,1124 $[M + H]^+$, sodiado em m/z 271,0938 $[M + Na]^+$ e o íon dímero sodiado em m/z 519,1991 $[2M + Na]^+$, indicando a fórmula molecular de $C_{14}H_{16}O_4$.

Os espectros de RMN de 1H e HSQC da substância possibilitaram a identificação de sinais característicos de metino aromático em δ_H 6,61, hidrogênio metínico em δ_H 3,94, hidrogênios de um grupo metileno δ_H 4,61 e δ_H 4,57, além de sinais referentes a dois grupos metoxila em δ_H 3,95 e δ_H 3,92, e de dois grupos metila em δ_H 1,34 e δ_H 2,12. A análise do espectro de RMN de ^{13}C indicou a presença de 14 carbonos.

A análise dos espectros HMBC e COSY possibilitou a identificação da substância como sendo a 6,8-dimetoxi-4,5-dimetil-3-metilenoisocroman-1-ona (**41**). Este composto foi descrito por Hamed et al. (2017) e Sang et al. (2008), mas as atribuições dos sinais espectroscópicos de RMN encontravam-se inconsistentes. Além do mais, a configuração absoluta em C-4 ainda não foi determinada.

Os dados de RMN e ECD indicaram a configuração absoluta em C-4 como *S*. A substância M16As54F foi denominada como (+)-(*S*)-6,8-dimetoxi-4,5-dimetil-3-metilenoisocroman-1-ona.



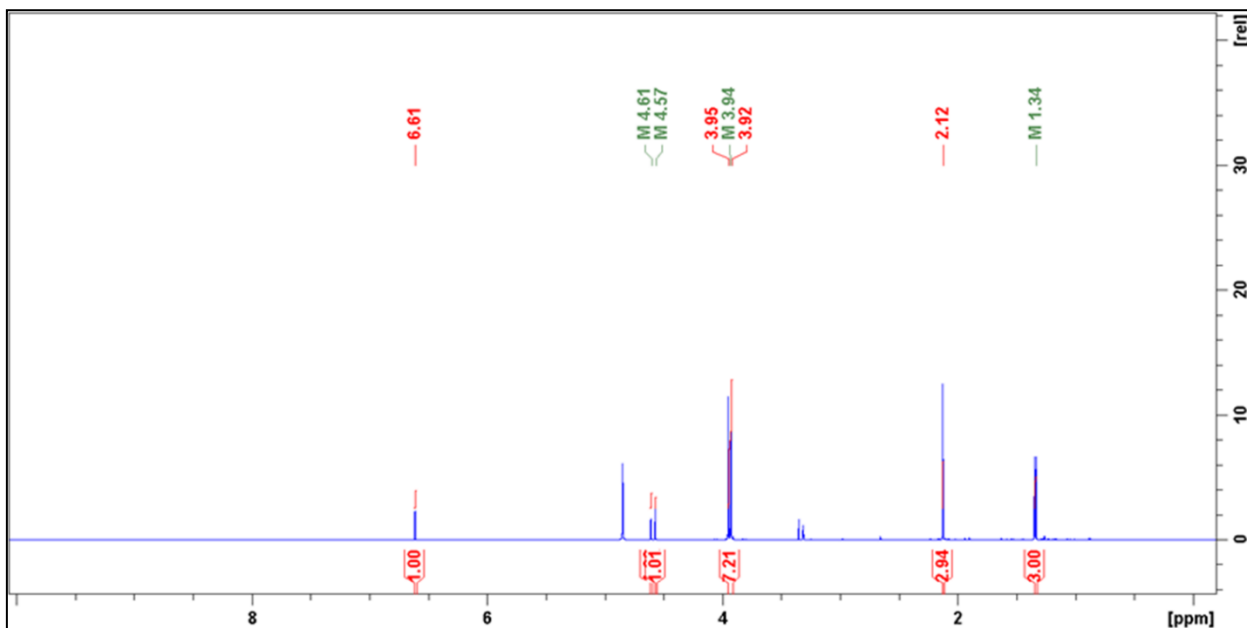
41

Tabela 10: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância M16As54F (14,1 T, CD_3OD).

M16As54F		
Posição	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}
1	-	162,6
3	-	158,9
4	3,94 (1H, q 7,1 Hz)	36,8
4a	-	146,2
5	-	104,0
6	-	165,3
7	6,61 (1H, s)	95,4
8	-	163,4
8a	-	115,3
9	4,61 (1H, dd 1,6 e 0,5 Hz) 4,57 (1H, d 1,6 Hz)	94,3
10	1,34 (3H, d 7,1 Hz)	21,8
11	2,12 (3H, s)	10,3
12	3,95 (3H, s)	56,6
13	3,92 (3H, s)	56,6

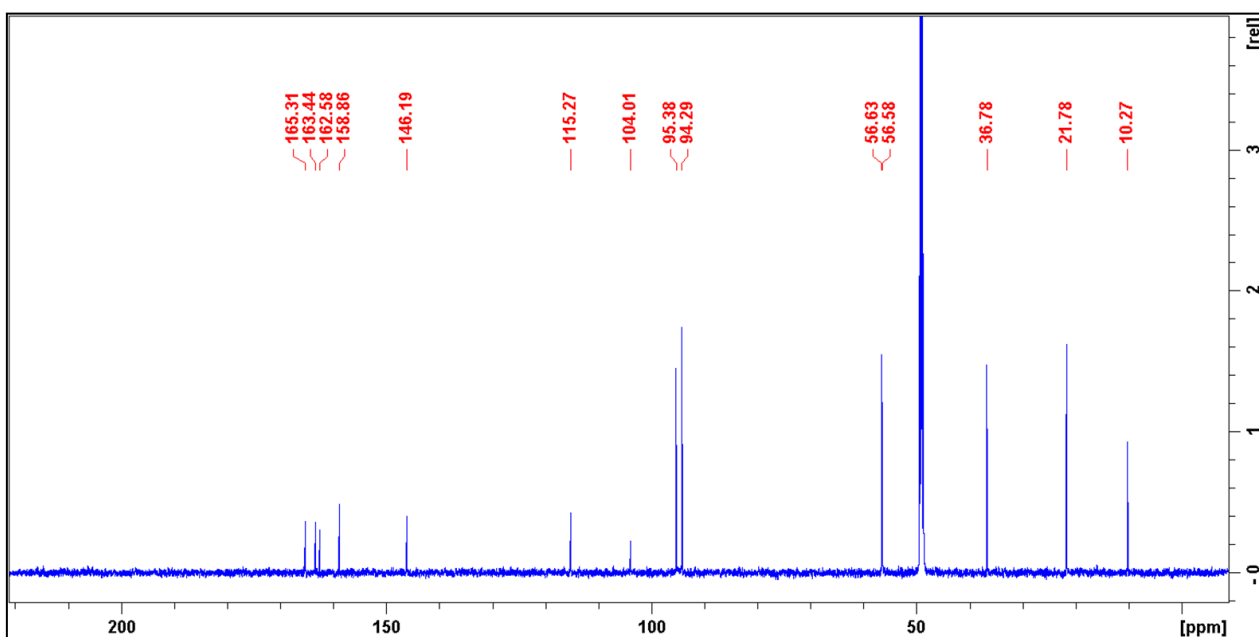
Fonte: A autora.

Figura 37: Espectro de RMN de ^1H da substância M16As54F (600 MHz, CD_3OD).



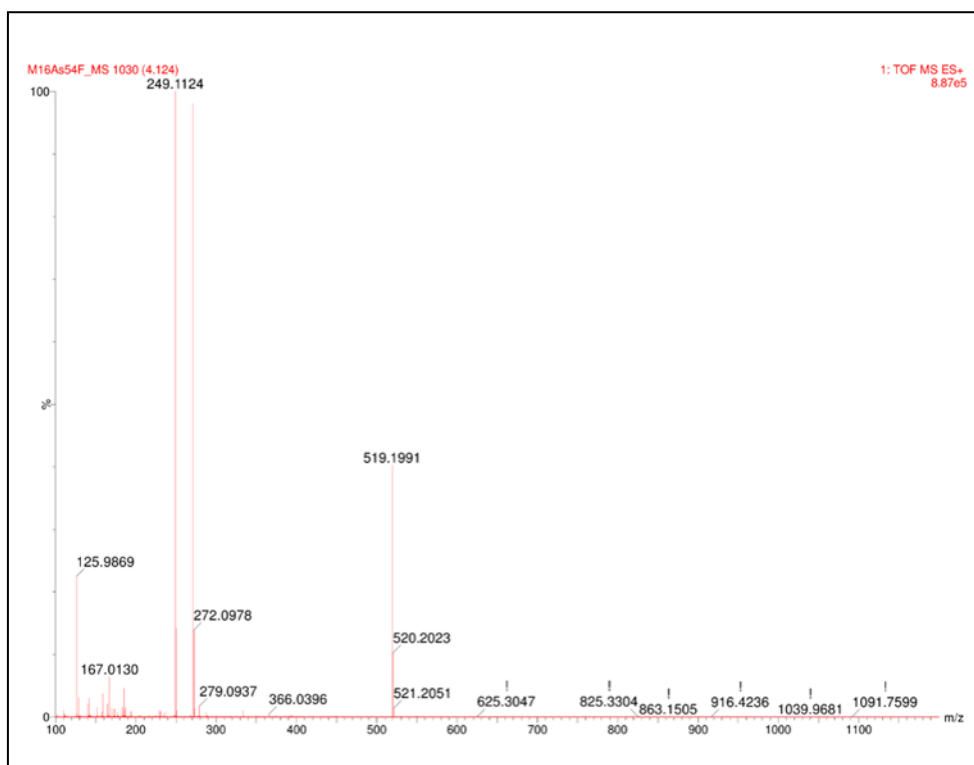
Fonte: A autora.

Figura 38: Espectro de RMN de ^{13}C da substância M16As54F (150 MHz, CD_3OD).



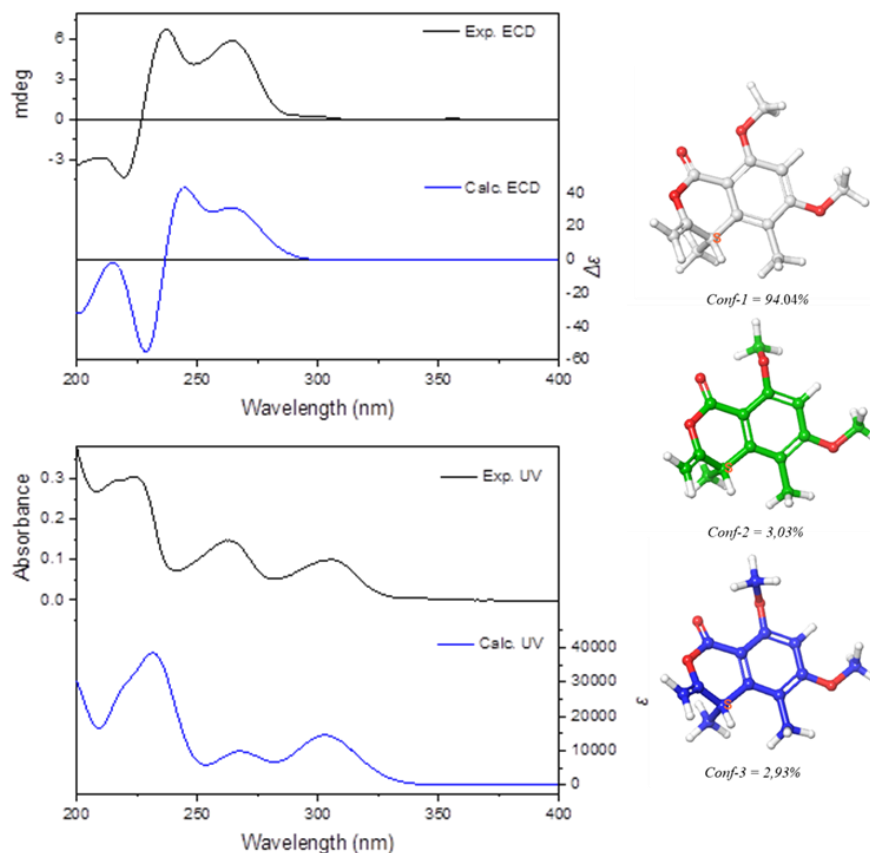
Fonte: A autora.

Figura 39: Espectro de massas de alta resolução da substância M16As54F.



Fonte: A autora.

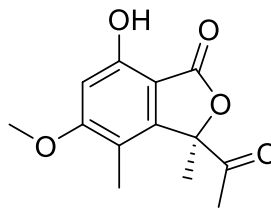
Figura 40: Comparação dos espectros de ECD e UV da estrutura da substância M16As54F.



Fonte: A autora. Legenda: **(Esquerda)** Comparação dos espectros de ECD e UV observados de (+)-**M16As54F** em metanol (traço preto) com o espectro de ECD e UV calculado em [PCM(MeOH)-CAM-B3LYP/TZVP//PCM(MeOH)- ω B97X-D/6-31G+(d,p)] da média de Boltzmann dos confôrmeros de menor energia identificados para (S) (traço azul). **(Direita)** Estrutura, energia livre de Gibbs relativa e população de Boltzmann (%) dos confôrmeros de energia mais baixa de (S)-**M16As54F**.

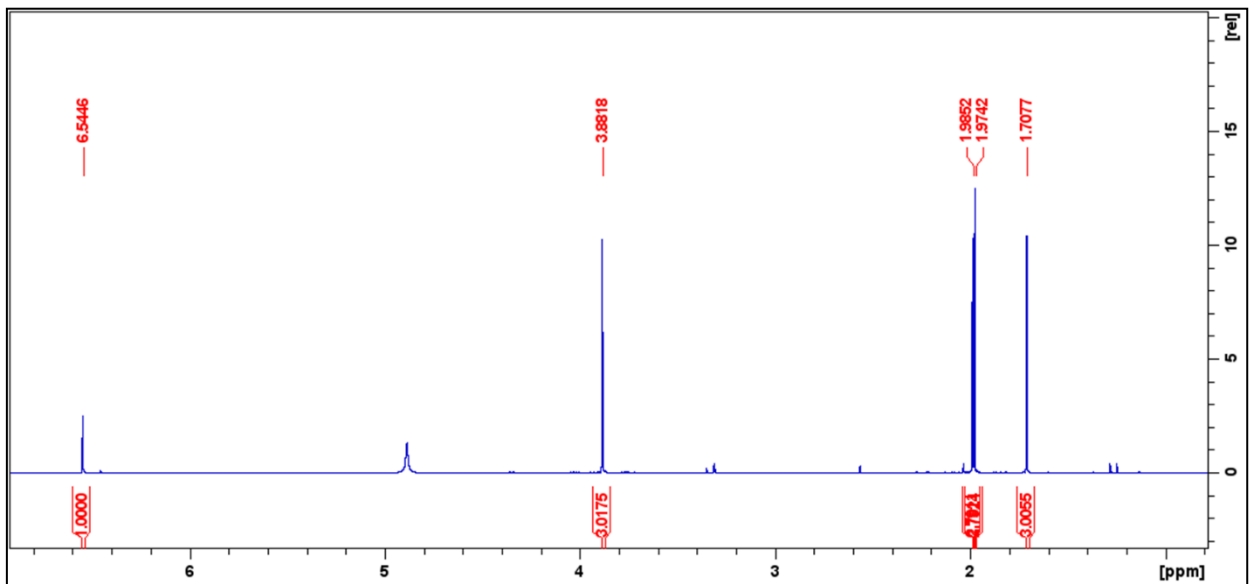
O composto M16As54L foi isolado como um sólido branco, o qual apresentou uma rotação óptica $[\alpha]_D^{22} + 179$ (c 0,22; EtOH). Essa substância foi descrita por Chinworrungsee et al. (2002) como sendo a (+)-(*R*)-3-acetil-7-hidroxi-5-metoxi-3,4-dimetil-3*H*-isobenzofuran-1-ona (**42**). Apresentou íon molecular protonado em m/z 251,0928 $[M+H]^+$, indicando fórmula molecular $C_{13}H_{14}O_5$. Seu espectro RMN- 1H apresentou sinais de quatro grupos metila em δ_H 1,71; 1,97; 1,99 e 3,92, bem como sinal de um próton aromático em δ_H 6,54.

Utilizando-se dos dados obtidos experimentalmente e consulta no banco de dados *Dictionary of Natural Products*, estabeleceu-se a estrutura (**42**). Segundo os autores supracitados, o composto exibiu muito fraca atividade antimicrobacteriana com CIM de 200 μ g/mL.



42

Figura 41: Espectro de RMN de ^1H da substância M16As54L (600 MHz, CD_3OD).



Fonte: A autora.

Tabela 11: Dados de RMN de ^1H da substância M16As54L (14,1 T, CD_3OD).

Posição	M16As54L		(+)-(R)-3-acetil-7-hidroxi-5-metoxi-3,4-dimetil-3H-isobenzofuran-1-ona (DMSO-d_6)*	
	δ_{H} (J in Hz)		δ_{H} (J in Hz)	
1	-		-	
3	-		-	
3a	-		-	
4	-		-	
5	-		-	
6	6,54 (1H, s)		6,60 (1H, s)	
7	-		-	
7a	-		-	
8	-		-	

9	1,97 (3H, s)	1,97 (3H, s)
10	1,71 (3H, s)	1,69 (3H, s)
11	1,99 (3H, s)	1,97 (3H, s)
12	3,92 (3H, s)	3,88 (3H, s)

Fonte: A autora. *Chinworrungsee et al. (2002).

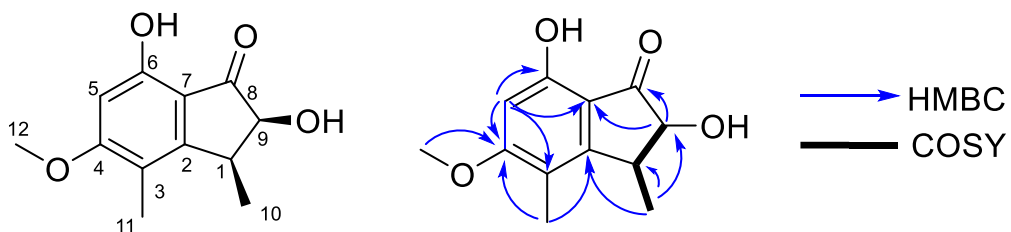
O composto M16As54N se apresentou como um óleo amarelado com rotação específica $[\alpha]_D^{21} + 14$ (c 0,05; MeOH). O composto apresentou um íon molecular protonado em m/z 223,0971 $[M + H]^+$ e o íon molecular protonado com perda de água em m/z 205,0865 $[M - H_2O + H]^+$, indicando fórmula molecular de $C_{12}H_{14}O_4$. O espectro no IV apresentou bandas em 3304, 2941, 1686 e 1601 cm^{-1} , características de grupos funcionais como hidroxila, carbonos sp^2 e carbonilas.

A análise dos espectros de RMN de 1H e HSQC permitiu a identificação de sinais de metino aromático em δ_H 6,32, hidrogênios metínicos vicinais em δ_H 4,54 e em δ_H 3,63, além de sinais referentes ao grupo metóxi em δ_H 3,88 e de dois grupos de metilas em δ_H 1,16 e δ_H 2,11.

A análise do espectro de RMN ^{13}C corroborou com o espectro de massas de alta resolução, no qual foi possível observar sinais de 12 carbonos. A análise dos espectros de RMN- 1H e COSY, levando-se em conta constantes de acoplamento e multiplicidades dos sinais no espectro de RMN de 1H , permitiu observar um sistema de spin constituído pelos grupos CH_3 -10, CH-1 e CH-9.

Os espectros HMBC indicou correlações dos hidrogênios H-5, H-1 e H-9 com o carbono da carbonila (C-8, δ_C 205,3), e de H₃-10 e H-1 com C-2 que permitiram conectar CH-1 em C-2 da porção aromática e CH-9 à carbonila C-8, por sua vez conectada em C-7 do anel benzeno. Estes dados permitiram estabelecer a estrutura química como sendo a 2,7-dihidroxi-5-metoxi-3,4-dimetil-2,3-dihidro-1H-inden-1-ona (**43**).

A configuração absoluta do composto M16As54N foi determinada por análise comparativa dos espectros experimental e simulado de dicroísmo circular eletrônico (ECD), este resultado definiu a configuração absoluta do composto M16As54N como (1S, 9S).



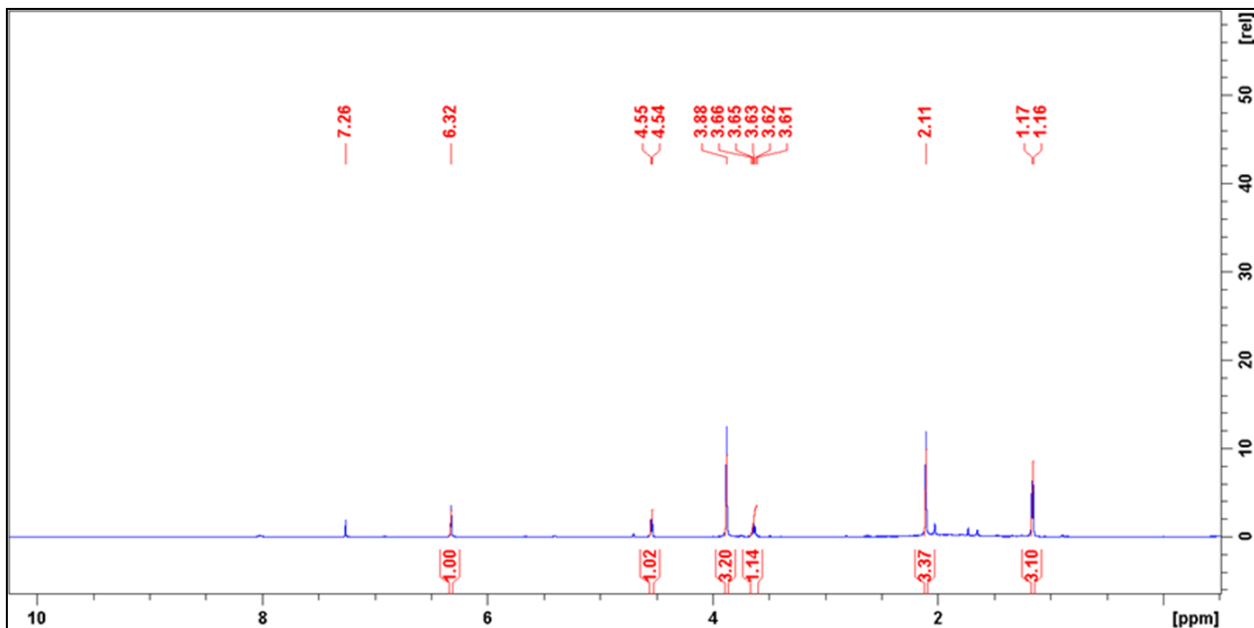
43

Tabela 12: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância M16As54N (14,1 T, CDCl_3).

M16As54N		
Posição	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}
1	3,63 (1H, quintet, 7,2)	37,8
2	-	155,0
3	-	115,3
4	-	166,5
5	6,32 (1H, s)	96,8
6	-	157,4
7	-	111,2
8	-	205,3
9	4,54 (1H, d, 7,2)	76,2
10	1,16 (3H, d, 7,2)	15,4
11	2,11 (3H, s)	10,5
12	3,88 (3H, s)	56,1

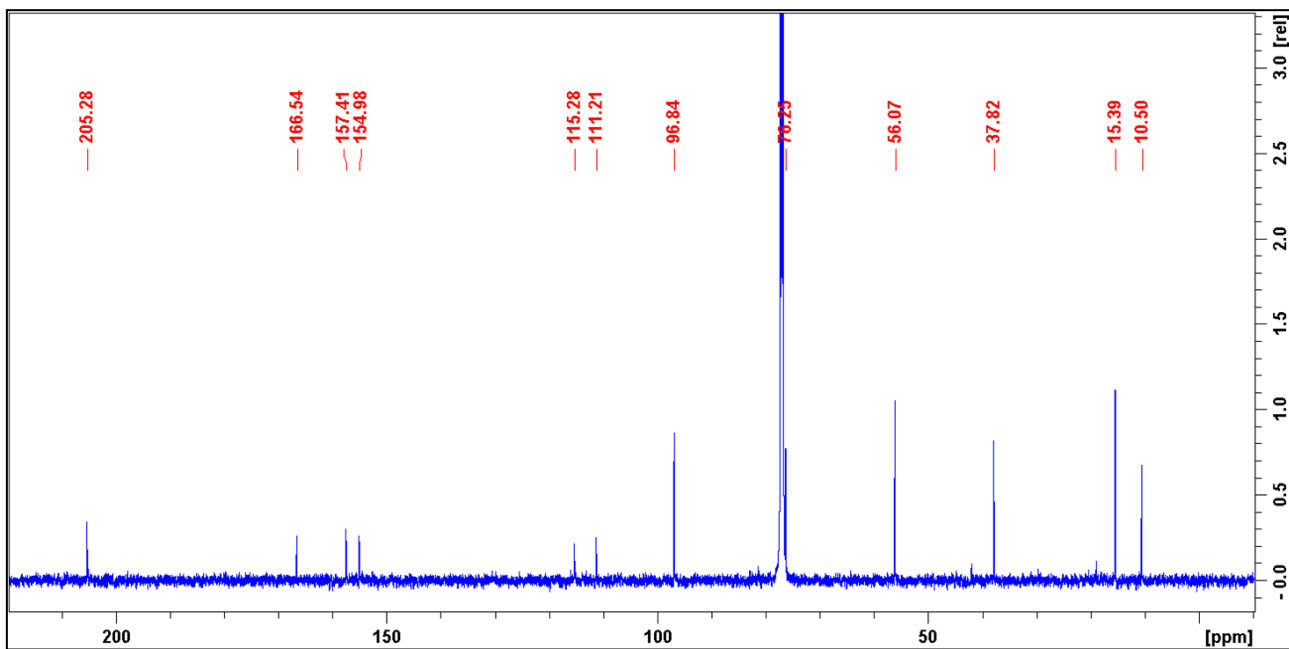
Fonte: A autora.

Figura 42: Espectro de RMN de ^1H da substância M16As54N (600 MHz, CDCl_3).



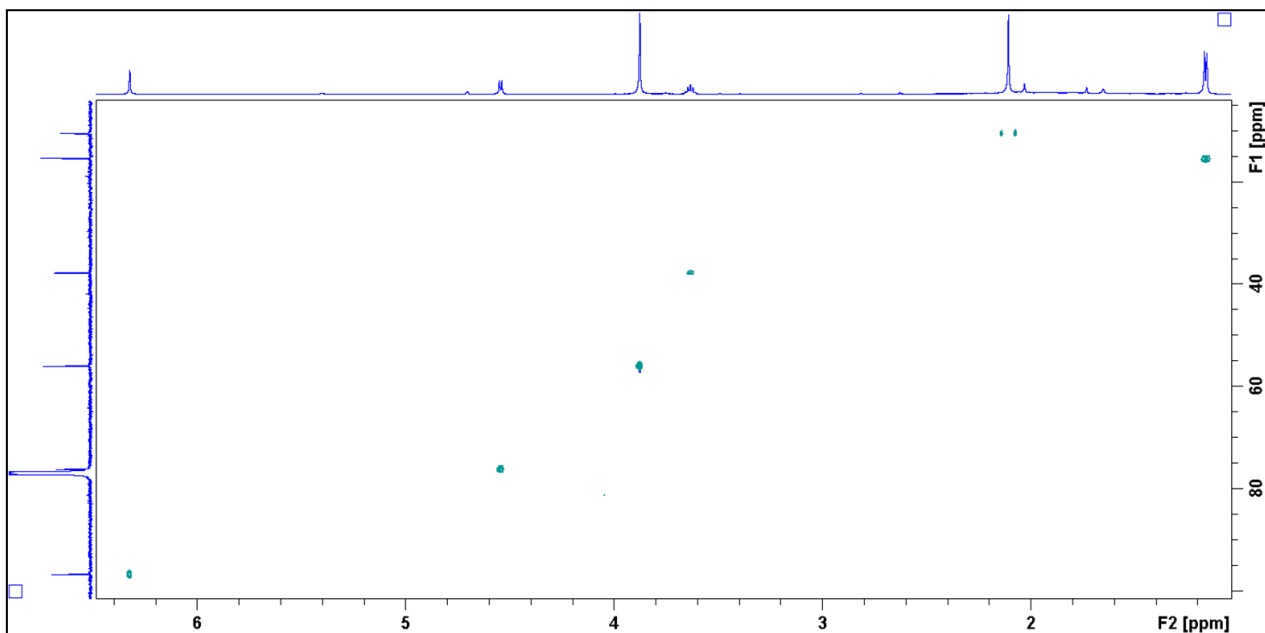
Fonte: A autora.

Figura 43: Espectro de RMN de ^{13}C da substância M16As54N (150 MHz, CDCl_3).



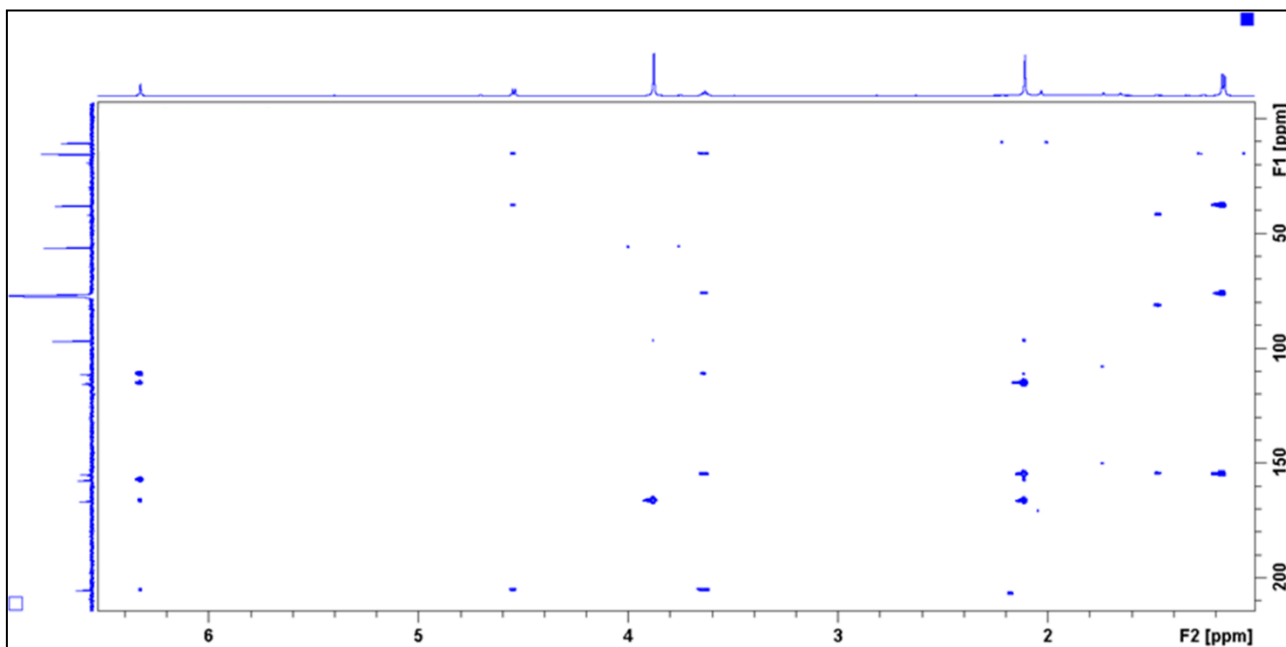
Fonte: A autora.

Figura 44: Espectro HSQC da substância M16As54N (14,1 T, CDCl₃).



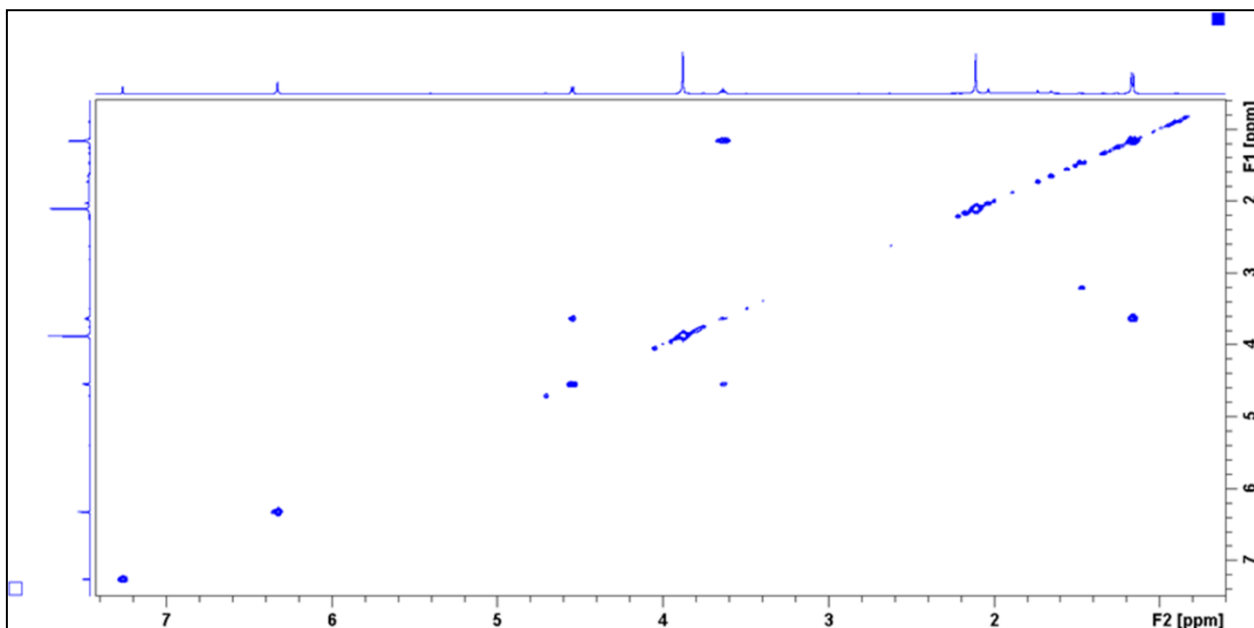
Fonte: A autora.

Figura 45: Espectro HMBC da substância M16As54N (14,1 T, CDCl₃).



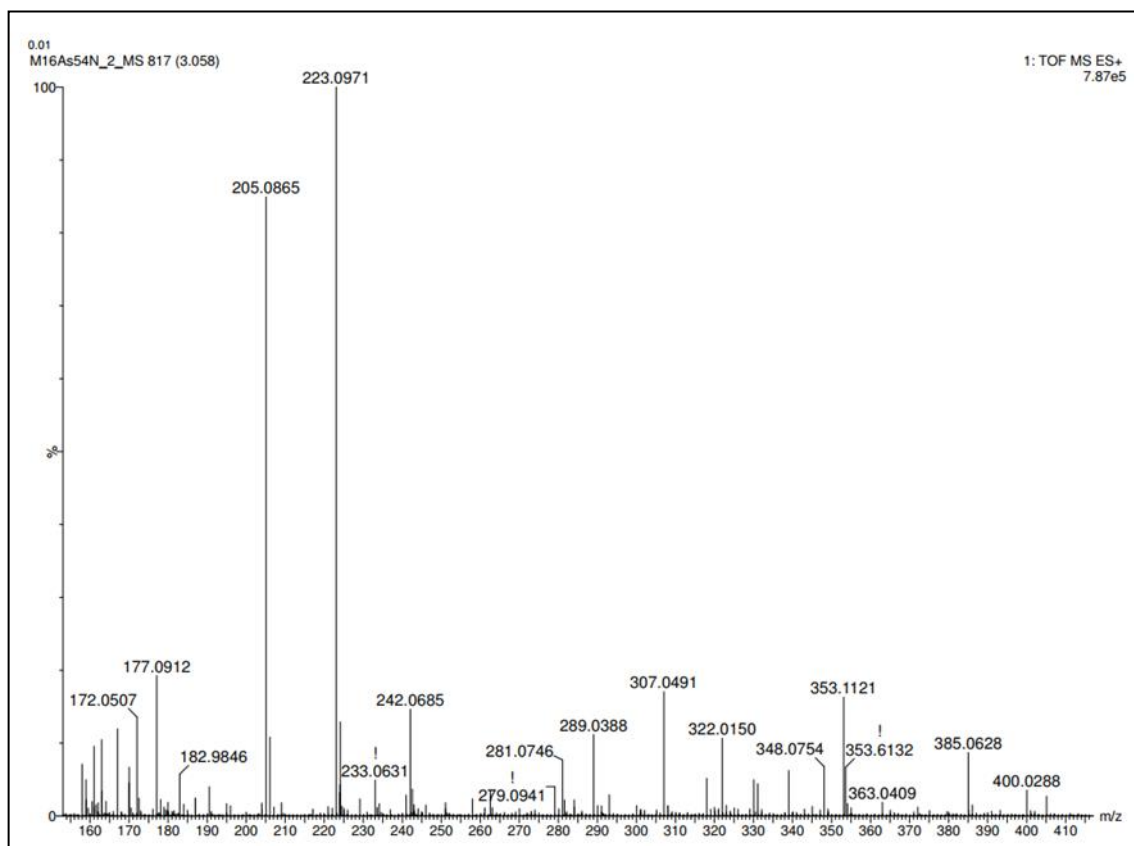
Fonte: A autora.

Figura 46: Espectro COSY da substância M16As54N (14,1 T, CDCl₃).



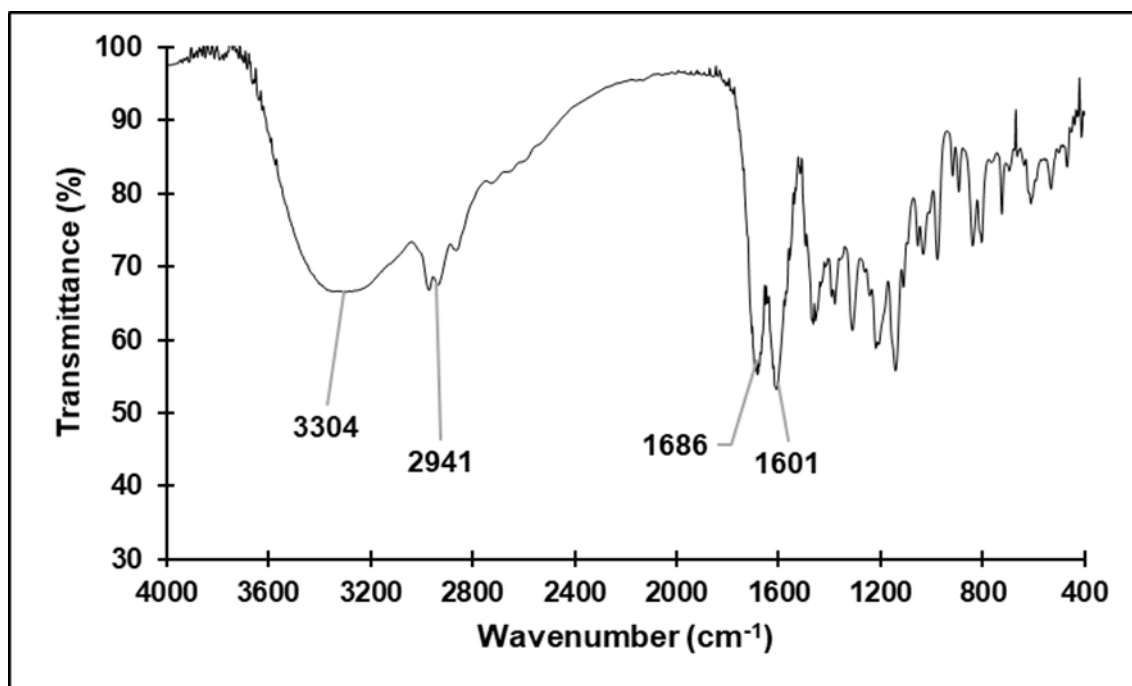
Fonte: A autora.

Figura 47: Espectro de massas de alta resolução da substância M16As54N.



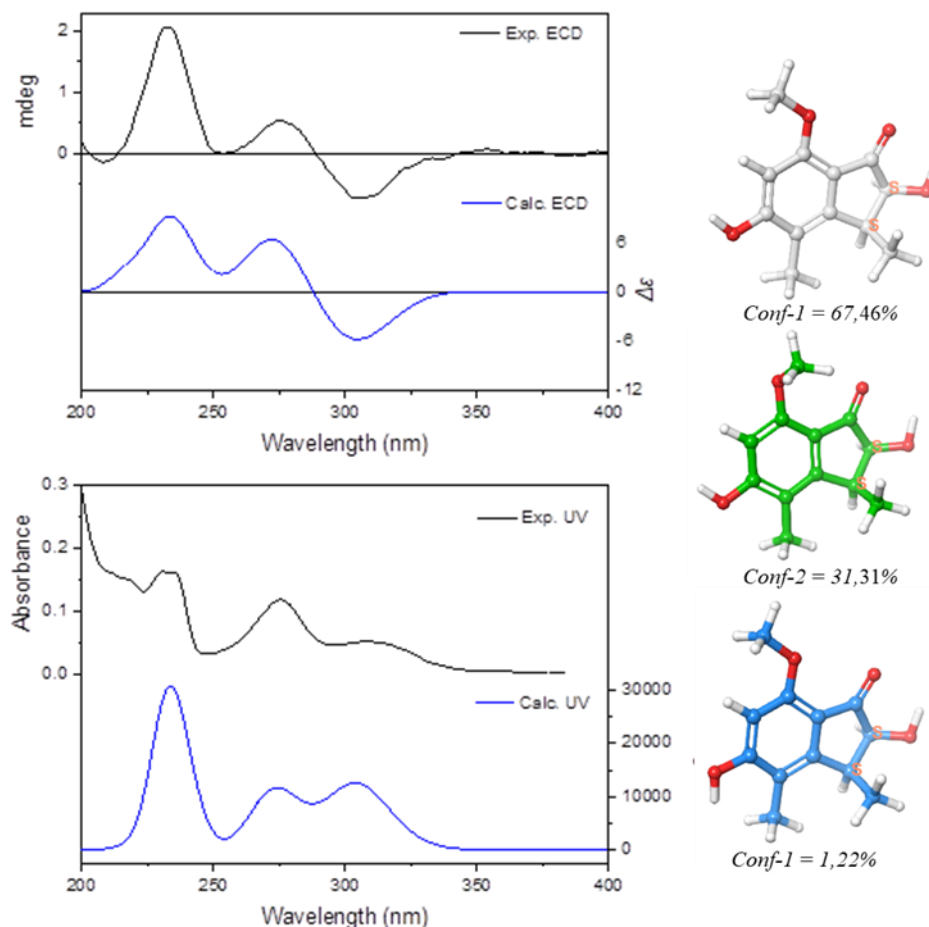
Fonte: A autora.

Figura 48: Espectro no IV (pastilha de Si) da substância M16As54N.



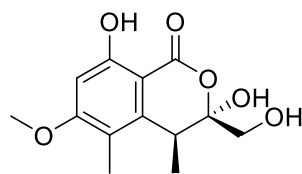
Fonte: A autora.

Figura 49: Comparação dos espectros de ECD e UV da estrutura da substância M16As54N.



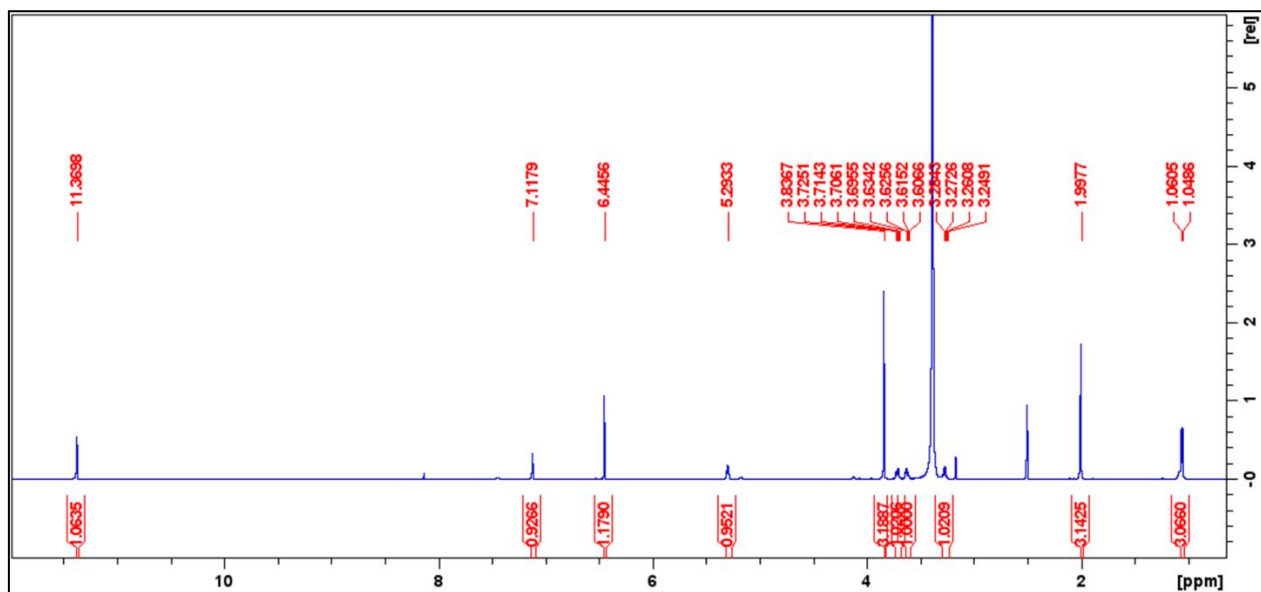
Fonte: A autora. Legenda: **(Esquerda)** Comparação dos espectros de ECD observados de (+)-**M16As54N** (25 µg/mL; MeOH) (traço preto) com o espectro de ECD calculado em [PCM(MeOH)-CAM-B3LYP/TZVP//PCM(MeOH)- ω B97X-D/6-31G+(d,p)] da média de Boltzmann dos confômeros de menor energia identificados para (1S, 9S) (traço azul). **(Direita)** Estruturas, energias livres de Gibbs relativas e população de Boltzmann (%) dos confômeros de energia mais baixa de (1S, 9S)-**M16As54N**.

A substância M16As54O foi isolada como um sólido branco com rotação óptica $[\alpha]_D^{23} + 42$ (c 0,1; CHCl₃). A análise dos dados de RMN (Tabela 12) indicaram que o composto é a (+)-(3R, 4S)-3,8-dihidroxi-3-hidroximetil-6-metoxi-4,5-dimetil-isocroman-1-ona (**44**) (TAYONE et al., 2011a). A fórmula molecular foi determinada como sendo C₁₃H₁₆O₆, considerando-se o espectro de massas de alta resolução ESI, que apresentou íon molecular protonado em m/z 269,1023 [M+H]⁺. O espectro de RMN-¹H apresentou sinais em δ_H 5,45 de hidrogênio em anel aromático, sinal de metoxila em δ_H 3,84 e de duas metilas em δ_H 1,05 e δ_H 2,00. TAYONE et al. (2011) assinalaram que **44** apresentou fraca inibição contra *Cochliobolus miyabeanus* com IC₅₀ 250 g/mL.



44

Figura 50: Espectro de RMN de ¹H da substância M16As54O (600 MHz, DMSO-d₆).



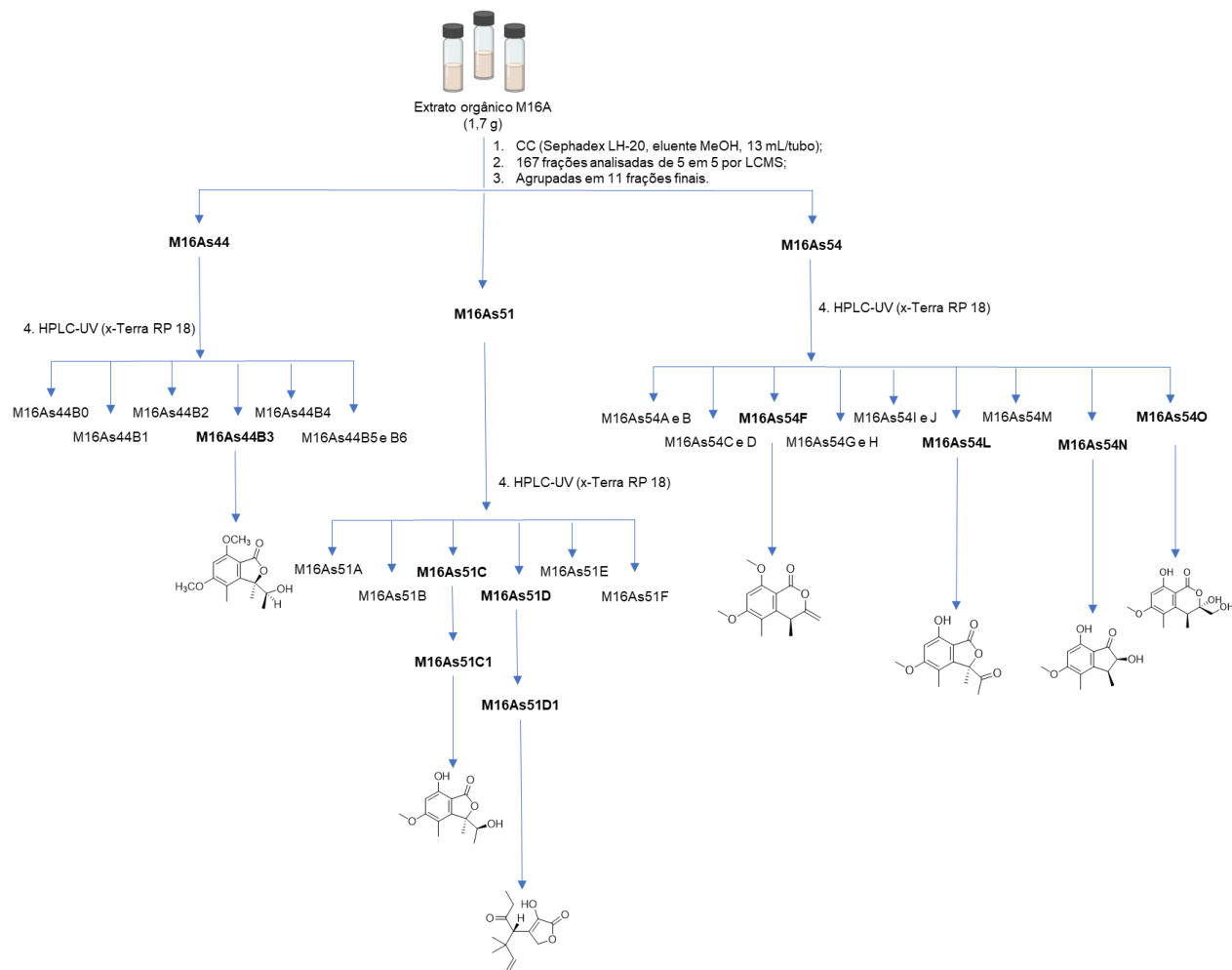
Fonte: A autora.

Tabela 13: Dados de RMN de ^1H da substância M16As54O (14,1 T).

	M16As54O (DMSO-d_6)	3,8-dihidroxi-3-hidroximetil-6- metoxi-4,5-dimetil-isocroman-1-ona (CDCl_3)*
Posição	δ_{H} (J in Hz)	δ_{H} (J in Hz)
1	-	-
3	-	-
4	3,26 (1H, q 7,1)	3,27 (1H, q 7,0)
4a	-	-
5	-	-
6	-	-
7	6,45 (1H, s)	6,39 (1H, s)
8	-	-
8a	-	-
9	3,71 (1H, dd 6,5 e 11,4) 3,62 (1H, dd 5,1 e 11,4)	4,12 (1H, d 11,9) 3,64 (1H, d 11,9)
10 CH_3	1,05 (3H, d 7,1)	1,15 (3H, d, 7,0)
11 CH_3	2,00 (3H, s)	2,08 (3H, s)
12 OCH_3	3,84 (3H, s)	3,86 (3H, s)
C-3 OH	7,12 (1H, s)	4,72 (3H, s)
C-8 OH	11,37 (s)	11,18 (s)
C-9 OH	5,29 (1H, t 5,6)	2,50 (s)

Fonte: A autora. * Tayone et al., 2011.

3.6.4 RESUMO DO FLUXO DE TRABALHO E IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS



Fonte: A autora. **Legenda:** A condição de purificação – M13As44 (HPLC-UV, coluna x-Terra, vazão 2,5 mL/min, eluição gradiente de 10-100% de MeOH:ACN (1:1, v/v) em 30 minutos monitorado em 237 e 279 nm); M13As51 (HPLC-UV, coluna x-Terra, vazão 2,5 mL/min, eluição gradiente de 16-100% de MeOH:ACN (1:1, v/v) em 30 minutos monitorado em 221 e 315 nm) e M16As54 (HPLC-UV, coluna x-Terra, vazão 2,5 mL/min e eluição gradiente de 30-80% de MeOH:ACN (1:1, v/v) em 30 minutos monitorado em 315 e 254 nm).

CAPÍTULO 4

CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

“Sempre me concentrei na pesquisa básica, motivada pelo desejo de entender o mundo.” (Jennifer Doudna)

Sumarizando os experimentos e os resultados obtidos para o projeto de elaboração de derivados da palitantina para a obtenção de análogos bioativos, inicialmente foi realizado um Planejamento Experimental Fatorial Fracionário (PEFF) com a finalidade de identificar a melhor condição de trabalho para a produção da palitantina. Logo, foi possível concluir que a temperatura de incubação do fungo é a variável que mais interfere na produção do composto. Assim, compreendeu-se como controlar o experimento para obter uma maior quantidade do produto desejado. Isso permitiu o crescimento do fungo *Geomyces* sp em escala ampliada para produzir uma quantidade suficiente de palitantina para a síntese de derivados e avaliação em ensaios biológicos.

A palitantina foi caracterizada por meio de análises de RMN, atribuindo configuração *E* às duplas ligações conjugadas e indicar a configuração relativa dos centros estereogênicos como configuração *S**. A redução da palitantina com redutores NaBH_4 e $\text{NaB}(\text{Ac})_3\text{H}$ permitiu a obtenção de dois estereoisômeros do palitanol, que foram isolados e caracterizados. O estudo revelou que o carbono 3 apresenta configuração *R** para o palitanol minoritário, enquanto o palitanol majoritário apresenta uma configuração relativa *S**.

Na segunda parte deste projeto, foram isolados compostos do meio de cultivo da linhagem fúngica *Peroneutypa* sp. M16, que envolveu diversas etapas: crescimento do fungo em escala ampliada, obtenção das frações orgânicas, envio para o ensaio biológico, posteriormente identificação dos micro-organismos, seleção das frações biologicamente ativas e por último o isolamento, purificação e caracterização dos compostos isolados.

Identificou-se sete substâncias, sendo duas delas (**40** e **43**) novas na literatura. Desse modo, o presente trabalho possibilitou desenvolver metodologias que contribuiu para a produção e isolamento de Produtos Naturais de origem fúngica com potencial biológico.

Entre as perspectivas futuras desses estudos incluem: avaliar os diastereoisômeros proveniente da palitantina em outros testes de bioensaio. As substâncias encontradas no projeto do capítulo 3 devem ser enviadas para análises de bioensaio. E por último, explorar as frações não estudadas do extrato bruto do meio de cultivo da linhagem, M16 e também isolar e caracterizar os metabólitos secundários dessas frações.

5 REFERÊNCIAS

- ABDEL-MAGID, A. F.; CARSON, K. G.; HARRIS, B. D.; MARYANOFF, C. A.; SHAH R. D. Reductive Amination of Aldehydes and Ketones with Sodium Triacetoxymethylborohydride. Studies on Direct and Indirect Reductive Amination Procedures¹. **The Journal of Organic Chemistry**, Washington, DC, v. 61, n. 11, p. 3849–3862, 1 jan. 1996.
- ARTYMOWICZ, M.; MACIOSZEK, S.; JACYNA, J. DAWIDOWSKA, J.; STRUCK-LEWICKA, W.; MARKUSZEWSKI, M. J.; SILUK, D. Development and optimization of modified nucleosides and deoxynucleosides simultaneous extraction with the use of Design of Experiments approach, **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, [s. l.], v. 21, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352554121000668>. Acesso em 1 jun. 2023
- BIRKINSHAW, J. H.; RAISTRICK, H. Studies in the biochemistry of micro-organisms. **Biochemical Journal**, [s. l.], v. 30, n. 12, p. 2194–2200, 1936. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1263326/>. Acesso em 1 jun. 2023
- BOOTH, H. The average coupling constants of protons on adjacent carbon atoms in mobile cyclohexane systems. **Tetrahedron**, Kidlington, v. 20, n. 10, p. 2211–2216, 1964.
- BOWDEN, K.; LYTHGOE, B.; MARSDEN, D. J. S. 330. The structure of palitantin. **Journal of the Chemical Society (Resumed)**, [s. l.], n. 0, p. 1662–1669, 1959. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/1959/jr/jr9590001662/unauth>. Acesso em 1 jun. 2023
- BUTLER, M. S.; ROBERTSON, A. A. B.; COOPER, M. A. Natural product and natural product derived drugs in clinical trials. **Nat. Prod. Rep.**, United Kingdom, v. 31, n. 11, p. 1612–1661, 2014.
- CARMARÁN, C. C.; ROMERO, A. I.; GIUSSANI, L. M. An approach towards a new phylogenetic classification in Diatrypaceae. **Fungal Diversity**, Kunming, P.R, v. 23, n. October 2006, p. 67–87, 2006.
- CHEMISTRY, O. Alcohols: Reactions and Synthesis 15.1. [s.l: s.n.].
- CHEN, L.; WANG, X. Y.; LIU, R. Z.; WANG, G. Y. Culturable Microorganisms Associated with Sea Cucumbers and Microbial Natural Products. **Marine drugs**, Basel, v. 19, n. 8, p. 1–21, ago. 2021.
- CHETHANA, K. W. T.; MANAWASINGHE, I. S.; HURDEAL, V. G.; BHUNJUN, C. S.; APPADOO, M. A.; GENTEKAKI, E.; RASPÉ, O.; PROMPUTTHA, I.; HYDE, K. D. What are fungal species and how to delineate them? **Fungal Diversity**, Kunming, P.R, v. 109, n. 1, 1 jul. 2021.
- CHINWORRUNGSEE, M.; KITTAKOOP, P.; ISAKA, M.; CHANPHEN, R.; TANTICHAROEN, M.; THEBTARANONTH, Y. Halorosellins A and B, unique

isocoumarin glucosides from the marine fungus *Halorosellinia oceanica*. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1**, London, n. 22, p. 2473–2476, 2002.

CHOPRA, B.; DHINGRA, A. K. Natural products: A lead for drug discovery and development. **Phytotherapy Research**, [s.l.], v. 35, p. 4660–4702, 2021. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ptr.7099>. Acesso em: 1 jun. 2023

CURTIS, P. J.; DUNCANSON, L. A. A structural relationship between frequentin and palitantin. **Biochemical Journal**, Bethesda, v. 51, n. 2, p. 276, 1952.

CURTIS, P. J.; HEMMING, H. G.; SMITH, W. K. Nature, Lond., 167, 557. *Doeuvre, J.*(1927). **Bull. Soc. chim. Fr.(iv)**, France, v. 41, p. 1145, 1951.

DE CAL, A.; SAGASTA, E. M.; MELGAREJO, P. Antifungal substances produced by *Penicillium frequentans* and their relationship to the biocontrol of *Monilinia laxa*. **Phytopathology**, [s.l.], v. 78, n. 7, p. 888-893, 1988. Disponível em: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19891123272>. Acesso em: 1 jun. 2023

DOMSCH, K. H.; GAMS, W.; ANDERSON, T. H. *Acremonium*. **Compendium of soil fungi**, London, v. 2, p. 30-38, 2007.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos: uma introdução a biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2a. ed. Caxias do Sul: EDUCS, 2010. 638p.

FISHER, R. A. The design of experiments. **The design of experiments.**, Edinburgh, n. 7th Ed, 1960.

GHOLAMI-SHABANI, M.; SHAMS-GHAHFAROKHI, M.; RAZZAGHI-ABYANEH, M. Natural product synthesis by fungi: recent trends and future prospects. **Recent Advancement in White Biotechnology Through Fungi: Volume 2: Perspective for Value-Added Products and Environments**, Switzerland, p. 195-228, 2019.

GOZARI, M.; BAHADOR, N.; JASSBI, A. R.; MORTAZAVI, M. S.; EFTEKHAR, E. Antioxidant and cytotoxic activities of metabolites produced by a new marine *Streptomyces* sp. isolated from the sea cucumber *Holothuria leucospilota*. **Iranian Journal of Fisheries Sciences**, Iran, v. 17, n. 2, p. 413–426, 2018.

HAMED, M. M.; GHAREEB, M. A.; SAAD, A. M.; ABDEL-AZIZ, M. S.; HADAD, A. H. Chemical Analysis, Antioxidant Activity and Antimicrobial Activity of Isolated Compounds and Essential Oil from *Callistemon citrinus* Leaf. **World Academy of Science, Engineering and Technology, International Journal of Medical and Health Sciences**, Tuguegarao City, v. 4, 2017.

HAYES, M. A. The geomyces fungi: Ecology and distribution. **BioScience**, Oxford, v. 62, n. 9, p. 819–823, 2012.

HUANG, X. S.; YANG, B.; SUN, X-F.; XIA, G-P.; LIU, Y-Y.; MA, L.; SHE, Z-G. A new polyketide from the mangrove endophytic fungus *penicillium* sp. sk14JW2P. **Helvetica Chimica Acta**, Zurich, v. 97, n. 5, p. 664–668, 2014.

HUITRIC, A. C.; CARR, J. B.; TRAGER, W. F.; NIST, B. J. Configurational and conformational analysis: Axial-axial and axial-equatorial coupling constants in six-membered ring compounds. **Tetrahedron**, Kidlington, v. 19, n. 12, p. 2145–2151, 1963.

HYDE, K. D. et al. The amazing potential of fungi: 50 ways we can exploit fungi industrially. **Fungal Diversity**, Kunming, P.R, v. 97, n. 1, p. 31, jul. 2019.

IÓCA, L. P. **Descoberta e estudos de biossíntese de peptídeos não-ribossomais envolvidos na motilidade de *Pseudovibrio brasiliensis* Ab134**. Orientador: Roberto Gomes de Souza Berlinck. 2020. Tese (Doutorado em Química Orgânica e Biológica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2020.

JANKOVIC, A.; CHAUDHARY, G.; GOIA, F. Designing the design of experiments (DOE) – An investigation on the influence of different factorial designs on the characterization of complex systems. **Energy and Buildings**, [s. l], [s. n], 2021.

Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037877882100582X>. Acesso em: 1 jun. 2023

KANG, Y.-H.; YANG, B.-T.; HU, R.-G.; ZHANG, P.; GU, M.; CONG, W. Gut Microbiota and Metabolites May Play a Crucial Role in Sea Cucumber *Apostichopus japonicus* Aestivation. **Microorganisms**, Basel, 2023.

KATZ, L.; BALTZ, R. H. Natural product discovery: past, present, and future. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 43, n. 2–3, p. 155–176, 1 mar. 2016.

KHOTIMCHENKO, Yuri. Pharmacological potential of sea cucumbers. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 19, n. 5, p. 1342, 2018.

LIU, F.-Z.; REN, J.-W.; TANG, J.-S.; LIU, X.-Z.; CHE, Y.-S.; YAO, X.-S. Cyclohexanone derivatives with cytotoxicity from the fungus *Penicillium commune*. **Fitoterapia**, [s. l] v. 87, p. 78-83, 2013. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0367326X13000798>. Acesso em: 1 jun. 2023

LIU, W.; LI, Q.; HU, J.; WANG, H.; XU, F.; BIAN, Q. Application of natural products derivatization method in the design of targeted anticancer agents from 2000 to 2018. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [s. l], v. 27, p. 1–8, 2019. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0968089619314993>. Acesso em: 1 jun. 2023

MAHAPATRA, T.; NANDA, S. Asymmetric synthesis of palitantin by an enzymatic and organocatalytic approach. **Tetrahedron: Asymmetry**, Kidlington, v. 20, n. 5, p. 610-615, 2009.

MAJHI, S.; DAS, D. Chemical derivatization of natural products: Semisynthesis and pharmacological aspects - A decade update. **Tetrahedron**, Kidlington, v. 78, p. 1–30, 8 jan. 2021.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 83, n. 3, p. 770–803, 27 mar. 2020.

OLA, A. R. B.; TAWO, B. D.; BELLI, H. L. L.; PROKSCH, P.; TOMMY, D.; HAKIM, E. H. A new antibacterial polyketide from the endophytic fungi *Aspergillus fumigati*affinis. **Natural Product Communications**, [s. l.], v. 13, n. 12, p. 1934578X1801301202, 2018. Disponível em: <https://www.cabdirect.org/globalhealth/abstract/20203419745>. Acesso em: 1 jun. 2023

OUELLETTE, R. J.; RAWN, J. D. **Organic chemistry study guide: Key concepts, problems, and solutions**. Elsevier, Amsterdam, 2014.

PANGESTUTI, R.; ARIFIN, Z. Medicinal and health benefit effects of functional sea cucumbers. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, [s. l.], v. 8, n. 3, p. 341–351, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S222541101730069X>. Acesso em: 1 jun. 2023

PEREIRA FILHO, E. R. **Planejamento fatorial em química: maximizando a obtenção de resultados**. São Carlos: EdUFSCar, 2021.

PROMPANYA, C.; DETHOUP, T.; GALES, L.; LEE, M.; PEREIRA, J. A. C.; SILVA, A. M. S.; PINTO, M. M. M.; KIJJOA, A. New polyketides and new benzoic acid derivatives from the marine sponge-associated fungus *Neosartorya quadricincta* KUFA 0081. **Marine Drugs**, Basel, v. 14, n. 7, p. 134, 2016.

RATEB, M. E.; EBEL, R. Secondary metabolites of fungi from marine habitats. **Nat. Prod. Rep.**, [s. l.], v. 28, n. 2, p. 290–344, 2011. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2011/np/c0np00061b/unauth>. Acesso em: 1 jun. 2023

SALLES, A. G.; DREKENER, R. L.; PASTRE, J. C. **Funções Orgânicas – Características, Propriedades e Reatividades**. Campinas: UNICAMP, 2016.

SANG, H. S.; SY, A. A.; GLOER, J. B.; WICKLOW, D. T. Isolation of an isocoumarin and an isobenzofuran derivatives from a fungicolous isolate of *Acremonium crocinigenum*. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, Korean, v. 29, n. 4, p. 863–865, 2008.

SCHULZ, B.; DRAEGER, S.; CRUZ, T. E.; RHEINHEIMER, J.; SIEMS, K.; LOESGEN, S.; BITZER, J.; SCHLOERKE, O.; ZEECK, A.; KOCK, I.; HUSSAIN, H.; DAI, J.; KROHN, K. Screening strategies for obtaining novel, biologically active, fungal secondary metabolites from marine habitats. **Botanica Marina**, New York, v. 51, n. 3, p. 219–234, 2008.

SHABANA, S.; LAKSHMI, K. R.; SATYA, A. K. An Updated Review of Secondary Metabolites from Marine Fungi. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 21, n. 5, p. 602–642, 2020. Disponível em:

<https://www.ingentaconnect.com/content/ben/mrmc/2021/00000021/00000005/art00007>. Acesso em: 1 jun. 2023

SHANG, Q.-J.; HYDE, K. D.; PHOOKAMSAK, R.; DOILOM, M.; BHAT, D. J.; MAHARACHCHIKUMBURA, S. S. N.; PROMPUTTHA, I. *Diatrypella tectonae* and *Peroneutypa mackenziei* spp. nov. (Diatrypaceae) from northern Thailand. **Mycological Progress**, Switzerland, v. 16, n. 4, p. 463–476, 2017.

SHIN, H. J. Natural Products from Marine Fungi. **Marine Drugs**, Basel, v.18, n.5, p. 230 2020.

SUN, P.; XU, D-X.; MÁNDI, A.; KURTÁN, T.; LI, T-J.; SCHULZ, B.; ZHANG, W. Structure, absolute configuration, and conformational study of 12-membered macrolides from the fungus *Dendrodochium* sp. associated with the sea cucumber *Holothuria nobilis* Selenka. **The Journal of organic chemistry**, Washington, DC, v. 78, n. 14, p. 7030–7047, jul. 2013.

TAKAHASHI, J. A.; LIMA, G. S.; DOS SANTOS, G. F.; LYRA, F. H.; DA SILVA-HUGHES, A. F.; GONÇALVES, F. A. G. Fungos Filamentosos e Química: Velhos Conhecidos, Novos Aliados. **Revista Virtual de Química**, Niterói, v. 9, n. 6, p. 2351–2382, 2017.

TAYONE, W.C.; KANAMARU, S.; HONMA, M.; TANAKA, K.; NEHIRA, T.; HASHIMOTO, M. Absolute stereochemistry of novel isochromanone derivatives from *Leptosphaeria* sp. KTC 727. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, Japan, v. 75, n. 12, p. 2390-2393, 2011.

TAYONE, W. C.; KANAMARU, S.; HONMA, M.; TANAKA, K.; NEHIRA, T.; HASHIMOTO, M. Stereochemical Investigations of Isochromenones and Isobenzofuranones Isolated from *Leptosphaeria* sp. KTC 727. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 74, n. 3, p. 425–429, 25 mar. 2011.

XIA, X.; LIU, X.; KOO, D. C.; SUN, Z.; SHIM, S. Chemical Constituents of *Fusarium* sp. Fungus Associated with Sea Cucumbers. **Chemistry of Natural Compounds**, Switzerland, v. 50, n. 6, p. 1103–1105, 2014.

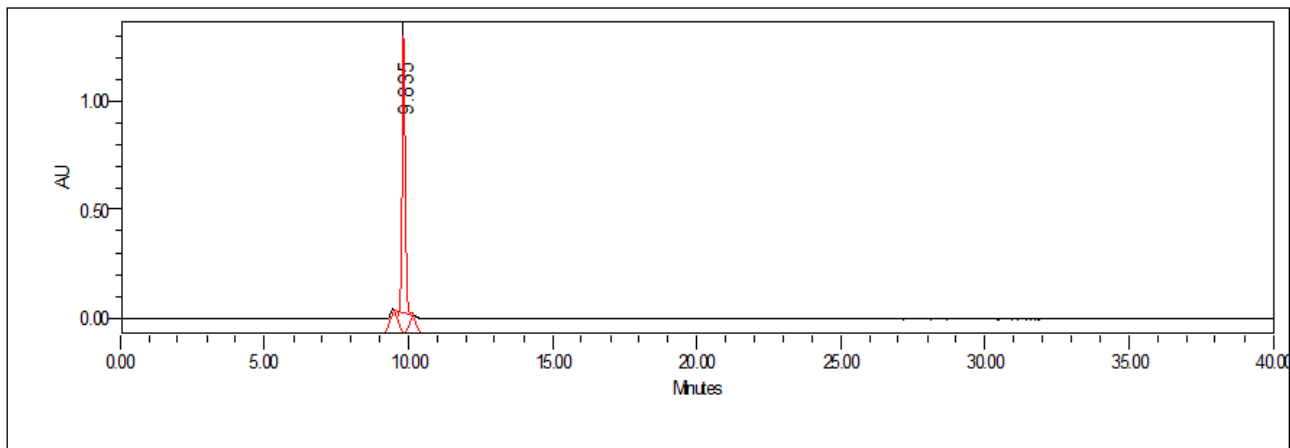
XU, D. X.; SUN, P.; KURTÁN, T.; MÁNDI, A.; TANG, H.; LIU, B.; GERWICK, W. H.; WANG, Z-W.; ZHANG, W. Polyhydroxy cyclohexanols from a *dendrodochium* sp. fungus associated with the sea cucumber *holothuria nobilis* selenka. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 77, n. 5, p. 1179–1184, 2014.

ZEYNIZADEH, B.; BEHYAR, T. Wet THF as a suitable solvent for a mild and convenient reduction of carbonyl compounds with NaBH₄. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, Japan, v. 78, n. 2, p. 307-315, 2005.

6 ANEXOS:

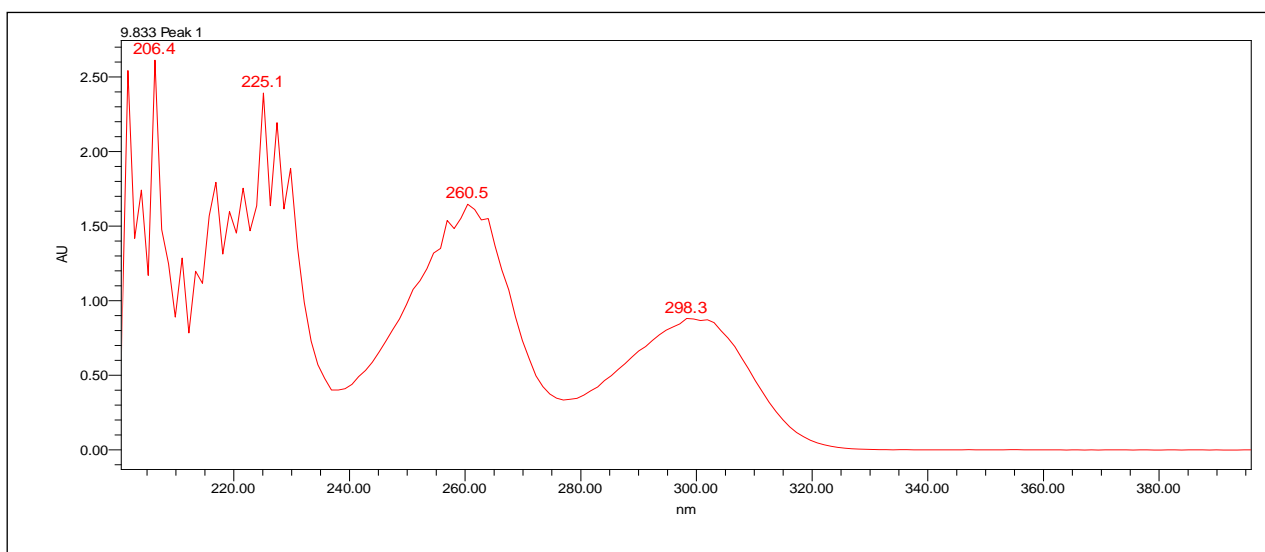
6.1 DADOS ESPECTROSCÓPICOS REFERENTE A M16As51C1

Figura 51: Cromatograma por HPLC-DAD monitorado em 254 nm.



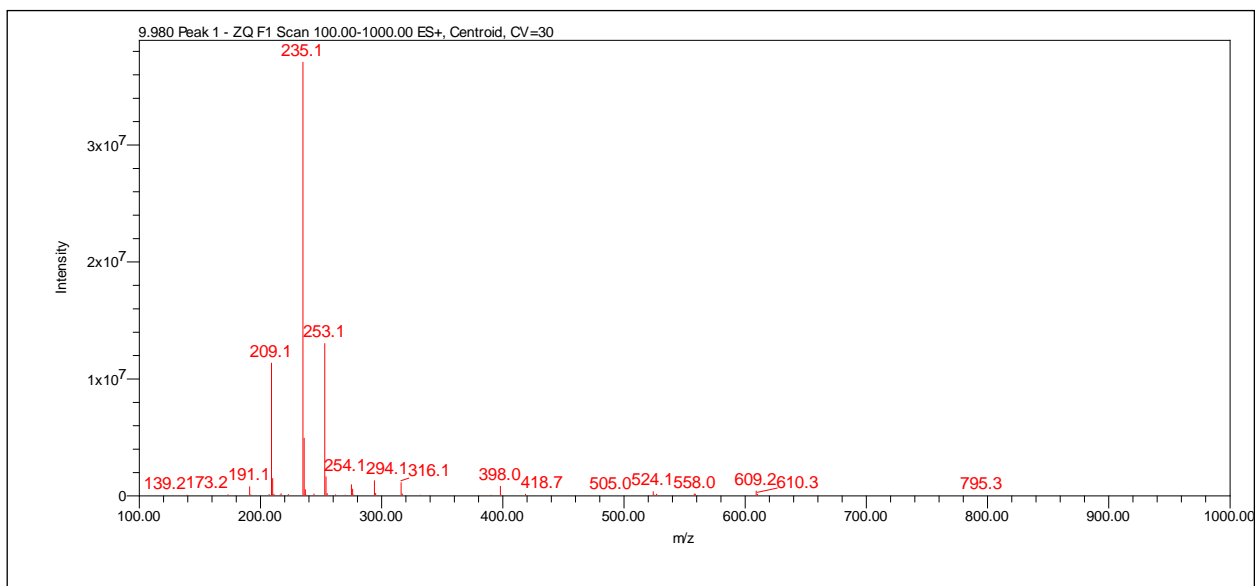
Fonte: A autora. Legenda: condição de análise – eluiu-se em modo gradiente de 10-100% de MeOH:MeCN (1:1) em 40 minutos.

Figura 52: Espectro de absorção na região do UV por HPLC-UV.



Fonte: A autora.

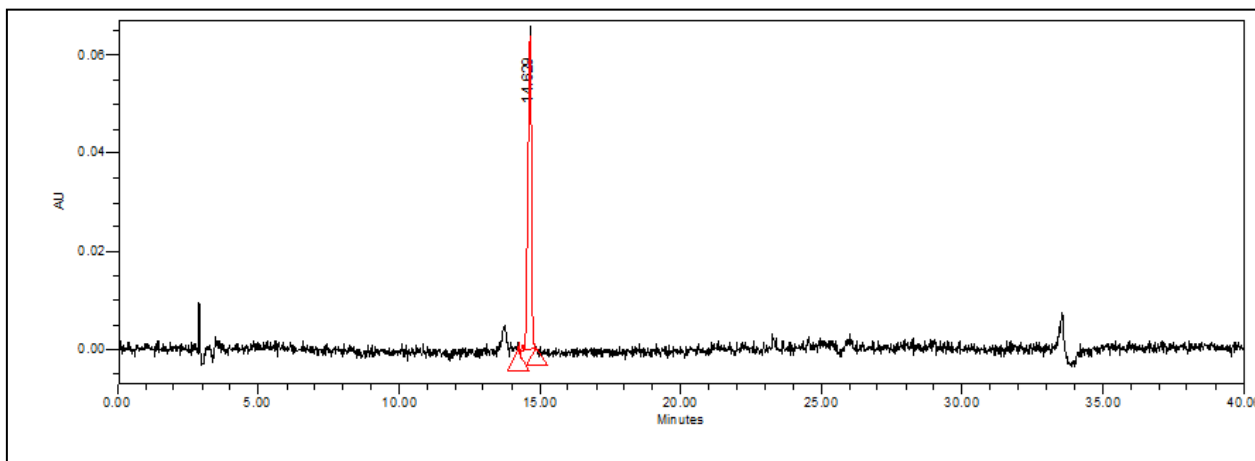
Figura 53: Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização.



Fonte: A autora.

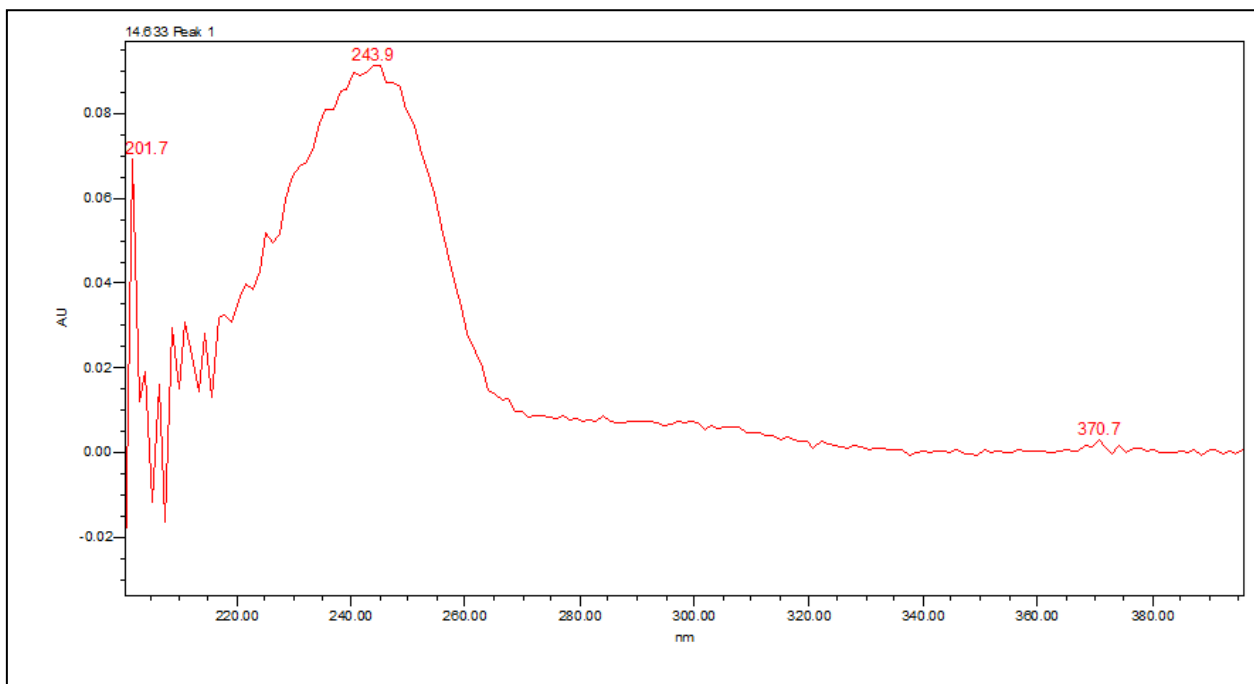
6.2 DADOS ESPECTROSCÓPICOS REFERENTE A M16As51D1

Figura 54: Cromatograma por HPLC-DAD monitorado em 254nm.



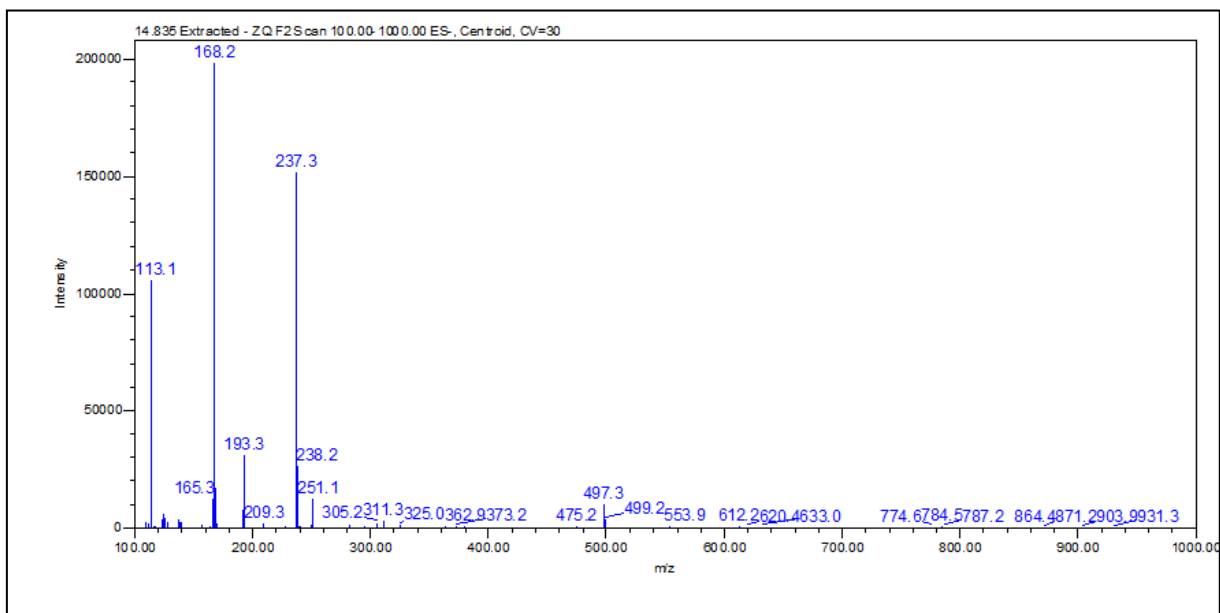
Fonte: A autora. Legenda: condição de análise – eluiu-se em modo gradiente de 10-100% de MeOH:MeCN (1:1) em 40 minutos.

Figura 55: Espectro de absorção na região do UV por HPLC-UV.



Fonte: A autora.

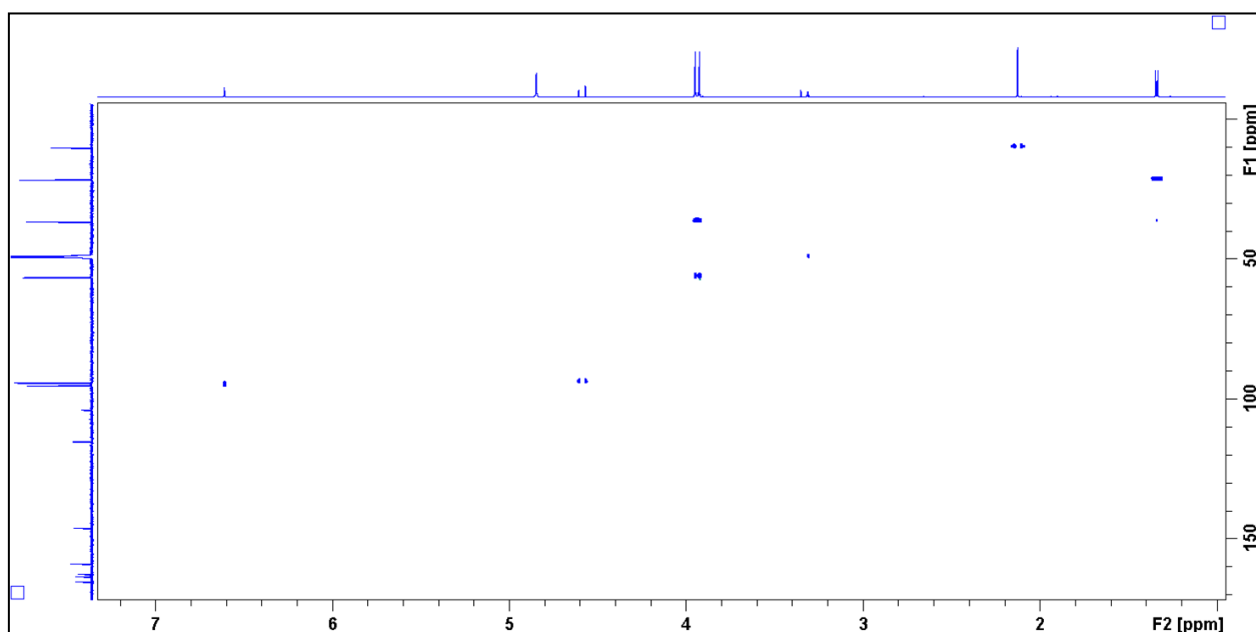
Figura 56: Espectro de ESI-MS em modo negativo de ionização.



Fonte: A autora.

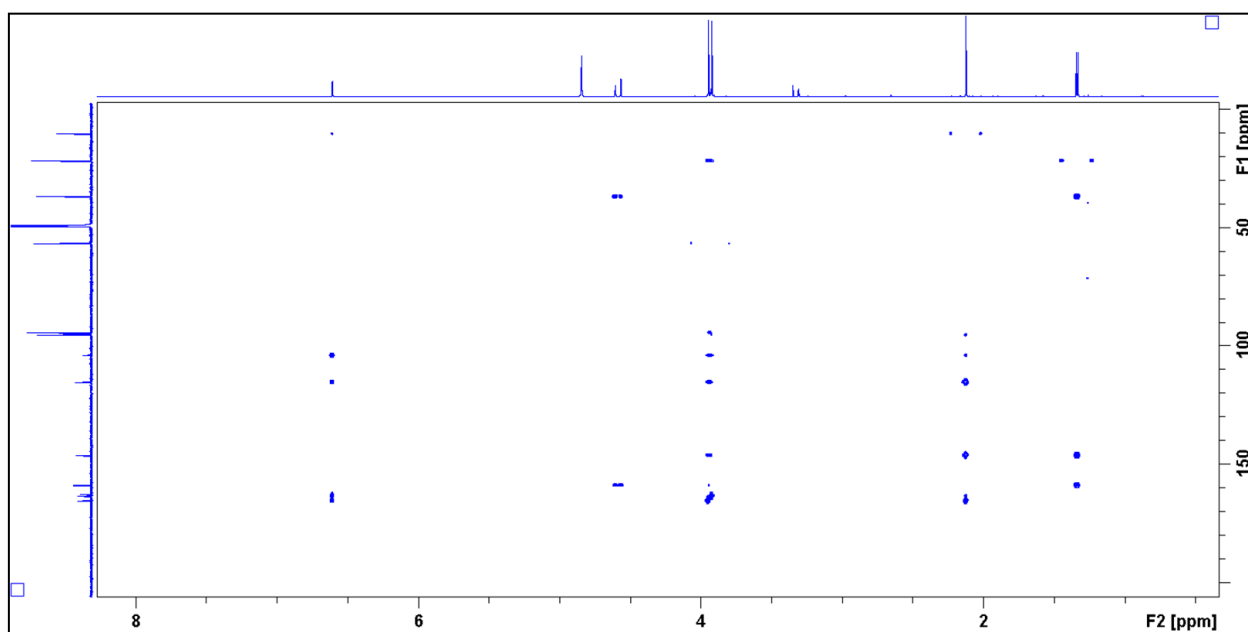
6.3 DADOS ESPECTROSCÓPICOS REFERENTE A M16As54F

Figura 57: Espectro de RMN de HSQC (14,1 T, CD₃OD).



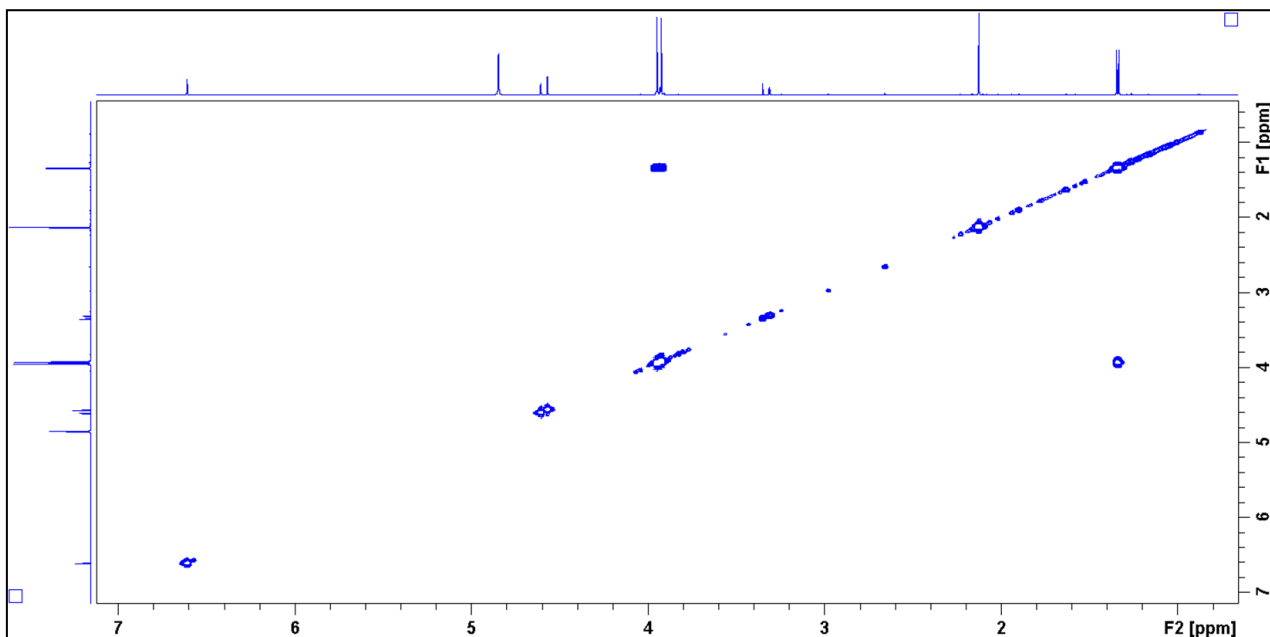
Fonte: A autora.

Figura 58: Espectro de RMN de HMBC (14,1 T, CD₃OD).



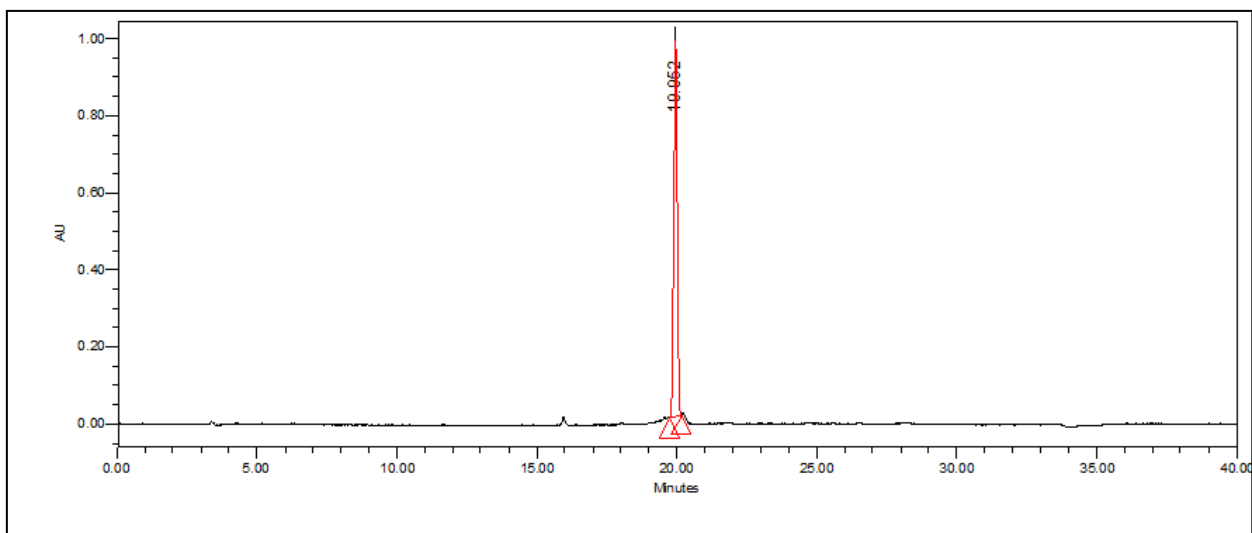
Fonte: A autora.

Figura 59: Espectro de RMN de COSY (14,1 T, CD₃OD).



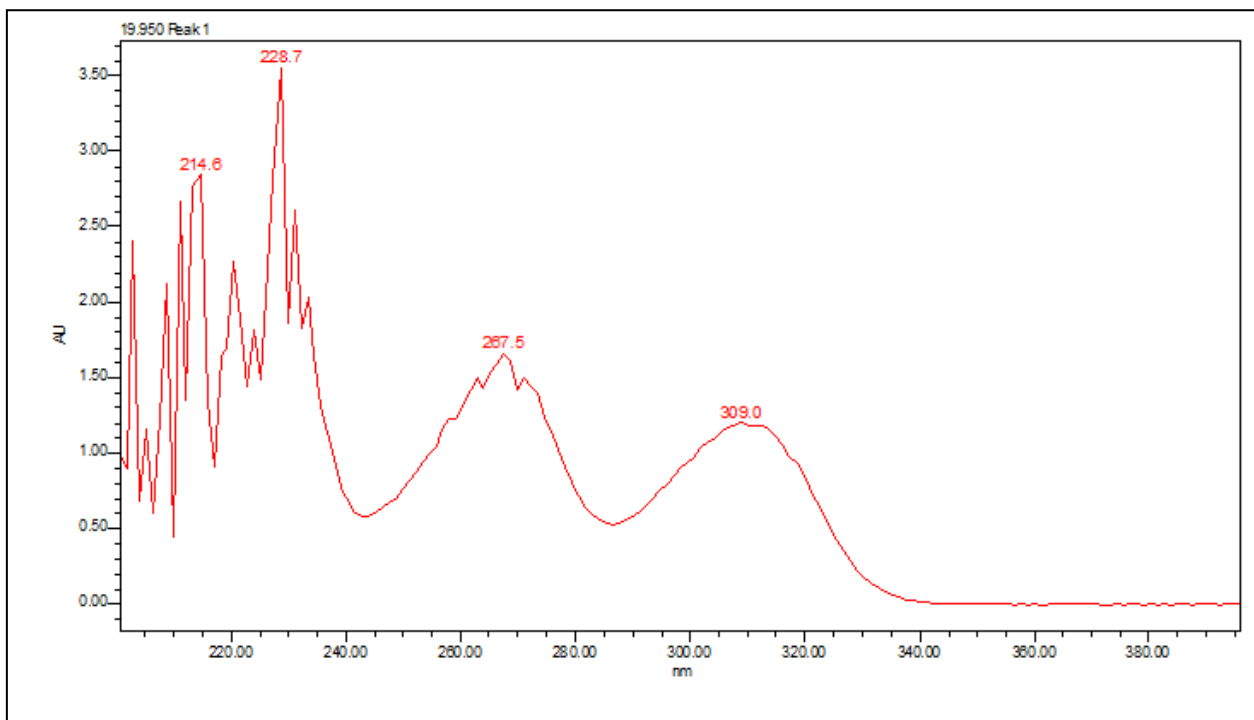
Fonte: A autora.

Figura 60: Cromatograma por HPLC-DAD monitorado em 254 nm.



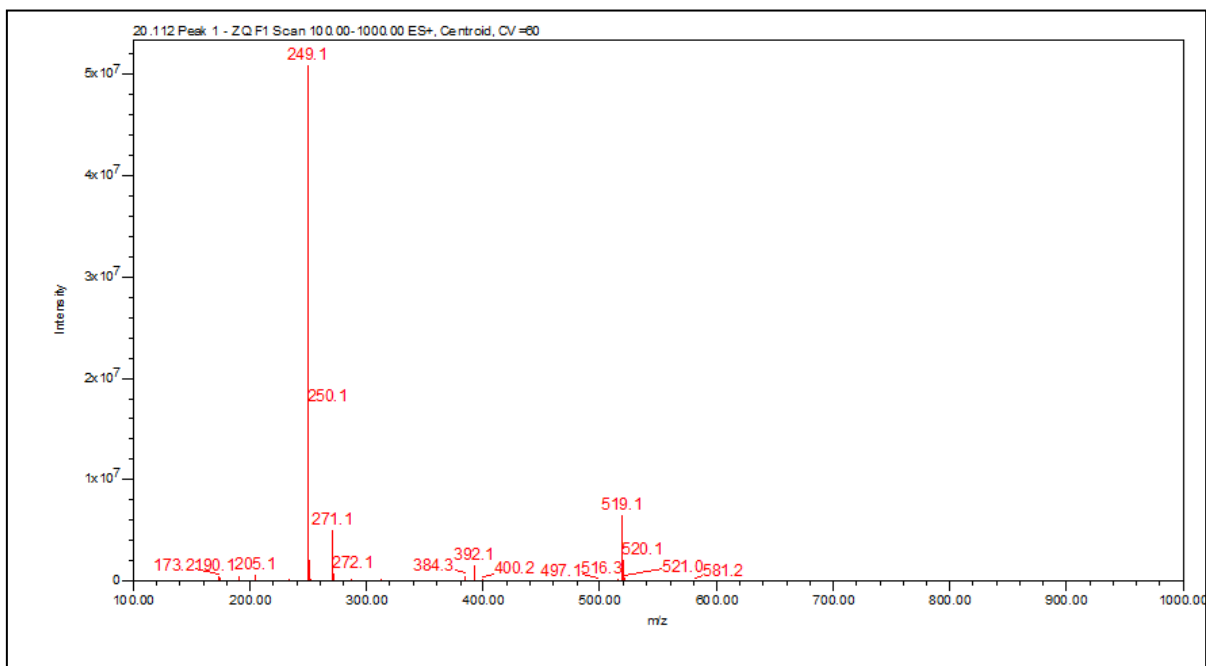
Fonte: A autora. Legenda: condição de análise – eluiu-se em modo gradiente de 10-100% de MeOH:MeCN (1:1) em 40 minutos.

Figura 61: Espectro de absorção na região do UV por HPLC-UV



Fonte: A autora.

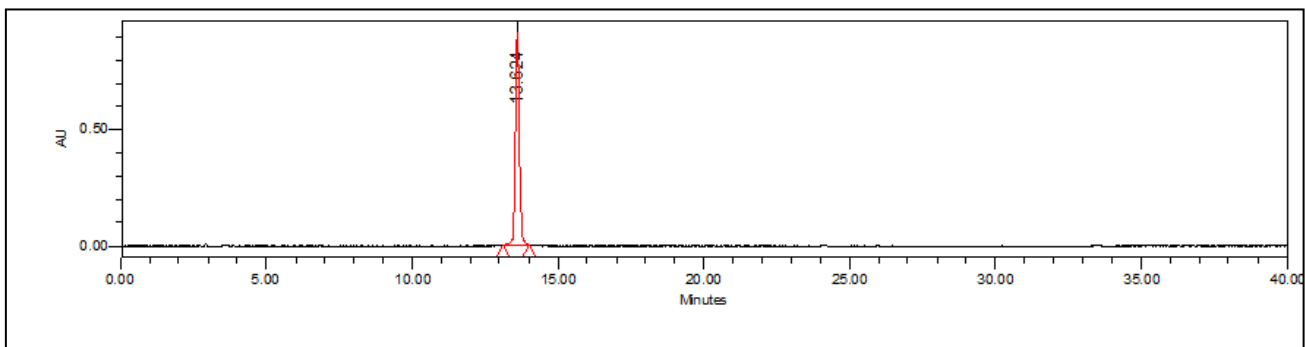
Figura 62: Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização.



Fonte: A autora.

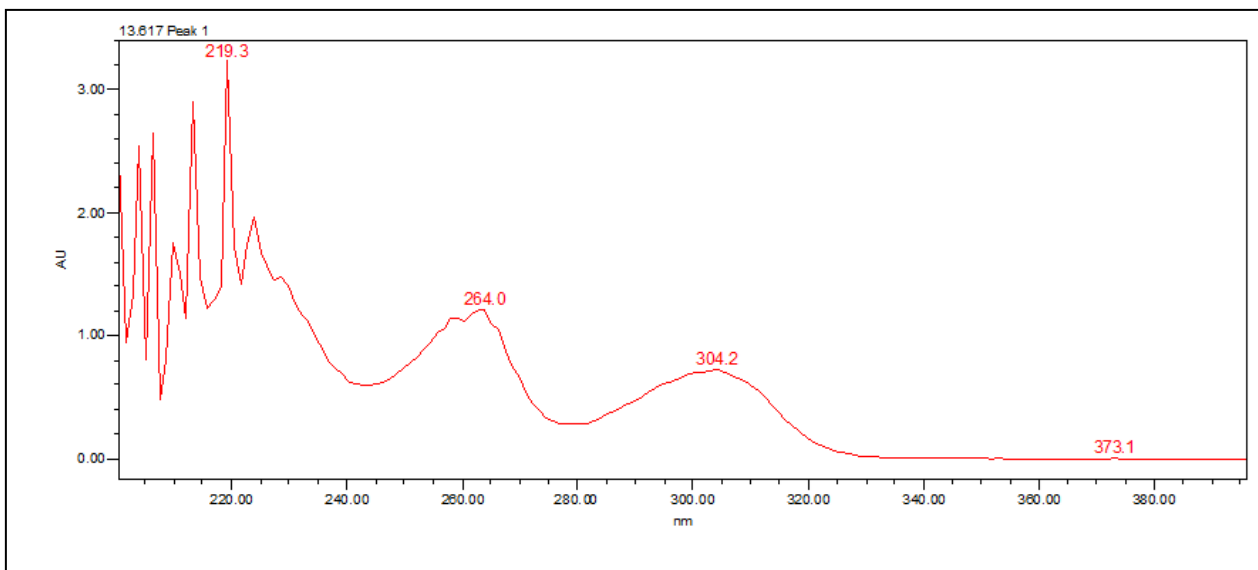
6.4 DADOS ESPECTROSCÓPICOS REFERENTE A M16As54L

Figura 63: Cromatograma por HPLC-DAD monitorado em 254 nm.



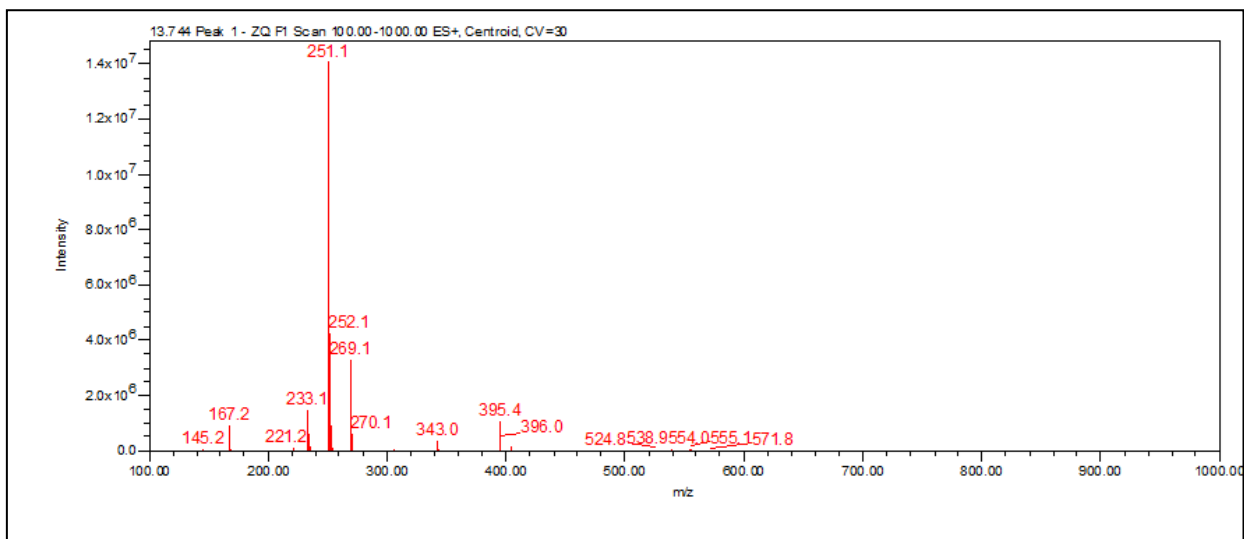
Fonte: A autora. Legenda: condição de análise – eluiu-se em modo gradiente de 10-100% de MeOH:MeCN (1:1) em 40 minutos.

Figura 64: Espectro de absorção na região do UV por HPLC-UV.



Fonte: A autora.

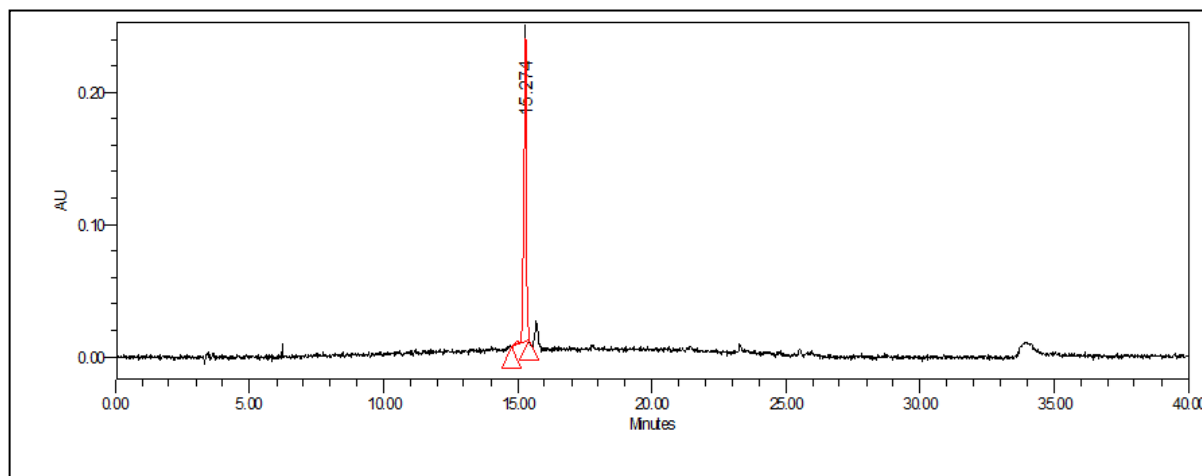
Figura 65: Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização.



Fonte: A autora.

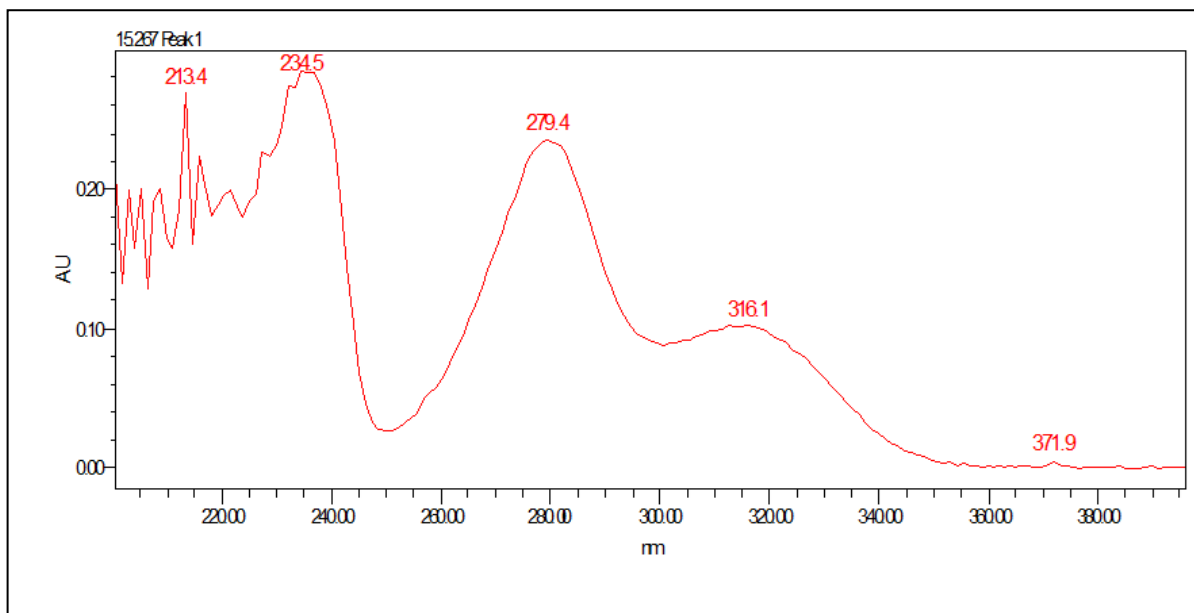
6.5 DADOS ESPECTROSCÓPICOS REFERENTE A M16As54N

Figura 66: Cromatograma por HPLC-DAD monitorado em 254nm.



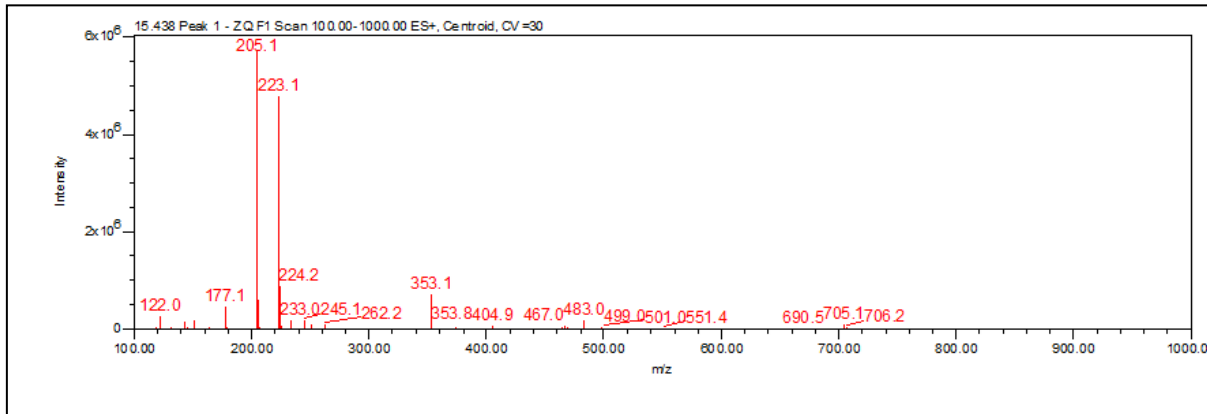
Fonte: A autora. Legenda: condição de análise – eluiu-se em modo gradiente de 10-100% de MeOH:MeCN (1:1) em 40 minutos.

Figura 67: Espectro de absorção na região do UV por HPLC-UV.



Fonte: A autora.

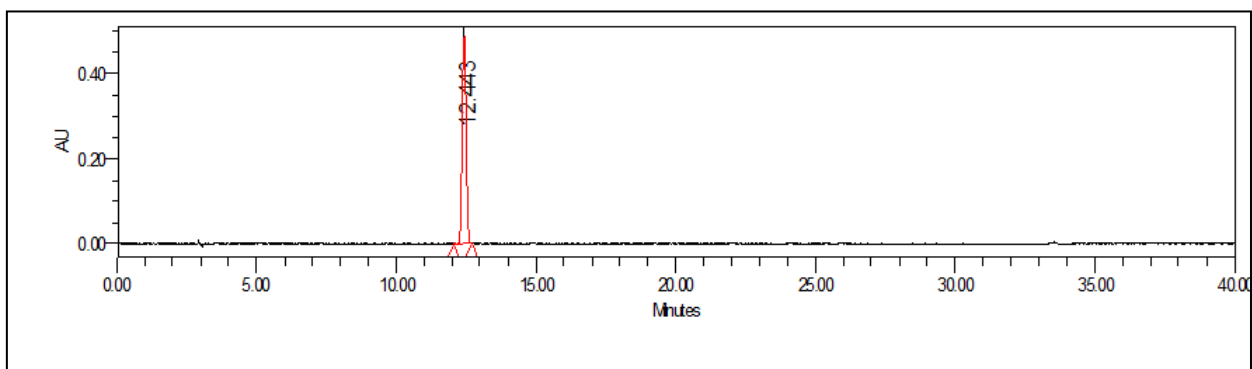
Figura 68: Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização.



Fonte: A autora.

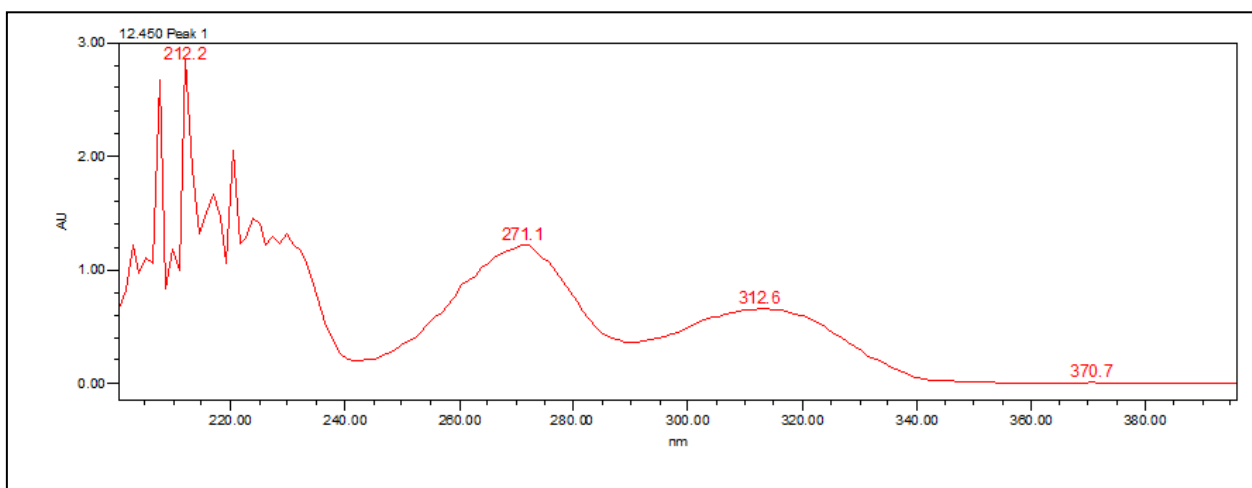
6.6 DADOS ESPECTROSCÓPICOS REFERENTE A M16As540

Figura 69: Cromatograma por HPLC-DAD monitorado em 254 nm.



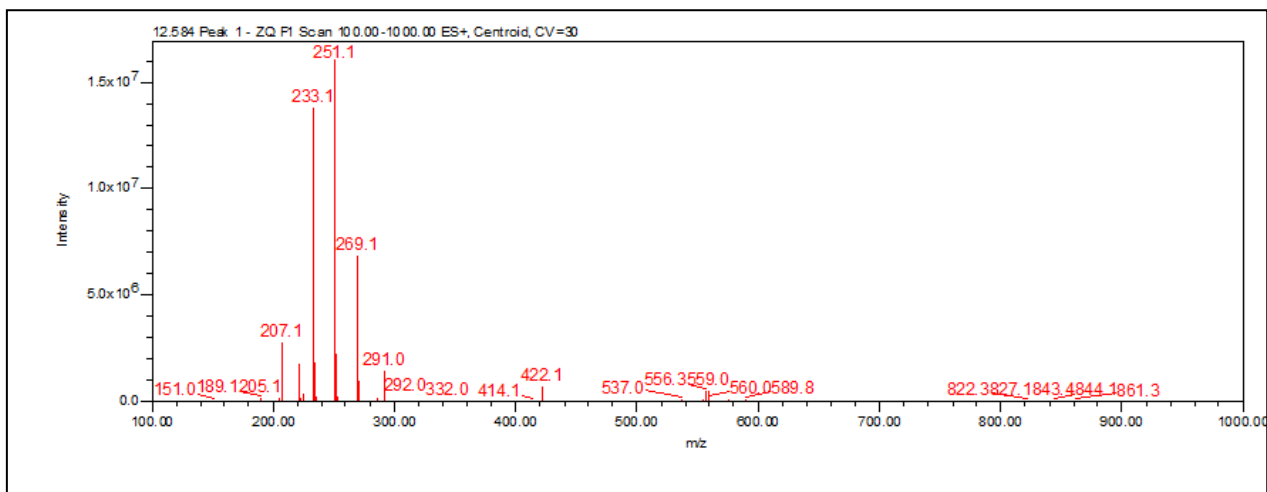
Fonte: A autora. **Legenda:** condição de análise – eluiu-se em modo gradiente de 10-100% de MeOH:MeCN (1:1) em 40 minutos.

Figura 70: Espectro de absorção na região do UV por HPLC-UV.



Fonte: A autora.

Figura 71: Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização.



Fonte: A autora.