

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

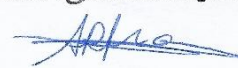
TÍTULO DA TESE: "Perfil metabólico das raízes de *Senna spectabilis* e exploração de fungos associados à sua microbiota para produção e biotransformação de metabólitos secundários"

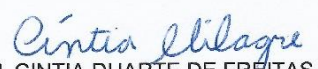
AUTOR: AFIF FELIX MONTEIRO

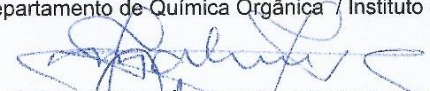
ORIENTADOR: IAN CASTRO GAMBOA

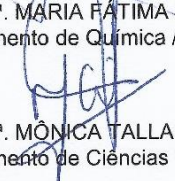
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em QUÍMICA, pela Comissão Examinadora:


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, RICHEL 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 (27/03/2018)	Total de citações: 9	Fator H: 2
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. Letícia 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 (F_{SM}) 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 F_{SM} 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, consequentemente, 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 *Rhinochrysiopsis 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 spectraline 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 *Rhinoctadiella 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 hymeglusina (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 - Cl 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
$\text{\AA}$	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 Ensaios 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 sempevirens* (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).

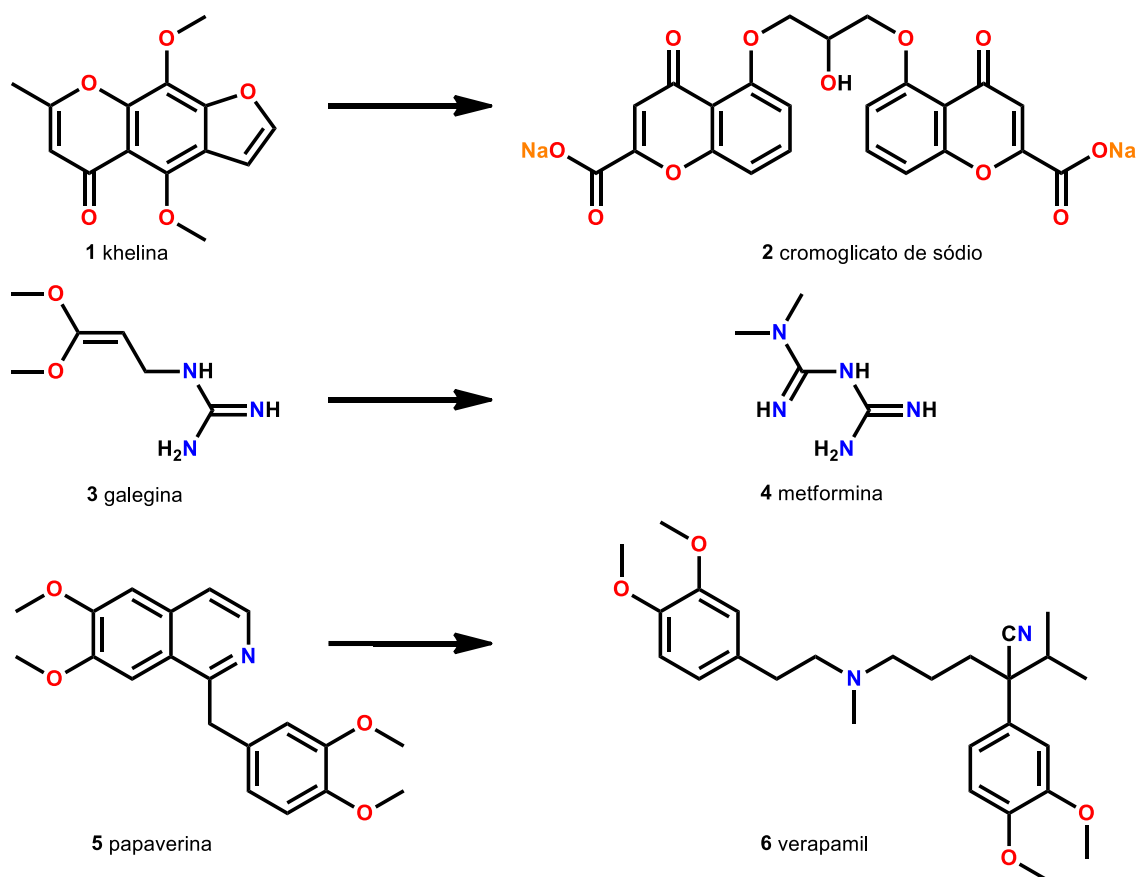
Os gregos e romanos contribuíram substancialmente para o desenvolvimento racional do uso de ervas medicinais no antigo mundo ocidental. Dioscórides, um médico grego (100 d.C.), registrou com precisão a coleção, o armazenamento e o uso de ervas medicinais durante sua viagem com exércitos romanos pelo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

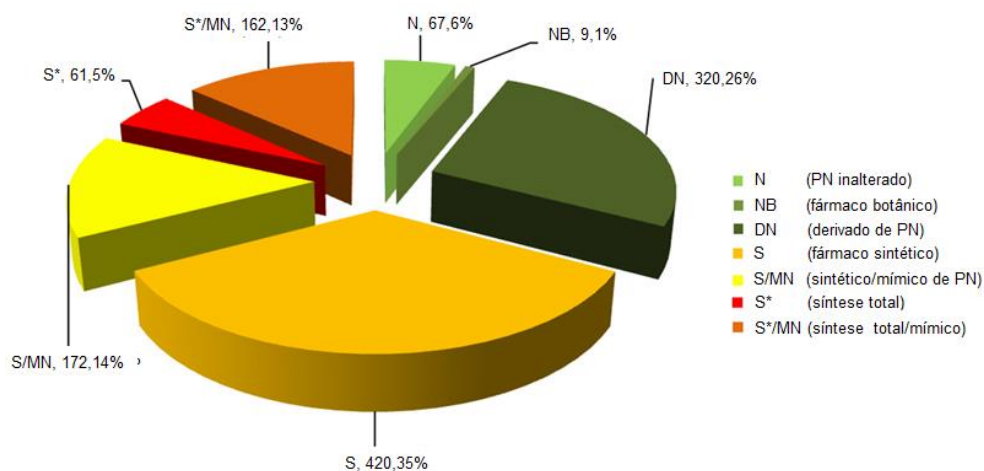
(RMN) e espectrometria de massas (EM); e de biologia molecular - fornecendo rotas alternativas para a geração de produtos naturais. Tais progressos facilitaram a compatibilidade de produtos naturais com os programas industriais de descoberta de fármacos (Bertrand *et al.*, 2014).

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, todas 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.

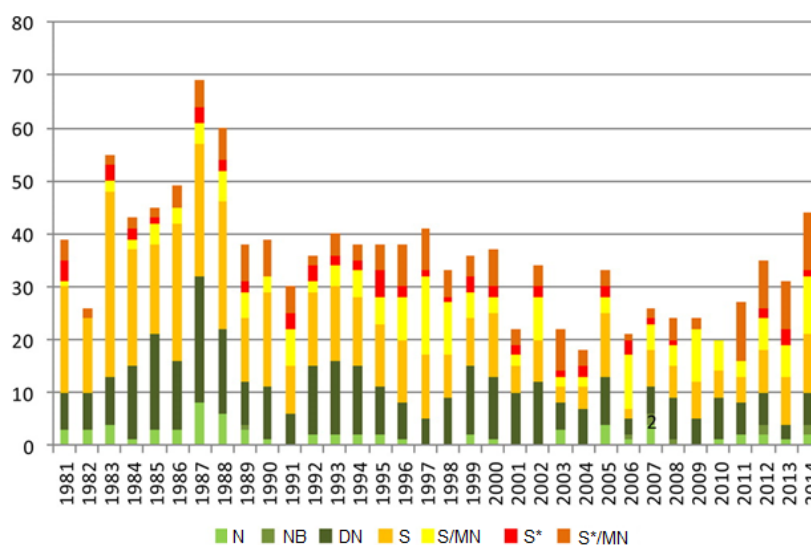
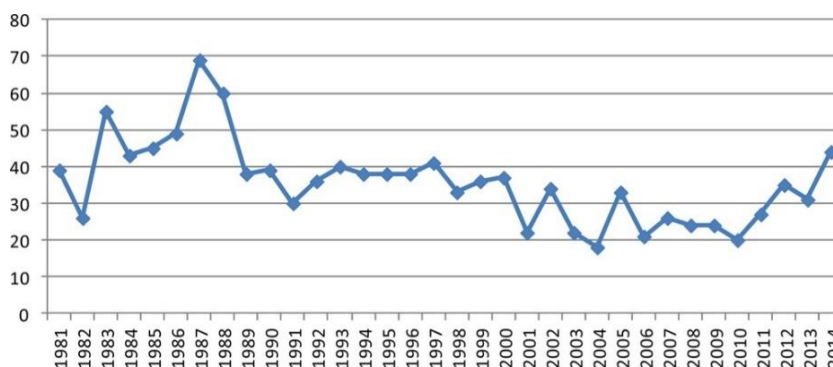


Figura 4 - Total de fármacos aprovados/ano.



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 - PLSDA (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 PN. 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 ChempSpider, 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 - sinônímias 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).

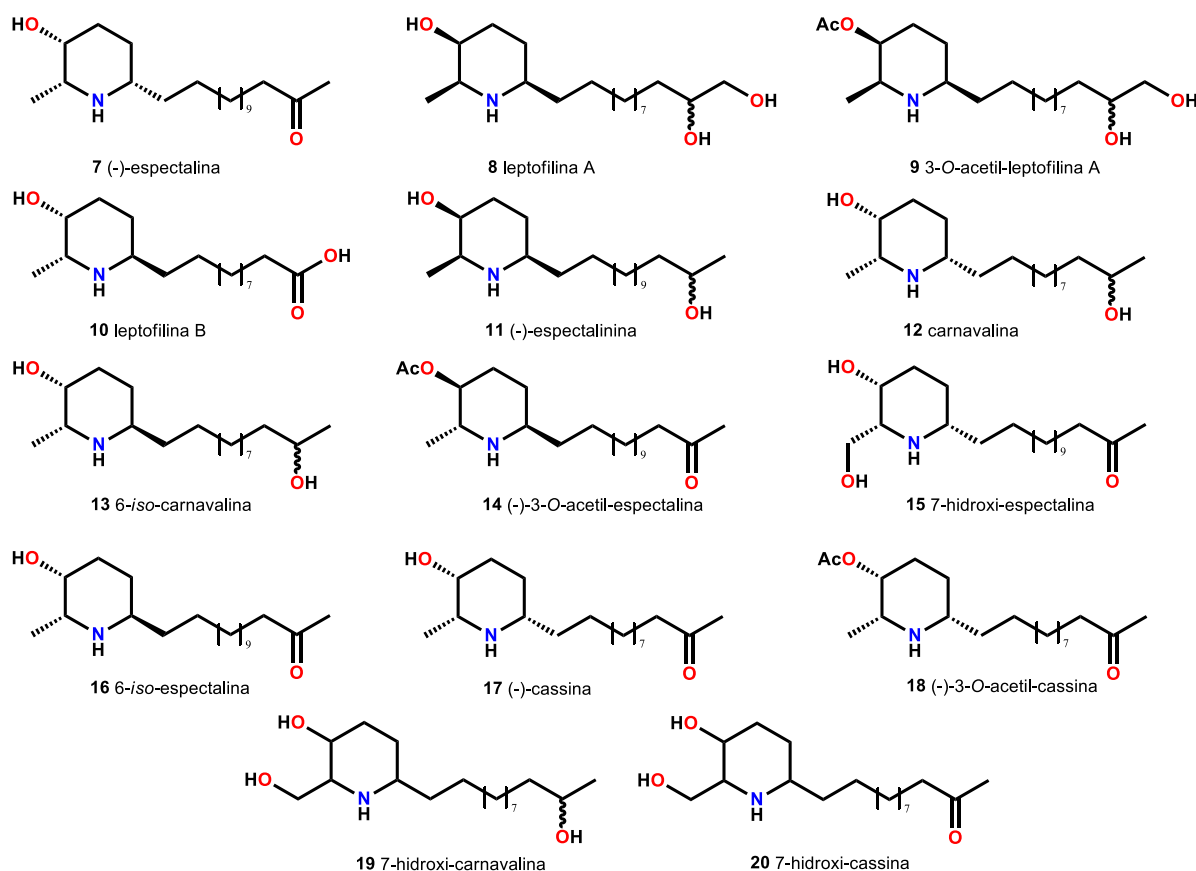
1.1.1.7 Estudos químicos e biológicos de *S. spectabilis*

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*.

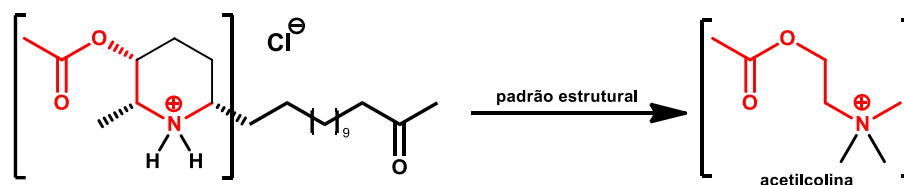
Anos depois, Viegas Jr. e colaboradores (2004) isolaram três novos alcaloides (Figura 6) das flores de *S. spectabilis*: (-)-3-*O*-acetil-espectalina (**14**), (-)-7-hidroxi-espectalina (**15**), e 6-*iso*-espectalina (**16**). Dentre esses compostos, **14** chamou atenção por apresentar uma unidade 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).

1.2 OBJETIVOS

O objetivo desse trabalho consistiu na determinação do perfil químico do extrato etanólico das raízes de mudas de *S. spectabilis*, para a identificação de alcaloides piperidínicos e de outras classes de compostos previamente relatados, visando a obtenção de informações sobre o metabolismo secundário deste órgão, até então desconhecidas.

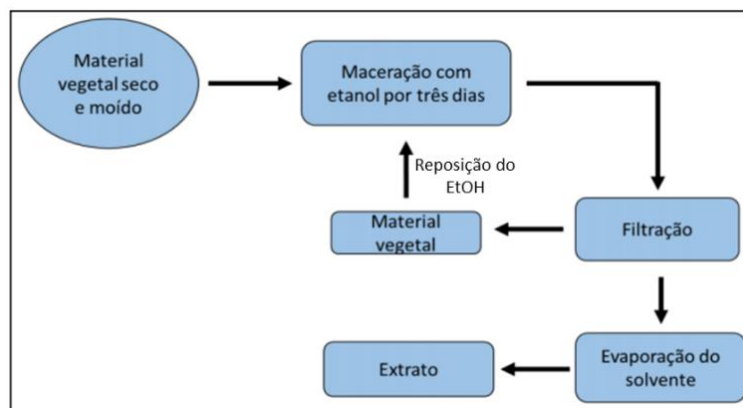
1.3 PARTE EXPERIMENTAL

1.3.1 Origem do material vegetal e preparo do extrato etanólico das raízes

Plântulas de *S. spectabilis* foram cultivadas em sistema hidropônico a partir da germinação de sementes coletadas de um espécime localizado nas proximidades do IQ-UNESP (exicata nº SP 370917). O cultivo foi realizado pela Dra. Patrícia Cardoso (supervisionada pelo Prof. Dr. Ian Castro-Gamboa), ao longo do desenvolvimento de seu projeto de doutorado. Após dezoito meses de crescimento, os espécimes (mudas adultas) foram removidos dos vasos de cultivo e suas partes vegetais foram separadas, liofilizadas e congeladas.

As raízes de um exemplar foram, então, trituradas em moinho analítico e submetidas a maceração com etanol destilado durante nove dias, realizando-se a filtração e reposição do solvente a cada três dias (Figura 8).

Figura 8 - Metodologia de preparo do extrato etanólico.



A massa de material vegetal seco, bem como o volume de solvente usado, e a massa de extrato obtida são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1 - Massa de material vegetal usado e de extrato fornecido.

Parte vegetal	Massa seca	Massa de extrato	Volume (EtOH)
Raiz	10,00 g	0,94 g	1,50 l

1.3.2 Análises cromatográficas

1.3.2.1 Análises por CLAE-EM e CLAE-EM/EM

As análises de espectrometria de massas sequencial (EM/EM) foram realizadas em um cromatógrafo Shimadzu® (composto pelos seguintes módulos bomba: LC-20AD, Detector de Arranjo de Diodos: SPD-M20A; forno de coluna: CTO-20A; injetor automático: SIL-20AHT e módulo de Comunicação: CBM-20A), acoplado a um espectrômetro de massas Amazon SL Bruker® (fonte de ionização por electrospray - ESI; analisador de massas: ionTrap).

As análises de espectrometria de massas de alta resolução foram realizadas utilizando-se um espectrômetro de massas modelo micrOTOF II-ESI-TOF (Bruker Daltonics, Billerica, MA, EUA), na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (USP) em Ribeirão Preto, sob a supervisão do Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes. As amostras ([1mg/ml]) foram solubilizadas em metanol e injetadas utilizando-se uma seringa (100 µl), adaptada a uma bomba de infusão, com fluxo de 300 µl/h. O capilar foi aquecido a 150 °C, com fluxo de gás nebulizante de 4 l/min e 4 kV. As análises foram realizadas no modo positivo. A calibração do equipamento de alta resolução foi feita com uma solução de Na-TFA de 10 mg/ml (TOF). As condições de análises foram: End Plate: 500 Volts, Capillary: 3500 Volts, Capillary Exit: 120 Volts, Skimmer 1: 50 Volts, Skimmer 2: 22 Volts, Transfer: 65 µs. As condições do espectrômetro foram: temperatura do gás de secagem de 220 °C, fluxo do gás de nebulização de 10 l/min, pressão do gás de nebulização de 5,5 Bar e gás nitrogênio. O cromatógrafo líquido acoplado foi um modelo prominence LC-20AD (SHIMADZU), constituído por bombas de alta pressão, operando na faixa de vazão de 0,0001 ml/min a 10,0000 ml/min, detector de arranjo de fotodiodos (SPD-M20A), módulo de comunicação (CBM-20A), desgaseificador (DGU-20A-5) e bomba de infusão (COLE PARMER). O método analítico consistiu em um gradiente exploratório e a eluição foi feita com H₂O/MeOH 5:95 (v/v) - ambos os solventes acidificados em 0,1% com ácido acético - até 1:0 (v/v) em 40 min, permanecendo nesta condição por mais 10 min (para a limpeza da coluna), sob vazão constante de 1,0 ml/min.

1.3.2.2 Fracionamento do extrato etanólico das raízes de *S. spectabilis* por CLAE semi-preparativa para isolamento de metabólitos

Com base no perfil químico preliminar traçado por CLAE-EM, bem como na complexidade metabólica e na presença de sinais de metabólitos não identificados, uma amostra de 60 mg do extrato das raízes (ER) foi submetida ao fracionamento por CLAE semipreparativa, conforme procedimento descrito a seguir.

As análises de CLAE foram realizadas em um instrumento prominence LC-20A (SHIMADZU), composto pelos seguintes módulos: duas bombas LC-6AD, degasificador DGU-20A, autoinjeter SIL-10AF, detector de fotoarranjo de diodos SPD-M20A; controlados pelo programa LabSolutions. As colunas utilizadas para desenvolvimento dos métodos cromatográficos foram: coluna analítica Phenomenex Kinetex®, 5 µm, C₁₈, 100 Å, (150 x 4,6 mm) e coluna semi-preparativa Phenomenex Kinetex®, 5 µm, C₁₈, 100 Å, (250 x 10,0 mm).

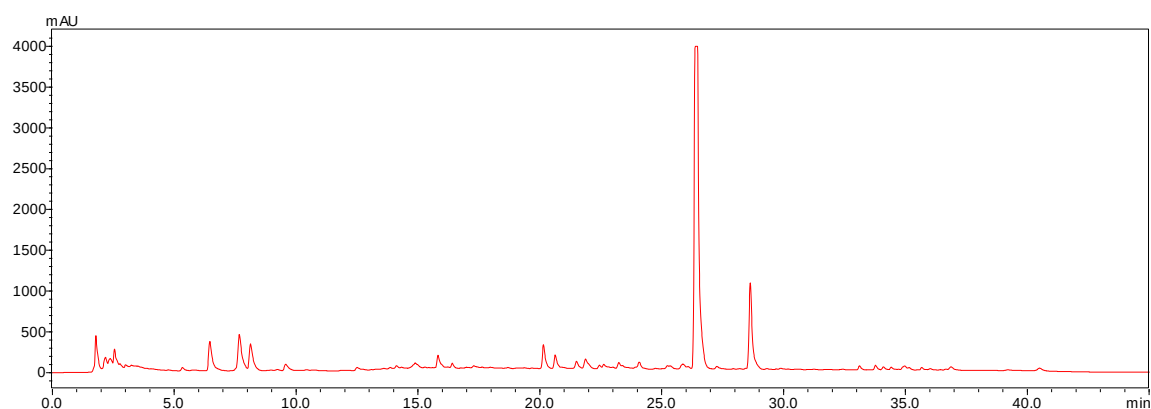
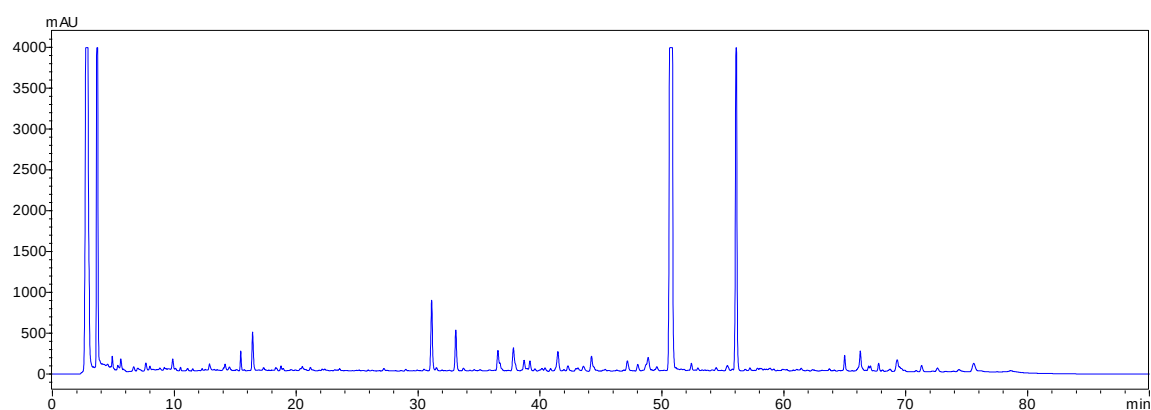
As análises cromatográficas em escala analítica (cromatograma mostrado na Figura 9) foram realizadas no modo gradiente, e eluição com H₂O (0,1% ác. fórmico)/ACN (0,1% ác. fórmico) 95:5 (v/v) até 0:100 (v/v), numa vazão constante de 1,0 ml/min, em 45 min (programação do gradiente - Tabela 2). O volume de injeção da amostra (extrato) foi de 20 µl de uma solução de concentração de 5 mg/ml e o comprimento de onda de referência monitorado foi de 254 nm.

O método analítico foi transposto para a escala semi-preparativa empregando-se uma vazão de 3,937 ml em 90 min (Tabela 2) e volume de injeção de 50 µl (solução [100 mg/ml]).

A separação resultou em 30 frações, das quais a fração ER7 (área do cromatograma referente ao intervalo de t_r 7,80 - 8,50 min, Figura 10) forneceu 1,5 mg (2,5%) da substância **07** (espectralina), a fração ER9 (t_r 9,5 - 10,0 min, Figura 9), rendeu 2,1 (4,16%) mg da substância **17** (cassina), e a fração ER26 (t_r 50,25 - 51,25) gerou 3,5 mg de uma mistura das substâncias **30** e **32**, na proporção de 1:3.

Tabela 2 - Programação do gradiente para as análises de ER.

Método analítico			Método semi-preparativo		
Tempo (min)	%B	Vazão (ml/min)	Tempo (min)	%B	Vazão (ml/min)
0,01	25	1,00	0,01	25	3,94
30,00	100	1,00	60,00	100	3,94
36,00	100	1,00	72,00	100	3,94
40,00	25	1,00	80,00	25	3,94
45,00	25	1,00	90,00	25	3,94
45,01	-	1,00	90,01	-	3,94

Figura 9 - Cromatograma do extrato ER em escala analítica ($\lambda = 254$ nm).**Figura 10** - Cromatograma do extrato ER em escala semipreparativa ($\lambda = 254$ nm).

1.3.3 Fracionamento do extrato ER por CE e separações de frações por CLAE para isolamento de metabólitos

Diante da complexidade da amostra que proporcionou um baixo rendimento de frações promissoras obtidas com o fracionamento direto do extrato, realizou-se o fracionamento de uma quantidade maior de ER (475 mg), através de CE, usando Sephadex-LH20 como fase estacionária (550 x 23 mm), e eluição no modo isocrático de polaridade, empregando-se 750 ml de fase móvel composta por AcOEt/MeOH (4:6).

O fracionamento forneceu 10 frações, das quais a fração ER3 (80.0 mg) também foi selecionada para refracionamento via CLAE semipreparativa por apresentar sinais de substâncias de interesse na análise de RMN de ^1H , empregando-se uma coluna Phenomenex Kinetex[®], 5 μ , C₁₈, 100 Å, (250 x 10,0 mm) e eluição com H₂O/ACN (ambos 0,1% em ácido fórmico), de acordo com as especificações da Tabela 3.

Tabela 3 - Programação do gradiente para fracionamento de ER3.

Método preparativo		
Tempo (min)	%B	Vazão (ml/min)
0,01	5	3,94
12,00	25	3,94
16,00	50	3,94
28,00	85	3,94
30,00	100	3,94
40,00	100	3,94
44,00	5	3,94
50,00	5	3,94
50,01	-	3,94

A separação resultou em 21 sub-frações (Figura 11), entre as quais a sub-fração ER3.7 (t_r 19,80 – 20,25 min) forneceu novamente o composto **7** (6,9 mg, 8,6%), e a sub-fração ER3.17 (t_r 37,30 – 38,00 min) proveu 7,3 mg do metabólito **31** (9,1%).

A fração ER4 (40 mg) foi refracionada por CLAE semipreparativa (Figura 12), usando-se a mesma coluna e fase móvel empregadas na separação de ER3, de acordo com as condições da Tabela 4.

Figura 11 - Cromatograma da fração ER3 em escala analítica ($\lambda = 254$ nm).

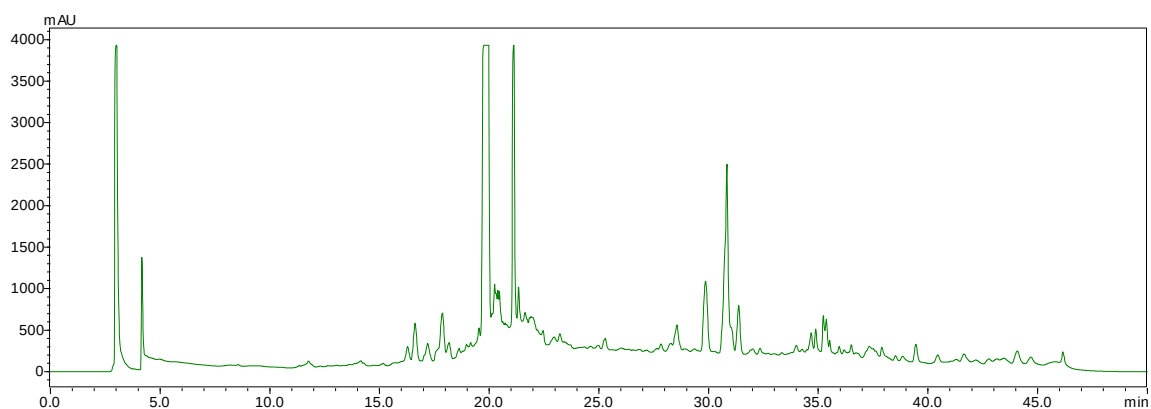
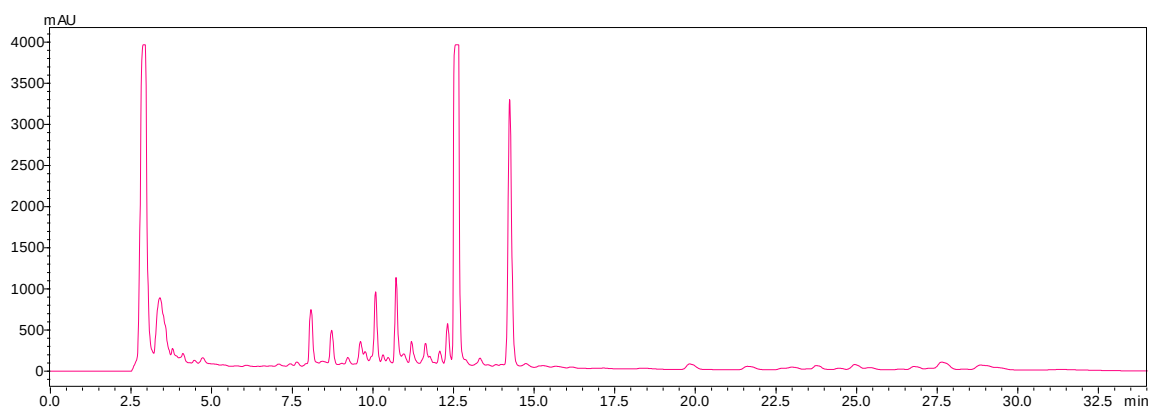


Tabela 4 - Programação do gradiente para fracionamento de ER4.

Método preparativo		
Tempo (min)	%B	Vazão (ml/min)
0,01	60	3,94
5,00	90	3,94
6,00	95	3,94
17,00	95	3,94
18,00	100	3,94
25,00	100	3,94
29,00	60	3,94
34,00	60	3,94
34,01	-	3,94

Figura 12 - Cromatograma da fração ER4 em escala semipreparativa ($\lambda = 254$ nm).

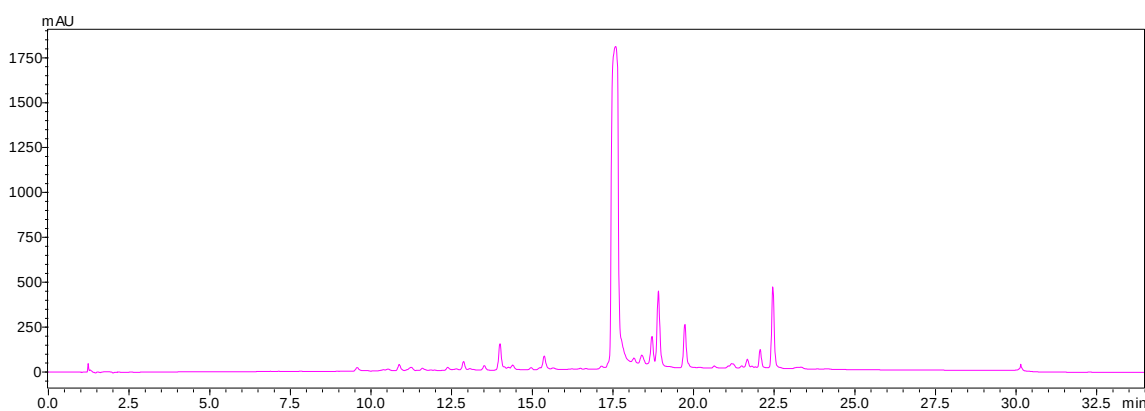


O fracionamento gerou 20 sub-frações e, destas, a sub-fração ER4.13 (t_r 13,00 – 13,45 min, 3,3 mg) foi submetida à purificação adicional por CLAE (Figura 13), utilizando-se uma coluna Phenomenex Luna 5 μ fenil-hexil® (100 x 4.6 mm) e eluição com H₂O/ACN (0,1% em ácido fórmico), de acordo com a Tabela 5.

Tabela 5 - Programação do gradiente para fracionamento de ER4.13.

Método preparativo		
Tempo (min)	%B	Vazão (ml/min)
0,01	5	1,00
20,00	100	1,00
28,00	100	1,00
30,00	5	1,00
34,00	5	1,00
34,01	-	-

Figura 13 - Cromatograma da subfração ER4.13 - escala analítica (λ = 254 nm).



O refractionamento obteve 4 subfrações, das quais a subfração RE4.13.3 (t_r 17,40 – 17,75 min) forneceu o composto **32** (1,1 mg, 33,3%).

1.3.4 Análises de espectroscopia de RMN

Os espectros de RMN foram adquiridos em um espectrômetro Bruker Avance III (600,13 MHz para ¹H e 150,9 MHz para ¹³C), equipado com sonda criogênica. As amostras foram preparadas solubilizando-as em 175 μ l de clorofórmio-*d* ou metanol-

d4 (ambos os solventes da marca Sigma Aldrich), seguido por filtração e transferência para tubos de RMN de 3,0 mm. Os FIDs foram adquiridos a 25 °C, usando sequência de pulso adequada para cada experimento selecionado. Os dados foram processados com o software Bruker Topspin 3.5pl7.

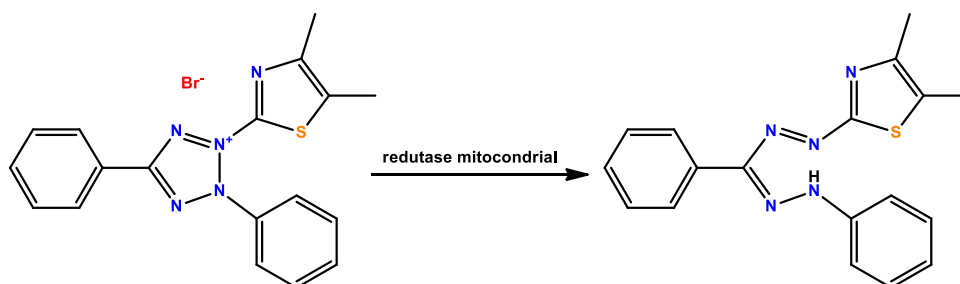
1.3.5 Ensaios de citotoxicidade

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados no Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais Marinhos, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo - SP, Brasil, pela mestrandia Larissa Costa de Almeida, sob supervisão da Profa. Dra. Letícia Veras Costa Lotufo.

As linhagens celulares utilizadas nos ensaios foram HCT-116 (carcinoma colorretal) e MCF-7 (adenocarcinoma de mama). As células foram crescidas em meio RPMI-1640 suplementado com 2.0 mM de glutamina, contendo 10% de soro fetal bovino, 100 µg/l de estreptomicina e 100 U/ml de penicilina. As células foram mantidas em 37 °C em atmosfera de CO₂.

O extrato e a substância foram diluídos em DMSO na concentração de 10 mM. O número de células plaqueadas por poço foi de 1×10^4 , em placas de 96 poços (5×10^4 células /ml em 200 µl de meio). Após 24 horas, as amostras foram adicionadas em concentrações de 5 µM (µg) e 50 µM (µg), cada concentração em duplicata, e incubadas por 72 horas. A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo e dimetilsulfóxido (DMSO) com controle negativo. Após 72 horas de incubação, o sobrenadante foi substituído por meio de cultura contendo MTT (0,5 mg/ml). Após três horas o sobrenadante foi removido, e após secagem da placa, o precipitado contendo azul de formazan de MTT foi dissolvido em 150 µl de DMSO, e a absorbância foi medida em 570 nm (Mosmann, 1983). Os valores de concentração inibitória mínima (CI₅₀), juntamente com intervalos de confiança de 95%, foram calculados por regressão não linear usando GraphPad Prism 5 com concentrações das substâncias de 0,00032 a 50 µM. O princípio do método colorimétrico do MTT consiste em medir indiretamente a viabilidade celular pela atividade enzimática mitocondrial das células vivas, as quais transformam o MTT em azul de formazan (Figura 14). Essa modificação na coloração permite avaliar a viabilidade celular no espectrofotômetro.

Figura 14 - Reação de redução do agente MTT a azul de formazan.



1.3.6 Ensaio em fluxo de compostos por colinesterases imobilizadas em reatores capilares e CLAE-IT-EM/EM

Os ensaios de inibição das enzimas acetil (AChE) e butirilcolinesterase (BChE), ambas as enzimas sendo alvos de importância terapêutica e diagnóstica da doença de Alzheimer (Ramsay *et al.*, 2016), foram realizados no Grupo de Cromatografia de Bioafinidade e Produtos Naturais da FFCLRP-USP, sob supervisão da Profa. Dra. Carmen Lúcia Cardoso.

A enzima recombinante humana Hr-AChE (C1682, SLBF4058) e do soro humano Hu-BChE (B4186, batch number SLBS4001), o substrato acetilcolina (A6625) e o inibidor padrão tacrina foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Os capilares Hr-AChE-ICER e Hu-BChE-ICER foram preparados por imobilização covalente da enzima em tubos capilares de sílica fundida (30 cm×0.375mm×100 µm I.D.), de acordo com o procedimento descrito por Vanzolini e colaboradores (2013). Os ICERs resultantes foram conectados em um sistema em fluxo de CLAE-IT-EM/EM como colunas biocromatográficas.

O equipamento de CLAE-IT-EM/EM (Shimadzu, Quioto, Japão) consistiu de duas bombas Nexera LC-20ADXR, um autoinjeter SIL 20A, com um loop de 50 µl, um degasificador DGU-20A5 e uma interface CBM-20. O cromatógrafo foi acoplado a um espectrômetro de massas AmaZon Speed Ion Trap, equipado com uma fonte de ESI, operando no modo positivo. Os dados foram adquiridos usando o software HyStar e processados com o programa Data Analysis 4.1 (Bruker Daltonics). As análises foram realizadas em 25 °C. As reações foram monitoradas por quantificação direta de colina (Ch, $[M+H]^+$ m/z 104), o produto de hidrólise da acetilcolina (ACh).

ER foi testado para a inibição de Hr-AChE e Hu-BChE. As amostras foram solubilizadas em metanol para fornecer uma solução estoque de 1.00 mM. Em seguida, amostras de 100 µl foram preparadas usando 10 µl de solução estoque (concentração final 100 µM), 20 µl de solução de acetilcolina (70 µM) e 70 µl de solução de acetato de amônio (15.0 mM, pH 8.0). As soluções foram preparadas em duplicata e alíquotas 20 µl foram usadas para injeção. Controles negativos (ausência de ACh) e positivos (presença de ACh e ausência de ligantes) foram analisadas entre cada amostra de candidato a inibidor. O percentual de inibição da amostra foi calculado por comparação entre a área de atividade enzimática na presença de inibidor (P_i) e na ausência (P_0), de acordo com a equação:

$$\% \text{inibição} = 100 - [(P_i/P_0) \times 100]$$

1.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

1.4.1 Triagem de alcaloides no extrato das raízes por Espectrometria de Massas de Alta Resolução com Ionização por Electrospray (EM-AR-IES)

O extrato etanólico das raízes foi submetido à análise de EM por infusão direta na perspectiva de detectar moléculas protonadas ($[M+H]^+$), com valores de m/z (razão massa/carga) pares, o que indica a presença de substâncias com número ímpar de átomo (s) de nitrogênio.

Os íons majoritários presentes no espectro de massas (Figura 15) foram selecionados (isolados) e fragmentados sequencialmente (EM/EM ou EM^2), empregando-se um gradiente de energia (10 - 40 eV), para fornecer informações estruturais com base nos perfis de fragmentação.

Os valores de m/z foram comparados com aqueles calculados para os compostos relatados previamente na literatura para *S. spectabilis*, os quais foram compilados em uma base de dados contendo quarenta e nove candidatos, possibilitando a seleção de estruturas químicas (com erro de até 20 ppm). Após esta etapa, a atribuição da identidade molecular foi confirmada por meio dos perfis de fragmentação.

Desta forma, foi possível constatar a presença dos alcaloides cassina (**17**) - correspondente ao íon majoritário de m/z 298,2738 (cujo o espectro de EM/EM é mostrado na Figura 16), e 7-hidroxi-cassina (**20**) - m/z 314,2625 (Figura 17).

Uma proposta de fragmentação para o composto **20** é apresentada na Figura 18. Ao analisar o espectro de EM/EM de **20** foi possível observar que um fragmento relativamente estável (m/z 296,25) foi gerado pela perda de uma molécula de água (neutra), proveniente de uma reação eliminação envolvendo a hidroxila da posição 3 do anel piperidínico. Em seguida, o fragmento de m/z 278,24 é formado pela perda da hidroxila da posição 7, pertencente ao grupo hidroximetileno, formando um dieno conjugado.

Figura 15 - Espectro de massas de IES do extrato etanólico das raízes de *S. spectabilis*.

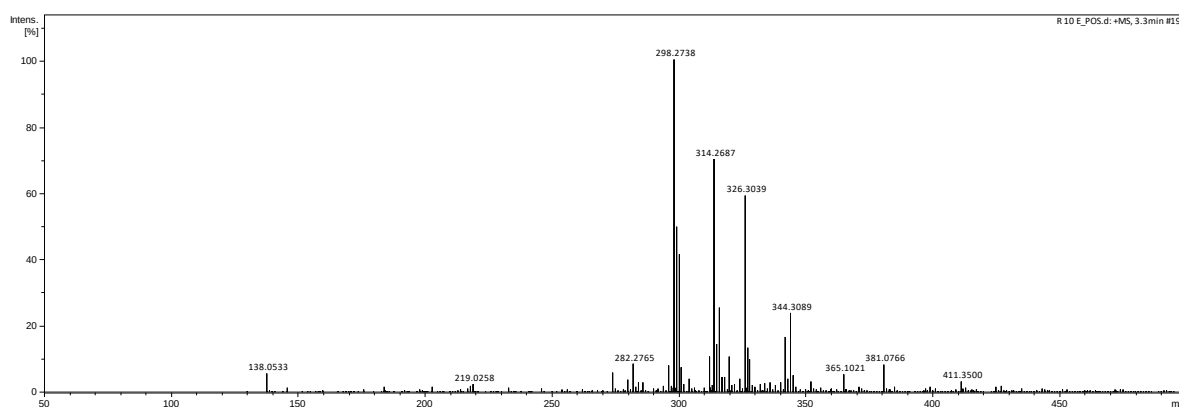


Figura 16 - Espectro de massas sequencial do íon $[M+H]^+$ de m/z 298,27.

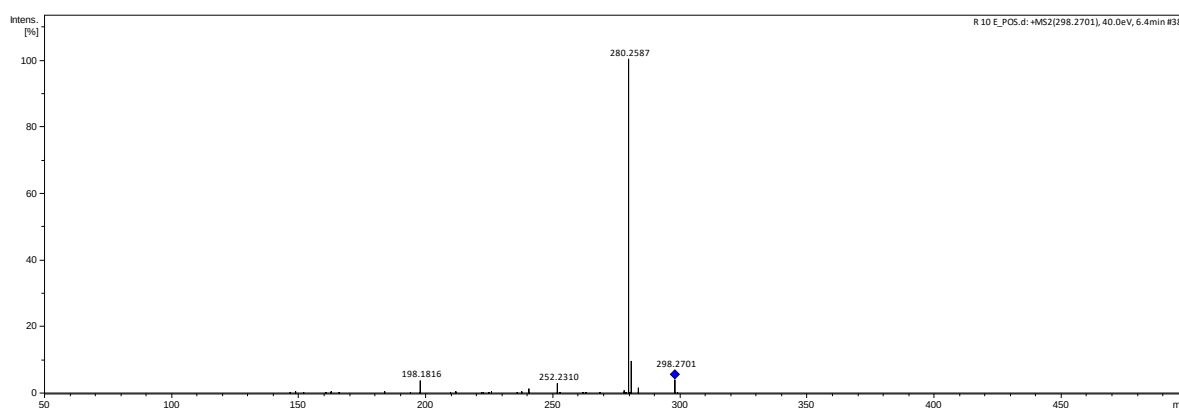
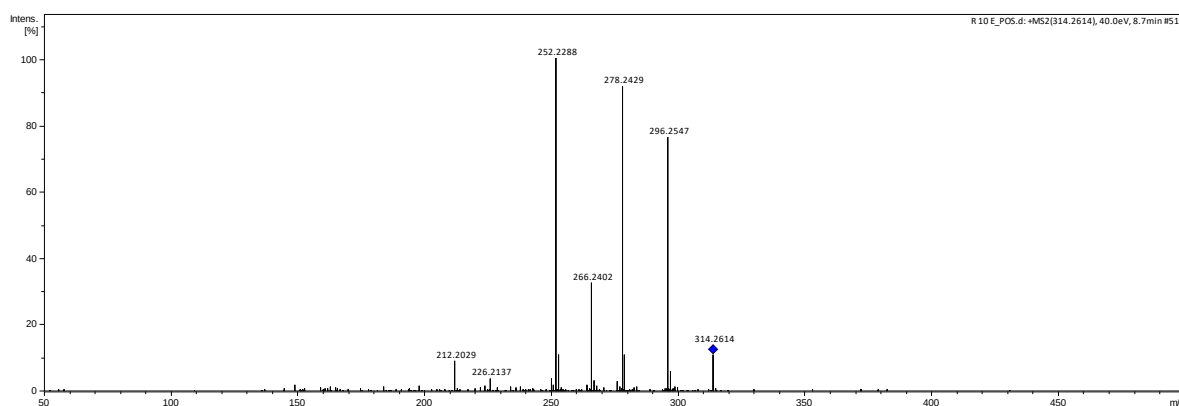
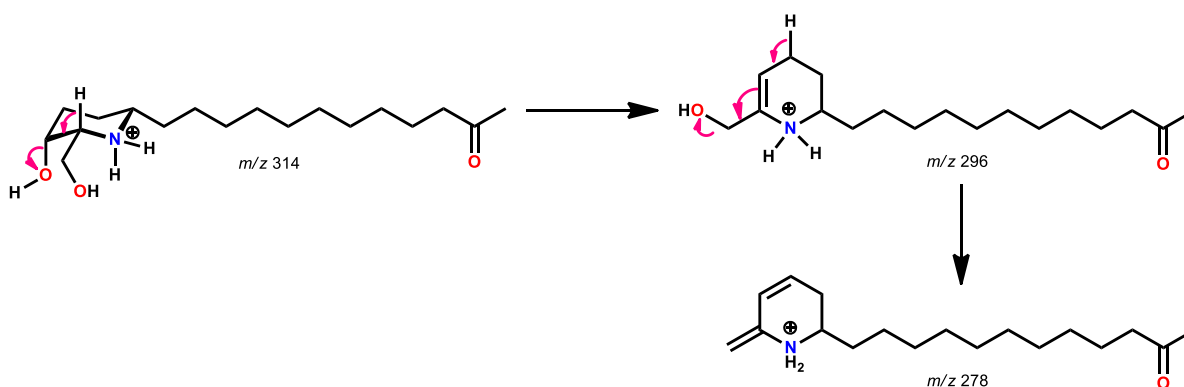


Figura 17 - Espectro de massas sequencial do íon $[M+H]^+$ de m/z 314,26.



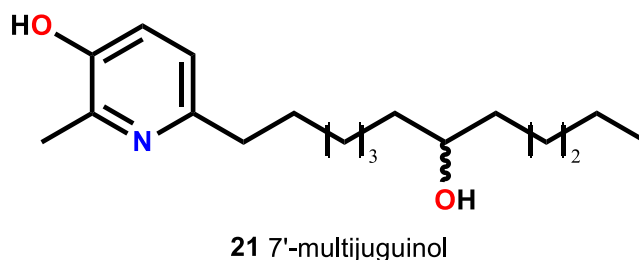
Além desses alcaloides, foi detectada a presença do íon $[M+H]^+$ de m/z 326,3039, o qual pode ser atribuído ao alcaloide espectralina (**7**). Adicionalmente, o íon de m/z 344,3039 não pôde ser associado a nenhum dos alcaloides já relatados, excluindo-se também a possibilidade de se tratar de um aduto de sódio, potássio ou amônio.

Figura 18 - Proposta de fragmentação do composto **20**.



O espectro de massas do extrato também revelou a presença de um íon majoritário de m/z 294,9299, o qual foi atribuído a um alcaloide de núcleo piridínico (**21**), denominado 7'-multijuguinol (Figura 19), identificado na fração diclorometano das flores de *S. multijuga* (Francisco *et al.*, 2012).

Figura 19 – Estrutura química do alcaloide **21**.



Ainda, foi constatada a presença de um íon de m/z 362,9148, cuja identificação também não foi possível.

Portanto, a técnica de EM por infusão direta consistiu em uma ferramenta importante para traçar o perfil alcaloídico, permitindo a identificação de alcaloides diretamente do extrato e revelando a presença dessa classe de metabólitos nas raízes de *S. spectabilis*, cuja composição química até então era totalmente desconhecida.

A ocorrência de alcaloides nas raízes de *S. spectabilis*, associada à presença abundante desses mesmos compostos em suas folhas (Mulchandani e Hassarajani, 1977), flores e frutos verdes (Viegas *et al.*, 2004), e sementes (Singh e Singh, 1984), sugere que eles devem desempenhar funções importantes para esta planta, podendo estar associados a efeitos defensivos (herbivoria), hormonais (sinalizadores) ou alelopáticos.

1.4.2 Desreplicação de compostos do extrato das raízes por CLAE-EM

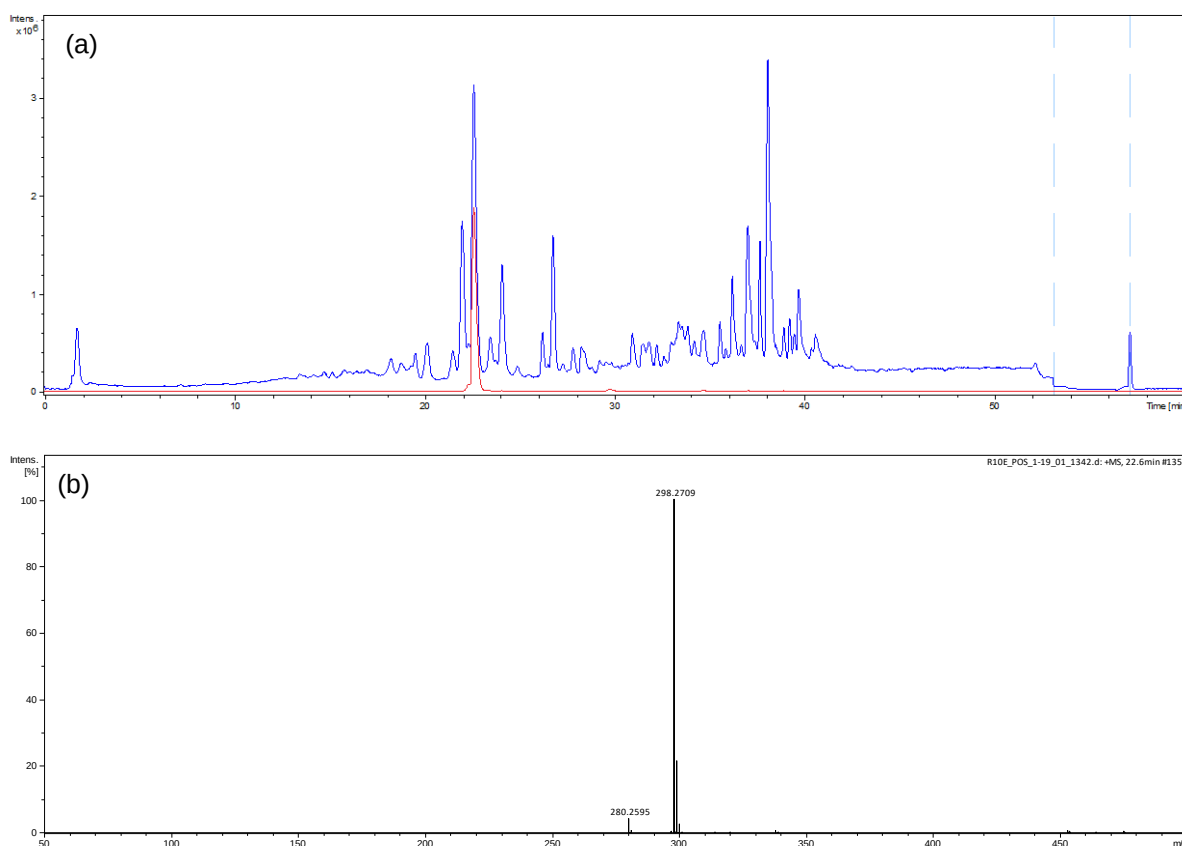
Na perspectiva de obter mais informações sobre a composição química do extrato das raízes, aliando o poder de separação da cromatografia líquida e de detecção por espectrometria de massas, o mesmo foi submetido à análises de CLAE-EM e CLAE-EM/EM, e desreplicação assistida pelas informações contidas na base de dados dos metabólitos relatados para *S. spectabilis*. Deste modo, a partir do Cromatograma de Íons Totais (TIC) obtido, foi possível realizar a busca pelos íons $[M+H]^+$ de m/z específicas, possibilitando a obtenção dos Cromatogramas de Íons Extraídos (EICs) correspondentes aos compostos presentes, aos quais estão associados os espectros de massas de alta resolução e de EM/EM, conforme exemplificado na Figura 20.

Dentre esses metabólitos, constata-se a predominância majoritária da classe de alcaloides piperidínicos. Porém, a presença de outras classes de compostos, tais como flavonas, antraquinonas, esteroides e triterpenoides sugere uma composição coerente com as demais partes de *S. spectabilis*.

Uma vez que não foi possível atribuir a identidade de diversos íons, diante da complexidade do perfil químico do extrato, decidiu-se pela realização do fracionamento do extrato, em busca de metabólitos novos, para enriquecer o conhecimento acerca da composição química das raízes de *S. spectabilis*.

Com base nessa estratégia, foram identificadas dezoito substâncias, cujos dados estão compilados na Tabela 6 e as estruturas são mostradas na Figura 21.

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).



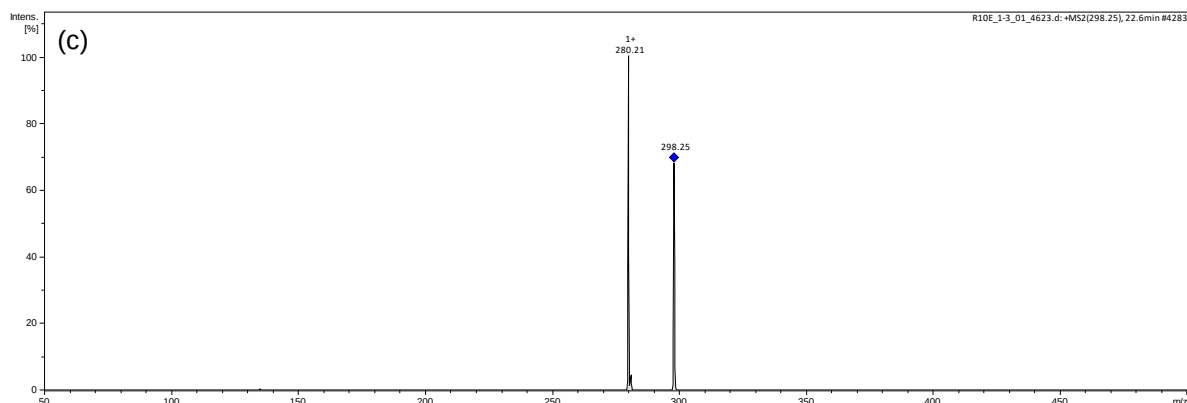
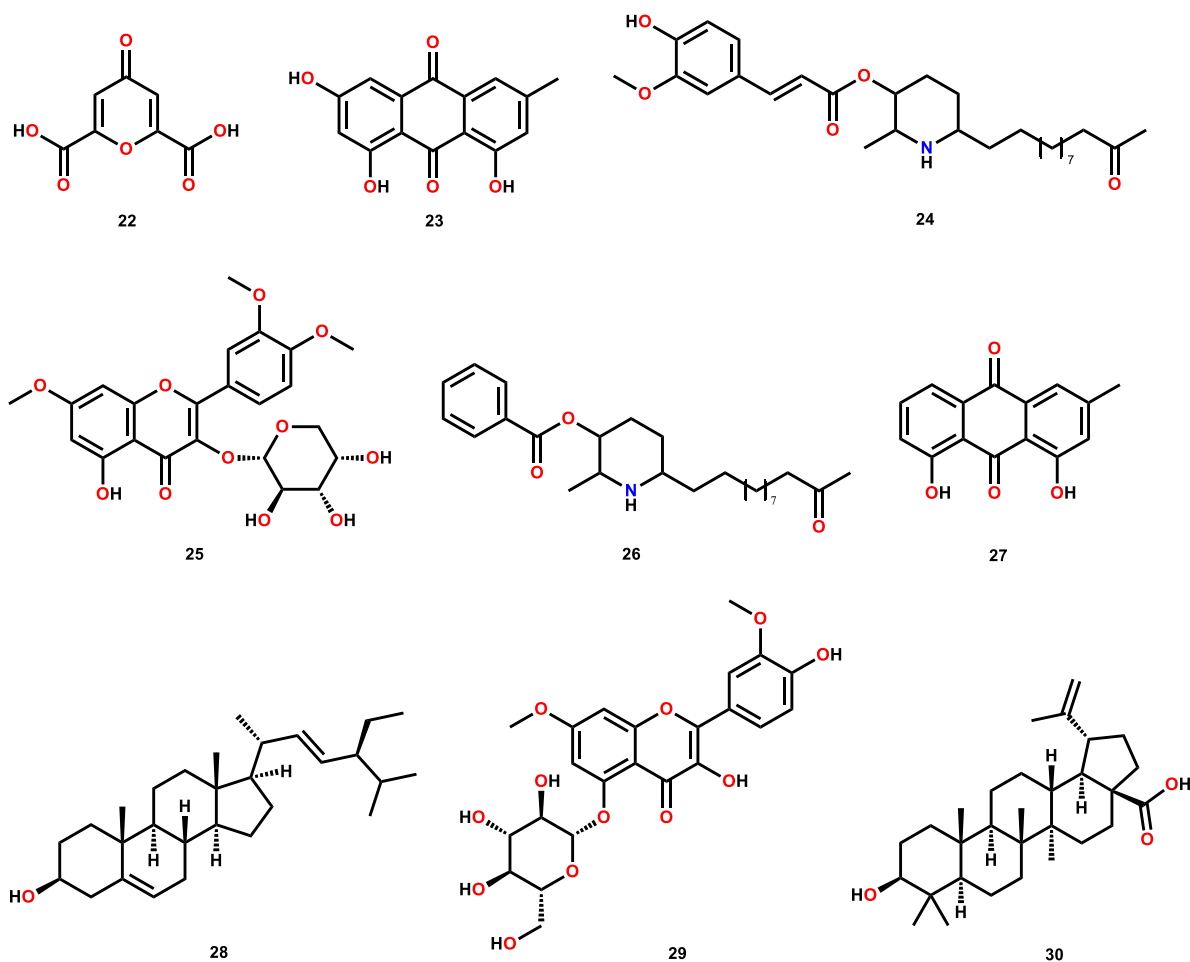


Figura 21 - Estruturas químicas dos compostos detectados por CLAE-EM e CLAE-EM².



1.4.3 Elucidação estrutural dos metabólitos isolados

A elucidação estrutural dos compostos isolados foi realizada por meio da análise dos experimentos de RMN unidimensionais (^1H , ^{13}C , TOCSY e NOESY) e bidimensionais (HSQC e HMBC), e comparação com dados da literatura.

Tabela 6 - Metabólitos identificados por CLAE-EMAR e CLAE-EM/EM.

Nº	Nome	t _r (min)	[M+H] ⁺ _{obs}	[M+H] ⁺ _{calc}	Erro (ppm)	Referência.
22	ácido quelidônico	2,4	185,0049	185,0041	4,3	<i>Current Science</i> 1984, 53, 01.
21	7'-multijuguinol	17,1	294,2389	294,2428	-13,3	<i>J. Nat. Prod.</i> 2012, 75 (3), 408-413.
18	3-O-acetilcassina	20,2	340,2563	340,2562	0,3	<i>J. Nat. Prod.</i> 2004, 67, 908-910
20	7-hidroxi-cassina	22,0	314,2655	314,2695	-12,7	<i>J. Braz. Chem. Soc.</i> 2013, 24(2), 230-235.
17	cassina	22,6	298,2709	298,2747	-12,7	<i>Planta Med.</i> 1977, 32(4), 357-61
12	carnavalina	24,1	300,2864	300,2903	-13,0	<i>Tetrahedron</i> 1995, 51(21), 5929-34
23	emodina	24,8	271,0564	271,0606	-15,5	<i>Bulletin Fac. of Science,</i> 21(2), 129 - 38, 1992
15	7-hidroxi-espectalina	26,2	342,2973	342,3008	-10,2	<i>J. Nat. Prod.</i> 2004, 67, 908-910
07	espectalina	26,8	326,3025	326,3014	3,0	<i>Planta Med.</i> 1977, 32(4), 357-61
24	3-feruloilcassina	27,0	474,3184	474,3219	-7,4	<i>J. Nat. Prod.</i> 2007, 70, 2026–2028
11	espectalinina	27,9	328,3176	328,3216	-12,2	<i>Tetrahedron</i> 1995, 51(21), 5929-34
14	3-O-acetil-espectalina	28,1	368,3158	368,3120	10,4	<i>J. Nat. Prod.</i> 2004, 67, 908-910
25	3,5-dihidroxi-7,3',4'-trimetoxiflavona-3-O-arabinopiranosídeo	35,6	477,4350	477,4397	-9,84	<i>Organische Chemie</i> 1985, 4, 550-2.
26	(R)-benzoiloxi-2(R)-metil-6(R)-(11'-oxododecil)-piperidina	35,8	402,3000	402,3008	-2,0	<i>Planta Med</i> 2003; 69(11): 1054-1056
27	crisofanol	36,2	255,0619	255,0657	14,9	<i>Bulletin Fac. of Science,</i> 1992, 21(2), 129 - 38
28	estigmasterol	39,7	413,3742	413,3783	-9,9	<i>Planta Med</i> 1977, 32(4), 357-61
29	4'-hidroxi-7,3'-dimetoxiflavona-5-O-β-D(+)-glucopiranosídeo	40,7	493,1408	493,1346	12,6	<i>Organische Chemie</i> 1985, 4, 550-2.
30	ácido betulínico	40,8	457,3702	457,3637	14,1	<i>Quim. Nova,</i> 2010, 33(9), 1874-1876

1.4.3.1 Substância 07 (espectralina)

O metabólito **07** foi isolado na forma de um sólido amarelo e sua estrutura foi identificada como sendo a do alcaloide espectralina (Figura 22), por meio da análise dos espectros de RMN e comparação com os dados relatados por Pivatto (2010).

A análise do espectro de RMN de ^1H (Figura A1), auxiliada por experimentos de TOCSY-1D, permitiu a identificação dos principais sinais característicos de um núcleo piperidínico tri-substituído: um multipeto em δ_{H} 3,21, o qual foi atribuído ao hidrogênio da posição 2 (H-2), e um dupeto em δ_{H} 1,32 ($J = 6,6$ Hz, 3H), referente à metila 7 (CH_3 -7). Além disso, ao irradiar o simpleto largo em δ_{H} 3,05 (atribuído a H-6), foi possível observar acoplamentos com os sinais de outros hidrogênios pertencentes ao sistema de spin do anel - 1,80 *m* (H-5a), 1,72 *m* (H-5b), 1,65 *m* (H-4).

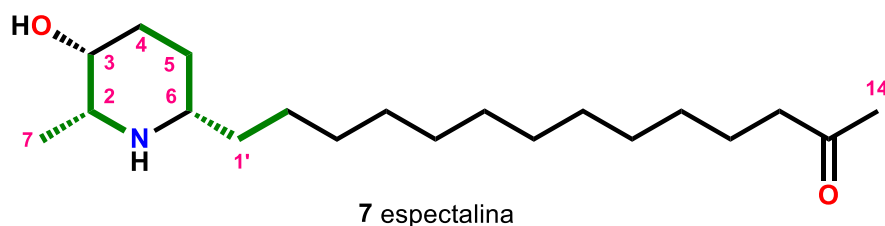
A extremidade da cadeia lateral, contendo um grupo metil-cetona, foi estabelecida com base na presença de um triplete em δ_{H} 2,47 ($J = 7,3$ Hz, 2H), o qual apresentou acoplamento com o quinteto em δ_{H} 1,56 ($J = 7,3$ Hz, 2H), sendo atribuídos aos metilenos das posições 12' e 11', respectivamente, além de um singleto em δ_{H} 2,13 (3H), referente à CH_3 -14'. Essas atribuições foram confirmadas pela análise do mapa de contorno de HMBC (Figura A4), através da observação de correlações dos sinais dos hidrogênios das posições H-14', H-12' e H-11' com C-13' (δ_{C} 211,9).

Os sinais referentes aos hidrogênios metilênicos da cadeia lateral (CH_2 -3' a CH_2 -8') encontram-se sobrepostos sob um simpleto largo, na região de δ_{H} 1,33.

As demais atribuições foram feitas com base nas correlações diretas (1J) observadas no mapa de contorno de HSQC (Figura A3) e de longa distância, fornecidas pelo HMBC, e estão compiladas na Tabela A1.

A extensão da cadeia lateral foi confirmada pelo número de sinais correspondentes a metilenos observados nos espectros de ^{13}C (Figura A2) e DEPT-135, na faixa de δ_{C} 30,2 a 30,8.

Figura 22 - Estrutura do alcaloide espectralina (**07**), mostrando as correlações visa TOCSY (verde).



1.4.3.2 Substância 17 (cassina)

O alcaloide cassina (**17**, Figura 23) foi isolado na forma de um sólido amarelo e sua estrutura foi identificada por meio da análise dos espectros de RMN e comparação com os dados espectroscópicos reportados por Pivatto (2010).

A análise do espectro de RMN de ^1H (Figura B1), juntamente com experimentos de TOCSY-1D, permitiu a identificação dos principais sinais característicos de um núcleo piperidínico tri-substituído: um quarteto aparente em δ_{H} 3,24 ($J = 6,5; 12,8$ Hz, 1H), o qual foi atribuído ao hidrogênio da posição 2 (H-2), acoplando com um duplete em δ_{H} 1,32 ($J = 6,5$ Hz, 3H), referente à metila 7 (CH₃-7). Adicionalmente, através da irradiação seletiva do multipeto em δ_{H} 3,05 (atribuído a H-6) foi possível observar acoplamentos com os sinais de outros hidrogênios pertencentes ao sistema de spin do anel - 1,75 *m* (H-5), 1,96 *m* (H-4a) - e com os multipletos em 1,55 e 1,40, os quais foram atribuídos, respectivamente, aos hidrogênios dos grupos metileno H-1' e H-2' da cadeia lateral.

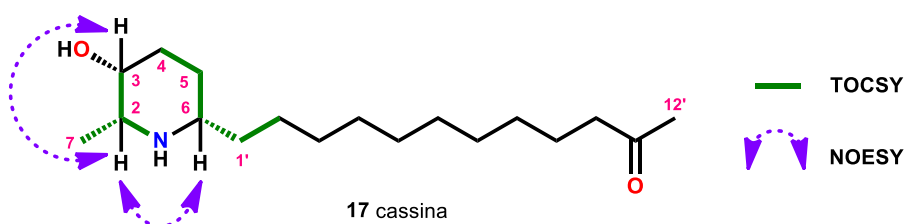
De maneira similar à estrutura **07**, a extremidade da cadeia lateral também foi estabelecida pela presença de um tripleto em δ_{H} 2,47 ($J = 7,4; 14,8$ Hz, 2H), o qual apresentou acoplamento com o multipeto em δ_{H} 1,53 ($J = 7,3$ Hz, 2H), sendo atribuídos aos metilenos das posições 10' e 9', respectivamente, além de um singlete em δ_{H} 2,13 (3H), referente à CH₃-12'. Essas atribuições foram confirmadas pela análise do mapa de contorno de HMBC (Figura B4), através da observação de correlações dos sinais dos hidrogênios das posições H-12', H-10' e H-9' com C-11' (δ_{C} 212,3). Os sinais referentes aos hidrogênios metilênicos da cadeia lateral (CH₂-3' a CH₂-8') apresentaram-se na forma de um simpleto largo, na região de δ_{H} 1,27.

As demais atribuições, feitas com base nas correlações diretas ($^1J_{H-C}$), observadas no espectro de HSQC (Figura B3) e de longa distância - HMBC (Figura B4), estão compiladas na Tabela B1.

A extensão da cadeia lateral foi confirmada pelo número de sinais correspondentes a metilenos observados nos espectros de ^{13}C (Figura B2) e DEPT 135 (na região de δ_C 30,2 - 30,6).

O alcaloide cassina, previamente identificado como um dos íons mais abundantes no espectro de massas do extrato foi alvejado para isolamento, sobretudo, com a finalidade de investigação da configuração relativa dos centros estereogênicos (por meio de NOESY-1D), em comparação àquela reportada na literatura, além de servir como padrão para diversas análises de interesse. Desta forma, a irradiação do multipeto referente à H-3 (δ_H 3,82) permitiu a observação de uma correlação (NOE) com o sinal de H-2 (δ_H 3,24, *quart*), indicando que estes grupos estão cofacialmente orientados (face β , Figura 24). O sinal em δ_H 3,05 (H-6) também apresentou correlação com H-2, sugerindo orientação β , o que aponta concordância com as configurações previamente relatadas.

Figura 23 - Estrutura do alcaloide cassina (17).



1.4.3.3 Substância 30 (ácido betulínico)

A fração R26 apresentou-se como um sólido de coloração laranja, correspondente a uma mistura das substâncias **30** e **32**, sendo que ambas apresentaram características espectrais distintas nos experimentos de RMN, motivo pelo qual suas estruturas puderam ser elucidadas mesmo em mistura.

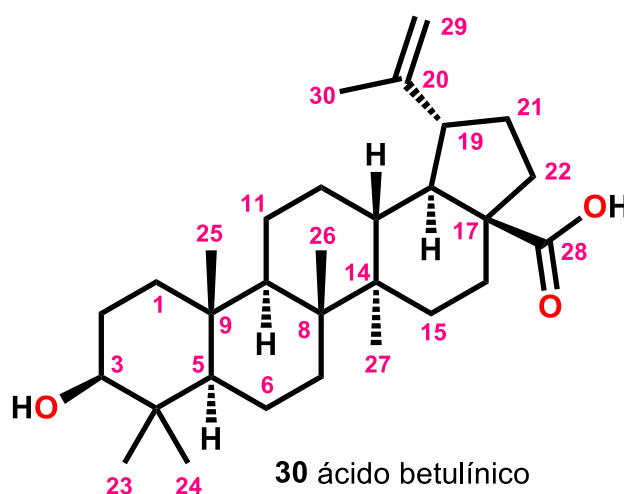
O espectro de RMN de 1H (Figura C1) revelou a presença de sinais característicos de seis grupos metílicos: δ_H 0,76, s (CH₃-24); δ_H 0,82, s (CH₃-25); δ_H

0,94, s (CH₃-26); δ_{H} 0,97, s (CH₃-23); δ_{H} 0,98, s (CH₃-27) e δ_{H} 1,69, s (CH₃-30); um duplo duplete em 3,19 ppm ($J = 4,8; 11,7$ Hz), atribuído a um hidrogênio hidroximetínico; além de dois sinais característicos de hidrogênios olefínicos: um duplete largo em 4,75 ($J = 1,8$ H) e um tripleto largo em 4,61 ppm ($J = 1,3$ Hz).

A análise conjunta dos espectros de ¹³C (Figura C2) e DEPT 135 (Figura C3) mostrou a presença de trinta sinais, dos quais seis correspondentes a grupos metila, onze metilenos, seis metinos, seis átomos de C quaternários e uma carboxila.

Esses dados sugeriram a estrutura de um triterpeno ácido pentacíclico, cuja atribuição completa de sinais (Tabela C1) realizada através da análise dos dados de HSQC (Figura C4), HMBC (Figura C5) e comparação com a literatura (Miranda *et al.*, 2015), resultou na identificação do ácido betulínico (Figura 24, **30**).

Figura 24 - Estrutura do ácido betulínico (**30**).



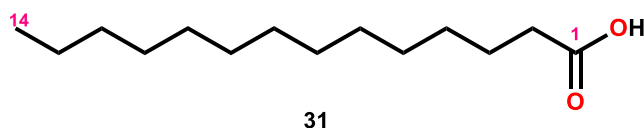
Essa substância apresenta atividade citotóxica efetiva contra uma ampla variedade de células tumorais e baixa citotoxicidade a células e tecidos normais, despertando um grande interesse como agente terapêutico no tratamento do câncer humano (Bhatia *et al.*, 2015).

1.4.3.4 Substância 31 (ácido mirístico)

A FM do composto **31** foi deduzida como $C_{14}H_{28}O_4$. O espectro de RMN de 1H (Figura D1) mostrou feição espectral característica de um ácido graxo: um tripleto em δ_H 0,90 ($J = 7,2$ Hz), típico de uma metila terminal; um quinteto em δ_H 1,60 ($J = 7,1$; 14,1 Hz) e um tripleto em 2,27 ppm ($J = 7,1$ Hz), ambos atribuíveis a grupos metilenos acoplado entre si; além de um simpleto largo em δ_H 1,29 ppm, referente a uma cadeia $-(CH_2)_n-$.

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura D2) apresentou catorze sinais, sendo um em 177,9 ppm, correspondente a ressonância de uma carboxila e os demais sinais referentes a doze grupos metileno e uma metila. As correlações diretas H-C foram atribuídas por meio da análise dos espectros de HSQC (Figura D3), e as conectividades dos átomos determinadas através de HMBC (Figura D3), revelando a estrutura do ácido tetradecanoico (Figura 25), conhecido usualmente como ácido mirístico (Lide, 1994).

Figura 25 - Estrutura do ácido mirístico (**31**).



Ácidos graxos e lipídios são constituintes majoritários e essenciais de células vegetais e fornecem não apenas integridade estrutural e energia para vários processos metabólicos, mas também podem funcionar como mediadores da transdução de sinais tanto intra, quanto intercelular. Ademais, produtos cíclicos ou acíclicos gerados durante o metabolismo de ácidos graxos também podem atuar como sinalizadores químicos importantes (Lim *et al.*, 2017).

1.4.3.5 Substância 32 (Dibenzofurano)

O metabólito **32** foi isolado como um sólido de coloração laranja. Sua fórmula molecular foi determinada como $C_{18}H_{18}O_4$ (IDH = 10), com base no espectro de

massas de alta resolução (modo positivo, Figura 26), o qual apresentou um íon de m/z 299,1279, correspondente à molécula protonada (calcd. para $C_{18}H_{19}O_4$, 299.1283).

O espectro de RMN de 1H (Figura 27) mostrou a presença de sinais representativos de três grupos metila (dos quais um apresentou ressonância em δ_H 2,41 (s), e os outros dois grupos mostraram-se quimicamente equivalentes, originando um simpleto em δ_H 1,44), um grupo metoxila (δ_H 3,77, s), quatro simpletos atribuíveis a hidrogênios aromáticos (δ_H 5,66; 6,61; 6,73; 6,88), um hidrogênio característico da funcionalidade aldeído (δ_H 9,76, s), e ainda, um sinal correspondente a um hidrogênio fenólico (δ_H 16,6).

A análise conjunta dos espectros de RMN de ^{13}C (Figura 28) e HSQC (Figuras 29 e 30) revelou doze sinais típicos de carbonos sp^2 , confirmando a presença de dois anéis aromáticos, bem como três grupos metila, um carbono oximetílico, um carbono quaternário, e ainda, uma carbonila de funcionalidade aldeído. Os deslocamentos químicos de hidrogênio foram atribuídos com base no experimento de HSQC.

Uma vez que dois anéis aromáticos e um grupo carbonila correspondem a nove insaturações, inferiu-se a presença de um terceiro anel (furano) entre os anéis aromáticos, constituindo um núcleo dibenzofurano – Figura 32 (Carpentier *et al.*, 2017). As conectividades dos substituintes nos anéis (Figura 35) foram estabelecidas por meio de experimentos de HMBC (Figura 31) e NOESY (Figuras 33 e 34).

A correlações via HMBC de H-1 (δ_H 6,61) com δ_C 158,5 (C-2) e δ_C 163,82 (C-3) permitiram determinar o posicionamento dos grupos dimetil-etanal e metoxila como ligados em C-2 e C-3 (anel A), respectivamente, bem como estabelecer as posições de H-1 e H-4 em *para* no anel. As correlações de H-9 (δ_H 6,88) com C-4a (δ_C 133,7), C-6 (δ_C 113,9) e C-14 (δ_C 22,31), sugeriram o posicionamento de H-6 e H-9 em *para*, bem como indicaram a ligação do grupo metila a C-8 e a presença de um grupo hidroxila em C-7 (anel B).

Os experimentos de NOESY (Figuras 33 e 34) confirmaram o posicionamento dos grupos nos anéis A e B, através da constatação de NOE entre os sinais de substituintes não apenas do mesmo anel, mas também de grupos em anéis diferentes (Figura 35). As principais interações observadas foram: OCH_3 -13 (δ_H 3,77) e CH_3 -12 (δ_H 1,43); CH_3 -14 (δ_H 2,40) e H-9 (δ_H 6,88); OCH_3 -13 (δ_H 3,77) e H-4 (δ_H 5,66); H-1 (δ_H 6,61) e H-4 (δ_H 5,66); H-6 (δ_H 6,73) e H-9 (δ_H 6,88); H-1 (δ_H 6,61) e H-9 (δ_H 6,88).

Desta forma, os dados corroboraram a proposta da estrutura denominada 7-hidroxi-3-metoxi-2-(10-dimetil)-etanal-8-metil-dibenzofurano (Figura 35), para a qual a atribuição completa dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C é dada na Tabela 7.

Figura 26 - Espectro de massas do composto **32** (modo positivo)

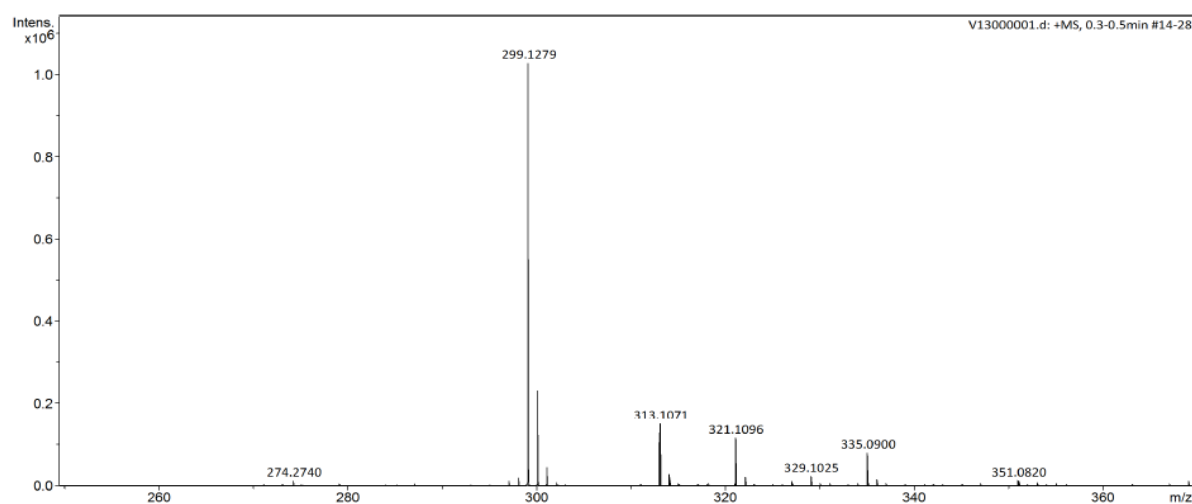


Figura 27 - Espectro de RMN de ^1H (600,13 MHz, CDCl_3) do composto **32**.

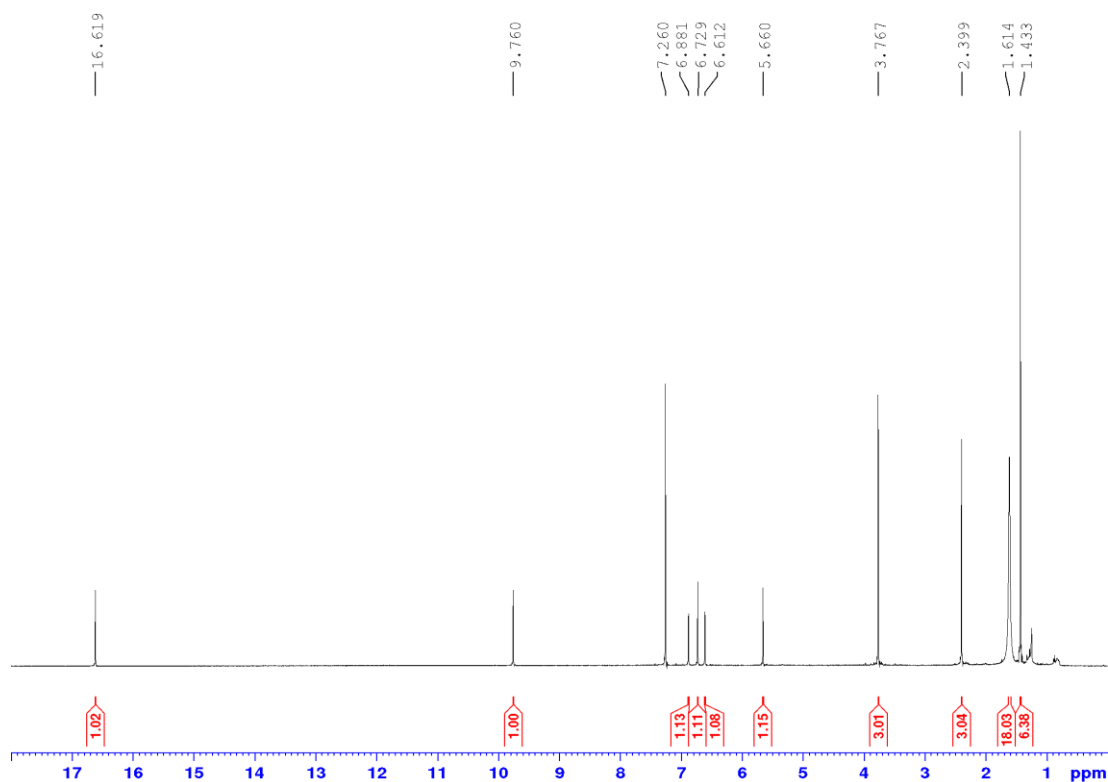


Figura 28 - Espectro de RMN de ^{13}C (150,9 MHz, CDCl_3) do composto **32**.

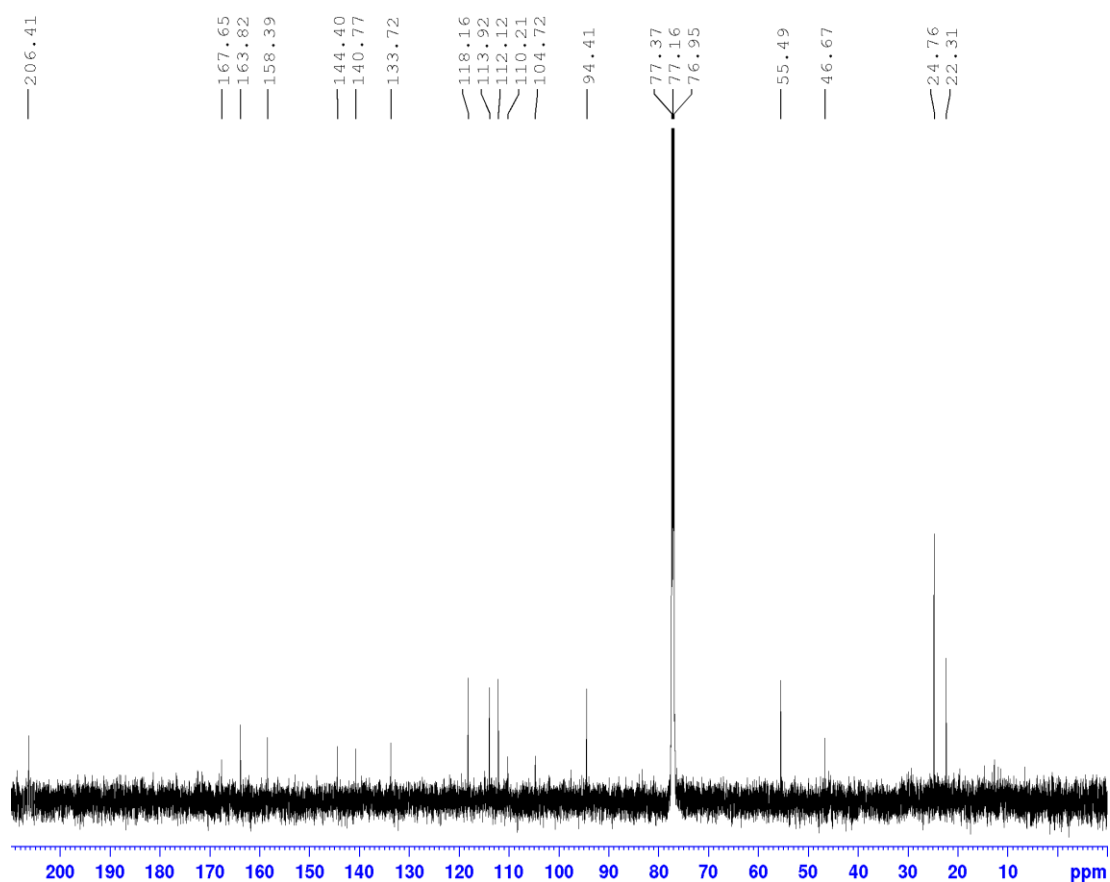


Figura 29 - Espectro de HSQC (600,13 MHz, CDCl_3) do composto **32**.

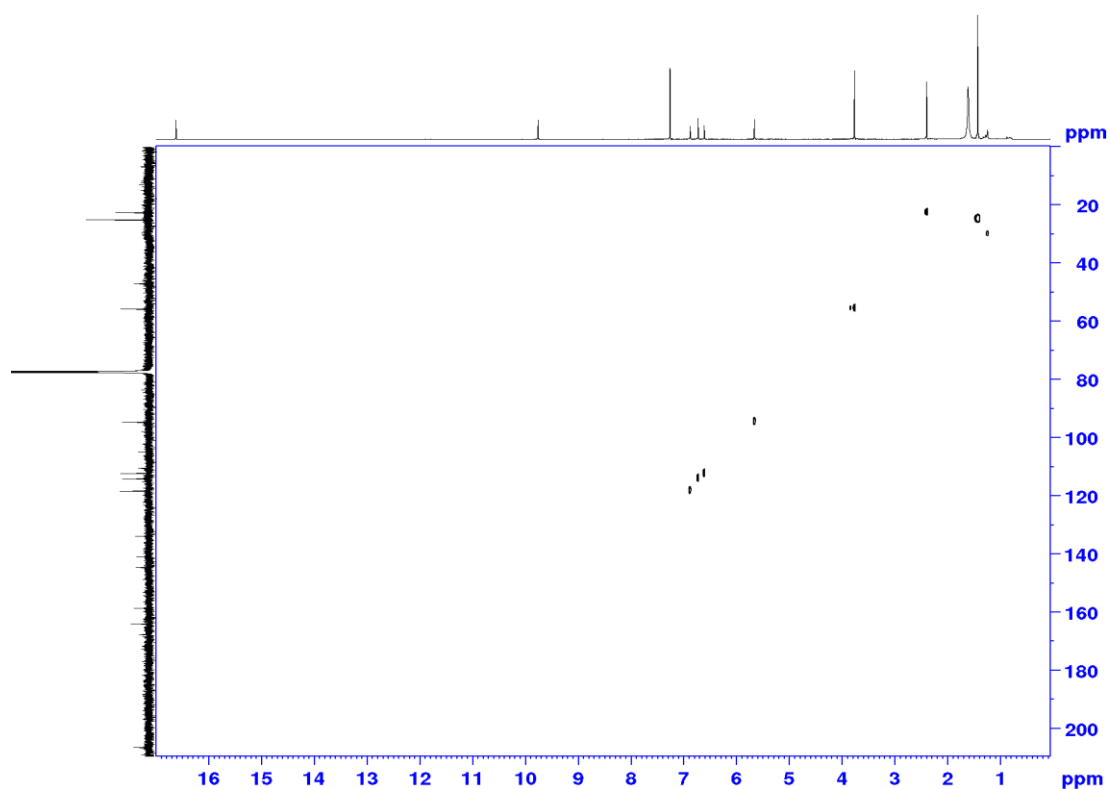


Figura 30 - Expansão do espectro de HSQC (600,13 MHz, CDCl_3) do composto **32**.

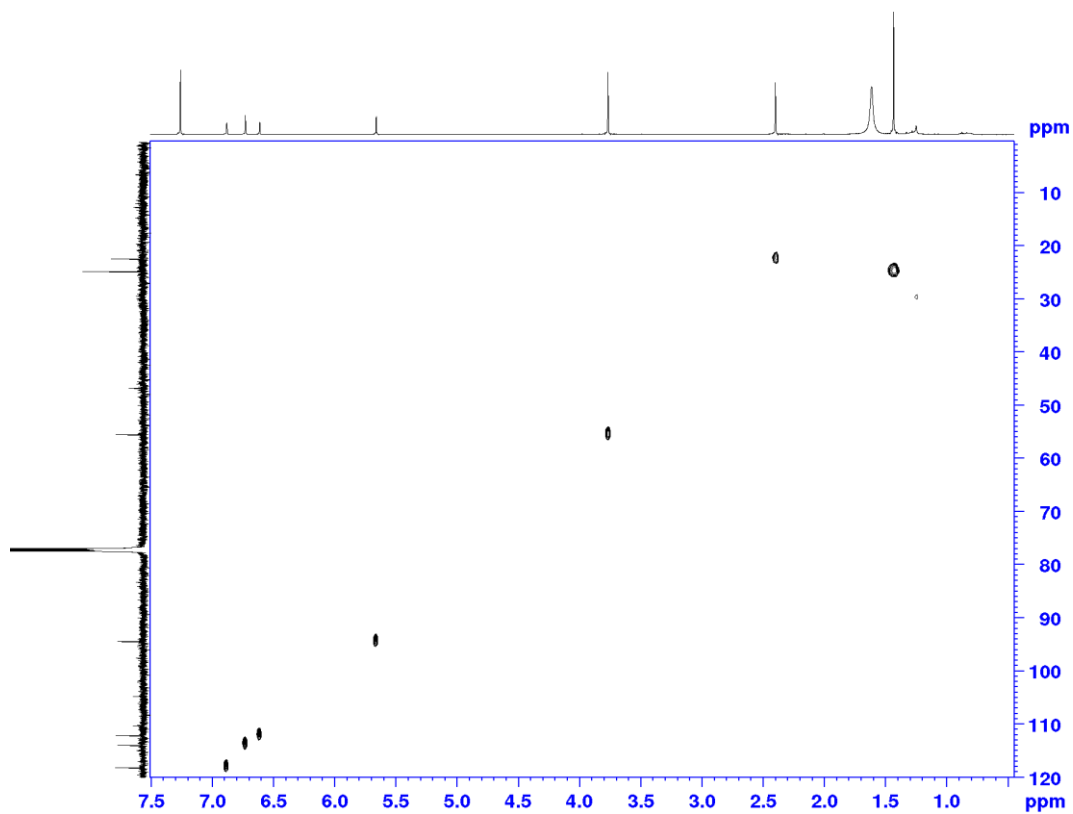


Figura 31 - Espectro de HMBC (600,13 MHz, CDCl_3) do composto **32**.

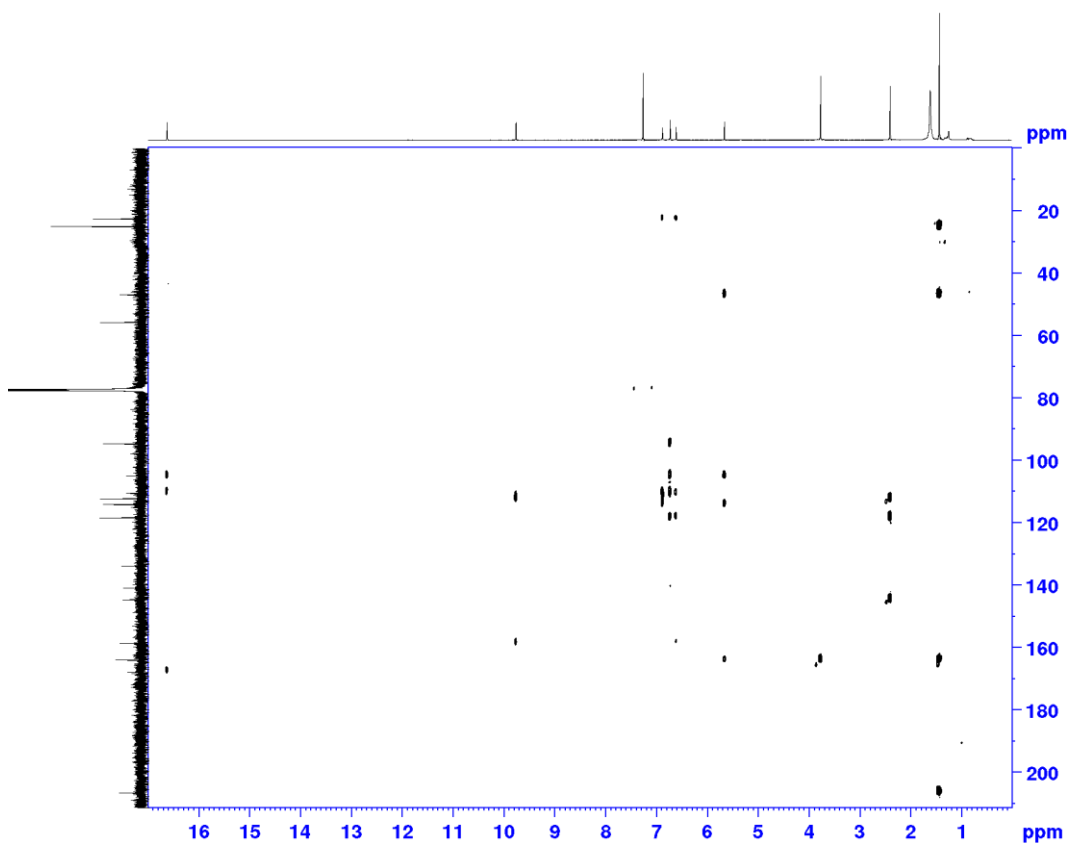
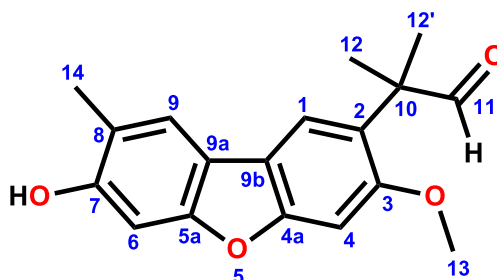


Figura 32 - Estrutura do composto **32**.

Em plantas, os dibenzofuranos foram encontrados em várias famílias, porém em número relativamente baixo. As atividades biológicas descritas, especificamente, para os compostos isolados dessa fonte foram: citotóxica, antibacteriana e anti-inflamatória (Milot *et al.*, 2016). No caso de líquens, o efeito antimicrobiano dessa classe de metabólitos é bem conhecido, e a produção da maioria desses compostos foi induzida como mecanismo de defesa, resultante do ataque de fungos.

Tabela 7 - Dados de RMN do composto **32** (CDCl₃, 600.13 MHz).

Posição	δ_C , tipo	δ_H , mult. (J = Hz)	HMBC
1	112,1, CH	6,61, s	C-2, C-3, C-9, C-9a
2	159,4, C		
3	163,8, C		
4	94,4, CH	5,66, s	C-3, C-9a, C-9b, C-10
4a	133,7, C		
5a	140,8, C		
6	113,9, CH	6,73, s	C-9, C-9a, C-9b, C-5a
7	167,7, C		
8	144,4, C		
9	118,2, CH	6,88, s	C-5a, C-6, C-9a, C-14
9a	110,2, C		
9b	104,7, C		
10	46,7, C		
11	206,4, C	9,76, s	C-1, C-2
12,12'	24,8, CH ₃	1,43, s	C-3, C-10, C-11
13	55,5, CH ₃	3,77, s	C-3
14	22,3, CH ₃	2,40, s	C-8, C-9

Figura 33 - Espectro de NOESY (600,13 MHz, CDCl_3) do composto **32** (0,0 – 8,0 ppm).

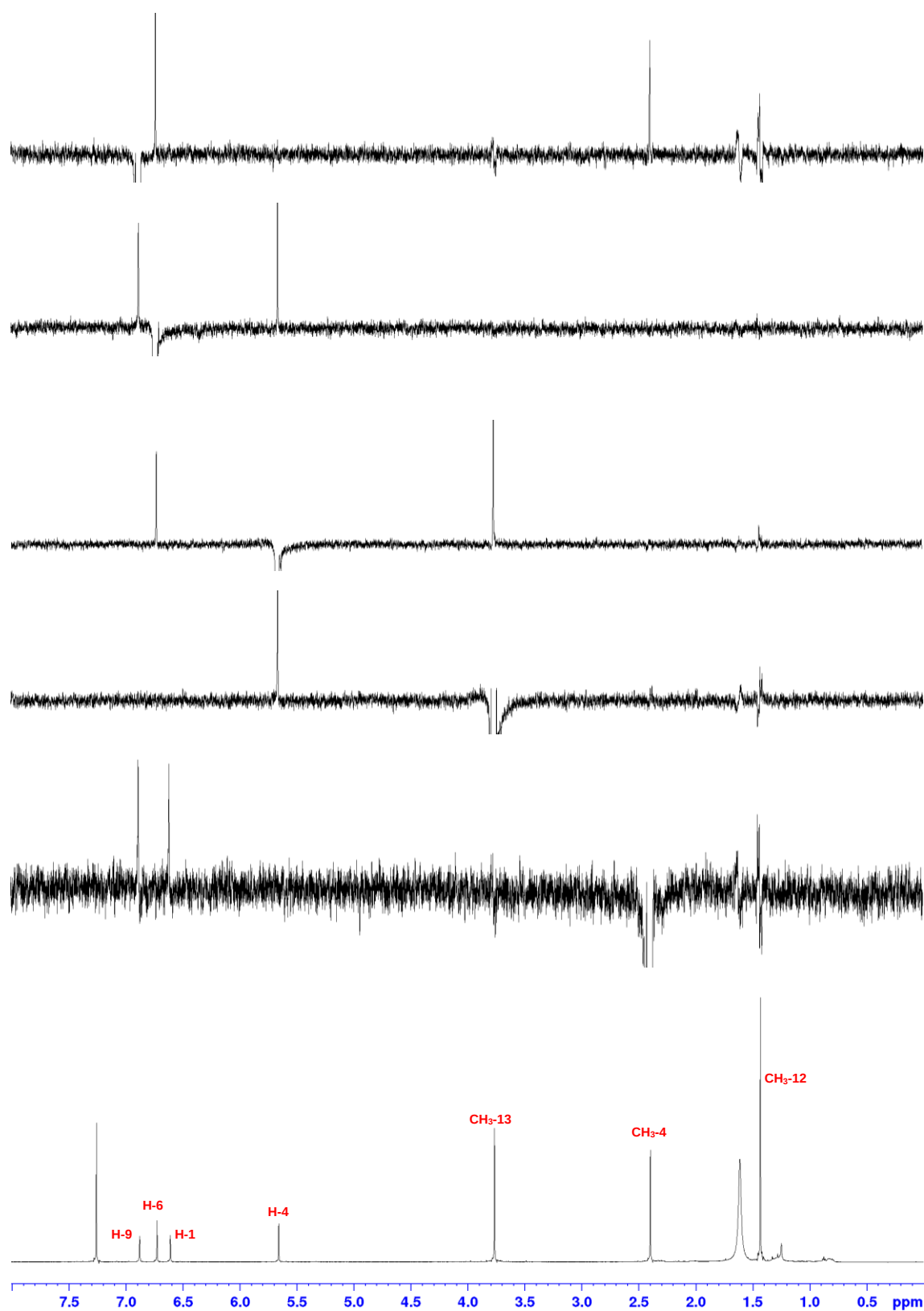


Figura 34 - Espectro de NOESY (600,13 MHz, CDCl₃) do composto **32** (0,0 – 18,0 ppm).

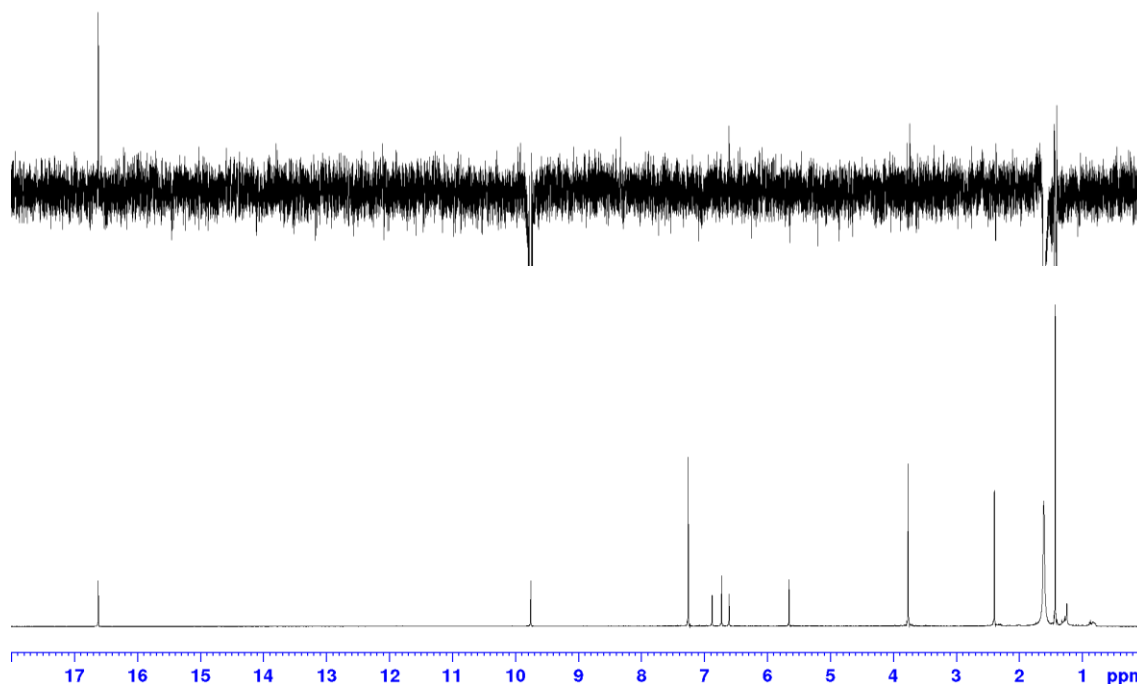
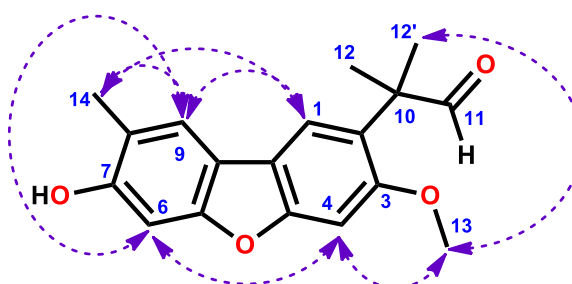


Figura 35 - Interações principais via NOESY.



1.4.3.6 Atividade citotóxica do extrato ER

A atividade citotóxica do extrato etanólico da raiz e do composto **32** (Tabela 8) foi acessada usando duas linhagens de células tumorais diferentes: HCT-116 (carcinoma cólon-retal) e MCF-7 (adenocarcinoma mamário).

O extrato apresentou um baixo percentual citotóxico (Tabela 8) frente as linhagens celulares avaliadas, embora compostos com comprovado potencial citotóxico tenham sido identificados e isolados (e.g., ácido betulínico), o que sugere que o baixo desempenho pode estar associado a uma pequena abundância desses compostos (constituintes minoritários).

O composto **32** desempenhou percentual de citotoxicidade moderado contra ambas as linhagens celulares, na concentração de 50 μM . Porém, em menor concentração (5 μM), a atividade decaiu aproximadamente pela metade (Tabela 8). No entanto, dibenzofuranos exibindo atividade antitumoral pronunciada são conhecidos de outras fontes (Sassa e Igarashi, 1990; Millot *et al.*, 2016), e essa diferença de atividade pode ser atribuída, dentre outros aspectos estruturais, ao efeito dos substituintes nos anéis.

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 $\pm$ EPM (n = 2)).

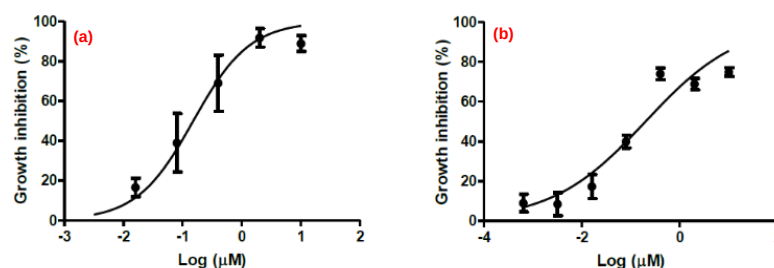
Amostra	HCT-116 - %Inib. $\pm$ EPM		MCF-7 - %Inib. $\pm$ EPM	
	5 μM	50 μM	5 μM	50 μM
ER	34,62 $\pm$ 4,78	53,27 $\pm$ 14,79	27,23 $\pm$ 5,09	42,39 $\pm$ 8,29
32	36,48 $\pm$ 4,55	77,58 $\pm$ 10,43	32,63 $\pm$ 2,45	65,86 $\pm$ 5,87

Doxorrubicina foi usada como controle positivo (Tabela 9) e apresentou CI_{50} de 0,15 μM para HCT-116 (Figura 36a) e 0,20 μM para MCF-7 (Figura 36b).

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 $\pm$ EPM (n = 2)).

	HCT-116	MCF-7
IC_{50}	0,15	0,20
Intervalo de confiança - 95%	0,08 $\pm$ 0,27	0,11 $\pm$ 0,35
R^2	0,87	0,86

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 $\pm$ EPM (n = 2)).



1.4.3.7 Atividade anticolinesterásica do extrato ER

ER exibiu percentuais inibitórios elevados (Tabela 10) sobre as enzimas acetilcolinesterase - AChE (85,7%) e butirilcolinesterase - BChE (87,4%), e esta atividade pode estar correlacionada com a presença dos alcaloides piperidínicos, bem como de outros compostos nitrogenados, no extrato.

Tabela 10 - Atividade inibitória (%inibição) de ER sobre as enzimas AChE e BChE.

Amostra	% Inib. ICER-AChE _{hr}	% Inib. ICER-BChE _{hu}
	100 µM	100 µM
ER	85,7	87,4
Tacrina	100,0	100,0

1.5 CONCLUSÕES

O perfil químico do extrato da raiz de *S. spectabilis*, traçado através da técnica de CLAE-EM-AR e CLAE-IT-EM/EM, permitiu a identificação da presença de alcaloides piperidínicos (classe predominante), bem como de metabólitos de outras classes biossintéticas: triterpenoide pentacíclico, antraquinonas, flavonas e esteroide; mostrando uma composição química similar àquela conhecida a partir das partes aéreas desta planta.

O fracionamento do extrato por meio de cromatografia de exclusão e CLAE levou ao isolamento dos alcaloides espectralina (**07**) e cassina (**17**), de uma mistura contendo o TP ácido betulínico (**30**), ácido tetradecanoico (**31**), além de um novo dibenzofurano (**32**). A substância **32** implica no primeiro relato de sua respectiva classe biossintética não apenas para a espécie *S. spectabilis*, mas também para o gênero, agregando conhecimento sobre sua composição química.

Ademais, a presença de alcaloides piperidínicos nas raízes de um indivíduo relativamente adulto pode remeter a uma indagação a respeito da localização do órgão responsável por biossintetizar esses metabólitos: os alcaloides são biossintetizados nas raízes e translocados para as partes aéreas, ou vice-versa?

Capítulo 2 – Triagem de extratos de fungos filamentosos endofíticos e da rizosfera de *Senna spectabilis*, obtidos via variação de meios de cultivo.

2.1 INTRODUÇÃO

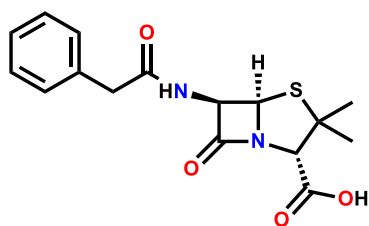
2.1.1 O papel dos microrganismos na produção de metabólitos bioativos

Historicamente, os microrganismos demonstraram constituir uma fonte prolífica de metabólitos bioativos diversificados estruturalmente, fornecendo alguns dos fármacos mais importantes da indústria farmacêutica. Um exemplo muito conhecido é a descoberta da β -lactama penicilina (**33**, Figura 37), proveniente do fungo filamentoso *Penicillium notatum*, realizada por Fleming em 1929. Outros exemplos de compostos líderes importantes, isto é, compostos com propriedades farmacológicas úteis para fins terapêuticos, isolados de microrganismos incluem: os macrolídeos usados como antibióticos (eritromicina, **35**); antifúngicos (anfotericina B, **38**), fármacos imunossupressores (cliclosporina, **36**) e depsipetídeos com atividade antibiótica (fusafungina). Além disso, agentes redutores de colesterol pertencentes à classe das estatinas (como a lovastatina, **37**) foram o quarto grupo de fármacos mais vendidos nos Estados Unidos, no ano de 2013. Os microrganismos também produzem compostos com esqueletos inovadores, tais como a pleurotina (**34**), os antibióticos enediinos (**39**) e dicetopiperazinas (**40**) (Bertrand *et al.*, 2014).

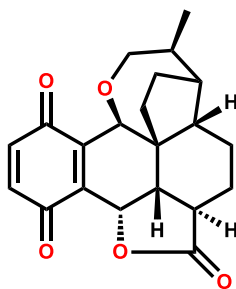
Portanto, bactérias e fungos são fontes importantes de fármacos e compostos líderes. Esse fato se torna ainda mais evidente diante da análise das fontes de fármacos aprovados pelo FDA (*US Food and Drug Administration*) no período de 1931 – 2013 (547 NEQs), baseados em PNs ou materiais naturais não modificados, derivados semissintéticos ou estruturas sintéticas conceitualmente derivadas de PNs. A análise dos dados (Figura 38) demonstra que enquanto 47% dos fármacos - excluindo aqueles de origem bioquímica - são de origem vegetal, bactérias (30%) e fungos (23%) respondem por 53% do total (Patridge *et al.*, 2016).

Ao avaliar as fontes de agentes antibacterianos nota-se que 97% dos fármacos são provenientes de micróbios, contra apenas 3% de origem vegetal (Figura 39). Os mecanismos de ação e os alvos dessas NEQs variam muito, no entanto, alguns subconjuntos predominam. Os agentes antibacterianos tendem a se ligar a topoisomerases (tetraciclinas), peptidiltransferases (macrolídeos), ribossomos (aminoglicosídeos) e transpeptidases (β -lactamas).

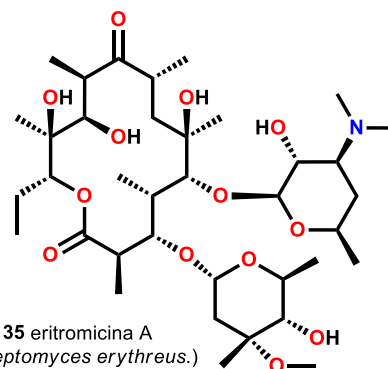
Figura 37 - PNs microbianos de interesse farmacêutico ou que apresentam diversidade estrutural particular.



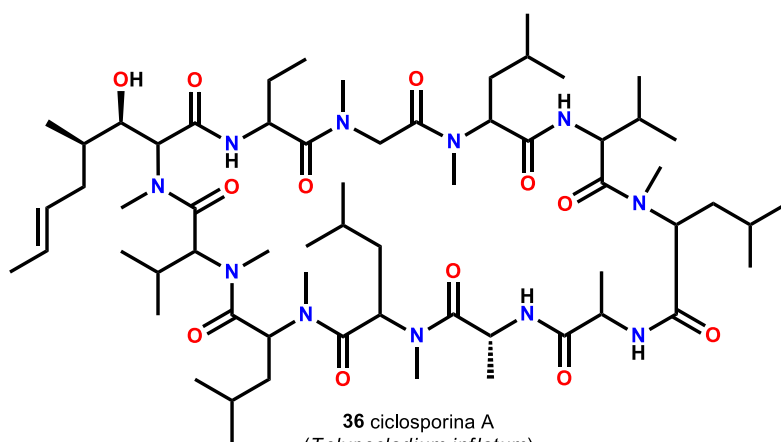
33 penicilina G
(*Penicillium* sp.)



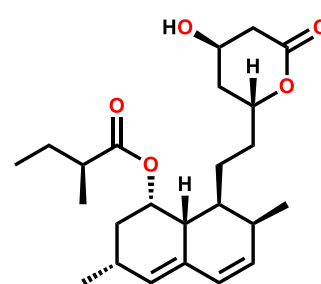
34 pleurotina
(*Pleurotus griseus*.)



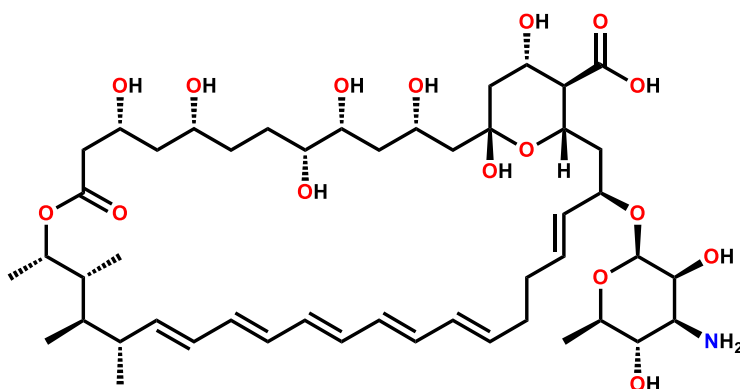
35 eritromicina A
(*Streptomyces erythreus*.)



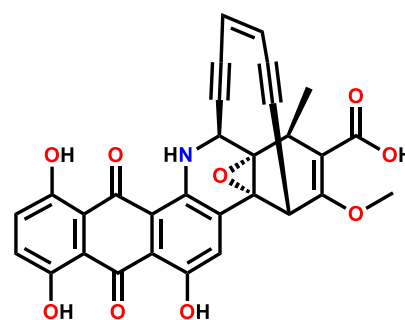
36 ciclosporina A
(*Tolypocladium inflatum*)



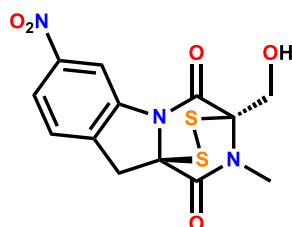
37 lovastatina
(*Aspergillus terreus*.)



38 anfotericina B
(*Streptomyces nodosum*)



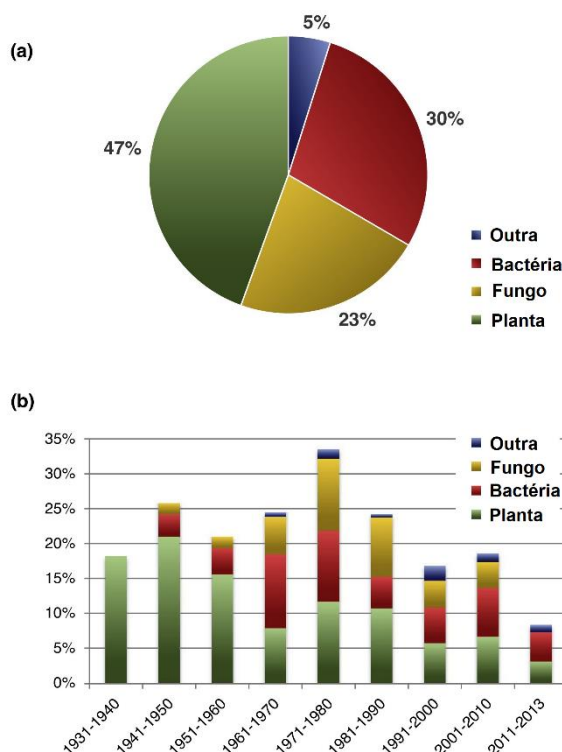
39 dinemicina A
(*Micromonospora chersina*)



40 gliotritina A
(*Aspergillus fumigatus*)

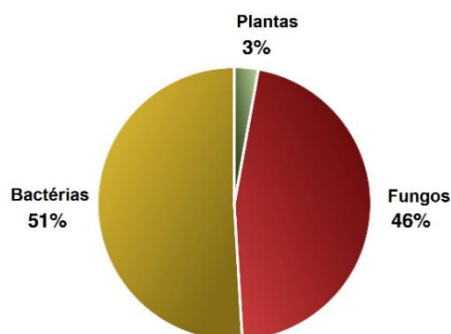
Fonte: Bertrand *et al.*, 2014.

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.



Fonte: Patridge *et al.*, 2016

Figura 39 - Percentual de agentes antibacterianos por fonte.



Fonte: Patridge *et al.*, 2016

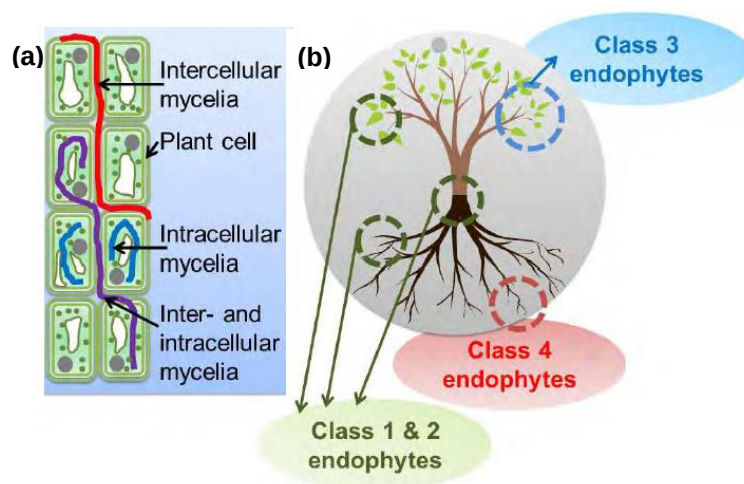
Os micróbios, se comparados aos outros recursos naturais, são a fonte mais atrativa de produtos naturais no presente, e os principais motivos são a ocorrência ubíqua, a biodiversidade extensiva e a quimiodiversidade ampla que pode ser encontrada até mesmo em uma determinada espécie. Outro aspecto importante é que alguns destes microrganismos podem ser cultivados em laboratório sob condições padrão, permitindo a otimização e ampliação da produção de produtos naturais quando necessária (Bertrand *et al.*, 2014).

2.1.2. Fungos endofíticos e suas potencialidades

Fungos endofíticos são microrganismos que residem nos tecidos internos de plantas vivas (Figura 40), pelo menos uma parte de seu ciclo de vida, sem causar qualquer efeito negativo imediato, mas que podem tornar-se patogênicos durante a senescência do hospedeiro (Aly *et al.*, 2011; Kusari e Spiteller, 2012). De acordo com Rodriguez *et al.* (2009), os endófitos podem apresentar padrões distintos de localização ou colonização dos tecidos dos hospedeiros, constituindo quatro classes funcionais distintas (Figura 40).

A maioria dos endófitos são transmitidos horizontalmente às suas plantas hospedeiras, através de esporos. Em contraste, alguns endófitos também podem ser transmitidos verticalmente, para as próximas gerações de plantas, via sementes (Hartley e Gange, 2008). Uma vez dentro do tecido do hospedeiro, o endófito assume um estado quiescente (latente) que pode durar a vida toda da planta ou um período de tempo estendido, até que as condições ambientais ou o estado ontogenético do hospedeiro sejam favoráveis ao fungo (Sieber, 2007).

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.



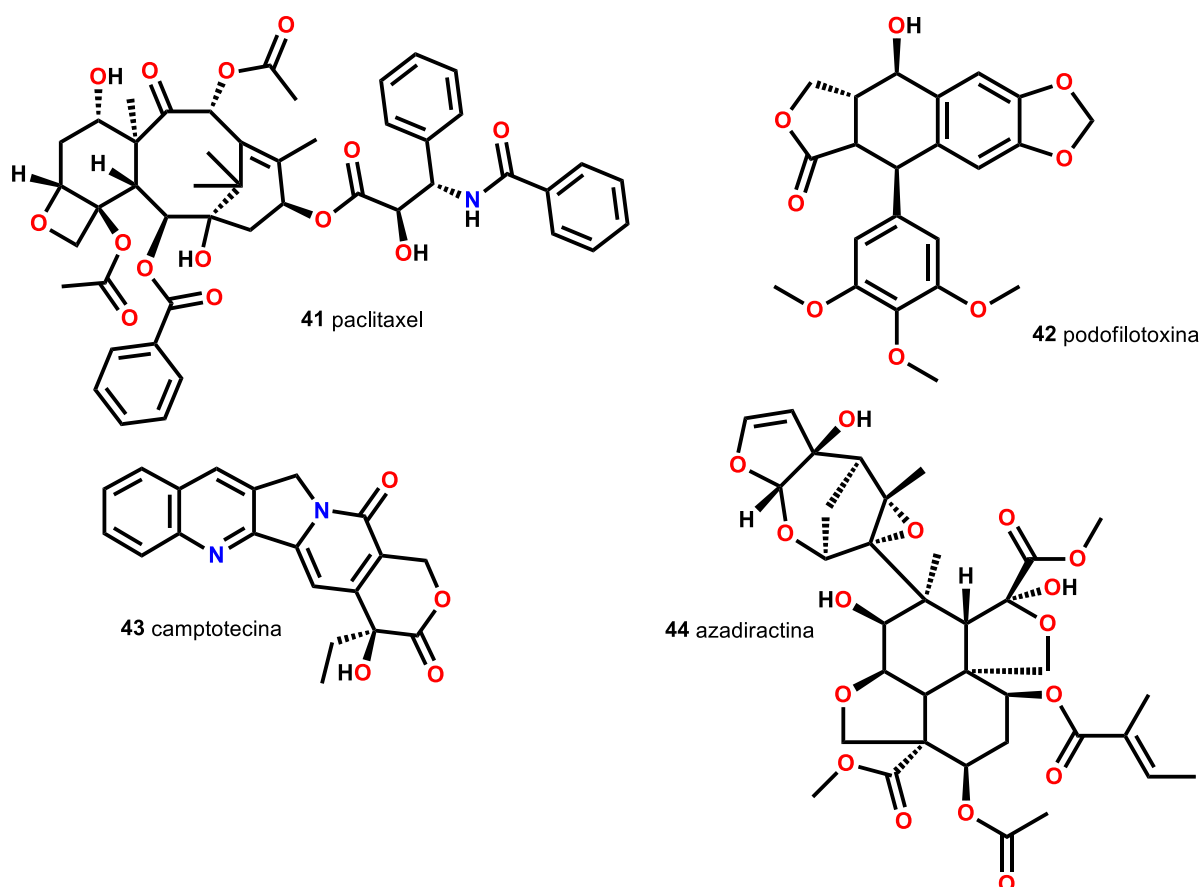
Fonte: Kusari e Spiteller, 2012.

O desenvolvimento recente de tecnologias de triagem revelou o grande potencial de endófitos como uma fonte de compostos biologicamente ativos, com aplicações medicinais promissoras (Zhang *et al.*, 2006; Aly *et al.*, 2011). Portanto,

trata-se de uma oportunidade imensa para a descoberta de novos produtos naturais promissores, os quais representam uma fonte enorme e relativamente inexplorada de estruturas químicas únicas (Guo *et al.*, 2008; Aly *et al.*, 2011).

Alguns endófitos são capazes de biossintetizar produtos medicinais produzidos por suas plantas hospedeiras, exibindo, portanto, uma grande aplicabilidade para a produção de compostos líderes e fármacos (Garyali *et al.*, 2013). A primeira descoberta foi a produção do fármaco anticâncer taxol (paclitaxel, **41**, Figura 41), pelo fungo *Taxomyces andreanae*, isolado de *Taxus brevifolia* (Stierle *et al.*, 1993). Em seguida, esforços de triagem para encontrar fungos produtores de metabólitos de plantas associadas levaram ao relato da produção do agente antitumoral podofilotoxina (**42**), pelo fungo *Phialocephala fortinii* isolado de *Podophyllum peltatum* (Eyberger *et al.*, 2006); do potente agente antineoplásico camptotecina (**43**), pelo fungo *Fusarium solani*, isolado de *Camptotheca acuminata* (Kusari *et al.*, 2009); e ainda, do inseticida azadiractina (**44**), pelo fungo *Eupenicillium parvum*, isolado de *Azadirachta indica* (Kusari *et al.*, 2012).

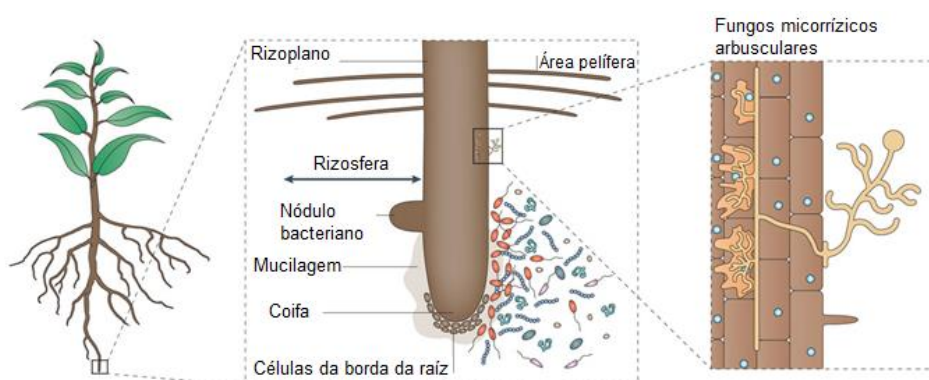
Figura 41 - Estruturas de produtos medicinais de plantas, biossintetizados por fungos endofíticos.



2.1.3 O potencial do microbioma da rizosfera

A rizosfera é definida como uma zona estreita de solo - camada de aproximadamente 1,5 mm - circundando as raízes da planta (Figura 42) e influenciada pela mesma. Por esse motivo, é uma região que abriga um elevado número de microrganismos, sendo considerada uma das interfaces mais complexas e dinâmicas do mundo (Mendes *et al.*, 2013; Philippot *et al.*, 2013).

Figura 42 - A rizosfera como interface entre a planta e o solo.



Fonte: Philippot *et al.*, 2013

Os (micro)organismos encontrados na rizosfera incluem bactérias, fungos, oomicetos, nematodos, protozoários, algas, vírus, arqueas e artrópodes (Mendes *et al.*, 2013), os quais são normalmente agrupados em três categorias: patogênicos para a planta; benéficos para a planta (simbiontes); e patógenos humanos (Keohane *et al.*, 2015). Essa diversidade microbiana é propiciada por um grande suprimento de nutrientes fornecido para os microrganismos, uma vez que as raízes liberam uma variedade enorme de compostos orgânicos (exsudatos e mucilagem) derivados da fotossíntese e de outros processos vegetais. Portanto, a rizosfera é um ambiente com uma elevada diversidade microbiana (Hryniewicz e Baum, 2012), o que a torna uma matriz exótica de grande interesse para estudos.

Uma das maiores consequências dessa grande diversidade é uma intensa atividade microbiana, com retroefeitos sobre o desenvolvimento da planta. De fato, a rizosfera atua como intermediário entre a planta, a qual requer nutrientes minerais solúveis, e o solo, que contém os nutrientes necessários, porém em concentrações

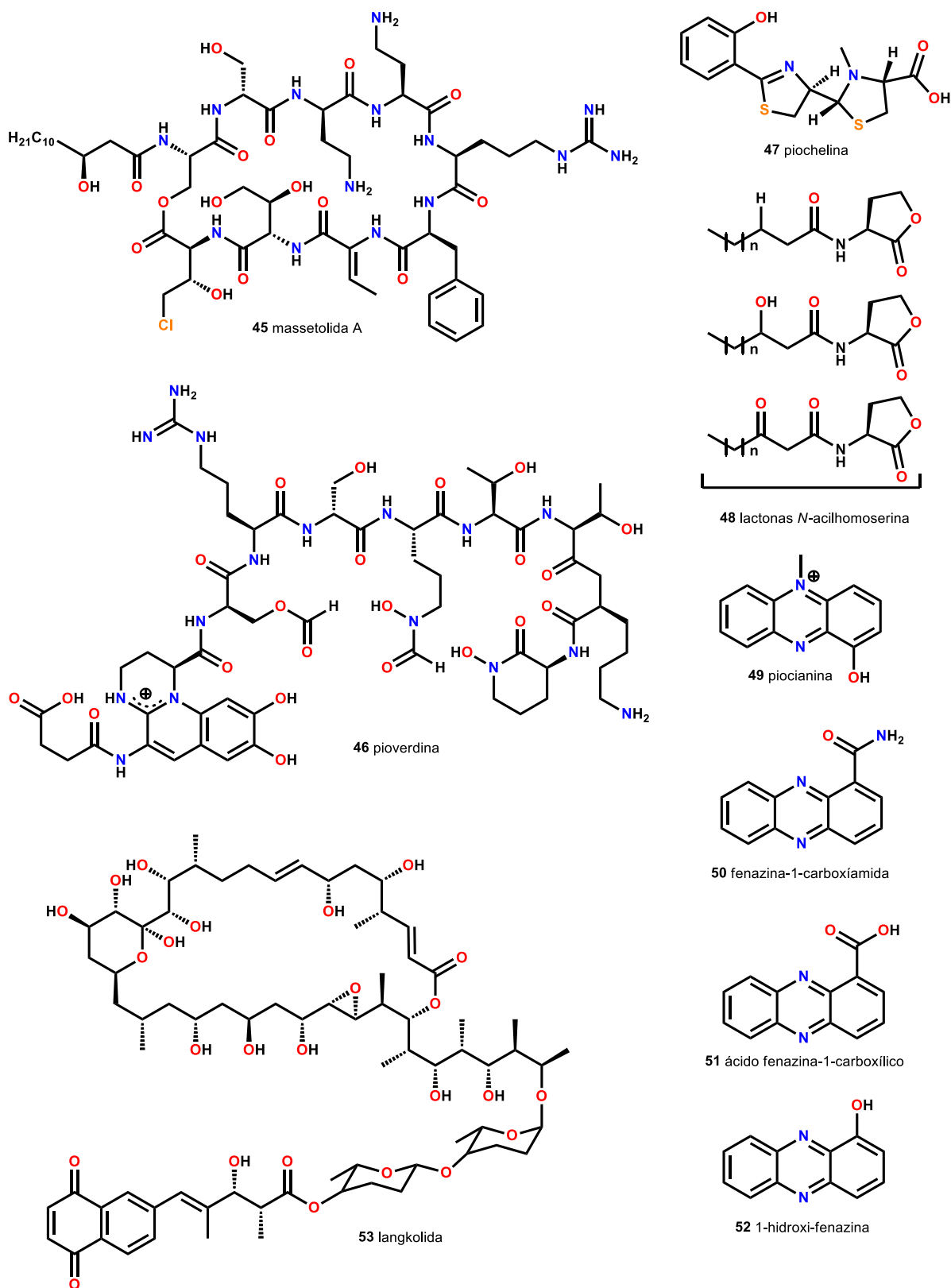
baixas e ou formas complexas inacessíveis. Deste modo, os micróbios da rizosfera servem como um intermédio entre a planta e o solo (Mendes *et al.*, 2013).

A maioria dos microrganismos que habitam a rizosfera é composta por fungos e bactérias. A abundância de fungos é 10 - 20 vezes maior na rizosfera do que em outras regiões do solo. A competição por fontes de nutrientes na rizosfera é bastante elevada, o que força microrganismos diferentes a desenvolver estratégias distintas, originando uma gama de interações, desde antagonistas a sinérgicas entre si mesmos e com a planta. Desta forma, diversas interações podem ser estabelecidas com base na variedade de microrganismos do solo (microbiota da rizosfera) e da planta (microbiota endofítica). A compreensão destas interações é extremamente relevante para aplicações no crescimento vegetal, para a remediação de solos perturbados (Hryniewicz e Baum, 2012) e também para o desenvolvimento de estratégias de combate a microrganismos patogênicos para os seres humanos, os quais desenvolvem resistência rápida aos fármacos antimicrobianos disponíveis (Keohane *et al.*, 2015). Além disso, a microbiota da rizosfera representa um potencial ainda muito pouco explorado para a produção de novos quimiotipos com estruturas químicas diversificadas e potencialmente bioativas.

De acordo com Keohane e colaboradores (2015) moléculas oriundas da rizosfera podem ser subdivididas em quatro categorias: lipopeptídeos, sideróforos, antibióticos/antifúngicos, e aqueles envolvidos em *quorum sensing*.

Lipopeptídeos cíclicos (LPCs) são definidos estruturalmente como polipeptídeos cíclicos (apresentam sequências de diversos aminoácidos), com uma cauda constituída por uma unidade de ácido graxo (comprimento variável da cadeia alquila). Esta classe é bem estudada devido às suas propriedades antibiótica de amplo espectro e surfactante (Keohane *et al.*, 2015). Além de letais contra bactérias gram-positivas, os LPCs desempenham uma função benéfica para os seus produtores e antagonista para os seus associados: a massetolida A (**45**, Figura **43**), por exemplo, é essencial para a motilidade e importante para a formação de biofilme de *Pseudomonas fluorescens* (De Bruijn *et al.*, 2007). Por outro lado, LPCs capazes de inibir e degradar biofilmes também são conhecidos.

Figura 43 - Estruturas de metabólitos provenientes da microbiota da rizosfera.



Além de inibir diretamente o crescimento de seus vizinhos, as bactérias usam a competição indireta por nutrientes como estratégia de sobrevivência. Nesse

contexto, o ferro é essencial no microbioma da rizosfera, porém sua maior parte encontra-se como óxido de ferro hidratado (Fe_2O_3), no estado férrico (3^+), altamente insolúvel em água no pH do solo. Para resolver este problema, micróbios e plantas liberam sideróforos, moléculas orgânicas com alta afinidade de quelação de íons, as quais se ligam ao íon Fe^{3+} , solubilizando-o. Os complexos solúveis podem ser então utilizados pelos micróbios e plantas, os quais se ligam a receptores de membrana que liberam o íon férrico e o reduz a íon ferroso (2^+), que atravessa a membrana celular por proteínas transportadoras de metais bivalentes (Keohane *et al.*, 2015). Um dos sideróforos mais predominantes é a pioverdina (**46**, Figura 43), possuindo diversas variantes de acordo com modificações na cadeia polipeptídica por diferentes linhagens bacterianas (Chiarini *et al.*, 1993).

Quorum sensing é a habilidade de micróbios ativarem a sinalização como resultado do aumento da densidade celular e consiste na principal fonte de comunicação de micróbios patogênicos. Desta forma, os habitantes possuem a habilidade de se defender de outros organismos baseados em sinais para produzir defesas, tais como fatores de virulência e biofilmes (Keohane *et al.*, 2015). O componente principal em *quorum sense* bacteriano são as *N*-acil-homoserinolactonas (HSLs), que são produzidas como moduladores para a produção de fator de virulência. HSLs (**48**, Figura 43) possuem cadeias acila conectadas via ligação amida, fornecendo uma gama de moléculas diferentes para cada espécie, o que torna difícil a intercepção da via de sinalização (Schuster *et al.*, 2013). *Quorum sensing* é um dos elementos mais desafiadores da rizosfera, no entanto, pode permitir a inibição de espécies específicas de micróbios.

A última categoria é a de antibióticos/antifúngicos, produzidos prevalentemente por *Streptomyces*, *Bacillus*, e *Pseudomonas*, que apresentam uma grande variação estrutural e, portanto, diversos mecanismos de ação. Essa classe de compostos permite que micróbios, tanto mutualísticos quanto patogênicos eliminem competidores (Keohane *et al.*, 2015). Um exemplo é o das fenazinas (**49 - 52**, Figura 43), moléculas cuja função principal é reduzir ferro, permitindo processos subsequentes necessários a sobrevivência (Haas e Défago, 2005). Um exemplo de destaque pela diversidade estrutural é o da langkolida (**53**, Figura 43), uma macrolactona de 32 membros entre as classes de antibióticos/antifúngicos, isolado da rizosfera de *Clitorea sp.* na Malásia, produzido por *Streptomyces sp* (ACTA 3062) (Helaly *et al.*, 2012).

2.1.4 Variação das condições de cultura (meio de cultivo)

A produção de metabólitos secundários por microrganismos depende fortemente de fatores ambientais, tais como condições de crescimento e estresses biótico e abiótico. Desta forma, a variação seletiva das condições de cultura para um microrganismo é uma estratégia promissora para gerar uma maior quimiodiversidade. Essa abordagem apresenta um grande potencial para afetar diversos níveis da maquinaria celular (genoma, transcriptoma, proteoma ou metaboloma) (Bertrand *et al.*, 2014).

As condições de cultura afetam os perfis metabólicos dos microrganismos, motivando a realização de experimentos com meios de cultura diferentes, com a finalidade de otimizar a produção metabólica. Desta forma, desenvolveu-se o método conhecido como abordagem OSMAC (*one strain-many compounds* - “muitos compostos de uma única cepa”) (Bode *et al.*, 2002), no qual o meio de cultura e os nutrientes são variados de forma sistemática para simular ambientes diferentes e, consequentemente, para induzir a produção de diversos metabólitos.

Os parâmetros que são variados nesta técnica incluem luz, pH, temperatura e suprimento de oxigênio. O meio é variado em termos de fontes de carbono, nitrogênio, fósforo, sais inorgânicos ou conteúdo de traços de metais e também pode ser suplementado com moléculas pequenas ou metais pesados, que atuam como indutores ou supressores de crescimento ou através de mecanismos desconhecidos (Bertrand *et al.*, 2014).

2.1.5 Identificação e seleção de fungos da microbiota de *S. spectabilis*

Através do cultivo de plântulas de *S. spectabilis* em meio hidropônico, a Dra. Patrícia Cardoso, supervisionada pelo Prof. Dr. Ian Castro-Gamboa, realizou o isolamento, purificação e preservação de uma coleção de microrganismos oriundos da rizosfera desta planta, composta por cento e trinta e cinco cepas de fungos filamentosos, sessenta e uma bactérias e um actinomiceto.

Dentre estes microrganismos, nove fungos filamentosos (Tabela 13) foram selecionados (com base em aspectos morfológicos, taxa de crescimento, dentre outros) para cultivo em diferentes meios nutrientes: CZAPEK – um meio pobre em fonte de carbono; e meios ricos - Malte e PBD.

A identificação dos fungos selecionados (Tabela 11) foi realizada com base na região ITS (Internal Transcribed Spacer), que separa os genes 18S e 28S do DNA ribossomal, e consiste em sequências altamente conservadas interespecificamente, mas variáveis entre espécies diferentes, que permitem a identificação de relações filogenéticas além da distinção de espécies (Chen *et al.*, 2004).

Tabela 11 - Identificação dos fungos da rizosfera selecionados para cultivo.

Código	Identificação molecular	Identidade (%)	Nº de acesso (GenBank)
CSP19A	<i>Fusarium solani</i>	99	KC907714.1
CSP18B	<i>Fusarium oxysporum</i>	100	KU170531.1
CSP9A	<i>Fusarium solani</i>	100	KC907714.1
CSP5B	<i>Fusarium solani</i>	99	JX435189.1
CSP44A	<i>Fusarium oxysporum</i>	100	KT884661.1
CSP4A	<i>Fusarium oxysporum</i>	99	KM265104.1
CSP30	<i>Fusarium oxysporum</i>	99	HM346538.1
CSP09	<i>Fusarium solani</i>	100	KC907714.1
CI06	<i>Colletotrichum sp.</i>	100	GU973623.1

Além dos nove microrganismos supracitados, também foram selecionados para estudos com finalidade comparativa, dois fungos filamentosos pertencentes à coleção de endófitos das partes aéreas de *S. spectabilis*, isolados pela Dra. Lisinéia Zanardi, sob supervisão da Profa. Dra. Angela R. Araújo (IQ-UNESP): *Phomopsis cassiae* (Pc) e *Colletotrichum sp.* (Csp). É importante salientar que apenas a identificação de *P. cassiae* era conhecida no início deste trabalho. No entanto, a apresentação das identidades de cada fungo faz-se necessária para uma melhor análise e compreensão do mesmo.

2.1.6 Crise de resistência aos antibióticos

A partir da descoberta da penicilina os antibióticos revolucionaram a medicina, salvando milhares de vidas, aliviando dores e sofrimento, bem como sendo usados na profilaxia para a prevenção de doenças infecciosas. Porém, atualmente atingiu-se

uma crise na qual muitos antibióticos não são mais efetivos até mesmo contra as infecções mais simples. Essas infecções geralmente resultam em um aumento do número de hospitalizações, mais falhas de tratamento e persistência de patógenos resistentes aos fármacos disponíveis (Martens e Demain, 2017).

Uma das maiores preocupações são os organismos resistentes à meticilina, como *Staphylococcus aureus*, *Clostridium difficile*, *Mycobacterium tuberculosis* multiresistente e extremamente resistente, *Neisseria gonorrhoeae*, Enterobacteriaceae resistentes a carbapenemos e bactérias que produzem β -lactamases de amplo espectro, tais como *Escherichia coli*. Para complicar ainda mais a situação, houve um grande declínio na descoberta de novos antibióticos efetivos, por várias razões. Portanto, há uma necessidade urgente da descoberta de novos antibióticos (Martens e Demain, 2017).

Neste cenário, o estudo de fungos principalmente da microbiota da rizosfera constitui uma grande oportunidade para a descoberta ou redescoberta de compostos com potencial antibacteriano, devido ao fato de que estes microrganismos encontram-se em interação constante com bactérias, muitas vezes em competição direta por nutrientes ou em guerra química. Além disso, até mesmo a compreensão de sinergismos fungo-bactéria podem ser úteis para entender o mecanismo de sobrevivência desses micróbios, facilitando o seu combate.

2.1.7 Abordagem de redes de interações moleculares para desreplcação de compostos

Uma abordagem que vem ganhando um destaque merecido para o tratamento e análise de dados de EM de matrizes complexas é a de desreplcação por redes de interações moleculares, através da plataforma GNPS (*Global Natural Products Social Molecular Networking*).

A espectrometria de massas é uma técnica utilizada rotineiramente para analisar amostras complexas de produtos naturais (como extratos, por exemplo). No entanto, um único experimento de espectrometria de massas pode coletar milhares de espectros de EM/EM em minutos e esses conjuntos de dados são, obviamente, muito extensos para interpretação manual. Embora várias bases de dados de

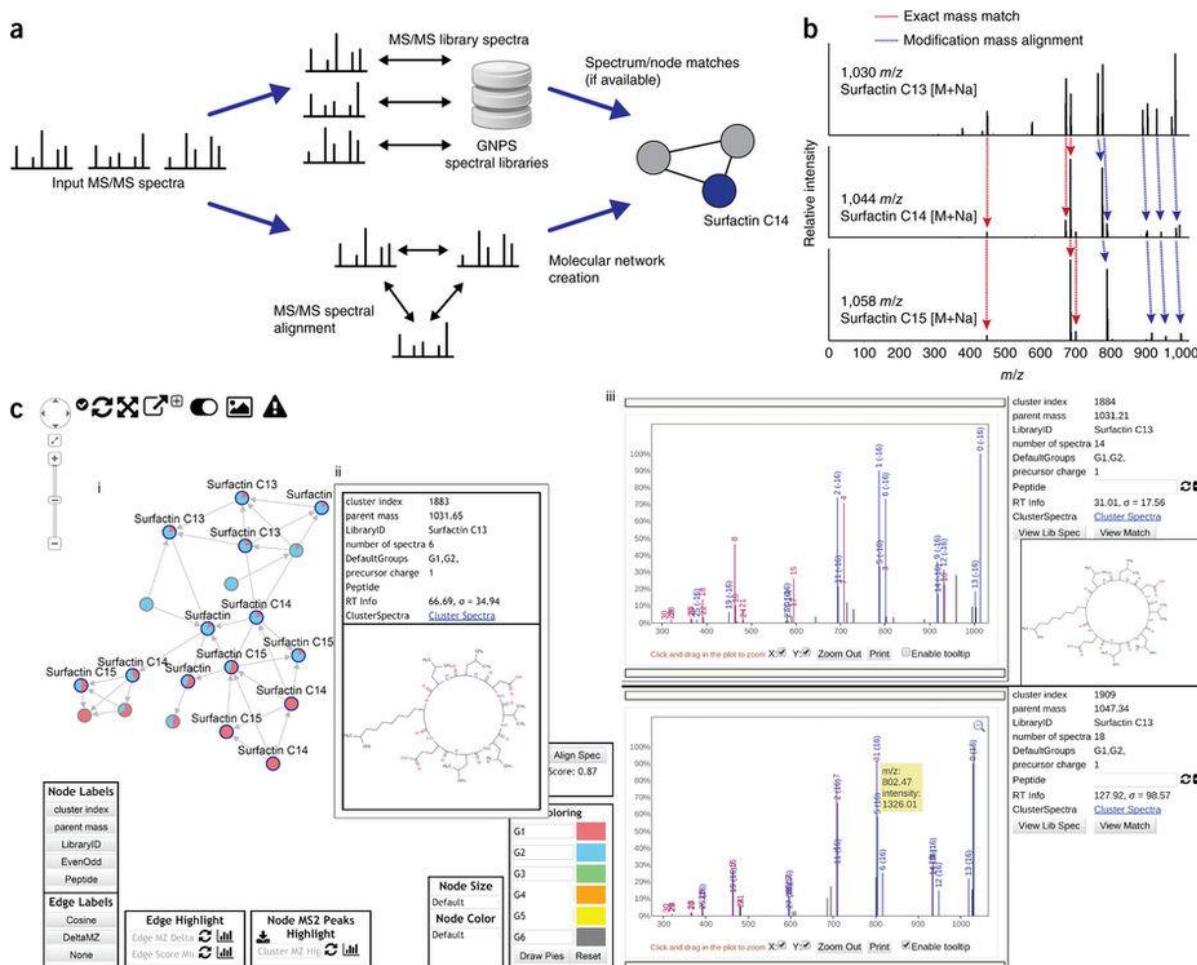
Produtos Naturais, tais como o Dicionário de Produtos Naturais, AntiBase e MarinLit auxiliem na desreplicação, esses recursos não estão disponíveis gratuitamente, e também não processam dados de EM (Wang *et al.*, 2016). Por outro lado, Bases de dados de EM, incluindo Mass Bank, Metlin, m/zcloud e Respect armazenam dados de EM/EM, mas limitam a análise dos dados a poucos espectros ou a uma quantidade limitada de arquivos de CLAE-EM (Wang *et al.*, 2016).

Diante da necessidade do desenvolvimento de uma plataforma comunitária para analisar e disseminar dados de EM de PN, surgiu a GNPS, uma plataforma de armazenamento, análise e disseminação de conhecimento de espectros de EM/EM que permite à comunidade científica compartilhar e realizar a anotação contínua dos dados armazenados, bem como realizar a preservação dos espectros de referência (bibliotecas espectrais) e dados experimentais.

A GNPS oferece a possibilidade de analisar um conjunto de dados e compará-lo com todos os dados disponíveis publicamente (Figura 44). Esta plataforma foi construída na infraestrutura do Centro Computacional de Espectrometria de Massas (*Computational Center for Mass Spectrometry* - CCMS, <http://proteomics.ucsd.edu/>) da Universidade da Califórnia San Diego (UCSD), funcionando como um depósito público de dados de EM, bem como um sistema de reaquisição de dados através do repositório de dados “*Mass Spectrometry Interactive Virtual Environment*” (massIVE). Desta forma, a plataforma da GNPS permite a desreplicação online, a análise automatizada de redes de interações moleculares (molecular networking), e a preservação de dados de EM/EM (Wang *et al.*, 2016).

A GNPS pode ser usada para gerar redes de interações moleculares, uma abordagem de correlação e visualização espectral que detecta o conjunto de dados de moléculas relacionadas, mesmo quando os espectros não são atribuídos a compostos conhecidos. Os alinhamentos espectrais detectam os espectros similares de moléculas estruturalmente relacionadas, assumindo que essas moléculas fragmentam de modos similares (padrões similares de EM/EM).

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.



Fonte: Wang *et al.*, 2016.

O processo de desrepliação de alto rendimento de dados de EM/EM de PNs é implementado pela GNPS através de comparação dos dados adquiridos com todos os espectros de referência das bibliotecas espectrais (Figura 44a). Num segundo estágio de desrepliação, a GNPS executa uma reidentificação usando desrepliação de variável, que consiste em uma busca na biblioteca espectral tolerante a modificação, mediada por um algoritmo de alinhamento espectral (Figura 44b). A desrepliação de variáveis permite a detecção de análogos de compostos conhecidos (diferindo por uma modificação estrutural ou substituição de um grupo químico) ou compostos pertencentes a uma mesma classe.

A visualização das redes moleculares representa cada espectro como um nodo, e alinhamentos espectro-a-espectro como arestas (conexões) entre os nodos. Os

nodos podem ser suplementados com metadados, incluindo informações fornecidas pelo usuário, tais como abundância, origem do produto, atividade bioquímica, as quais se refletem no tamanho ou cor dos nodos (Figura 44c).

2.2 OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho consistiram no cultivo de fungos endofíticos e da rizosfera de *S. spectabilis* em diferentes meios de cultura para obtenção de uma minibiblioteca de extratos brutos, para serem analisados por CLAE-DAD, e concomitantemente submetidos a ensaios de triagem da atividade antibacteriana, visando a seleção de extratos promissores para desreplicação e isolamento de constituintes bioativos. Além disso, a aplicação da abordagem de redes de interações moleculares através da plataforma GNPS para assistir a desreplicação de compostos também é objeto deste estudo.

2.3 PARTE EXPERIMENTAL

2.3.1 Pré-cultivo dos microrganismos em meio sólido

Os fungos selecionados foram cultivados em placas de Petri contendo meios diferentes (CZAPEK Ágar, Malte Ágar ou Batata Dextrose Ágar) por cerca de sete dias, a 28 °C e sob presença constante de luz, antes da inoculação em meio líquido.

2.3.2 Cultivo em meio líquido

Os microrganismos previamente cultivados em meio sólido foram inoculados separadamente em frascos contendo meio líquido (caldo de CZAPEK, extrato de Malte ou caldo de Batada Dextrose). Para cada fungo foram usados oito frascos de erlenmeyer de 500 ml, contendo 300 ml de cada meio, no qual permaneceram por 28 dias, estáticos e sob as mesmas condições do pré-cultivo. Os meios usados foram adquiridos comercialmente, da marca Kasvi ou Acumedia.

2.3.3 Obtenção dos extratos

Após o término do período de incubação, o material de cultivo foi submetido a filtração à vácuo para remoção do micélio e, em seguida, o caldo foi submetido a partição líquido-líquido com acetato de etila para extração dos metabólitos de interesse. O solvente foi subsequentemente removido com o auxílio de evaporador rotativo, fornecendo os extratos brutos. Antes de proceder às análises, os extratos obtidos passaram por um procedimento de “*clean-up*” por Extração em Fase Sólida (EFS), utilizando-se cartuchos de C₁₈ e eluição com MeOH.

2.3.4 Análises dos extratos por CLAE-DAD

As análises cromatográficas em escala analítica foram realizadas no modo gradiente e eluição com H₂O (0,1% ác. fórmico)/ACN (0,1% ác. fórmico) 95:5 (v/v) até 0:100 (v/v), numa vazão constante de 1,0 ml/min, em 40 min. O volume de injeção das amostras foi de 20 µl de uma solução de concentração de 5 mg/ml, o λ de referência monitorado foi de 254 nm e a coluna usada foi uma analítica Phenomenex Kinetex®, 5 µ, C₁₈, 100 Å, (150 x 4,6 mm).

2.3.5 Análise quimiométrica dos extratos por PCA

O conjunto dos dados cromatográficos foi submetido a uma análise exploratória aplicando-se o tratamento quimiométrico de análise de componentes principais (PCA). Para tanto, os dados cromatográficos referentes à absorção em 254 nm foram exportados na forma de uma matriz (t_r x intensidade) no formato .txt. Em seguida, a matriz foi decomposta em vetores, os quais foram reagrupados em uma nova matriz (96 linhas x 5628 colunas). Os dados matriciais foram importados no software Matlab 2014, submetidos a etapas de pré-processamento (normalização e alinhamento) e finalmente, à análise multivariada (PCA).

2.3.6 Triagem da atividade antibacteriana dos extratos

A triagem dos extratos em ensaios antibacterianos foi realizada no Laboratório de Epidemiologia e Microbiologia Molecular (LEMiMo) - IFSC-USP, sob supervisão da Profa. Dra. Ilana L. B. C. Camargo. As linhagens bacterianas *Gram* positivas e *Gram* negativa usadas são apresentadas na Tabela 12.

Tabela 12 - Linhagens bacterianas testadas.

Tipo	Bactéria	Linhagem	Características
<i>Gram +</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 35984	Boa formadora de biofilme
<i>Gram +</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	-
<i>Gram +</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC29212	-
<i>Gram +</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	VRE16	ST412, <i>vanA</i> , origem clínica
<i>Gram -</i>	<i>Escherichia coli</i>	ATCC25922	-

Para os ensaios, cada amostra foi diluída em DMSO para fornecer uma solução estoque concentrada (100 vezes). Posteriormente a solução estoque foi diluída na proporção de 1:100 em caldo Mueller Hinton Cátion Ajustado (MHCA) (BD Lot. 3322206) segundo as condições do CLSI (2013). A partir disso cada extrato foi testado em 512 µg/ml a 1% DMSO, ou na maior concentração em que foi possível dissolver a amostra sem que houvesse precipitação. Para o controle negativo e controle positivo foram adicionados caldo Mueller Hinton Cátion Ajustado (1% DMSO).

A incubação foi a 37°C e a leitura visual dos resultados foi realizada após 24h. A triagem da atividade foi definida como positiva ou não, na concentração testada. Quando o CIM (Concentração Inibitória Mínima) é maior que a concentração testada, a amostra é considerada inativa. As amostras que apresentaram atividade positiva foram submetidas ao teste de avaliação da CIM. Os testes foram realizados em duplicata.

2.3.7 Fracionamento do extrato de *F. solani* obtido em malte e isolamento dos metabólitos

O extrato *Fusarium solani* em Malte (CSP5B, também denominado neste estudo como *FsM* = Nome do fungo + inicial do meio), após ter seu método cromatográfico analítico otimizado, foi fracionado por CLAE semipreparativa nas condições delineadas pela Tabela 13: eluição gradiente, com fase móvel composta

por H₂O (0,1% ác. fórmico)/ACN (0,1% ác. fórmico). O método analítico (cromatograma mostrado na Figura 45) foi escalonado para o semipreparativo empregando-se uma vazão de 3,94 ml em 75.00 min (Tabela 13), e volume de injeção de 50 µl (solução [60 mg/ml]).

Tabela 13 - Programação do gradiente para as análises de *FsM*.

Método analítico			Método semi-preparativo		
Tempo (min)	%B	Vazão (ml/min)	Tempo (min)	%B	Vazão (ml/min)
0,01	5	1,00	0,01	5	3,94
26,00	61,75	1,00	52,00	61,75	3,94
29,00	100	1,00	56,00	100	3,94
35,00	100	1,00	66,00	100	3,94
38,00	5	1,00	70,00	5	3,94
42,00	5	1,00	75,00	5	3,94
42,01	-		75,01	-	

A separação gerou 15 frações, das quais a fração *FsM*.8 (*t_r* 27,75 - 28,00 min, Figura 46) forneceu 3,2 mg (5,3%) da substância **53** (poconina N), enquanto a fração *FsM*.13 (*t_r* 35,80 - 36,00 min, Figura 46), rendeu 4,8 mg (8%) da substância **54**.

Figura 45 - Cromatograma do extrato *FsM* em escala analítica (λ = 254 nm).

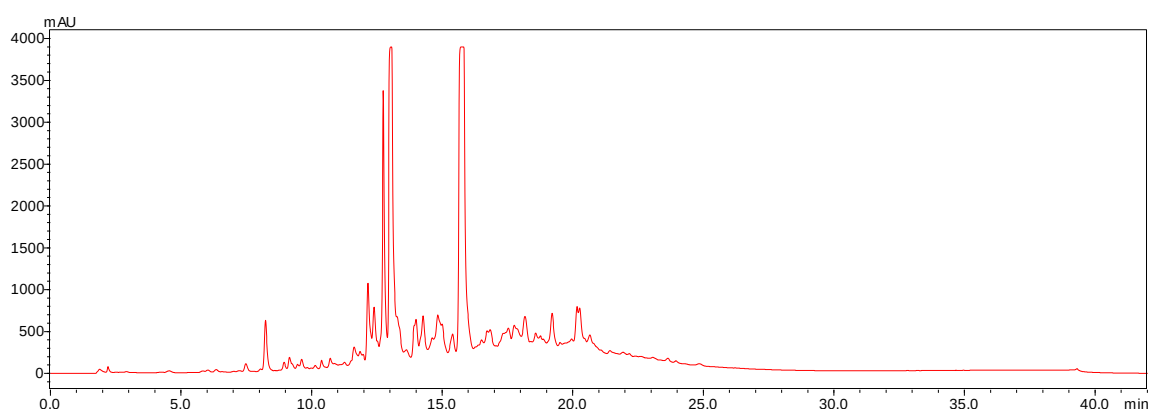
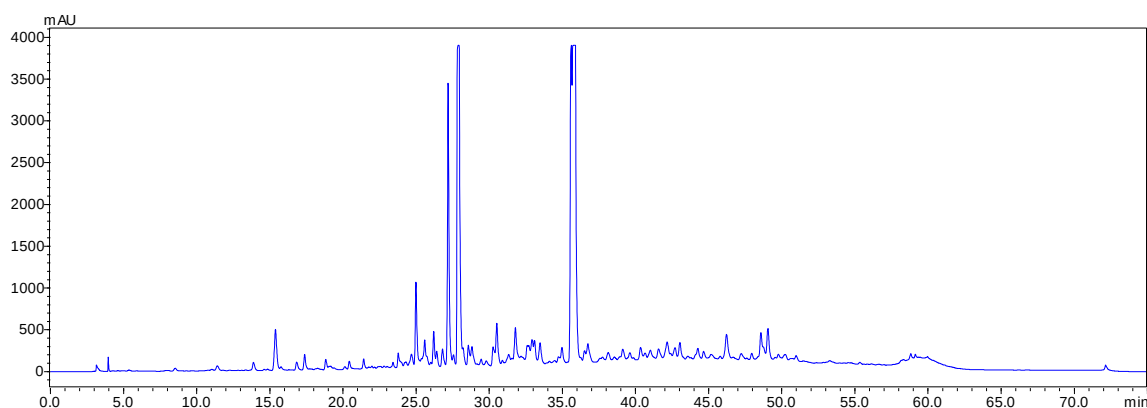


Figura 46 - Cromatograma do extrato *FsM* em escala semipreparativa ($\lambda = 254$ nm).



2.3.8 Análises de CLAE-EM/EM

As análises de espectrometria de massas sequencial (EM/EM) foram realizadas em um CLAE Shimadzu® (composto pelos seguintes módulos bomba: LC-20AD, Detector de Arranjo de Diodos: SPD-M20A; forno de coluna: CTO-20A; injetor automático: SIL-20AHT e módulo de Comunicação: CBM-20A), acoplado a um espectrômetro de massas Amazon SL Bruker®, (fonte de ionização: electrospray; analisador de massas: IonTrap). O método cromatográfico analítico consistiu naquele especificado na seção 2.3.7

Os dados de EM foram adquiridos no modo positivo, na faixa de m/z de 50-1200 Da. Para aquisição dos espectros de fragmentação (EM/EM), os três íons mais intensos foram selecionados e automaticamente fragmentados (auto-EM²) aplicando-se uma amplitude de fragmentação de 75%.

2.3.9 Construção das redes de interações moleculares

Os dados de CLAE-EM/EM de entrada (extrato do meio Malte, branco do solvente e *FsM*) para a construção das redes de interações moleculares foram gerados através da conversão dos dados não tratados para o formato .mzXML (32 bit), utilizando-se o software MSconvert (Proteowizard 3.0). Os dados foram subsequentemente submetidos à plataforma GNPS (gnps.ucsd.edu) e o conjunto público dos resultados desta análise encontra-se disponível em

<https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=40a0eaf1f75a4ef4ba5873597d1e5122>.

Os resultados foram importados e visualizados utilizando-se o software Cytoscape 3.4.0. A rede de interações moleculares foi criada usando-se os seguintes parâmetros: os dados foram filtrados removendo-se todos os picos de EM/EM dentro de +/- 17 Da em relação à m/z do precursor. Os espectros de EM/EM foram filtrados pela seleção de apenas seis picos na janela de +/- 50 Da pelo espectro. Os dados foram então agrupados com MS-Cluster com uma tolerância da massa parental de 2.0 Da e uma tolerância do íon fragmento de 0.5 Da para criar os espectros de consenso. Em seguida, os espectros de consenso com menos de dois espectros foram descartados. Uma rede foi então criada onde as arestas foram filtradas para terem uma pontuação de cosseno acima de 0.7 e mais de seis picos combinados. As arestas entre dois nodos foram mantidas na rede apenas se os nodos aparecessem entre os 10 nodos mais similares um do outro. Os espectros da rede foram então procurados nas bibliotecas espectrais da GNPS. A biblioteca espectral foi filtrada da mesma maneira que os dados de entrada. Todas as combinações mantidas entre a rede de espectros e os espectros da biblioteca apresentaram pontuação acima de 0.7 e no mínimo 6 picos encontrados.

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

2.4.1 Massas de extratos obtidas e análise exploratória dos dados cromatográficos por PCA

De modo geral, todos os fungos apresentaram bom desenvolvimento nos meios de cultivo utilizados, o que foi evidenciado pela produção de uma grande quantidade de micélio, além da coloração e viscosidade do caldo. As massas de extrato obtidas são mostradas na Tabela 14.

F. oxysporum foi o fungo que produziu a maior quantidade de extrato no meio CZAPEK (178,3 e 210,1 mg, respectivamente, para as possíveis subespécies correspondentes aos códigos CSP18B e CSP44A), enquanto nos meios PDB (68,7 mg - CSP19A) e Malte (73,4 mg - CSP5B), *F. solani* foi aquele a fornecer as maiores massas.

No que tange ao comparativo entre fungos endofíticos versus rizosféricos, os endófitos mostraram um menor rendimento de extrato, porém um perfil metabólico mais rico nos cromatogramas fornecidos por CLAE-DAD, baseado no número de picos detectados. Por outro lado, o perfil metabólico menos diversificado dos fungos rizosféricos parece ser compensado pela produção de compostos em uma escala muito superior à dos endofíticos.

Tabela 14 - Massas de extratos provenientes de cultivo em diferentes meios.

Fungo	Código	Malte	PDB	Czapek
<i>Fusarium solani</i>	CSP19A	20,2 mg	68,7 mg	*
<i>Fusarium oxysporum</i>	CSP18B	18,4 mg	10,1 mg	178,3 mg
<i>Fusarium solani</i>	CSP9A	18,1 mg	18,1 mg	70,1 mg
<i>Fusarium solani</i>	CSP5B	73,4 mg	6,3 mg	73,3 mg
<i>Fusarium oxysporum</i>	CSP44A	20,0 mg	8,6 mg	210,1 mg
<i>Fusarium oxysporum</i>	CSP4A	26,1 mg	27,0 mg	46,8 mg
<i>Fusarium oxysporum</i>	CSP30	25,3 mg	*	4,2 mg
<i>Fusarium solani</i>	CSP09	25,2 mg	6,6 mg	*
<i>Colletotrichum sp.</i>	Csp	13,4 mg	18,9 mg	*
<i>Phomopsis cassiae</i>	Pc	17,9 mg	28,9 mg	56,4 mg

*Extratos não obtidos ou obtidos em massas muito baixas.

A sobreposição dos dados cromatográficos plotados após a etapa de pré-processamento é ilustrada na Figura 46, e o gráfico bidimensional de scores, contendo as componentes PC1 x PC2 que expressam a maior parte da variância são representadas na Figura 47.

O gráfico de scores mostra o agrupamento de extratos de *fusariums* (elipse laranja) provenientes do meio CZAPEK (CSP5B, CSP09 - *F. solani*; CSP30, CSP44A - *F. oxysporum*), o que está de acordo com os perfis químicos destes fungos, uma vez que eles podem produzir compostos em comum.

No entanto, um segundo conjunto distinto foi observado (rosa), o qual é formado por dois extratos de *F. solani* (CSP9A) e *F. oxysporum* (CSP18B). Porém esse grupo pode ser justificado ou a partir de flutuações nas condições de cultura (variação de temperatura, luminosidade, entre outros) que frequentemente levam até mesmo uma única espécie a apresentar perfis metabólicos diferentes, ou mais provavelmente, trata-se de variações inerentes à duas subespécies de *Fusarium* que exibem produção de compostos diferenciadas dos demais *Fusarium* coagrupados,

porém similares entre si. Desta forma, os resultados da PCA mostram um bom modelo de predição para as variáveis.

Figura 47 - Sobreposição dos dados cromatográficos plotados após a etapa de pré-processamento.

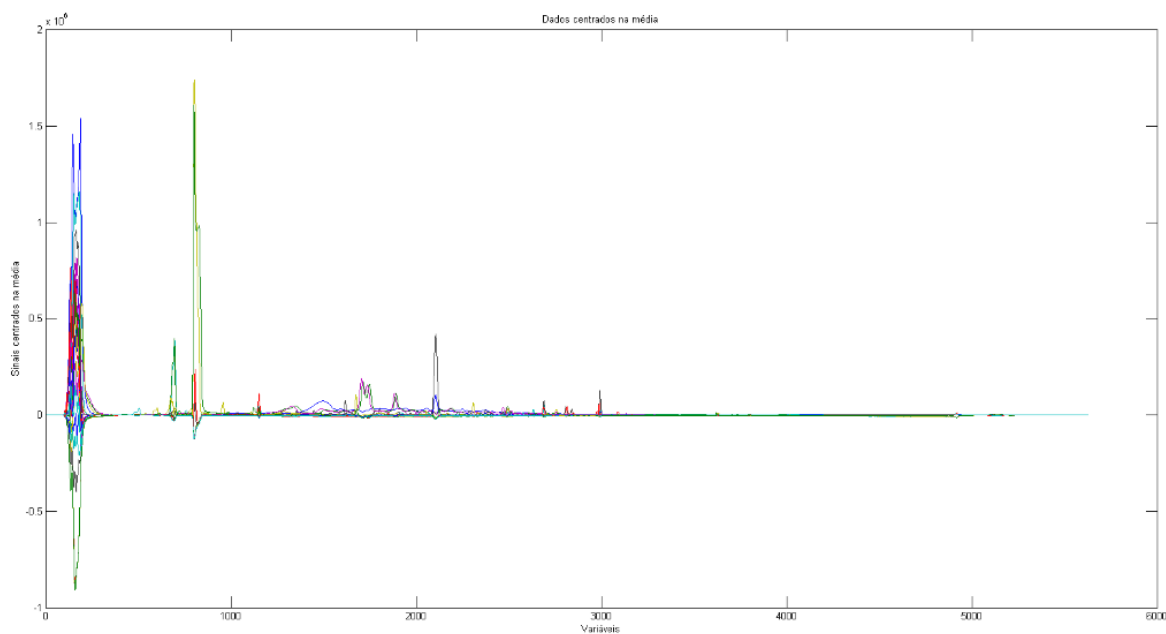
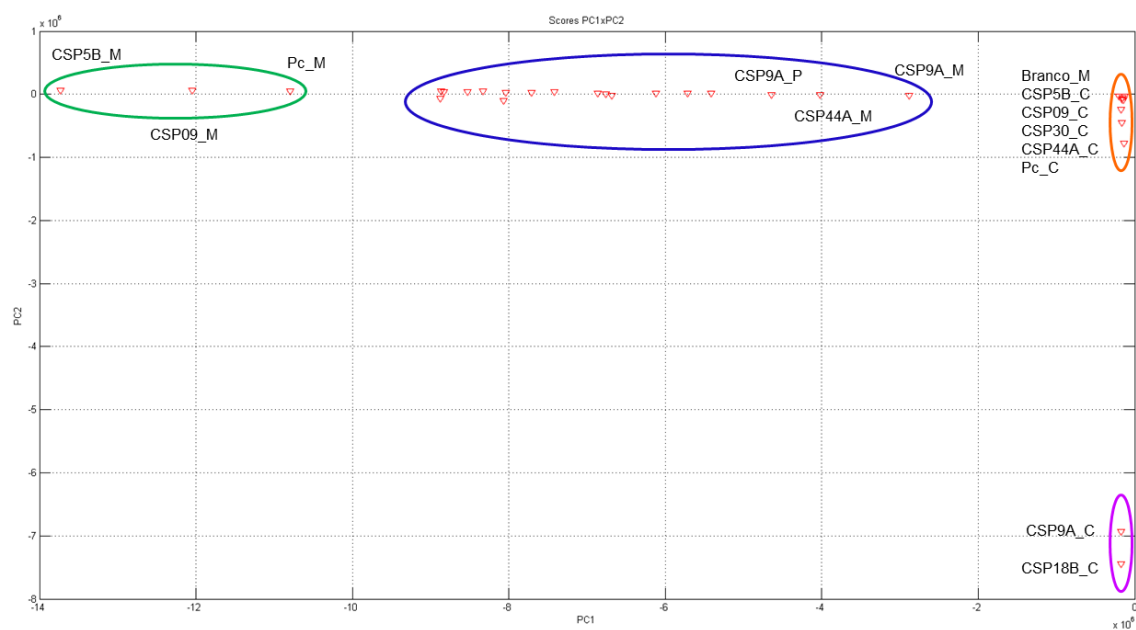


Figura 48 - Gráficos de scores da PCA.



2.4.2 Resultados da triagem antibacteriana

No total, vinte e cinco extratos foram triados para efeitos bacterianos ou bacteriostáticos sobre as linhagens de bactérias gram-positivas (*Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*) e gram-negativa (*E. coli*), listadas nas Tabelas 15 a 17, dos quais dezesseis extratos são oriundos de meio Malte, nove de PBD e cinco de CZAPEK.

Apenas o extrato de *F. solani* em Malte - FsM (CSP5B) foi ativo entre os demais testados, desempenhando atividade contra *S. epidermidis* ATCC35984, porém apresentando inatividade frente às demais linhagens.

Tabela 15 - Atividade de inibição do crescimento bacteriano dos extratos em Malte (valores <512 destacados em azul).

Linhagens bacterianas	CIM (µg/mL)										
	Malte	CSP19A	CSP18B	CSP9A	CSP5B	CSP44A	CSP4A	CSP30	CSP09	Csp	Pc
<i>S. epidermidis</i> ATCC35984	>512	>512	>512	>512	<512	>512	>512	>512	>512	>512	>512
<i>S. aureus</i> ATCC25923	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512
<i>E. faecalis</i> ATCC29212	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512
<i>E. faecium</i> VRE16	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512
<i>K. pneumoniae</i> ATCC700603	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512
<i>E. coli</i> ATCC25922	>512	>512	>512*	>512*	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512

*Inibição parcial para bactéria *E. coli* ATCC 25922 de 92% para o extrato 18B e 86,67% para o extrato CSP9A.

Tabela 16 - Atividade de inibição do crescimento bacteriano dos extratos em PDB (valores <512 destacados em vermelho).

Linhagens bacterianas	CIM (µg/mL)										
	PDB	CSP19A	CSP18B	CSP9A	CSP5B	CSP44A	CSP4A	CSP30	CSP09	Csp	Pc
<i>S. epidermidis</i> ATCC35984	>512	>512	>512	-	<512	>512	>512	-	<512	>512	>512
<i>S. aureus</i> ATCC25923	>512	>512	>512	-	<512	>512	>512	-	<512	>512	>512
<i>E. faecalis</i> ATCC29212	>512	>512	>512	-	>512	>512	>512	-	>512	>512	>512
<i>E. faecium</i> VRE16	>512	>512	>512	-	>512	>512	>512	-	>512	>512	>512
<i>K. pneumoniae</i> ATCC700603	>512	>512	>512	-	>512	>512	>512	-	>512	>512	>512
<i>E. coli</i> ATCC25922	>512	>512	>512	-	>512	>512	>512	-	>512	>512	>512

Tabela 17 - Atividade de inibição do crescimento bacteriano dos extratos em CZAPEK (valores <512 destacados em verde).

Linhagens bacterianas	CIM (µg/mL)										
	CZAPEK	CSP19A	CSP18B	CSP9A	CSP5B	CSP44A	CSP4A	CSP30	CSP09	Csp	Pc
S. epidermidis ATCC35984	-	-	>512	< 512	>512	-	>512	-	-	-	>512
S. aureus ATCC25923	-	-	>512	< 512	>512	-	>512	-	-	-	>512
E. faecalis ATCC29212	-	-	>512	< 512	>512	-	>512	-	-	-	>512
E. faecium VRE16	-	-	>512	> 512	>512	-	>512	-	-	-	>512
K. pneumoniae ATCC700603	-	-	>512	> 512	>512	-	>512	-	-	-	>512
E. coli ATCC25922	-	-	>512	< 512	>512	-	>512	-	-	-	>512

Entre os extratos de PDB, constatou-se atividade para os extratos de *F. solani* (CSP5B e CSP09) sobre as linhagens gram-positivas *S. epidermidis* ATCC35984 e *S. aureus* ATCC25923, indicando a presença de compostos comumente atribuíveis ao efeito observado.

F. solani (CSP9A) cultivado em czapek também foi o único cujo o extrato apresentou-se ativo, mostrando um espectro de ação abrangendo um número maior de linhagens gram-positivas, especificamente: *S. epidermidis* ATCC35984, *S. aureus* ATCC25923, *E. faecalis* ATCC29212; e também gram-negativa - *E. coli* ATCC25922.

Embora apenas duas espécies diferentes de endófitos tenham sido testadas, face a um número maior de possíveis subespécies de *F. solani* e *F. oxysporum*, esses resultados sugerem um maior potencial dos fungos da rizosfera, provavelmente atribuível ao contato direto desses microrganismos com uma variedade de bactérias rizosféricas.

2.4.3 Elucidação estrutural dos metabólitos isolados

2.4.3.1 Substância 53

A fórmula molecular do composto **53**, isolado na forma de cristais brancos, $[\alpha]_D^{25}$ - 70,0 (c 0,1, MeOH), foi estabelecida como $C_{18}H_{21}ClO_7$, com base no seu espectro de massas (Figura 48), o qual apresentou o íon de m/z 385,08, correspondente a molécula protonada (calc. para $C_{18}H_{22}ClO_7$, 385,1025), além de íons referentes aos adutos de sódio (m/z 407,08) e de potássio (m/z 423,03).

Os dados de RMN de ^1H (Figura 49) mostraram a presença de um sinal em δ_{H} 6,46 (s), atribuível a um hidrogênio aromático, um sinal em δ_{H} 5,50 (*quint*, $J = 6,6; 13,2$), característico de um hidrogênio acilometoxínico, além de dois sinais típicos da ressonância de grupos oximetínicos (δ_{H} 4,28, *dd*; 3,82, *td*), e uma metila secundária δ_{H} 1,37 (*d*).

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 50), em combinação com o de DEPT-135 (Figura 51), indicou a presença de duas carbonilas, sendo uma típica de éster (δ_{C} 171,7) e uma cetônica (não conjugada, δ_{C} 207,83), além de um anel benzeno pentassubstituído, uma ligação dupla (δ_{C} 134,6; 135,1) e, ainda, dez sinais correspondentes a carbonos sp^3 , incluindo uma metila, quatro metilenos, um aciloximetino, dois oximetilenos, quatro metilenos e uma metila.

As atribuições diretas H-C foram feitas de acordo com a interpretação do espectro de HSQC (Figura 52) e as conectividades dos átomos foram determinadas por meio da combinação de dados fornecidos pelos experimentos de HMBC (Figura 53) e TOCSY-1D (Figura 55). Desta forma, foi possível confirmar a presença de um sistema 2-alkil-3-cloro-4,6-dihidroxi-benzoato (C11 - C18) e de uma porção (um único sistema de *spin*) (*Z*)-undec-5,6-en-4,7-diol (Figura 54), permitindo a identificação da molécula como uma lactona β -resorcílica (Xu *et al.*, 2010).

A geometria da ligação dupla-5,6 C-C foi determinada de acordo com o valor da constante de acoplamento ($J_{\text{H-5/H-6}} = 6,5$ Hz), indicando que ela possui configuração *Z*.

As configurações relativas dos centros estereogênicos foram atribuídas com base nos dados de NOESY 1D (Figura 56) e nas constantes de acoplamento ($J_{\text{H-4/H-5}} = 9,3$ Hz; $J_{\text{H-6/H-7}} = 9,3$ Hz). As correlações observadas via NOESY para $\text{CH}_3\text{-1/H-4}$ sugerem que estes grupos estão cofacialmente orientados (face α do macrociclo, Figura 54). Portanto, a estrutura do metabólito **53** foi elucidada como (-)-(2*R**, 4*S**, 8*R**)-(*Z*)-pochonina N, cujo o análogo possuindo configuração *E* da dupla ligação-5,6 foi isolado do fungo *Pochonia chlamydosporia*, por Shinonaga e colaboradores (2009).

O composto pochonina N foi avaliado para inibição da glicoproteína WNT-5A e citotoxicidade frente a células de derme papilar. Embora tenha demonstrado baixa atividade de inibição da WNT-5A, ela demonstrou-se não tóxica às células (Shinonaga *et al.*, 2009), e a baixa toxicidade foi atribuída a presença do átomo de cloro.

Figura 49 - Espectro de massas do composto **53** (modo positivo).

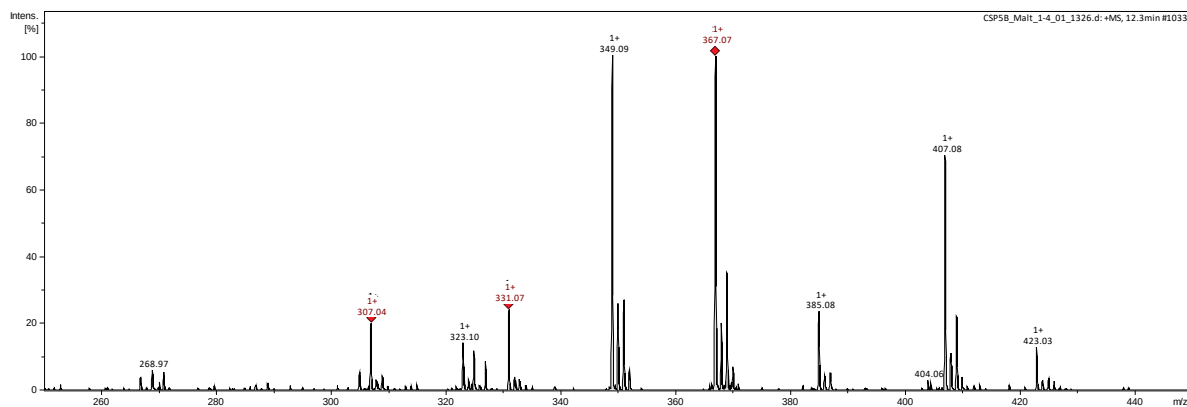


Figura 50 - Espectro de RMN de ^1H (600,13 MHz, CD_3OD) do composto **53**.

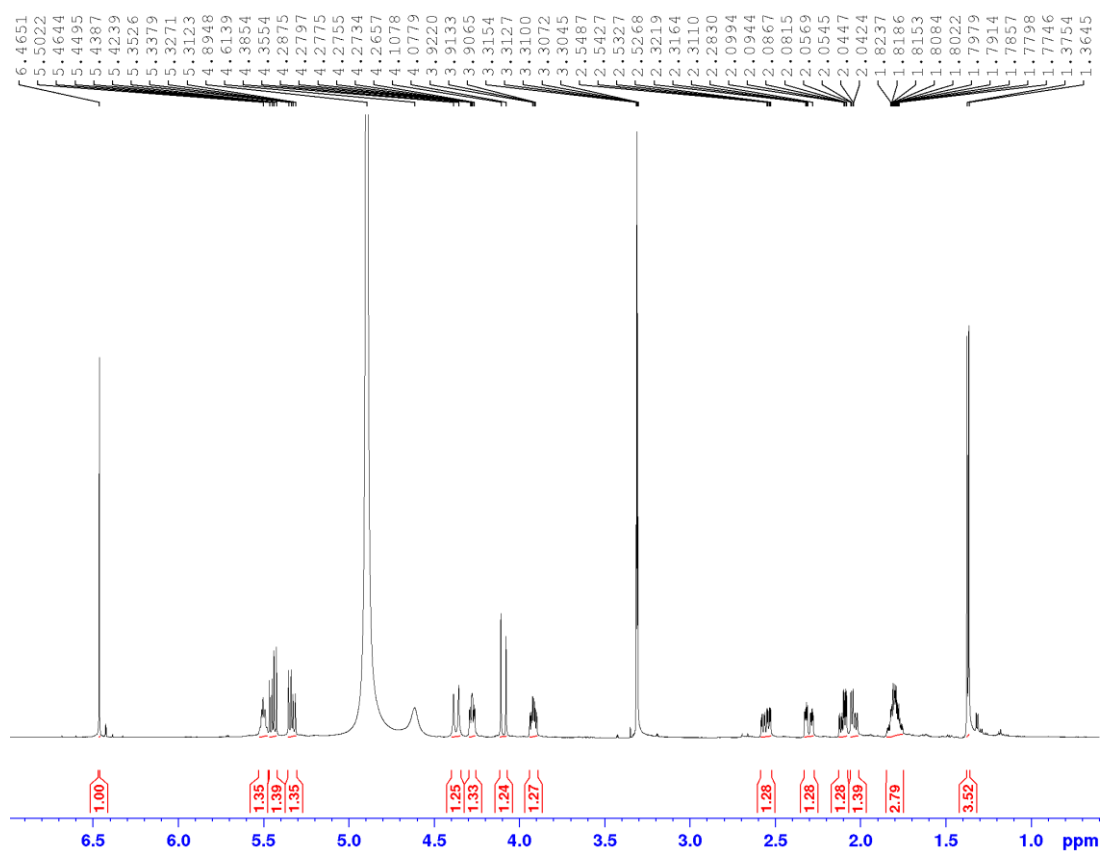


Figura 51 - Espectro de RMN de ^{13}C (150,9 MHz, CD_3OD) do composto **53**.

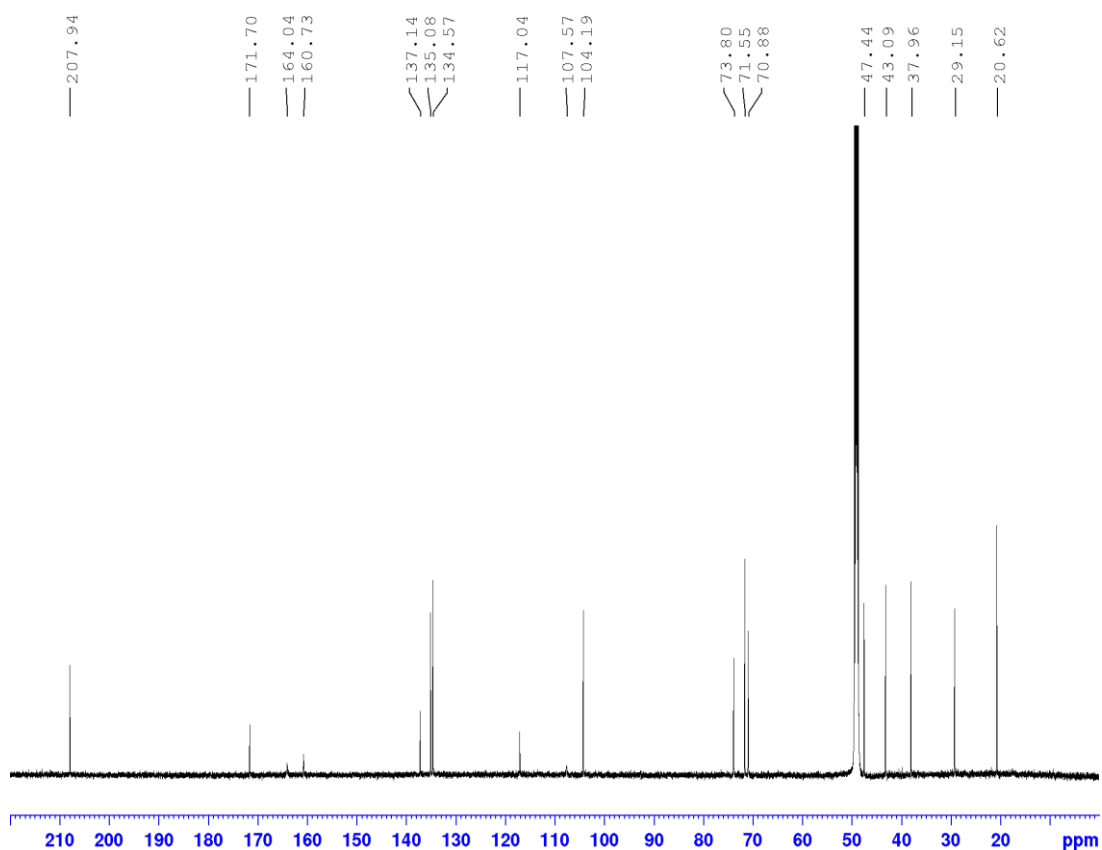


Figura 52 - Espectro de DEPT-135 (150,9 MHz, CD_3OD) do composto **53**.

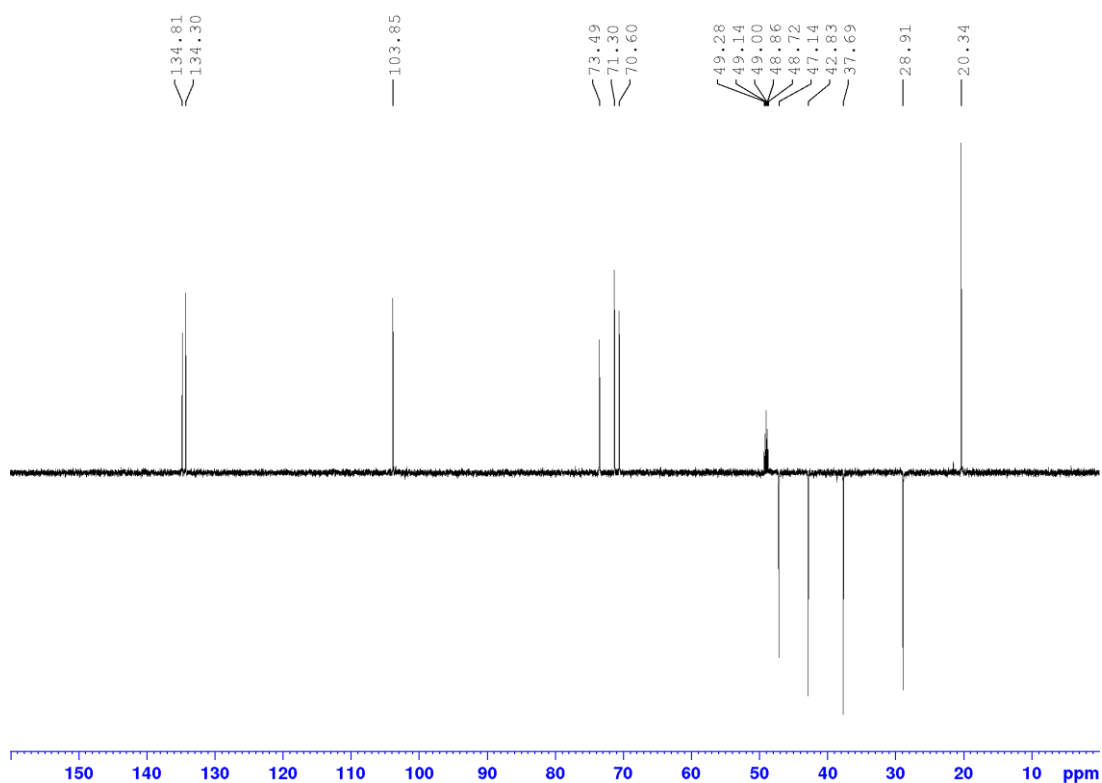


Figura 53 - Espectro de HSQC (600,13 MHz, CDCl_3) do composto **53**.

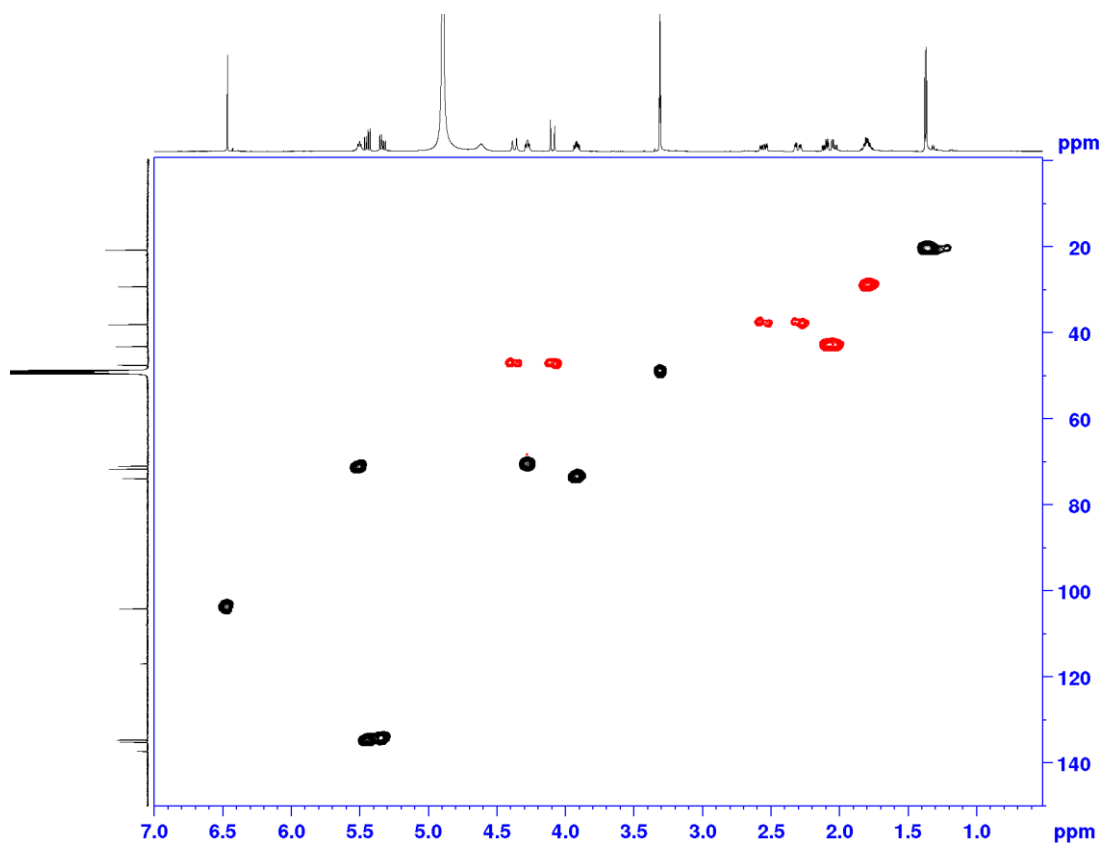


Figura 54 - Espectro de HMBC (600,13 MHz, CDCl_3) do composto **53**.

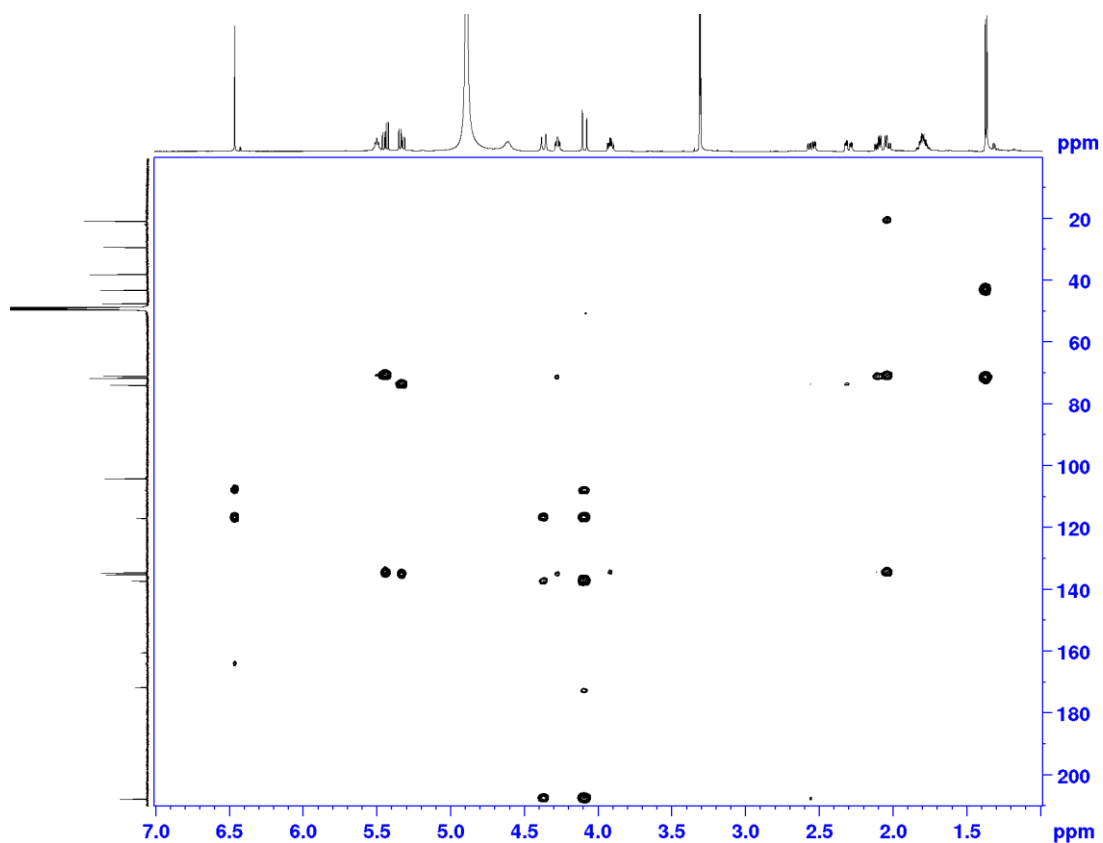


Figura 55 - Estrutura do composto **53**.

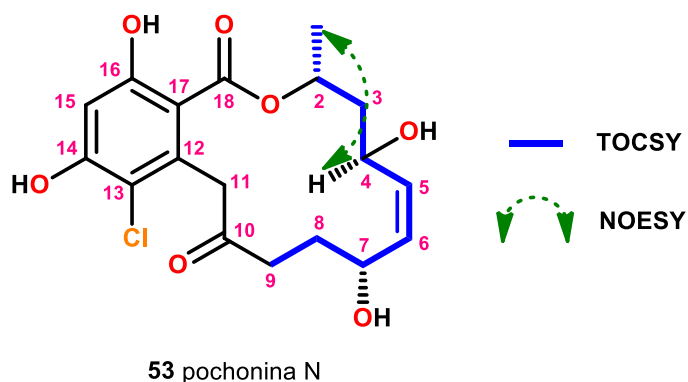


Tabela 18 - Dados espectroscópicos de RMN do metabólito **53** (600 MHz, CD₃OD).

Posição	δ_c , tipo	δ_H , mult. (J = Hz)	HMBC
1	20,6, CH ₃	1,37, <i>d</i> (6,5)	C-2, C-3
2	71,6, CH	5,50, <i>quint</i> (6,5; 13,2)	C-4, C-18
3	43,1, CH ₂	2,10, <i>ddd</i> (3,0; 7,5; 10,8) 2,04, <i>ddd</i> (1,6; 7,5; 8,8)	C-1, C-2, C-4, C-5
4	70,9, CH	4,28, <i>ddd</i> (1,6; 4,3; 9,3)	C-2, C-6
5	134,6, CH	5,33, <i>dd</i> (9,3; 6,5)	C-6, C-7
6	135,1, CH	5,44, <i>dd</i> (9,3; 6,5)	C-2, C-3, C-4
7	73,8, CH	3,92, <i>td</i> (5,2; 9,3; 18,9)	C-6, C-8
8	29,2, CH ₂	1,80, <i>m</i>	C-6, C-7, C-10
9	38,0, CH ₂	2,55, <i>ddd</i> (3,5; 9,6; 13,1; 19,5) 2,30, <i>ddd</i> (3,5; 7,6; 10,8; 19,5)	C-7, C-8, C-10
10	207,8, C		
11	47,4, CH ₂	4,37, <i>d</i> (18,0) 2,30, <i>d</i> (18,0)	C-10, C-12, C-13, C-17
12	137,2, C		
13	116,9, C		
14	160,4, C		
15	104,1, CH	6,46, <i>s</i>	C-13, C-14, C-16, C-17
16	164,0, C		
17	107,8, C		
18	171,7, C		

Figura 56 - Espectro de TOCSY-1D (600 MHz, CD₃OD).do composto **53**.

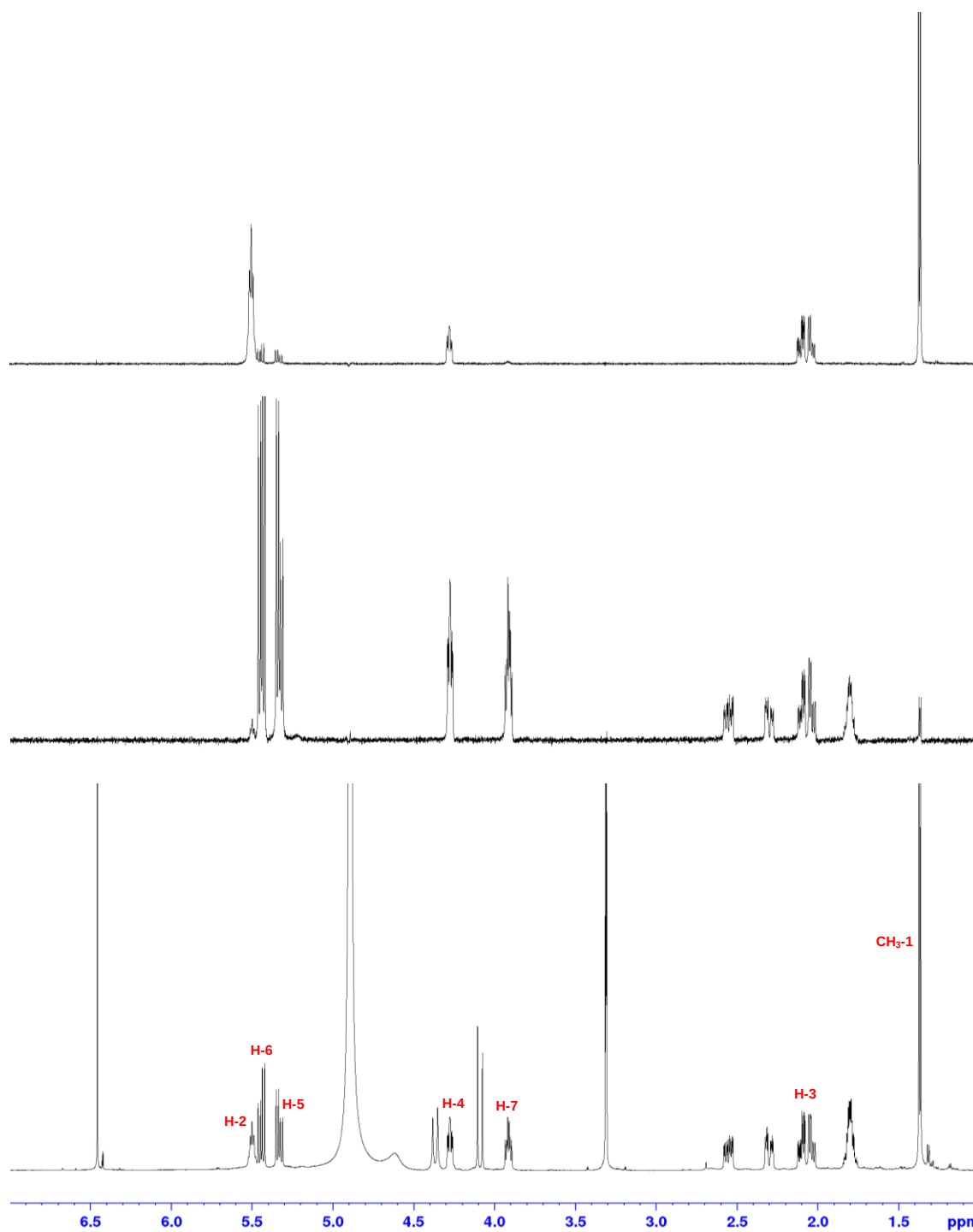
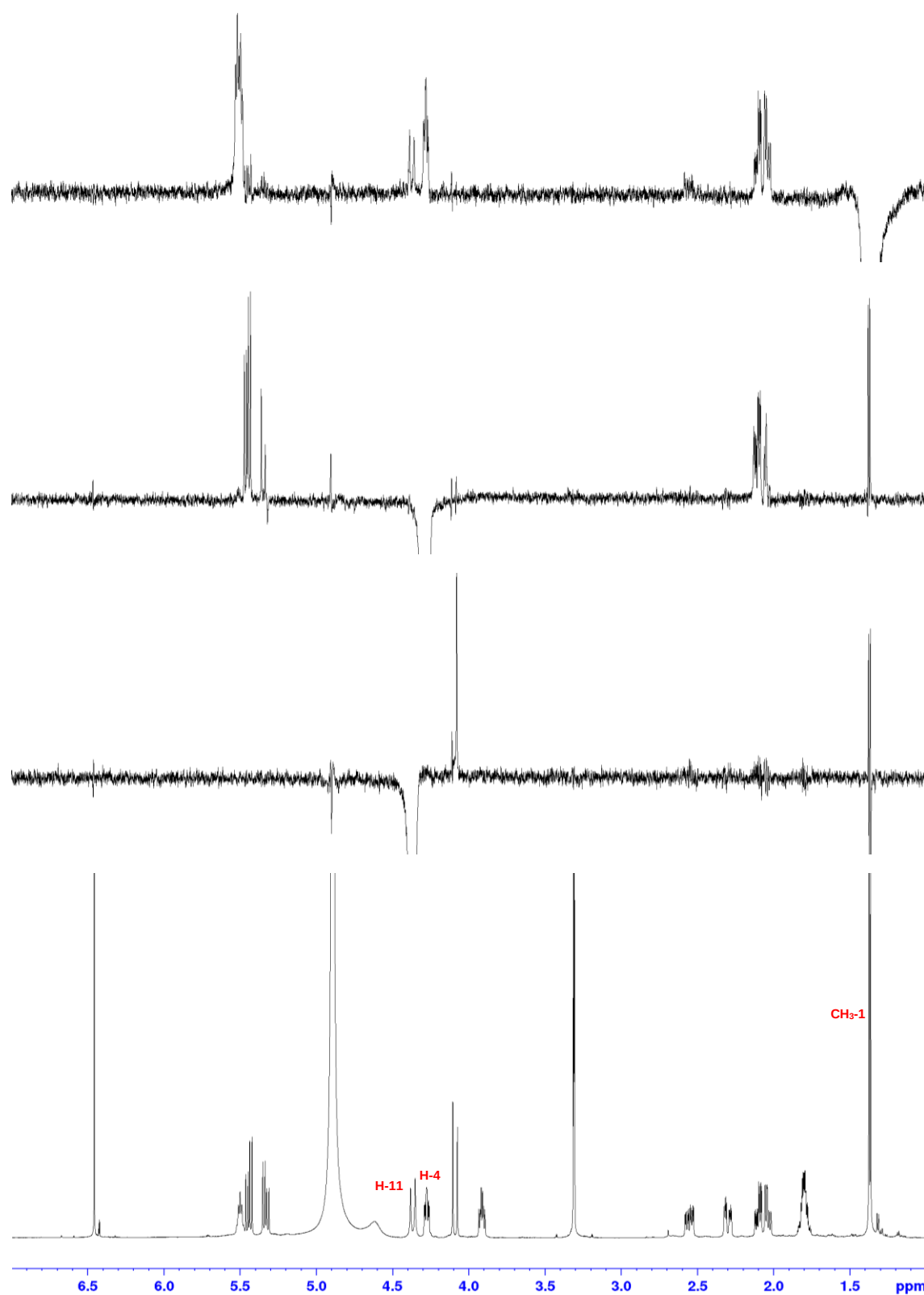


Figura 57 - Espectro de NOESY-1D (600 MHz, CD₃OD).do composto **53**.



2.4.3.2 Substância 54

O composto **54** foi obtido na forma de cristais brancos, $[\alpha]_D^{25} + 6,4$ (c 0,1, MeOH), e sua fórmula molecular foi inferida como $C_{18}H_{28}O_5$ a partir do íon da molécula protonada (Figura E1) de m/z 325,19 (calc. para $C_{18}H_{29}O_5$, 325,1970), observado em seu espectro de massas.

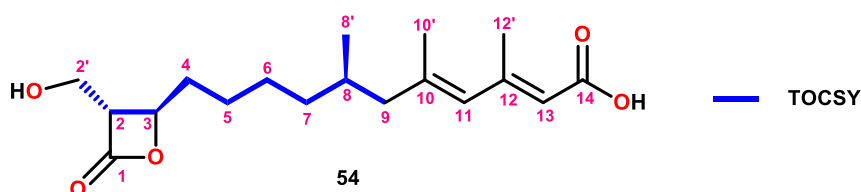
O espectro de RMN de 1H (Figura E2) mostrou sinais atribuíveis a ressonância de um grupo acilóximetino (δ_H 3,82, *m*), um hidroximetileno [3,83, *m*; 3,76, *dd* (5,5; 10,8 Hz)], bem como sinais característicos de dois hidrogênios vinílicos (δ_H 5,76, *sl*; 5,65, *sl*) e uma metila secundária, em δ_H 0,86, *d* (6,6 Hz).

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura E3), em combinação com o de DEPT-135 (Figura E4), revelou a presença de 18 sinais: sendo um atribuível a uma carboxila (δ_C 170,5) $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -dieno-conjugada; uma carbonila cujo deslocamento sugere tratar-se de um éster cíclico (δ_C 176,7), indicando a presença de um anel lactônico; além de um carbono aciloximetínico (δ_C 71,0), um hidroximetileno (δ_C 61,6), dois metinos, cinco grupos metileno e três metilas.

O espectro de HSQC (Figura E5) forneceu as correlações diretas hidrogênio-carbono ($^1J_{H-C}$). Enquanto os dados de TOCSY 1D confirmaram a extensão de parte da cadeia (C-5 – C-10), o experimento de HMBC (Figura E6) corroborou a presença de um anel β -lactônico e, ainda, permitiu estabelecer a localização das metilas (Figura 57, Tabela E1) em C-8, C-10 e C-12.

Desta forma, a estrutura do composto **54** foi identificada como o ácido carboxílico β -lactônico denominado ácido 12-hidroxi-13-hidroximetil-3,5,7-trimetiltetradeca-2,4-dienoico-12,14-lactona (Figura 57), isolado originalmente como um antibiótico por Aldridge *et al.*, 1971. Também conhecida como hymeglusina, essa substância foi redescoberta como um inibidor potente e específico da citosólico 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) sintase (Tomoda *et al.*, 2004).

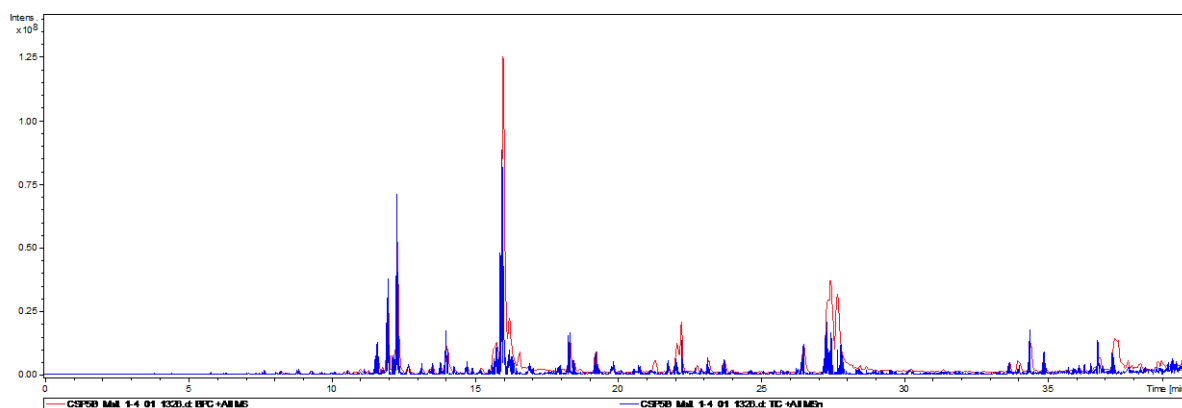
Figura 58 - Estrutura da β -lactona hymeglusina (**54**).



2.4.3 Compostos identificados no extrato por redes de interações moleculares

A aplicação da abordagem de redes de interações moleculares a partir dados de CLAE-EM/EM (Figura 59) do extrato *FsM* resultou na formação de catorze agrupamentos moleculares distintos (Figura 60) e na anotação de vinte e oito compostos, permitindo a identificação de onze metabólitos (Tabela 19, Figura 61), através da análise manual dos perfis dos espectros de EM/EM dos candidatos anotados.

Figura 59 - Cromatograma base (vermelho) e TIC (azul) obtido como auto-EM/EM (modo positivo) para o extrato *FsM*.



De maneira geral, em uma rede molecular cada nodo representa uma molécula, enquanto os aglomerados correspondem a moléculas correlacionadas estruturalmente, baseadas na similaridade dos seus espectros e padrões de fragmentação, constituindo famílias moleculares (Caraballo-Rodríguez *et al.*, 2017).

Entre as famílias moleculares observadas, uma mostrou um agrupamento de íons correspondentes à dicetopiperazinas (Figura 62), incluindo as estruturas dos compostos **55** - **59**. A confirmação dessas estruturas é exemplificada por meio do espectro representativo de EM/EM da substância **59** (Figura 63), bem como de seu perfil de fragmentação (Figura 64). A fragmentação inicial da molécula protonada ocorre com a clivagem heterolítica da ligação C₂-N₁, resultando na formação de um íon acílio intermediário, seguida pela perda de CO, por assistência anquimérica. Subsequentemente, ocorre a perda de NH₃, provavelmente, através de uma eliminação *syn*.

Figura 60 - Rede de interações moleculares resultante.

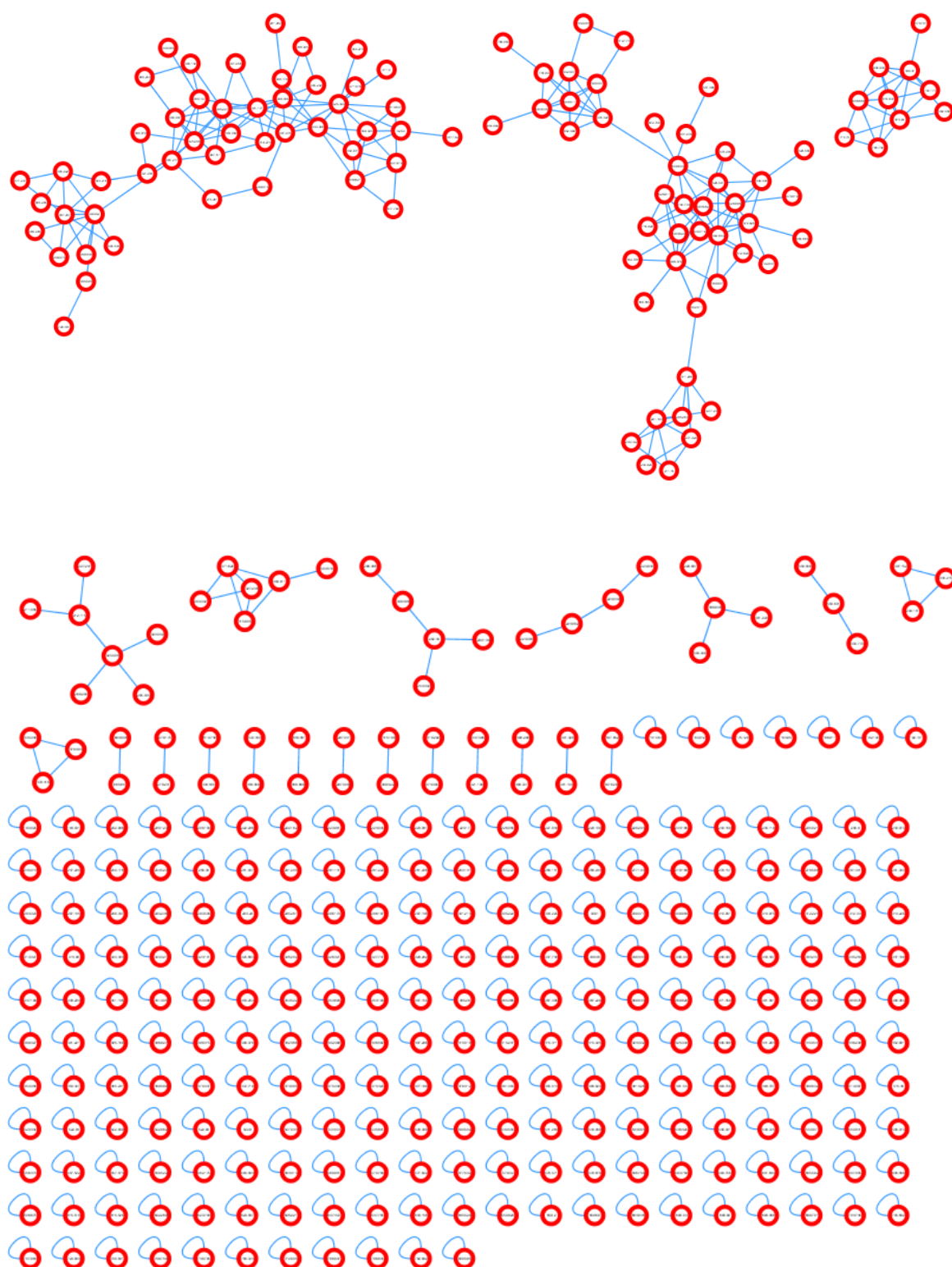


Tabela 19 - Metabólitos identificados via redes de interações moleculares.

Nº	Nome	t _r (min)	[M+H] ⁺ _{obs}	[M+H] ⁺ _{bib}	Dif. de massa (ppm)	FM
55	Ile-Pro	7,44	211,16	211,14	0,02	C ₁₁ H ₂₀ N ₂ O ₃
56	Ile-Tyr	7,29	277,32	277,15	0,15	C ₁₅ H ₂₂ N ₂ O ₄
57	Ciclo(Pro-Phe)	8,68	245,18	254,01	0,17	C ₁₄ H ₁₆ N ₂ O ₂
58	Tyr-Pro	5,78	261,18	261,12	0,06	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O ₄
59	Ciclo(Phe-Tyr)	9,66	311,30	311,00	0,30	C ₁₈ H ₁₈ N ₂ O ₃
60	Glu-Ile-Lys	6,47	388,37	388,25	0,12	C ₁₇ H ₃₃ N ₅ O ₅
61	13-(Z)-Docosenamida	33,63	338,49	338,34	0,15	C ₂₂ H ₄₃ NO
62	9-(Z)-Octadecenamida	34,38	282,43	282,28	-0,16	C ₁₈ H ₃₅ NO
63	Ácido 9,12-octadecadiinoico		277,11	277,22	-0,11	C ₁₈ H ₂₈ O ₂
64	Éster de metila do ácido 5-(Z),8-(Z),-11(Z)-eicosatrienoico		247,29	247,20	0,09	C ₂₂ H ₄₀ O ₃
65	Álcool Perilílico	28,1	175,13	175,11	0,02	C ₁₁ H ₂₀ O ₂

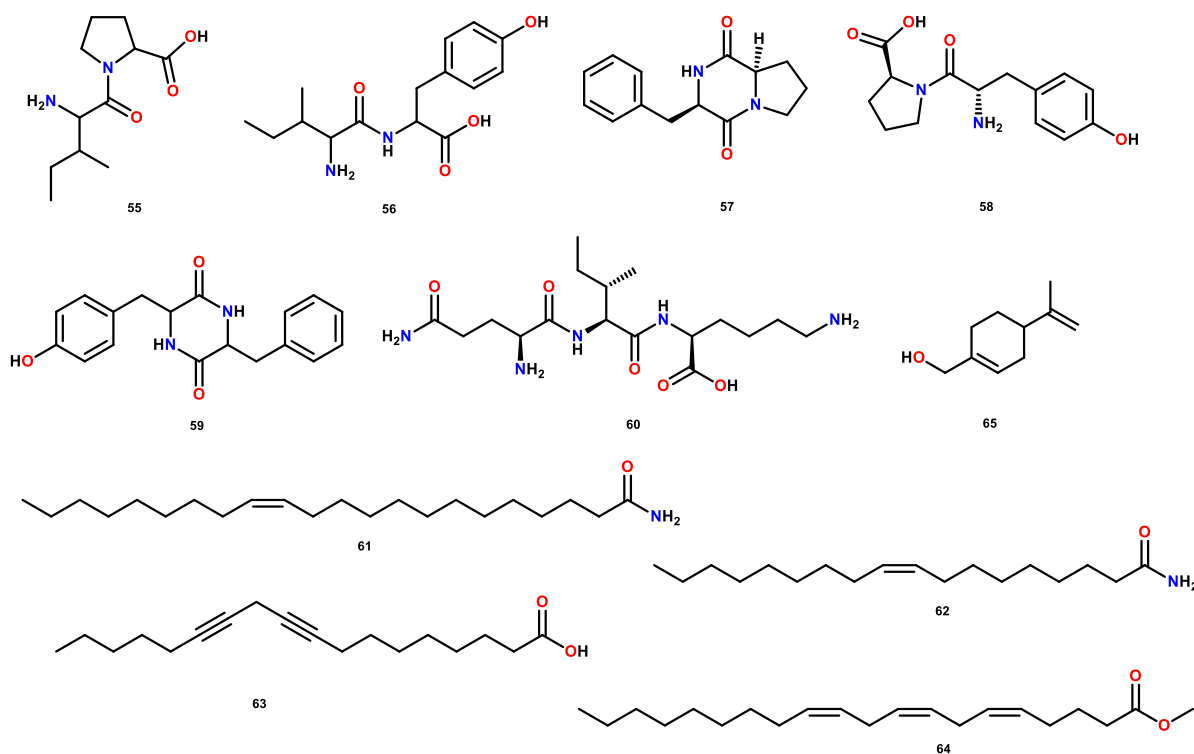
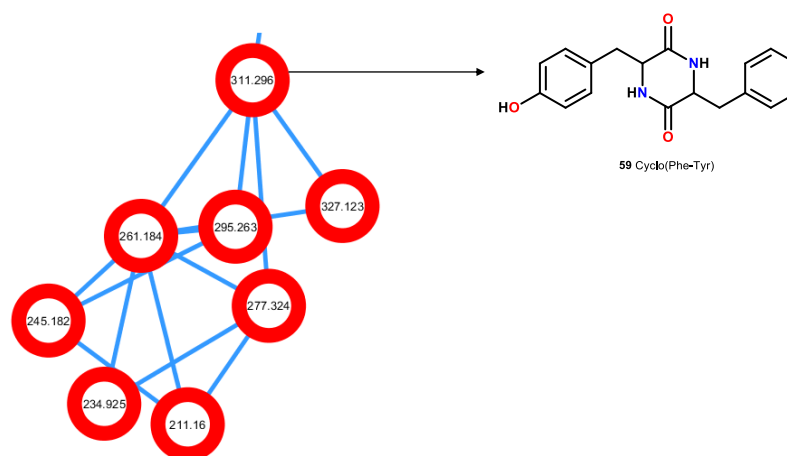
Figura 61 - Estruturas químicas dos compostos identificados por redes de interações moleculares.

Figura 62 - Família molecular de íons de dicetopiperazinas (**55** - **59**).



Dicetopiperazinas são PNs comumente encontrados em culturas fúngicas realizadas em meio rico em nutrientes, como o extrato de Malte. Essas substâncias são de interesse pois apresentam atividades em diversos ensaios biológicos, tais como antimicrobiano, antitumoral e antiviral (Furtado *et al.*, 2005).

O segundo aglomerado molecular (Figura 65) englobando nodos com valores referentes a compostos anotados na biblioteca da GNPS apontou a presença de enamidas, cujos perfis de fragmentação corroboraram as anotações, permitindo a identificação das moléculas **61** e **62** (Figura 60).

Figura 63 - Espectro de EM/EM representativo do íon precursor de m/z 311,16 - composto **59**.

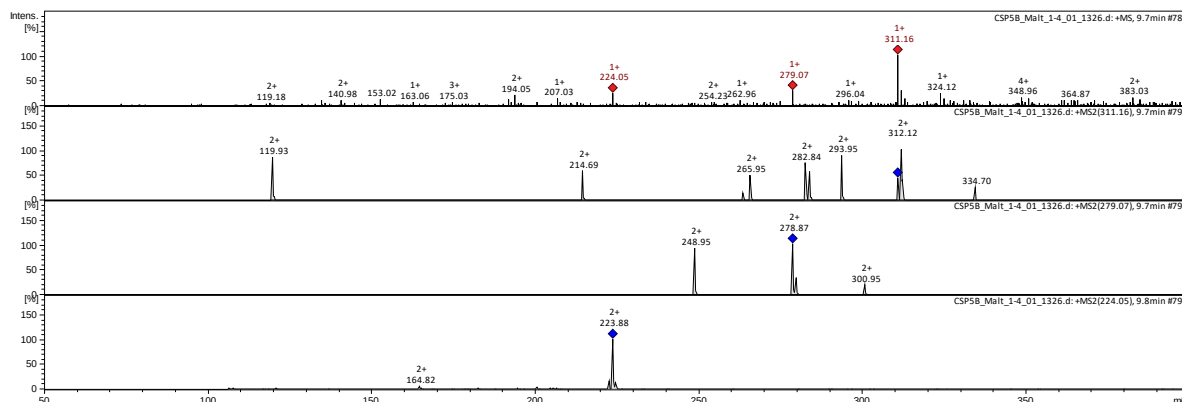


Figura 64 - Proposta de fragmentação inicial da molécula protonada do composto **59**.

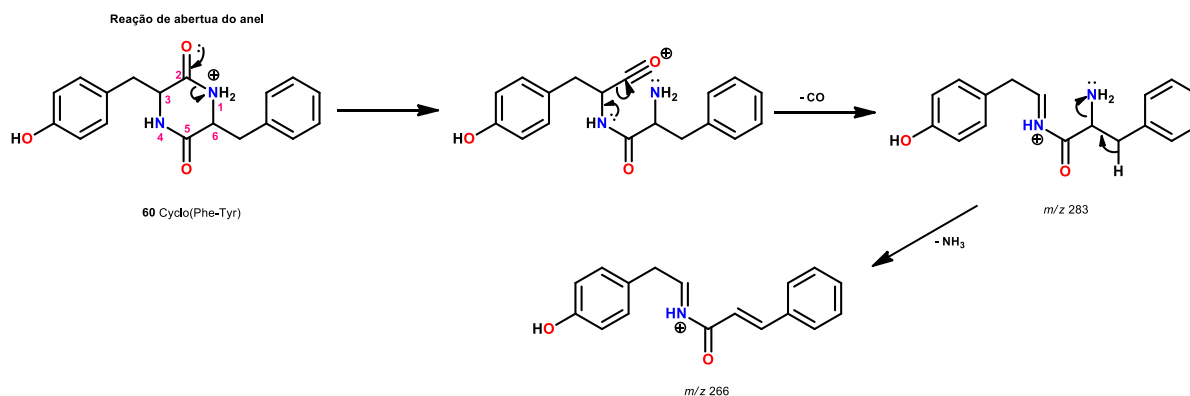
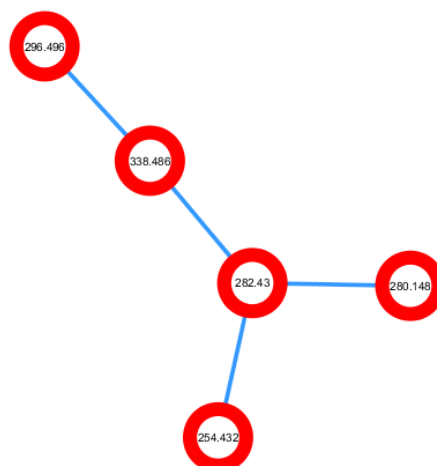


Figura 65 - Família molecular abrangendo os íons referentes à enamidas (**61** - **62**).



Enamidas com propriedades surfactantes e potencial antioxidação foram produzidas pelo fungo *Fusarium proliferatum*, cultivado em meio de arroz. Biossurfactantes possuem uma gama de aplicação devido a suas características anfífilas, incluindo biorremediação, alimentos, cosméticos, antimicrobiano e biomédica (Bhardwaj *et al.*, 2015).

Aglomerados distintos contendo os sinais atribuíveis à lactona resorcílica e a butirolactona isoladas do extrato foram localizados, indicado a produção de uma variedade rica desses compostos.

2.5 CONCLUSÕES

O cultivo de fungos endofíticos e rizosféricos associados à microbiota de *S. spectabilis*, realizado em diferentes meios de cultivo (caldo de CZAPEK, PDB e Malte), forneceu um conjunto de extratos que foram submetidos a análises do perfil metabólico por CLAE-DAD, bem como a triagem da atividade antibacteriana.

FsM, o extrato de *Fusarium solani* em Malte - um dos extratos ativos, foi submetido ao fracionamento por CLAE semipreparativa, resultando no isolamento da lactona β -resorcílica (-)-(2*R**, 4*S**, 8*R**)-(*Z*)-pochonina N e do ácido carboxílico β -lactônico hymeglusina, sendo esta última substância bastante conhecida por seu potencial antibiótico, o qual pode estar associado à atividade antibacteriana apresentada pelo extrato.

O extrato FsM também foi submetido a análise de CLAE-EM/EM e os dados obtidos foram analisados aplicando-se a abordagem de redes de interações moleculares, revelando a identificação de onze metabólitos adicionais, dentre os quais predomina a classe das dicetopiperazinas.

Embora apenas duas espécies diferentes de endófitos tenham sido testadas para atividade antibacteriana, contra um número maior de possíveis subespécies de *F. solani* e *F. oxysporum*, esses resultados sugerem um maior potencial dos fungos da rizosfera, provavelmente atribuível ao contato direto desses microrganismos com uma variedade de bactérias e outros micróbios rizosféricos.

Com base nos resultados, pode-se concluir que a microbiota de *S. spectabilis* constitui uma fonte prolífica de quimiotipos de interesse estrutural e biológico.

Capítulo 3 - Novos derivados do tipo halimano obtidos por oxidação fúngica

3.1. INTRODUÇÃO

3.1.1 Biocatálise *versus* catálise química

Apesar dos grandes avanços da química orgânica sintética nos últimos anos, um dos principais desafios atuais da área é a ativação oxidativa (hidroxilação) regio e estereosseletiva de ligações C–H sp^3 de compostos orgânicos ($R-H \rightarrow R-OH$), as quais são difíceis ou até mesmo impossíveis de sintetizar usando o estado da arte da química de metais de transição, como catalisadores ou organocatalisadores (Ilie *et al.*, 2015). As ligações C–H são altamente estáveis e com a disponibilidade simultânea de diversas ligações para ativação, a discriminação entre posições C–H inativadas similares, diante da ausência de efeitos dirigentes fortes no substrato, está completamente fora do escopo dos métodos quimio-catalíticos correntes (Gensch *et al.*, 2016; Latham *et al.*, 2016).

Nas últimas décadas, a biocatálise alcançou uma importância notável para aplicações químicas e farmacêuticas, o que se deve majoritariamente ao fato de que as enzimas atuam como melhores catalisadores em reações regio- e estereoespecíficas quando comparados com abordagens de química sintética tradicional, principalmente na química da ligação C–O (Schrewe *et al.*, 2013). Mais recentemente, Latham e colaboradores (2016) relataram a aplicação combinada de bio e quimio-catálise - “quimio-biotransformação”, resultando em uma complementaridade capaz de criar novas estratégias de ativação, nas quais posições C–H até então inalcançáveis quimio-cataliticamente podem ser alvejadas para etapas de formação de ligações C–C, C–N, C–Hal e outros tipos fundamentais.

A criação ou modificação catalítica quimio, regio, diastereo e enantiosseletiva de funcionalidades C–O (De Carvalho, 2017; Lin e Tao, 2017) mediadas por enzimas são as reações químicas mais comumente encontradas na natureza, uma vez que a maioria das enzimas envolvidas são oxidoredutases (com poucas exceções, como as hidratases), as quais, normalmente, dependem de cofatores e apresentam estruturas homo ou ainda multiméricas (Schrewe *et al.*, 2013).

A vantagem principal de um biocatalisador em uma síntese química é a alta seletividade, normalmente, obtida em razão da ampla superfície de contato estabelecida entre uma enzima e seu substrato, que oferece elevado potencial para

regio e estereocontrole: apenas uma área (regiocontrole) e uma face do substrato (estereocontrole) encontram-se adequadamente posicionadas diante da maquinaria enzimática, enquanto o restante do substrato permanece excluído. Como consequente, mesmo que a molécula de substrato possua diversos átomos com reatividades similares, apenas um deles será favorecido para a conversão (Clouthier e Pelletier, 2012).

Outros benefícios da biocatálise abrangem o uso reduzido de grupos protetores, redução de reações secundárias, purificação mais simples dos produtos e menos impactos ambientais. As desvantagens mais comuns incluem a presença de subprodutos metabólicos e a atuação da membrana como uma barreira de transporte de massa (Lin e Tao, 2017).

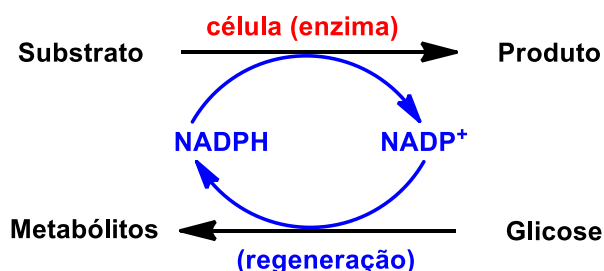
Em aplicações, tais como síntese química, a estabilidade enzimática é crucial pois a evolução não otimiza catalisadores naturais para as condições técnicas de processos. Desta forma, a estabilidade é obtida geralmente através da imobilização da enzima em matrizes artificiais, principalmente no caso de enzimas simples ou reações para geração de produto em pequena escala. Já para aplicações em larga escala, as enzimas encontram-se normalmente protegidas (imobilizadas) em uma célula microbiana - biocatálise de célula inteira, a qual pode ser aplicada tanto a células de microrganismos vivos quanto a células metabolicamente inativas (mortas) (Schrewe *et al.*, 2013; De Carvalho, 2017).

A biocatálise executada por enzimas isoladas é governada pela bioquímica de proteínas e seus cofatores e coenzimas - NAD(P)/NAD(P)H, FAD/FADH e coenzima A (CoA). Da mesma maneira, a biocatálise empregando células microbianas inteiras é controlada, ainda, pela transferência de massa, metabolismo celular, síntese de proteínas, compartimentalização, crescimento e inativação celular. Desta forma, a combinação de sínteses baseadas em catálise por sistemas vivos cria oportunidades únicas para o desenvolvimento de reações e processos que possam proporcionar a estabilização, o suprimento e a regeneração do biocatalisador ao longo do curso. (Schrewe *et al.*, 2013; Wachtmeister e Rother, 2016).

3.1.2 Química biocatalítica da ligação C-O

A biocatálise oferece alternativas altamente regio e estereosseletivas em relação a química sintética tradicional, com um grande destaque para a oxifuncionalização seletiva de ligações C–H sp^3 que possui um alto valor sintético. Enquanto a oxifuncionalização catalisada por liases é restrita a hidratação de ligações duplas, as oxidoredutases são altamente versáteis, representando a classe mais proeminente de enzimas capazes de executar a química da ligação C–O. As oxidoredutases geralmente consistem em múltiplos componentes de proteínas, apresentando baixa estabilidade na forma isolada e são dependentes de cofatores. Esses fatores favorecem a sua aplicação em um ambiente protegido, autorrenovador, regenerador de cofator e que degrada espécies reativas de oxigênio, ou seja, a célula (Schrewe *et al.*, 2013).

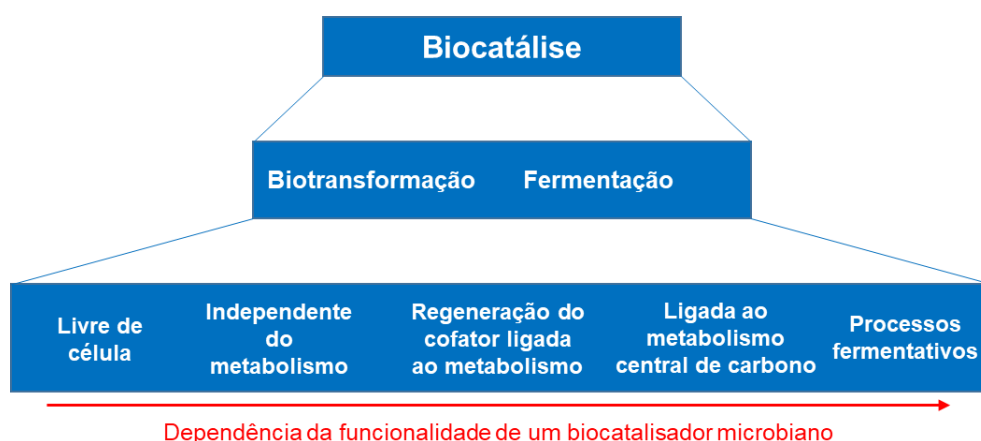
Figura 66 - Biotransformação de célula inteira.



Os processos biocatalíticos são, normalmente, divididos em duas categorias: (i) biotransformações e (ii) fermentações. Reações de biotransformação podem ser catalisadas ou por enzimas isoladas ou por células inteiras, nas quais uma fonte orgânica de carbono barata (por exemplo, glicose, glicerol ou um ácido orgânico) é aplicada para a produção do biocatalisador, podendo atuar também como fonte de energia e equivalentes de redução para manutenção da célula e regeneração do cofator durante a biotransformação (Figura 66), em que um substrato adicional é transformado em um produto com valor agregado por meio de catálise uni ou multietapas (Schrewe *et al.*, 2013; Rico-Martinez *et al.*, 2014; Lin e Tao, 2017).

A fermentação clássica difere da biotransformação, visto que a síntese do produto de interesse pelas células é obtida diretamente da fonte de carbono e energia, através de uma via metabólica celular complexa. Na verdade, essa divisão em apenas uma categoria pode ser estendida como um contínuo, variando desde a biocatálise *in vitro* com enzimas isoladas, biotransformações baseadas em células inteiras, biotransformações desacopladas ou acopladas ao metabolismo, e finalmente, até fermentações clássicas (Figura 67) (Schrewe *et al.*, 2013; Rico-Martinez *et al.*, 2014; Lin e Tao, 2017).

Figura 67 - Biocatálise como um contínuo.



Fonte: Schrewe *et al.*, 2013.

3.1.3 Biotransformação fúngica

A biotransformação mediada por células inteiras de fungos filamentosos consiste em um método poderoso para executar modificações químicas de uma variedade de materiais de partida, tais como produtos naturais bioativos, para obtenção de derivados com propriedades biológicas melhoradas ou, até mesmo, novas bioatividades. Essa abordagem se destaca como uma alternativa promissora em relação aos métodos químicos tradicionais, uma vez que fungos contêm sistemas multienzimáticos que apresentam uma ampla gama de especificidades e são, portanto, capazes de catalisar uma grande variedade de reações químio, regio e estereosseletivas em sítios moleculares que são, normalmente, não reativos ou difíceis de se alcançar quimicamente. Ademais, a transformação microbiana é uma

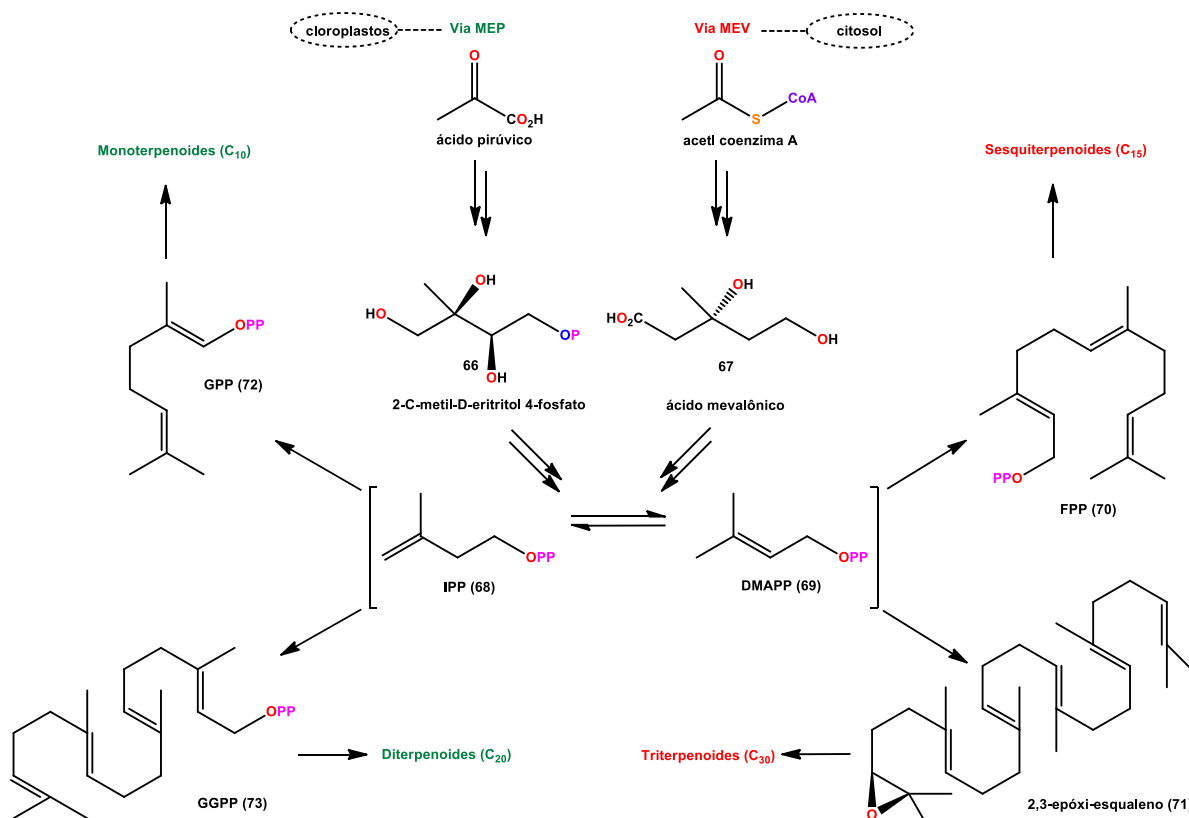
técnica relativamente rápida, eficiente, economicamente viável e ecologicamente amigável, pois requer apenas condições brandas de reação, tais como meio aquoso, pH moderado e temperaturas baixas (Arakawa *et al.*, 2013; Basso *et al.*, 2016; Wachtmeister e Rother, 2016; Monteiro *et al.*, 2017).

3.1.4 Diterpenoides labdano e *ent*-halimano como substratos para biotransformação fúngica

3.1.4.1 Biossíntese de terpenoides em plantas

Os terpenoides compõem a maior e mais distribuída classe de metabólitos secundários, compreendendo mais de 55000 compostos identificados até o momento e com diversos compostos novos sendo descobertos a cada ano. A produção dos terpenoides nas células vegetais ocorre através de duas rotas distintamente localizadas: via do mevalonato (MEV, **67**), ativa no citosol; e via do metileritritol 4-fosfato (MEP, **66**) - cloroplastos (Figura 68). A via do MEP fornece precursores principalmente para a síntese de mono e diterpenoides, isopreno, carotenoides, fitorhômios giberelinas e ácido abscísico, fitol, as cadeias laterais de clorofilas, tocoferóis, filoquinonas e plastoquinonas. Por sua vez, a via do MEV fornece principalmente pirofosfato de isopentenila (IPP, **68**), essencial para a síntese de sesquiterpenoides, esteróis, brassinosteroides e poliprenóis (Dewick, 2009; Rico-Martinez *et al.*, 2014; Ludwiczuk *et al.*, 2017).

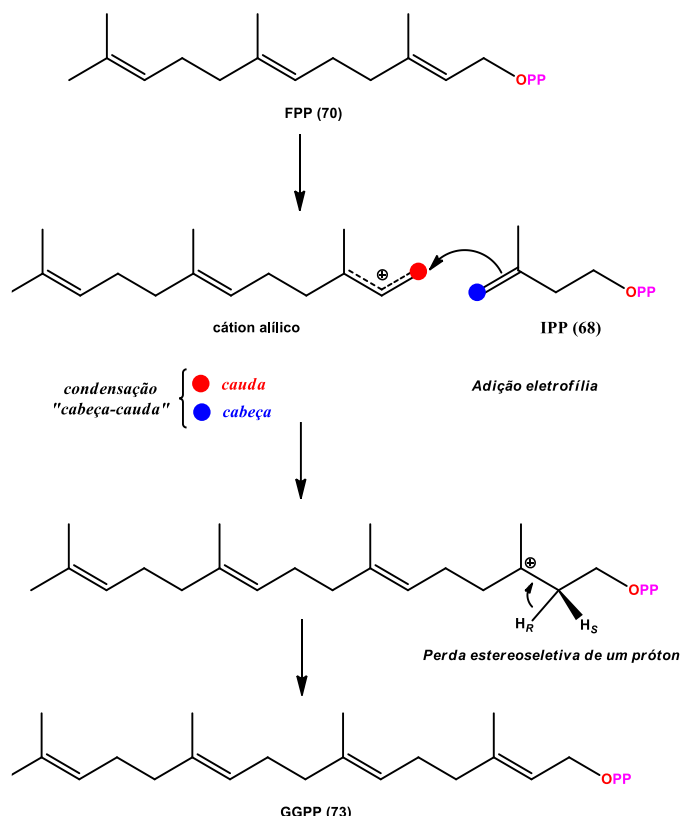
Figura 68 - Biossíntese de terpenoides.



Fonte: Ludwiczuk, 2017

As estruturas dos terpenoides podem ser vistas como unidades de isopreno (C_5), unidas em um modelo cabeça-cauda. Uma variedade ampla de diterpenoides se origina a partir da ciclização de difosfato de geranilgeranila (GGPP, **73**), o qual é formado pela adição de uma molécula adicional de IPP (**68**) ao pirofosfato de farnesila - FPP, **70** - (Figura 69). Reações de ciclização do GGPP, mediadas pela formação de carbocátions, além do potencial para rearranjos de Wagner-Meerwein, possibilitam que diversas variantes estruturais de diterpenoides sejam produzidas, além de modificações químicas dos esqueletos carbônicos, tais como oxidação, redução, acetilação, metilação e glicosilação (Dewick, 2009; Toyomasu e Sassa, 2010; Ludwiczuk *et al.*, 2017).

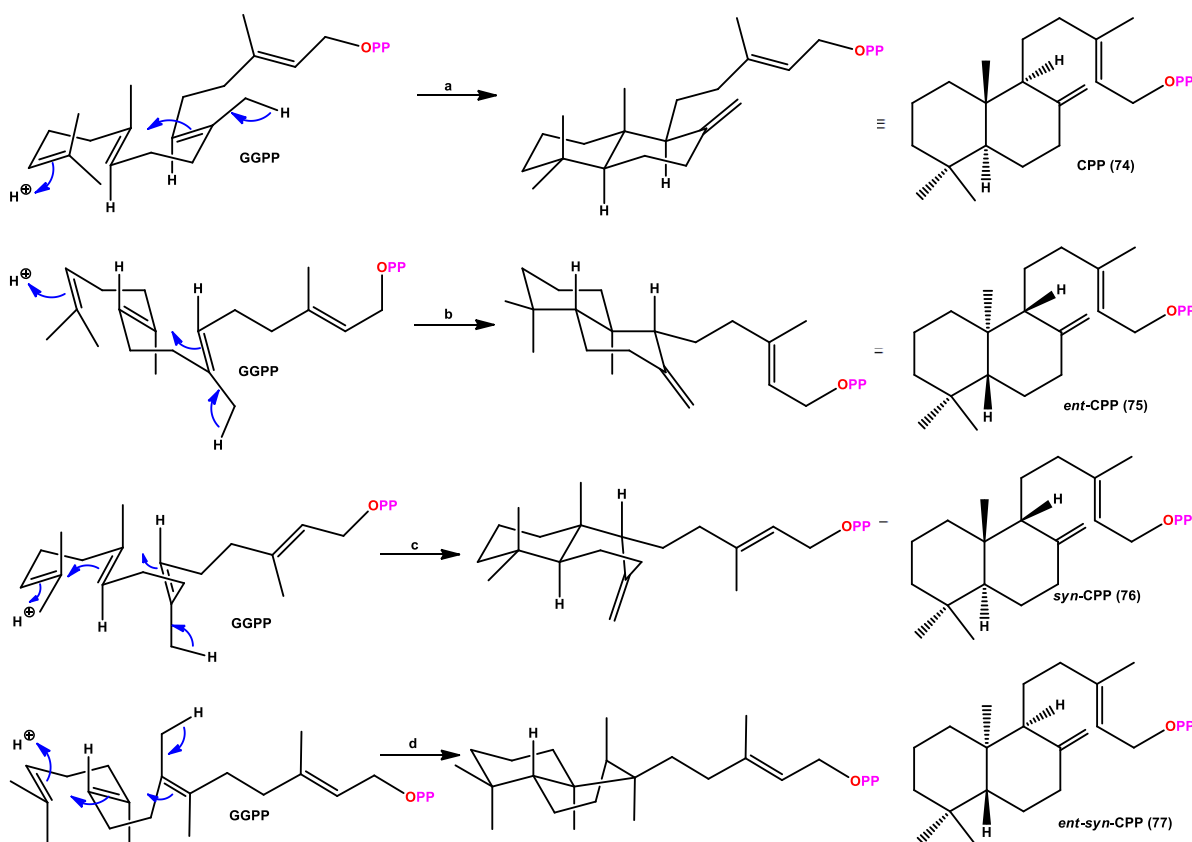
Figura 69 - Formação de GGPP- **73**.



Fonte: Dewick, 2009.

O primeiro passo na biossíntese de diterpenoides de esqueleto labdano é a formação de estereoisômeros de difosfato de copalila, CPP – **74** (Figura 70). A formação do carbocátion é iniciada pela protonação da ligação dupla-14,15, na cabeça da cadeia de GGPP (**72**), seguida por um ataque de C-10 a C-15, e subsequentemente de C-6 a C-11, fornecendo quatro estereoisômeros (**74**, **75**, **76**, **77**). A perda subsequente do difosfato também produz um carbocátion e facilita ciclização adicional. A protonação de GGPP pode iniciar uma sequência de ciclização concertada, terminada pela perda de um próton de uma metila, fornecendo difosfato de copalila (Figura 70). A estereoquímica deste produto é controlada pelo dobramento do substrato na superfície da enzima, embora um dobramento alternativo possa levar a formação do produto enantiomérico, possuindo configurações opostas nos novos centros estereogênicos formados. A conformação cadeira-cadeira de GGPP gera **74** (CCP), e a conformação cadeira-barco fornece **76** (*syn*-CCP), e suas conformações antipodais geram **75** (*ent*-CCP) e **77** (*ent-syn*-CCP), respectivamente (Dewick, 2009; Toyomasu e Sassa, 2010; Ludwiczuk *et al.*, 2017).

Figura 70 - Protonação de GGPP inicia uma sequência de reações concertadas, fornecendo quatro estereoisômeros.

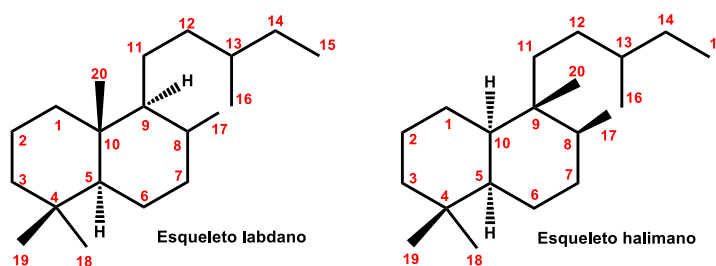


3.1.4.2 Biotransformação fúngica de diterpenoides labdano e *ent*-halimano

Dentre os terpenoides, os diterpenoides atraem uma enorme atenção devido a ampla gama de atividades biológicas pronunciadas que alguns desses constituintes desempenham, além de uma grande diversidade estrutural (quimiodiversidade). Essa classe de metabólitos é produzida, em sua maioria por plantas, mas também são encontrados em microrganismos - tais como fungos e bactérias, assim como em organismos marinhos (Hanson, 2017; Blunt *et al.*, 2018).

Os labdanos constituem uma ampla subclasse de diterpenoides (C_{20}), apresentando um núcleo decalina e uma cadeia lateral (C_6), cíclica ou alifática (Figura 71). Eles exibem, normalmente, cinco centros estereogênicos e podem ocorrer em ambas as séries: normal e antipodal. Diterpenoides halimano derivam dos labdanos pela migração do grupo metila da posição C-10 para C-9 (Figura 71) (Demetzos e Dimas, 2001; Monteiro *et al.*, 2015).

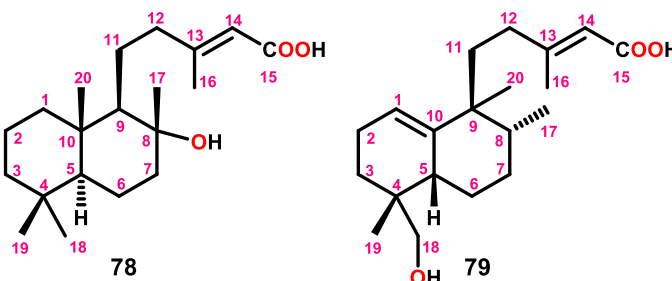
Figura 71 - Estruturas representativas de diterpenoides de esqueletos labdano e halimano.



Dentre as famílias de plantas produtoras de diterpenoides como constituintes regulares, aquelas pertencentes à Fabaceae merecem destaque, principalmente as espécies compreendidas pelo gênero *Hymenaea*, cerca de 15 espécies, as quais são muito conhecidas por constituírem fontes muito ricas de diterpenoides *ent*-labdano na resina do tronco e extrato das cascas, e *ent*-halimano na resina das sementes (Nogueira *et al.*, 2001; Monteiro *et al.*, 2015).

O estudo químico dos extratos etanólicos das folhas e flores de *Hymenaea stigonocarpa* (Fabaceae), uma planta medicinal conhecida popularmente como “jatobá do cerrado”, realizado como parte de um projeto de Bioprospecção de plantas do Cerrado Brasileiro, no âmbito do Programa SISBIOTA, coordenado pelo Prof. Dr. Paulo Cezar Vieira, resultou no isolamento dos diterpenoides ácidos (+)-(5*S*, 8*S*, 9*R*, 10*S*)-lab-13-en-8β-ol-15-óico (**78**) e (+)-(4*R*, 5*S*, 8*R*, 9*S*)-18-hidróxi-*ent*-halima-1(10),13-(*E*)-dien-15-óico (**79**) - Figura 72, respectivamente, como constituintes majoritários (Monteiro *et al.*, 2015).

Figura 72 - Estruturas dos compostos 78 e 79.



Essas substâncias foram reisoladas e testadas para investigação da capacidade inibitória das enzimas recombinante humana acetil (Hr-AChE) e do sêrum humano butirilcolinesterase (Hu-BChE), alvos terapêuticos e diagnósticos para o

tratamento da doença de Alzheimer. No entanto, esses metabólitos desempenharam fracos percentuais inibitórios sobre as enzimas-alvo, motivando a realização de experimentos de biotransformação com a finalidade de gerar novos análogos estruturais e potencialmente bioativos (Monteiro *et al.*, 2017).

Embora substratos diterpenicos demonstrem, normalmente, boa susceptibilidade frente a enzimas fúngicas, não havia na literatura, até o momento, estudos de transformação microbiana de diterpenoides do tipo halimano. Desta forma, investigou-se a capacidade de *Fusarium oxysporum* (um fungo isolado da rizosfera de *Senna spectabilis*) e *Myrothecium verrucaria* (um endófito das partes aéreas de *S. spectabilis*) biotransformarem os ácidos **78** e **79**, isolados de *H. stigonocarpa*. Os experimentos resultaram na produção de seis derivados do substrato **79**, incluindo hidróxi-, oxo-, formil-, e carbóxi-análogos. (Monteiro *et al.*, 2017). Adicionalmente, os derivados também foram submetidos a avaliação do potencial inibitório de Hr-AChE e Hu-BCHE. A catálise de modificações notáveis foi observada, incluindo a ativação de ligações C-H sp^3 em posições de reatividades distintas em ambos os anéis dos substratos, além de uma pequena melhoria na atividade inibitória de AChE de um dos análogos (Monteiro *et al.*, 2017).

Uma das principais razões pelas quais diterpenoides têm recebido uma atenção especial como substratos para biotransformações, e que pode inclusive justificar a susceptibilidade enzimática, é o fato de que muitos diterpenoides são metabólitos produzidos endogenamente por fungos (Rodrigues-Filho *et al.*, 2002). Além disso, diversos diterpenoides são abundantes na natureza e encontram-se, até mesmo, disponíveis comercialmente. Aliado a esses fatores, diversos derivados (obtidos via métodos químicos ou biomanipulação) de diterpenoides exibem atividades farmacêuticas importantes, tais como antifúngica, antibacteriana, antimutagênica, citotóxica, anti-inflamatória e analgésica (Frija *et al.*, 2011).

3.2 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo realizar a investigação da capacidade de biotransformação (oxidação) do substrato diterpenoide (**79**) por microrganismos endofíticos (*M. verrucaria*) e da rizosfera de *S. spectabilis*, (*F. oxysporum* e

Rhinoclastiella similis), bem como avaliar o potencial citotóxico do substrato e seus possíveis bioprodutos frente às linhagens de células tumorais HCT-116 (carcinoma colorretal) e MCF-7 (adenocarcinoma de mama).

3.3. PARTE EXPERIMENTAL

3.3.1 Procedimentos gerais

As medidas de rotação óptica foram realizadas em um polarímetro Perkin Elmer, modelo 341 LC (Shelton, USA), utilizando-se uma cubeta de quartzo de 1 dm de comprimento, a 25 °C. As análises de RMN foram realizadas em um espectrômetro Bruker Avance III HD 600 (14.1 T - 600.13 MHz para ^1H e 150.9 para ^{13}C), equipado com uma sonda criogênica Triple Inverse TCI (5.0 mm), usando-se como solventes clorofórmio- d_1 e metanol- d_4 . Os valores de deslocamento químico (δ) são dados em ppm e as constantes de acoplamento (J) em hertz (Hz). Os espectros de massas de alta resolução (EMAR-ESI) foram obtidos em um espectrômetro de massas Bruker Daltonics Inc Q-TOF Maxis Impact, no modo positivo ou negativo, empregando-se formiato de sódio (HCOONa) como padrão interno. As separações cromatográficas foram executadas em um cromatógrafo Shimadzu Prominence HPLC system (Kyoto, KY, Japan), composto pelos seguintes módulos: duas bombas LC-6AD, unidade desgasificadora DGU-20A, auto-injetor SIL-10AF, detector de arranjo de diodos SPD-20A (configurado em 210 e 254 nm) e módulo de comunicação CBM-20A; controlados pelo software Lab Solutions. As colunas cromatográficas usadas foram: Kinetex® analítica (5 μm , C18, 100 Å, h: 150 x 4.60 mm) e Kinetex® semi-preparativa (5 μm , C18, 100 Å, h: 250 x 10.0 mm) - Phenomenex (Torrance, California, CA, USA). Os solventes orgânicos utilizados (metanol e acetonitrila) apresentavam grau cromatográfico, adquiridos da J.T.Baker® - Avantor (Center Valley, PA, USA).

3.3.2 Material vegetal

As flores de *H. stigonocarpa* foram coletadas durante o estágio de floração em Catalão-GO, Brazil. As exsiccatas foram depositadas no Herbário da EMBRAPA - Recursos Genéticos e Biotecnologia Herbarium, sob o número GD046.

3.3.3 Extração e isolamento do substrato 79

O fracionamento de 10.0 g do extrato etanólico das flores de *H. stigonocarpa*, de acordo com o procedimento descrito por Monteiro e colaboradores (2015), forneceu 0.6 g do composto **79**. Os dados físicos e espectroscópicos (Figuras F1 e F2) do composto isolado foram comparados com aqueles relatados na literatura e mostraram concordância total (Monteiro *et al.*, 2015; Monteiro *et al.*, 2017).

3.3.4 Microrganismos e condições de cultivo

As culturas de *Myrothecium verrucaria* (AJ302003.1) foram isoladas de folhas saudáveis de um espécime de *Senna spectabilis* (Fabaceae), coletado nas proximidades do Instituto de Química - UNESP, Araraquara, Brasil, pela Dra. Lisinéia M. Zanardi sob a supervisão da Profa. Dra. Ângela Regina Araújo (ZANARDI, 2010). As exsiccatas encontram-se depositadas no Herbário do Jardim Botânico de São Paulo (SP384109).

As culturas de *Fusarium oxysporum* (HM346538.1) e *Rhinoctadiella similis* foram isoladas da rizosfera de plântulas de *S. spectabilis*, cultivadas em meio hidropônico pela Dra. Patrícia Cardoso, sob supervisão do Prof. Dr. Ian Castro-Gamboa (Cardoso, 2015). As preservações (espécimes testemunhos) de *M. verrucaria* (Cs-f23), *F. oxysporum* (CSP-30) e *R. similis* (CSP-58) são mantidas na coleção Micoteca - NuBBE, Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara - SP, Brasil.

Os fungos (Figura 73) foram pré-cultivados em placas de Petri contendo ágar de dextrose de batata (PDA) por 7 dias, a 28 °C, antes da inoculação em meio líquido.

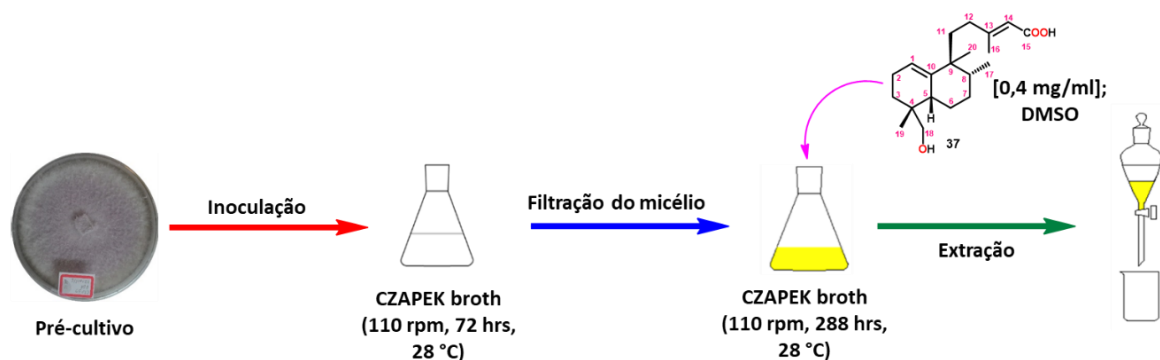
Figura 73 - Fotos dos microrganismos cultivados em placa de petri.



Fonte: Autor

3.3.5 Procedimento de biotransformação

Todas as cepas foram cultivadas em um procedimento de duas etapas. Primeiro, uma suspensão de esporos de cada fungo foi inoculada em três frascos de erlenmeyer de 500 ml, contendo 250 ml de caldo de CZAPEK estéril (pH ~5.3), e, subsequentemente, incubados sob agitação em 110 rpm, incidência de luz 24 hrs/dia, por 72 hrs, em 28 °C. Em seguida, a massa micelial foi filtrada, inoculada em meio CZAPEK fresco (em duplicata) e reincubados nas mesmas condições por mais 288 hrs. O substrato (100 mg) foi dissolvido em DMSO na concentração de 50.0 mg/ml e adicionado ao frasco para atingir uma concentração final de 0.4 mg/ml, conforme ilustrado na Figura 74, fornecendo os extratos *FoE1*, *MvE1* e *RsE1*. Os controles de cultivo (*FoE2*, *MvE2* e *RsE2*) consistiram de três frascos contendo meio CZAPEK, nos quais os fungos foram cultivados na presença da mesma quantidade de DMSO, porém, na ausência de substrato. Os controles de substrato (*FoE3*, *MvE3* e *RsE3*), por sua vez, compreenderam o meio e a mesma concentração do composto de partida, no entanto, com ausência de cepas. Os controles foram incubados, simultaneamente, em condições idênticas aos experimentos de biotransformação. Com a finalidade de monitorar o consumo de substrato, assim como detectar a formação dos produtos de biotransformação, amostras de 1 ml de meio foram coletadas, diariamente, durante o curso de incubação, extraídas com acetato de etila (AcOEt) e analisadas por CLAE-DAD (de acordo com as condições especificadas na Seção 3.3.6).

Figura 74 - Procedimento de biotransformação do substrato.

3.3.6 Extração, análises cromatográficas e fracionamento dos extratos

O micélio dos experimentos foi removido por filtração à vácuo e o caldo remanescente foi submetido à três extrações consecutivas com AcOEt (3 x 125 ml) e o solvente foi removido em evaporador rotativo, fornecendo os extratos. As massas dos extratos obtidos são apresentadas na Tabela 20.

Tabela 20 - Massas dos extratos obtidos através dos experimentos de biotransformação.

<i>Fusarium oxysporum</i>		<i>Myrothecium verrucaria</i>		<i>Rhinoctadiella similis</i>	
Extrato	m (mg)	Extrato	m (mg)	Extrato	m (mg)
FoE1	236,0	MvE1	245,4	RsE1	228,2
FoE2	14,5	MvE2	16,1	RsE2	14,8
FoE3	8,8	MvE3	9,8	RsE3	6,4

As análises cromatográficas dos extratos em escala analítica (FoE - Figura 75, MvE- Figura 76 e RsE - Figura 77) foram executadas em modo de eluição de gradiente linear, com uma fase móvel composta por água (0,1% ácido fórmico)/acetonitrila (0,1% ác. fórmico), variando de 75:25 (v/v) até 0:100 (v:v) em 20 min, numa vazão de 1,0 ml/min, de acordo com a programação do gradiente da Tabela 21. O volume de injeção das amostras foi de 20 µl das soluções de concentração igual a 5.0 mg/ml, e o comprimento de onda monitorado foi de 254 nm. As condições de escala analítica foram transpostas para escala semipreparativa empregando-se uma vazão de 3,9 ml/min de acordo com a programação do gradiente (Tabela 21) e volume de injeção de 50 µl, para soluções de concentração [50 mg/ml]).

Tabela 21 - Programação do método gradiente empregado na análise dos extratos.

Método analítico			Método semi-preparativo		
Tempo (min)	%B	Vazão	Tempo (min)	%B	Vazão
0,01	25	1,0 ml/min	0,01	25	3,9 ml/min
20,00	100	1,0 ml/min	35,00	90	3,9 ml/min
25,00	100	1,0 ml/min	36,00	100	3,9 ml/min
28,00	25	1,0 ml/min	40,00	100	3,9 ml/min
32,00	25	1,0 ml/min	43,00	25	3,9 ml/min
32,01	-	-	45,00	25	-

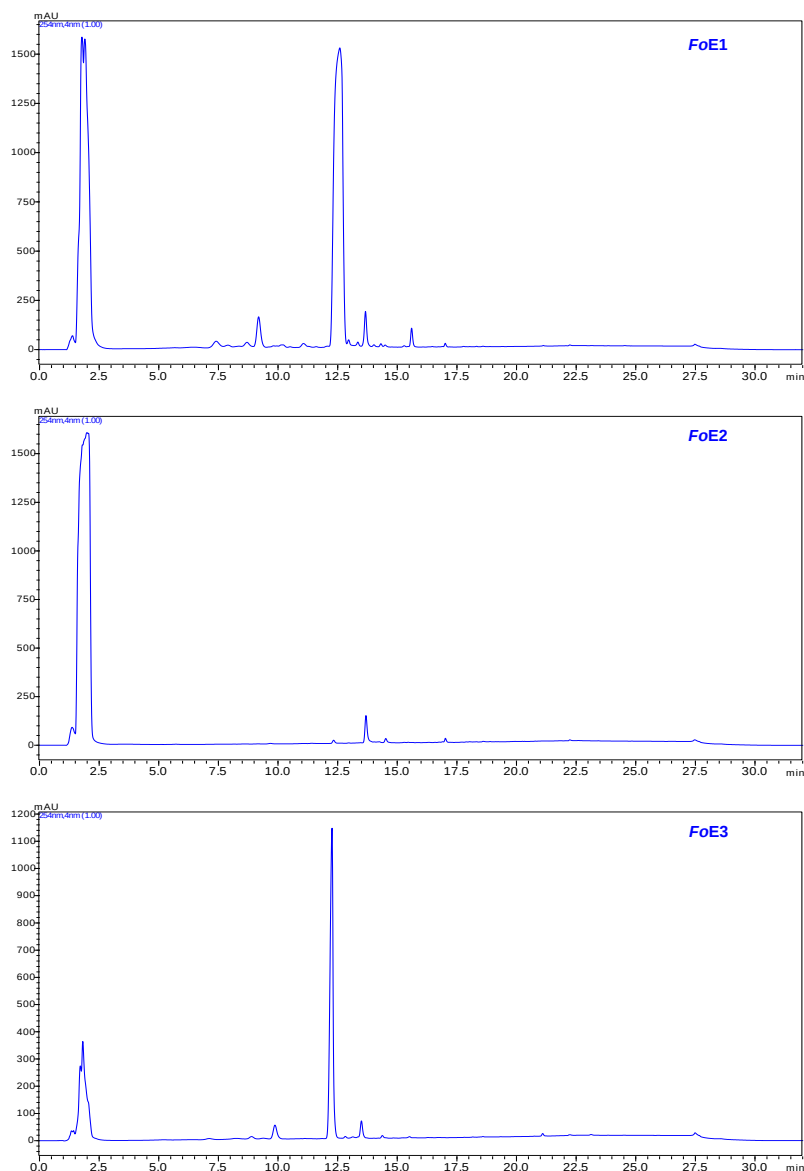
Figura 75 - Cromatogramas representativos dos extratos *FoE1* - *FoE3* em escala analítica ($\lambda = 254$ nm)

Figura 76 - Cromatogramas representativos dos extratos *MvE1* - *MvE2* em escala analítica ($\lambda = 254$ nm)

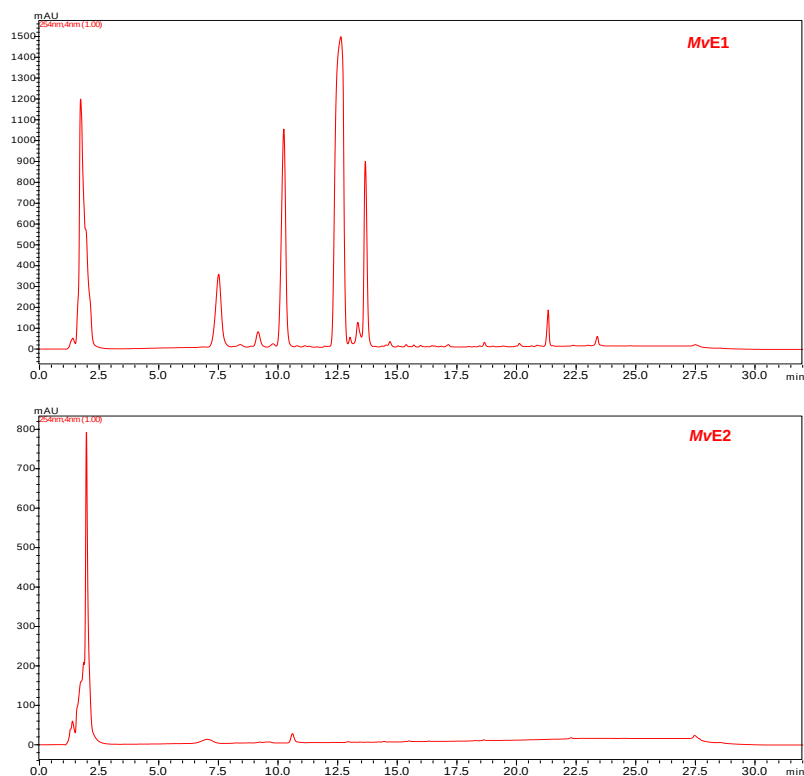
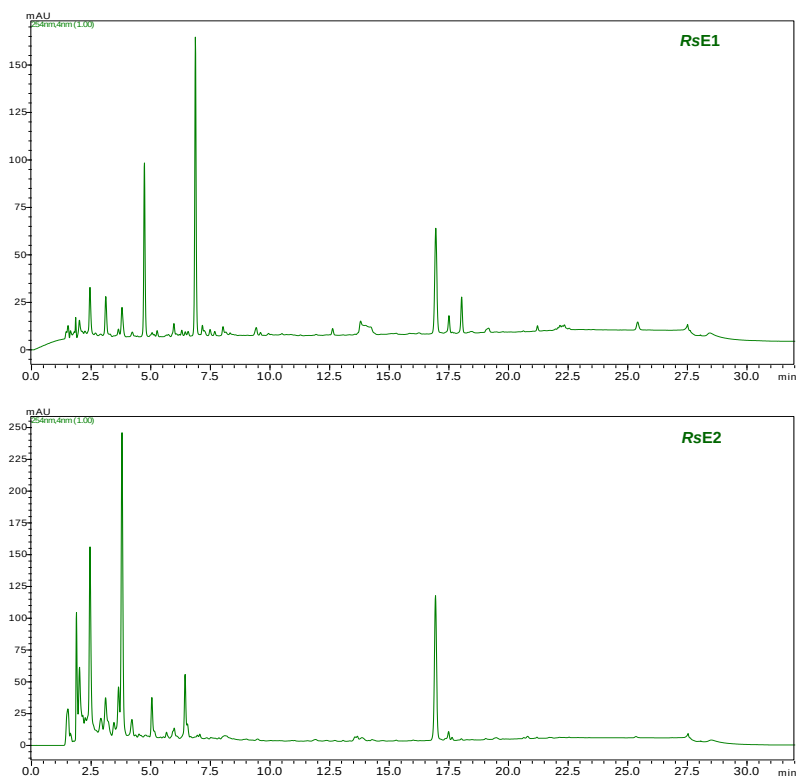


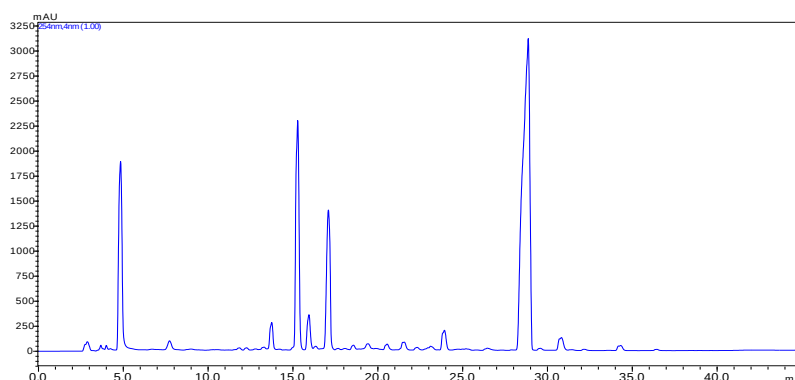
Figura 77 - Cromatogramas representativos dos extratos *RsE1* – *RsE2* em escala analítica ($\lambda = 254$ nm).



3.3.7 Isolamento dos produtos de biotransformação

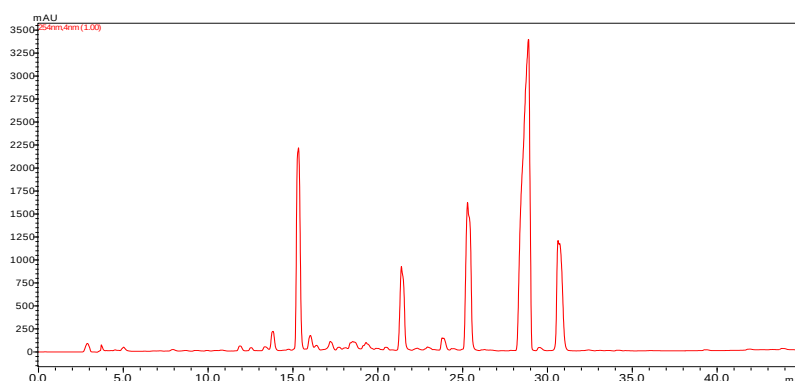
O fracionamento do extrato *FoE1* por CLAE semipreparativa (Figura 78) gerou 15 frações, das quais a fração *FoE1.6* (t_r 15,10 - 15,60 min) forneceu o composto **80** (1,4 mg, 2,8%), *FoE1.8* (t_r 15,80 - 16,25 min) proveu o derivado **81** (0,8 mg, 1,6%), *FoE1.10* (t_r 17,00 - 17,50 min) resultou no análogo **82** (4,3 mg, 8,6%) e, finalmente, a fração *FoE1.14* (t_r 28,25 - 29,00 min) promoveu a recuperação do substrato **79** (31,3 mg, 62,6%).

Figura 78 - Cromatograma do extrato *FoE1* em escala semi-preparativa ($\lambda = 254$ nm).



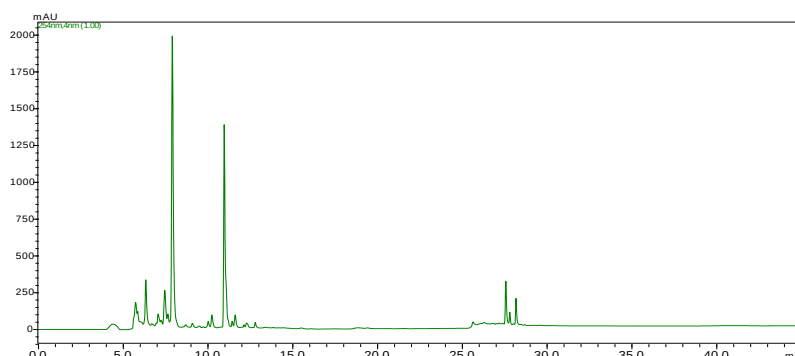
O extrato *MvE1* foi fracionado para dar 17 frações (Figura 79), das quais a fração *MvE1.4* (t_r 15,15 - 15,55 min) mostrou-se idêntica àquela do composto **80** (0,9 mg, 1,8%), previamente isolado de *FoE1*, enquanto *MvE1.8* (t_r 21,20 - 21,65 min) rendeu o derivado **83** (1,0 mg, 2%), *MvE1.12* (t_r 25,00 - 25,50) proveu o bioproduto **84** (5,4 mg, 10,8%), *MvE1.14* (t_r 28,20 - 29,00) recuperou 13,4 mg (26,8%) do substrato **79** e a fração *MvE1.16* (t_r 30,50 - 31,00) apresentou-se como o biotransformado **85** (4,4 mg, 8,8%).

Figura 79 - Cromatograma do extrato *MgE1* em escala semi-preparativa ($\lambda = 254$ nm).



O extrato *RsE1* foi submetido a CLAE semipreparativa para gerar 12 frações (Figura 80), das quais a fração *RsE1.5* (tr 7,90 – 8,20) forneceu o análogo natural **86** (1,0 mg, 2,0%).

Figura 80 - Cromatograma do extrato *MgE1* em escala semi-preparativa ($\lambda = 254$ nm).



3.3.8 Ensaios de citotoxicidade dos bioprodutos isolados

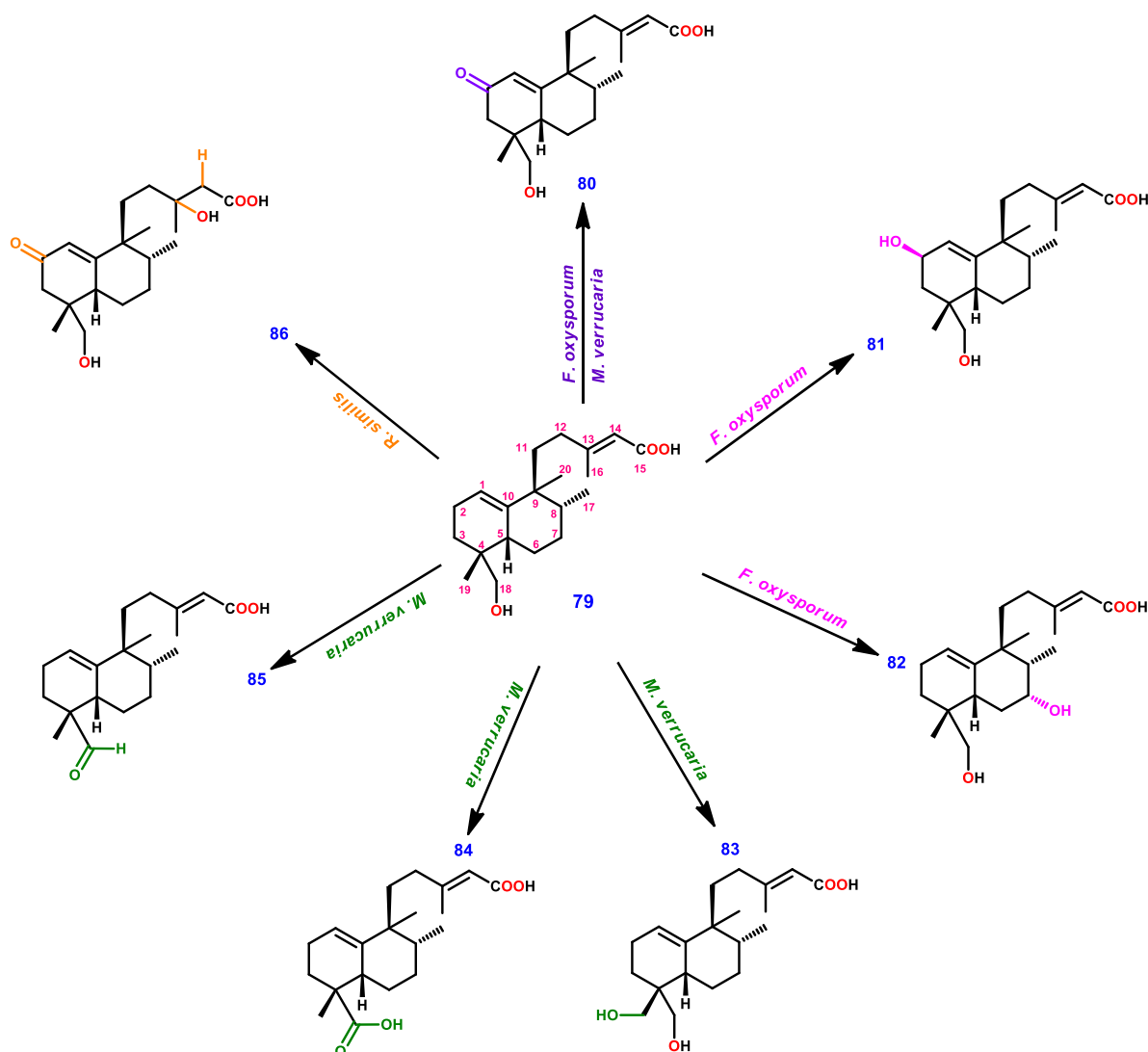
Os ensaios de citotoxicidade foram realizados conforme o procedimento descrito na seção 1.3.5.

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.4.1 Elucidação estrutural dos bioprodutos

A biotransformação do substrato **79** por *F. oxysporum* forneceu três análogos estruturais (os metabólitos **80**, **81** e **82** - Figura 81), enquanto a oxidação por *M. verrucaria* gerou quatro derivados (**80**, **83**, **84** e **85**) e, por fim, a transformação executada por *R. similis* rendeu um bioproduto adicional (composto **86**).

Figura 81 - Produtos de biotransformação obtidos a partir do substrato **79**.



As estruturas dos bioprodutos foram elucidadas através da análise dos dados espectroscópicos (RMN de ^1H , ^{13}C , HSQC, HMBC, TOCSY-1D e NOESY-1D) e espectrométricos (espectrometria de massas de alta resolução com ionização por electrospray - EMAR-IES), além de comparação com os dados da substância de partida (**79**) (Monteiro *et al.*, 2015) e de substâncias correlatas na literatura. Desta maneira, os compostos **80**, **83**, **84** e **85** foram identificados, respectivamente, como os análogos 2-oxo (**80**, relatado pela primeira vez a partir de *M. verrucaria* – Espectros de massas e RMN mostrados nas Figuras G1 a G4), 18,19-dihidroxi (**83**, Figuras H1 a H5), 18-carboxi (**84**, Figuras I1 a I5,) e 18-formil (**85**, Figuras K1 a K5), previamente isolados de experimentos de biotransformação executados com *F. oxysporum* e *M. verrucaria* (Monteiro *et al.*, 2017).

Os metabólitos **81**, **82** e **86** foram determinados como análogos (novos) não descritos na literatura, até o momento.

A fórmula molecular do composto **81** foi determinada como $C_{20}H_{32}O_4$ com base no seu EMAR-IES (Figura 82), o qual apresentou um íon correspondente a molécula desprotonada $[M-H]^-$ de m/z 335,2223 (calc. para $C_{20}H_{31}O_4$, 335,2228), sugerindo a inserção de um átomo de oxigênio (16 uma) ao substrato pelo micro-organismo ($C_{20}H_{32}O_3$).

O espectro de RMN de 1H (Figura 83) mostrou o aparecimento de um sinal em δ_H 4,32 (*dd*, $J = 5,5; 6,0$ Hz), correspondente a um novo hidrogênio oximetínico, ao qual foi atribuído o deslocamento químico de ^{13}C (δ_C) de 72,5 ppm, através da correlação direta 1H - ^{13}C observada no mapa de contorno de HSQC (Figura 85). A posição da hidroxilação foi estabelecida em C-2 por meio da inspeção das correlações a longa distância no espectro de HMBC (Figura 86), o qual demonstrou correlação entre o sinal de H-1 (δ_H 5,68) com o sinal em δ_C 72,5 (C-2). Além disso, em uma análise comparativa dos dados de RMN de ^{13}C de **81** (Figura 84) e **79**, notou-se a presença de efeitos β em C-1 (+ 4,5) e C-2 (+ 17,9), corroborando a proposta.

A posição de ocorrência da oxidação também foi confirmada via experimentos de TOCSY-1D (Figura 87), e a conectividade do sistema de spin (CH-1)-(CH-2)-(CH₂-3) através da irradiação seletiva do sinal em δ_H 4,32. Os espectros de NOESY (Figura 88) apresentaram interações entre δ_H 4,32 (1H, *dd*, $J = 5,0, 6,0$ Hz, H-2) e os sinais δ_H 1,16 (3H, *s*, H-19) e 0,93 (3H, *s*, H-20) correspondentes às metilas 19 e 20, respectivamente, sugerindo que esses grupos estão cofacialmente orientados, em equatorial (face α) e, como conseqüente, o grupo 2-OH encontra-se disposto na face β . As configurações relativas dos centros estereogênicos de **81** são mostradas na Figura 89, juntamente com as interações principais de NOE observadas. A atribuição completa dos dados de 1H e ^{13}C é dada na Tabela 22.

Figura 82 - EM-IES do composto **81** (modo negativo).

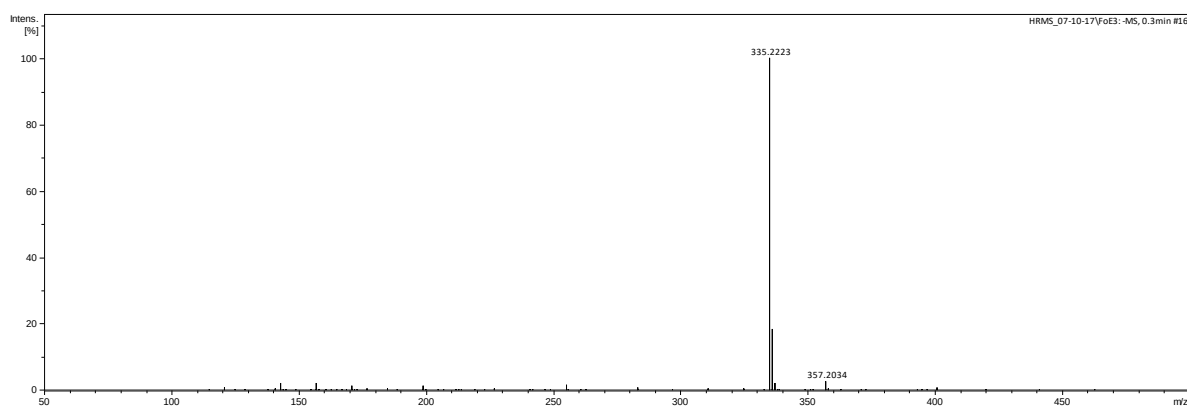


Figura 83 - Espectro de RMN de ^1H (600,13 MHz, CDCl_3) do composto **81**.

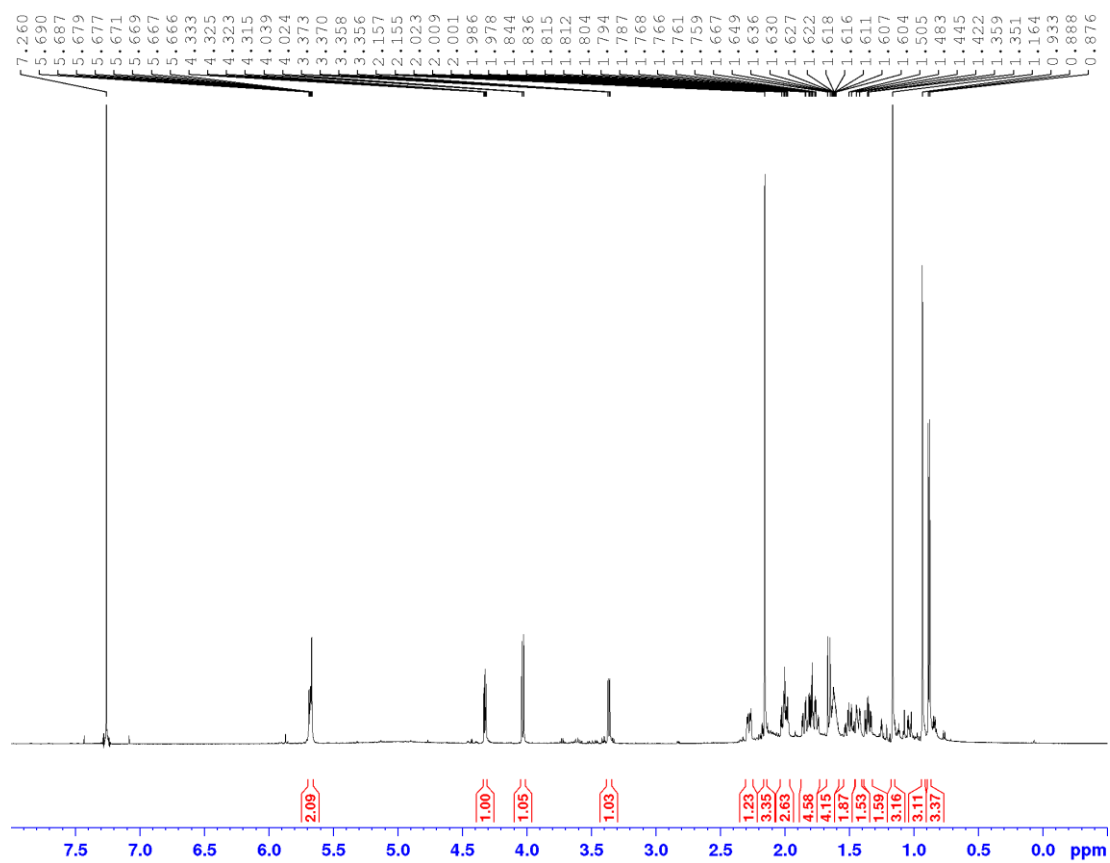


Figura 84 - Espectro de RMN de ^{13}C (150,9 MHz, CDCl_3) do composto **81**.

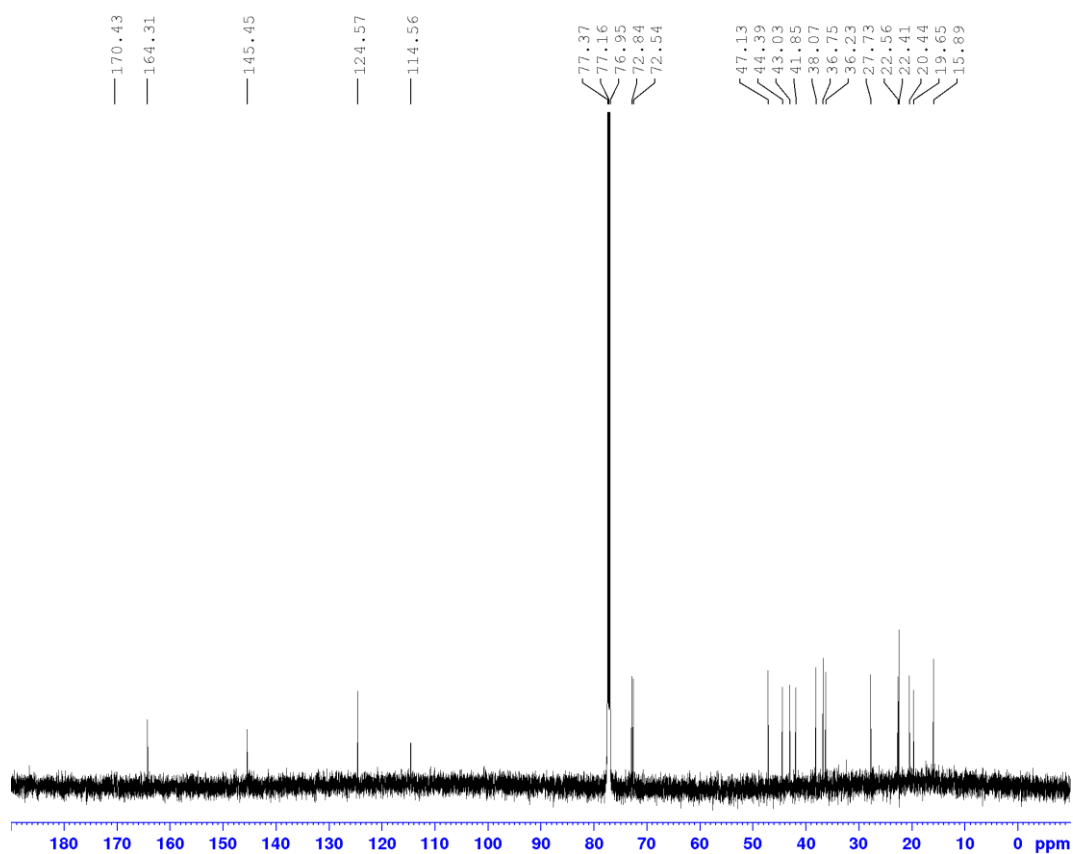


Figura 85 - Espectro de HSQC (600,13 MHz, CDCl_3) do composto **81**.

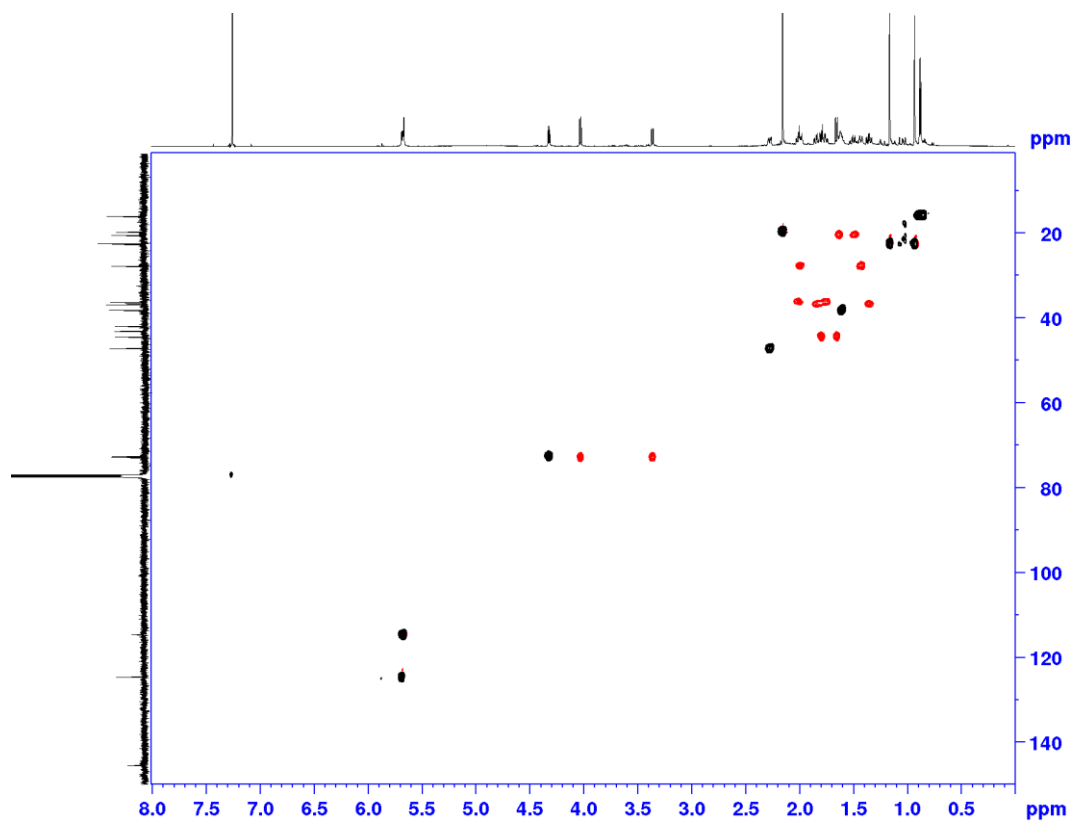


Figura 86 - Espectro de HMBC (600,13 MHz, CDCl_3) do composto **81**.

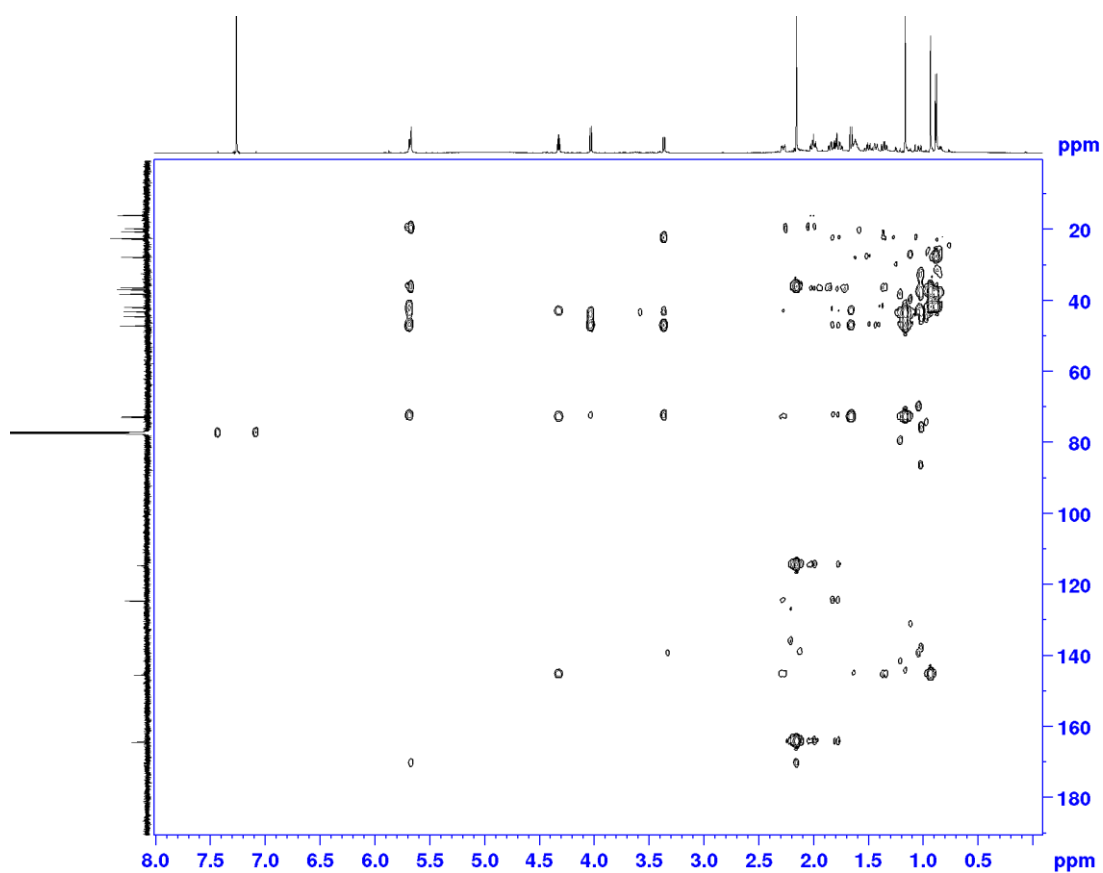


Figura 87 - Espectro de TOCSY-1D (600,13 MHz, CDCl_3) do composto **81**.

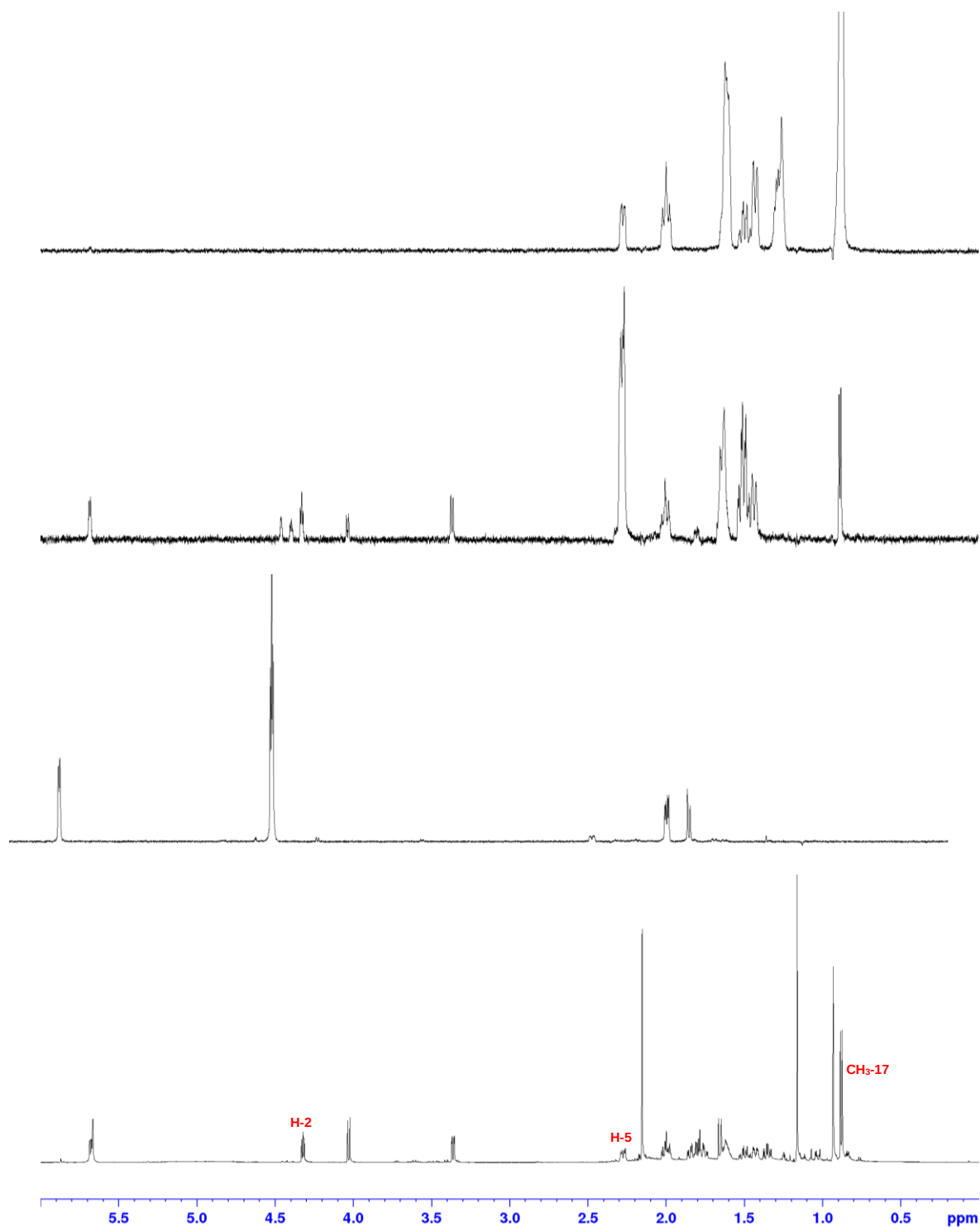


Figura 88 - Espectro de NOESY (600,13 MHz, CDCl_3) do composto **81**.

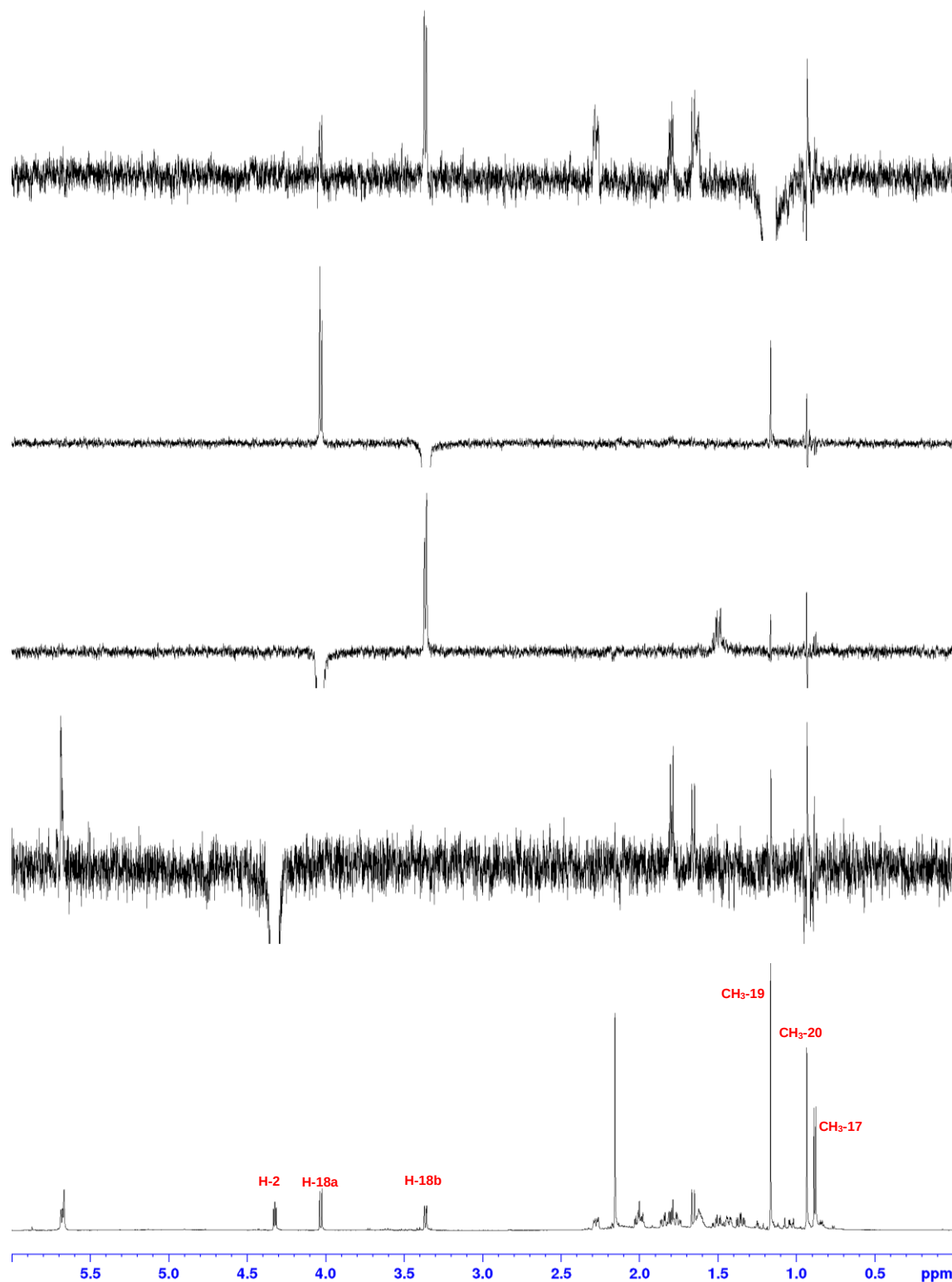
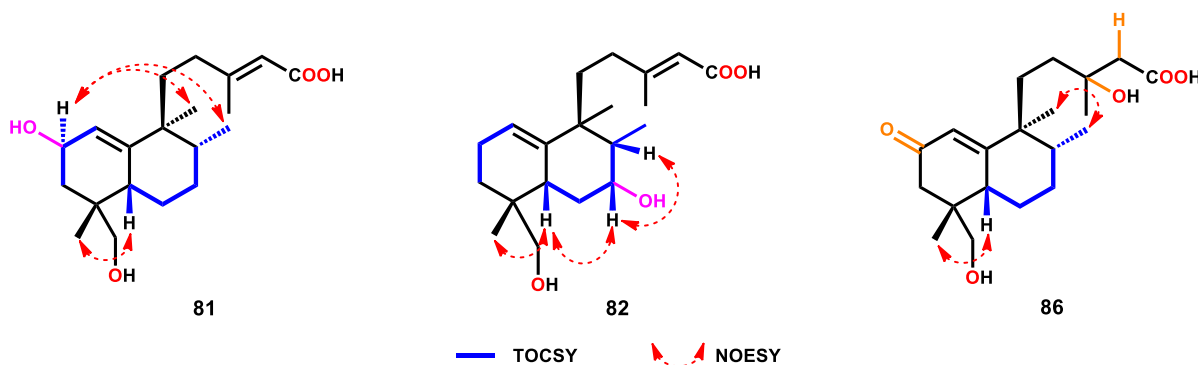


Tabela 22 - Dados espectroscópicos de RMN dos compostos **81** (em CDCl₃), **82** e **86** (em CD₃OD).

Nº	Composto 81		Composto 82		Composto 86	
	δ_C	δ_H , mult. ($J = \text{Hz}$)	δ_C	δ_H , mult. ($J = \text{Hz}$)	δ_C	δ_H , mult. ($J = \text{Hz}$)
1	124,6	5,68, <i>dd</i> (1,8; 6,0)	122,9	5,46, <i>t</i> (3,5; 1,1)	125,0	5,79, <i>s</i>
2	72,2	4,32, <i>dd</i> (5,0; 6,0)	23,4	2,09, <i>m</i>	201,8	
3	44,4	1,80, <i>m</i> 1,66, <i>m</i>	28,1	1,10, <i>dt</i> (4,5; 9,1) 1,37, <i>m</i>	43,5	2,35, <i>d</i> (16,0) 1,92, <i>d</i> (16,0)
4	43,0		37,1		39,9	
5	47,1	2,28, <i>ddt</i> (1,9; 3,7; 5,1; 6,2)	40,2	1,96, <i>m</i>	43,8	2,48, <i>dd</i> (4,4; 12,9)
6	20,4	1,63, <i>m</i> 1,50, <i>m</i>	32,4	1,81, <i>m</i> 1,21, <i>m</i>	25,5	1,93, <i>m</i> 1,60, <i>ddd</i> (4,4; 12,6; 17,0)
7	27,7	2,00, <i>m</i> 1,43, <i>m</i>	69,5	4,26, <i>dt</i> (4,7; 9,3)	29,7	2,19, <i>m</i> 1,42, <i>m</i>
8	38,1	1,62, <i>m</i>	46,6	1,71, <i>m</i>	43,0	1,86, <i>m</i>
9	41,9		44,7		46,4	
10	145,2		140,6		173,9	
11	36,7	1,84, <i>m</i> ; 1,36, <i>td</i> (4,8; 12,8)	38,1	2,06, <i>m</i> 1,35, <i>m</i>	34,4	2,27, <i>m</i> 1,38, <i>m</i>
12	36,2	2,01, <i>m</i> ; 1,76, <i>m</i>	36,9	2,10, <i>m</i> 1,83, <i>m</i>	37,6	1,49, <i>m</i>
13	164,3		162,6		72,1	
14	114,6	5,67, <i>dd</i> (1,3; 2,2)	116,6	5,63, <i>sl</i>	48,3	2,26, <i>m</i> 2,23, <i>m</i>
15	170,4		170,3		174,0	
16	19,7	2,16, <i>d</i> (1,3)	19,1	2,12, <i>d</i> (1,1)	27,2	1,18, <i>s</i>
17	15,9	0,88, <i>d</i> (7,0)	8,0	0,75, <i>d</i> (6,9)	15,9	0,85, <i>d</i> (7,1)
18	72,8	4,03, <i>d</i> (8,5) 3,36, <i>dd</i> (1,7; 8,5)	69,6	3,44, <i>d</i> (10,7) 3,28, <i>d</i> (10,7)	69,1	3,53, <i>d</i> (11,0) 3,51, <i>d</i> (11,0)
19	22,4	1,16, <i>s</i>	22,6	0,98, <i>s</i>	23,4	1,04, <i>s</i>
20	22,6	0,93, <i>s</i>	22,9	1,01, <i>s</i>	21,7	1,03, <i>s</i>

Figura 89 - Interações principais via NOESY e sistemas de spin observados por TOCSY-1D.



O composto **82** apresentou a fórmula molecular $C_{20}H_{32}O_4$, deduzida a partir do íon $[M-H]^-$ (Figura 90) de m/z 335,2223 (calc. para $C_{20}H_{31}O_4$, 335,2228), indicando a incorporação de um átomo de oxigênio ao substrato.

O espectro de RMN de 1H (Figura 91) apresentou o surgimento de um sinal em δ_H 4,26 (*dt*, $J = 4,7; 9,3$ Hz), característico da ressonância de um novo hidrogênio oximetínico. Os espectros de ^{13}C (Figura 92) e DEPT-135 (Figura 93) confirmaram a presença de um sinal em δ_C 69,5, correspondente a um carbono oximetínico. A correlação 1H - ^{13}C entre os respectivos sinais (δ_H 4,26 - δ_C 69,5) foi observada no espectro de HSQC (Figura 94) e a posição do novo grupo hidroxila foi determinada em C-7 através das correlações dos sinais de H-8 (δ_H 1,71) e H₂-6 (δ_H 1,81; 1,21) com δ_C 69,5 (C-7) constatadas pelo HMBC (Figura 95). Adicionalmente, efeitos β foram verificados com C-8 (+ 5,5) e C-6 (+ 7,2), os quais são consistentes com a proposta.

A irradiação seletiva dos sinais correspondentes a H-3b (δ_H 1,10, *dt*, 4,5; 9,5 Hz) e a H-1 (δ_H 5,46, *t*, 1,1; 3,5 Hz) via experimentos de TOCSY-1D (Figura 96) permitiu a confirmação do sistema de spin (CH-1)-(CH₂-2)-(CH₂-3), enquanto a irradiação do sinal em 4.26 ppm (1H, *dt*, 4,7; 9,3 Hz) referente a H-7 revelou as conectividades do sistema (CH₃-17)-(CH-8)-(CH-7)-(CH₂-6)-(CH-5) inteiro, confirmando as atribuições feitas (Tabela 22). A orientação α (Figura 89) do grupo 7-OH foi inferida por meio da análise dos espectros de NOESY (Figura 97), nas quais constatou-se interações entre os sinais correspondentes a H-7 e H-5, e entre H-7 e H-8, apontando que esses grupos se encontram coorientados na face β .

Figura 90 - Espectro de massas de alta resolução do composto **82** (modo negativo).

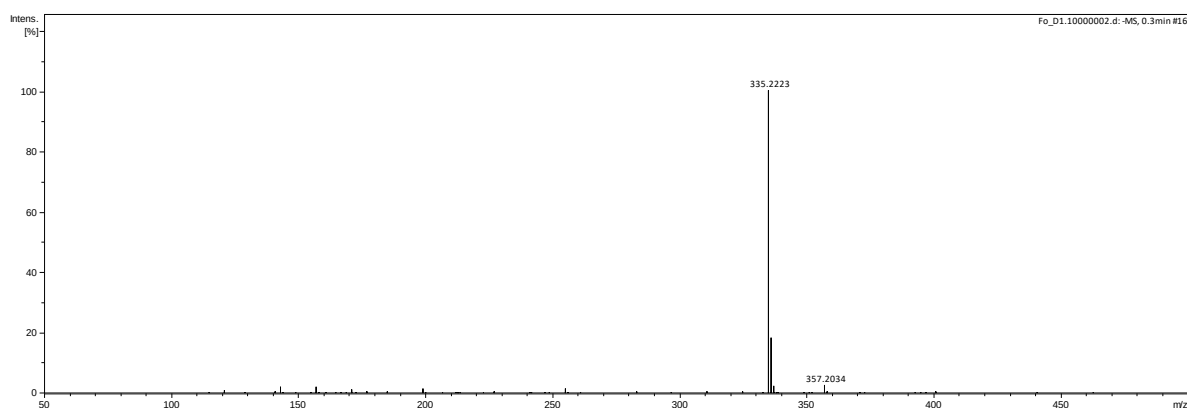


Figura 91 -Espectro de RMN de ^1H (600,13 MHz, CDCl_3) do composto **82**.

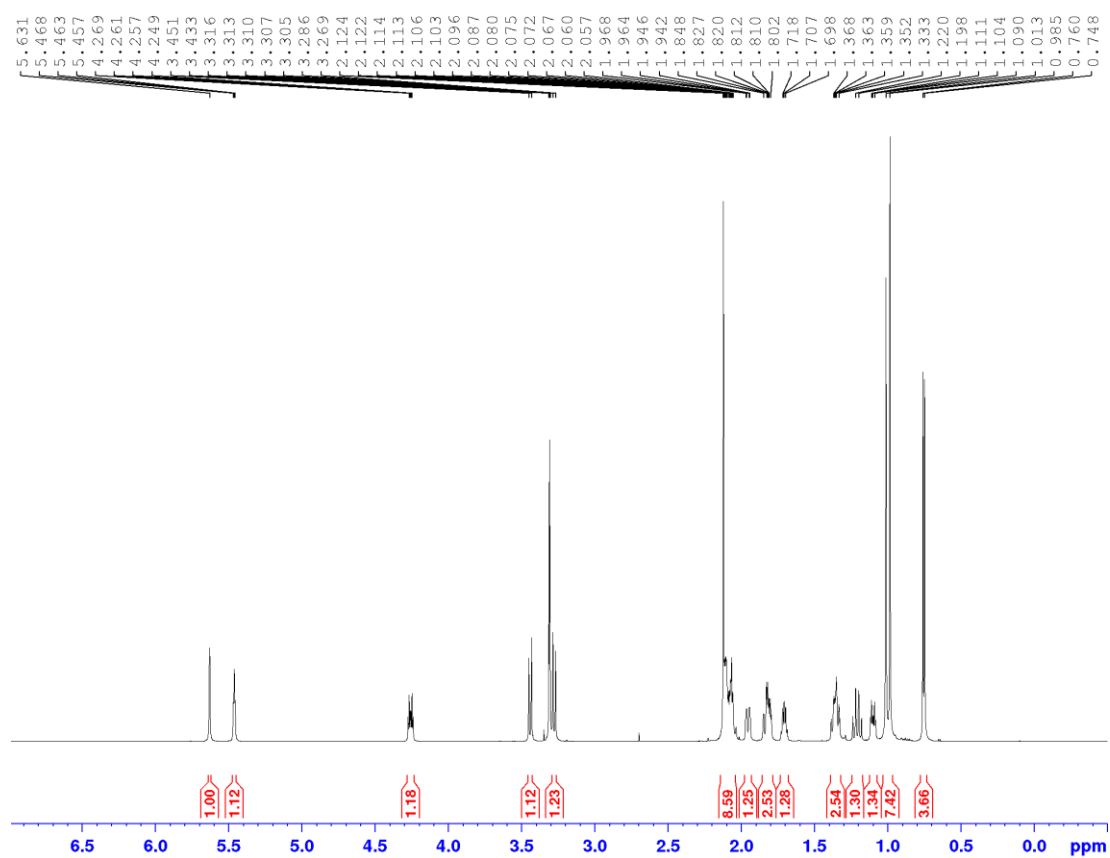


Figura 92 - Espectro de RMN de ^{13}C (150,9 MHz, CDCl_3) do composto **82**.

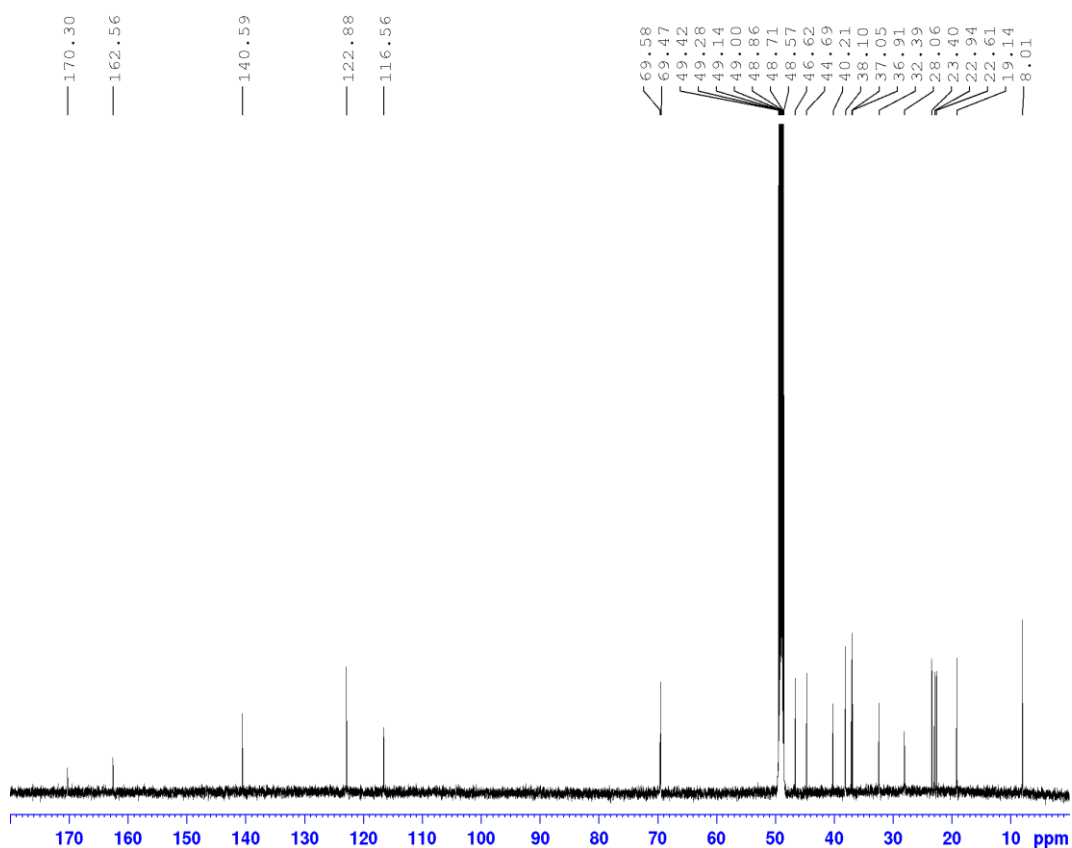


Figura 93 - Espectro de DEPT-135 (150,9 MHz, CDCl_3) do composto **82**.

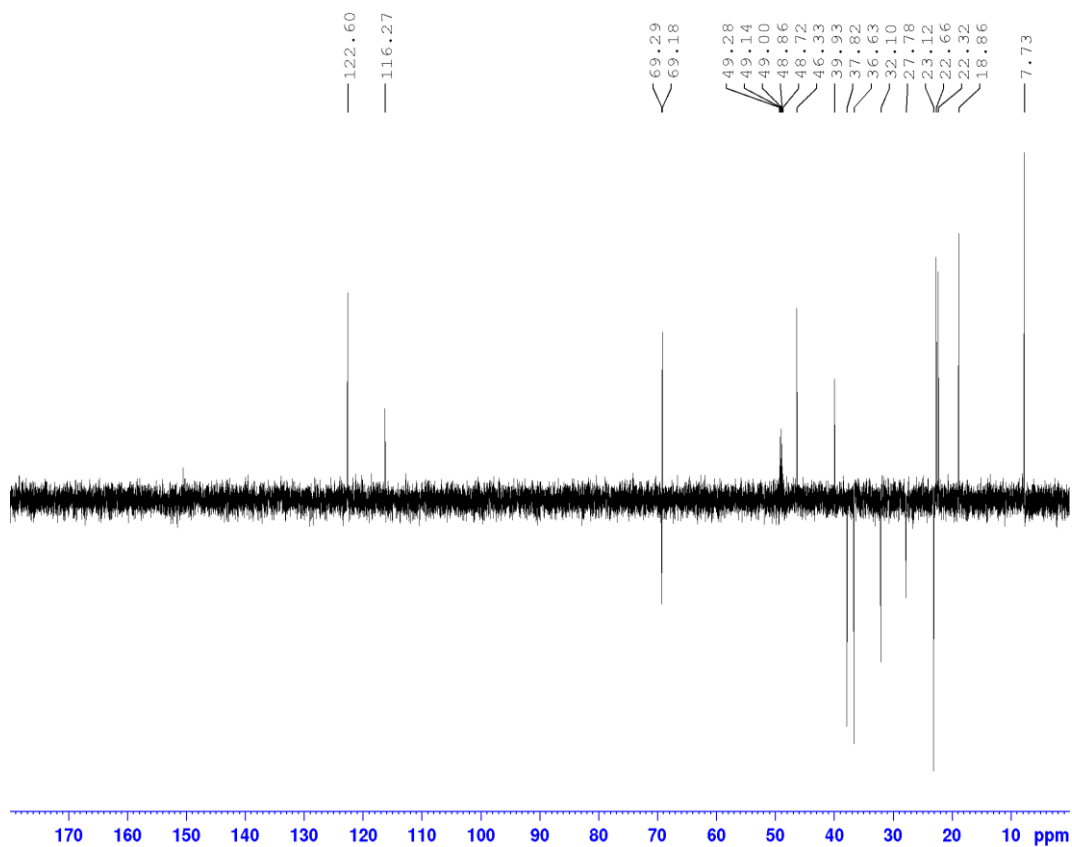


Figura 94 - Espectro de HSQC (600,13 MHz, CDCl_3) do composto **82**.

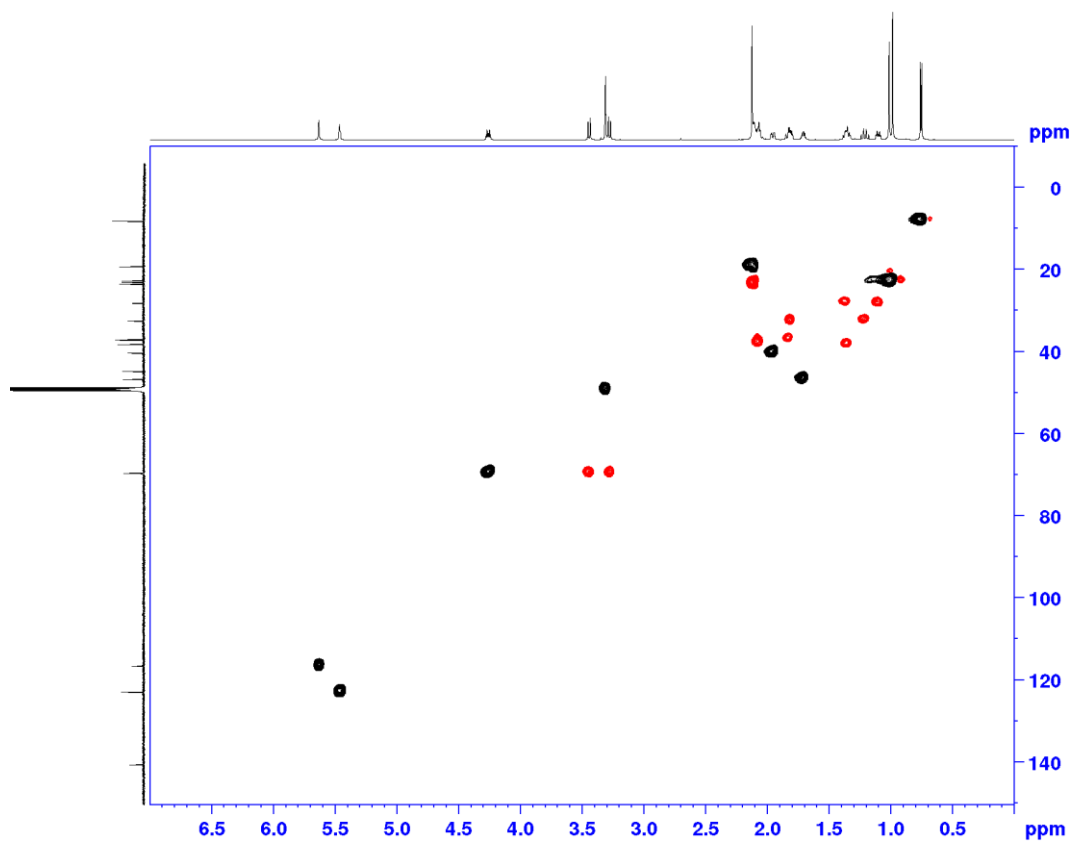


Figura 95 - Espectro de HMBC (600,13 MHz, CDCl_3) do composto **82**.

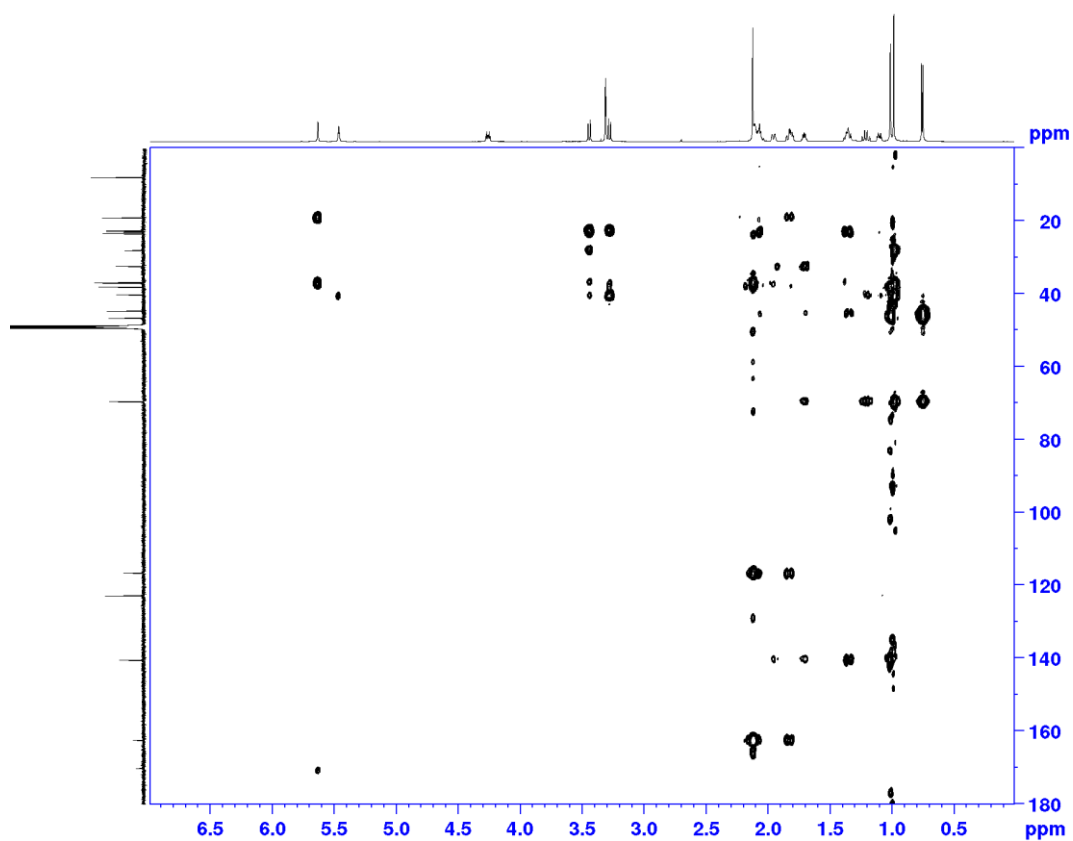


Figura 96 - Espectro de TOCSY-1D (600,13 MHz, CDCl_3) do composto **82**.

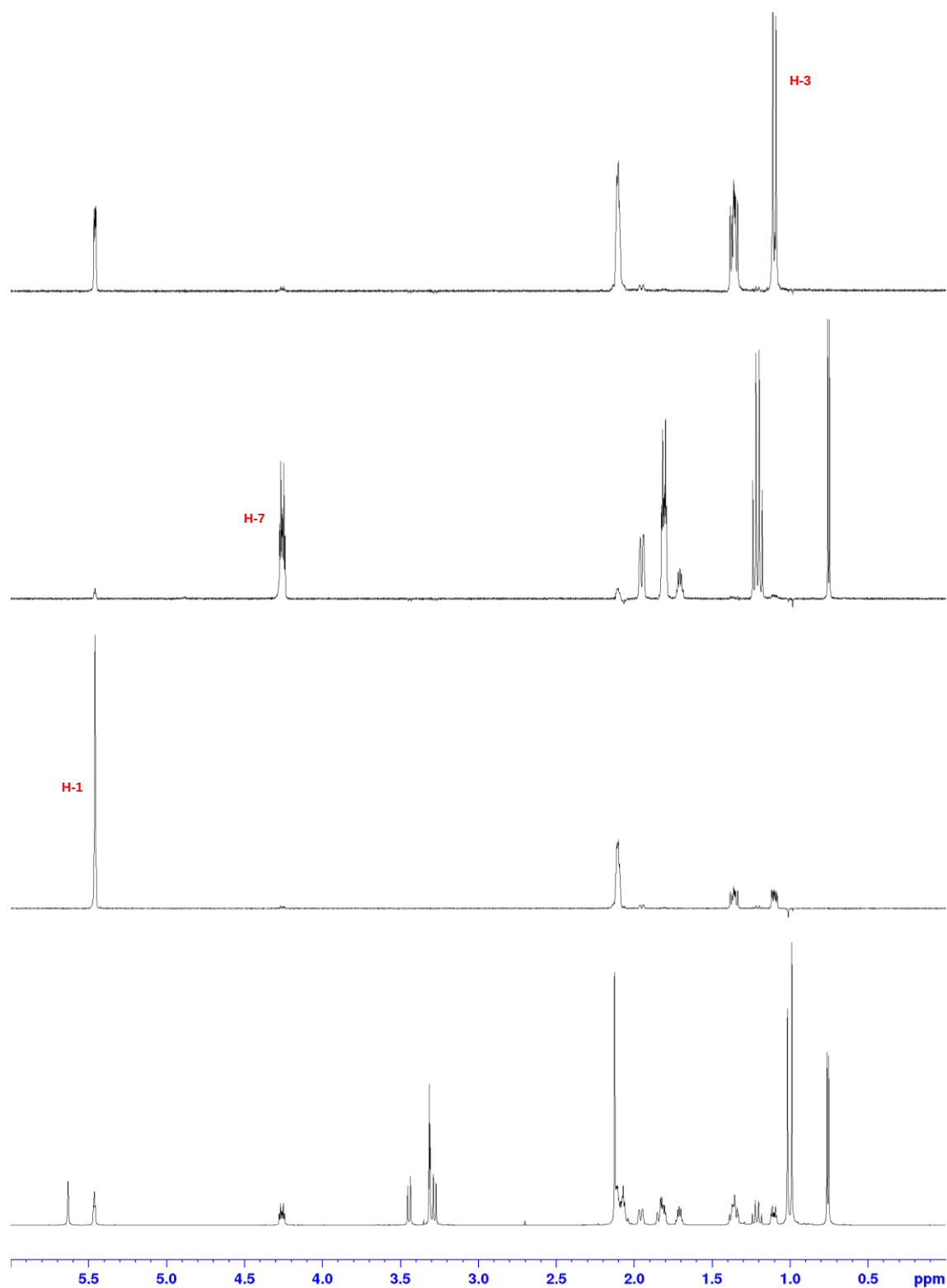
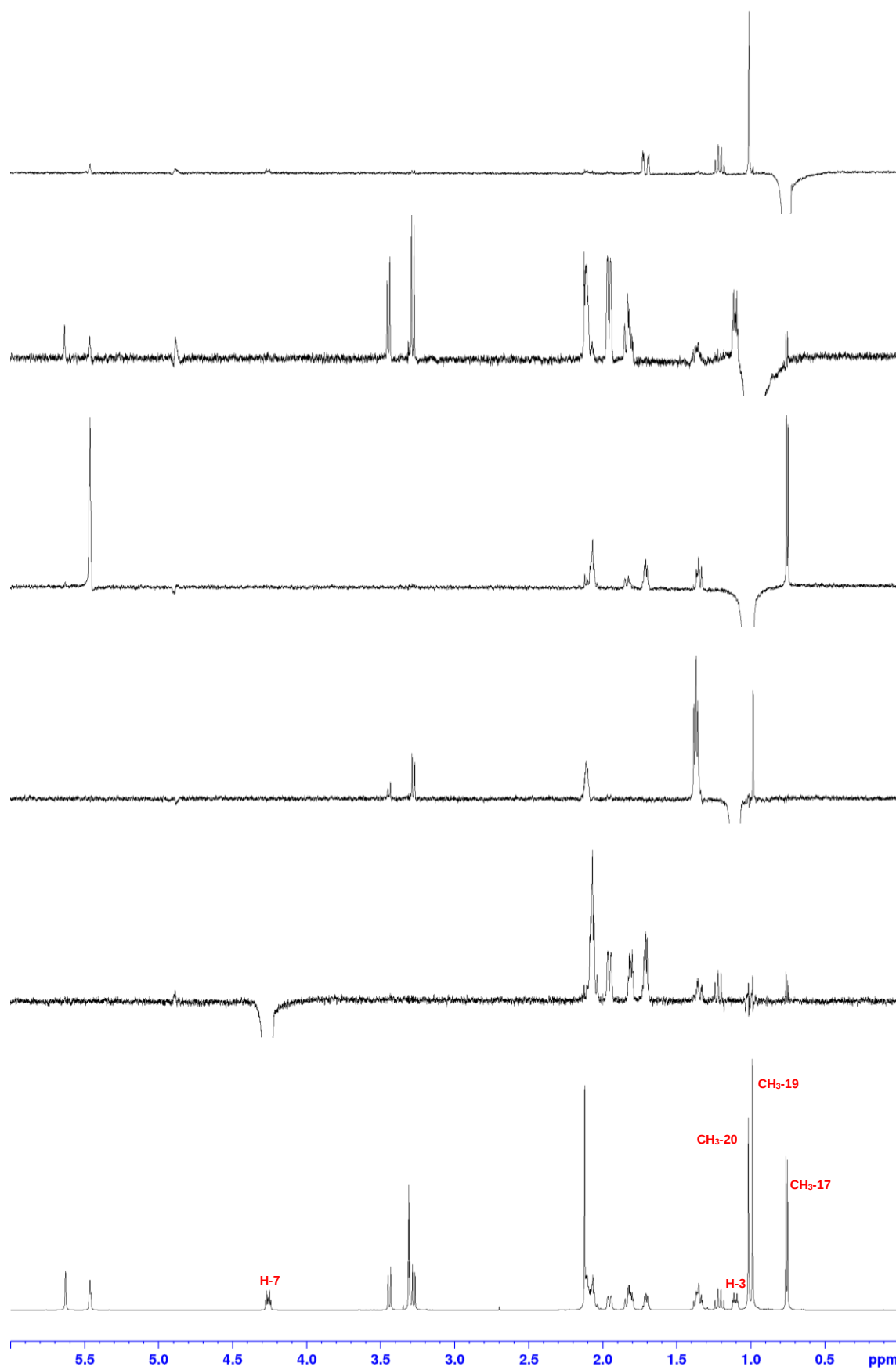


Figura 97 - Espectro de NOESY (600,13 MHz, CDCl_3) do composto **82**.



O espectro de massas de baixa resolução (Figura 98) do composto **86**, adquirido no modo de EM/EM, apresentou um íon atribuído à molécula protonada $[M+H]^+$ de m/z 353,23, assim como íons referentes aos adutos de sódio ($[M+Na]^+$, m/z 375,21) e de potássio ($[M+K]^+$, m/z 391,18), permitindo a dedução da fórmula molecular como $C_{20}H_{32}O_5$ (calc. para $C_{20}H_{33}O_5$, 353,2328), e sugerindo a adição de dois átomos de oxigênio ao substrato.

A inspeção do espectro de RMN de 1H do bioproduto **86** (Figura 99), em comparação com aquele de **79** (Figura F1), revelou a presença de sinais (δ_H 2,35; 1,92) oriundos da ressonância de um típico grupo metileno adjacente a um grupo carbonila α,β -insaturado (δ_H 2,35; 1,92) *dt*, 4,5; 9,5 Hz), juntamente com a desblindagem do sinal de H-1 (de 5,37 ppm em **79**) para δ_H 5,79, além da ausência do sinal em δ_H 5,66 (H-14) e, ainda, a blindagem do deslocamento químico do grupo CH_3 -16 (δ_H 2,10 em **79**) para 1,18 ppm, indicando a ocorrência da hidratação da ligação dupla-13,14.

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 100) confirmou a presença de um sinal típico de um grupo carbonila (δ_C 201,8) e, em conjunto com o espectro de DEPT-135 (Figura 101), revelou a ausência dos sinais característicos da ligação sp^2 -13,14 na cadeia lateral. A correlação direta 1H - ^{13}C entre o simpleto em δ_H 1,18 e o sinal do carbono em δ_C 27,2 (ambos referentes à CH_3 -16), observada no espectro de HSQC (Figura 102), bem como a presença de correlações a 2J no espectro de HMBC (Figura 103, Tabela 23) entre o sinal em δ_H 1,18 e δ_C 72,1 (C-13) e a 3J com os sinais em δ_C 37,6 (CH_2 -12) e δ_C 48,3 (CH_2 -14), reforçaram a proposta da oxidação da ligação dupla.

O espectro de TOCSY-1D (Figura 104) correspondente à irradiação seletiva do duplo duplete oriundo de H-5 (J = 4,4; 12,9 Hz) confirmou as conectividades dos grupos pertencentes ao sistema de spin (CH_3 -17)-(CH-8)-(CH-7)-(CH₂-6)-(CH-5), contribuindo para a atribuição completa de sinais (Tabela 22). As principais interações espaciais entre os grupos constatadas via NOESY (Figura 105) são apresentadas na Figura 89.

Figura 98 - Espectro de massas de baixa resolução do composto **86** (modo positivo).

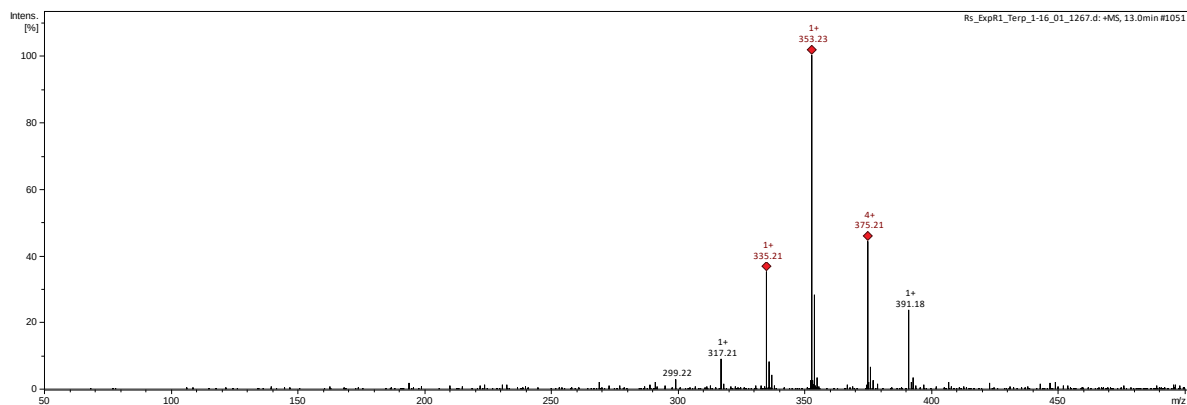


Figura 99 - Espectro de RMN de ^1H (600,13 MHz, CD_3OD) do composto **86**.

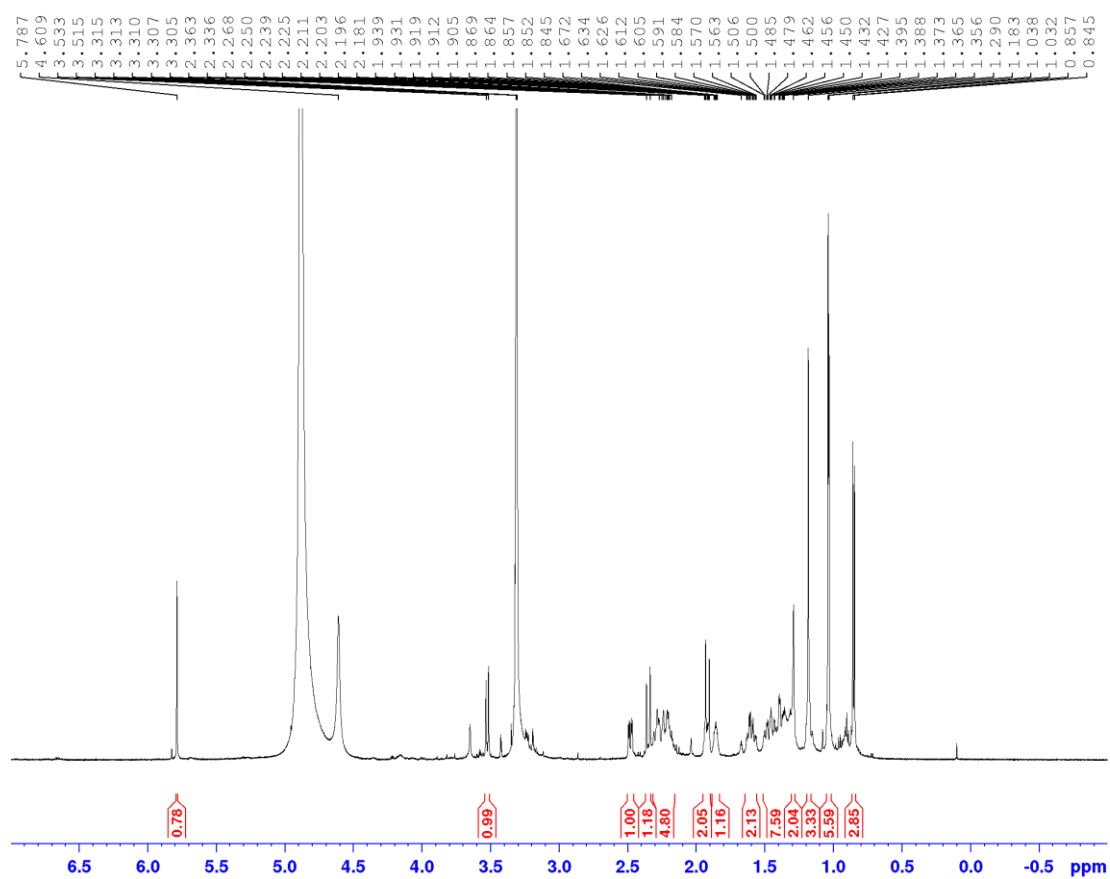


Figura 100 - Espectro de RMN de ^{13}C (150,9 MHz, CD_3OD) do composto **86**.

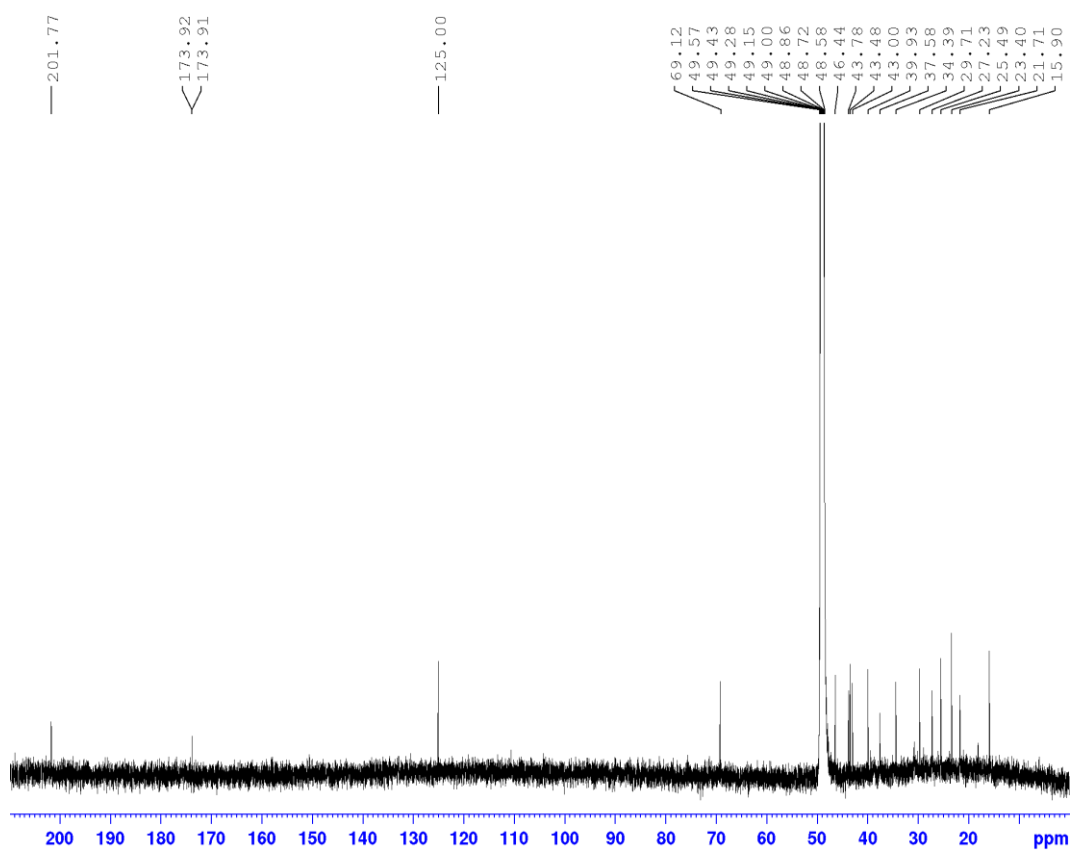


Figura 101 - Espectro de DEPT-135 (150,9 MHz, CD_3OD) do composto **86**.

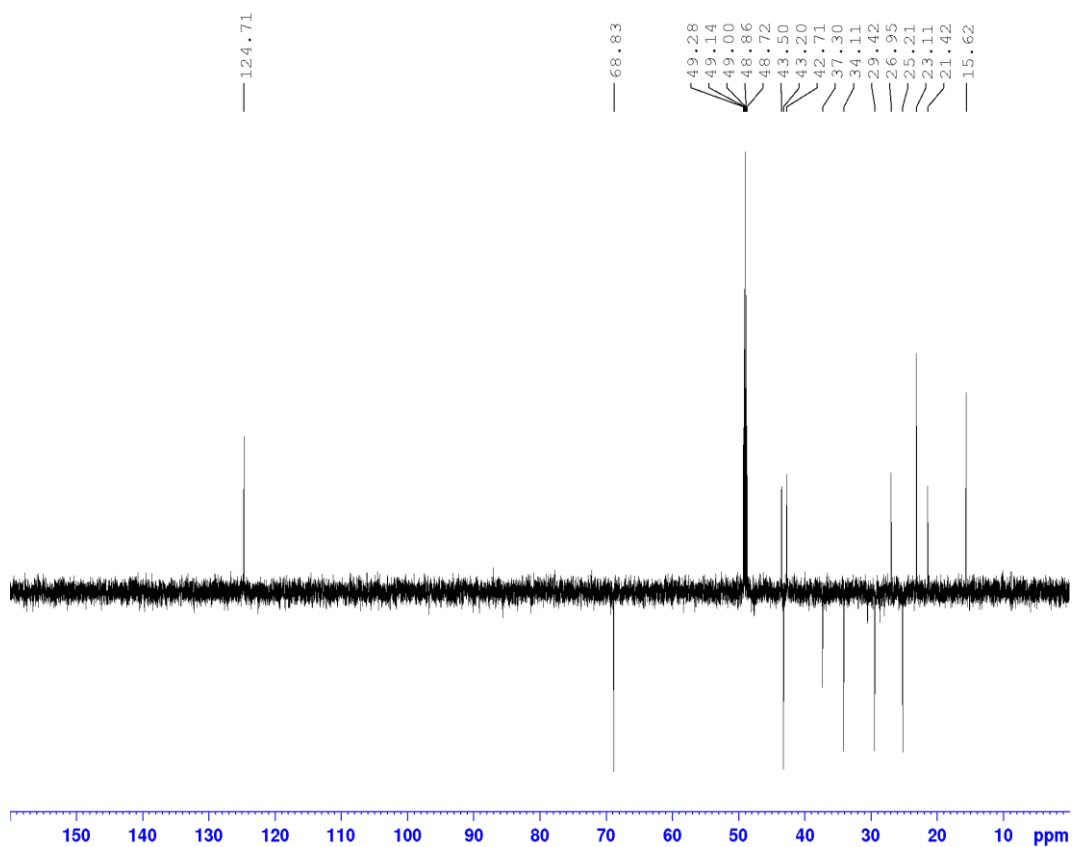


Figura 102 - Espectro de HSQC (600,13 MHz, CD₃OD) do composto **86**.

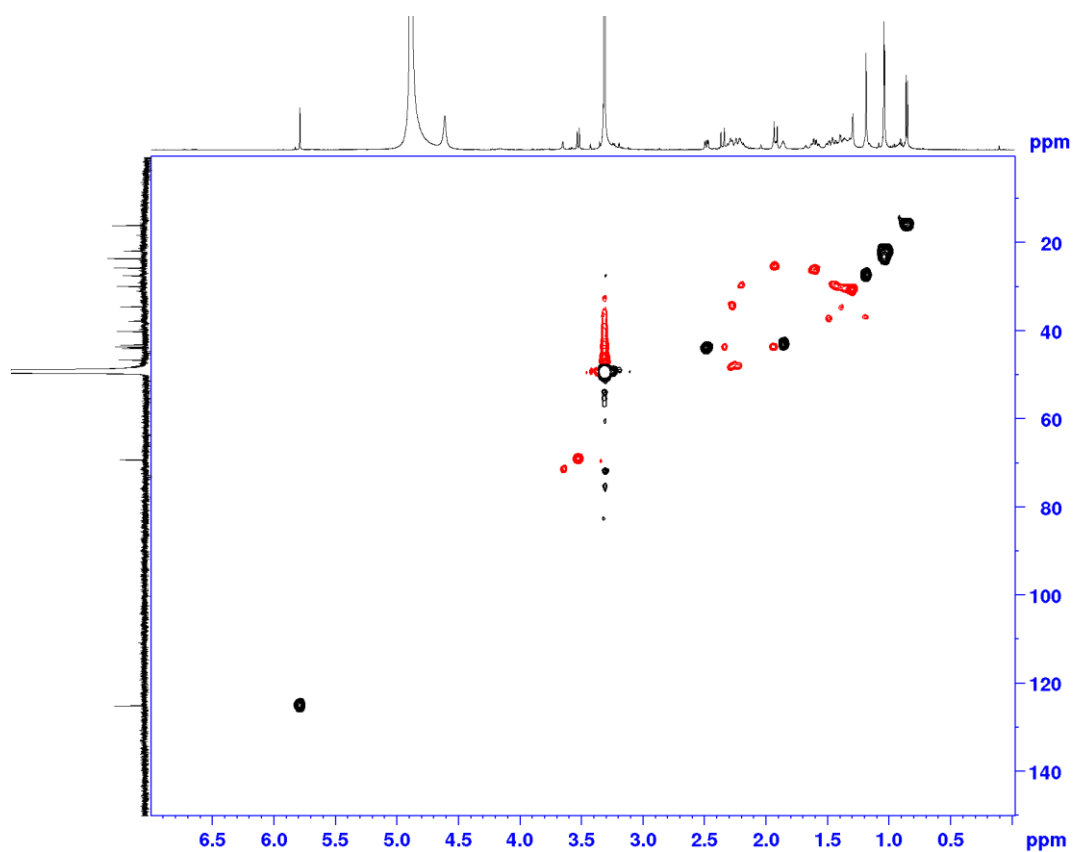


Figura 103 - Espectro de HMBC (600,13 MHz, CDCl₃) do composto **86**.

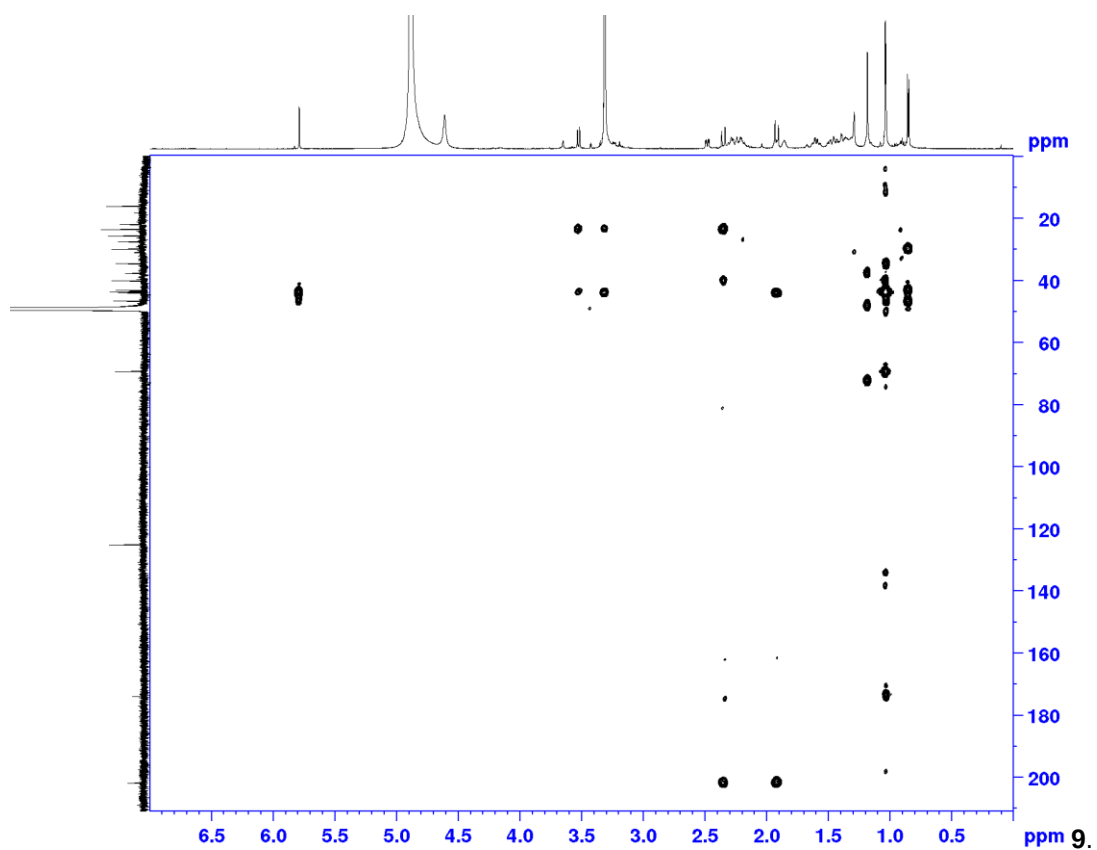


Figura 104 - Espectro de 1D-TOCSY (600,13 MHz, CDCl_3) do composto **86**.

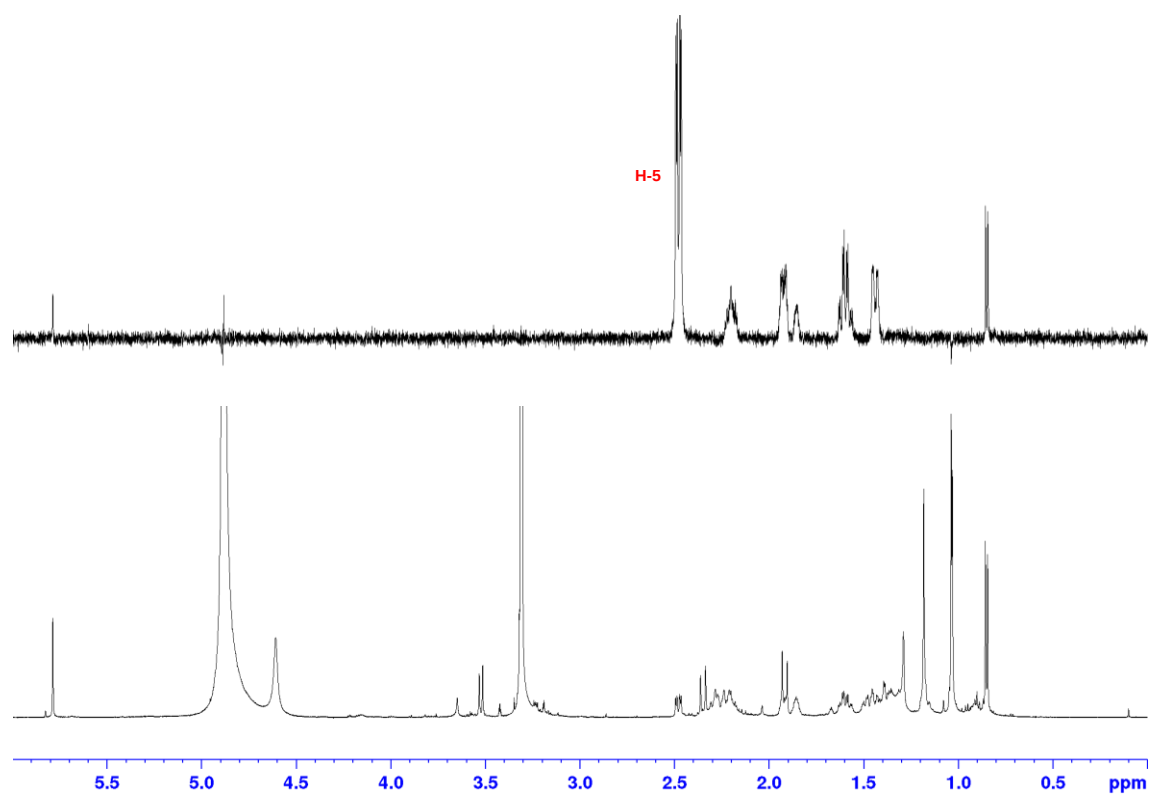
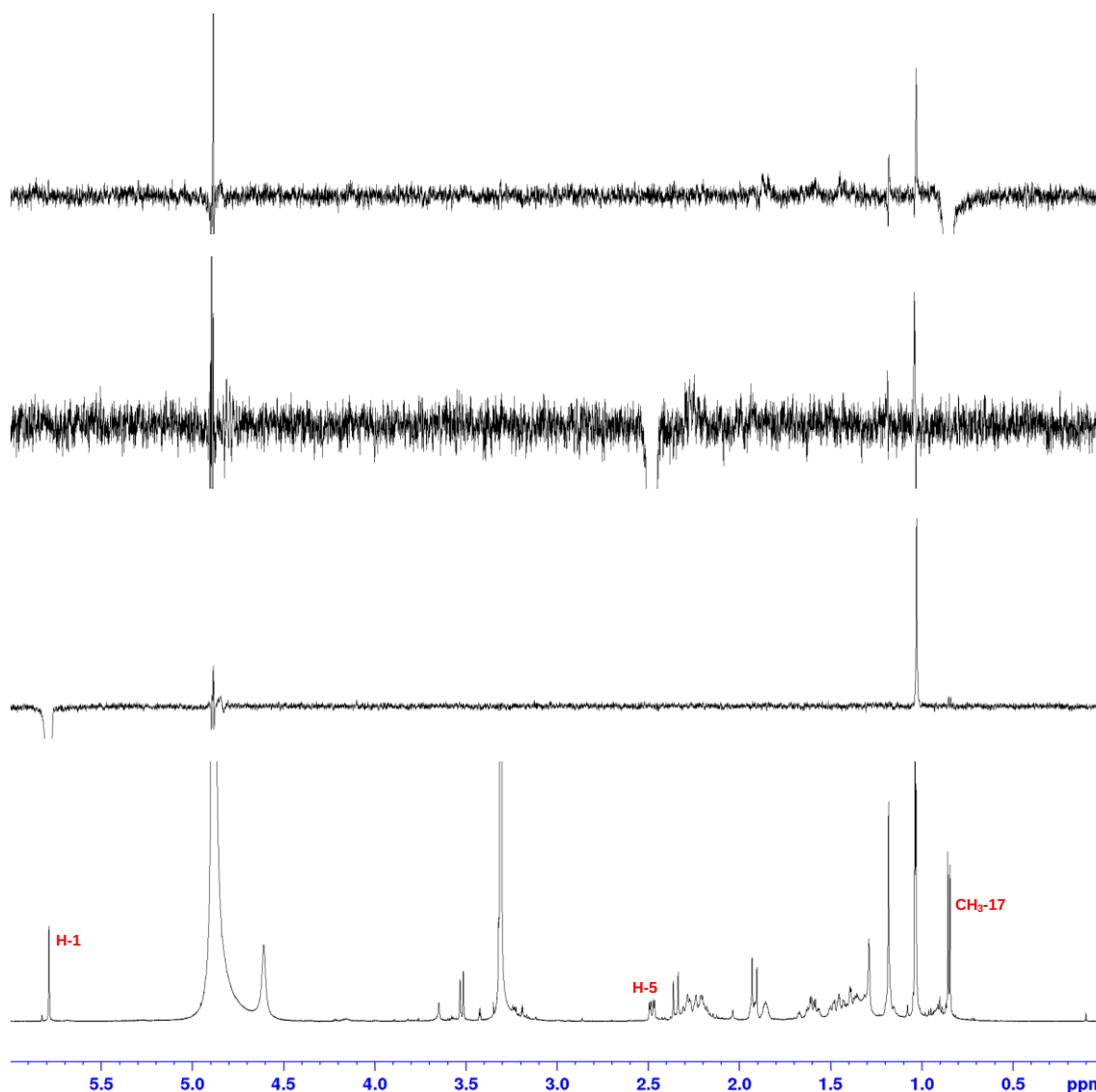


Figura 105 - Espectro de NOESY (600,13 MHz, CDCl_3) do composto **86**.



Dados físicos e espectroscópicos dos compostos **79** - **86**:

Ácido (+)-(4*R*, 5*S*, 8*R*, 9*S*)-18-hidróxi-*ent*-halima-1(10),13-(*E*)-dien-15-óico (**79**): sólido amorfo branco, $[\alpha]_D^{25} + 90,0$ (c 0,1, MeOH); RMN de ^1H (CD_3OD , 600,13 MHz): δ_{H} 5,66 (1H, s, H-14), 5,37 (1H, t, $J = 3,5, 6,9$ Hz, H-1), 3,43 (1H, d, $J = 10,7$ Hz, H-18a), 3,23 (1H, t, $J = 10,7$ Hz, H-18b), 2,19 (1H, td, $J = 3,9, 13,0$ Hz, H-11a), 2,10 (3H, s, H-16), 2,08 (2H, m, H-2), 2,07 (1H, m, H-7a), 2,03 (1H, m, H-12a), 1,90 (1H, dd, $J = 3,3, 9,2$ Hz, H-5), 1,82 (1H, td, $J = 3,9, 13,0$ Hz, H-12b), 1,66 (1H, m, H-6a), 1,58 (1H, m, H-8), 1,35 (1H, m, H-3a), 1,33 (1H, m, H-7b), 1,28 (1H, m, H-6b), 1,24 (1H, m, H-11b), 1,08 (1H, dt, $J = 4,2, 8,3, 12,4$ Hz, H-3b), 0,96 (3H, s, H-19), 0,95 (3H, s, H-20), 0,85 (3H, d, $J = 7,0$ Hz, H-17); RMN de ^{13}C (CD_3OD , 150,9 MHz): δ_{C} 170,4

(C, C-15), 162,8 (C, C-13), 142,5 (C, C-10), 121,4 (CH, C-1), 116,3 (CH, C-14), 70,1 (CH₂, C-18), 44,4 (C, C-9), 41,8 (CH, C-5), 41,1 (CH, C-8), 38,5 (CH₂, C-11), 37,2 (CH₂, C-12), 36,8 (C, C-4), 30,4 (CH₂, C-7), 27,6 (CH₂, C-3), 25,2 (CH₂, C-6), 23,4 (CH₂, C-2), 22,5 (CH₃, C-20), 22,3 (CH₃, C-19), 19,1 (CH₃, C-16), 16,0 (CH₃, C-17).

Ácido (+)-(4*R*, 5*S*, 8*R*, 9*S*)-2-Oxo-18-hidroxi-*ent*-halima-1(10),13-(*E*)-dien-15-oico (**80**): sólido amorfo branco, $[\alpha]_D^{25} + 63,5$ (c 0,1, MeOH); RMN de ¹H (CDCl₃, 600,13 MHz): δ_H 5,87 (1H, s, H-1), 5,67 (1H, *d*, *J* = 1,0 Hz, H-14), 3,62 (1H, *d*, *J* = 10,6 Hz, H-18a), 3,41 (1H, *d*, *J* = 10,6 Hz, H-18b), 2,33 (1H, *dd*, *J* = 4,3, 13,0 Hz, H-5), 2,31 (1H, *d*, *J* = 15,5 Hz, H-3a), 2,21 (1H, *m*, H-11a), 2,16 (3H, *d*, *J* = 1,0 Hz, H-16), 2,14 (1H, *m*, H-12a), 1,99 (1H, *d*, *J* = 15,5 Hz, H-3b), 1,93 (1H, *m*, H-6a), 1,84 (1H, *m*, H-8), 1,78 (1H, *td*, *J* = 4,1, 13,4 Hz, H-12b), 1,57 (1H, *qd*, *J* = 4,3, 13,0 Hz, H-6b), 1,47 (1H, *td*, *J* = 4,1, 13,4 Hz, H-11b), 1,25 (2H, *sl*, H-7), 1,08 (3H, s, H-19), 1,05 (3H, s, H-20), 0,84 (3H, *d*, *J* = 7,1 Hz, H-17); RMN de ¹³C (CDCl₃, 150,9 MHz): δ_C 198,9 (C, C-2), 170,0 (C, C-10), 168,8 (C, C-15), 163,3 (C, C-13), 125,3 (CH, C-1), 114,8 (CH, C-14), 69,3 (CH₂, C-18), 45,6 (C, C-9), 43,1 (CH₂, C-3), 42,6 (CH, C-5), 41,5 (CH, C-8), 39,2 (C, C-4), 37,2 (CH₂, C-11), 36,2 (CH₂, C-12), 30,0 (CH₂, C-7), 24,8 (CH₂, C-6), 23,3 (CH₃, C-19), 21,5 (CH₃, C-20), 19,7 (CH₃, C-16), 16,0 (CH₃, C-17); EMAR *m/z* 333.2073 [M-H]⁻ (calcd. para C₂₀H₂₉O₄ 333,2071).

Ácido (-)-(2*S*^{*}, 4*R*^{*}, 5*S*^{*}, 8*R*^{*}, 9*S*^{*})-2,18-dihidroxi-*ent*-halima-1(10),13-(*E*)-dien-15-oico (**81**): sólido branco amorfo, $[\alpha]_D^{25} - 1,4$ (c 0,07, MeOH); Dados de RMN de ¹H e ¹³C – Tabela 23; EMAR *m/z* 335,2236 [M-H]⁻ (calcd. para C₂₀H₃₁O₄ 335,2228).

Ácido (+)-(4*R*^{*}, 5*S*^{*}, 7*S*^{*}, 8*S*^{*}, 9*S*^{*})-7,18-dihidroxi-*ent*-halima-1(10),13-(*E*)-dien-15-oico (**82**): sólido branco amorfo, $[\alpha]_D^{25} + 99,6$ (c 0,09, MeOH); Dados de RMN de ¹H e ¹³C - Tabela 23; EMAR *m/z* 335,2223 [M-H]⁻ (calcd. para C₂₀H₃₁O₄ 335,2228).

Ácido (+)-(5*S*, 8*R*, 9*S*)-18,19-dihidróxi-*ent*-halima-1(10),13-(*E*)-dien-15-oico (**83**): sólido amorfo branco, $[\alpha]_D^{25} + 28,3$ (c 0,1, MeOH); EMAR *m/z* 335,2236 [M-H]⁻ (calcd. para C₂₀H₃₁O₄ 335,2228).

Ácido (+)-(4*R*, 5*S*, 8*R*, 9*S*)-18-carbóxi-*ent*-halima-1(10),13-(*E*)-dien-15-oico (**84**): sólido branco amorfo, $[\alpha]_D^{25} + 17,4$ (c 0.11, MeOH); EMAR m/z 333,2071 $[M-H]^-$ (calcd. para C₂₀H₂₉O₄ 333,2071).

Ácido (+)-(4*R*, 5*S*, 8*R*, 9*S*)-18-formyl-*ent*-halima-1(10),13-(*E*)-dien-15-oico (**85**): sólido branco amorfo, $[\alpha]_D^{25} + 4.7$ (c 0.1, MeOH); EMAR m/z 317,2123 $[M-H]^-$ (calcd. para C₂₀H₂₉O₃ 317.2122).

Ácido (+)-(4*R*^{*}, 5*S*^{*}, 8*R*^{*}, 9*S*^{*}, 13*S*^{*})-13,18-dihidroxi-*ent*-halima-1(10)-(E)-en-15-oico (**86**): sólido branco amorfo, $[\alpha]_D^{25} + 20,0$ (c 0.1, MeOH); EM-IT m/z 353,23 $[M+H]^+$ (calcd. para C₂₀H₃₃O₅ 353,2328).

3.4.2 Considerações sobre a bio-oxifuncionalização do substrato

F. oxysporum é um fungo filamentoso que tem sido empregado com sucesso na biotransformação de substratos pertencentes a diversas classes de produtos naturais: monoterpenoides (Bicas *et al.*, 2008; Kuriata-Adamusiak *et al.*, 2011; Molina *et al.*, 2015), diterpenoides (Tapia *et al.*, 1997; Monteiro *et al.*, 2017), esteroides (Wilson *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2013) e alcaloides (Kumar e Ahmad, 2013).

Os relatos de modificações de diterpenoides executadas por espécies de *Fusarium* incluem: a hidroxilação do diterpenoide tetracíclico isosteviol por *Fusarium verticilloides*, produzindo os derivados *ent*-7 β -hidroxi e *ent*-12 α -hidroxi (De Oliveira e Strapasson, 1996); a conversão do ácido desidroabiético (esqueleto abietano) em seu análogo 1 α -hidroxi por *F. oxysporum* e *F. moniliforme* (Tapia *et al.*, 1997); a hidroxifuncionalização do labdano esclareol por *F. lini*, resultando em seus bioprodutos 1 β -hidroxi e (12*S*)-12-hidróxi (Choudhary *et al.*, 2006); a oxidação do ácido *ent*-16-oxo-17-norkauran-19-oico (caurano) em seu derivado 2 β -hidroxi (Rocha *et al.*, 2010) e do ácido caurênoico em seu análogo 2 α -hidroxi, ambas por *F. proliferatum* (Rocha *et al.*, 2017); bem como a conversão do ácido (+)-(4*R*, 5*S*, 8*R*, 9*S*)-18-hidroxi-*ent*-halima-1(10),13-(*E*)-dien-15-oico (halimano) em seu derivado 2-

oxo, e do ácido (+)-(5*S*, 8*S*, 9*R*, 10*S*)-lab-13-en-8 β -ol-15-oico (labdano) em seu análogo 7 α -hidroxi, executadas por *F. oxysporum* (Monteiro *et al.*, 2017).

Portanto, a formação dos produtos **80**, **81**, e **82** observada no presente estudo, por intermédio de *F. oxysporum*, provavelmente envolveu a ação da enzima citocromo monoxigenase P450, a qual seria responsável pela biohidroxilação – oxidação/ativação microbiana das ligações C-H sp^3 - das posições C-2 e C-7. Neste contexto, a oxofuncionalização da posição 2 (**80**) foi favorecida pelo fato de que uma ligação C-H alílica é consideravelmente mais reativa que uma ligação C-H secundária (Clayden *et al.*, 2012).

Monoxigenases P450 são enzimas dependentes do grupo prostético Fe-heme. O intermediário cataliticamente ativo [heme-Fe=O] induz a abstração do átomo de hidrogênio do substrato R-H, com a formação de um radical R $\cdot$, seguido pela formação rápida da ligação C-O e liberação do produto R-OH. Isso implica que para se alcançar regio e estereoespecificidades elevadas, é necessário que o substrato seja mantido em uma posição específica, com a porção contendo a ligação C-H apontando para as espécies cataliticamente ativas. Portanto, compostos que possuem grupos funcionais podem sofrer ligações de hidrogênio como um dos fatores determinantes para o posicionamento no amplo sítio de ligação das isoenzimas do citocromo P450 (CYPs), o que significa que a hidroxilação de substratos desprovidos de tais grupos de alocação seja difícil de ocorrer (Ilie *et al.*, 2015).

M. verrucaria é uma espécie pouco estudada e empregada para experimentos de biotransformação até o momento, tendo sido usado somente para a modificação dos diterpenoides halimano e labdano: o ácido (+)-(4*R*, 5*S*, 8*R*, 9*S*)-18-hidroxi-*ent*-halima-1(10),13-(*E*)-dien-15-oico, promovendo a oxidação do grupo CH₂OH-18 em seu respectivo aldeído (18-COH) e ácido carboxílico (18-COOH), bem como a ativação da posição C-19 (derivado 19-hidroxi); e o ácido (+)-(5*S*, 8*S*, 9*R*, 10*S*)-lab-13-en-8 β -ol-15-oico, transformado em seus análogos 3 β -hidroxi e 7 α -hidroxi (Monteiro *et al.*, 2017). Tais resultados prévios, juntamente com os resultados deste estudo atual, no qual se relata pela primeira vez a formação do derivado 2-oxo do substrato (**79**), revelam um potencial promissor para aplicação deste microrganismo na oxidação de substratos diterpênicos.

Enquanto *M. verrucaria* demonstrou especificidade pelas posições C-2, C-18 e C-19 do anel A do núcleo decalina, *F. oxysporum* promoveu a oxidação seletiva das posições C-2 (anel A) e C-7 (anel B). Quanto à distribuição dos bioprodutos, *M. verrucaria* proveu um número maior de derivados do que *F. oxysporum*, porém forneceu um rendimento consideravelmente menor do análogo **80** (0,9 %) em comparação à *F. oxysporum* (2,8%), o que pode se justificar pelo “desvio” de substrato para a conversão simultânea de um número maior de bioprodutos.

As espécies do gênero *Rhinocladia*, à exemplo do *Myrothecium*, também são muito pouco exploradas para estudos químicos e biotransformações. No entanto, Koshimura e colaboradores (2009) descrevem o uso de duas linhagens, *Rhinocladia atrovirens* NRBC 32362 e *Rhinocladia* sp. K-001, isoladas da alga marinha *Styopodium zonale*, para a biotransformação de bromosesquiterpenos. *R. atrovirens* NRBC 32362 converteu aplisistatina em seus derivados 5 α -hidroxi, 5 α -hidroxiiso e 9 β -hidroxi. Já a transformação de aplisistatina, palisadina A e 12-hidroxi palisadina B 3 por *Rhinocladia* sp. forneceu dois análogos: 3,4-dihidroaplisistatina e 9,10-desidrobromopalisadina A.

As modificações estruturais presentes no derivado fornecido por *R. similis*, demonstraram, ao mesmo tempo, um sítio de oxidação em comum com aquelas executadas por *F. oxysporum* e *M. verrucaria* (C-2, anel A), porém um segundo sítio de oxirredução totalmente distinto: a ligação dupla-13,14 localizada na cadeia lateral do substrato. *R. similis* catalisou a oxofuncionalização em C-2 por intermédio de uma oxidase, ao passo que promoveu a hidratação da ligação dupla mediada por uma hidratase (Schrewe *et al.*, 2013; Resch e Hanefeld, 2015).

A adição seletiva de água a ligações duplas C-C é uma reação quimicamente desafiadora, uma vez que a molécula de água é pouco reativa, comportando-se tanto como um nucleófilo, quanto um eletrófilo fracos. Por outro lado, enzimas são capazes de usar a água como substrato e fornecer um ambiente adequado para transformações assimétricas, permitindo a síntese de álcoois enantiomericamente puros. Além disso, suas propriedades ácido/base permitem a estabilização do estado de transição formado durante a adição (Resch e Hanefeld, 2015).

Uma vez que a ligação sp^2 -13,14 faz parte de um sistema carboxila α,β -conjugado (e portanto, encontra-se polarizada ou deficiente em elétrons), a adição da

molécula de água representa uma adição de Michael. Dependendo do tipo de enzima, a reação de adição pode mostrar preferência *syn* ou *anti* (Resch e Hanefeld, 2015).

De modo geral, as modificações estruturais do substrato obtidas por meio dos três fungos filamentosos usados reforçam a grande capacidade e versatilidade que micróbios possuem de catalisar diferentes tipos de reações através de sua complexa maquinaria enzimática, bem como a susceptibilidade de diterpenoides como substratos frente a essas enzimas.

3.4.3 Atividade citotóxica do substrato e bioprodutos

É bem estabelecido na literatura que diversos diterpenoides, incluindo diterpenos de esqueleto halimano e labdano, exibem atividade citotóxica sobre um grande número de linhagens de células tumorais humanas (Rico-Martinez 2014). Nesse contexto, a atividade citotóxica dos compostos **79** – **85** (Tabela 23) foi acessada usando duas linhagens de células tumorais diferentes: HCT-116 (carcinoma cólon-retal) e MCF-7 (adenocarcinoma mamário).

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 μ M (média $\pm$ EPM (n = 2)).

Composto	HCT-116 - %Inib. $\pm$ EPM		MCF-7 - %Inib. $\pm$ EPM	
	5 μ M	50 μ M	5 μ M	50 μ M
79	3,39 $\pm$ 3,27	7,04 $\pm$ 11,86	16,42 $\pm$ 2,10	9,98 $\pm$ 12,10
80	7,06 $\pm$ 0,48	16,72 $\pm$ 25,11	17,62 $\pm$ 2,79	34,40 $\pm$ 24,32
81	0,00 $\pm$ 9,57	0,00 $\pm$ 1,99	9,45 $\pm$ 2,85	13,16 $\pm$ 3,01
82	0,00 $\pm$ 0,84	18,80 $\pm$ 4,48	4,31 $\pm$ 2,15	10,94 $\pm$ 3,08
83	15,74 $\pm$ 16,84	89,02 $\pm$ 10,97	47,05 $\pm$ 6,87	71,62 $\pm$ 6,81
84	0,57 $\pm$ 17,92	2,69 $\pm$ 25,26	24,10 $\pm$ 1,83	20,99 $\pm$ 5,90
85	0,00 $\pm$ 18,24	0,00 $\pm$ 23,72	28,59 $\pm$ 5,95	20,40 $\pm$ 5,70

Com exceção do análogo **83**, o qual demonstrou percentuais de inibição elevado contra HCT-116 e moderado frente à MCF-7, ambos na concentração de 50 μ M, os demais compostos apresentaram baixa atividade e podem ser considerados

não citotóxicos nas linhagens testadas. No entanto, esses resultados sugerem uma correlação relevante entre a estrutura do substrato **79** e seu derivado **83**, apontando que a hidroxilação em C-19 contribuiu para elevar de forma considerável a atividade inibitória desse composto frente à ambas as linhagens celulares.

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* (Schrader) 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.

APÊNDICE

APÊNDICE A - Dados espectroscópicos de RMN (Tabela A1) e espectros de RMN de ^1H , DEPT-135, HSQC e HMBC do composto **07**.

Tabela A1. Dados espectroscópicos de RMN do metabólito **07** (600 MHz, CD_3OD).

Posição	δ_{C} , tipo	δ_{H} , mult. ($J = \text{Hz}$)	HMBC
2	57,2, CH	3,21, <i>m</i>	C-7
3	65,6, CH	3,84, <i>m</i>	
4	31,9, CH_2	1,65, <i>m</i>	C-2
5	23,35, CH_2	1,80, <i>m</i> 1,22, <i>m</i>	
6	58,4, CH	3,04, <i>m</i>	
7	15,7, CH_3	1,32, <i>d</i> (6,6)	C-4, C-2, C-3
1'	34,5, CH_3	1,67, <i>m</i> 1,56, <i>m</i>	
2'	26,5, CH_2	1,44, <i>m</i> 1,38, <i>m</i>	
3'	30,2, CH_2	1,33, <i>sl</i>	
4'	30,2, CH_2	1,33, <i>sl</i>	
5'	30,2, CH_2	1,33, <i>sl</i>	
6'	30,2, CH_2	1,33, <i>sl</i>	
7'	30,3, CH_2	1,33, <i>sl</i>	
8'	30,3, CH_2	1,33, <i>sl</i>	
9'	30,8, CH_2	1,33, <i>sl</i>	
10'	29,9, CH_2	1,33, <i>sl</i>	
11'	24,6, CH_2	1,56, <i>quint</i> (7,3)	C-10', C-12', C-13',
12'	44,0, CH	2,47, <i>t</i> (7,3)	C-10', C-11', C-13',
13'	211,9, C		
14'	29,5, CH_3	2,13, <i>s</i>	C-12', C-13',

Figura A1 - Espectro de RMN de ^1H (600,13 MHz, CD_3OD) do composto **07**.

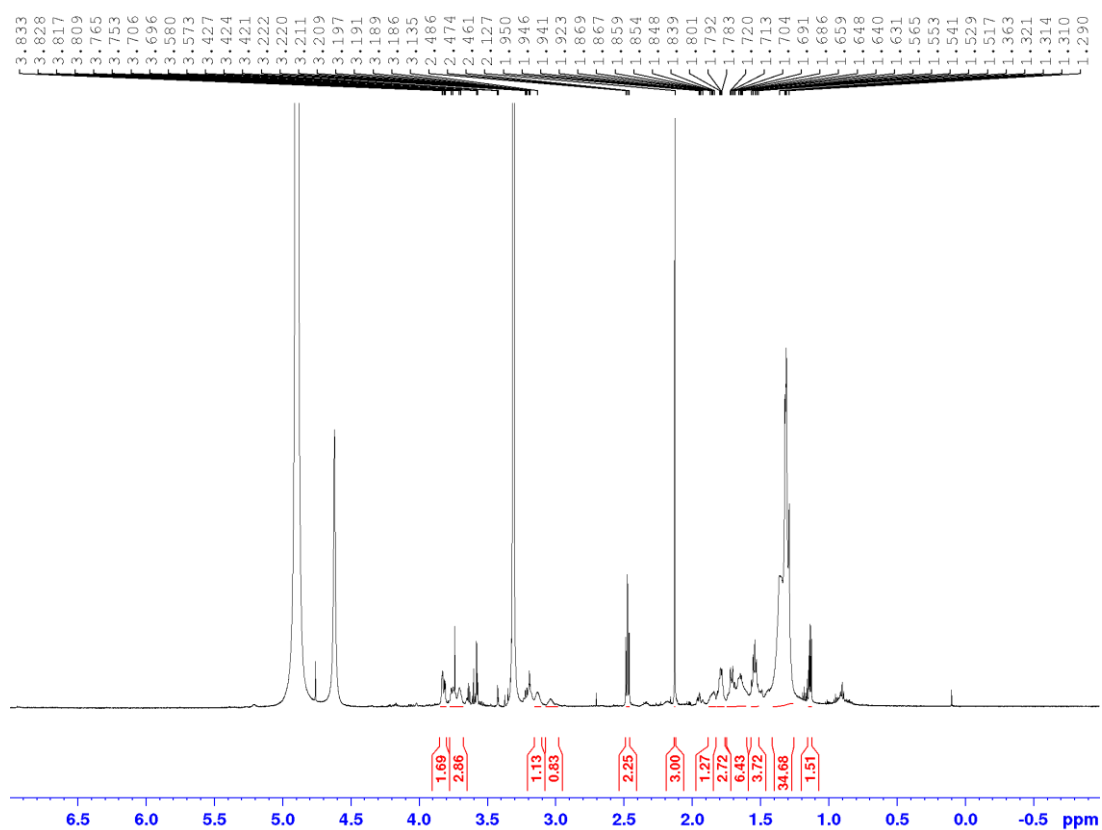


Figura A2 - Espectro de DEPT-135 (150,9 MHz, CD_3OD) do composto **07**.

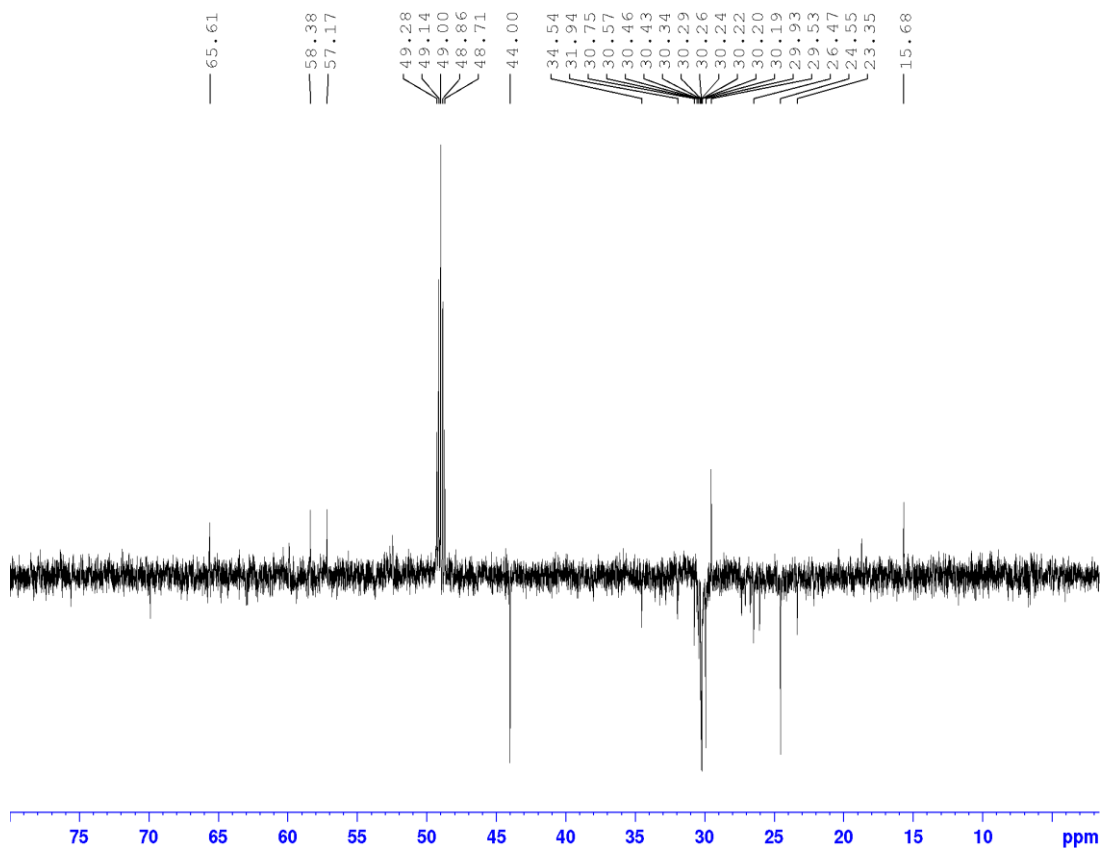


Figura A3 - Espectro de HSQC (600,13 MHz, CD₃OD) do composto **07**.

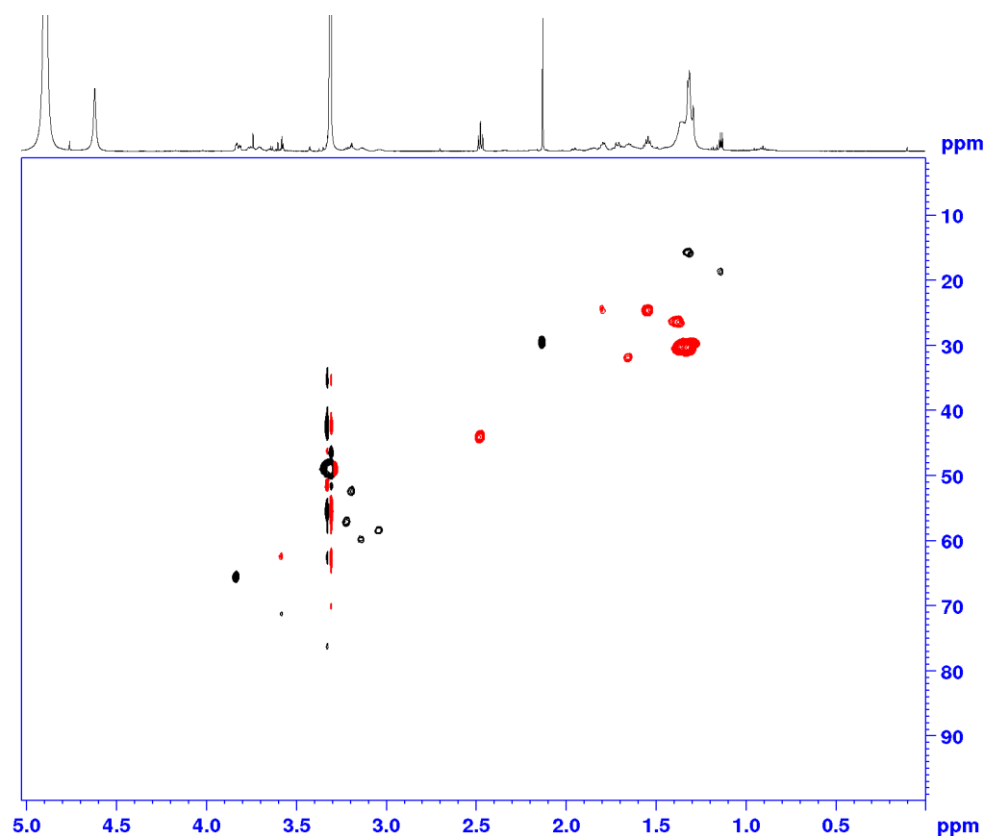
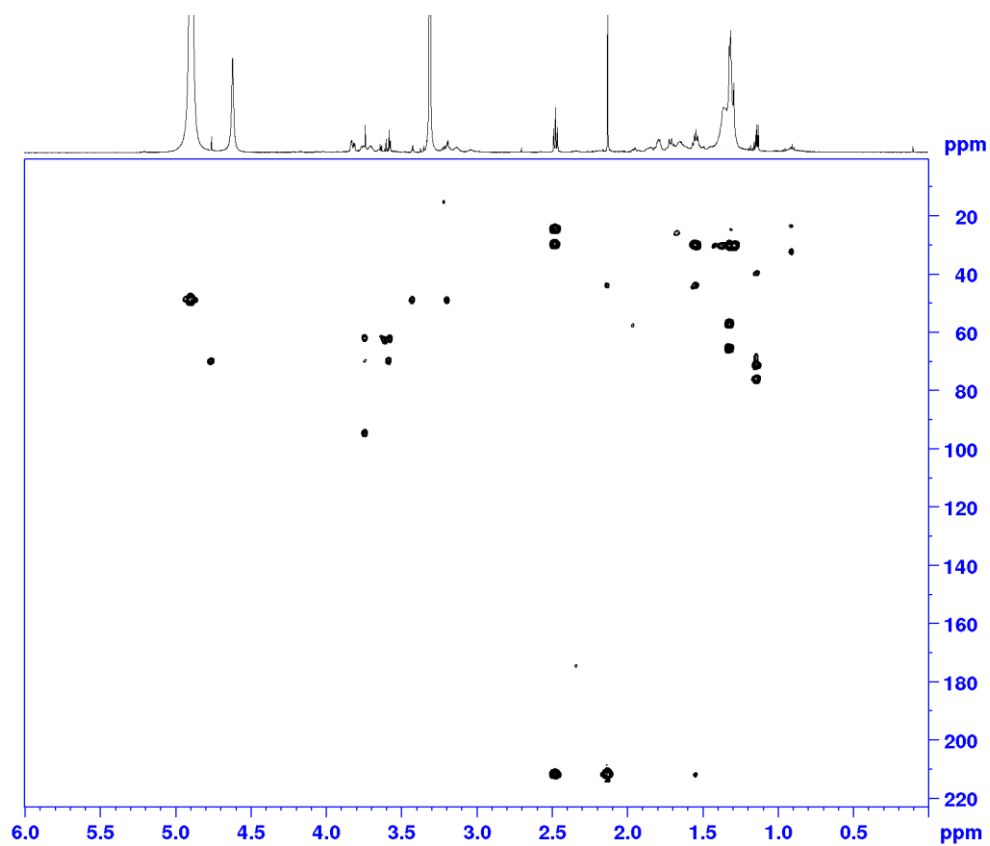


Figura A4 - Espectro de HMBC (600,13 MHz, CD₃OD) do composto **07**.



APÊNDICE B – Dados espectroscópicos de RMN (Tabela B1) e espectros de RMN de ^1H , ^{13}C , HSQC e HMBC do composto **17**.

Tabela B1. Dados espectroscópicos de RMN do metabólito **17** (600 MHz, CD_3OD).

Posição	δ_{C} , tipo	δ_{H} , <i>mult.</i> ($J = \text{Hz}$)	HMBC
2	58,5, CH	3,24, <i>quart</i> (6,5; 12,8)	C-7
3	66,1, CH	3,82, <i>m</i>	C-5, C-6, C-7
4	31,2, CH_2	1,96, <i>m</i> 1,73, <i>m</i>	C-2, C-3, C-7
5	23,7, CH_2	1,77, <i>m</i>	
6	57,3, CH	3,05, <i>m</i>	
7	16,0, CH_3	1,30, <i>d</i> (6,5)	C-2, C-6
1'	34,8, CH_3	1,68, <i>m</i> 1,55, <i>m</i>	
2'	26,3, CH_2	1,40, <i>m</i>	
3'	30,6, CH_2	1,27, <i>sl</i>	
4'	30,5, CH_2	1,27, <i>sl</i>	
5'	30,5, CH_2	1,27, <i>sl</i>	
6'	30,4, CH_2	1,27, <i>sl</i>	
7'	30,4, CH_2	1,27, <i>sl</i>	
8'	30,2, CH_2	1,27, <i>sl</i>	
9'	24,8, CH_2	1,53, <i>m</i>	C-10', C-11'
10'	44,3, CH_2	2,47, <i>t</i> (7,4; 14,8)	C-9', C-11'
11'	212,3, C		
12'	29,8, CH_3	2,13, <i>s</i>	C-10', C-11'

Figura B1 - Espectro de RMN de ^1H (600,13 MHz, CD_3OD) do composto **17**.

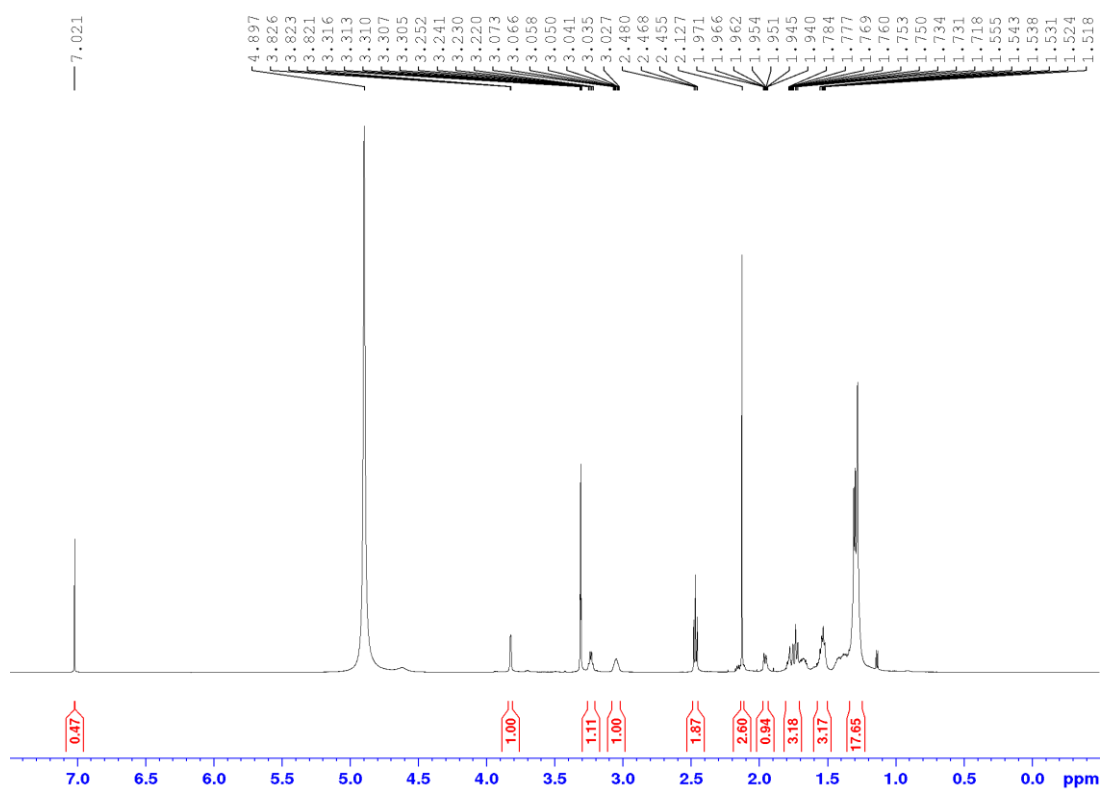


Figura B2 - Espectro de ^{13}C (150,9 MHz, CD_3OD) do composto **17**.

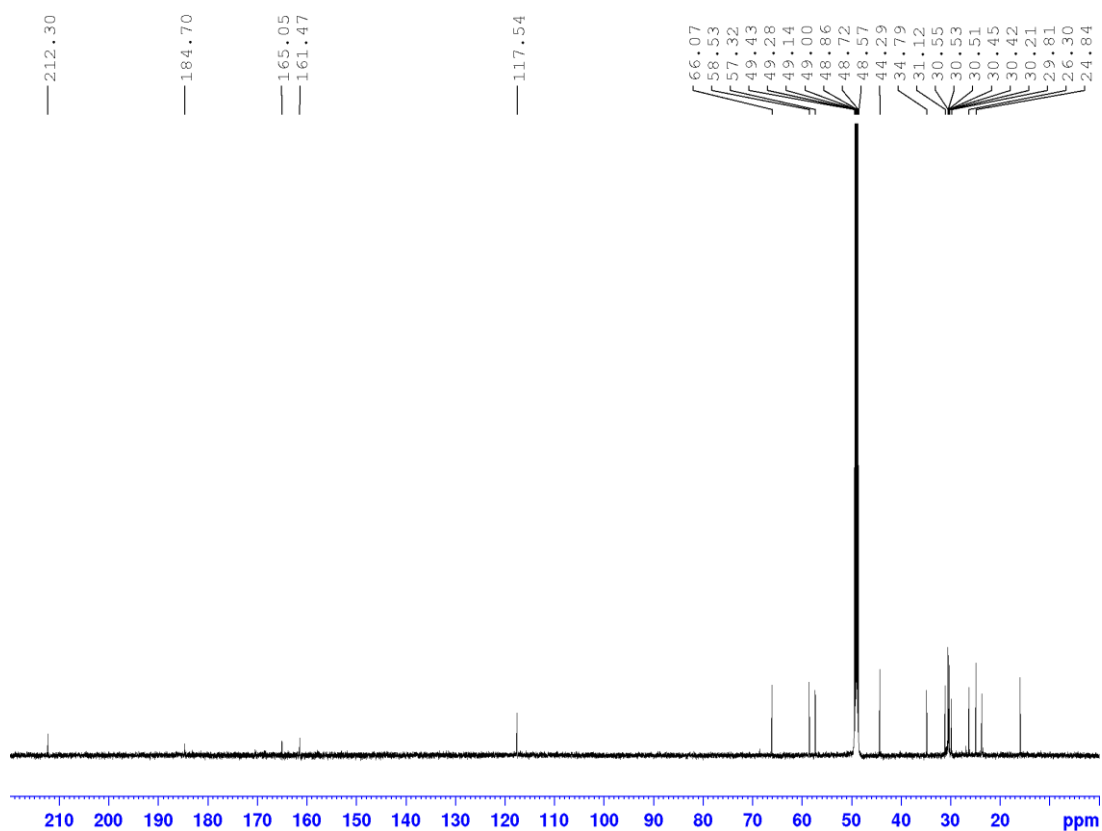


Figura B3 - Espectro de HSQC (600,13 MHz, CD₃OD) do composto **17**.

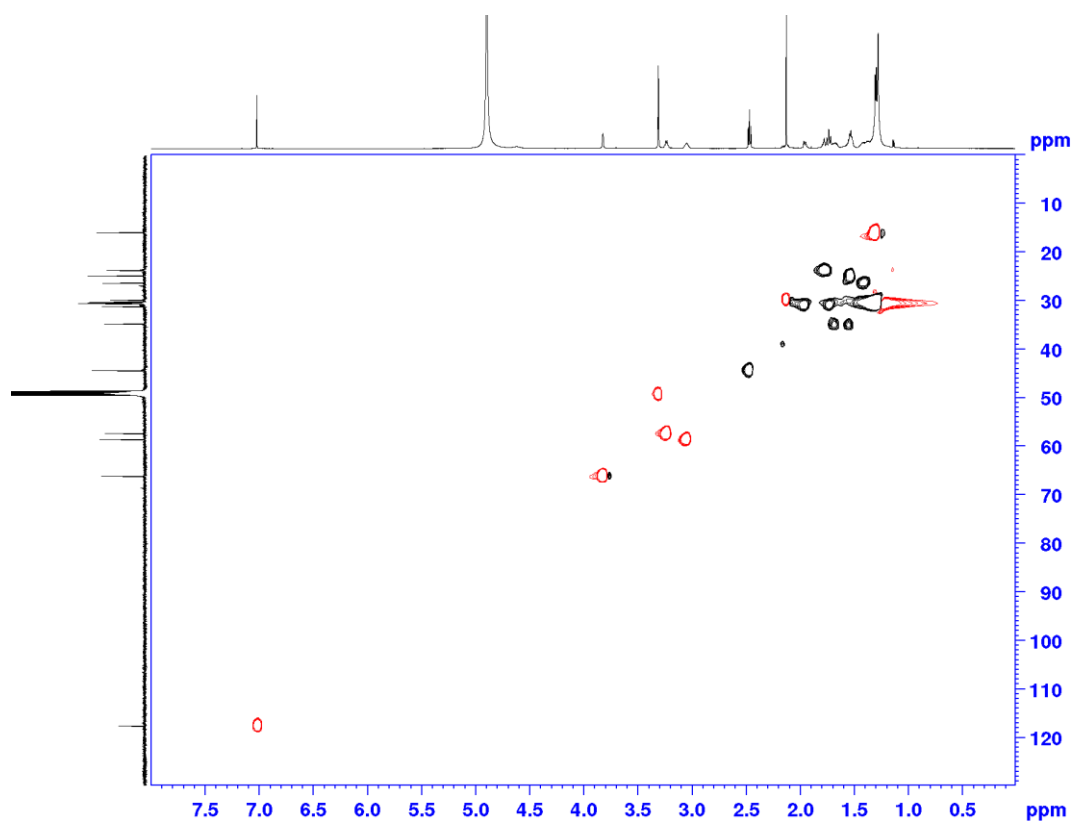
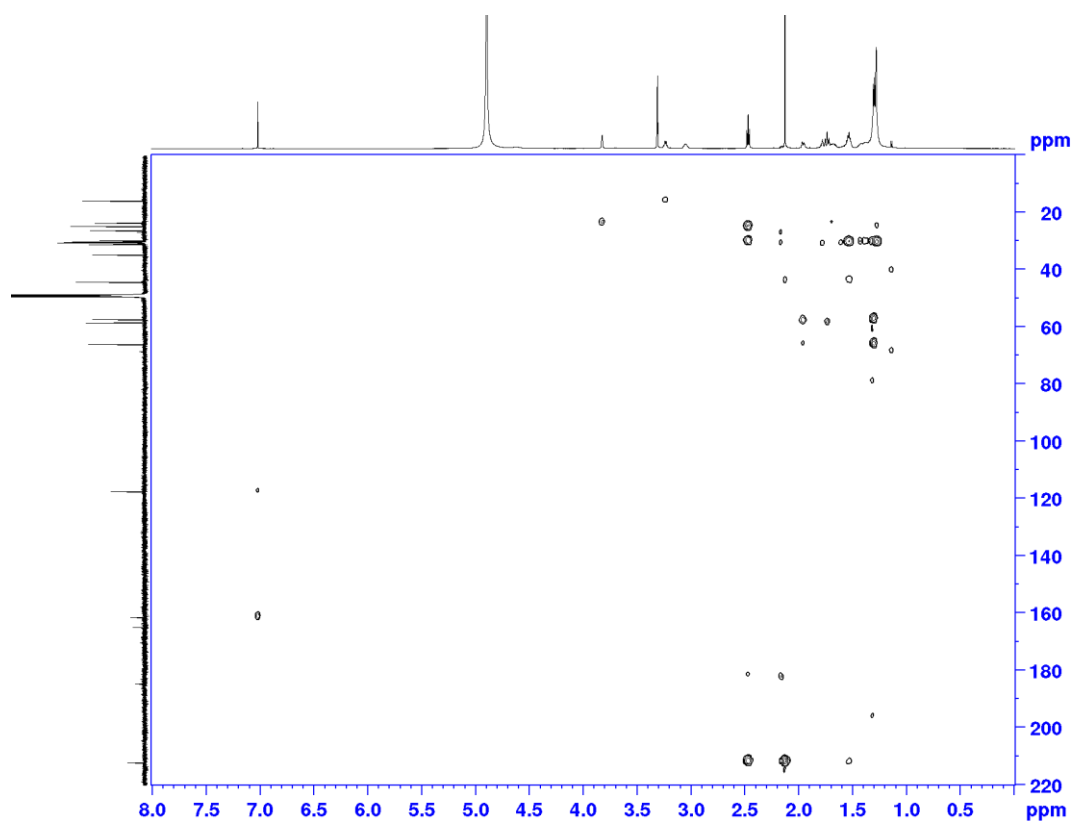


Figura B4 - Espectro de HMBC (600,13 MHz, CD₃OD) do composto **17**.



APÊNDICE C – Dados espectroscópicos de RMN (Tabela A3) e espectros de RMN de ^1H , ^{13}C , HSQC e HMBC do composto **30**.

Figura C1 - Dados espectroscópicos de RMN do metabólito **30** (600 MHz, CDCl_3).

Posição	δ_{C}	δ_{H} , <i>mult.</i> ($J = \text{Hz}$)	HMBC
1	38,7, CH_2	1,68, <i>m</i> ; 0,91, <i>m</i>	
2	27,4, CH_2	1,62, <i>m</i>	
3	79,1, CH	3,19, <i>m</i>	C-23; C-24
4	38,9, C		
5	55,4, CH	0,70, <i>m</i>	
6	18,3, CH_2	1,58, <i>m</i> ; 1,39, <i>m</i>	
7	34,3, CH_2	1,40, <i>m</i>	
8	40,7, C		
9	50,5, CH	1,28, <i>m</i>	
10	37,1, C		
11	20,9, CH_2	1,28, <i>m</i> ; 1,44, <i>m</i>	
12	25,5, CH_2	1,70, <i>m</i> ; 1,73, <i>m</i>	
13	38,4, CH	2,21, <i>m</i>	
14	42,4, C		
15	30,52 CH_2	1,99, <i>m</i> ; 1,39, <i>m</i>	
16	32,2, CH_2	2,28, <i>m</i> ; 1,46, <i>m</i>	
17	56,3, C		
18	46,9, CH	3,02, <i>m</i>	
19	49,2, CH	3,00, <i>ddd</i> (4,56 Hz)	
20	150,4, C		
21	29,7, CH_2	1,22, <i>m</i> ; 1,29, <i>m</i>	
22	37,2, CH_2	1,49, <i>m</i>	
23	28,0, CH_3	0,97, <i>s</i>	C-24; C-4; C-5; C-3
24	15,4, CH_3	0,76, <i>s</i>	C-23; C-4; C-9; C-3
25	16,0, CH_3	0,82, <i>s</i>	C-1; C-9
26	16,1, CH_3	0,94, <i>s</i>	C-7; C-8; C-9
27	14,7, CH_3	0,98, <i>s</i>	C-14
28	180,5, C		
29	109,6, CH_2	4,75, <i>d</i> (1,8 Hz); 4,61, <i>t</i> (1,25 Hz)	C-18, C-30
30	19,4, CH_3	1,69, <i>s</i>	C-29, C-20, C-18

Figura C1 - Espectro de RMN de ^1H (600,13 MHz, CDCl_3) do composto **30**.

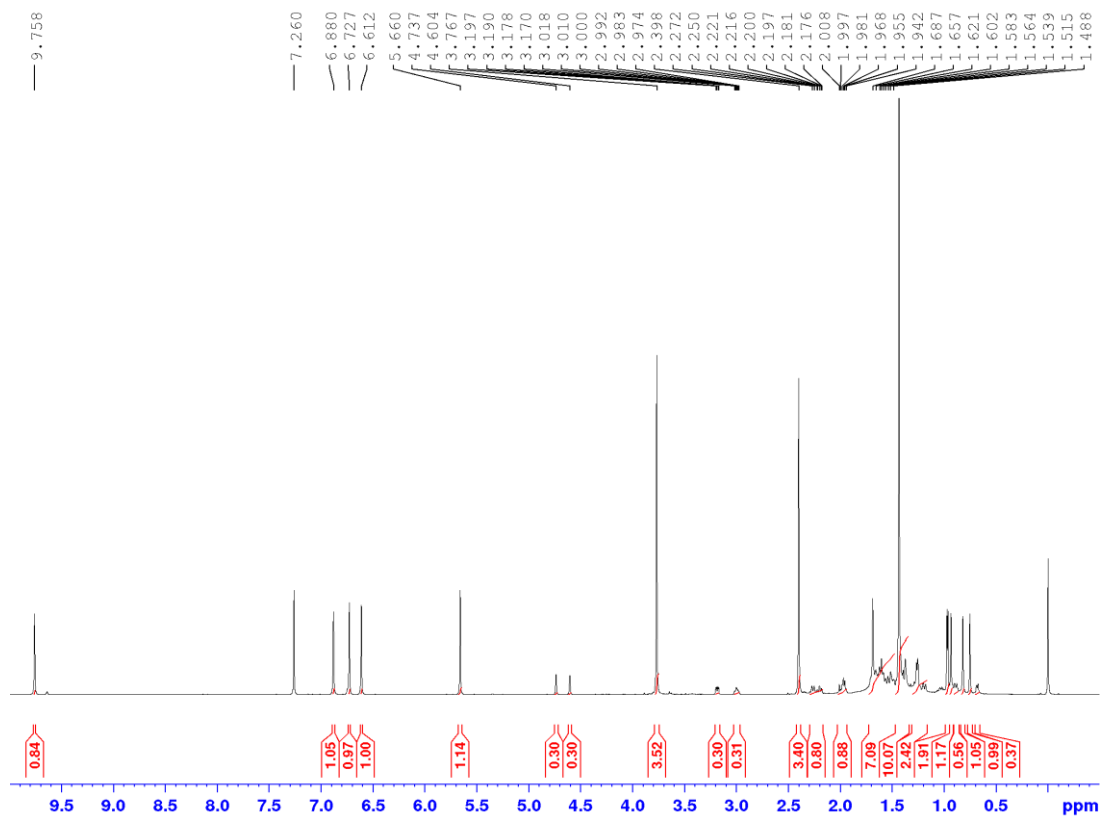


Figura C2. Espectro de RMN de ^{13}C (150,9 MHz, CDCl_3) do composto **30**.

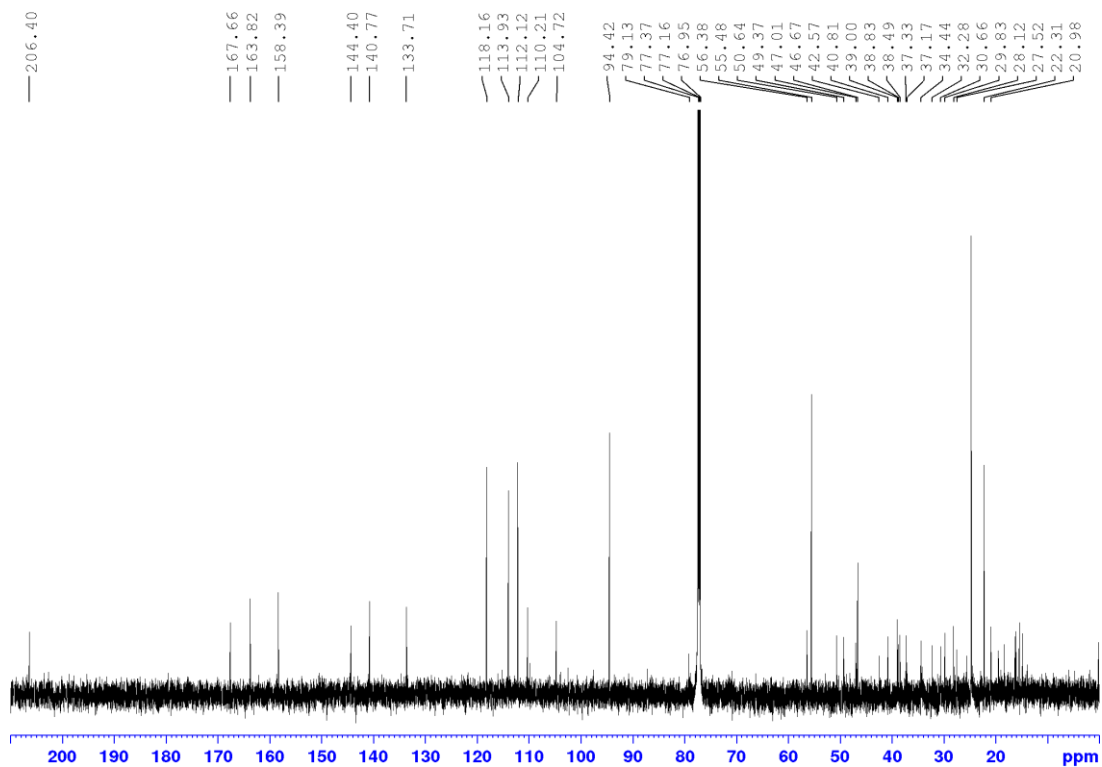


Figura C3 - Espectro de RMN de DEPT-135 (150,9 MHz, CDCl_3) do composto **30**.

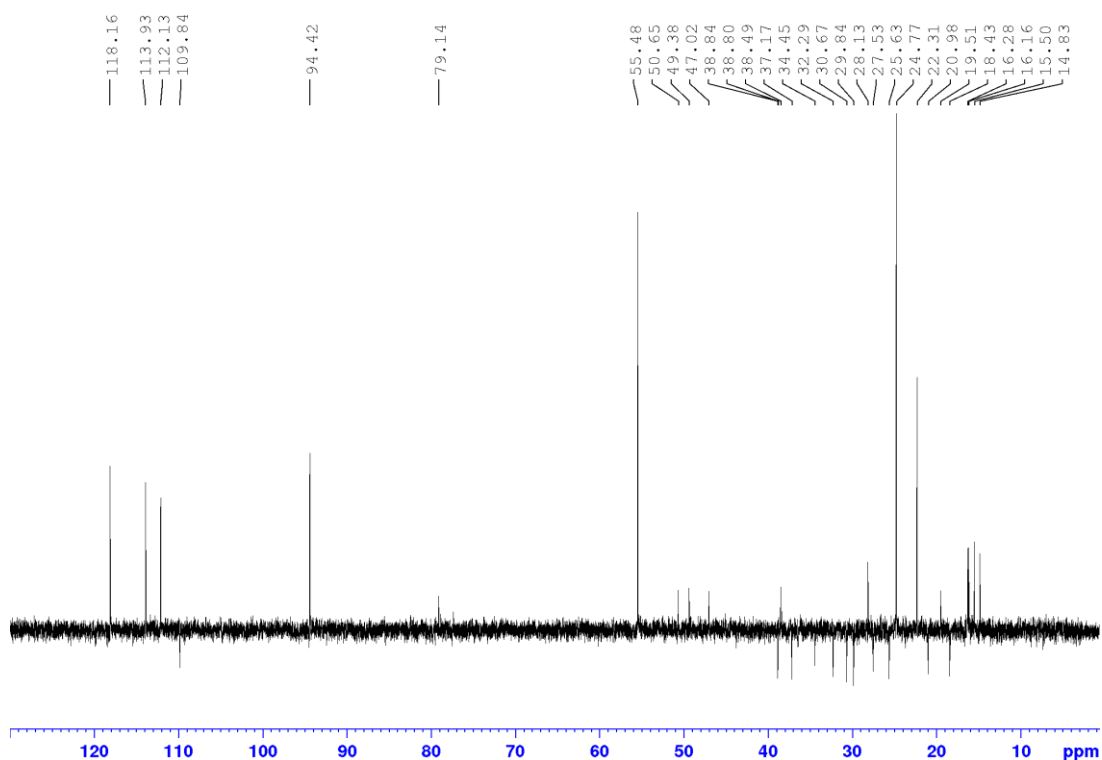


Figura C4 - Espectro de HSQC (600,13 MHz, CDCl_3) do composto **30**.

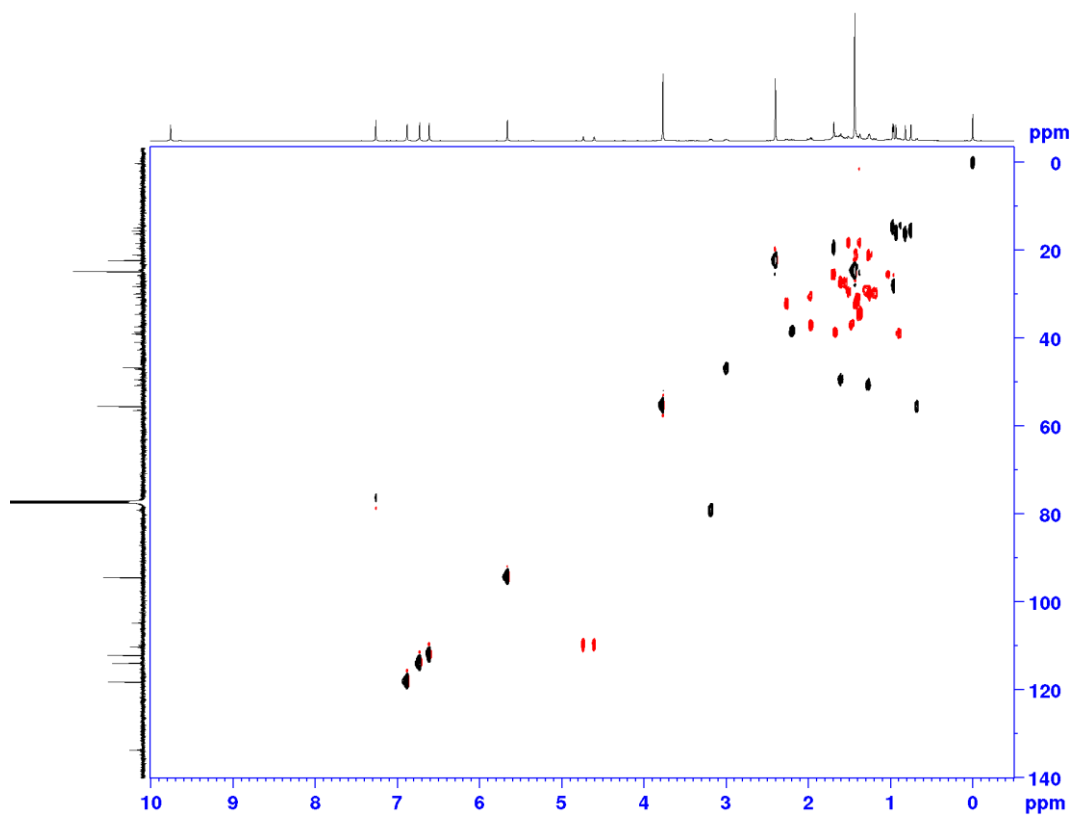
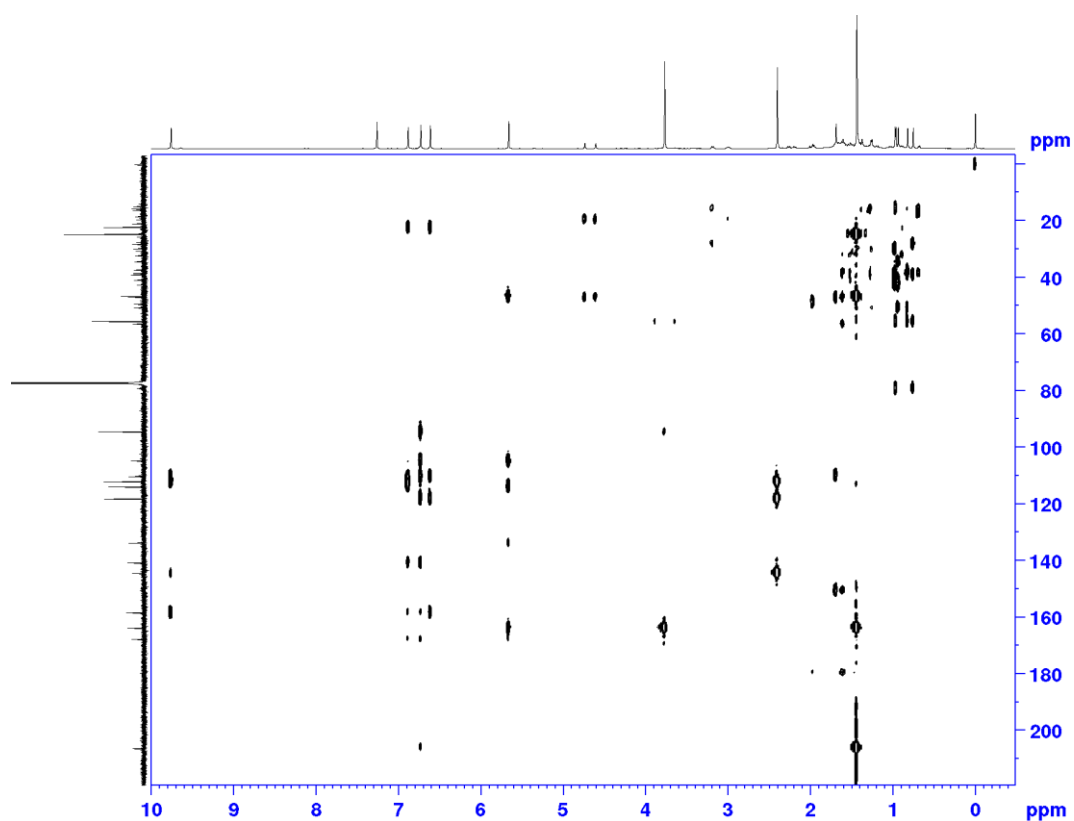


Figura C5 - Espectro de HMBC (600,13 MHz, CDCl_3) do composto **30**.



APÊNDICE D – Dados espectroscópicos de RMN (Tabela D1) e espectros de RMN de ^1H , ^{13}C , HSQC e HMBC do composto **31**.

Figura D1 - Espectro de RMN de ^1H (600,13 MHz, CDCl_3) do composto **31**.

Posição	δ_{C}	δ_{H} , <i>mult.</i> ($J = \text{Hz}$)	HMBC
1	177,9, C		
2	35,0, CH_2	2,27, <i>t</i> (7,1; 14,1)	C-1
3	26,1, CH_2	1,60, <i>quint</i> (7,1; 14,1)	C-1, C-2
4	30,3, CH_2	1,29, <i>sl</i>	
5	30,4, CH	1,29, <i>sl</i>	
6	30,5, CH_2	1,29, <i>sl</i>	
7	30,6, CH_2	1,29, <i>sl</i>	
8	30,7, CH_2	1,29, <i>sl</i>	
9	30,8, CH_2	1,29, <i>sl</i>	
10	30,8, CH_2	1,29, <i>sl</i>	
11	30,8, CH_2	1,29, <i>sl</i>	
12	33,1, CH_2	1,29, <i>sl</i>	
13	23,74, CH_2	1,33, <i>m</i>	
14	14,5, CH_3	0,90, <i>t</i> (7,2)	C-12, C-13

Figura D1 - Espectro de RMN de ^1H (600,13 MHz, CDCl_3) do composto **31**.

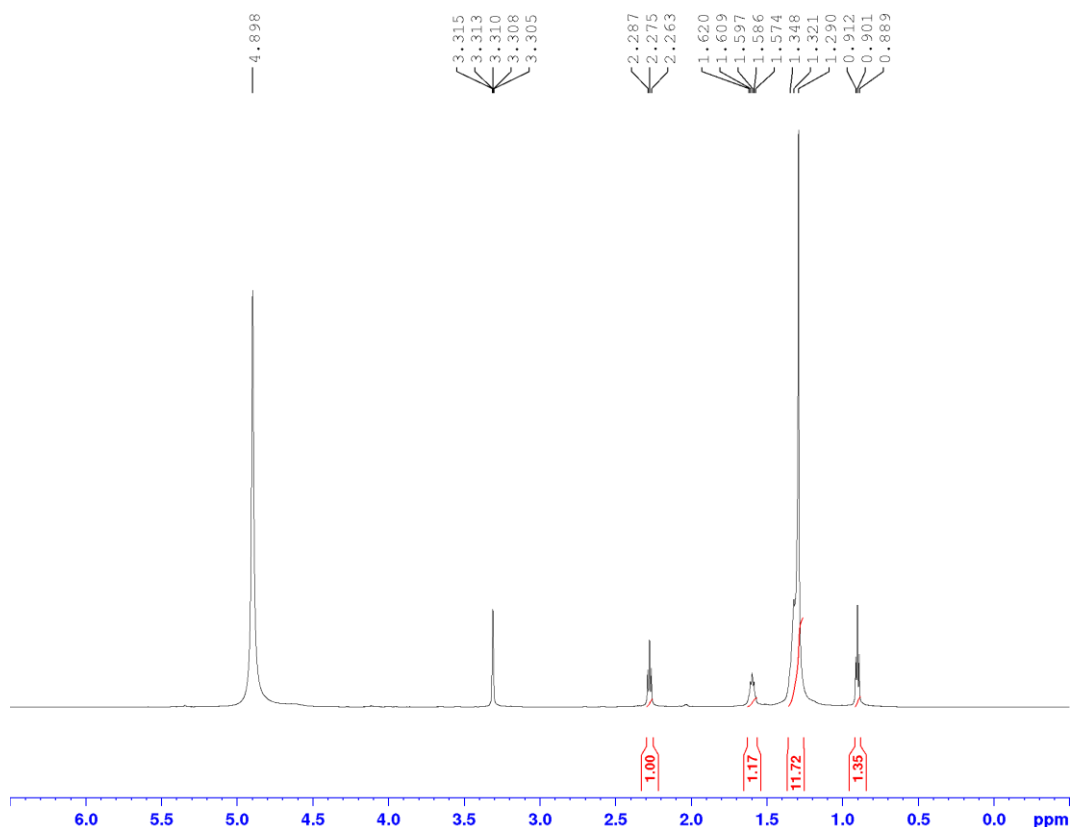


Figura D2. Espectro de RMN de ^{13}C (150,9 MHz, CDCl_3) do composto **31**.

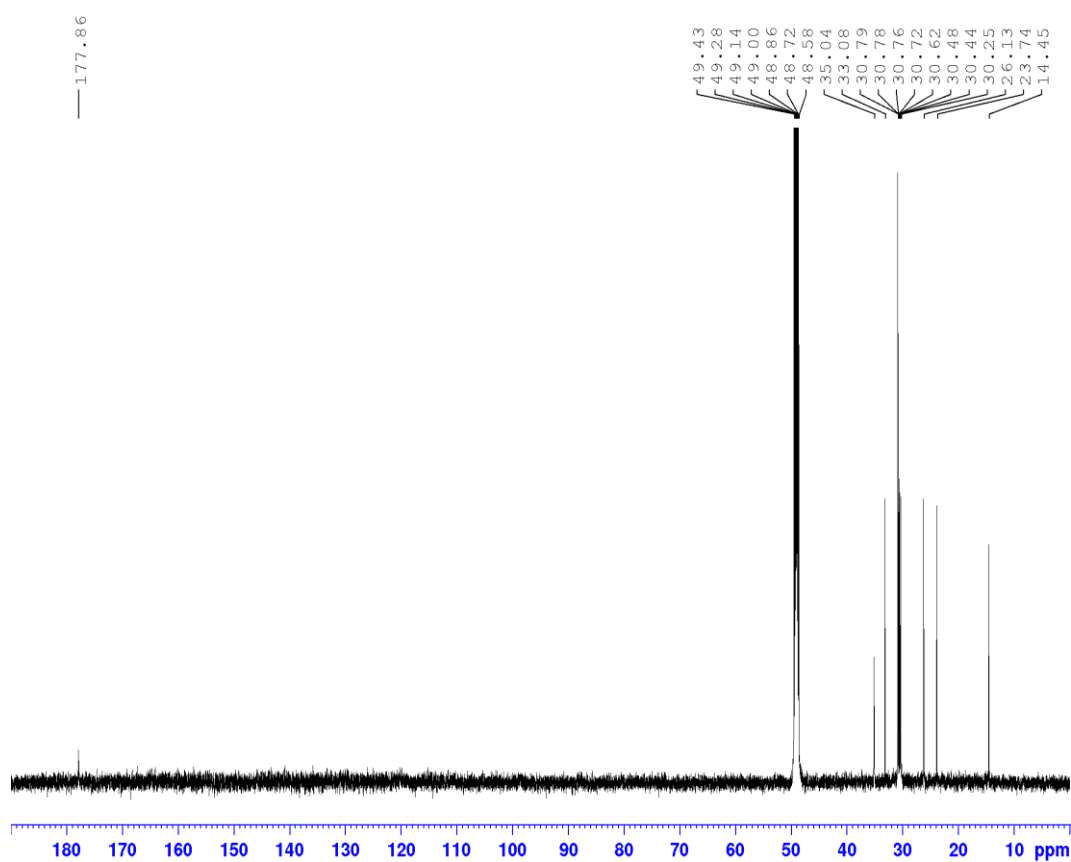


Figura D3 - Espectro de HSQC (600,13 MHz, CDCl_3) do composto **31**.

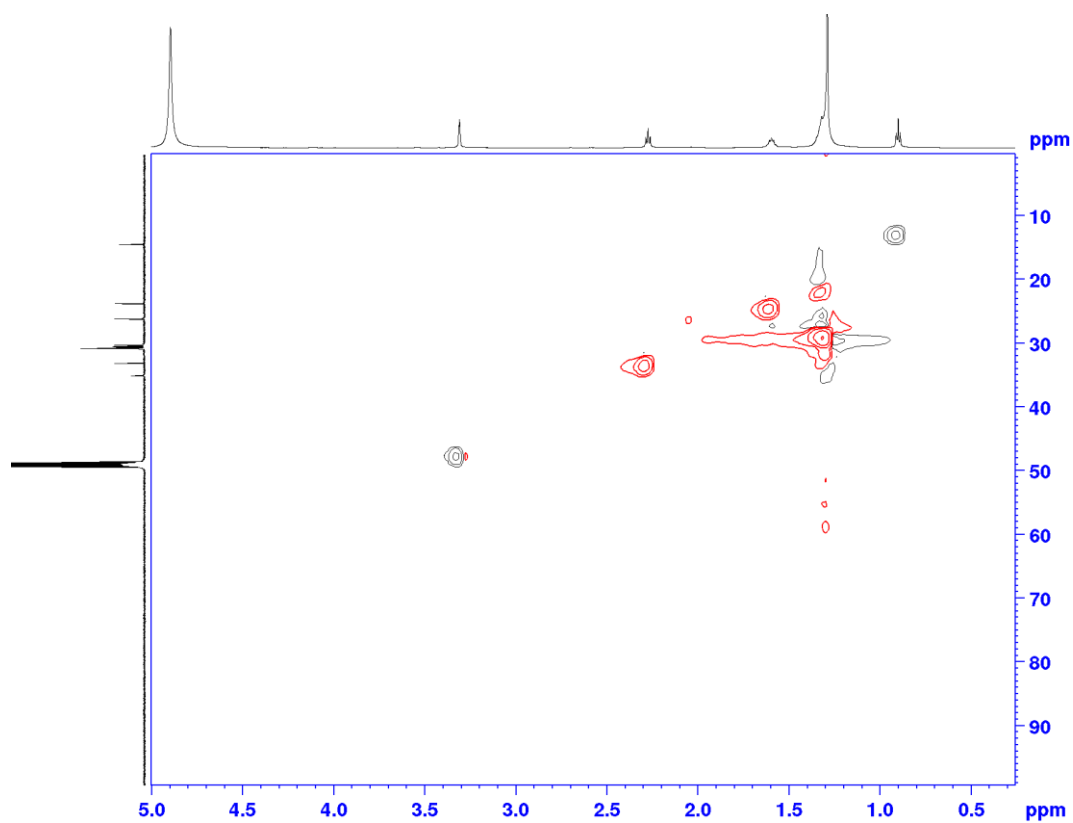
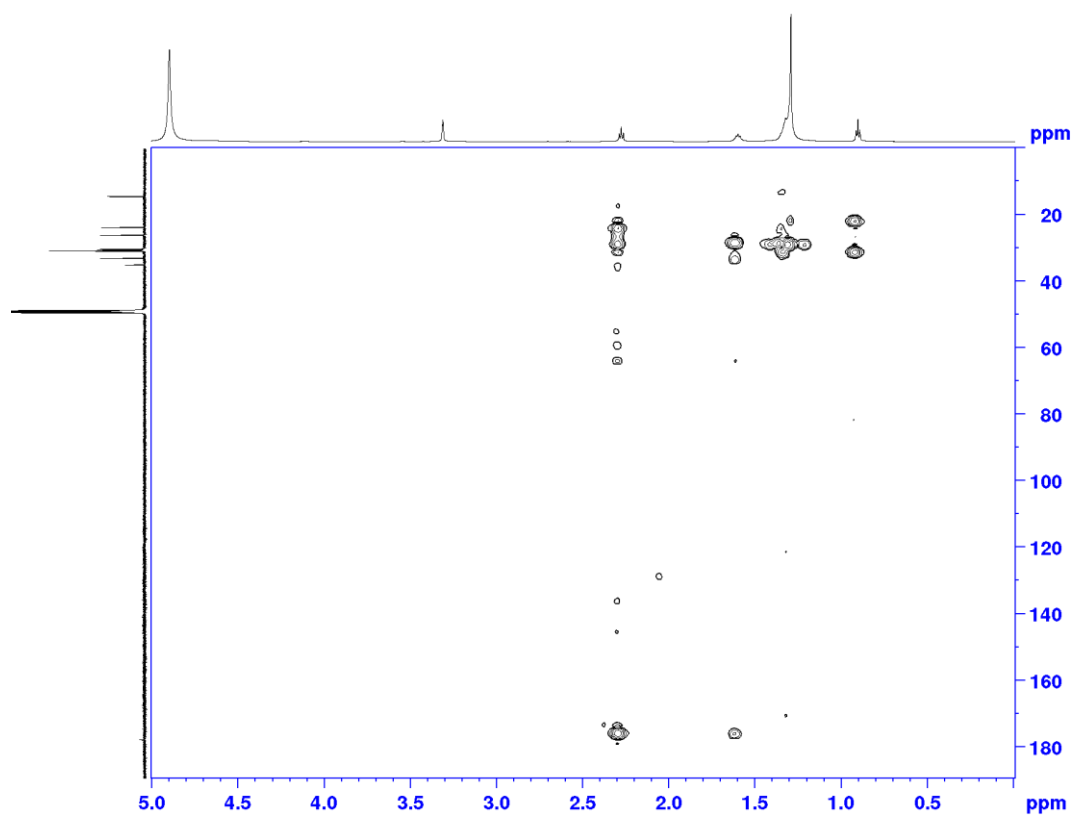


Figura D4 - Espectro de HMBC (600,13 MHz, CDCl_3) do composto **31**.



APÊNDICE E - Dados espectroscópicos de RMN (Tabela E1) e espectros de massas e RMN de ^1H , ^{13}C , DEPT-135, HSQC e HMBC do composto **54**.

Tabela E1 - Dados espectroscópicos de RMN do composto **54** (600 MHz, CD_3OD).

Posição	δ_{C} , tipo	δ_{H} , mult. ($J = \text{Hz}$)	HMBC
1	176,7, C		
2	55,8, CH	2,61, <i>m</i>	C-1, C-3, C-4, C-2'
3	71,0, CH	3,82, <i>m</i>	
4	36,0, CH_2	1,53, <i>m</i> 1,48, <i>m</i>	
5	27,1, CH_2	1,47, <i>m</i>	
6	28,0, CH_2	1,36, <i>m</i>	
7	37,9, CH	1,34, <i>m</i> 1,14, <i>m</i>	
8	32,1, CH	1,71, <i>m</i>	
9	50,0, CH_2	2,13, <i>dd</i> (5,7; 13,3) 1,87, <i>dd</i> (8,4; 13,3)	C-7, C-8, C-10, C-11, C-8'
10	142,4, C		
11	130,6, CH	5,76, <i>sl</i>	C-9, C-10, C-12, C-13, C-10'
12	155,7, C		
13	118,7, CH	5,65, <i>sl</i>	C-10, C-11, C-12, C-14, C-12'
14	170,5, C		
2'	61,6, CH_2	3,83, <i>m</i> 3,76, <i>dd</i> (5,5; 10,8)	C-1
8'	19,8, CH_3	0,86, <i>d</i> (6,6)	C-7, C-8, C-9
10'	18,5, CH_3	1,81, <i>d</i> (1,2)	C-9, C-10, C-11
12'	19,8, CH_3	2,20, <i>d</i> (1,1)	C-10, C-11, C-13

Figura 82 - Espectro de massas do composto **54** (modo positivo).

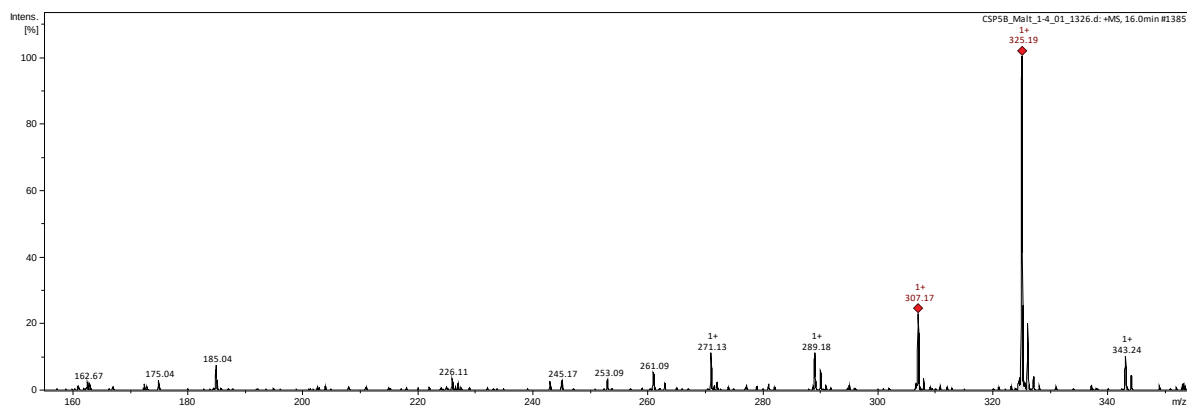


Figura 83 - Espectro de RMN de ^1H (600,13 MHz, CD_3OD) do composto **54**.

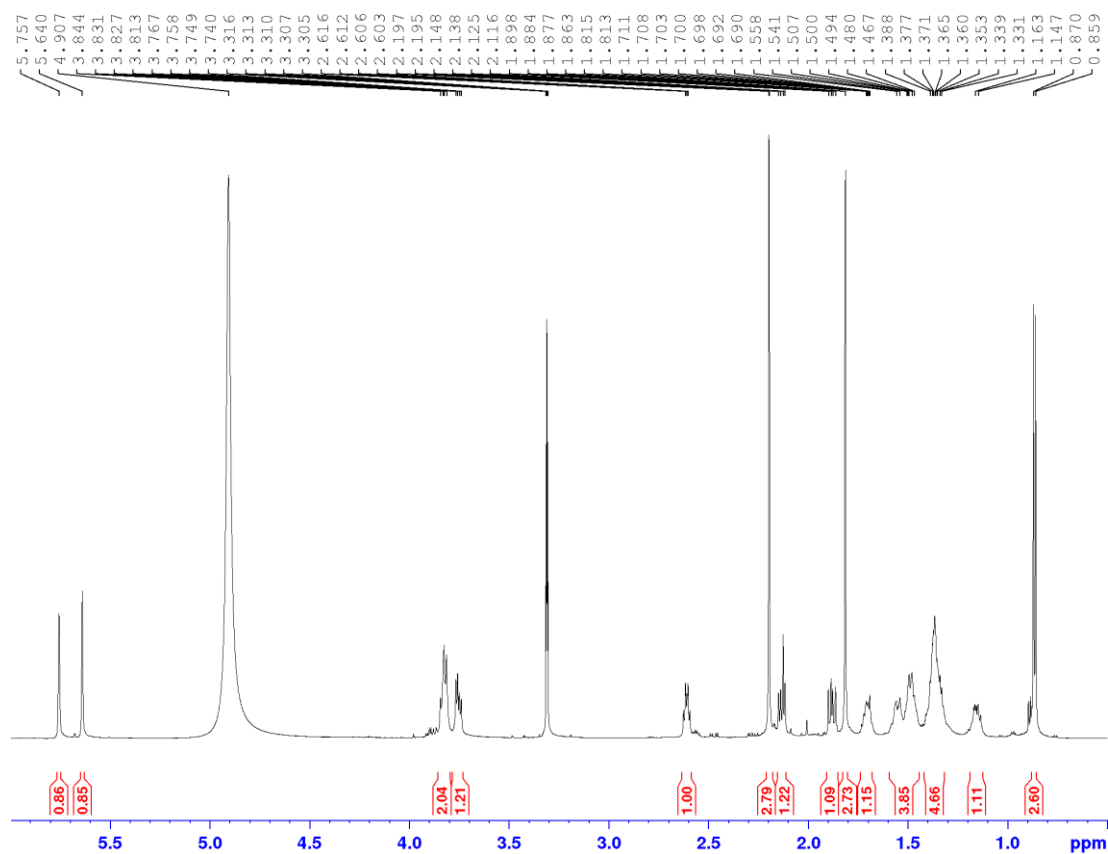


Figura 84 - Espectro de RMN de ^{13}C (150,9 MHz, CD_3OD) do composto **54**.

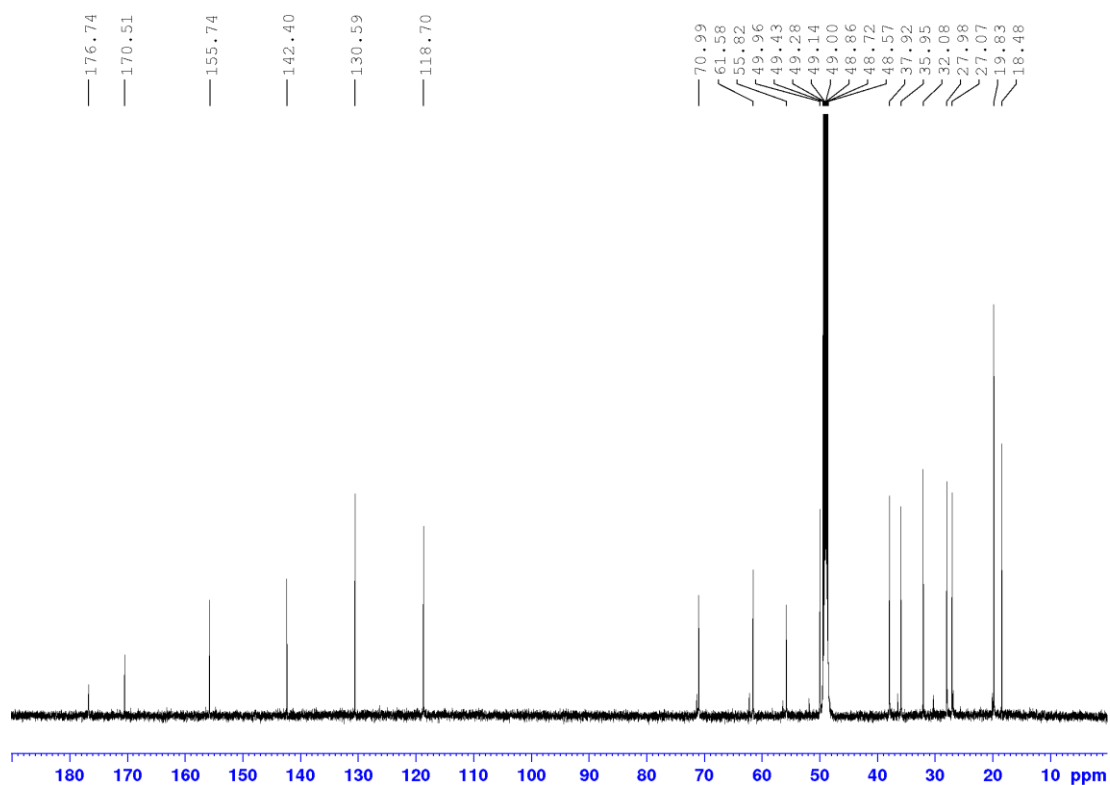


Figura E4 - Espectro de DEPT-135 (150,9 MHz, CD_3OD) do composto **54**.

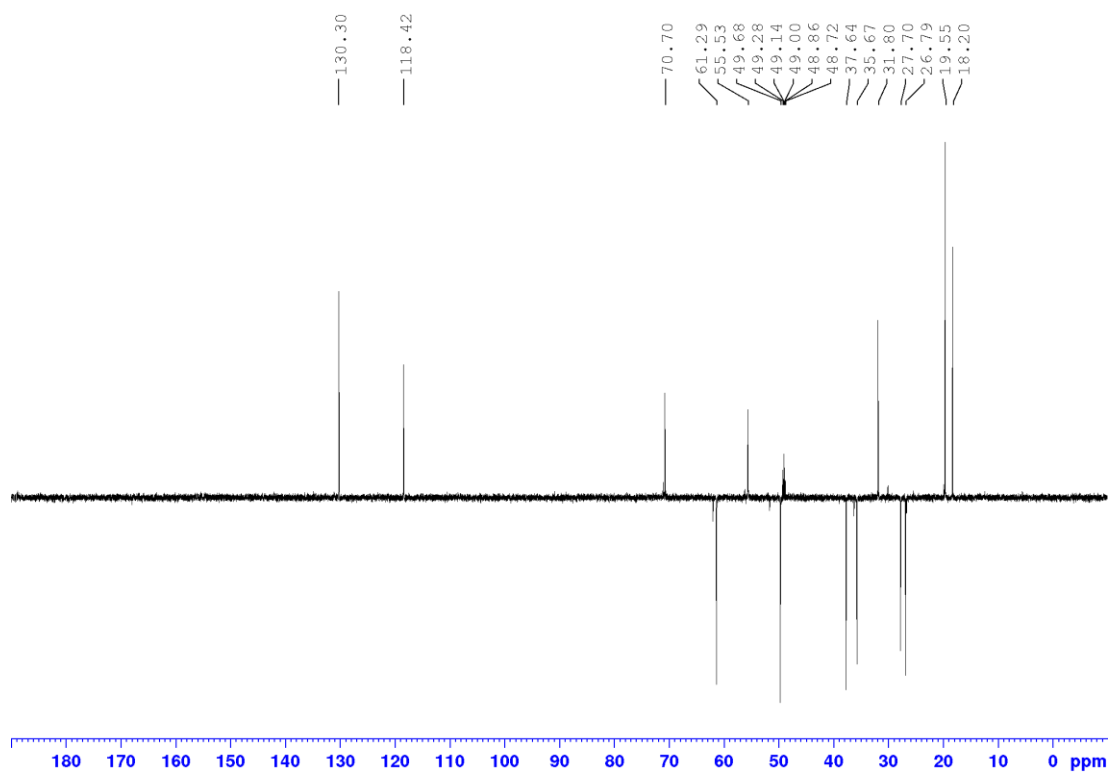


Figura E5 - Espectro de HSQC (600,13 MHz, CD₃OD) do composto **54**.

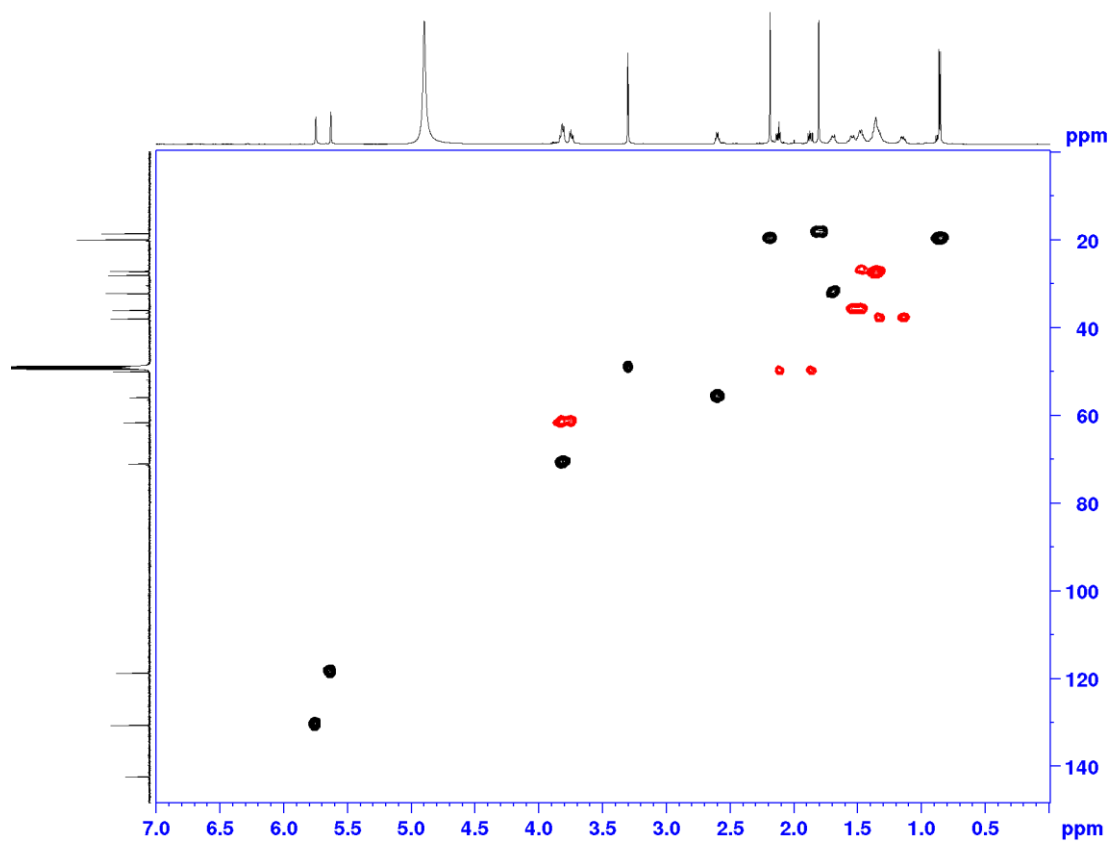
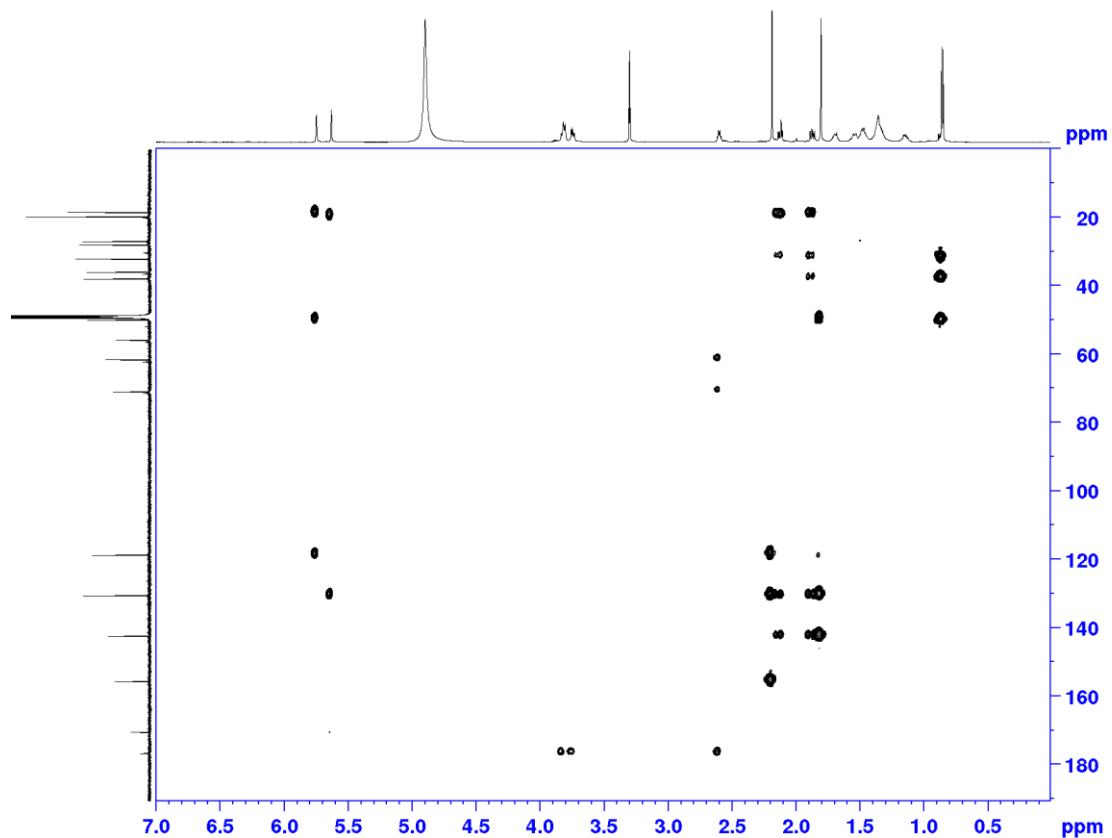


Figura E6 - Espectro de HMBC (600,13 MHz, CD₃OD) do composto **54**.



APÊNDICE F - Dados espectroscópicos de RMN e espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **79**.

Figura F1 - Espectro de RMN de ^1H (600,13 MHz, CD_3OD) do composto **79**.

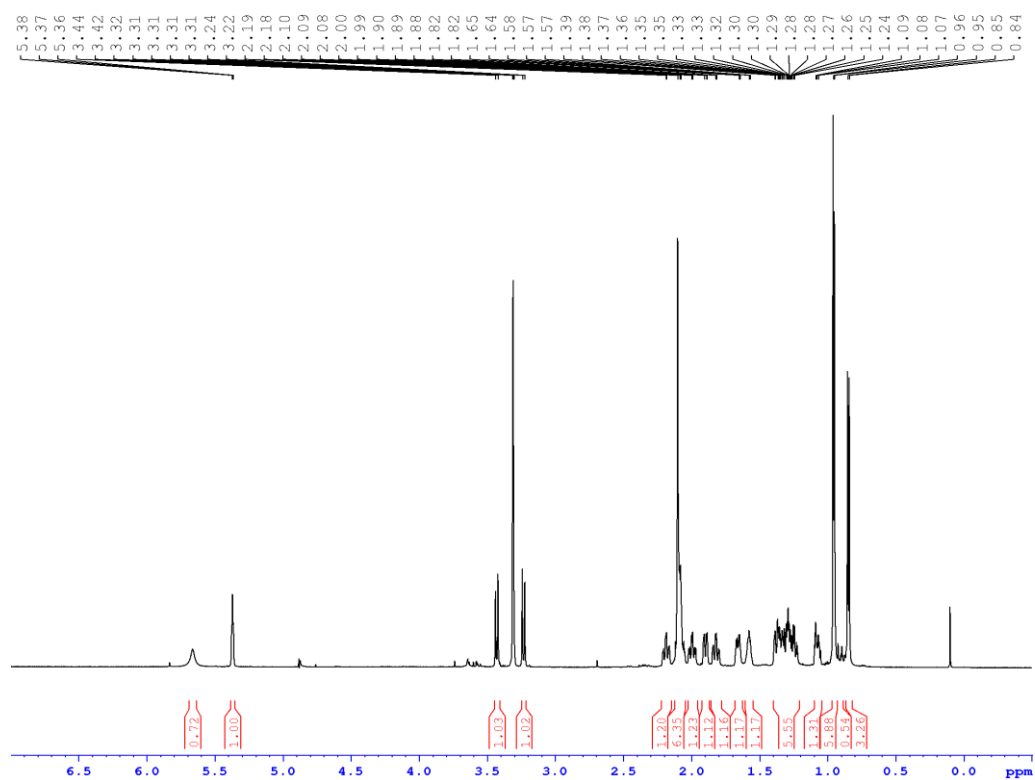
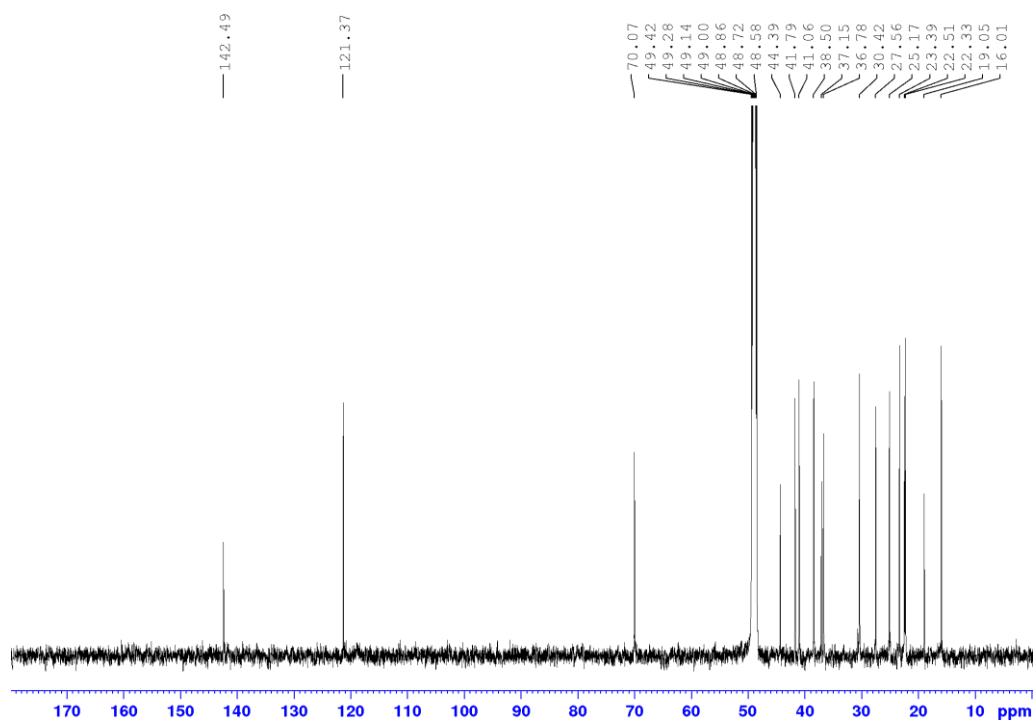


Figura F2 - Espectro de RMN de ^{13}C (150,9 MHz, CD_3OD) do composto **79**.



APÊNDICE G: Espectros de massas, RMN de ^1H , HSQC e HMBC e EM-IES do composto **80**.

Figura G1 - Espectro de massas de alta resolução do composto **80** (modo negativo).

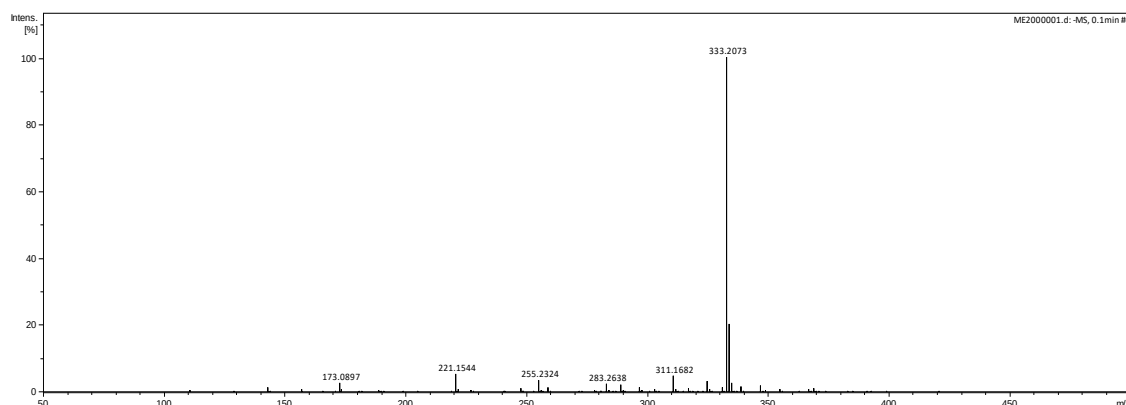


Figura G2 - Espectro de RMN de ^1H (600,13 MHz, CDCl_3) do composto **80**.

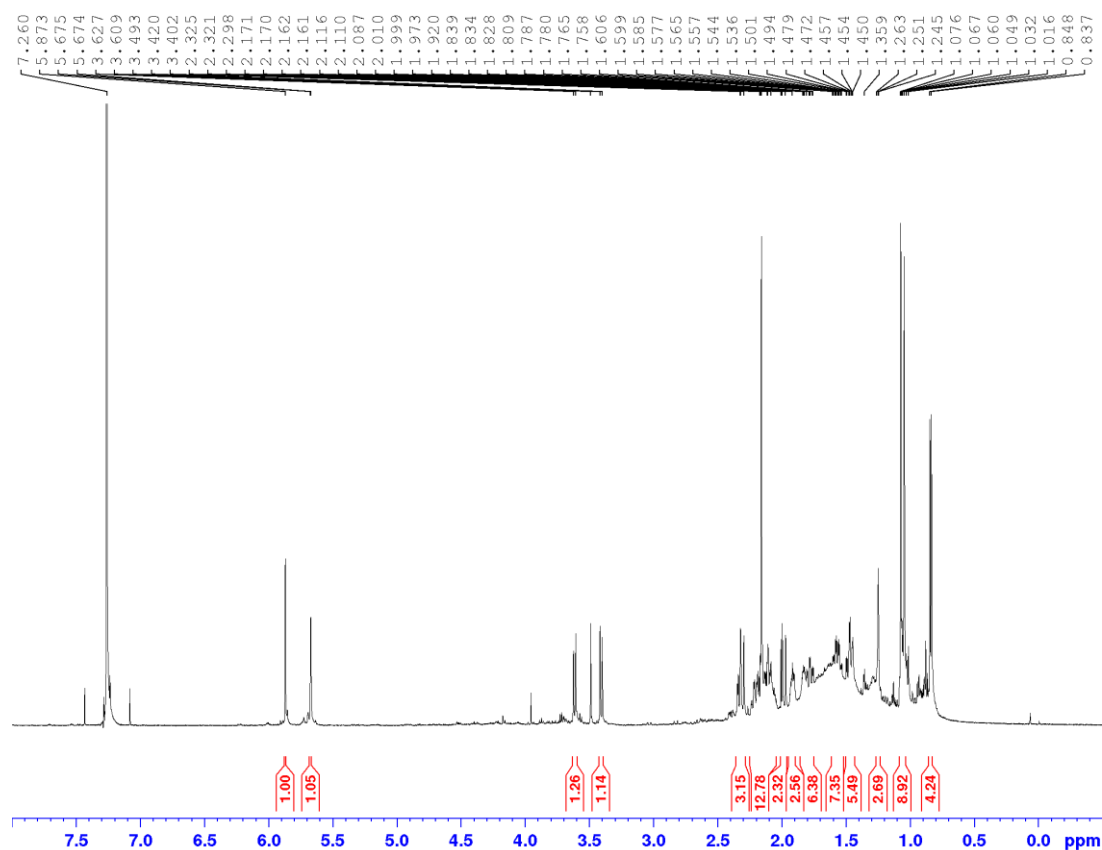


Figura G3 - Espectro de HSQC (600,13 MHz, CDCl_3) do composto **80**.

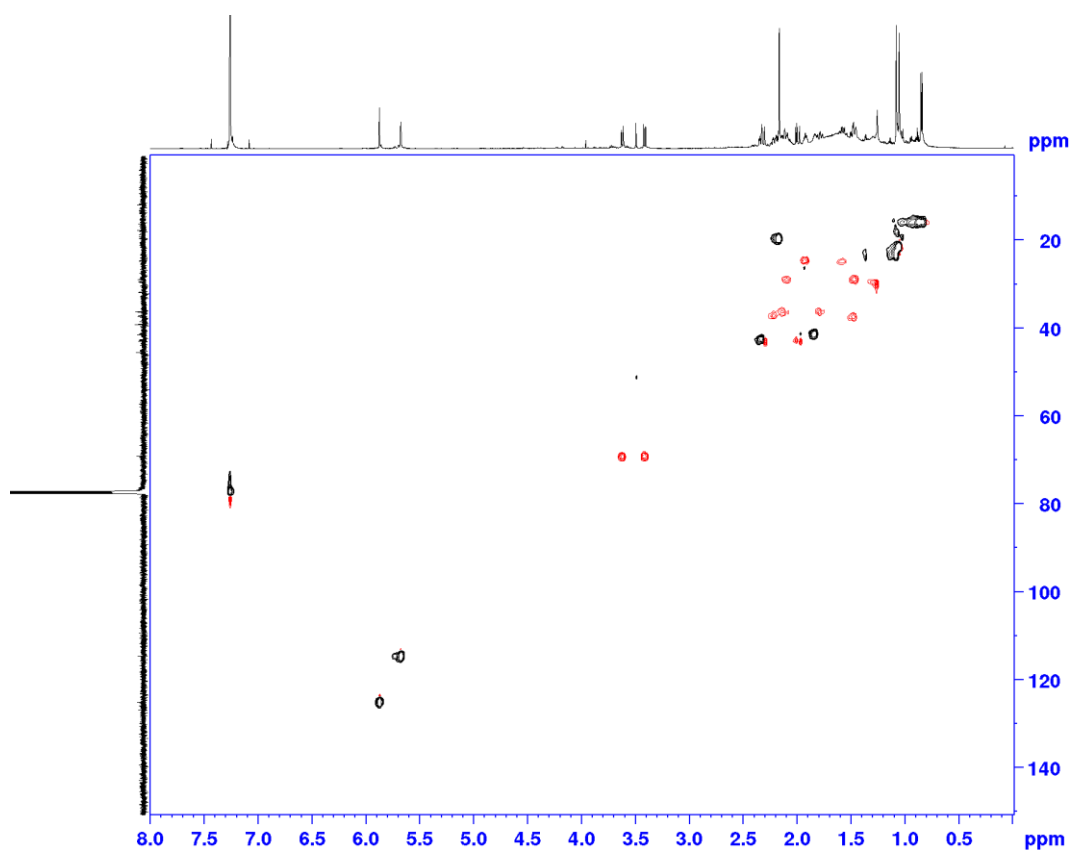
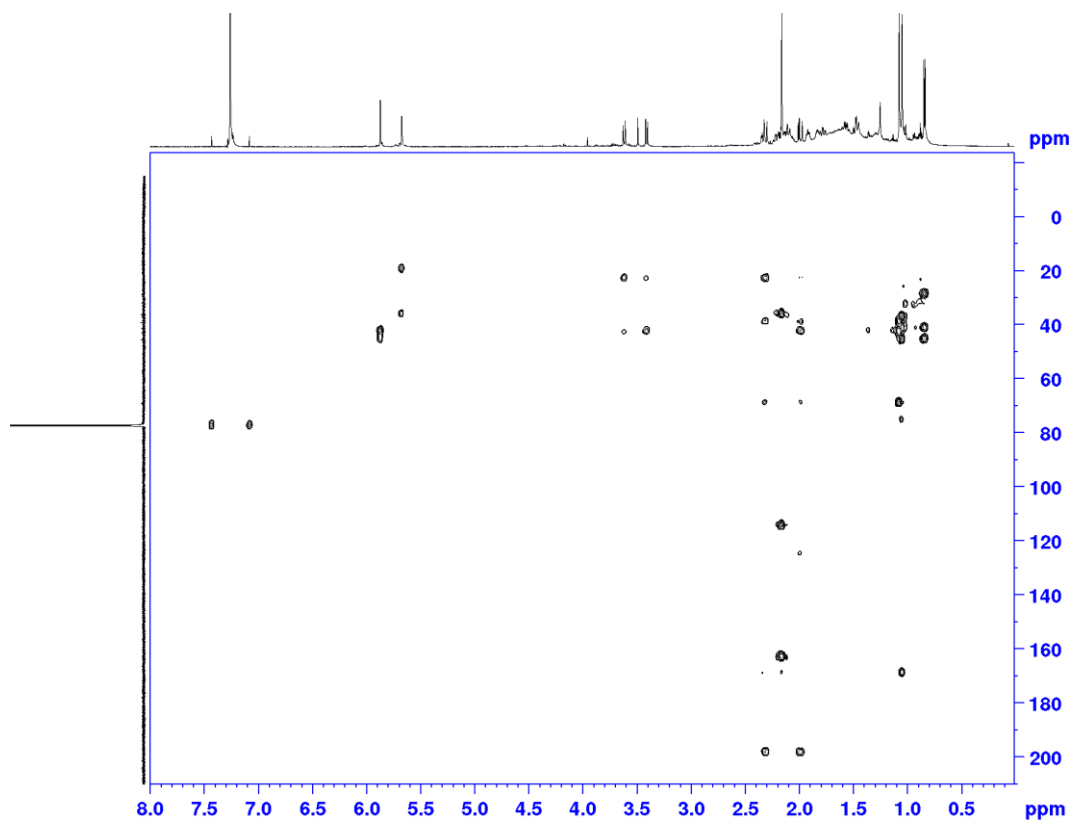


Figura G4 - Espectro de HMBC (600,13 MHz, CDCl_3) do composto **80**.



APÊNDICE H: Espectros de massas, RMN de ^1H , ^{13}C , HSQC e HMBC do composto **83**.

Figura H1 - Espectro de massas de alta resolução do composto **83** (modo negativo).

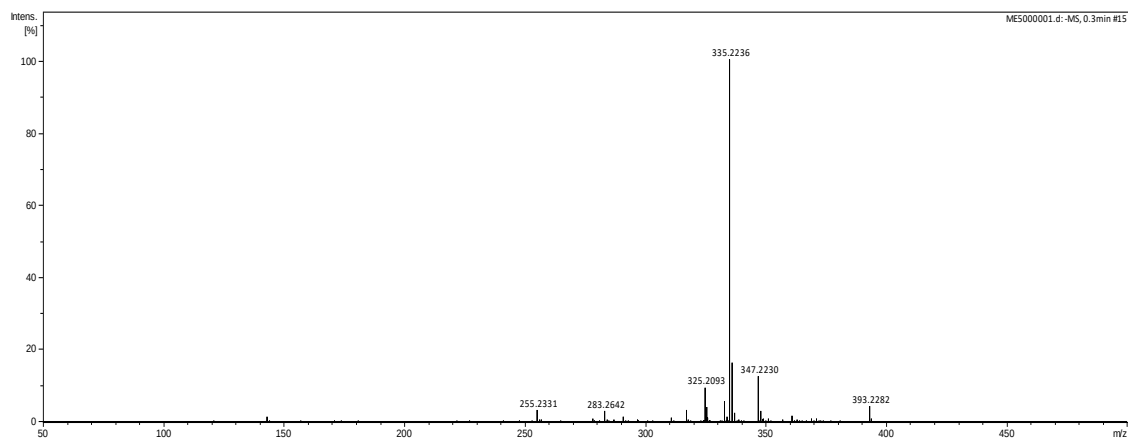


Figura H2 - Espectro de RMN de ^1H (600,13 MHz, CDCl_3) do composto **83**.

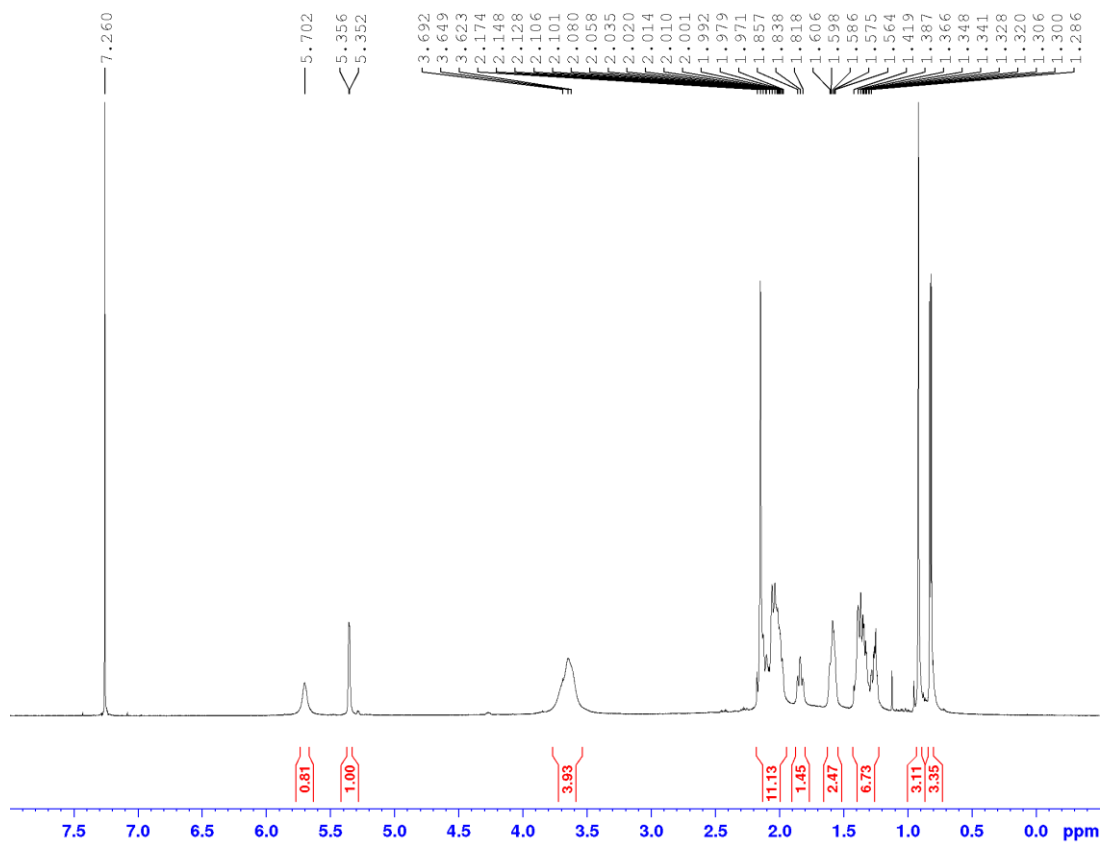


Figura H3 - Espectro de RMN de ^{13}C (150,9 MHz, CDCl_3) do composto **83**.

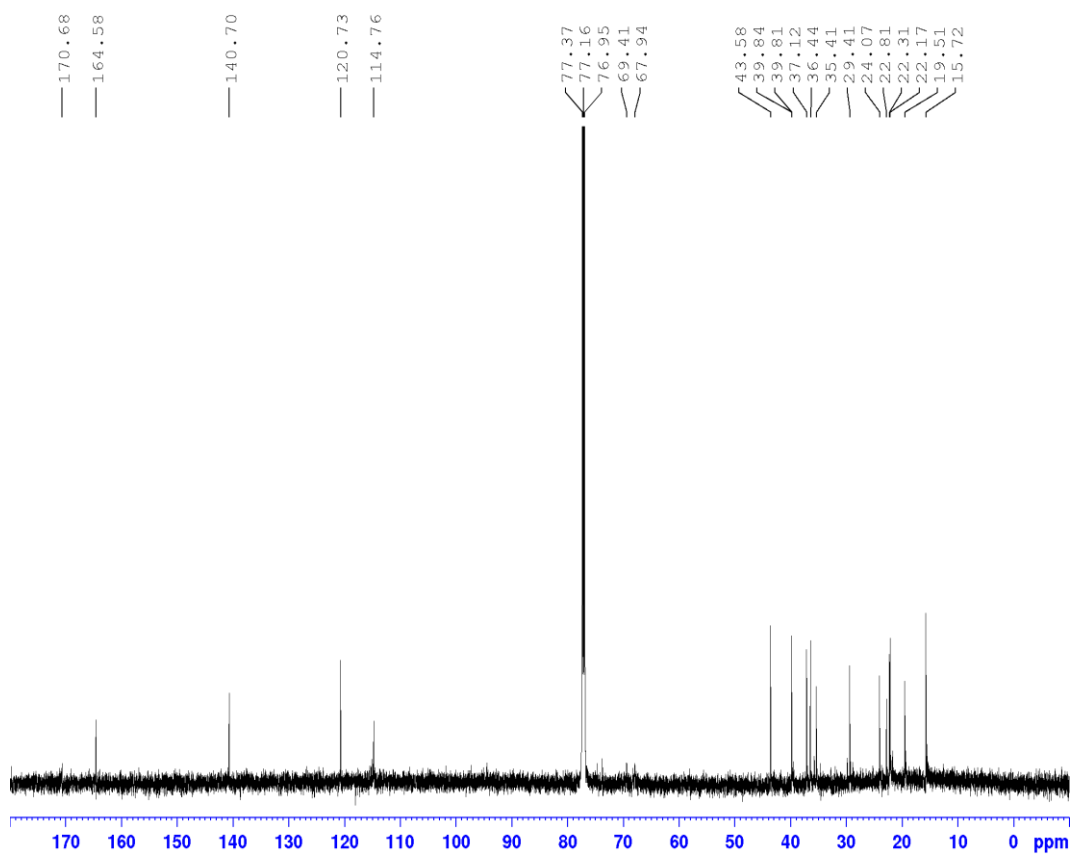


Figura H4 - Espectro de HSQC (600,13 MHz, CDCl_3) do composto **83**.

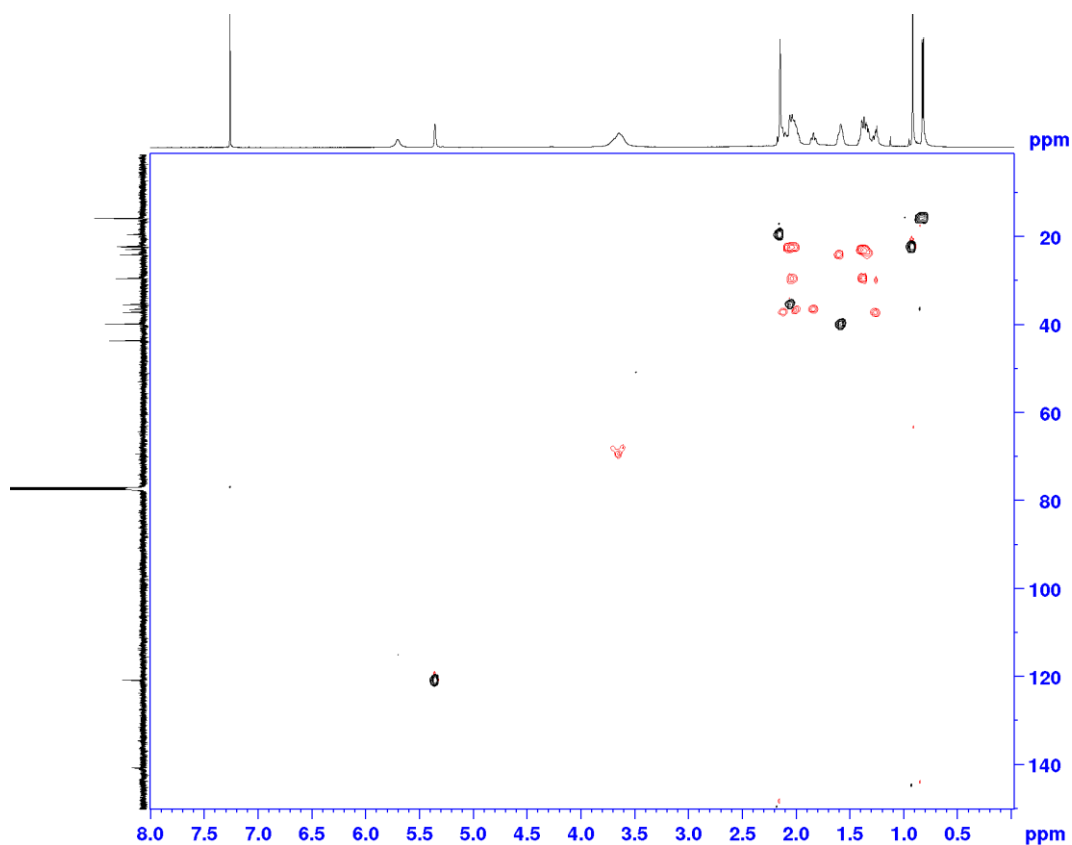
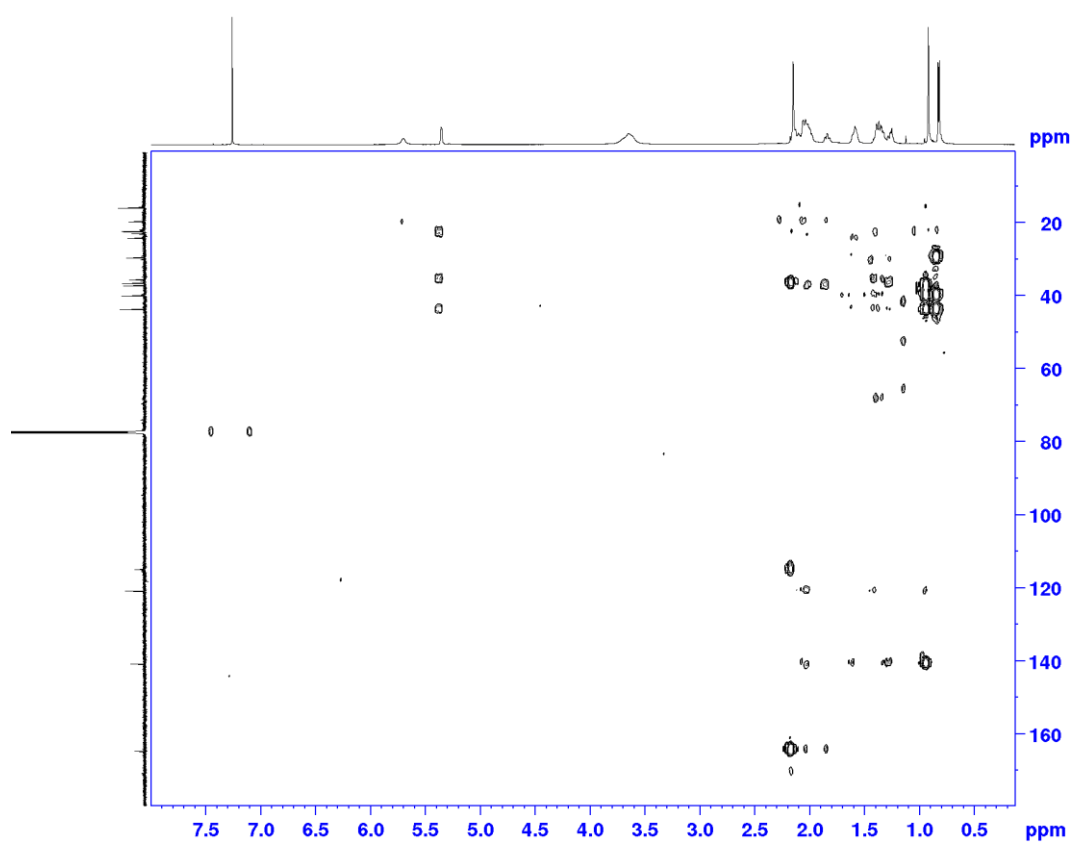


Figura H5 - Espectro de HMBC (600,13 MHz, CDCl_3) do composto **83**.



APÊNDICE I - Espectros de massas e de RMN de ^1H , ^{13}C , HSQC e HMBC e EM-IES do composto **84**.

Figura I1 - Espectro de massas de alta resolução do composto **84** (modo negativo).

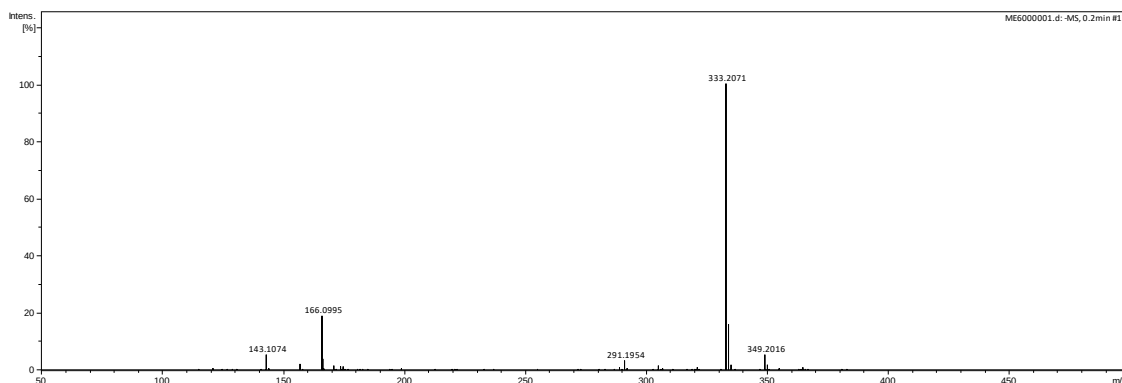


Figura I2 - Espectro de RMN de ^1H (600,13 MHz, CDCl_3) do composto **84**.

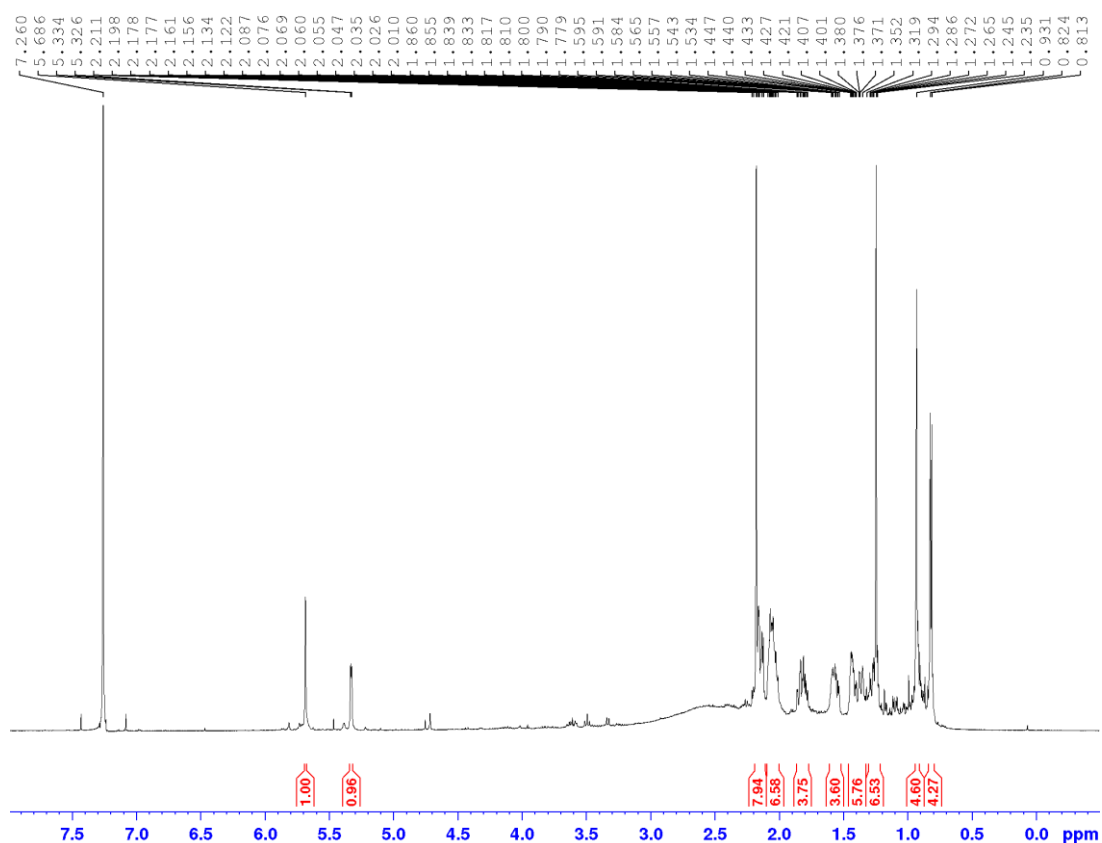


Figura I3 - Espectro de RMN de ^{13}C (150,9 MHz, CDCl_3) do composto **84**.

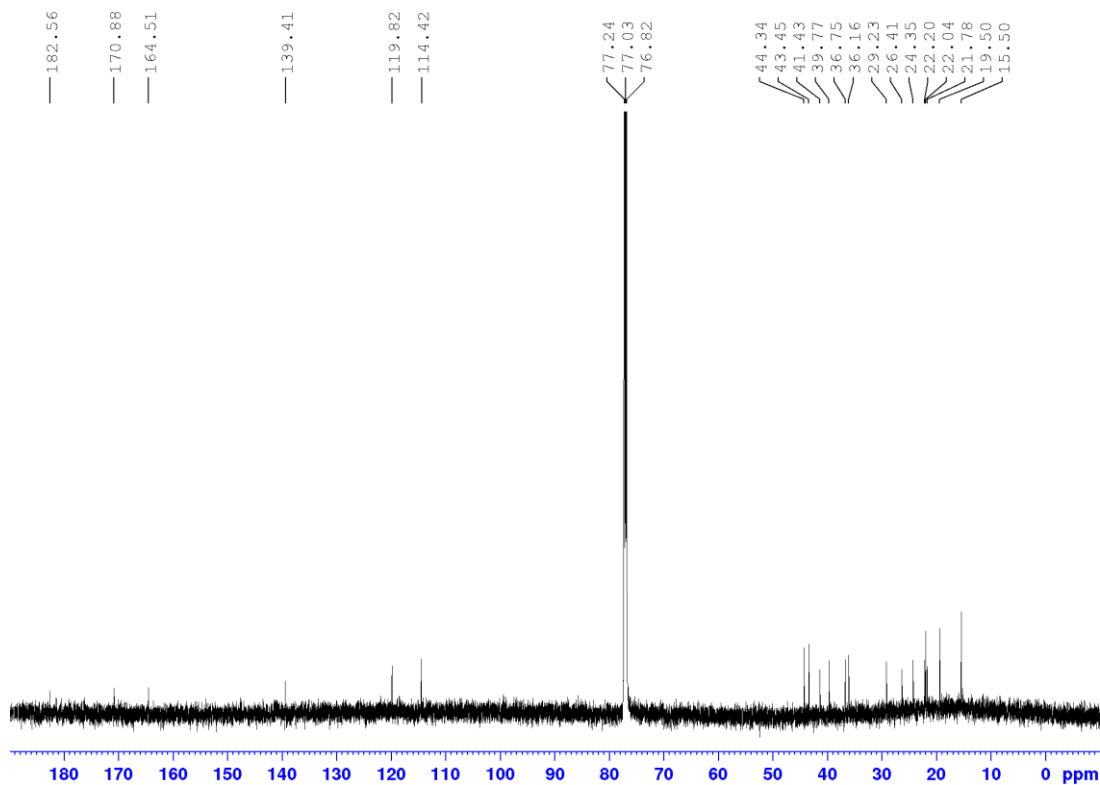


Figura I4 - Espectro de HSQC (600,13 MHz, CDCl_3) do composto **84**.

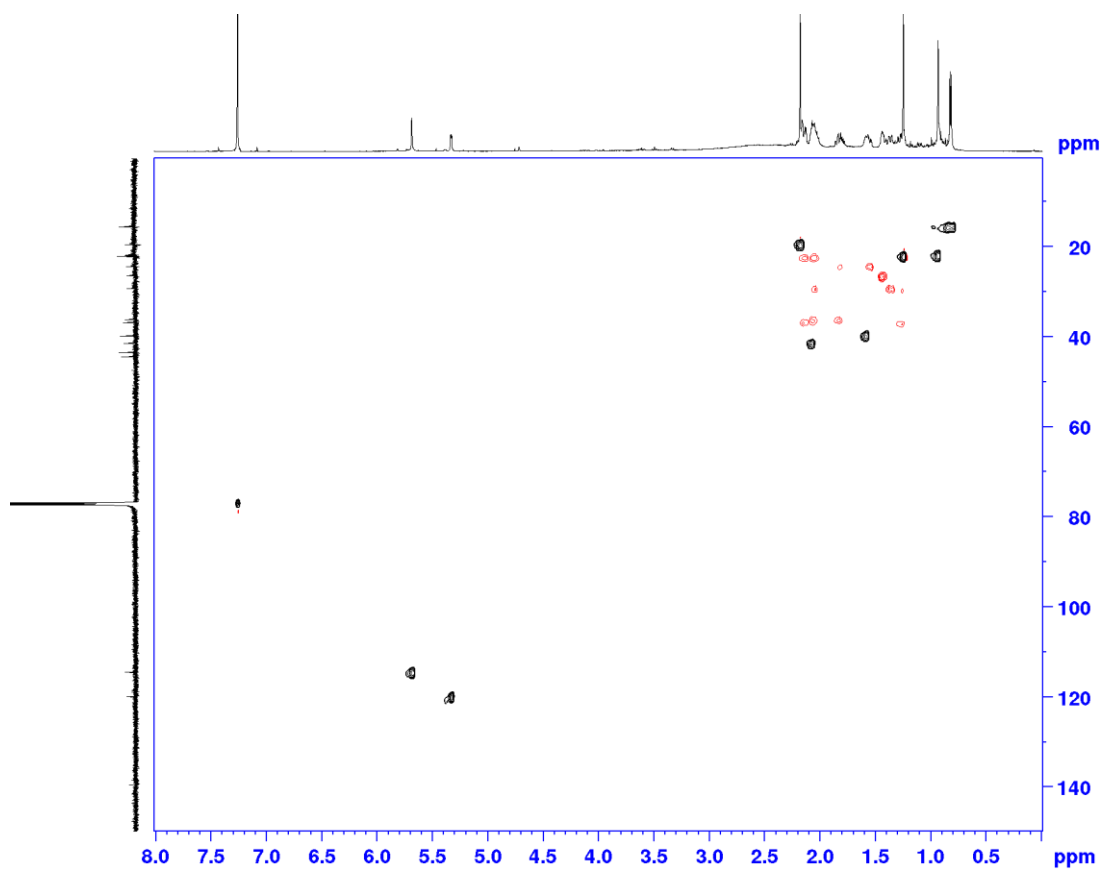
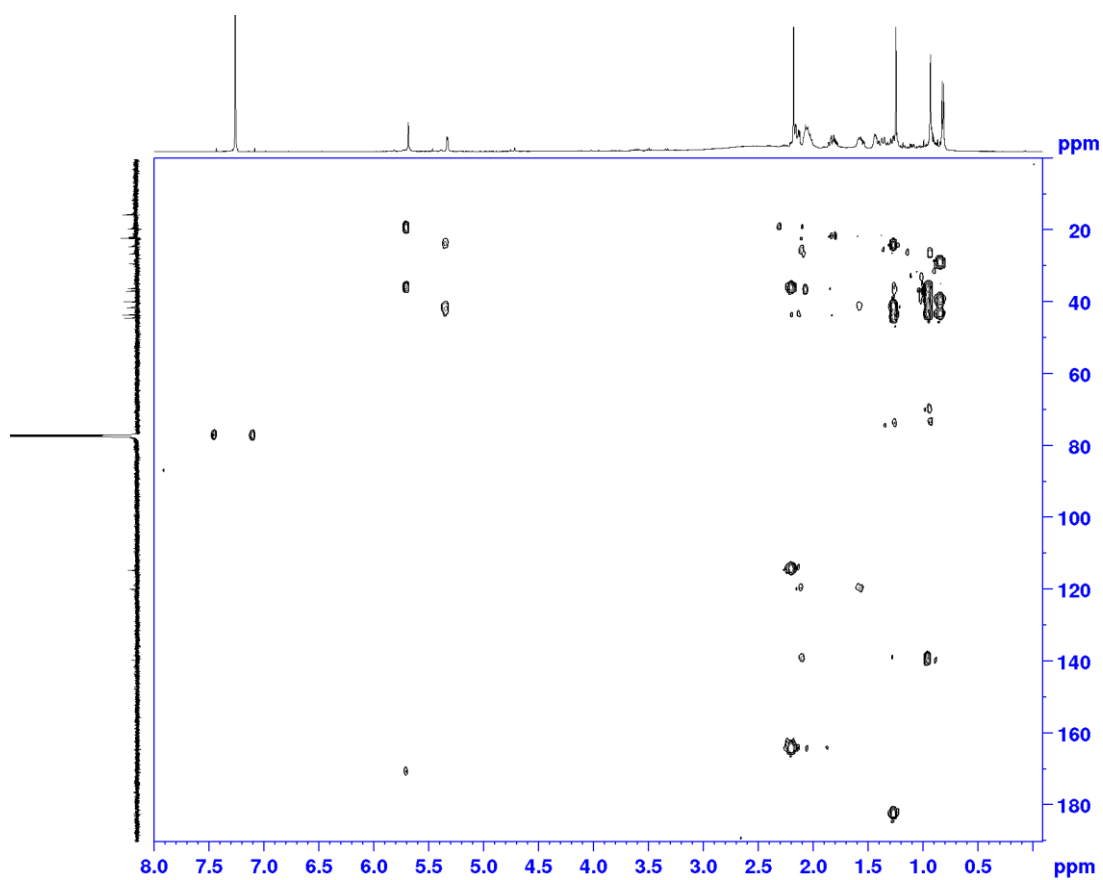


Figura I5 - Espectro de HMBC (600,13 MHz, CDCl_3) do composto **84**.



APÊNDICE J - Espectros de massas e de RMN de ^1H , ^{13}C , HSQC e HMBC e EM-IES do composto **85**.

Figura J1 - Espectro de massas de alta resolução do composto **85** (modo negativo).

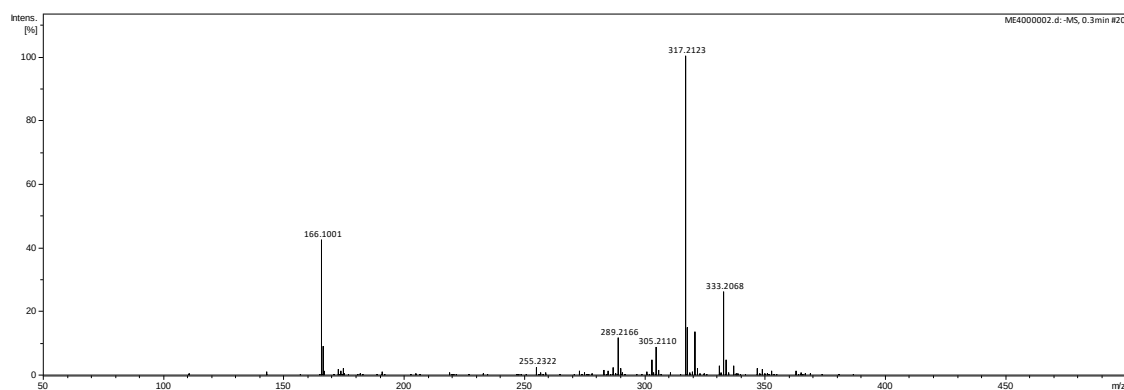


Figura J2 - Espectro de RMN de ^1H (600,13 MHz, CDCl_3) do composto **85**.

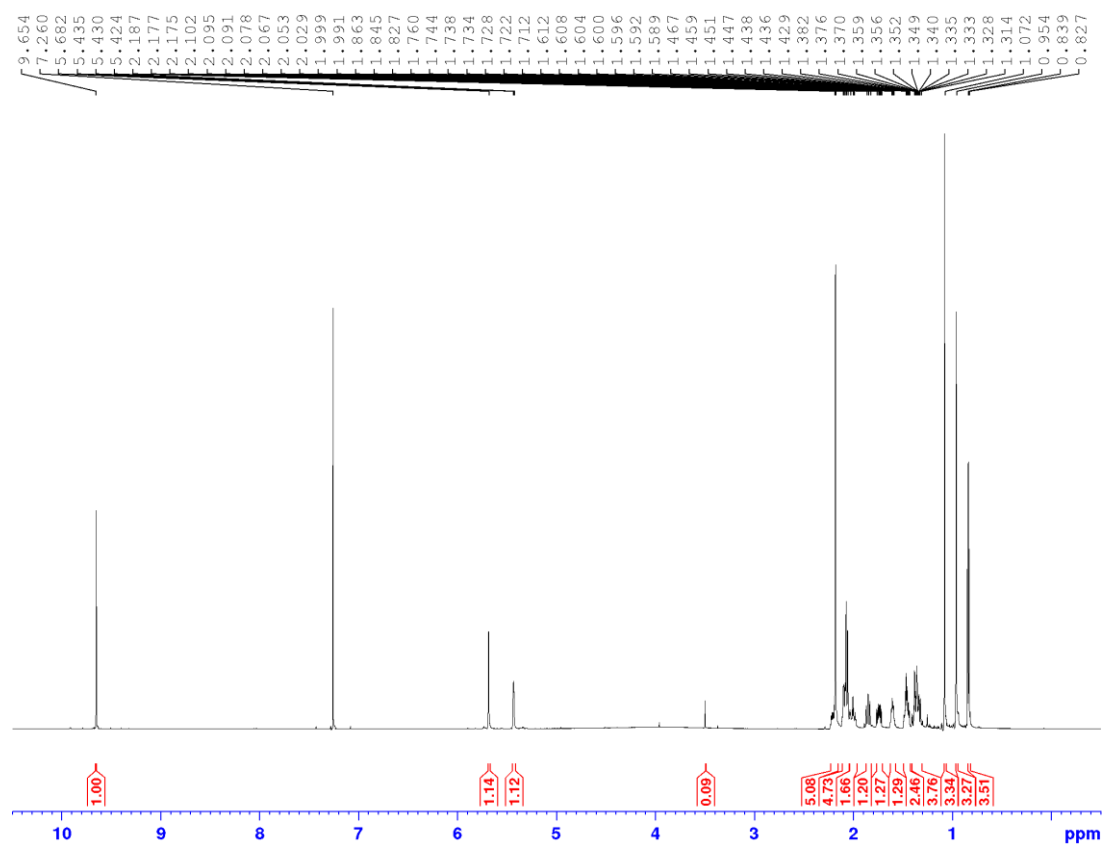


Figura J3 - Espectro de RMN de ^{13}C (150,9 MHz, CDCl_3) do composto **85**.

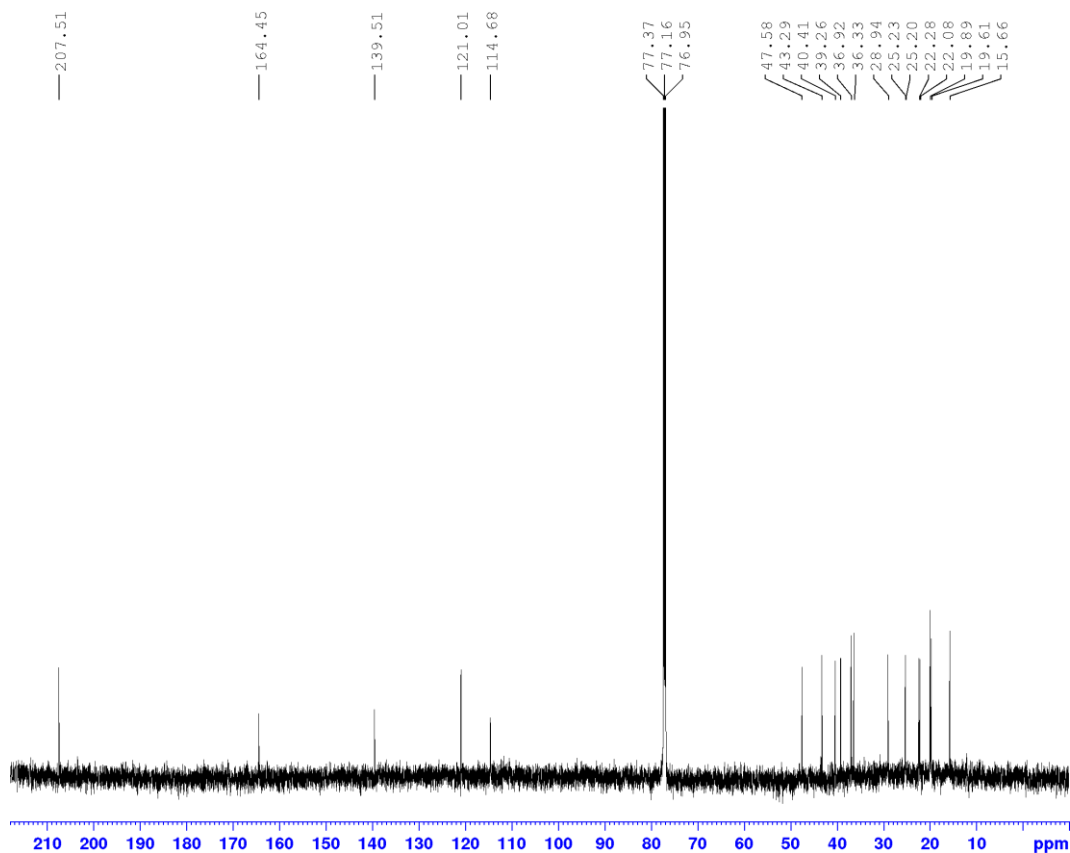


Figura J4 - Espectro de HSQC (600,13 MHz, CDCl_3) do composto **85**.

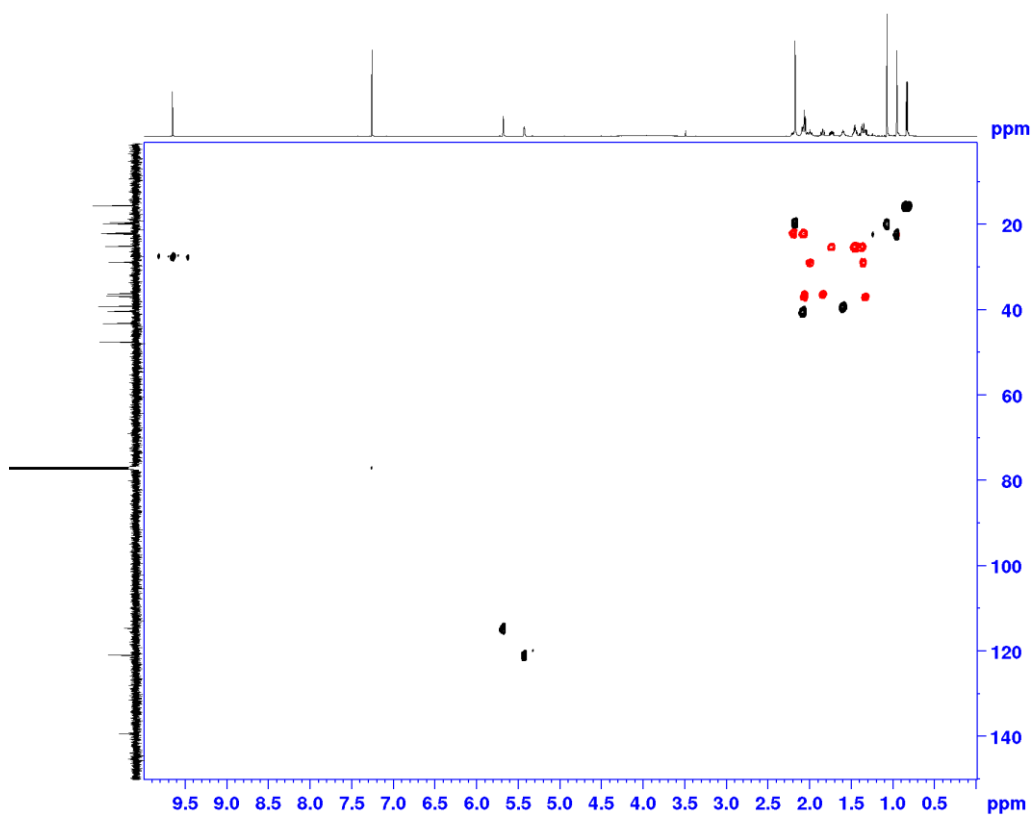


Figura J5 - Espectro de HMBC (600,13 MHz, CDCl_3) do composto **85**.

