

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 02/04/2020.

AFIF FELIX MONTEIRO

Perfil metabólico das raízes de *Senna spectabilis* e exploração de fungos associados à sua microbiota para produção e biotransformação de metabólitos secundários.

Tese apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Química

Orientador: Prof. Dr. Ian Castro-Gamboa

Araraquara - SP

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

M772p Monteiro, Afif Felix
Perfil metabólico das raízes de *Senna spectabilis* e
exploração de fungos associados à sua microbiota para
produção e biotransformação de metabólitos secundários /
Afif Felix Monteiro. – Araraquara : [s.n.], 2018
191 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química
Orientador: Ian Castro-Gamboa

1. Fungos do solo. 2. Microbiota. 3. Rizosfera. 4. Fungos
endofíticos. 5. Biotransformação (Metabolismo). I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: "Perfil metabólico das raízes de *Senna spectabilis* e exploração de fungos associados à sua microbiota para produção e biotransformação de metabólitos secundários"


AUTOR: AFIF FELIX MONTEIRO

ORIENTADOR: IAN CASTRO GAMBOA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em QUÍMICA, pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. IAN CASTRO GAMBOA
Departamento de Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara


Profª. Drª. ANGELA REGINA ARAUJO
Departamento de Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara


Profª. Drª. CINTIA DUARTE DE FREITAS MILAGRE
Departamento de Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara


Profª. Drª. MARIA FÁTIMA DAS GRAÇAS FERNANDES DA SILVA
Departamento de Química / Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia - UFSCAR - São Carlos


Profª. Drª. MÔNICA TALLARICO PUPO
Departamento de Ciências Farmacêuticas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP - Ribeirão Preto

Araraquara, 02 de abril de 2018

DADOS CURRICULARES

IDENTIFICAÇÃO

Nome: Afif Felix Monteiro

Nome em citações bibliográficas: Monteiro, A. F.; Monteiro, Afif F.; Monteiro, Afif Felix

ENDEREÇO PROFISSIONAL

Universidade Estadual Paulista - UNESP

Instituto de Química de Araraquara; Departamento de Química Orgânica, Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais – NuBBE. Rua Professor Francisco Degni, 55. Araraquara - SP, 14800-900, Brasil

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

2014 - atual Doutorado em Química

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil

Título: Perfil metabólico das raízes de *Senna spectabilis* e exploração de fungos associados à sua microbiota para produção e biotransformação de metabólitos secundários.

Orientador: Prof. Dr. Ian Castro-Gamboa

Bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES - Proc. nº 1427484)

2012 - 2014 Mestrado em Química

Universidade Federal de Goiás - Campus Catalão, UFG, Brasil.

Título: Estudo químico e avaliação do potencial efeito biológico das folhas e flores de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne (Fabaceae).

Orientadora: Profa. Dra. Vanessa Gisele Pasqualotto Severino

Bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

2016 - 2016 Graduação - Licenciatura em Química

Faculdade Associada Brasil, FAB, Brasil

2007 - 2011 Graduação - Bacharelado em Química

Universidade Federal de Goiás-Campus de Catalão, UFG-CAC, Brasil.

Título: Estudo Químico das Folhas de *Hymenaea stigonocarpa* (Fabaceae).

Orientador: Profa. Dra. Vanessa Gisele Pasqualotto Severino.

Bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

2017 - 2017 Aplicação da espectrometria de massas em interações ecológicas (Duração: 8h).

9ª Reunião do Programa BIOTA-FAPESP, São Pedro, Brasil.

2017 - 2017 Métodos de isolamento e caracterização de fungos filamentosos. (Duração: 8h).

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

2016 - 2016 Didática aplicada (Duração: 12h).

Instituto Phorte Educação, IPE, Brasil.

2016 - 2016 Políticas educacionais. (Duração: 12h).

Instituto Phorte Educação, IPE, Brasil.

REVISOR DE PERIÓDICO

2017 - atual Natural Product Research (ISSN: 1478-6419)

Impact factor (JCR 2016): 1.828

Editora: Taylor & Francis

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Artigos completos publicados em periódicos

1. MONTEIRO, AFIF F.; SEIDL, CLÁUDIA ; SEVERINO, VANESSA G. P. ; CARDOSO, CARMEN LÚCIA ; CASTRO-GAMBOA, IAN . Biotransformation of labdane and halimane diterpenoids by two filamentous fungi strains. **Royal Society Open Science**, v. 4, p. 170854, 2017.

2. SELEGATO, DENISE ; MONTEIRO, AFIF ; VIEIRA, NATÁLIA ; CARDOSO, PATRÍCIA ; PAVANI, VICTOR ; BOLZANI, VANDERLAN ; CASTRO-GAMBOA, IAN . Update: Biological and Chemical Aspects of *Senna spectabilis*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, p. 415-426, 2016.
3. MONTEIRO, AFIF F.; BATISTA, JOÃO M. ; MACHADO, MICHELLE A. ; SEVERINO, RICHELE P. ; BLANCH, EWAN W. ; BOLZANI, VANDERLAN S. ; VIEIRA, PAULO C. ; SEVERINO, VANESSA G. P. . Structure and Absolute Configuration of Diterpenoids from *Hymenaea stigonocarpa*. **Journal of Natural Products**, v. 78, p. 1451-1455, 2015.
4. SEVERINO, VANESSA GISELE PASQUALOTTO ; MONTEIRO, AFIF FELIX ; SILVA, MARIA FÁTIMA DAS GRAÇAS F. DA ; LUCARINI, RODRIGO ; MARTINS, CARLOS HENRIQUE GOMES . Chemical study of *Hortia superba* (Rutaceae) and investigation of the antimycobacterial activity of crude extracts and constituents isolated from *Hortia* species. **Química Nova**, v. 38, p. 42, 2014.

Resumos expandidos publicados em anais de congressos

1. CAIXETA NETA, A. ; MONTEIRO, A. F.; SEVERINO, R. P. ; SEVERINO, V. G. P. . Estudo químico e avaliação do potencial efeito biológico do extrato das flores de *Hymenaea stigonocarpa*. In: CONPEEX, 2015, Goiânia. Anais do XII Congresso de Pesquisa, Ensino e Extensão - CONPEEX (2015), 2015. p. 49-50.

Resumos publicados em anais de congressos

1. MONTEIRO, A. F.; SEIDL, C. ; SEVERINO, V. G. P. ; CARDOSO, C. L. ; CASTRO-GAMBOA, I. . Biotransformation of diterpenoids by filamentous fungi strains. In: 6th Brazilian Conference on Natural Products, 2017, Vitória - ES. 6th Brazilian Conference on Natural Products, 2017.
2. SIMOES, L. V. ; MONTEIRO, A. F. ; RIGHETTO, G. M. ; CAMARGO, I. L. B. C. ; CASTRO-GAMBOA, I. . Clindamycin fungal biotransformation aimed analogues with pharmacologic potential. In: 6th Brazilian Conference on Natural Products, 2017, Vitória - ES.
3. STIVAL, A. C. S. ; COSTA, E. T. S. ; MONTEIRO, A. F. ; AMBROSIO, M. A. L. V. ; MARTINS, C. H. G. ; SEVERINO, V. G. P. . LC-MS-based profile and antibacterial activity of the ethanolic extract from *Hymenaea stigonocarpa* leaves (Fabaceae). In: 6th Brazilian Conference on Natural Products, 2017, Vitória - ES.
4. GAMA, B. T. A. F. ; COSTA, E. C. C. ; KATO, L. ; RIBEIRO, R. I. M. A. ; SANTOS, K. M. ; AZEVEDO, L. S. ; MONTEIRO, A. F. ; SEVERINO, V. G. P. . LC-MS Fingerprint Profile, Chemical Study and Antitumor Activity of Roots from

Kielmeyera coriacea (Calophyllaceae). In: 6th Brazilian Conference on Natural Products, 2017, Vitória - ES.

5. SEVERINO, V. G. P. ; MONTEIRO, A. F. ; BATISTA, JOÃO M. . Application of Raman Optical Activity (ROA) to determine the absolute configuration of diterpenoids from *Hymenaea stigonocarpa*. In: 6th EuCheMS Chemistry Congress, 2016, Sevilha.
6. SIMOES, L. V. ; CASTRO-GAMBOA, IAN ; MONTEIRO, A. F. . Estudo metabolômico das raízes e sementes de *Senna spectabilis*. In: XXVIII Congresso de Iniciação Científica, 2016, Araraquara.
7. MONTEIRO, A. F.; BARBOSA, L. S. ; SEVERINO, R. P. ; VIEIRA, Paulo Cezar ; SEVERINO, V. G. P. . Evaluation of secondary metabolites isolated from *Hymenaea stigonocarpa* (Fabaceae) as inhibitors of cathepsins K, L and V. In: 7th Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry, 2014, Campos do Jordão.
8. MAGALHAES, L. F. ; DEMOND, K. A. ; FARIA, R. S. ; MONTEIRO, A. F. ; SEVERINO, V. G. P. ; VIEIRA, Paulo Cezar ; LACERDA, E. P. S. . Determination of cytotoxicity and inhibition of cathepsin L of extracts, fractions and isolated *Hymenaea stigonocarpa* in tumor and non-tumorigenic strains. In: Brazilian Symposium on Chemistry and Physiology of Proteases and their Inhibitors, 2014, São Carlos.

Citações em bases bibliográficas

Web of Science Total de trabalhos: 4 Total de citações: 9 Fator H: 2
(27/03/2018)

Scopus Total de trabalhos: 4 Total de citações: 9 (27/03/2018)

PARTICIPAÇÕES EM EVENTOS CIENTÍFICOS

1. 6th Brazilian Conference on Natural Products, Vitória - ES. 6th Brazilian Conference on Natural Products, 2017.
2. 9^a Reunião de Avaliação do PROGRAMA BIOTA-FAPESP, São Pedro - SP, 2017.
3. International School on Vibrational Chiroptical Spectroscopy - ISVCS, São Carlos - SP, 2016.
4. 1st UNESP NMR Symposium - Recent Advances in NMR, Araraquara - SP, 2014.

SUPERVISÃO CIENTÍFICA

2015 - 2015 Aluna: Laura Vilar Simões.

Título: Estudos metabolômicos das raízes de *Senna spectabilis*.
Iniciação Científica.

Graduanda em Engenharia Química - Universidade Estadual Paulista
Júlio de Mesquita Filho

Bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e
Tecnológico (CNPq)

Dedico este trabalho a:

Cirene Rodovalho Felix

Adélcio Felix Monteiro

Renata Felix Monteiro

Regina Felix Monteiro

Alencar Felix Monteiro

Adolfo Felix Monteiro

Alejandro Felix Monteiro

Deniun A. Cobaisse

Fernando Petacci (*In memoriam*)

Richele Priscila Severino

Vanessa G. P. Severino

Paulo Cezar Vieira

Elaine Rosechrer Carbonero

Ian Castro-Gamboa

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e irmãos pelo apoio, principalmente durante o início do meu doutorado, e por terem me incentivado sempre a seguir esta carreira.

Ao professor Ian pela receptividade calorosa, orientação, motivação, ensinamentos, profissionalismo e por todos os esforços envidados ao longo desses quatro anos.

Aos técnicos do IQ-UNESP pelo suporte, em especial aos Drs. Nivaldo Boralle e Lucinéia Vizotto Marconcini, pela competência e eficiência na realização dos experimentos de RMN. À Dra. Juliana Rodrigues e ao MSc. João Luiz Bronzel Júnior, pela prestatividade e pró-atividade frente aos laboratórios do NuBBE. À secretária do NuBBE, Vilma A. Pestana, pelo suporte. Aos Drs. Naira Canevarolo Pesquero e Alberto Camilo Alécio pelo auxílio nas análises de Infravermelho realizadas neste período.

Aos professores Dra. Carmen Lúcia Cardoso (FFCLRP-USP), Dra. Leticia V. C. Lotufo (ICB-USP) e Dra. Ilana L. B. C. Camargo (IFSC-USP) pela colaboração e realização dos ensaios biológicos. Ao prof. Dr. Norberto Peporine Lopes (FCFRP-USP) pela realização de análises de espectrometria de massas e ao prof. Dr. Antônio G. Ferreira (UFSCar) pela realização de análises de RMN. Ao prof. Dr. João M. B. Júnior (UNIFESP) pela colaboração na realização de experimentos quirópticos realizados neste período. À profa. Dra. Isabele R. Nascimento (UNESP) e à MSc. Camila L. Cunha pela realização de leituras de atividade óptica.

Aos professores do DQO-IQ pelas disciplinas ministradas, que contribuíram para minha formação: Dr. Alberto J. Cavalheiro, Dra. Angela R. Araújo, Dra. Dulce H. S. Silva, Dr. Humberto M. S. Milagre, Dra. Isabele R. Nascimento, Dra. Lúcia M. X. Lopes, Dra. Lourdes C. dos Santos e Dr. Ian Castro-Gamboa.

Aos alunos de iniciação científica que colaboraram com o trabalho: Laura Vilar Simões e Alex Cruz.

À Dra. Andressa Somensi pelo acompanhamento no cultivo de microrganismos durante o início do trabalho.

Aos colegas e amigos do NuBBE e do DQO, em especial à Alene, Rafael Vieira, Raquel Sabará, Luciano, Natália, Alan, Victor, Patrícia, Denise, Richard, Fausto e Rafael Freire.

Ao Instituto de Química da UNESP-CAr e ao NuBBE.

À CAPES pela bolsa concedida (nº proc. 1427484), ao CNPq (449523/2014-4) e a FAPESP (CIBFar 2013/07600-3) pelos auxílios financeiros.

"However bad life may seem, there is always something you can do and succeed at. Where there's life, there's hope"

Stephen Hawking

RESUMO

Neste trabalho, analisou-se o perfil químico do extrato etanólico das raízes de mudas adultas de *S. spectabilis* por meio da aplicação da técnica de CLAE-EM e CLAE-EM/EM, permitindo observar a predominância de alcaloides piperidínicos, bem como de metabólitos de outras classes biossintéticas, incluindo triterpenoide pentacíclico (PT), antraquinonas, flavonas e esteroide. O fracionamento do extrato proporcionou o isolamento e a subsequente elucidação estrutural via técnicas de EM e RMN, de cinco metabólitos secundários: os alcaloides espectralina e cassina; o TP ácido betulínico; o ácido tetradecanoico; e um novo dibenzofurano, o qual consiste no primeiro relato de sua respectiva classe biossintética para *S. spectabilis*, bem como para o gênero *Senna*. Essas classes de quimiotipos possuem propriedades estruturais e bioatividades de reconhecido interesse para química medicinal. Nesse contexto, dado ao grande potencial de micróbios associados a plantas medicinais, realizou-se o cultivo de fungos endofíticos e da microbiota relacionada à rizosfera de *S. spectabilis*, em diferentes meios de cultivo (CZAPEK, Malte e PDB). Os extratos obtidos foram analisados por CLAE-DAD e submetidos a triagem em ensaios antibacterianos. Entre os extratos ativos promissores, o extrato de *Fusarium solani* em Malte (*FsM*) foi selecionado e fracionado por CLAE semipreparativa, fornecendo a lactona β -resorcílica (-)-(2*R*^{*}, 4*S*^{*}, 8*R*^{*})-(Z)-pochonina N, a qual encontra-se em fase de avaliação biológica, e o ácido carboxílico β -lactônico hymeglusina, um composto cujo o potencial antibiótico é bem conhecido. O extrato *FsM* foi, ainda, analisado por CLAE-EM/EM e os dados gerados foram tratados utilizando-se a abordagem de “redes de interações moleculares” através da plataforma GNPS, propiciando a identificação de onze metabólitos adicionais, entre os quais prevalece a classe de dicetopiperazinas. Esses resultados indicam que a microbiota de *S. spectabilis* constitui uma fonte rica para a produção de metabólitos com uma ampla diversidade estrutural e, conseqüentemente, capazes de desempenhar uma gama de funções biológicas. Por fim, investigou-se a capacidade de biotransformação de um substrato diterpenoide (esqueleto halimano) pelos fungos *Fusarium oxysporum*, *Myrothecium verrucaria* e *Rhinochadiella similis*, os quais forneceram sete análogos estruturais oxifuncionalizados, promovendo a biocatálise de reações notáveis, como a oxidação de ligações C-H *sp*³ não ativadas em posições específicas dos anéis da decalina, bem como a hidratação da ligação dupla-13,14 C-C da cadeia lateral. Essas modificações geraram novas funcionalidades (hidroxi, oxo, formil e carboxi), as quais correspondem a novos sítios reativos e, portanto, podem permitir o alcance de um número maior de análogos estruturais de relevância não apenas química, mas também biológica. O substrato e seus produtos de biotransformação foram avaliados quanto a atividade citotóxica contra as linhagens celulares HCT-116 (carcinoma cólon-retal) e MCF-7 (adenocarcinoma mamário), porém apenas o derivado 19-hidroxi desempenhou inibição intensificada frente às linhagens, em 50 μ M. Portanto, estes microrganismos se mostraram fontes enzimáticas prolíficas para a oxidação/redução de diterpenoides com baixa reatividade, revelando um potencial praticamente inexplorado de fungos endofíticos e rizosféricos de *Senna spectabilis* para a transformação microbiana de outros substratos naturais e ou sintéticos.

Palavras-chave: Fungos do solo, microbiota, rizosfera, fungos endofíticos, biotransformação (metabolismo).

ABSTRACT

This work describes the chemical profiling of the ethanolic extract from roots (ER) of *Senna spectabilis*' seedlings by HPLC-HR-ESI-MS and HPLC-IT-MS/MS. This approach allowed observing the prevalence of piperidine alkaloids, as well as metabolites belonging to other biosynthetic classes, including pentacyclic triterpene (PT), anthraquinones, flavones, and steroid. The fractionation of ER provided the isolation, and then the structural elucidation through MS and NMR-based techniques, of five secondary metabolites: piperidine alkaloids spectaline and casine, PT betulinic acid, tetradecanoic acid, and a new dibenzofuran. The dibenzofuran compound comprises the first report of its class for *S. spectabilis*, and therefore for *Senna* genus. These chemotypes possess outstanding chemical and bioactive properties for application in medicinal chemistry. In this context, the great potential of plant-associated microbes motivated the cultivation of endophytic and rhizosphere fungi belonging to *S. spectabilis* microbiota to be performed in different cultivation media (CZAPEK, Malt, and PDB). The resulting extracts were analyzed by HPLC-DAD and subjected to screening in antibacterial assays. The Malt extract of *Fusarium solani* (FsM), one of the active ones, was fractionated by semi-preparative HPLC, affording the β -resorcylic lactone (-)-(2*R**, 4*S**, 8*R**)-(*Z*)-pochonin N, which is currently being assayed for antibacterial activity, together with the β -lactonic carboxylic acid hymeglusin, a well-known compound for its antibiotic potential. FsM was further analyzed by HPLC-IT-EM/EM and the data were treated applying the molecular networking approach through GNPS platform, allowing the identification of eleven additional metabolites, including diketopiperazines predominantly. These results indicate that *S. spectabilis*' microbiota comprises a rich source for production of metabolites exhibiting a wide range of structural diversity and, consequently, able to display a variety of bioactivities. Finally, it was investigated the fungal capability of *Fusarium oxysporum*, *Myrothecium verrucaria*, and *Rhinocladiella similis*, to biotransform a diterpenoid substrate (halimane skeleton). These fungi provided seven oxifunctionalized analogs by biocatalysing noteworthy reactions: oxidation of non-activated sp^3 C-H bonds, as well as hydration of the C-C 13,14-double bond from the side-chain. The new generated (hydroxyl, oxo, formil and carboxy) functionalities correspond to new active sites and can allow a further number of structural derivatives to be obtained, not only for chemical but also for biological purposes. The substrate and its bioproducts were accessed for cytotoxic activities against the tumor cell lines HCT-116 e MCF-7 however, only compound 19-hydroxi displayed some enhanced inhibition to both cells, in [50 μ M]. Therefore, the abovementioned microorganisms proved to be prolific enzymatic sources for the oxidation/reduction towards weakly reactive diterpenoids, revealing, an untapped potential from endophytes and rhizosphere microorganisms for the transformation of natural and or synthetic substrates.

Keywords: Soil fungi, microbiota, rhizosphere, endphytic fungi, biotransformation (metabolism).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fármacos derivados de compostos líderes baseados na medicina tradicional.....	27
Figura 2 - Fármacos baseados em moléculas pequenas, aprovados no período de 1981-2014; n = 1211.	30
Figura 3 - Fármacos baseados em moléculas pequenas, aprovados por fonte/ano.	30
Figura 4 - Total de fármacos aprovados/ano.	30
Figura 5 - A espécie <i>Senna spectabilis</i> (Fabaceae).	36
Figura 6 - Estruturas de alcaloides piperidínicos isolados de <i>S. spectabilis</i>	38
Figura 7 - Modelo estrutural para inibidores de AChE.	38
Figura 8 - Metodologia de preparo do extrato etanólico.	40
Figura 9 - Cromatograma do extrato ER em escala analítica ($\lambda = 254$ nm).	43
Figura 10 - Cromatograma do extrato ER em escala semipreparativa ($\lambda = 254$ nm).	43
Figura 11 - Cromatograma da fração ER3 em escala analítica ($\lambda = 254$ nm).	45
Figura 12 - Cromatograma da fração ER4 em escala semipreparativa ($\lambda = 254$ nm).	45
Figura 13 - Cromatograma da subfração ER4.13 - escala analítica ($\lambda = 254$ nm). ...	46
Figura 14 - Reação de redução do agente MTT a azul de formazan.	48
Figura 15 - Espectro de massas de IES do extrato etanólico das raízes de <i>S. spectabilis</i>	50
Figura 16 - Espectro de massas sequencial do íon $[M+H]^+$ de m/z 298,27.	50
Figura 17 - Espectro de massas sequencial do íon $[M+H]^+$ de m/z 314,26.	51
Figura 18 - Proposta de fragmentação do composto 20	51
Figura 19 - Estrutura química do alcaloide 21	52
Figura 20 - (a) cromatograma de íons totais (azul) do extrato e cromatograma de íon extraído (vermelho) referente ao íon $[M+H]^+$ de m/z 298,2709; (b) espectro de massas de alta resolução do íon $[M+H]^+$ selecionado; (c) espectro de massas sequencial do íon selecionado (EM^2).	53
Figura 21 - Estruturas químicas dos compostos detectados por CLAE-EM e CLAE- EM^2	54
Figura 22 - Estrutura do alcaloide espectralina (07), mostrando as correlações visa TOCSY (verde).	57
Figura 23 - Estrutura do alcaloide cassina (17).	58
Figura 24 - Estrutura do ácido betulínico (30).	59
Figura 25 - Estrutura do ácido mirístico (31).	60
Figura 26 - Espectro de massas do composto 32 (modo positivo)	62
Figura 27 - Espectro de RMN de 1H (600,13 MHz, $CDCl_3$) do composto 32	62
Figura 28 - Espectro de RMN de ^{13}C (150,9 MHz, $CDCl_3$) do composto 32	63
Figura 29 - Espectro de HSQC (600,13 MHz, $CDCl_3$) do composto 32	63
Figura 30 - Expansão do espectro de HSQC (600,13 MHz, $CDCl_3$) do composto 32	64
Figura 31 - Espectro de HMBC (600,13 MHz, $CDCl_3$) do composto 32	64
Figura 32 - Estrutura do composto 32	65

Figura 33 - Espectro de NOESY (600,13 MHz, CDCl ₃) do composto 32 (0,0 – 8,0 ppm).....	66
Figura 34 - Espectro de NOESY (600,13 MHz, CDCl ₃) do composto 32 (0,0 – 18,0 ppm).....	67
Figura 35 - Interações principais via NOESY.	67
Figura 36 - Regressão linear do controle positivo doxorrubicina com concentrações de 0,0032 a 10 µM nas linhagens celulares de (a) HCT-116 e (b) MCF-7 (média ± EPM (n = 2)).....	68
Figura 37 - PNs microbianos de interesse farmacêutico ou que apresentam diversidade estrutural particular.	72
Figura 38 - Contribuição microbiana para as NEQs: (a) Percentual de fármacos aprovados pelo FDA por fonte ambiental; (b) Fração de NEQs aprovadas por ano, separadas por fonte.	73
Figura 39 - Percentual de agentes antibacterianos por fonte.	73
Figura 40 - Representação esquemática da associação de fungos endofíticos com suas plantas hospedeiras. (a) diferentes padrões de localização de fungos endofíticos dentro dos tecidos vegetais; (b) localização de diferentes classes de endófitos.....	74
Figura 41 - Estruturas de produtos medicinais de plantas, biossintetizados por fungos endofíticos.....	75
Figura 42 - A rizosfera como interface entre a planta e o solo.	76
Figura 43 - Estruturas de metabólitos provenientes da microbiota da rizosfera.	78
Figura 44 - a) Redes moleculares construídas a partir do alinhamento dos espectros de MS/MS; (b) Exemplo de alinhamento entre três espectros de EM/EM de compostos com modificação estrutural; (c) Visualização online da rede de interações.	84
Figura 45 - Cromatograma do extrato <i>FsM</i> em escala analítica (λ = 254 nm).....	88
Figura 46 - Cromatograma do extrato <i>FsM</i> em escala semipreparativa (λ = 254 nm).	89
Figura 47 - Sobreposição dos dados cromatográficos plotados após a etapa de pré-processamento.....	92
Figura 48 - Gráficos de scores da PCA.	92
Figura 49 - Espectro de massas do composto 53 (modo positivo).....	96
Figura 50 - Espectro de RMN de ¹ H (600,13 MHz, CD ₃ OD) do composto 53	96
Figura 51 - Espectro de RMN de ¹³ C (150,9 MHz, CD ₃ OD) do composto 53	97
Figura 52 - Espectro de DEPT-135 (150,9 MHz, CD ₃ OD) do composto 53	97
Figura 53 - Espectro de HSQC (600,13 MHz, CDCl ₃) do composto 53	98
Figura 54 - Espectro de HMBC (600,13 MHz, CDCl ₃) do composto 53	98
Figura 55 - Estrutura do composto 53	99
Figura 56 - Espectro de TOCSY-1D (600 MHz, CD ₃ OD).do composto 53	100
Figura 57 - Espectro de NOESY-1D (600 MHz, CD ₃ OD).do composto 53	101
Figura 58 - Estrutura da β-lactona hymeclusina (54).....	102
Figura 59 - Cromatograma base (vermelho) e TIC (azul) obtido como auto-EM/EM (modo positivo) para o extrato <i>FsM</i>	103
Figura 60 - Rede de interações moleculares resultante.	104
Figura 61 - Estruturas químicas dos compostos identificados por redes de interações moleculares.....	105
Figura 62 - Família molecular de íons de dicetopiperazinas (55 - 59).	106

Figura 63 - Espectro de EM/EM representativo do íon precursor de m/z 311,16 - composto 59	106
Figura 64 - Proposta de fragmentação inicial da molécula protonada do composto 59	107
Figura 65 - Família molecular abrangendo os íons referentes à enamidas (61 - 62).	107
Figura 66 - Biotransformação de célula inteira.	112
Figura 67 - Biocatálise como um contínuo.....	113
Figura 68 - Biossíntese de terpenoides.	115
Figura 69 - Formação de GGPP- 73	116
Figura 70 - Protonação de GGPP inicia uma sequência de reações concertadas, fornecendo quatro estereoisômeros.....	117
Figura 71 - Estruturas representativas de diterpenoides de esqueletos labdano e halimano.....	118
Figura 72 - Estruturas dos compostos 78 e 79	118
Figura 73 - Fotos dos microrganismos cultivados em placa de petri.	122
Figura 74 - Procedimento de biotransformação do substrato.....	123
Figura 75 - Cromatogramas representativos dos extratos <i>FoE1</i> - <i>FoE3</i> em escala analítica ($\lambda = 254$ nm).....	124
Figura 76 - Cromatogramas representativos dos extratos <i>MvE1</i> - <i>MvE2</i> em escala analítica ($\lambda = 254$ nm).....	125
Figura 77 - Cromatogramas representativos dos extratos <i>RsE1</i> - <i>RsE2</i> em escala analítica ($\lambda = 254$ nm).....	125
Figura 78 - Cromatograma do extrato <i>FoE1</i> em escala semi-preparativa ($\lambda = 254$ nm).	126
Figura 79 - Cromatograma do extrato <i>MgE1</i> em escala semi-preparativa ($\lambda = 254$ nm).	126
Figura 80 - Cromatograma do extrato <i>MgE1</i> em escala semi-preparativa ($\lambda = 254$ nm).	127
Figura 81 - Produtos de biotransformação obtidos a partir do substrato 79	128
Figura 82 - EM-IES do composto 81 (modo negativo).....	130
Figura 83 - Espectro de RMN de ^1H (600,13 MHz, CDCl_3) do composto 81	130
Figura 84 - Espectro de RMN de ^{13}C (150,9 MHz, CDCl_3) do composto 81	131
Figura 85 - Espectro de HSQC (600,13 MHz, CDCl_3) do composto 81	131
Figura 86 - Espectro de HMBC (600,13 MHz, CDCl_3) do composto 81	132
Figura 87 - Espectro de TOCSY-1D (600,13 MHz, CDCl_3) do composto 81	133
Figura 88 - Espectro de NOESY (600,13 MHz, CDCl_3) do composto 81	134
Figura 89 - Interações principais via NOESY e sistemas de spin observados por TOCSY-1D.	136
Figura 90 - Espectro de massas de alta resolução do composto 82 (modo negativo).	137
Figura 91 - Espectro de RMN de ^1H (600,13 MHz, CDCl_3) do composto 82	137
Figura 92 - Espectro de RMN de ^{13}C (150,9 MHz, CDCl_3) do composto 82	138
Figura 93 - Espectro de DEPT-135 (150,9 MHz, CDCl_3) do composto 82	138
Figura 94 - Espectro de HSQC (600,13 MHz, CDCl_3) do composto 82	139
Figura 95 - Espectro de HMBC (600,13 MHz, CDCl_3) do composto 82	139
Figura 96 - Espectro de TOCSY-1D (600,13 MHz, CDCl_3) do composto 82	140

Figura 97 - Espectro de NOESY (600,13 MHz, CDCl ₃) do composto 82	141
Figura 98 - Espectro de massas de baixa resolução do composto 86 (modo positivo).	143
Figura 99 - Espectro de RMN de ¹ H (600,13 MHz, CD ₃ OD) do composto 86	143
Figura 100 - Espectro de RMN de ¹³ C (150,9 MHz, CD ₃ OD) do composto 86	144
Figura 101 - Espectro de DEPT-135 (150,9 MHz, CD ₃ OD) do composto 86	144
Figura 102 - Espectro de HSQC (600,13 MHz, CD ₃ OD) do composto 86	145
Figura 103 - Espectro de HMBC (600,13 MHz, CDCl ₃) do composto 86	145
Figura 104 - Espectro de 1D-TOCSY (600,13 MHz, CDCl ₃) do composto 86	146
Figura 105 - Espectro de NOESY (600,13 MHz, CDCl ₃) do composto 86	147

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Massa de material vegetal usado e de extrato fornecido.....	40
Tabela 2 - Programação do gradiente para as análises de ER.....	43
Tabela 3 - Programação do gradiente para fracionamento de ER3.....	44
Tabela 4 - Programação do gradiente para fracionamento de ER4.....	45
Tabela 5 - Programação do gradiente para fracionamento de ER4.13.....	46
Tabela 6 - Metabólitos identificados por CLAE-EMAR e CLAE-EM/EM.	55
Tabela 7 - Dados de RMN do composto 32 (CDCl ₃ , 600.13 MHz).	65
Tabela 8 - Inibição do crescimento celular de ER e do composto 32 nas linhagens celulares de HCT-116 e MCF-7, nas concentrações de 5 e 50 µM (média ± EPM (n = 2)).....	68
Tabela 9 - CI ₅₀ (µM), intervalo de confiança (95%) e coeficiente de confiabilidade (R ²) do controle positivo doxorrubicina nas linhagens celulares de HCT-116 e MCF-7 (média ± EPM (n = 2)).....	68
Tabela 10 - Atividade inibitória (%inibição) de ER sobre as enzimas AChE e BChE.	69
Tabela 11 - Identificação dos fungos da rizosfera selecionados para cultivo.	81
Tabela 12 - Linhagens bacterianas testadas.	87
Tabela 13 - Programação do gradiente para as análises de <i>FsM</i>	88
Tabela 14 - Massas de extratos provenientes de cultivo em diferentes meios.	91
Tabela 15 - Atividade de inibição do crescimento bacteriano dos extratos em Malte (valores <512 destacados em azul).....	93
Tabela 16 - Atividade de inibição do crescimento bacteriano dos extratos em PDB (valores <512 destacados em vermelho).	93
Tabela 17 - Atividade de inibição do crescimento bacteriano dos extratos em CZAPEK (valores <512 destacados em verde).	94
Tabela 18 - Dados espectroscópicos de RMN do metabólito 53 (600 MHz, CD ₃ OD).	99
Tabela 19 - Metabólitos identificados via redes de interações moleculares.	105
Tabela 20 - Massas dos extratos obtidos através dos experimentos de biotransformação.....	123
Tabela 21 - Programação do método gradiente empregado na análise dos extratos.	124
Tabela 22 - Dados espectroscópicos de RMN dos compostos 81 (em CDCl ₃), 82 e 86 (em CD ₃ OD).	135
Tabela 23 - Inibição do crescimento celular dos compostos 80 - 85 nas linhagens celulares de HCT-116 e MCF-7, nas concentrações de 5 e 50 µM (média ± EPM (n = 2)).....	152

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
AcOEt	Acetato de etila
CG	Cromatografoa Gasosa
CE	Cromatografia de Exclusão
CL	Cromatografia Líquida
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-EM	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de massas
EM	Espectrometria de Massas
EM/EM	Espectrometria de massas sequencial
eV	Elétron volt
FM	Fórmula Molecular
Hz	Hertz
IES	Ionização por Electrospray
MeOH	Metanol
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio
NEQ	Nova Entidade Química
PCA	Principal Component Analysis (Análise de componentes principais)
PLSDA	Partial least squares discriminant analysis (Análise discriminante dos mínimos quadrados parciais)
PNs	Produtos naturais
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SNC	Sistema Nervoso Central
t _r	Tempo de retenção

LISTA DE SÍMBOLOS

α	alfa
β	beta
γ	gama
δ	delta
μ	micro
λ	lambda
\AA	Angstrom

SUMÁRIO

Capítulo 1 – Perfil metabólico do extrato etanólico das raízes de <i>Senna spectabilis</i>	24
1.1 INTRODUÇÃO.....	25
1.1.1 A química de produtos naturais como fonte de molécula bioativas	25
1.1.1.1 Histórico da utilização de produtos naturais pelo homem.....	25
1.1.1.2 O papel dos PNs para a descoberta e desenvolvimento de fármacos	27
1.1.1.3 Alvos celulares de produtos naturais	31
1.1.1.4 Metabolômica e quimiometria: uma abordagem integrada	32
1.1.1.5 Avanços nas estratégias de desreplicação.....	33
1.1.1.6 A espécie <i>Senna spectabilis</i> (Fabaceae)	35
1.1.1.7 Estudos químicos e biológicos de <i>S. spectabilis</i>	36
1.2 OBJETIVOS	39
1.3 PARTE EXPERIMENTAL	40
1.3.1 Origem do material vegetal e preparo do extrato etanólico das raízes	40
1.3.2 Análises cromatográficas	41
1.3.2.1 Análises por CLAE-EM e CLAE-EM/EM	41
1.3.2.2 Fracionamento do extrato etanólico das raízes de <i>S. spectabilis</i> por CLAE semi-preparativa para isolamento de metabólitos.....	42
1.3.3 Fracionamento do extrato ER por CE e separações de frações por CLAE para isolamento de metabólitos	43
1.3.4 Análises de espectroscopia de RMN.....	46
1.3.5 Ensaio de citotoxicidade	47
1.3.6 Ensaio em fluxo de compostos por colinesterases imobilizadas em reatores capilares e CLAE-IT-EM/EM	48
1.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	49
1.4.1 Triagem de alcaloides no extrato das raízes por Espectrometria de Massas de Alta Resolução com Ionização por Electrospray (EM-AR-IES)	49
1.4.2 Desreplicação de compostos do extrato das raízes por CLAE-EM.....	52
1.4.3 Elucidação estrutural dos metabólitos isolados.....	54
1.4.3.1 Substância 07 (espectralina)	56
1.4.3.2 Substância 17 (cassina)	57
1.4.3.3 Substância 30 (ácido betulínico).....	58
1.4.3.4 Substância 31 (ácido mirístico).....	59
1.4.3.5 Substância 32 (Dibenzofurano)	60
1.4.3.6 Atividade citotóxica do extrato ER	67
1.4.3.7 Atividade anticolinesterásica do extrato ER.....	69

1.5 CONCLUSÕES	69
Capítulo 2 – Triagem de extratos de fungos filamentosos endofíticos e da rizosfera de <i>Senna spectabilis</i>, obtidos via variação de meios de cultivo.....	70
2.1 INTRODUÇÃO.....	71
2.1.1 O papel dos microrganismos na produção de metabólitos bioativos	71
2.1.2. Fungos endofíticos e suas potencialidades.....	74
2.1.3 O potencial do microbioma da rizosfera	76
2.1.4 Variação das condições de cultura (meio de cultivo)	80
2.1.5 Identificação e seleção de fungos da microbiota de <i>S. spectabilis</i>	80
2.1.6 Crise de resistência aos antibióticos	81
2.1.7 Abordagem de redes de interações moleculares para desreplicação de compostos.....	82
2.2 OBJETIVOS	85
2.3 PARTE EXPERIMENTAL	85
2.3.1 Pré-cultivo dos microrganismos em meio sólido	85
2.3.2 Cultivo em meio líquido	85
2.3.3 Obtenção dos extratos	86
2.3.4 Análises dos extratos por CLAE-DAD	86
2.3.5 Análise quimiométrica dos extratos por PCA	86
2.3.6 Triagem da atividade antibacteriana dos extratos	86
2.3.7 Fracionamento do extrato de <i>F. solani</i> obtido em malte e isolamento dos metabólitos	87
2.3.8 Análises de CLAE-EM/EM	89
2.3.9 Construção das redes de interações moleculares	89
2.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	90
2.4.1 Massas de extratos obtidas e análise exploratória dos dados cromatográficos por PCA	90
2.4.2 Resultados da triagem antibacteriana.....	93
2.4.3 Elucidação estrutural dos metabólitos isolados.....	94
2.4.3.1 Substância 53.....	94
2.4.3.2 Substância 54.....	101
2.4.3 Compostos identificados no extrato por redes de interações moleculares	103
2.5 CONCLUSÕES	108
Capítulo 3 - Novos derivados do tipo halimano obtidos por oxidação fúngica	109
3.1. INTRODUÇÃO	110
3.1.1 Biocatálise versus catálise química.....	110

3.1.2	Química biocatalítica da ligação C-O	112
3.1.3	Biotransformação fúngica.....	113
3.1.4	Diterpenoides labdano e <i>ent</i> -halimano como substratos para biotransformação fúngica	114
3.1.4.1	Biossíntese de terpenoides em plantas	114
3.1.4.2	Biotransformação fúngica de diterpenoides labdano e <i>ent</i> -halimano	117
3.2	OBJETIVOS	119
3.3	PARTE EXPERIMENTAL	120
3.3.1	Procedimentos gerais.....	120
3.3.2	Material vegetal	120
3.3.3	Extração e isolamento do substrato 79	121
3.3.4	Microrganismos e condições de cultivo	121
3.3.5	Procedimento de biotransformação.....	122
3.3.7	Isolamento dos produtos de biotransformação	126
3.3.8	Ensaio de citotoxicidade dos bioprodutos isolados	127
3.4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	127
3.4.1	Elucidação estrutural dos bioprodutos	127
3.4.2	Considerações sobre a bio-oxifuncionalização do substrato.....	149
3.4.3	Atividade citotóxica do substrato e bioprodutos	152
3.5	CONCLUSÕES	153
4	REFERÊNCIAS	154

***Capítulo 1 – Perfil metabólico do extrato etanólico das raízes de Senna
spectabilis***

1.1 INTRODUÇÃO

1.1.1 A química de produtos naturais como fonte de molécula bioativas

1.1.1.1 Histórico da utilização de produtos naturais pelo homem

Os produtos naturais (PNs) podem ser definidos, de forma genérica, como um conjunto de moléculas pequenas derivadas de organismos vivos, que não estão envolvidas no metabolismo primário. Esses compostos são, em sua maioria, codificados e produzidos por vias do metabolismo secundário (Pye *et al.*, 2017) de plantas, animais, bactérias, fungos, e organismos marinhos (Dixon *et al.*, 2007; Yuan *et al.*, 2016).

Ao longo do tempo, os seres humanos confiaram na natureza para atender às suas necessidades básicas, utilizando os PNs na forma de poções, óleos e remédios para o tratamento e alívio de uma ampla variedade de doenças, embora muitos desses PNs bioativos ainda não sejam conhecidos até hoje (Cragg e Newman, 2013; Yuan *et al.*, 2016). As plantas, em particular, formaram a base dos sistemas de medicina tradicional modernos, com os primeiros relatos datando de 2600 a.C., documentando o uso de aproximadamente 1000 misturas de substâncias derivadas de plantas, na Mesopotâmia. Estas incluem óleos de espécies de *Cedrus* (cedro) e *Cupressus sempervirens* (cipreste), *Glycyrrhiza glabra* (alcaçuz), espécies de *Commiphora* (mirra) e *Papaver somniferum* (suco de papoula), as quais ainda são usadas atualmente para o tratamento de doenças que vão desde tosses e resfriados até infecções parasitárias e inflamação. A medicina egípcia, por sua vez, data de 2900 a.C., mas o melhor registro conhecido é o “Papiro de Ebers”, documentando mais de 700 remédios, a maioria de origem vegetal. A Matéria Médica Chinesa foi amplamente documentada ao longo dos séculos, com o primeiro registro datando de cerca de 1100 a.C. (Wu shi er bing fang, contendo 52 prescrições), seguidos por trabalhos tais como Ervas de Shennong (~100 a.C., 365 remédios) e Ervas de Tang (659 d.C., 850) (Cragg e Newman, 2001; Cragg e Newman, 2013).

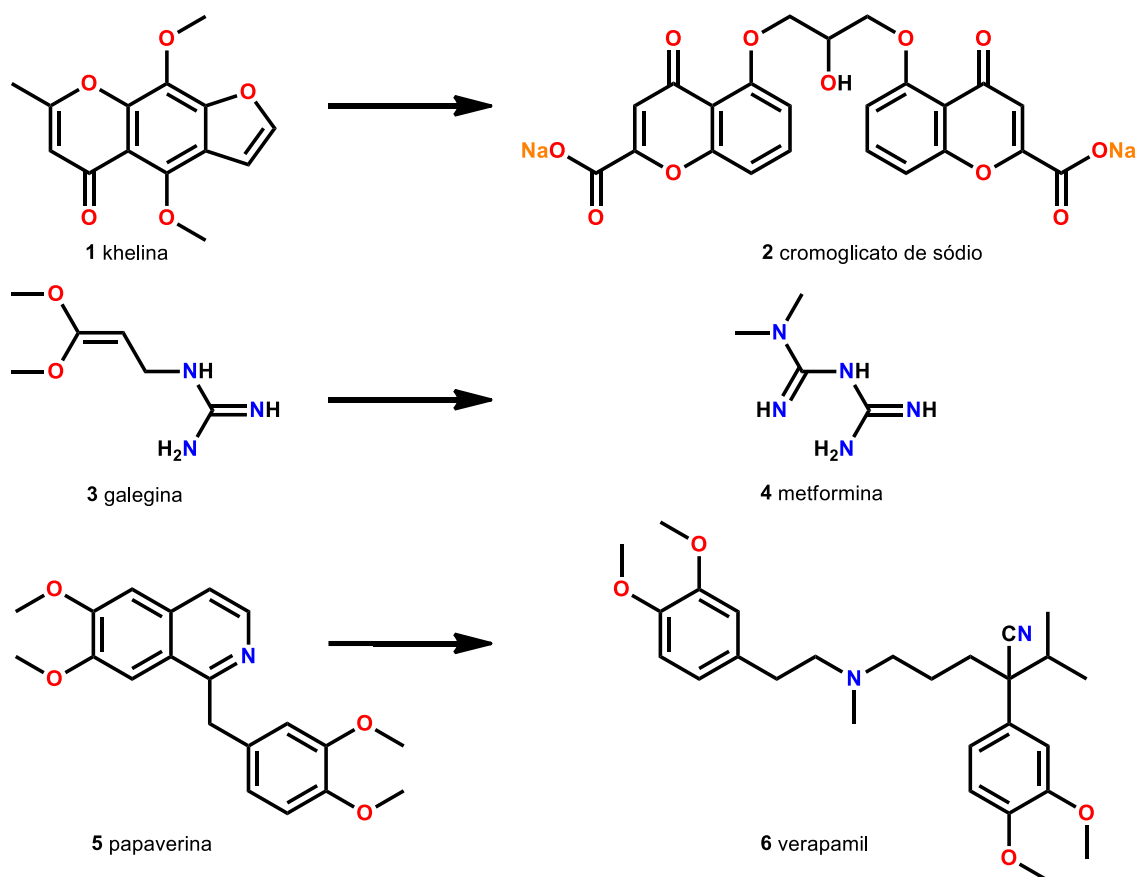
Os gregos e romanos contribuíram substancialmente para o desenvolvimento racional do uso de ervas medicinais no antigo mundo ocidental. Dioscórides, um médico grego (100 d.C.), registrou com precisão a coleção, o armazenamento e o uso de ervas medicinais durante sua viagem com exércitos romanos pelo “mundo

conhecido”, enquanto Galen (130 - 200 d.C.), um praticante e professor de farmácia e medicina em Roma, é conhecido por suas prescrições complexas e fórmulas usadas na composição de medicamentos. Os árabes, no entanto, preservaram grande parte dos conhecimentos greco-romanos durante a Era das Trevas e da Idade Média (séculos V e XII), e expandiram-nos para incluir o uso de seus recursos próprios, juntamente com as ervas chinesas e indianas desconhecidas para o mundo greco-romano (Cragg e Newman, 2001).

Desta forma, a fonte dominante de conhecimento do uso de PNs de plantas medicinais é o resultado da experimentação do homem por tentativa e erro, ao longo do uso por centenas de séculos através de ensaios de palatabilidade, em busca de alimentos disponíveis para a dieta e o tratamento de doenças, que no caso de plantas venenosas levavam a reações tóxicas, tais como vômito, diarreia, e até mesmo à morte (Dias *et al.*, 2012; Yuan *et al.*, 2016).

Ainda hoje, as plantas constituem uma fonte medicinal para os cuidados de saúde primário, principalmente em países em desenvolvimento. Um levantamento de compostos puros derivados de plantas usados como fármacos nos países que hospedam Centros de Medicina Tradicionais da OMS indicou que, dos 122 compostos identificados, 80% foram usados para os mesmos propósitos etnomédicos ou finalidades similares, e foram derivados de apenas 94 espécies de plantas. Alguns exemplos relevantes são: khellina (**1**), de *Ammi visnaga* (L.) Lam., que levou ao desenvolvimento de cromolina, na forma de cromoglicato de sódio (**2**, Figura 1) como um broncodilatador; galegina (**3**), de *Galega officinalis* L., a qual foi o modelo para a síntese de metformina (**4**) e de outros fármacos antidiabéticos do tipo bisguanidina; e papaverina (**5**), de *Papaver somniferum*, a qual serviu como base para o verapamil (**6**), usado no tratamento da hipertensão. A espécie *Papaver somniferum* é mais conhecida como a fonte de analgésicos como a morfina e codeína, mas provavelmente, o melhor exemplo do papel da etnomedicina na orientação da descoberta e desenvolvimento de fármacos é o dos compostos antimalária, principalmente quinina e artemisina (Cragg e Newman, 2013).

Figura 1 - Fármacos derivados de compostos líderes baseados na medicina tradicional.



Fonte: Newman e Cragg, 2013.

1.1.1.2 O papel dos PNs para a descoberta e desenvolvimento de fármacos

A maioria dos agentes terapêuticos baseados em moléculas pequenas em uso nos dias de hoje tem suas origens em PNs, os quais forneceram diretamente ou inspiraram o desenvolvimento de 50 - 70% de todos os agentes em uso clínico, principalmente antitumorais e antimicrobianos (Harvey *et al.*, 2015; Pye *et al.*, 2017).

No entanto, diversos aspectos tornam os PNs desafiadores para as companhias farmacêuticas, tais como: a identificação dos organismos estudados; os aspectos legais relacionados aos recursos naturais e propriedades intelectuais; a forte dependência da produção (ou expressão) de metabólitos secundários de acordo com condições ao qual o organismo está exposto, as quais nem sempre são fáceis de controlar; a complexidade dos extratos que dificulta a avaliação da bioatividade, pois a presença de compostos tóxicos pode mascarar os efeitos dos constituintes ativos

ou desejados, especialmente quando os mesmos estão presentes em quantidade muito pequenas - constituintes minoritários (Bertrand *et al.*, 2014).

Além disso, uma das maiores preocupações se refere ao reisolamento (redescoberta) de moléculas previamente identificadas, o que torna o processo mais caro e demorado (Bertrand *et al.*, 2014; Pye *et al.*, 2017), requerendo a realização de análises químicas precisas dos extratos e de bases de dados detalhadas para a desreplicação dos compostos conhecidos. Ademais, para que PNs ou extratos possam ser considerados compatíveis com triagens de alto rendimento, são necessárias etapas prévias de enriquecimento ou isolamento dos compostos de interesse, uma tarefa intensiva e laboriosa. E, ainda, a complexidade das moléculas que podem possuir vários estereocentros, dificulta o processo de elucidação estrutural.

Para superar essas dificuldades, a grande maioria dos programas industriais de pesquisa e desenvolvimento de fármacos decidiram inicialmente, operar com base em bibliotecas de compostos produzidos puramente via síntese combinatória (Wolfender *et al.*, 2010), levando a um desinteresse no uso de PNs. No entanto, esse período de desinteresse foi acompanhado por um declínio no número de fármacos aprovados, o que fez com que as grandes companhias começassem a gerar bibliotecas moleculares inspiradas em PNs (Wolfender *et al.*, 2010; Newman e Cragg, 2012; Cragg e Newman, 2013).

As bibliotecas de compostos inspiradas em (fragmentos de) PNs podem transferir, pelo menos em parte, aspectos farmacologicamente relevantes para moléculas pequenas, sinteticamente mais tratáveis, melhorando potencialmente a atividade biológica desses compostos. Os PNs diferem de moléculas sintéticas em diversos aspectos: contém um número maior de átomos sp^3 e centros estereogênicos, além de apresentar um menor número de átomos de nitrogênio, em contraste a um número maior de átomos de oxigênio. Adicionalmente, a natureza parece favorecer anéis alifáticos em vez de aromáticos (Rodrigues *et al.*, 2016).

O reinteresse em PNs foi propiciado, ainda, por diversos avanços atingidos nos últimos anos, incluindo melhorias nas técnicas cromatográficas, permitindo o isolamento rápido de moléculas de misturas complexas; analíticas, principalmente com respeito à detecção por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

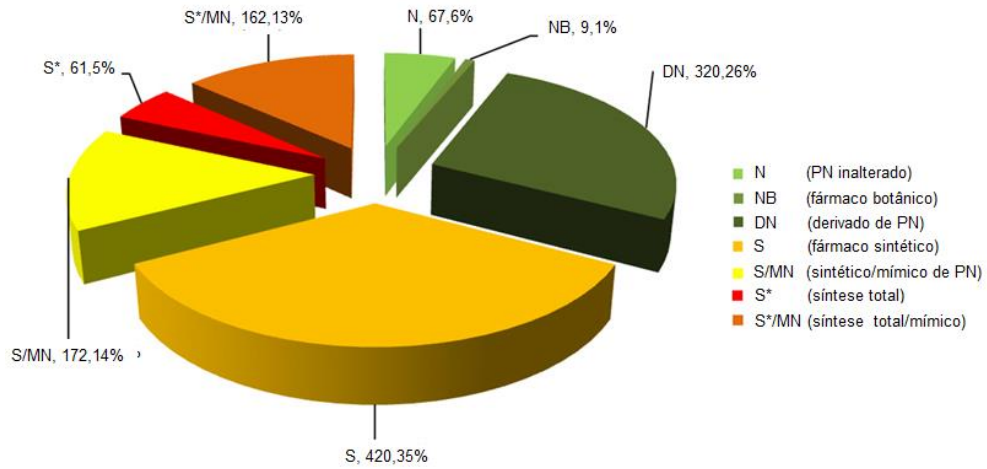
(RMN) e espectrometria de massas (EM); e de biologia molecular - fornecendo rotas alternativas para a geração de produtos naturais. Tais progressos facilitaram a compatibilidade de produtos naturais com os programas industriais de descoberta de fármacos (Bertrand *et al.*, 2014).

De fato, a natureza fornece uma gama de organismos que produzem compostos potencialmente benéficos, de serem descobertos e explorados (bioprospecção), uma vez que a produção de esqueletos moleculares inovadores e incomuns (quimiodiversidade) é incomparável (Cragg e Newman, 2013). A variedade de quimiotipos contendo padrões de grupos farmacofóricos e esqueletos moleculares biologicamente relevantes está intrinsecamente relacionada às propriedades tridimensionais e estéricas bem definidas, as quais conferem vantagens em termos de eficiência e seletividade frente a alvos moleculares, tornando os PNs fontes inestimáveis de inspiração para o planejamento de fármacos (Rodrigues *et al.*, 2016; Yuan *et al.*, 2016).

Uma revisão abrangendo todas as fontes de agentes terapêuticos aprovados no período de 1 de janeiro de 1981 até 31 de dezembro de 2014, cobrindo todas as doenças mundiais ao longo de 34 anos (Figuras 2 - 4), realizada por Newman e Cragg (2016), reforça a contribuição massiva dos PNs e seus derivados para o desenvolvimento de fármacos, sobretudo para o tratamento de câncer e doenças infecciosas.

Uma inspeção dos dados (Figura 2) mostra que enquanto apenas 35% dos fármacos lançados no período são de origem puramente sintética, todos as novas entidades químicas (NEQs) remanescentes são produtos naturais não modificados (PNs inalterados; fármacos botânicos – mistura de composição conhecida), modificados (derivados semissintéticos) ou moléculas sintéticas inspiradas em PNs (compostos obtidos por síntese ou síntese total, cujos grupos farmacofóricos são provenientes de um PN, ou que mimetizam a ação de um PN).

Figura 2 - Fármacos baseados em moléculas pequenas, aprovados no período de 1981-2014; n = 1211.



Fonte: Newman e Cragg, 2016.

Figura 3 - Fármacos baseados em moléculas pequenas, aprovados por fonte/ano.

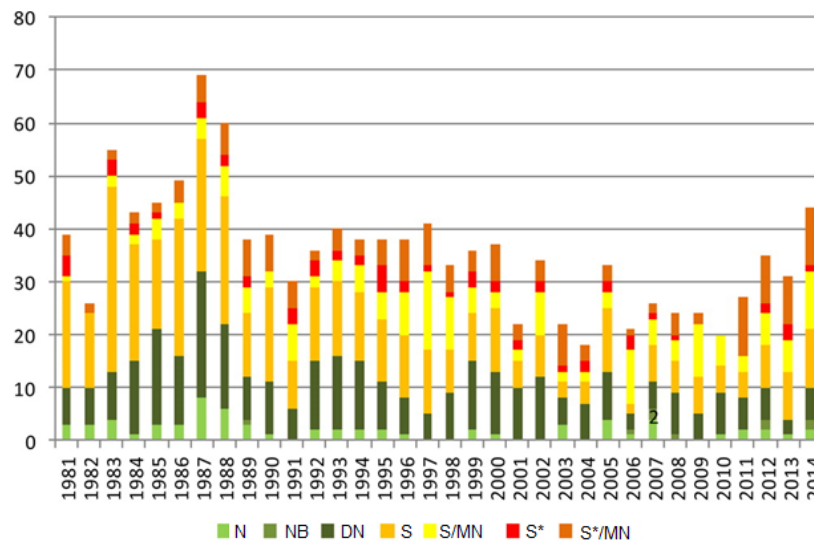
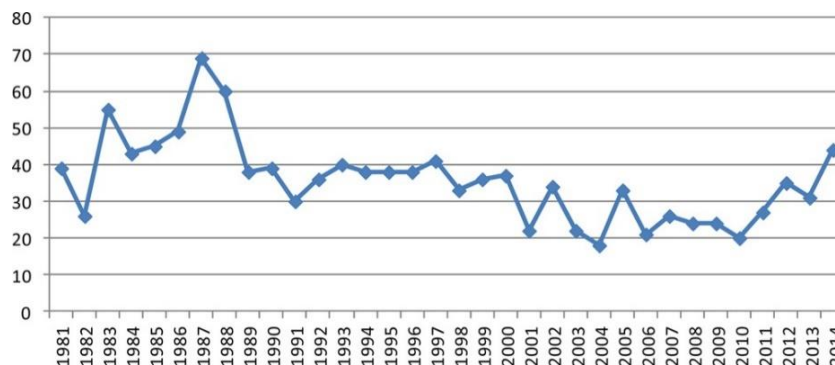


Figura 4 - Total de fármacos aprovados/ano.



A Figura 3 ilustra a contribuição de cada fonte de NEQs/ano, enquanto a Figura 4 representa o número total de aprovações/ano. Desta forma, é possível observar que o número máximo de aprovações ficou em torno de quarenta durante a maior parte dos anos 1989 a 2000 (exceto em 2002), e ficou próximo de vinte durante 2001 a 2010, a partir de quando os números subiram para mais de trinta. Nos últimos quatro anos do período coberto pela revisão (2011 - 2014), as aprovações cresceram de vinte e oito para quarenta e quatro. Portanto, os dados enfatizam que os PNs continuam a desempenhar um papel essencial no desenvolvimento do arsenal terapêutico.

1.1.1.3 Alvos celulares de produtos naturais

Os PNs são, normalmente, estruturas complexas que foram otimizadas ao longo da evolução para se ligarem a macromoléculas, particularmente, às proteínas. Consequentemente, PNs são capazes de interagir com diversos alvos celulares. Essa peculiaridade foi fundamental para o processo de desenvolvimento de fármacos por muitos anos. No entanto, atualmente, os PNs estão sendo usados de forma crescente como “sondas” para fornecer informações sobre sistemas biológicos como parte da genômica química e de áreas de pesquisa correlatas. Deste modo, os PNs têm demonstrado utilidade, correlacionando-se as atividades biológicas das principais classes de PNs com a localização de seus alvos moleculares específicos. Assim, a associação de novos compostos e atividades descobertas pode permitir a compreensão de uma função biológica específica ou servir de base para novas abordagens terapêuticas (Dixon *et al.*, 2007; Rodrigues *et al.*, 2016).

Os organismos evoluíram ao longo de 3 bilhões de anos para produzir ácidos nucleicos, proteínas e outras macromoléculas, e também moléculas menores – metabólitos secundários. Deste modo, é possível que exista um metabólito secundário (PN) ligante para muitos dos alvos macromoleculares distintos que existem no interior das células. Os PNs são biossintetizados através de catálise por proteínas, de forma que as estruturas do PN e da proteína devem, necessariamente, ter coevoluído para se ligarem um ao outro seletivamente. Além disso, muitos metabólitos capazes de regular sua própria biossíntese ou degradação através de interação com genes são conhecidos, em particular, os mRNAs, os quais codificam a enzima responsável por

seu metabolismo. Portanto, enquanto metabólitos primários desempenham funções definidas no crescimento e desenvolvimento normais dos organismos vivos, parece provável que os metabólitos secundários tenham evoluído especificamente para interagir com macromoléculas biológicas e modular suas funções. Adicionalmente, algumas dessas moléculas são conhecidas por promoverem vantagem seletiva contra o ataque microbiano ou defesa contra infestação e doença, enquanto outras atuam em *quorum sensing*, como feromônios ou pigmentos, facilitando a reprodução (Dixon *et al.*, 2007).

Além do potencial para o desenvolvimento farmacêutico, o imenso potencial de PNs como moduladores da função biomolecular se tornou evidente com o advento da genômica química e metodologias de triagem de alto rendimento. Para este fim, abordagens de *genome mining* e metagenômica microbiana, assim como sistemas de expressão heteróloga, foram desenvolvidas para revelar fontes de PNs do ambiente, massivas e inexploradas, que continuam desconhecidas ou inacessíveis. Além disso, ferramentas poderosas como engenharia biossintética combinatória foram introduzidas para a biossíntese de PNs “não naturais”. Essas abordagens permitem não apenas a otimização de compostos líderes de modelos estruturais existentes, mas também oferecem potencial para biossíntese de *novo* de entidades moleculares completamente novas (Dixon *et al.*, 2007; Harvey *et al.*, 2015).

1.1.1.4 Metabolômica e quimiometria: uma abordagem integrada

O modelo para descoberta de PNs adotado como padrão emprega abordagens reducionistas para descobrir moléculas pequenas, alvejando uma única via (Maguire, 2014). Essa estratégia possibilita a obtenção de conhecimentos sobre a estrutura e a função de componentes individuais de sistemas biológicos complexos (Zhan *et al.*, 2013), consistindo em um processo laborioso de isolamento e subsequente elucidação estrutural de compostos bioativos. Além de consumir tempo, essa metodologia apresenta um custo elevado e envolve a desreplicação de compostos já conhecidos (Yuliana *et al.*, 2013; Maree *et al.*, 2014).

Uma alternativa emergente e mais apropriada de estudo, que visa superar esses problemas, é a utilização de uma abordagem holística, em que bioensaios são combinados com análises metabolômicas. Esse método é bastante promissor uma

vez que, ao trabalhar com um organismo inteiro, é possível observar os efeitos totais de um conjunto de compostos presentes em extratos complexos e, até mesmo, em misturas de extratos. Além disso, efeitos de sinergismo também podem ser detectados. Essa abordagem apresenta potencial não apenas para a descoberta de novas moléculas bioativas, mas também de novos modos de ação e, portanto, novos alvos (Yuliana *et al.*, 2013).

A metabolômica é o método de pesquisa mais adequado para tal abordagem holística, pois compreende a identificação do maior número possível de metabólitos secundários presentes no metaboloma de um determinado sistema biológico (Maree *et al.*, 2014). Deste modo, essa estratégia possibilita uma visão compreensiva dos resultados combinatórios desde fatores genéticos, até ambientais (Fang e Gonzalez, 2014).

A plataforma analítica utilizada em experimentos de metabolômica requer a aplicação de ferramentas quimiométricas (técnicas matemáticas e estatísticas) adequadas para extrair informações importantes dos conjuntos de dados complexos gerados (Zhao, 2013; Maree *et al.*, 2014).

Métodos estatísticos multivariados ou de reconhecimento de padrão fornecem meios adequados de coletar informações relevantes sobre as diferenças ou similaridades entre vias metabólicas, comparar dados espectrais complexos, identificar padrões de coocorrência de compostos e para assistir à elucidação de diferenças químicas composicionais entre amostras. Esses métodos incluem projeção multivariada, na qual as técnicas mais usadas são análise de componentes principais (PCA) e análise discriminante dos mínimos quadrados parciais - PLS-DA (Zhao, 2013).

As plataformas mais comumente utilizadas em metabolômica devido às suas capacidades de detecção, são: cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM); cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CL-EM) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Cada uma dessas plataformas possui vantagens e desvantagens intrínsecas (Fang e Gonzalez, 2014).

1.1.1.5 Avanços nas estratégias de desreplicação

A desreplicação refere-se à detecção e identificação rápida e direta de metabólitos secundários conhecidos em extratos brutos (Abdelmohsen *et al.*, 2014).

Até o momento, a espectroscopia de RMN de ^1H e a espectrometria de massas são as duas técnicas principais para a detecção da composição metabólica (metaboloma) de um determinado sistema (Tang *et al.*, 2009).

O método baseado na EM é altamente sensível e fornece informações sobre a massa molecular e padrões de fragmentação para uma ampla gama de compostos. No entanto, requer a confirmação a partir de padrões, os quais nem sempre estão disponíveis, principalmente para substâncias desconhecidas (Tang *et al.*, 2009).

A espectroscopia de RMN permite que um catálogo de métodos bi-dimensionais seja empregado para obter conectividades atômicas em uma molécula, possibilitando sua subsequente elucidação estrutural. Porém, esta técnica apresenta sensibilidade intrínseca relativamente baixa (μg) para pequenas concentrações de metabólitos, e a sobreposição de sinais, principalmente em misturas complexas, dificulta a elucidação estrutural dos compostos menos abundantes (Tang *et al.*, 2009).

Com a finalidade de reunir as vantagens de ambas as técnicas e superar às limitações intrínsecas mencionadas, recentemente, desenvolveu-se uma técnica hifenada que combina: separação por CLAE; detecção por DAD e EM; extração em fase sólida (EFS) para o enriquecimento de um metabólito de interesse; e RMN para revelar a conectividade entre os núcleos (CLAE-DAD-EM-EFS-RMN) (Tang *et al.*, 2009). Essa técnica pode fornecer informação abrangente sobre os metabólitos em extratos brutos, auxiliando na decisão de continuidade de um processo de isolamento, evitando, portanto, gasto de tempo e recursos em compostos já conhecidos (Johansen *et al.*, 2013).

Além disso, o fracionamento orientado por metabolômica possibilita a identificação de componentes ativos na primeira etapa de fracionamento, bem como a predição de quais estruturas podem ser bioativas, ajudando a priorizar frações para purificação adicional dos compostos alvo (Harvey *et al.*, 2015).

Diversos avanços também foram obtidos em tecnologias de informação para a análise rápida e eficiente de conjuntos amplos de dados de bibliotecas de PNs. Essas abordagens inovadoras para analisar dados de massas (por exemplo, usando

MZmatch, XCMS e Molecular Networking) podem ser usadas com análise diferencial e bases de dados online (tais como Chempider, Dictionary of Natural Products e GNPS), e ou bases de dados *in-house*. A análise diferencial envolve uma série de processos, incluindo o alinhamento, seguido pela filtração de sinais autênticos de espectros de massas da amostra, e finalmente, a detecção de picos, de modo que os metabólitos conhecidos são associados aos compostos correspondentes através de uma base de dados (Harvey *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2016).

1.1.1.6 A espécie *Senna spectabilis* (Fabaceae)

A família Fabaceae é dividida em três subfamílias: Mimosoideae, Faboideae e Caesalpinioideae. Destas, a subfamília Caesalpinioideae compreende os gêneros *Senna* e *Cássia* (Selegato *et al.*, 2017).

O gênero *Senna* abrange cerca de 600 espécies distribuídas mundialmente, as quais apresentam perfis químicos altamente diversificados, possuindo constituintes pertencentes às classes dos flavonoides, taninos, saponinas, antraquinonas, estilbenoides, xantinas, triterpenoides, esteroides e alcaloides (Pereira *et al.*, 2016). A presença desses compostos nos extratos de tais plantas é responsável por vários efeitos biológicos relevantes, atribuídos por meio de ensaios específicos, dentre os quais se destacam os potenciais antimicrobiano, sedativo, anticonvulsivo, antioxidante, antinociceptivo, anti-inflamatório e leishmanicida (De Castro *et al.*, 2016).

A quimiotaxonomia de espécies de *Senna* e *Cássia* (Fabaceae) foi objeto de estudos extensivos e, recentemente, revisões da classificação botânica desses gêneros levaram à transposição de espécies de *Cássia* para o táxon *Senna*. Estudos de morfologia floral sustentam a classificação inalterada de muitas espécies, embora diversas espécies de *Cássia* continuem sendo descritas como sinônimas de espécies de *Senna* (Viegas Junior *et al.*, 2006).

Dentre as várias espécies de *Senna*, *S. spectabilis* se destaca devido a abundância de alcaloides piperidínicos 2,6-dialquil-O-substituídos em suas folhas, flores e frutos, os quais demonstraram além das atividades citadas anteriormente, efeitos sobre o sistema nervoso central (SNC), incluindo inibição da enzima

acetilcolinesterase (AChE, alvo no tratamento dos sintomas cognitivos da doença de Alzheimer) e analgesia central (Silva *et al.*, 2010).

S. spectabilis - sinônimas botânicas *Cassia spectabilis*, *Cassia excelsa* W. Schrad. e *Cassia fastigiata* Nees - é uma planta arbórea (Figura 5), conhecida popularmente como “são-joão”, “cássia-do-nordeste”, “canafístula-de-besouro” e “pau-de-ovelha”. Esta espécie é característica do Nordeste semi-árido (caatinga), mas é comumente encontrada no Cerrado do estado de São Paulo. De acordo com relatos etnofarmacológicos, é usada na medicina popular brasileira para o tratamento de tosse e resfriados, e também como laxante (Lorenzi, 2009).

Figura 5 - A espécie *Senna spectabilis* (Fabaceae).



Fonte: <http://www.flickrriver.com/photos/mercadanteweb/sets/72157623169621020/>. Acessado em 03/08/2017.

A árvore pode atingir de 6 - 9 m de altura, com tronco medindo de 30 - 40 cm de diâmetro e apresenta folhas compostas pinadas, contendo 10 - 20 pares de folíolos de 2 - 4 cm de comprimento. A madeira é aproveitada para confecção de objetos leves, caixotaria, lenha e carvão. A planta é ornamental devido ao longo período de floração (que se estende de dezembro - abril), motivo pelo qual é empregada no paisagismo e na arborização de ruas, e a maturação dos frutos ocorre entre os meses de agosto e setembro (Lorenzi, 2009).

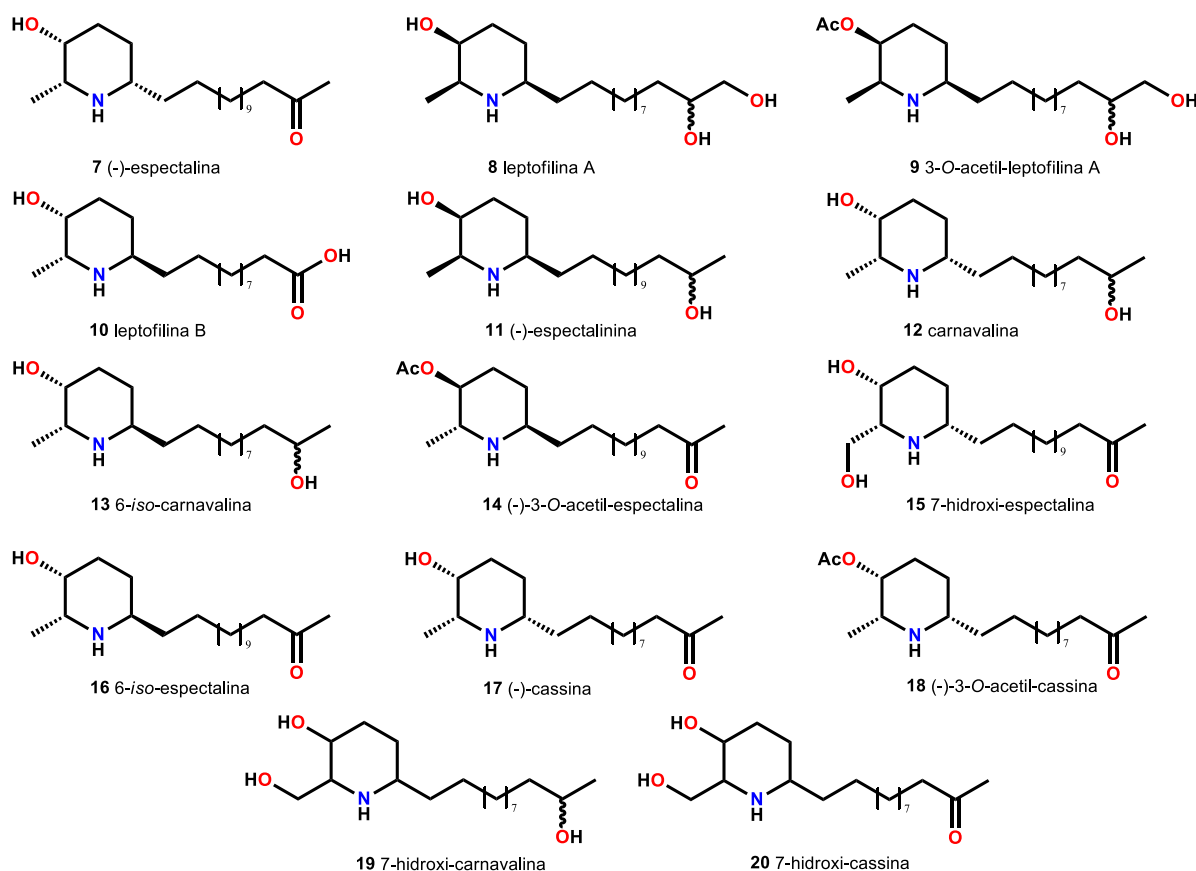
1.1.1.7 Estudos químicos e biológicos de *S. spectabilis*

Uma revisão cobrindo os dados químicos e biológicos de *S. spectabilis*, feita por Selegato e colaboradores (2017), mostra o isolamento/identificação de cerca de quarenta e nove substâncias desta espécie e aponta a presença de diversas classes de metabólitos secundários, incluindo alcaloides, triterpenos pentacíclicos (TPs), esteroides, pironas, antraquinonas e flavonoides, dentre as quais predominam os alcaloides de núcleo piperidínico e os TPs, ambas as quais desempenham uma gama de atividades biológicas potentes (Selegato *et al.*, 2017).

O estudo químico das folhas de *S. spectabilis*, realizado por Bolzani *et al.*, 1995, resultou no isolamento de sete alcaloides piperidínicos (Figura 6): (-)-espectalina (**7**), leptofilina A (**8**), 3-O-acetil-leptofilina A (**9**), leptofilina B (**10**), (-)-espectalinina (**11**), carnavalina (**12**) e 6-*iso*-carnavalina (**13**); dos quais os compostos **7**, **11** e **12** apresentaram atividade citotóxica elevada em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*.

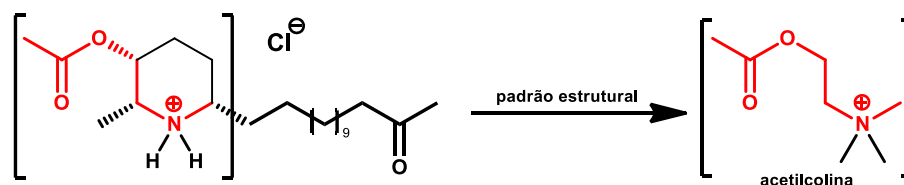
Anos depois, Viegas Jr. e colaboradores (2004) isolaram três novos alcaloides (Figura 6) das flores de *S. spectabilis*: (-)-3-O-acetil-espectalina (**14**), (-)-7-hidroxi-espectalina (**15**), e 6-*iso*-espectalina (**16**). Dentre esses compostos, **14** chamou atenção por apresentar uma unidade de acetilcolina internalizada em sua estrutura molecular, o que despertou o interesse para avaliação da atividade de inibição da enzima AChE (Viegas *et al.*, 2004).

Figura 6 - Estruturas de alcaloides piperidínicos isolados de *S. spectabilis*.



O cloridrato do metabólito **14** apresentou um potencial farmacológico elevado e toxicidade moderada, tornando-se um composto líder para o desenvolvimento de um fármaco anticolinesterásico (Figura 7), chegando a fase pré-clínica. No entanto, os estudos foram descontinuados por problemas de suprimento, uma vez que constatou-se que a planta adulta não era capaz de produzir esses compostos em quantidade necessária e sua obtenção por via sintética é complexa, devido a presença de três centros estereogênicos.

Figura 7 - Modelo estrutural para inibidores de AChE.



Diante disso, na perspectiva de elucidar as vias metabólicas dos alcaloides piperidínicos, como pré-requisito para potencializar a produção desses compostos através de técnicas de engenharia genética, Pivatto (2010) realizou o estudo de *S. spectabilis* em busca de análogos naturais para estudos biossintéticos, resultando no isolamento dos alcaloides piperidínicos (-)-cassina (**17**) e (-)-3-O-acetilcassina (**18**), e na identificação de **19** e **20** (Figura 6).

Inicialmente, a biogênese dos metabólitos foi proposta elegendo-se a lisina e o acetato como precursores das vias metabólicas. Em seguida, foram realizados experimentos empregando-se os precursores marcados isotopicamente (L-lisina-[U-¹⁴C], acetato de sódio-1-[¹³C] ou CD₃¹³CO₂Na), os quais foram administrados *in vivo* e *in vitro* nas folhas, flores e sementes (plântulas), e em extratos enzimáticos, respectivamente. Porém, não foi detectada incorporação dos precursores, sugerindo inatividade enzimática no momento da administração e incubação do precursor (Pivatto, 2010).

Embora as partes aéreas, frutos e até mesmo as sementes de *S. spectabilis* tenham sido estudados, não existem relatos de estudos químicos de suas raízes na literatura até o momento, de modo que sua composição permanece totalmente desconhecida. Neste contexto, sabe-se que em algumas espécies de plantas, alcaloides são transportados a partir do órgão de origem, após sua biossíntese, e dissipados para outros órgãos através de transportadores de longa distância. Um exemplo bastante conhecido é o da nicotina, a qual é biossintetizada nas raízes e, posteriormente, translocada para as folhas, onde finalmente é acumulada nos vacúolos foliares de espécies de *Nicotiana* (Solanaceae) (Shitan *et al.*, 2009).

3.5. CONCLUSÕES

A biotransformação do composto de partida (**79**) executada por *F. oxysporum*, *M. verrucaria* e *R. similis* forneceu sete análogos estruturais, incluindo quatro metabólitos já relatados e três ainda não descritos, através de reações de oxifuncionalização notáveis dos pontos de vista químico e biocatalíticos, tais como a oxidação de ligações C-H sp^3 não ativadas de posições seletivas dos anéis A e B da decalina, bem como a hidratação da ligação sp^2 -13,14 da cadeia lateral. Essas modificações geraram novas funcionalidades (hidroxi, oxo, formil e carboxi), as quais correspondem a novos sítios reativos e, portanto, podem permitir o alcance de um número maior de análogos estruturais de relevância não apenas química, mas também biológica. O substrato e seus produtos de biotransformação foram avaliados quanto a atividade citotóxica contra as linhagens celulares HCT-116 (carcinoma cólon-retal) e MCF-7 (adenocarcinoma mamário), no entanto, somente o composto **83** desempenhou um percentual inibitório intensificado frente à ambas as linhagens, na concentração de 50 μ M. Desta forma, os três fungos empregados se mostraram fontes enzimáticas prolíficas para a oxidação/redução de diterpenoides com baixa reatividade, revelando um potencial praticamente inexplorado de fungos endofíticos e rizosféricos de *Senna spectabilis* para a transformação microbiana de outros substratos naturais e ou sintéticos.

4 REFERÊNCIAS

- ABDELMOHSEN, U. R. et al. Dereplication strategies for targeted isolation of new antitrypanosomal actinosporins A and B from a marine sponge associated-*Actinokineospora* sp. EG49. **Mar Drugs**, v. 12, n. 3, p. 1220-44, Mar 2014.
- ALDRIDGE, D. C.; GILES, D.; TURNER, W. B. Antibiotic 1233A: a fungal [small beta]-lactone. **Journal of the Chemical Society C: Organic**, n. 0, p. 3888-3891, 1971.
- ALY, A. H.; DEBBAB, A.; PROKSCH, P. Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 90, n. 6, p. 1829-45, Jun 2011.
- ARAKAWA, N. S. et al. Unusual biotransformation products of the sesquiterpene lactone budlein A by *Aspergillus* species. **Phytochemistry**, v. 96, p. 92-100, 12// 2013.
- BASSO, A. V. et al. Biotransformation of Salpichrolides A, C, and G by Three Filamentous Fungi. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 6, p. 1658-1667, 2016/06/24 2016.
- BERTRAND, S. et al. Metabolite induction via microorganism co-culture: A potential way to enhance chemical diversity for drug discovery. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 6, p. 1180-1204, Nov 1 2014.
- BHARDWAJ, G.; CAMEOTRA, S. S.; CHOPRA, H. K. Isolation and purification of a new enamide biosurfactant from *Fusarium proliferatum* using rice-bran. **RSC Advances**, v. 5, n. 67, p. 54783-54792, 2015.
- BHATIA et al., Anticancerous Efficacy of Betulinic acid: An Immunomodulatory Phytochemical. **Journal of PharmaSciTech**, v. 4, 2, 2015.
- BICAS, J. L. et al. Optimization of R-(+)- α -terpineol production by the biotransformation of R-(+)-limonene. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 35, n. 9, p. 1061-1070, 2008/09/01 2008.
- BLUNT, J. W. et al. Marine natural products. 2018/01/16 2018.
- BODE, H. B. et al. Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity. **ChemBiochem**, v. 3, n. 7, p. 619-27, Jul 2 2002.
- CARABALLO-RODRÍGUEZ, A. M.; DORRESTEIN, P. C.; PUPO, M. T. Molecular inter-kingdom interactions of endophytes isolated from *Lychnophora ericoides*. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 5373, 2017/07/14 2017.
- CARPENTIER, C. et al. Dibenzofurans and Pseudodepsidones from the Lichen *Stereocaulon paschale* Collected in Northern Quebec. **Journal of Natural Products**, v. 80, n. 1, p. 210-214, 2017/01/27 2017.

CHEN, C. A. et al. Secondary structure and phylogenetic utility of the ribosomal internal transcribed Spacer 2 (ITS2) in Scleractinian corals. **Zoological Studies**, v. 43, n. 4, p. 759-771, Oct 2004.

CHIARINI, L.; TABACCHIONI, S.; BEVIVINO, A. Interactions between rhizosphere microorganisms under iron limitation. **Archives of Microbiology**, v. 160, n. 1, p. 68-73, 1993/07/01 1993.

CHOUDHARY, M. I. et al. Structure Elucidation and Antibacterial Activity of New Fungal Metabolites of Sclareol. **Chemistry & Biodiversity**, v. 3, n. 1, p. 54-61, 2006.

CLAYDEN, J.; GREEVES, N.; WARREN, S. G. **Organic chemistry**. Oxford; New York: Oxford University Press, 2012.

CLOUTHIER, C. M.; PELLETIER, J. N. Expanding the organic toolbox: a guide to integrating biocatalysis in synthesis. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 4, p. 1585-1605, 2012.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural product drug discovery in the next millennium. **Pharmaceutical Biology**, v. 39, p. 8-17, 2001 2001.

_____. Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1830, n. 6, p. 3670-3695, 6// 2013.

DE BRUIJN, I. et al. Genome-based discovery, structure prediction and functional analysis of cyclic lipopeptide antibiotics in *Pseudomonas* species. **Molecular Microbiology**, v. 63, n. 2, p. 417-428, 2007.

DE CARVALHO, C. C. C. R. Whole cell biocatalysts: essential workers from Nature to the industry. **Microbial Biotechnology**, v. 10, n. 2, p. 250-263, 2017.

DE CASTRO, A. T. et al. In vitro evaluation of the schistosomicidal effect of the extracts, fractions and major 3-hydroxy-2,6-dialkyl-substituted piperidine alkaloids from the flowers of *Senna spectabilis* (Fabaceae). **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, n. 17, p. 4197-4204, 9/1/ 2016.

DE OLIVEIRA, B. H.; STRAPASSON, R. A. Biotransformation of isosteviol by *Fusarium verticilloides*. **Phytochemistry**, v. 43, n. 2, p. 393-395, 1996/09/01/ 1996.

DEMETZOS, C.; DIMAS, K. S. Labdane-type diterpenes: Chemistry and biological activity. In: ATTA UR, R. (Ed.). **Studies in Natural Products Chemistry**: Elsevier, v. Volume 25, Part F, 2001. p.235-292.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**. Wiley, 2009.

DIAS, D. A.; URBAN, S.; ROESSNER, U. A Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery. **Metabolites**, v. 2, n. 2, 2012.

DIXON, N. et al. Cellular targets of natural products. **Natural Product Reports**, v. 24, n. 6, p. 1288-1310, 2007.

EYBERGER, A. L.; DONDAPATI, R.; PORTER, J. R. Endophyte fungal isolates from *Podophyllum peltatum* produce podophyllotoxin. **J Nat Prod**, v. 69, n. 8, p. 1121-4, Aug 2006.

FANG, Z.-Z.; GONZALEZ, F. LC-MS-based metabolomics: an update. **Archives of Toxicology**, p. 1-12, 2014/04/08 2014.

FRANCISCO, W. et al. Pyridine Alkaloids from *Senna multijuga* As Acetylcholinesterase Inhibitors. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 3, p. 408-413, 2012/03/23 2012.

FRIJA, L. M. T.; FRADE, R. F. M.; AFONSO, C. A. M. Isolation, Chemical, and Biotransformation Routes of Labdane-type Diterpenes. **Chemical Reviews**, v. 111, n. 8, p. 4418-4452, 2011/08/10 2011.

FURTADO, N. et al. Diketopiperazines produced by an *Aspergillus fumigatus* Brazilian strain. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 6B, p. 1448-1453, Nov-Dec 2005.

GARYALI, S.; KUMAR, A.; REDDY, M. S. Taxol production by an endophytic fungus, *Fusarium redolens*, isolated from Himalayan yew. **J Microbiol Biotechnol**, v. 23, n. 10, p. 1372-80, 2013.

GENSCH, T. et al. Mild metal-catalyzed C-H activation: examples and concepts. **Chemical Society Reviews**, v. 45, n. 10, p. 2900-2936, 2016.

GUO, B. et al. Bioactive natural products from endophytes: A review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 136-142, 2008/03/01 2008.

HAAS, D.; DÉFAGO, G. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, p. 307, 03/10/online 2005.

HANSON, J. R. Diterpenoids of terrestrial origin. 2017/09/06 2017.

HARTLEY, S. E.; GANGE, A. C. Impacts of Plant Symbiotic Fungi on Insect Herbivores: Mutualism in a Multitrophic Context. **Annual Review of Entomology**, v. 54, n. 1, p. 323-342, 2009/01/01 2008.

HARVEY, A. L.; EDRADA-EBEL, R.; QUINN, R. J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. **Nat Rev Drug Discov**, v. 14, n. 2, p. 111-129, 02/print 2015.

HELALY, S. E. et al. Langkolide, a 32-Membered Macrolactone Antibiotic Produced by *Streptomyces* sp. Acta 3062. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 6, p. 1018-1024, 2012/06/22 2012.

HRYNKIEWICZ, K.; BAUM, C. The Potential of Rhizosphere Microorganisms to Promote the Plant Growth in Disturbed Soils. In: MALIK, A. e GROHMANN, E. (Ed.). **Environmental Protection Strategies for Sustainable Development**: Springer Netherlands, 2012. cap. 2, p.35-64. (Strategies for Sustainability).

ILIE, A. et al. P450-catalyzed regio- and stereoselective oxidative hydroxylation of disubstituted cyclohexanes: creation of three centers of chirality in a single CH-activation event. **Tetrahedron**, v. 71, n. 3, p. 470-475, 2015/01/21/ 2015.

JOHANSEN, K. T.; WUBSHET, S. G.; NYBERG, N. T. HPLC–NMR Revisited: Using Time-Slice High-Performance Liquid Chromatography–Solid-Phase Extraction–Nuclear Magnetic Resonance with Database-Assisted Dereplication. **Analytical Chemistry**, v. 85, n. 6, p. 3183-3189, 2013/03/19 2013.

KEOHANE, C. E.; STEELE, A. D.; WUEST, W. M. The Rhizosphere Microbiome: A Playground for Natural Product Chemists. **Synlett**, v. 26, n. 20, p. 2739-2744, // 07.12.2015 2015.

KOSHIMURA, M. et al. Biotransformation of bromosenesquiterpenes by marine fungi. **Phytochemistry**, v. 70, n. 17, p. 2023-2026, 2009/12/01/ 2009.

KUMAR, A.; AHMAD, A. Biotransformation of vinblastine to vincristine by the endophytic fungus *Fusarium oxysporum* isolated from *Catharanthus roseus*. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 31, n. 2, p. 89-93, 2013/04/01 2013.

KURIATA-ADAMUSIAK, R. et al. Biotransformation of bicyclic terpenoid ketones towards compounds with olfactory properties. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 26, n. 5, p. 351-355, 2011.

KUSARI, S.; SPITELLET, M. (2012). **Metabolomics of Endophytic Fungi Producing Associated Plant Secondary Metabolites: Progress, Challenges and Opportunities**, **Metabolomics**, Dr Ute Roessner (Ed.), InTech.

KUSARI, S. et al. An endophytic fungus from *Azadirachta indica* A. Juss. that produces azadirachtin. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 3, p. 1287-1294, 2012/03/01 2012.

KUSARI, S.; ZÜHLKE, S.; SPITELLER, M. An Endophytic Fungus from *Camptotheca acuminata* That Produces Camptothecin and Analogues. **Journal of Natural Products**, v. 72, n. 1, p. 2-7, 2009/01/23 2009.

LATHAM, J. et al. Integrated catalysis opens new arylation pathways via regiodivergent enzymatic C–H activation. **Nature Communications**, v. 7, p. 11873, 06/10/online 2016.

LIDE, D.R., G.W.A. MILNE (eds.). **Handbook of Data on Organic Compounds**. Volume I. 3rd ed. CRC Press, Inc. Boca Raton ,FL. 1994., p. V5: 5004

LIM, G.-H. et al. Fatty Acid– and Lipid-Mediated Signaling in Plant Defense. **Annual Review of Phytopathology**, v. 55, n. 1, p. 505-536, 2017/08/04 2017..

LIN, B.; TAO, Y. Whole-cell biocatalysts by design. **Microbial Cell Factories**, v. 16, n. 1, p. 106, 2017/06/13 2017.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras : manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2009.

LUDWICZUK, A.; SKALICKA-WOŹNIAK, K.; GEORGIEV, M. I. Chapter 11 - Terpenoids A2 - Badal, Simone. In: DELGODA, R. (Ed.). **Pharmacognosy**. Boston: Academic Press, 2017. p.233-266.

MAGUIRE, G. Systems Biology Approach to Developing “Systems Therapeutics”. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 5, n. 5, p. 453-455, 2014/05/08 2014.

MAREE, J. et al. The application of GC–MS combined with chemometrics for the identification of antimicrobial compounds from selected commercial essential oils. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 130, n. 0, p. 172-181, 1/15/ 2014.

MARTENS, E.; DEMAİN, A. L. The antibiotic resistance crisis, with a focus on the United States. **The Journal Of Antibiotics**, v. 70, p. 520, 03/01/online 2017.

MENDES, R.; GARBEVA, P.; RAAIJMAKERS, J. M. The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. **FEMS Microbiol Rev**, v. 37, n. 5, p. 634-63, Sep 2013.

MILLOT, M.; DIEU, A.; TOMASI, S. Dibenzofurans and derivatives from lichens and ascomycetes. **Natural Product Reports**, v. 33, n. 6, p. 801-811, 2016.

MIRANDA, M. et al. Triterpenos e Outros Constituintes dos Frutos de *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong (Fabaceae). **Rev. Virtual Quim.**, 7 (6), 2597-2605, 2015.

MOLINA, G. et al. Comparative study of the bioconversion process using R-(+)- and S-(–)-limonene as substrates for *Fusarium oxysporum* 152B. **Food Chemistry**, v. 174, p. 606-613, 5/1/ 2015.

MONTEIRO, A. F. et al. Structure and Absolute Configuration of Diterpenoids from *Hymenaea stigonocarpa*. **Journal of Natural Products**, v. 78, n. 6, p. 1451-1455, 2015/06/26 2015.

_____. Biotransformation of labdane and halimane diterpenoids by two filamentous fungi strains. **Royal Society Open Science**, v. 4, n. 11, 2017.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55-63, 12/16/ 1983.

MULCHANDANI, N. B.; HASSARAJANI, S. A. CASSINICINE, A NEW ALKALOID AND ANTHRAQUINONES FROM CASSIA SPECTABILIS AND THEIR BIOGENETIC RELATIONSHIP. **Planta Med**, v. 32, n. 08, p. 357-361, //13.01.2009 1977.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 3, p. 311-335, 2012/03/23 2012.

_____. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629-661, Mar 2016.

NOGUEIRA, R. T. et al. Clerodane-type diterpenes from the seed pods of *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa*. **Phytochemistry**, v. 58, n. 8, p. 1153-1157, 12// 2001.

PATRIDGE, E. et al. An analysis of FDA-approved drugs: natural products and their derivatives. **Drug Discovery Today**, v. 21, n. 2, p. 204-207, Feb 2016.

PEREIRA, R. M. et al. Alkaloids derived from flowers of *Senna spectabilis*, (–)-cassine and (–)-spectaline, have antiproliferative activity on HepG2 cells for inducing cell cycle arrest in G1/S transition through ERK inactivation and downregulation of cyclin D1 expression. **Toxicology in Vitro**, v. 31, p. 86-92, 3// 2016.

PHILIPPOT, L. et al. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. **Nat Rev Micro**, v. 11, n. 11, p. 789-799, 11//print 2013.

PIVATTO, M. Espectrometria de massas aplicada aos estudos de biossíntese de alcalóides de *Senna spectabilis*. 2010. 198 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química, 2010.

PYE, C. R. et al. Retrospective analysis of natural products provides insights for future discovery trends. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 22, p. 5601, 2017.

RAMSAY, R. R. et al. Key Targets for Multi-Target Ligands Designed to Combat Neurodegeneration. **Frontiers in Neuroscience**, v. 10, p. 375, 2016.

RESCH, V.; HANEFELD, U. The selective addition of water. 2015/02/26 2015.

RICO-MARTINEZ, M. et al. Biotransformation of diterpenes. **RSC Advances**, v. 4, n. 21, p. 10627-10647, 2014.

ROCHA, A. D. et al. Hydroxylation at Carbon-2 of ent-16-Oxo-17-norkauran-19-oic Acid by *Fusarium proliferatum*. **Journal of Natural Products**, v. 73, n. 8, p. 1431-1433, 2010/08/27 2010.

_____. Synthesis of a new allelopathic agent from the biotransformation of ent-15 α -hydroxy-16-kauren-19-oic acid with *Fusarium proliferatum*. **Natural Product Research**, v. 31, n. 22, p. 2647-2653, 2017/11/17 2017.

RODRIGUES, T. et al. Counting on natural products for drug design. **Nature Chemistry**, v. 8, p. 531, 04/25/online 2016.

RODRIGUES-FILHO, E. et al. Hydroxylation of the Labdane Diterpene Cupressic Acid by *Fusarium graminearum*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 13, p. 266-269, 2002.

RODRIGUEZ, R. J. et al. Fungal endophytes: diversity and functional roles. **New Phytologist**, v. 182, n. 2, p. 314-330, 2009.

SASSA, T.; IGARASHI, M. Structures of (-)-Mycousnine, (+)-Isomycousnine and (+)-Oxymycousnine, New Usnic Acid Derivatives from Phytopathogenic *Mycosphaerella nawae*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 54, n. 9, p. 2231-2237, 1990.

SCHREWE, M. et al. Whole-cell biocatalysis for selective and productive C-O functional group introduction and modification. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6346-6377, 2013.

SCHUSTER, M. et al. Acyl-Homoserine Lactone Quorum Sensing: From Evolution to Application. **Annual Review of Microbiology**, v. 67, n. 1, p. 43-63, 2013/09/08 2013.

SELEGATO, D. M. et al. Update: Biological and Chemical Aspects of *Senna spectabilis*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 3, p. 415-426, Mar 2017.

SHINONAGA, H. et al. Pochonins K–P: new radicicol analogues from *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* and their WNT-5A expression inhibitory activities. **Tetrahedron**, v. 65, n. 17, p. 3446-3453, 2009/04/25/ 2009.

SHITAN, N.; MORITA, M.; YAZAKI, K. Identification of a nicotine transporter in leaf vacuoles of *Nicotiana tabacum*. **Plant Signaling & Behavior**, v. 4, n. 6, p. 530-532, 03/31/2009.

SIEBER, T. N. Endophytic fungi in forest trees: are they mutualists? **Fungal Biology Reviews**, v. 21, n. 2–3, p. 75-89, 5// 2007.

SILVA, F. D. O. et al. Constituintes químicos das folhas de *Senna spectabilis* (DC) Irwin & Barneby var. *excelsa* (Schrad.) Irwin & Barneby. **Química Nova**, v. 33, p. 1874-1876, 2010.

SINGH, M.; SINGH, J. Chemical Examination of the Seeds of *Cassia spectabilis*. **Zeitschrift für Naturforschung B**. 39: 1425 p. 1984.

STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. **Science**, v. 260, n. 5105, p. 214-6, Apr 9 1993.

TANG, H.; XIAO, C.; WANG, Y. Important roles of the hyphenated HPLC-DAD-MS-SPE-NMR technique in metabonomics. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 47, n. S1, p. S157-S162, 2009.

TAPIA, A. A. et al. Hydroxylation of dehydroabietic acid by *Fusarium* species. **Phytochemistry**, v. 46, n. 1, p. 131-133, 1997/09/01 1997.

TOMODA, H. et al. Binding site for fungal β -lactone hymeglusin on cytosolic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1636, n. 1, p. 22-28, 2004/02/27/ 2004.

TOYOMASU, T.; SASSA, T. 1.17 - Diterpenes. In: (Ed.). **Comprehensive Natural Products II**. Oxford: Elsevier, 2010. p.643-672.

VANZOLINI, K. L. et al. Acetylcholinesterase Immobilized Capillary Reactors–Tandem Mass Spectrometry: An On-Flow Tool for Ligand Screening. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 56, n. 5, p. 2038-2044, 2013/03/14 2013.

VIEGAS, C. et al. Further Bioactive Piperidine Alkaloids from the Flowers and Green Fruits of *Cassia spectabilis*. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 5, p. 908-910, 2004/05/01 2004.

VIEGAS JUNIOR, C. et al. Aspectos químicos, biológicos e etnofarmacológicos do gênero *Cassia*. **Química Nova**, v. 29, p. 1279-1286, 2006.

WACHTMEISTER, J.; ROTHER, D. Recent advances in whole cell biocatalysis techniques bridging from investigative to industrial scale. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 42, p. 169-177, 2016/12/01/ 2016.

WANG, M. et al. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. **Nature Biotechnology**, v. 34, p. 828, 08/09/online 2016.

WILSON, M. R.; GALLIMORE, W. A.; REESE, P. B. Steroid transformations with *Fusarium oxysporum* var. *cubense* and *Colletotrichum musae*. **Steroids**, v. 64, n. 12, p. 834-843, 1999/12/01/ 1999.

WOLFENDER, J.-L.; MARTI, G.; FERREIRA QUEIROZ, E. Advances in Techniques for Profiling Crude Extracts and for the Rapid Identification of Natural Products: Dereplication,

Quality Control and Metabolomics. **Current Organic Chemistry**, v. 14, n. 16, p. 1808-1832, // 2010.

XU, L. et al. β -Resorcylic Acid Lactones from a Paecilomyces Fungus. **Journal of Natural Products**, v. 73, n. 5, p. 885-889, 2010/05/28 2010.

YUAN, H. et al. The Traditional Medicine and Modern Medicine from Natural Products. **Molecules**, v. 21, n. 5, 2016.

YULIANA, N. et al. Metabolomics for the rapid dereplication of bioactive compounds from natural sources. **Phytochemistry Reviews**, v. 12, n. 2, p. 293-304, 2013/06/01 2013.

ZHAN, M.; CHINGOZHA, L.; LU, H. Enabling Systems Biology Approaches Through Microfabricated Systems. **Analytical Chemistry**, v. 85, n. 19, p. 8882-8894, 2013/10/01 2013.

ZHANG, H. et al. Effective multi-step functional biotransformations of steroids by a newly isolated *Fusarium oxysporum* SC1301. **Tetrahedron**, v. 69, n. 1, p. 184-189, 1/7/ 2013.

ZHANG, H. W.; SONG, Y. C.; TAN, R. X. Biology and chemistry of endophytes. **Natural Product Reports**, v. 23, n. 5, p. 753-771, 2006.

ZHAO, Y.-Y. Metabolomics in chronic kidney disease. **Clinica Chimica Acta**, v. 422, n. 0, p. 59-69, 6/25/ 2013.