

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**“DIFERENCIAÇÃO ABIÓTICA DO METABOLISMO
SECUNDÁRIO EM *Aspergillus aculeatus* E *Penicillium
brasilianum* UTILIZANDO SAIS INORGÂNICOS”**

Amanda Maciel Lima*

Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do título de
MESTRE EM QUÍMICA, área de
concentração: QUÍMICA ORGÂNICA

Orientador: Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho

***bolsista CNPq**

São Carlos – SP

2020



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Amanda Maciel Lima, realizada em 31/03/2020:

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Edson Rodrigues Filho', is written above a horizontal line.

Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho
UFSCar

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Márcia Nitschke', is written above a horizontal line.

Profa. Dra. Márcia Nitschke
IQSC/USP

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Tiago Venâncio', is written above a horizontal line.

Prof. Dr. Tiago Venâncio
UFSCar

Dedico essa dissertação a Lila Maciel, minha amada mãe que me criou com muita dedicação e amor, porém nos deixou com saudades muito cedo.

Mãe você está eternamente no meu coração.

Te amo!

Agradecimento

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida e por ser meu instrumento de força para enfrentar tudo.

Agradeço a minha Mãe por ter me criado e ter me educado até os 13 anos de idade. Ela quem me deu todo discernimento de humildade, comprometimento com o que faço e amor.

Agradeço ao meu pai Gilvan pelas cobranças por estudos, além de ter sido pai e mãe em muitos momentos da minha vida.

Agradeço minha irmã Andréa por ter enfrentado todos momentos comigo, por ter sido forte quando eu não fui e ser essa geógrafa maravilhosa. Agradeço também o meu irmão José Filipe por ser forte, corajoso e sonhador.

Agradeço meu orientador professor Dr. Edson Rodrigues Filho, pelos ensinamentos, ampliação de visão científica, pela amizade e convivência durante dois anos.

Agradeço ao meu namorado Murilo, por ter vindo lá do Piauí pra me apoiar nessa trajetória. Muito obrigada pelo amor, carinho, paciência e dedicação.

Agradeço a banca examinadora, Prof. Dr. Marcia Nitschke, Prof. Dr. Tiago Venâncio, Prof. Dr. André Luiz Meleiro Porto e Prof. Felipe Christoff Wouters.

Agradeço a família LaBioMMi: Luciana, Rebeca, Daiane, Satiko, Salata, Sartori, Day, Thais, Willian, Caipora, Alef, Zac, Murilo, Antônio e Naiara pela convivência, discussão científica, aprendizado, os cafés da tarde e happy hours,
rsrs

Agradeço em especial o acolhimento no grupo, amizade e ensinamentos da Luciana e da Daiane.

Agradeço a grande amizade, ensinamentos, discussões científicas e convivência da Rebequinha.

Aos meus amigos de disciplina Glenda, Romário, Flávia e Iza.

Agradeço a minha amiga de sanca coterrânea Josi pelo apoio, conselhos e amizade.

Agradeço aos meus grandes amigos de graduação Lizia e Leonardo, por estarem perto mesmo estando a 3000 km de distância.

Agradeço ao Tiago Venâncio pela paciência de ter feito minhas análise de RMN.

Agradeço ao laboratório NUBE pela disponibilidade de ter feito as análises de massas de alta resolução em Araraquara.

Ao programa de Pós – graduação de Química da UFSCar.

A FAPESP pelo apoio financeiro ao laboratório.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

Abreviaturas

AcOEt	Acetato de etila
ACN	Acetonitrila
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLUE	Cromatografia líquida de ultra eficiência
COSY	Correlated Spectroscopy
DAD	Detector de arranjo diodo
EM	Espectrometria de massas
ESI	Ionização Elétrospray
Hex	Hexano
HRMS	High Resolution Mass Sapectrometry
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
<i>J</i>	Constante de acomplamento em Hertz
MeOH	Metanol
<i>m/z</i>	Relação massa/ carga
nm	Nanômetro
OSMAC	One Strain Many Coumpounds
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
TOF	Analisador por Tempo de voo
δ	Deslocamento químico em ppm

Lista de Tabela

Tabela 3.1 – Código usado para as cinco linhagens de fungos estudadas.....	34
Tabela 3.2 – Composição do meio de cultivo em g/L variando os aditivos inorgânicos.....	36
Tabela 3.3 – Diferentes concentrações avaliadas no ensaio analítico.....	40
Tabela 3.4 – Composição do meio de cultivo em g/L do testes qualitativo realizado com a composição do meio contendo KBr na presença de sulfato de ferro.....	42
Tabela 3.5 – Frações obtidas a partir da purificação do extrato MeOH_KBr em sílica gel.....	46
Tabela 3.6 – Frações obtidas por CLAE-DAD em escala preparativa da fração MeOH_KBr_C.....	47
Tabela 3.7 – Frações obtidas por CLAE-DAD em escala preparativa da fração MeOH_KBr_D.....	49
Tabela 3.8 – Frações obtidas por CLAE-DAD em escala preparativa da fração MeOH_KBr_E.....	50
Tabela 3.9 – Frações obtidas a partir da purificação do extrato MeOH_CoCl ₂ em gel de sílica.....	52
Tabela 3.10 – Frações obtidas por CLAE-DAD em escala preparativa da fração MeOH_CoCl ₂ _C.....	53
Tabela 4.1 – Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C para M_KBr_C_26 (400 e 100 MHz).....	106
Tabela 4.2 – Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C para M_KBr_C_39 (600 e 150 MHz).....	116
Tabela 4.3 – Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C para M_KBr_C_50 (400 e 100 MHz).....	127
Tabela 4.4 – Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C para M_KBr_C_53 (400 e 100 MHz).....	132
Tabela 4.5 – Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C para M_KBr_D_26 (400 e 100 MHz).....	142
Tabela 4.6 – Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C para M_KBr_D_26 (400 e 100 MHz).....	151
Tabela 4.7 – Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C para M_KBr_E_34 (400 e 100 MHz).....	160

Lista de Esquemas

Esquema 1.1 – Classificação de mecanismos de halogenação enzimática.....	16
Esquema 3.1 – Rendimentos dos extratos obtidos no cultivo em larga escala de KBr.....	44
Esquema 3.2 – Rendimentos dos extratos obtidos no cultivo em larga escala de CoCl_2	45

Lista de Figuras

Figura 1.1 – Substâncias isoladas de produtos naturais e suas aplicações farmacológicas.....	3
Figura 1.2 – Substâncias isoladas de produtos naturais e derivados de produtos naturais aprovados pela <i>Food and Drug Administration</i> (FDA).....	4
Figura 1.3 – Declínio no números de publicações de novos produtos naturais enquanto ocorre um aumento exponencial na quantidade de grupamento de genes Biossintético, <i>Biosynthetic Gene Clusters</i> (BGCs).....	5
Figura 1.4 – Alterações de parâmetro de cultivo afeta a expressão de genes.....	7
Figura 1.5 – Exemplo de substâncias produzidas por modificação do cultivo com fontes de C e N como a cordicepina (3'-desoxiadenosina, 1) por <i>Cordyceps militaris</i> e pentapetídeo lajolamida A (2) por <i>Asteromyces cruciatus</i> , respectivamente.....	9
Figura 1.6 – Exemplos de substâncias produzidas por <i>A.unguis</i> no meio de cultivo suplementado com sais halogenados como KBr que produziu a aspergillusidona D (3), aspergillusidona E (4), aspergillusidona F (5) e como KI que produziu o unguinol (6). A modificação do meio com NH ₄ Br gerou a bromoroquefortina C (7) produzida por <i>P. brasilianum</i>	11
Figura 1.7 Substância que apresentam atividade antibacteriana e possuem halogênio em sua estrutura como: a vancomicina (8), clorotetraciclina (9) e cloranfenicol (10).....	12
Figura 1.8 – Exemplos de compostos produzidos á medida que foram modificados os meio de cultivo com metais, como, a introdução de Mn ²⁺ e Fe ²⁺ que aumentou a expressão da biossíntese de AK-1111-81 (11) por <i>S. hygrosopicus</i> . Como também, com a suplemnetação de Cu ²⁺ e Mn ²⁺ no cultivo de <i>P. brasilianum</i> promoveu a biossíntese JBIR 113, JBIR 114 e JBIR 115 (12-14). Além disso, com o cultivo da <i>S. coelicolor</i> na presença de Co ²⁺ estimulou a produção de coeligiosina A (15) e B (16).....	14
Figura 1.9 – Proposta catalítica da halogenagese cloroperoxidase (CPO) dependente do grupamento heme.....	17
Figura 1.10 – Proposta mecanística enzimática de cloração do pirrol na presença do co-fator flavina FAD e oxigênio.....	18
Figura 1.11 – Exemplo de compostos bioativos produzidos por espécies do gênero <i>Aspergillus</i>	19

Figura 1.12 – Exemplos de compostos isolados de <i>Aspergillus aculeatus</i>	21, 22, 23
Figura 1.13 – Novos compostos derivados de L-triptofano-L-fenilalanina isolados de <i>Aspergillus aculeatus</i> por meio da modificação do meio de cultivo com sal de amônio.....	24
Figura 3.1 – Reativação das linhagens utilizadas no trabalho em meio BDA. F1= <i>P. brasilianum</i> nativo, F2= <i>P. brasilianum</i> Δ pal, F3= <i>P. brasilianum</i> Δ NRPS 23, F4= <i>P. brasilianum</i> Δ NRPS 07 e F5= <i>A. aculeatus</i>	35
Figura 3.2 – Esquema das etapas de cultivo dos endófitos nos meios modificados com aditivos inorgânicos.....	37
Figura 3.3 – Esquema da metodologia de empregada para extração e análise dos extratos.....	38
Figura 3.4 – Cromatograma do padrões internos usados por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Luna Phenyl-Hexyl; 15 a 100% ACN:H ₂ O v/v a 0,8 mL/min 45 minutos; modo analítico) em 268 nm.....	39
Figura 3.5 – Perfil cromatográfico (coluna Phenomenex Luna Phenyl-Hexyl; gradiente 30 a 90% ACN:H ₂ O v/v a 8,0 mL/min; 60 minutos; modo preparativo; λ = 277 e 293 nm) da fração MeOH_KBr_C	48
Figura 3.6 – Perfil cromatográfico (coluna Phenomenex Luna Phenyl-Hexyl; gradiente 10 a 80% ACN:H ₂ O v/v a 8,0 mL/min; 40 minutos; modo preparativo; λ = 254 e 290 nm) da fração MeOH_KBr_D	49
Figura 3.7 – Perfil cromatográfico (coluna Phenomenex Luna Phenyl-Hexyl; gradiente 5 a 40% ACN:H ₂ O v/v a 8,0 mL/min; 35 minutos; modo preparativo; λ = 254 e 290 nm) da fração MeOH_KBr_E	51
Figura 3.8 – Perfil cromatográfico (coluna Sulpelco C-18; gradiente 65 a 100% MeOH:H ₂ O v/v a 8,0 mL/min; 50 minutos; modo preparativo; λ = 230 e 285 nm) da fração MeOH_CoCl₂_C	54
Figura 4.1 – Cultivo de <i>P. brasilianum</i> Δ NRPS 07 (F4) a) controle Czapek enriquecido com 2% de extrato de levedura e os meios modificados com b) 0,1 g/L FeSO ₄ , c) 1,0 g/L FeSO ₄ , d) MnCl ₂ , e) CoCl ₂ , f) NiCl ₂ , g) ZnCl ₂ , h) KBr e i) <i>A. aculeatus</i> (F5) durante 14 dias	58
Figura 4.2 – Cromatograma do extrato AcOEt em gradiente exploratório de <i>P. brasilianum</i> selvagem (F1) por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Luna Phenyl-Hexyl; 15 a 100% ACN:H ₂ O v/v a 0,8 mL/min; 40 minutos; modo analítico) em 235 nm.....	61
Figura 4.3 – Espectros de UV/Vis dos componentes de indução de F1 observados nos meios a) M _{0b} e M _{0c} nos tempos de 8 a 10 min e b) composto de média polaridade presentes nos meios M ₁ , M ₂ e M ₃	61

Figura 4.4 - Cromatograma do extrato AcOEt em gradiente exploratório de *P. brasilianum* Δ pal (F2) por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Luna Phenyl-Hexyl; 15 a 100% ACN:H₂O v/v a 0,8 mL/min; 40 minutos; modo analítico) em 235

nm.....63

Figura 4.5 – Espectros de UV/Vis dos componentes de indução de F2. Observados nos meios a) M_{0b} e M_{0c} das substâncias que coeluíram em 9,09 e 9,30, bem como nos meios b) M₃, M₄ e M₅ maior abundância das substâncias em 11, 1 e 12,5 min comparado ao controle, bem como a presença de c) um composto de indução em 16,3 min; d) O meio M₂ apresentou um novo compostos 20,5 e) e os meios M₄ e M₅ apresentaram um novo componente em 21,2 min.....63, 64

Figura 4.6 – Cromatograma do extrato AcOEt em gradiente exploratório de *P. brasilianum* Δ NRPS 23 (F3) por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Luna Phenyl-Hexyl; 15 a 100% ACN:H₂O v/v a 0,8 mL.min⁻¹; 40 minutos; modo analítico) em 235

nm.....65

Figura 4.7 – Espectros de UV/Vis dos componentes de indução de F3 observados nos meios a) M_{0b} e M_{0c} em 8,5 min b) M₂ em 9,9 min c) M₁, M₂, M₃, M₄ e M₅ em 17,3 min e d) M₅ em 23 min.....66

Figura 4.8 - Cromatograma do extrato AcOEt em gradiente exploratório de *P. brasilianum* Δ NRPS 07 (F4) por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Luna Phenyl-Hexyl; 15 a 100% ACN:H₂O v/v a 0,8 mL/min; 40 minutos; modo analítico) em 235 nm.....67

Figura 4.9 – Espectros de UV/Vis dos componentes de indução de F4 observados nos meios M₂, M₃, M₄ e M₅ em 17,9 min.....67

Figura 4.10 - Cromatograma do extrato AcOEt em gradiente exploratório de *A. aculeatus* (F5) por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Luna Phenyl-Hexyl; 15 a 100% ACN:H₂O v/v a 0,8 mL/min; 40 minutos; modo analítico) em 310 nm.....70

Figura 4.11 – Espectros de UV/Vis dos componentes de indução observados no extrato AcOEt de F5 a) de alta polaridade b) média e c) baixa para CoCl₂.....71

Figura 4.12- Cromatograma do extrato MeOH em gradiente exploratório de *A. aculeatus* (F5) por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Luna Phenyl-Hexyl; 15 a 100% ACN:H₂O v/v a 0,8 mL/min; 40 minutos; modo analítico) em 296 nm.....72

Figura 4.13 – Espectros de UV/Vis dos componentes observados no extrato MeOH de F5 dos meios a) M₁, M₄ e M₅ em 7,08 e b) 8,93 min; c) maior produção

dos composto em 12,7 e 15,4 nos meios M ₁ , M ₂ , M ₄ e M ₅ do que no controle e d) derivados de naftopronas.....	73
Figura 4.14 – Representação do processo de Halogenase da Aurosperona A (nafto- γ - pirona) visando formar moléculas halogenas.....	75
Figura 4.15 – Fotos do cultivo de <i>A. aculeatus</i> em meio Czapek suplementado com KBr durante a) 2 dias b) 3 dias e c) 5 dias de crescimento.....	78
Figura 4.16 – Gráfico de comparação a) da quantidade de massa micelial e b) massa de extrato AcOEt adquiridos nas diferentes concentrações de sais para KBr	79
Figura 4.17 – Cromatograma dos extratos AcOEt para diferentes concentrações de KBr obtido por CLUE-DAD (coluna C-18; 15 a 100% ACN:H ₂ O v/v a 0,5 mL/min; 12 minutos; modo analítico) em 231 nm.....	80
Figura 4.18 – Fotos do cultivo de <i>A. aculeatus</i> em meio Czapek suplementado com CoCl ₂ com a) 2 dias b) 3 dias e c) 5 dias d) 9 dias de crescimento.....	81
Figura 4.19 – Gráfico de comparação a) da quantidade de massa micelial produzidas, b) quantidade de massa de extrato AcOEt adquirido nas diferentes concentrações de sais de KBr.....	82
Figura 4.20 - Cromatograma dos extratos AcOEt para diferentes concentrações de CoCl ₂ obtido por CLUE-DAD (coluna C-18; 15 a 100% ACN:H ₂ O v/v a 0,5 mL/min; 12 minutos; modo analítico) em 231 nm.....	83
Figura 4.21- Cromatograma do extrato AcOEt em gradiente exploratório de <i>A.culeatus</i> em meio a) Czapek b) meio Czapek suplementado com KBr na ausência de FeSO ₄ e b) meio Czapek suplementado com KBr e FeSO ₄ . Analisados por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Luna Phenyl-Hexyl; 15 a 100% ACN:H ₂ O v/v a 0,8 mL/min; 45 minutos; modo analítico) em 293 nm.....	84
Figura 4.22- Cromatograma do extrato MeOH em gradiente exploratório de <i>A.culeatus</i> em meio a) Czapek b) meio Czapek suplementado com KBr na ausência de FeSO ₄ e b) meio Czapek suplementado com KBr e FeSO ₄ . Analisados por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Luna Phenyl-Hexyl; 15 a 100% ACN:H ₂ O v/v a 0,8 mL/min; 45 minutos; modo analítico) em 293 nm.....	85
Figura 4.23 – Cultivo do fungo antes do período de esporular (4 dias) e após esporular (14 dias) com meio suplementados com a) KBr e b) CoCl ₂	86
Figura 4.24 – Cromatograma obtido por CLUE-DAD dos extratos AcOEt. Para o período de cultivo a) antes de esporular (4 dias) e b) após esporular (14 dias) em 100 g/L de KBr (coluna C-18; 15 a 100% ACN:H ₂ O v/v a 0,5 mL/min; 12 minutos; modo analítico) em 230 nm.....	88

Figura 4.25 – Cromatograma obtido por CLUE-DAD dos extratos MeOH. Para o período de cultivo a) antes de esporular (4 dias) e b) após esporular (14 dias) em 100 g/L de KBr (coluna C-18; 15 a 100% ACN:H ₂ O v/v a 0,5 mL/min; 12 minutos; modo analítico) em 230 nm.....	88
Figura 4.26 – Cromatograma obtido por CLUE-DAD dos extratos AcOEt. Para o período de cultivo a) antes de esporular (4 dias) e b) após esporular (7 dias) e 100 g/L de KBr (coluna C-18; 15 a 100% ACN:H ₂ O v/v a 0,5 mL/min; 12 minutos; modo analítico) em 299 nm.....	89
Figura 4.27 – Cromatograma obtido por CLUE-DAD dos extratos AcOEt. Para o período de cultivo a) antes de esporular (4 dias) e b) após esporular (7 dias) e 100 g/L de KBr (coluna C-18; 15 a 100% ACN:H ₂ O v/v a 0,5 mL/min; 12 minutos; modo analítico) em 230 nm.....	89
Figura 4.28– Cromatograma obtido por CLUE-DAD dos extratos AcOEt. Para o período de cultivo a) antes de esporular (4 dias) e b) após esporular (7 dias) e 100 g/L de KBr (coluna C-18; 15 a 100% ACN:H ₂ O v/v a 0,5 mL/min; 12 minutos; modo analítico) em 296 nm.....	90
Figura 4.29 - Cromatograma obtido por CLAE-DAD de a) branco do meio KBr b) do extrato obtido do cultivo de <i>A. aculetus</i> no controle Czapek, c) do extrato obtido do cultivo no meio suplementado com KBr e c) e da fração MeOH-KBr-C em 293 nm.. O método de separação foi com a (coluna Phenomenex Luna Phenyl-Hexyl; 15 a 100% ACN:H ₂ O v/v a 0,8 mL.min ⁻¹ ; 40 minutos; modo analítico).....	93
Figura 4.30 - Cromatograma obtido por CLAE-DAD do a) branco do meio KBr b) do extrato obtido do cultivo de <i>A. aculetus</i> no controle, c) do extrato obtido do cultivo no meio suplementado com KBr e c) da fração MeOH-KBr-D em 293 nm. O método foi com a (coluna Phenomenex Luna Phenyl-Hexyl; 15 a 100% ACN:H ₂ O v/v a 0,8 mL/min; 40 minutos; modo analítico)	94
Figura 4.31 - Cromatograma obtido por CLAE-DAD do a) branco do meio KBr, b) do extrato obtido do cultivo de <i>A. aculetus</i> no controle, c) do extrato obtido do cultivo no meio suplementado com KBr e c) da fração MeOH-KBr-E em 293 nm. . O método de separação foi com a (coluna Phenomenex Luna Phenyl-Hexyl; 15 a 100% ACN:H ₂ O v/v a 0,8 mL/min; 40 minutos; modo analítico).....	95
Figura 4.32 – Cromatograma obtido por CLAE-DAD do a) branco do meio CoCl ₂ b) do extrato obtido do cultivo de <i>A. aculetus</i> no controle, c) do extrato obtido do cultivo no meio suplementado com CoCl ₂ c) e da fração MeOH-CoCl₂-C em 293 nm. O método foi com com a (coluna Phenomenex Luna Phenyl-Hexyl; 15 a 100% ACN:H ₂ O v/v a 0,8 mL/min; 40 minutos; modo analítico).....	96
Figura 4.33 – Substâncias isoladas no extrato metanólico do cultivo com KBr.....	97

Figura 4.34 – Espectro de absorção do composto M_KBr_C_26 em 50% ACN:H ₂ O v/v.....	98
Figura 4.35 – Espectro de massas de alta resolução no modo negativo de M_KBr_C_26	99
Figura 4.36- Espectro de RMN de ¹ H de M_KBr_C_26 (CD ₃ OD; 400 MHz).....	102
Figura 4.37- Espectro de RMN de ¹³ C de M_Br_C_26 (CD ₃ OD e CDCl ₃ ; 400 MHz).....	103
Figura 4.38- Espectro bidimensional de HSQC de M_KBr_C_26 (CD ₃ OD; 400 MHz).....	104
Figura 4.39 – Espectro bidimensional de HMBC ampliado de M_KBr_C_26 (CD ₃ OD; 400 MHz).....	105
Figura 4.40 – Proposta biossintética para RF 3192.....	107
Figura 4.41 – Espectro de absorção do composto M_KBr_C_39 em ACN:H ₂ O v/v.....	108
Figura 4.42 – Espectro de massas de alta resolução no modo positivo de M_KBr_C_39	109
Figura 4.43 – Espectro de RMN de ¹ H de M_KBr_C_39 (CDCl ₃ ; 600 MHz).....	112
Figura 4.44 – Espectro de RMN de ¹³ C de M_KBr_C_39 (CDCl ₃ ; 600 MHz).....	113
Figura 4.45 – Espectro bidimensional de HSQC M_KBr_C_39 (CDCl ₃ ; 600 MHz).....	114
Figura 4.46 - Espectro bidimensional de HMBC de M_KBr_C_39 (CDCl ₃ ; 600 MHz).....	115
Figura 4.47 – Espectro de absorção do composto M_KBr_C_50 em 59% ACN:H ₂ O v/v.....	117
Figura 4.48 – Espetro de massas no modo positivo de ionização em <i>elétronspray</i> para M_KBr_C_50	118
Figura 4.49- Espectro de RMN de ¹ H de M_KBr_C_50 (CDCl ₃ ;400 MHz).....	121
Figura 4.50- Espectro de RMN de ¹³ C de M_KBr_C_50 (CDCl ₃ ;100 MHz).....	122
Figura 4.51- Espectro bidimensional de HSQC de M_KBr_C_50 (CD ₃ OD; 400 MHz).....	123

Figura 4.52- Espectro bidimensional de HMBC M_KBr_C_50 (CD ₃ OD; 400 MHz).....	124, 125, 126
Figura 4.53 – Espectro de absorção do composto M_KBr_C_53 em 60% ACN:H ₂ O v/v.....	128
Figura 4.54 – Espectro de RMN de ¹ H M_KBr_C_53 (CDCl ₃ ; 400 MHz).....	130
Figura 4.55- Espectro de RMN de ¹³ C de M_KBr_C_53 (CDCl ₃ ; 100 MHz).....	131
Figura 4.56 – Espectro de absorção do composto M_KBr_D_26 em 37 % ACN:H ₂ O v/v.....	133
Figura 4.57 – Espectro de massas de alta resolução no modo positivo de M_KBr_D_26	134
Figura 4.58 – Espectro de RMN ¹ H de M_KBr_D_26 (CD ₃ OD; 400 MHz).....	137
Figura 4.59- Espectro de RMN ¹³ C de M_KBr_D_26 (CD ₃ OD; 100 MHz).....	138
Figura 4.60- Espectro bidimensional de HSQC de M_KBr_D_26 (CD ₃ OD; 400 MHz e 100 MHz).....	139
Figura 4.61- Espectro bidimensional de COSY de M_KBr_D_26 (CD ₃ OD; 400 MHz e 100 MHz).....	140
Figura 4.62 – Espectro bidimensional de HMBC ampliado de M_KBr_D_26 (CD ₃ OD; 400 MHz).....	141
Figura 4.63- Espectro de UV do constituinte M_KBr_D_30 em 43% ACN:H ₂ O v/v.....	143
Figura 4.64 – Espectro de massas de alta resolução no modo positivo de M_KBr_D_30	144
Figura 4.65- Espectro de RMN de ¹ H de M_KBr_C_30 (CDCl ₃ e CD ₃ OD ;400 MHz).....	147
Figura 4.66- Espectro de RMN de ¹³ C de M_KBr_C_30 (CDCl ₃ e CD ₃ OD ;400 MHz).....	148
Figura 4.67- Espectro bidimensional de HSQC de M_KBr_D_30 (CD ₃ OD; 400 MHz).....	149
Figura 4.68- Espectro bidimensional de HMBC de M_KBr_D_30 (CD ₃ OD; 400 MHz).....	150

Figura 4.69 – Espectro de UV da substância M_KBr_E_34 em 14% ACN:H ₂ O v/v.....	152
Figura 4.70 – Espectro de massas no modo positivo da substância M_KBr_E_34	153
Figura 4.71 – Espectro de RMN de ¹ H de M_KBr_E_34 (CD ₃ OD ;400 MHz).....	156
Figura 4.72 – Espectro de RMN de ¹³ C de M_KBr_E_34 (CD ₃ OD ;100 MHz).....	157
Figura 4.73 – Espectro bidimensional de HSQC de M_KBr_E_34 (CD ₃ OD; 400 MHz).....	158
Figura 4.74 – Espectro bidimensional de HMBC de M_KBr_E_34 (CD ₃ OD; 400 MHz).....	159

Resumo

DIFERENCIAÇÃO ABIÓTICA DO METABOLISMO SECUNDÁRIO EM *Aspergillus aculeatus* E *Penicillium brasilianum* UTILIZANDO SAIS INORGÂNICOS. O potencial biossintético de micro-organismos para a produção de metabólitos secundários é limitado pelas rotas codificadas no seu genoma. No entanto, embora este potencial seja enorme, poucas são expressas em condições padrões de cultivo. Como a biossíntese de metabólitos secundário em fungos ocorre em resposta a diferentes composições químicas do meio de cultivo, no presente trabalho foram realizados estudos visando à indução de novas rotas metabólicas em fungos endofíticos usando sais inorgânicos. Uma triagem foi previamente realizada, através do cultivo de cinco cepas fúngicas disponíveis na micoteca LaBioMMi (*Penicillium brasilianum*, *P. brasilianum* Δpal, *P. brasilianum* ΔNRPS23, *P. brasilianum* ΔNRPS7 e *Aspergillus aculeatus*). Assim, um meio de referência (controle Czapek) foi estabelecido para verificar as variações metabólicas dos fungos cultivados em sete meios modificados com sais inorgânicos. Variou-se as concentrações de FeSO₄ de 0,001 para 0,1 e 1,0 g/L; bem como substituiu-se o FeSO₄ pelos sais MnCl₂, CoCl₂, NiCl₂, ZnCl₂ e KBr a 0,5 g/L. Os fungos foram crescidos em triplicatas de cada condição de cultivo durante 14 dias em modo estático. Posteriormente, eles foram submetidos à extração do micélio com MeOH, e do caldo fermentativo com AcOEt. Os extratos obtidos foram analisados por CLAE-DAD. Assim, foram observadas as diferenças nos perfis de metabólitos dos meios extraídos com AcOEt nas linhagens de *P. brasilianum* e *A. aculeatus*. Nos extratos metanólicos foram verificadas diferenças metabólicas somente para *A. aculeatus*. Após as análises químicas, foi escolhido o fungo *A. aculeatus* (LaBioMMi 481), para cultivo em maior escala, usando os meios contendo os sais halogenados CoCl₂ e KBr. Foram efetuado testes analíticos qualitativos avaliando a susceptibilidade do fungo a diferentes concentrações salinas, tempo ótimo de cultivo em dois estágios de crescimento do micro-organismo, bem como combinações de sais. Os parâmetros analíticos ajustados foram empregados para cultivo em larga escala, usando 6L de cada meio contendo 10 e 2 g/L de KBr e CoCl₂, respectivamente, no período de 14 dias. Os extratos obtidos foram fracionados, sob vácuo, usando sílica-gel. As frações contendo compostos aparentemente induzidos foram escolhidas para isolamento por CLAE em escala preparativa. Os compostos purificados das frações foram analisados por RMN 1D e 2D. Desses compostos, foram identificados 7 constituintes, como RF 3192C, orlandina, kotanina, aurosperona A, fonsecinona A, pestalamida B e aspernigrina A. A pestalamida B e aspernigrina A ainda não foram descritas como constituintes produzidos por *A. aculeatus*. Além disso, a biossíntese da Pestalamida B, fonsecinona A e orlandina foram mais estimulada pelo meio suplementado com KBr do que no cultivo controle.

Abstract

ABIOTIC DIFFERENTIATION OF SECONDARY METABOLISM IN *Aspergillus aculeatus* AND *Penicillium brasilianum* USING INORGANIC SALTS. The biosynthetic potential of microorganisms for the production of secondary metabolites is limited by the routes encoded in their genome. However, although this potential is enormous, few of them are expressed under standard cultivation conditions. As the biosynthesis of secondary metabolites of fungi occurs in response to the different chemical compositions of culture medium, in the present work studies were conducted in order to induce new metabolic routes in endophytic fungi using inorganics salts. A screening was performed by cultivating five fungal strains available in the LaBioMMi library (*Penicillium brasilianum*, *P. brasilianum* Δ pal, *P. brasilianum* Δ NRPS 023, *P. brasilianum* Δ NRPS 07 e *A. Aculeatus*). The reference medium (Czapek control) was established to verify alterations of metabolism of fungi cultivated using seven medium modified with inorganic salts. Thus, FeSO_4 concentrations were varied from 0,01 to 0,1 e 1,0 g/L; as well as FeSO_4 was substituted by the other MnCl_2 , CoCl_2 , NiCl_2 , ZnCl_2 at 0.5 g/L. The fungi were grown in triplicates of each culture condition for 14 days in static mode. After that, they were subjected to extraction from mycelium with MeOH and from fermentation broth with AcOEt. The extracts obtained were analyzed by HPLC-DAD. Thus, differences were observed in the metabolite profiles of the media extracted with AcOEt in the strains of *P. brasilianum* and *A. aculeatus*. Methanolic extracts showed metabolic differences only for *A. aculeatus*. After chemical analysis, the fungus *A. aculeatus* (LaBioMMi 481) was chosen for cultivation at larger scale, using the medium containing the halogenated salts CoCl_2 and KBr. Qualitative analytical tests were carried out evaluating the susceptibility of the fungus to different salt concentrations, optimal cultivation time in two stages of growth of the microorganism, as well as combinations of salts. The adjusted analytical parameters were used for large scale cultivation, using 6L of each medium containing 10 and 2 g/L of KBr and CoCl_2 , respectively, in the period of 14 days. The extracts obtained were fractionated on silica gel, under vacuum. Fractions containing apparently induced compounds were chosen for isolation by HPLC an preparative scale. The purified compounds of the fractions were analyzed by 1D and 2D NMR. Among these compounds, 7 constituents have been identified, such as RF 3192C, orlandin, kotanin, aurosperone A, fonsecinone A, pestalamide B and aspernigrin A. Pestalamide B and aspernigrin A have not yet been described as constituents produced by *A. aculeatus*. In addition, the biosynthesis of pestalamide B, fonsecinone A and orlandin compounds were more stimulated by medium supplemented with KBr than in the control.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	2
1.1 Importância dos produtos naturais	2
1.2 Redução na descoberta de novos produtos naturais	3
1.3 Estratégias para produção de novas substâncias usando micro-organismos.....	6
1.4 Alterações químicas de parâmetros de cultivo	8
1.4.1 Fonte de carbono e nitrogênio.....	8
1.4.2 Salinidade.....	9
1.4.3 Metais	12
1.5 Mecanismos de halogenação.....	15
1.6 Metabólitos produzidos por <i>Aspergillus aculeatus</i>	18
1.7 Motivação para o estudo exploratório de metabólitos dos fungos endofíticos <i>Penicillium brasilianum</i> e <i>Aspergillus aculeatus</i>	25
2. OBJETIVO	27
2.1 Objetivo Geral	27
2.2 Objetivos específicos.....	27
3.0 PARTE EXPERIMENTAL	29
3.1 Materiais	29
3.1.1 Materiais utilizados para reativação e o repique dos fungos endofíticos	29
3.1.2 Materiais utilizados para o preparo do meio Czapek enriquecido com 2 % de extrato de levedura e dos meios modificados com sais.....	29
3.1.3 Materiais utilizados para extração, fracionamento cromatográfico e ensaios analíticos ...	30
3.1.3.1 Solventes.....	30
3.1.3.2 Colunas e fases estacionárias para cromatografia.....	30
3.1.3.3 Outros materiais.....	30
3.2 Equipamentos	31
3.2.1 Equipamentos utilizados para o cultivo dos fungos endofíticos, preparo do meio de cultivo e ensaios analíticos	31
3.2.3 Equipamentos utilizados para extração e concentração de amostras.....	31
3.1.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência(CLAE).....	31
3.1.5 Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (CLUE-DAD)	32
3.1.6 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	32
3.1.7 Espectrometria de Massas (EM)	32
3.3 Metodologia.....	33
3.3.1 Reativação de linhagem de fungos estabelecidos para estudo de triagem.....	33
3.3.2 Meios de cultura modificados com sais inorgânicos estabelecidos para etapa de triagem ..	36
3.3.4 Ensaios em escala analítica	39

3.3.4.1 Avaliação da tolerância de F5 em diferentes concentrações de sais dos meios suplementados com KBr e CoCl ₂	40
3.3.4.2 Avaliação da influência da adição de sulfato de ferro ao meio contendo KBr	41
3.3.4.3 Avaliação do tempo ótimo de cultivo do fungo	42
3.3.5 Cultivo em larga escala KBr e CoCl ₂	43
3.3.5.1 Estudo da Fração MeOH_KBr	45
3.3.5.1.1 Estudo da Fração MeOH_KBr_C.....	46
3.3.5.1.2 Estudo da Fração MeOH_KBr_D.....	48
3.3.5.1.3 Estudo da Fração MeOH_KBr_E.....	50
3.3.5.2 Estudo da fração MeOH_CoCl ₂	51
3.3.5.2.1 Estudo da fração MeOH_CoCl ₂ _C	52
4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
4.1 Influência dos sais halogenados no cultivo de F1, F2, F3, F4 e F5	57
4.1.1 Avaliação das diferenças morfológicas apresentadas no cultivo dos fungos endofíticos	57
4.1.2 Avaliação das mudanças apresentadas na produção de metabólitos na etapa de triagem..	59
4.1.2.2 <i>Aspergillus aculeatus</i>	69
4.2 Ensaio em escala analítica de <i>Aspergillus aculeatus</i> (F5) em meios suplementados com KBr e CoCl ₂	77
4.2.1 Avaliação da tolerância de F5 em diferentes concentrações de sais de KBr e CoCl ₂ suplementados ao meio de cultivo.....	77
4.2.1.1 KBr	77
4.2.1.2 CoCl ₂	80
4.2.1 Avaliação da produção de metabólitos no meio KBr com a presença de Sulfato de Ferro .	84
4.2.1 Avaliação do tempo ótimo de cultivo para os meios contendo KBr e CoCl ₂	86
4.3 Isolamento e identificação de compostos.....	92
4.3.1 Escolha das frações estudadas e isolamento de compostos	92
4.3.2 Identificações dos compostos isolados do extrato MeOH_KBr.....	97
4.3.2.1 Identificação da estrutura M_KBr_C_26	98
4.3.2.1.1 Proposta Biosintética para o constituinte RF-3192	107
4.3.2.2 Identificação da estrutura M_KBr_C_39	108
4.3.2.3 Identificação da estrutura M_KBr_C_50	117
4.3.2.4 Identificação da estrutura M_KBr_C_53	128
4.3.2.5 Identificação da estrutura M_KBr_D_26	133
4.3.2.6 Identificação da estrutura M_KBr_D_30	143
4.3.2.6 Identificação da estrutura M_KBr_E_34.....	152
5. CONCLUSÃO	162
6. REFERÊNCIA	165

1. Introdução

1. INTRODUÇÃO

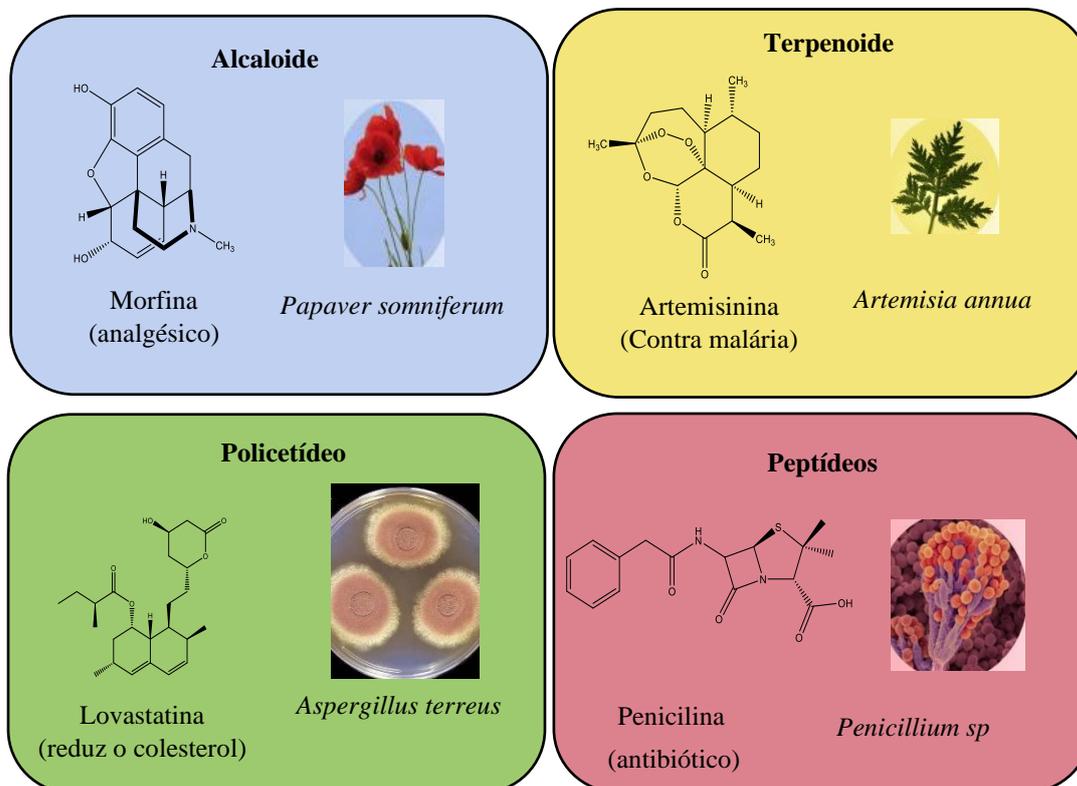
1.1 Importância dos produtos naturais

Os produtos naturais são considerados substâncias orgânicas sintetizadas por organismos vivos. A sua descoberta foi historicamente primordial para o desenvolvimento de medicamentos (LI; LOU, 2018). Sendo assim, cerca de um terço dos medicamentos aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) dos EUA entre os anos 1981 a 2013 foram classificados como “novas entidades moleculares” formadas a partir de produtos naturais ou derivados deles (PATRIDGE et al., 2016; LI; LOU, 2017). Desses produtos naturais aprovados pela FDA, 44% são de origem animal, 25% de plantas, 16% de bactéria e 12% de fungo (PATRIDGE et al., 2016).

Ressaltando a importância da descoberta de compostos e sua aplicação farmacológica, pode-se destacar a morfina, que foi isolada em 1817 da resina do ópio (*Paapaver somniferum*) por Friedrich Serturmer. A morfina foi considerada o primeiro medicamento com propriedades analgésicas a ser comercializado, cujo princípio ativo é utilizado até os dias atuais. Além disso, a descoberta da penicilina, um poderoso antibiótico produzido pelo fungo endofítico *Penicillium*, no período da segunda guerra mundial, rendeu o prêmio Nobel em de fisiologia e medicina à Alexander Fleming, Ernst B. Chain e Howard Florey em 1945 (SHEN, 2015). A partir de então, os micro-organismos passaram a ser fonte promissoras de antibióticos, ou seja, 70% dos antibióticos atuais são oriundos de fungos e bactérias (PATRIDGE et al., 2016). Outros compostos em destaque é a lovastatina, que foi descoberta em 1970 como produto de biossíntese de *Aspergillus terreus*, tendo apresentado importante papel na prevenção de doenças cardiovasculares. Outra substância que é considerada de extrema importância entre os produtos naturais é a artemisinina, isolada da planta *Artemisia annua*, que também rendeu prêmio Nobel de fisiologia e medicina em

2015. Sua descoberta por Youyou Tu, reduziu significativamente as taxas de mortalidade de pacientes portando malária (AWAN et al., 2016; SHEN, 2015).

Figura 1.1 – Substâncias isoladas de produtos naturais e suas aplicações farmacológicas

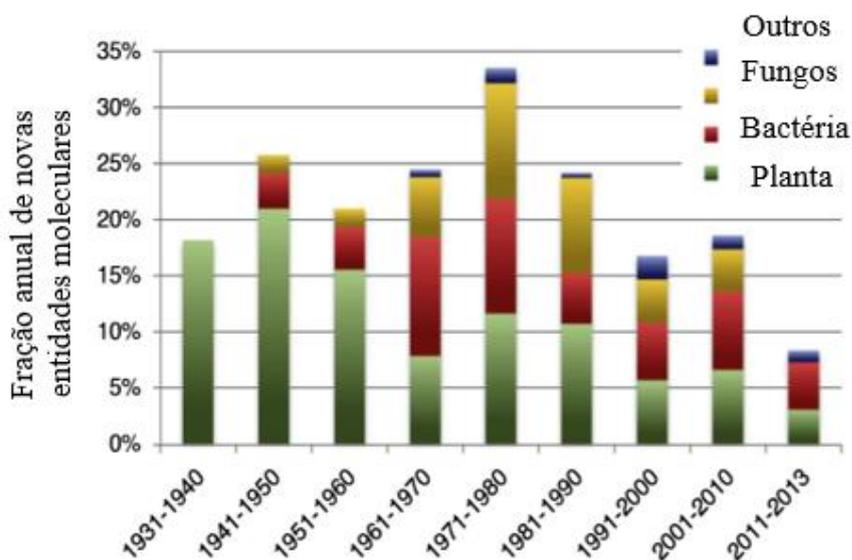


Fonte: AWAN et al, 2016 (adaptado)

1.2 Redução na descoberta de novos produtos naturais

PATRIDGE et al. (2016) realizou um estudo de prospecção científica dos produtos naturais descobertos nos últimos anos e aprovados pela FDA, principalmente originários de plantas e micro-organismo entre os anos de 2000 e 2013, e observou uma redução de 50% na quantidade de medicamentos desenvolvidos a partir de produtos naturais (Figura 1.2). Os estudos apontam ainda que essa redução ocorreu devido ao recorrente reisolamento dos constituintes provenientes de produtos naturais (RUTLEDGE e CHALLIS, 2015).

Figura 1.2 – Substâncias isoladas de produtos naturais e derivados de produtos naturais aprovados pela *Food and Drug Administration* (FAD)



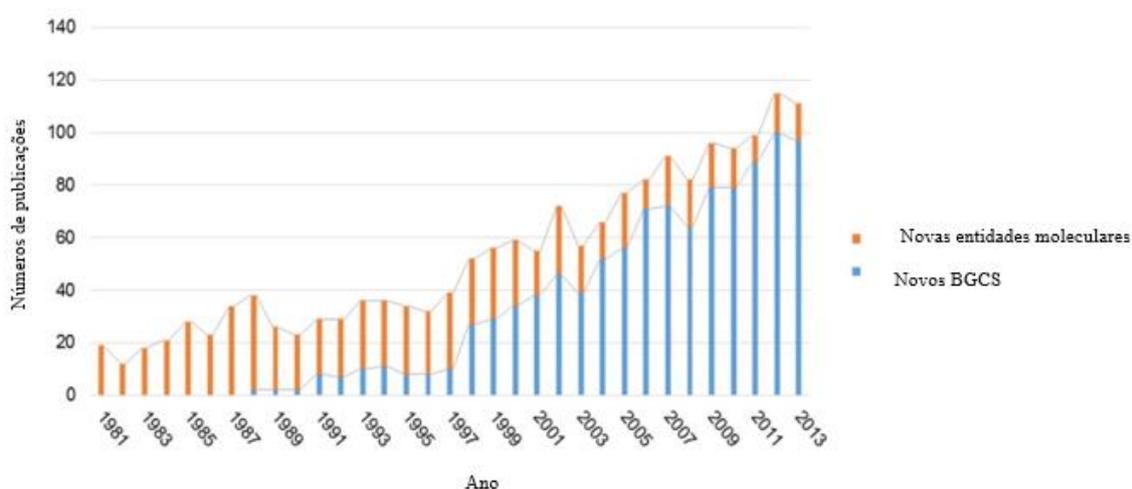
Fonte: PATRIDGE et al., 2016.

Assim, com o advento do avanço de técnicas sequenciamento genético, juntamente com o desenvolvimento da bioinformática, novos grupamentos de genes biosintéticos de micro-organismos foram previstos (*biosynthetic gene clusters*, abreviado BGCs), principalmente de fungos filamentosos, bactérias e cianobactérias (REEN et al., 2015; RUTLEDGE e CHALLIS, 2015). Assim, entre os micro-organismos até o momento sequenciados e depositados (*Integrated Microbial Genomes*, abreviado IMG) estão 710 eucariotos e 76888 bactérias. Em consequência disso, nos últimos anos houve uma grande quantidade de trabalhos publicados apresentando novos grupamentos de genes, enquanto que a quantidade de novas substâncias descoberta de produtos naturais vem decrescendo (REN et al., 2015) (Figura 1.3).

A descoberta desses novos BGCs revelou um grande potencial dos micro-organismos para produção de novos constituintes, o que despertou novamente um grande interesse pelo estudo de produtos naturais microbianos, uma vez que, em condições padrões de laboratório esses novos BGCs podem encontrar-se silenciados (REN et al., 2015; ROMANO et al., 2018). A biossíntese

dessas novas moléculas pode não ser essencial para sobrevivência do micro-organismo, regulando seu metabolismo basal. Mas elas podem ser primordiais para mediar fatores ecológicos, como sinalizações químicas, ou até mesmo defesa. Esse fato é uma das explicações para os BGCs estarem inoperantes em condições padrões de cultivo (ROKAS et al., 2019).

Figura 1.3 – Declínio no números de publicações de novos produtos naturais enquanto ocorre um aumento exponencial na quantidade de Grupamento de Genes Biossintético, *biosynthetic gene clusters* (BGCs)



Fonte: REEN et al., 2015.

1.3 Estratégias para produção de novas substâncias usando micro-organismos

A partir da descoberta de genes inoperantes (“silenciados”), sugeriram três estratégias principais usadas como forma de ativar os BGCs (REN et al., 2015; ROMANO et al., 2018).

Uma delas é a *modulação epigenética*, que seria basicamente a alteração do DNA por meio de reações que formam ligações covalentes, tipicamente acetilação ou metilação. Essa abordagem é considerada bastante agressiva ao micro-organismo e, portanto, alguns deles não são resistentes e não sobrevivem a essas modificações no seu DNA (REN et al., 2015; ROMANO et al., 2018).

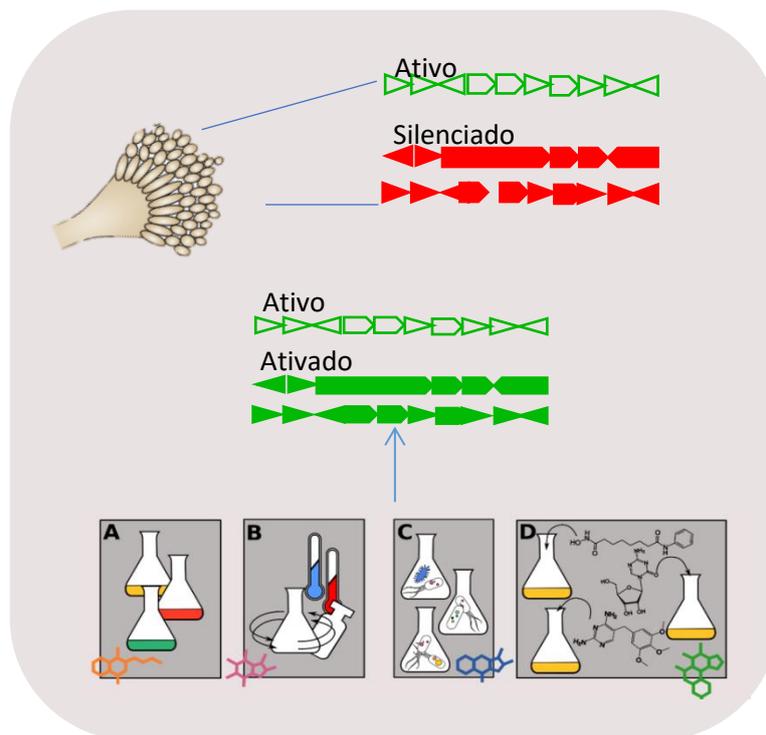
Outra abordagem empregada é a *modificação genética*, por intermédio da deleção de genes, ou através de alterações nos processos regulatórios genéticos, como as mutações da RNA polimerase e das proteínas ribossômicas, com o intuito de acionar as expressões dos genes silenciados. No entanto, a abordagem de manipulação genética necessita de um profissional com amplo conhecimento de engenharia genética, como também demanda um considerável suporte financeiro para o desenvolvimento da pesquisa (REN et al., 2015; ROMANO et al., 2018).

Além das estratégias usando da epigenia e da engenharia genética, existe atualmente algo que vem sendo apontada como uma terceira via, fundamentada na alteração de parâmetros de cultivo do micro-organismo. Isso ficou conhecido na literatura como abordagem OSMAC (do inglês “*One Strain MAny Compounds*”), introduzida pelo professor Zeeck e colaboradores (BODE et al., 2002). Neste caso, a modificação pode ser através de *parâmetro abióticos químico*, baseado nas inúmeras possibilidades de alteração da composição nutritiva do meio; *parâmetros abióticos físicos*, como a incidência de luz, taxa de aeração e temperatura; e *parâmetros bióticos*, como o co-cultivo do micro-

organismo com outro (REN et al., 2015; ROMANO et al., 2018; PAN et al., 2019) (Figura 1.4). Essas modificações tem o objetivo de provocar uma mudança nos processos enzimáticos microbiano, tendo em vista as suas características heterotrófica. Por conta disso, eles se adaptam facilmente ao habitat que está inserido, resultando na produção de constituintes que não eram produzidos em condições padrões. No entanto, do ponto de vista probabilístico, a abordagem de alteração de parâmetros se torna desafiadora, pois há inúmeras possibilidade de modificação de parâmetros de cultivo (ROMANO et al., 2018).

Dessa maneira, na literatura, é relatado que a aplicação dessas estratégias pode regular o grau de expressão e o padrão de expressão dos genes na produção de metabólitos secundários (PAN et al., 2019).

Figura 1.4- Alterações de parâmetro de cultivo pode afetar a expressão de genes



Fonte: ROMANO et al., 2018 (Adaptado).

1.4 Alterações química dos parâmetros de cultivo

As alterações químicas nos parâmetros de cultivo estão vinculadas a mudança da taxa de fornecimento de carbono e nitrogênio, salinidades, bem como a introdução de íons metálicos (PAN et al., 2019).

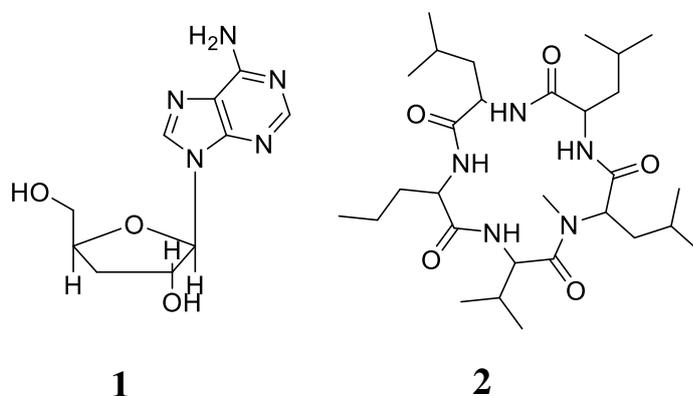
1.4.1 Fonte de carbono e nitrogênio

O principal componente do meio de cultivo é o carbono, geralmente fornecido na forma de açúcares (glicose, maltose e galactose). Eles são essenciais para formação da biomassa do micro-organismo, como também fornece unidades de carbono para a biossíntese de metabólitos primários e secundários (ROMANO et al., 2018; PAN et al., 2019).

O nitrogênio é outro principal fator nutricional do meio para produção de proteínas, ácidos nucleicos e metabólitos secundários diversos, além de afetar o pH do meio pela formação de amônia (ROMANO et al., 2018; PAN et al., 2019).

Seguindo essas ideias, a otimização da concentração de glicose e peptona, usadas como fontes de C/N para o cultivo de *Cordyceps militaris*, permitiu aos pesquisadores obter maior rendimento da cordicepina (3'-desoxiadenosina) (**1**), que apresenta importante atividade anticancerígena (MAO et al., 2005). Da mesma forma, durante o cultivo do fungo marinho *Asteromyces cruciatus*, o meio Czapek foi modificado substituindo o nitrato de sódio, usado como fonte de nitrogênio, pelo aminoácido arginina. Em resposta a essa mudança o fungo produziu o novo pentapéptido lajolamida A (**2**) (GULDER et al., 2012).

Figura 1.5 – Exemplo de substâncias produzidas por modificação do cultivo com fontes de C e N como a cordicepina (3'-desoxiadenosina, **1**) por *Cordyceps militaris* e pentapeptídeo lajolamida A (**2**) por *Asteromyces cruciatus*, respectivamente.



Fonte: Autor.

1.4.2 Salinidade

Os micro-organismos também podem produzir diferentes metabólitos à medida que é modificada a composição dos sais no meio de cultivo, pois eles são essenciais para o desenvolvimento microbiano, desempenhando um papel importante no equilíbrio osmótico e no metabolismo celular. No entanto, quando introduzida uma quantidade elevada de sais, como sais halogenados, o equilíbrio osmótico das células do micro-organismo pode ser fortemente afetada, provocando nelas a lise osmótica. Em consequência disso, para minimizar esse estresse, os micro-organismos podem despertar genes biossintéticos que estariam silenciados, como grupamentos de genes responsáveis pelo mecanismo de halogenação de substâncias orgânicas (PAN et al., 2019).

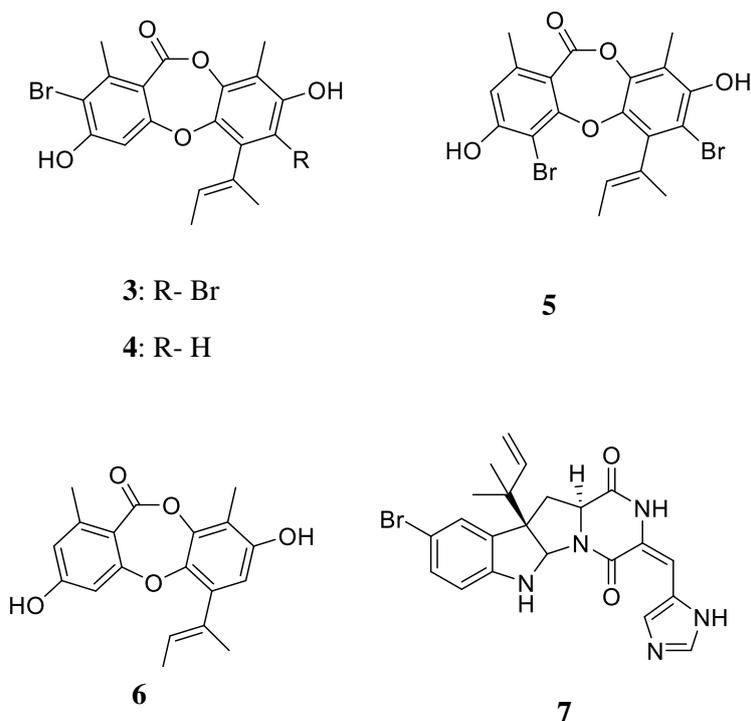
Desse modo, muitos trabalhos relatados na literatura mostram que ao modificar o meio de cultivo com água do mar e sais halogenados, ocorre a produção de substâncias halogenadas (SILVA et al., 2014). Esse processo pode acontecer via formação de intermediário como o cátion halônio (X^+), que seria essencial para formação de novas moléculas.

Assim, o cultivo do fungo marinho *Aspergillus unguis* em meio contendo os sais halogenados KBr, KI e KF, promoveu a biossíntese de depsidonas bromadas (**3-5**) no meio suplementado com KBr, e da depsidona não halogenada como unguinol (**6**), no meio suplementado com KI. Estas substâncias são de bom potencial terapêutico para tratamento contra o câncer de mama (SURERAM et al., 2013).

Em outro exemplo, durante um trabalho do grupo LaBioMMi, o cultivo do fungo endofítico *Penicillium chrysogenum* em meio Czapek suplementado com sais halogenados, levou à produção de roquefortina C bromada (**7**). Dessa forma, quando se ensaiou a roquefortina C e a roquefortina C bromada frente à bactéria *Bacillus subtilis*, verificou-se uma maior atividade da molécula halogenada (SILVA et al., 2014).

A presença do átomo de halogênio (Cl, F, Br) em uma molécula pode influenciar de modo significativo na sua atividade, tornando-a geralmente mais bioativa e mais biodisponíveis. Assim, cerca de 4500 constituintes halogenados foram isolados de fontes naturais. Entre esses compostos, a cloração parece ser mais efetiva que a bromação, embora elas sejam mais frequentes que a fluoração e a iodação, que por sua vez são raras (NEUMANN et al., 2008).

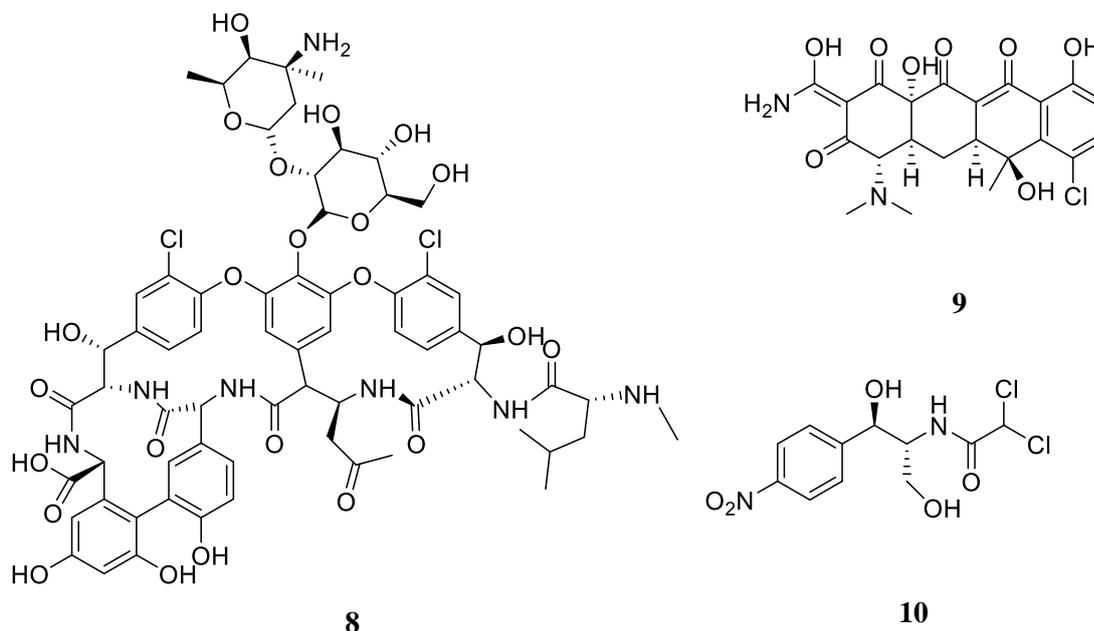
Figura 1.6 – Exemplos de substâncias produzidas por *A.unguis* no meio de cultivo suplementado com sais halogenados, como KBr que produziu a aspergillusidona D (**3**), aspergullusidona E (**4**), aspergullusidona F (**5**) e como KI que produziu o unguinol (**6**). A modificação do meio com NH₄Br gerou a bromoroquefortina C (**7**) produzida por *P. brasilianum*.



Fonte: Autor.

Vários produtos naturais com atividade antibacteriana possui um átomo de halogênio em sua estrutura, como a vancomicina (**8**) que é usada no tratamento contra bactérias gram-positivas, clortetraciclina (**9**) que é um medicamento utilizado principalmente contra infecções de ouvido, e o cloranfenicol (**10**), o qual é usado em vários tratamentos, por exemplo, meningite, otite e sinusite (Figura 1.6). Estes medicamentos são da ultima geração de antibióticos. A resistencia bacteriana à ação deles é uma grande preocupação, o que impulsiona a necessidade de descoberta de novos compostos para terapias antimicrobianas (NEUMANN et al., 2008).

Figura 1.7 Substância que apresentam atividade antibacteriana e possuem halogênio em sua estrutura como: a vancomicina (**8**), clorotetraciclina (**9**) e cloranfenicol (**10**)



Fonte: Autor.

1.4.3 Metais

Algumas hipóteses são levantadas para justificar a adaptação de algumas espécies de micro-organismos à presença de metais de transição. Estas hipóteses são baseadas na formação de metaloproteínas e metaloenzima. Estes metais são capazes de complexar com sítios doadores de elétrons por possuírem orbitais *d* disponíveis, promovendo a formação de reações redox com metaloproteínas, e atuando como cofatores de enzimáticos (CULOTTA e DALY, 2013).

Os metais podem ainda provocar alteração da conformação enzimática por complexação com aminoácidos, favorecendo o encaixe de novos substratos, resultando, conseqüentemente, no surgimento de novas moléculas (FOSTER et al., 2014). Existem cerca de 30% de metaloproteínas nos micro-

organismos. Os metais como, Fe, Cu, Mn, Zn, Co, Ni, Mo e Mg, funcionam como “peças chaves” para a biossíntese de muitos metabólitos secundários, bem como influenciam na indução/supressão de BGCs (DUBEY et al., 2019).

Estudos apontam que a suplementação de cátions metálicos no meio de cultivo pode favorecer a competição com os metais já ligados às metaloproteínas. Assim, as propriedades químicas e físicas de metais e proteínas, como raio iônico, geometria de coordenação, números de ligantes, bem como características do ligante (carga líquida, momento dipolar e polarizabilidade, atuação na doação/aceitação de carga), podem influenciar a preferência da interação entre eles. Um exemplo disso é o zinco, que geralmente substitui o magnésio em enzimas, ativando as tirosinaquinases e a fosfatase alcalina de magnésio (DUBEY et al, 2019; FOSTER et al., 2014).

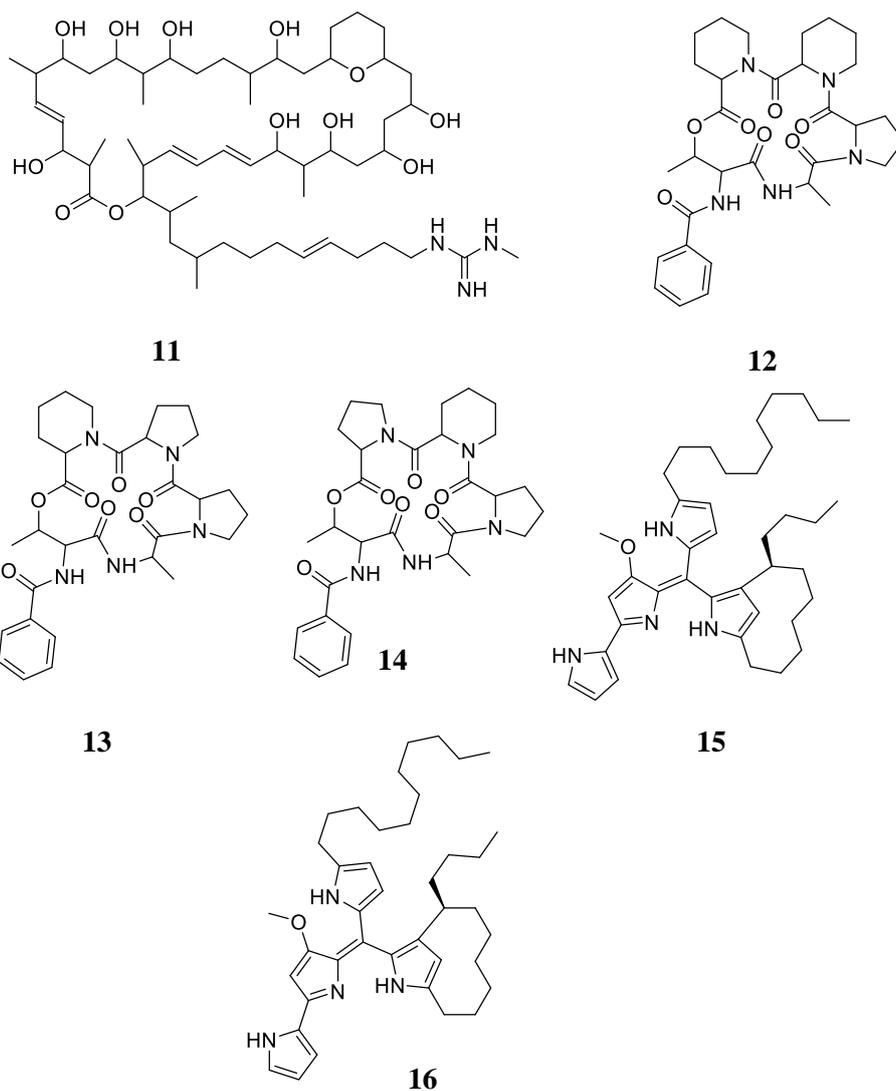
Inúmeros trabalhos encontrados na literatura vêm abordando novos metabólitos secundários sendo produzidos por adição de metais. Grande parte dos metabólitos retratados possui atividade antibacteriana.

Alguns trabalhos ilustram que metais como o Mn^{2+} e Fe^{2+} podem aumentar o nível de expressão de metabólitos, por exemplo, a estimulação da biossíntese do antibiótico macrofilo AK-1111-81 (**11**) pela bactéria *Streptomyces hygrosopicus* (GESHEVA et al., 2005).

Além disso, recentemente um trabalho do LaBioMMi relatou que o fungo endofítico *Penicillium brasilianum*, cultivado em meio Czapek com suplementação de $CuSO_4$ e $MnSO_4$, produziu ciclopeptídeos (JBIR 113, JBIR 114 e JBIR 115 - **12-14**) que não eram produzidos em condições padrões, na ausência destes aditivos (FILL et al., 2016).

Em outro exemplo, a presença do íon Co^{2+} alterou as características fenotípicas da bactéria *Streptomyces coelicolor*, evidenciando alteração para a coloração vermelha, e a produção dois novos derivados de prodigiosinas a coeligiosina A (**15**) e B (**16**) (MORGENSTERN et al., 2015).

Figura 1.8 – Exemplos de compostos produzidos á medida que foram modificados os meio de cultivo com metais, como, a introdução de Mn^{2+} e Fe^{2+} que aumentou a expressão da biossíntese de AK-1111-81 (**11**) por *S. hygrosopicus*. Como também, a suplementação de Cu^{2+} e Mn^{2+} no cultivo de *P. brasilianum* promoveu a biossíntese JBIR 113, JBIR 114 e JBIR 115 (**12-14**). Além disso, com o cultivo da *S. coelicolor* na presença de Co^{2+} estimulou a produção de coeligosina A (**15**) e B (**16**).



Fonte: Autor.

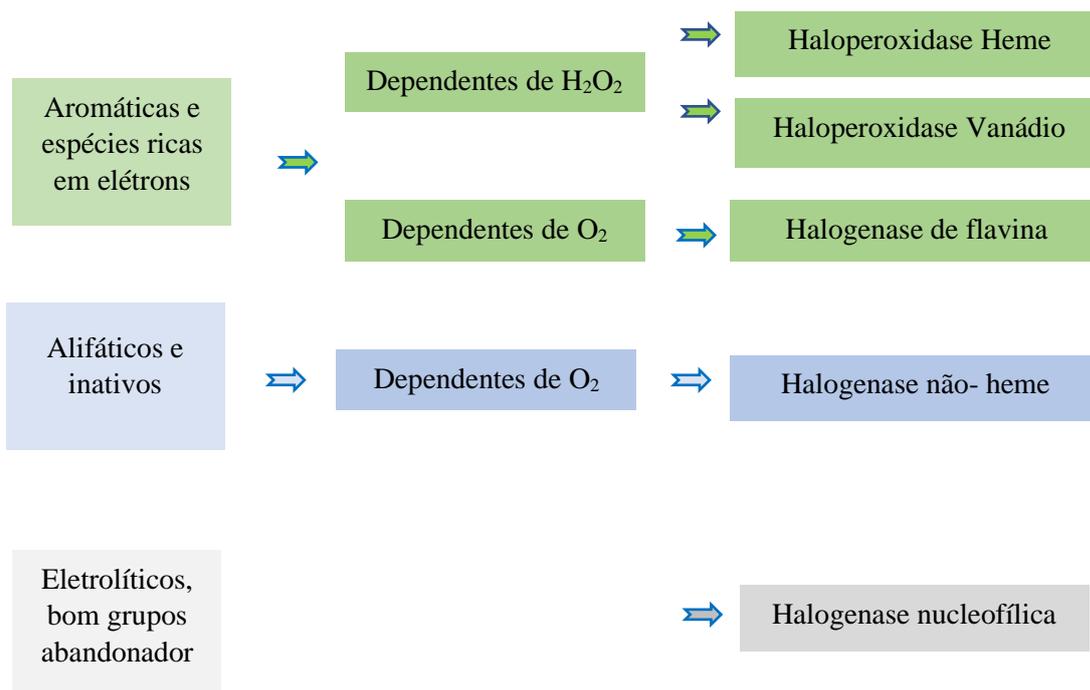
1.5 Mecanismos de halogenação

A busca pelo entendimento dos mecanismos de halogenação enzimática é de fundamental importância, no sentido de se desenvolver processos de vias metabólicas em micro-organismo para biossíntese de compostos bioativos, para uso como fármacos (JAREMKO et al, 2019).

Assim, na década de 1960 foi descoberta a primeira enzima halogenase cloroperoxidase (abreviado CPO) contendo porfirina como grupo heme, que foi isolada do fungo *Caldariomyces fumago*, o qual biosintetizou um produto natural clorado, a caldariomicina (BUTLER e SANDY, 2009).

Posteriormente, outras enzimas responsáveis pelo processo de halogenação em espécies químicas aromáticas e ricas em elétrons, como *haloperoxidase* de vanádio e haloperoxidase de ferro, as quais requerem peróxido de hidrogênio para efetuar o processo de halogenação, foram descobertas. As *halogenases*, como a halogenase dependente de flavina e halogenase não dependente de grupamento heme, necessitam do oxigênio para o processo de oxidação. Por fim, *halogenases nucleofílicas*, como a fluorase, agem em compostos eletrofílicos que apresentam um bom grupo abandonador (Esquema 1.1) (BLASIAK e DRENNAN, 2009; BUTLER e SANDY, 2009).

Esquema 1.1 – Classificação dos mecanismos de halogenação enzimática



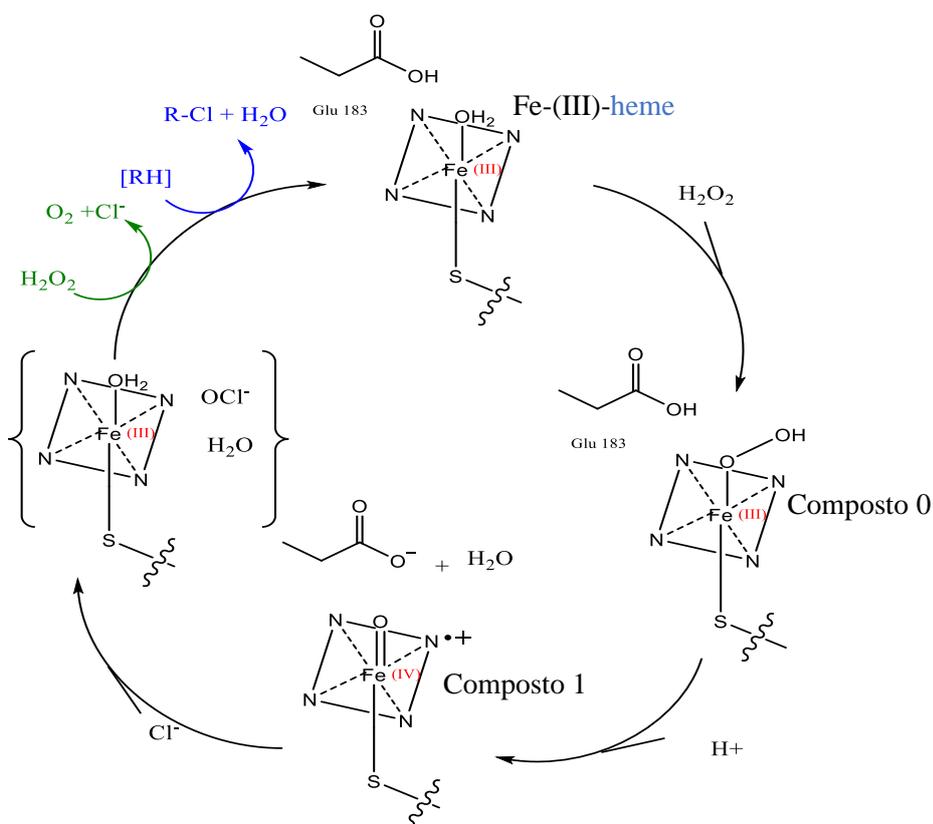
Fonte: BLASIAK e DRENNAN, 2009 (Adaptado).

O mecanismo da primeira haloperoxidase heme CPO, ocorre em condições de pH 2,7. No entanto, as CPOs podem também catalisar uma série de outros tipos de reações de oxidação em pH neutro e na ausência de cloro (BUTLER e SANDY, 2009).

A ação da halogenase cloroperoxidase (CPO) dependente do ferro, está ilustrada na Figura 1.8. Neste mecanismo, o complexo Fe (III)-heme está coordenado a uma cadeia lateral proximal de cisteína. O centro de Fe(III)-heme vai atuar como um catalizador redox. O hidrogeno peróxido catalisa o Fe(III)-heme no composto I, com auxílio da Glu 183. Primeiramente, o hidrogeno-peróxido forma um intermediário de curta duração, complexo peroxo-ânion (Composto 0), que posteriormente resulta na formação do Fe (IV)-oxo (Composto I), uma espécie radicalar. O composto I induz a oxidação do cloreto pela transferência de dois elétrons, restaurando o centro Fe(III)-heme. Este estado levou a vários questionamentos, por exemplo da possibilidade do OCl⁻ formado estar coordenado ao ferro ou apenas interagindo com o mesmo sem coordenar-se.

O intermediário pode participar em seguida do mecanismo de cloração do substratos orgânicos (em azul) ou reagir com o hidrogeno peroxido (verde), produzindo uma substância halogenada e oxigênios no estado singlete, respectivamente (BUTLER e SANDY, 2009; CHEN e PÉE, 2008) (Figura 1.8).

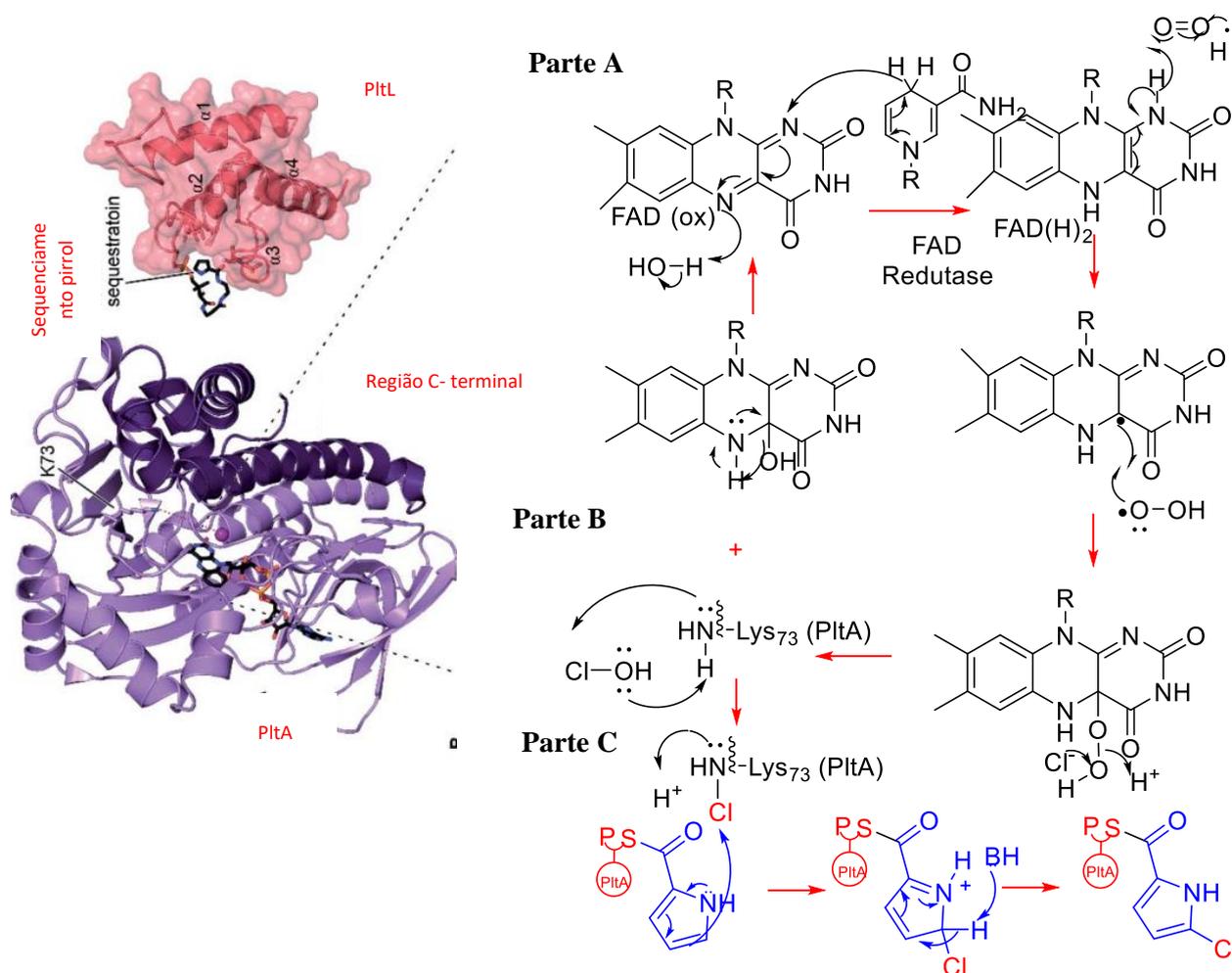
Figura 1.9 – Proposta catalítica da halogenase cloroperoxidase (CPO) dependente do grupamento heme



Fonte: BUTLER e SANDY, 2009 (adaptado)

Outra proposta para ação dessas oxidases está ilustrada na Figura 1.9, destacando-se o processo envolvendo halogenase dependente do flavina (FAD) e do oxigênio, que ocorre em substratos eletrofílicos, como o anel pirrol. A proposta mecanística consiste na participação do FADH₂ juntamente com o O₂, que catalisam a formação do ácido hipocloroso (parte A), e reage com um resíduo de lisina formando uma espécie de cloroamina (parte B). Esse resíduo de lisina proximal clorado favorece a substituição eletrofílica em várias posições do anel pirrol (parte C) (JAREMKO et al., 2020).

Figura 1.10 – Proposta mecanística enzimática de cloração do pirrol na presença do co-fator flavina FAD e oxigênio



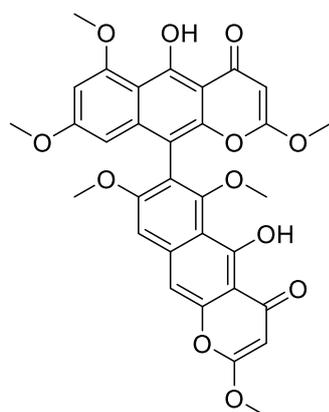
Fonte: JAREMKO et al., 2020 (adaptado).

1.6 Metabólitos produzidos por *Aspergillus aculeatus*

O presente estudo foi efetuado usando uma cepa fúngica de *Aspergillus aculeatus*, devido ao gênero *Aspergillus* ser um promissor produtor de compostos bioativos, como nafto- γ -pironas, que apresentam atividade antibacteriana, e aspenigrinas, que apresentam atividade neuroprotetoras, ambas isoladas de *Aspergillus niger*. Além disso, destaca-se a lovastatina, biosintetizada por *Aspergillus terreus*, que é conhecida por controlar os níveis de colesterol; e a

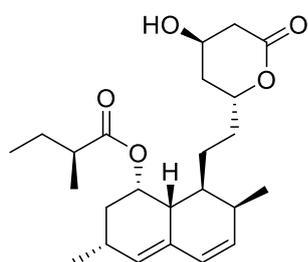
fumetremorgina C, sintetizada por *Aspergillus fumigatus*, que possui atividade contra o cancer de mama (Figura 1.10) (ROMSDAHL e WANG, 2019).

Figura 1.11 – Exemplo de compostos bioativos produzidos por espécies do gênero *Aspergillus*



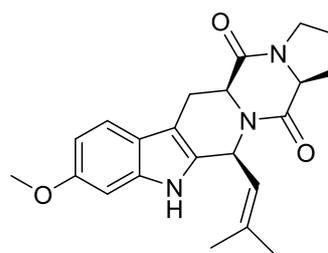
Aurosperona A (*A. niger*)

(Antibacteriana)



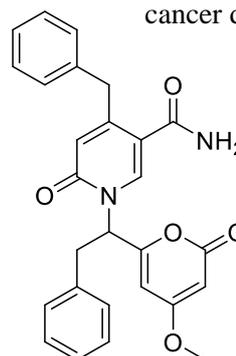
Lovastatina (*A. terreus*)

(Redutor de colesterol)



Fumetremorgina C (*A. fumigatus*)

(Atividade contra células do cancer de mama)



Aspenigrinas B (*A. niger*)

(Atividade neuroprotetora)

Fonte: Autor.

Aspergillus aculeatus é um fungo filamentososo que produz conídio de coloração preta, sendo considerado pertencente à seção dos *Aspergillus Nigri*, que é a mesma classe do *Aspergillus niger*. O fungo *A. aculeatus* resiste a drásticas variações de temperatura (10-50 °C) e pH (2-11), podendo ser cultivado em condições extremas, além de apresentar ótima adaptação a nutrições que lhe são impostas. Além disso, ele é considerado um agente patógeno do tomate e uva (ÖZKAYAA et al., 2018; PARK et al., 2017; PITT e HOCKING, 2009).

Na seção do *Aspergillus Nigri* foram descobertos cerca de 145

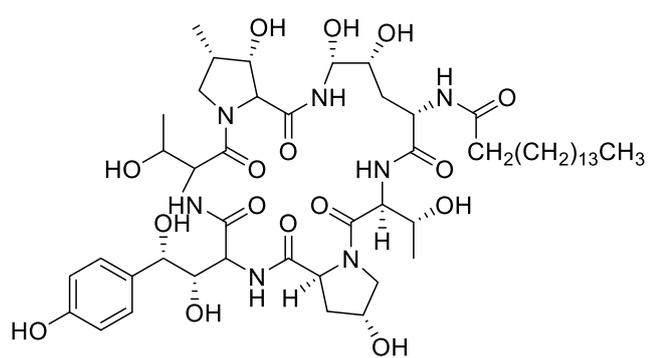
metabólitos derivados de policetídeos (PK), peptídeos não ribossômicos (NRP) e de origem biossintética mistas. Conforme reportados na literatura, esses compostos podem ser nafto- γ -pironas, isoprenos, bicumarinas, ciclopeptídeos e dicetopiperazina (PETERSEN et al., 2014; WANG et al., 2018).

Os metabólitos até o momento isolados de fungos endofíticos da espécie *A. aculeatus* são principalmente aculeacina A, ácido secalônicos D e F, okaraminas H e I, fonsecinona A-D, aurosperona A-B, aculenos A-C, kotanina, orlandina, dicetopiperazinas, oxalina, emindol SB, 16-ceto-aspergillimida, asperdicromo, RF 3192C, panorina, altecromona A e variecolactona. Além desses, em fungo marinho dessa espécie foi detectado a presença de compostos como asperaculina A, aspergillusol A, e aculeatusquinonas A-D (CAMPOS, 2005; PETERSEN et al., 2014; HAYASHI et al., 1999; WANG et al., 2018)(Figura 1.11).

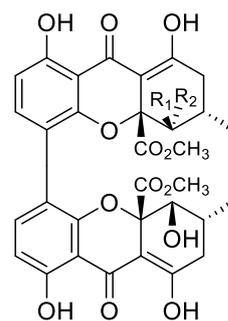
Alguns desses constituintes isolados de *A. aculeatus* possuem bioatividade, por exemplo, a aculeanina A é um ciclopeptídeo que apresenta atividade antibiótica (MIZUNO et al., 1976), assim como os policetídeos funsecinona A, funsecinona C e Aurosperona A (HE et al., 2016). Além desses, os aculenos A-C apresentaram atividade citotóxica *in vitro* contra células humanas cancerígenas (GAO et al., 2014).

Além disso, recentemente WANG et al., 2018 desenvolveu um estudo de alteração de parâmetro de cultivo de *A. aculeatus*, usando meio de arroz suplementado com sal de amônia, onde verificou-se a mudança na produção de metabólitos secundário quando comparado ao cultivo padrão, com arroz não suplementado. Observou-se a indução de dez novas substâncias, denominada de aculeatina A-J, apresentando também novos substituintes derivados de ácido conjugado de L-triptofano- L-fenilalanina (Figura 1.11).

Figura 1.12 – Exemplos de compostos isolados de *Aspergillus aculeatus*

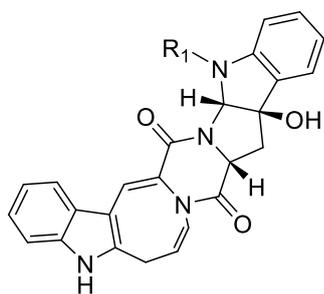


Aculeacina A

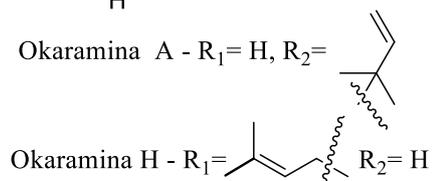


Ácido secalônico D - R₁= OH, R₂= H

Ácido secalônico F - R₁= H, R₂= OH

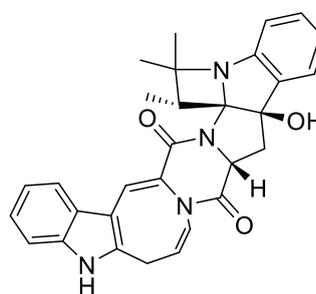


Okaramina A - R₁= H, R₂=

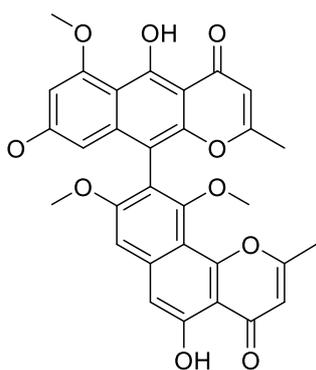


Okaramina H - R₁=

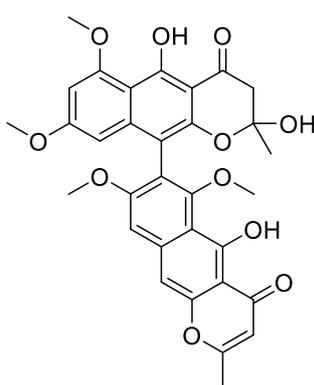
Okaramina I - R₁= H, R₂= H



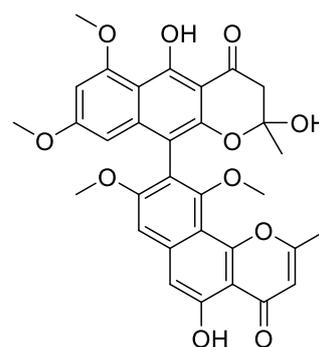
Okaramina B



Fonsecinona A



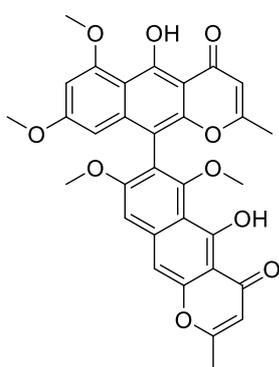
Fonsecinona B



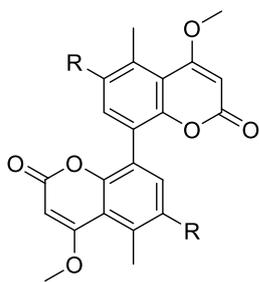
Fonsecinona C

Fonte: Autor.

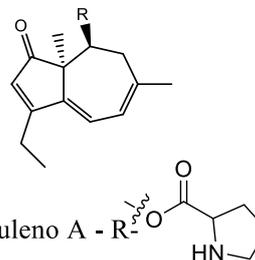
Figura 1.12 (Continuação) – Exemplos de compostos isolados de *Aspergillus aculeatus*



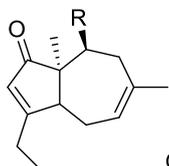
Aurosperona A



Kotanina - R- OCH₃
Orlandina - R - OH

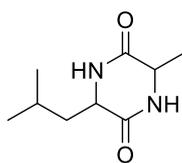


Aculeno A - R-
Aculeno C- R - OH

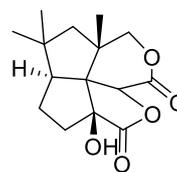


Aculeno B - R-

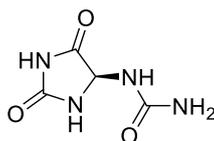
Aculeno D - R - OH



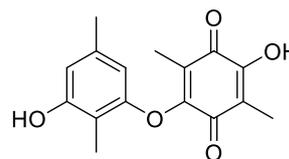
3- metil-6-(2-metilpropil)-
2-5-piperazinadiona



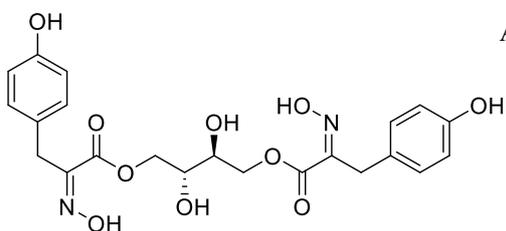
Asperaculina A



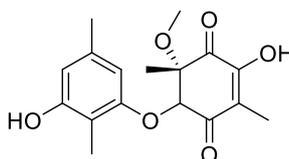
Alantoína



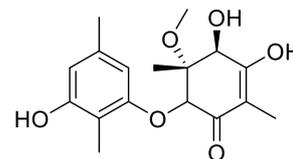
Aculeatusquinonas A



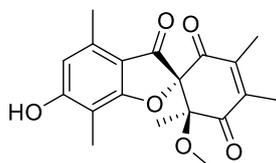
Aspergillusol A



Aculeatusquinonas B



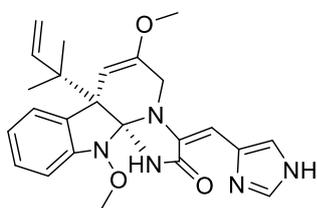
Aculeatusquinonas C



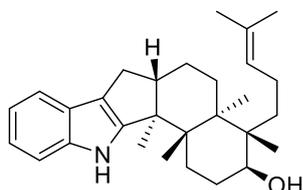
Aculeatusquinonas D

Fonte: Autor.

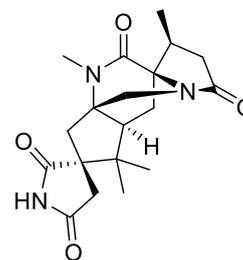
Figura 1.12 (Continuação) – Exemplos de compostos isolados de *Aspergillus aculeatus*



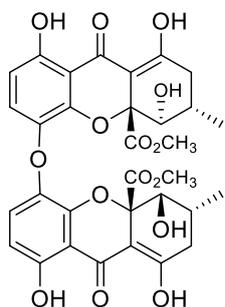
Oxalina



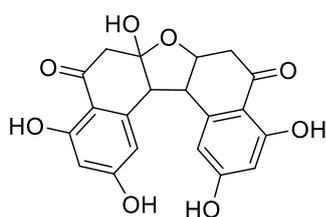
Emidol SB



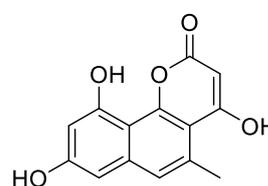
16-ceto-aspergilimida



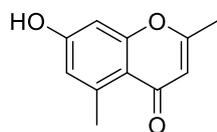
Asperdicromo



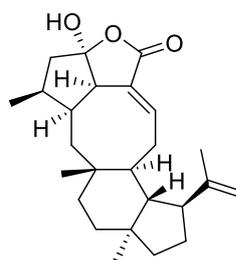
RF 3192C



Panorina



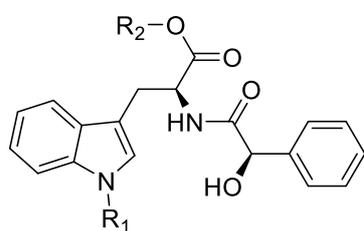
Altecromona A



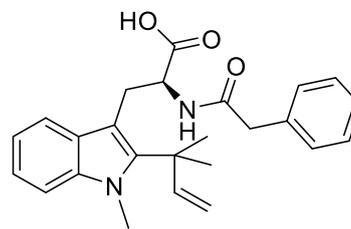
Variocolactona

Fonte: Autor.

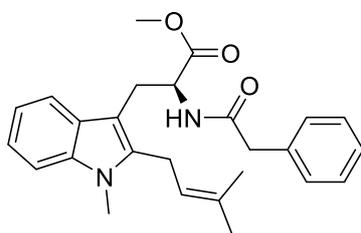
Figura 1.13 – Novos compostos derivados de L-triptofano- L-fenilalanina isolados de *Aspergillus aculeatus* por meio da modificação do meio de cultivo com sal de amônio



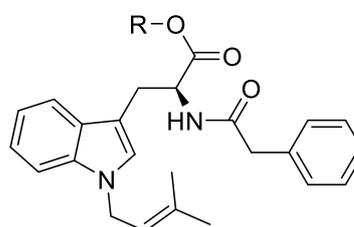
Aculeatina A $R_1 = \text{CH}_3$, $R_2 = \text{CH}_3$
 Aculeatina B $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{CH}_3$



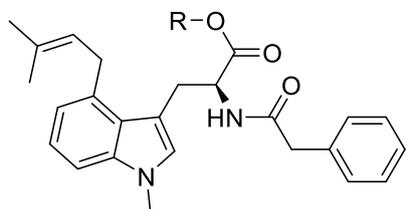
Aculeatina C



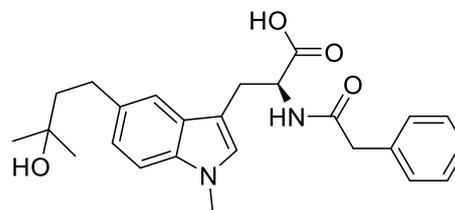
Aculeatina D



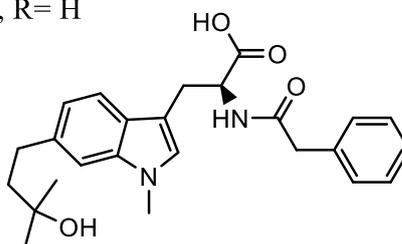
Aculeatina E, $R = \text{CH}_3$
 Aculeatina F, $R = \text{H}$



Aculeatina G, $R = \text{CH}_3$
 Aculeatina H, $R = \text{H}$



Aculeatina I



Aculeatina J

Fonte: WANG et al, 2018.

1.7 Motivação para o estudo exploratório de metabólitos dos fungos endofíticos *Penicillium brasilianum* e *Aspergillus aculeatus*

Neste trabalho, realizou-se um estudo exploratório da produção de metabólitos secundário pelo fungo endofítico *Penicillium brasilianum* (linhagem nativa), bem como as linhagens de *P. brasilianum*, modificadas geneticamente (Δ pal, Δ NRPS 23 e Δ NRPS 07) como resultados de outros trabalhos do grupo.

Várias classes de substâncias foram reportadas na literatura apresentando-se como constituintes biossintetizados por *P. brasilianus* (nativo), totalizando 40 substâncias das classes dos alcalóides, dicetopiperazinas, meroterpenóides, policetídeos e ciclodepsipeptídeos (BAZIOLI et al., 2017). Contudo, o metabolismo secundário das cepas de *P. brasilianum* modificadas geneticamente não foi ainda explorado, portanto seria uma contribuição para literatura estudar os nesse trabalho. O enfoque principal foi avaliar se houve diferenciação da produção de metabólitos nos meios modificados com sais para as diferentes linhagens de *P. brasilianum*.

Além disso, foi estudada anteriormente no grupo a linhagem de *A. aculeatus* Lizuka, que produziu nafto- γ -pironas e bicumarinas (CAMPOS et al., 2005; DE LAZARO et al., 2008). Essas substâncias com cadeias contendo anéis aromáticos, ricos em elétrons, podem ser susceptíveis a substituição eletrofílicas por halogênios, por meio de mecanismos enzimáticos envolvendo halooxigenases. Logo, *A. aculeatus* Lizuka foi o enfoque principal da parte de isolamento e identificação de constituintes do trabalho.

2. Objetivo

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

Efetuar um estudo exploratório de metabólitos secundário em *Penicillium brasilium* nativo, *Penicillium brasilium* modificado geneticamente e *Aspergillus aculeatus* por meio da modificação do meio de cultivo com sais inorgânicos.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar um ensaio de triagem com 5 fungos endofíticos frente a 7 meios modificados com sais e compará-los com o controle Czapek;
- Escolher um fungo promissor, bem como 2 meios modificados para cultivá-los em maior escala;
- Realizar ensaios analíticos para escolha do tempo ótimo de cultivo, combinações de sais e susceptibilidade do fungo a diferentes concentrações de sais;
- Purificar os compostos dos quais verificou-se a modificações com relação ao controle Czapek;
- Elucidar os compostos por técnicas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e espectrometria de massas (EM).

3. Parte Experimental

3.0 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Materiais

3.1.1 Materiais utilizados para reativação e o repique dos fungos endofíticos

- Batata, dextrose, Ágar (BDA) - ACUMÉDIA®;
- Água destilada;
- Álcool 70%;
- Alça de platina;
- Bico de Bunsen;
- Lâmina de Bisturi;
- Placa Petri.

3.1.2 Materiais utilizados para o preparo do meio Czapek enriquecido com 2 % de extrato de levedura e dos meios modificados com sais

- Água destilada;
- Cloreto de cobalto (CoCl_2) (98%) - Synth;
- Cloreto de manganês (MnCl_2) (98 – 101%) - Synth;
- Cloreto de níquel (NiCl_2) (98%) - Synth;
- Cloreto de potássio (KCl) (99 – 100,5%) - Synth;
- Cloreto de zinco (ZnCl_2) (98%) - Synth;
- Brometo de potássio (KBr) (99,00 – 99,73%) - Neon;
- Extrato de levedura - Neogen;
- Fosfato de potássio (K_2HPO_4) (98%) - Synth;
- Glicose - Synth;
- Nitrato de sódio (NaNO_3) (97%) - Synth;
- Sulfato de ferro ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (99%) - Reagen;
- Sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (99%) - Synth.

3.1.3 Materiais utilizados para extração, fracionamento cromatográfico e ensaios analíticos

3.1.3.1 Solventes

- Solventes de padrão analítico (P.A.) e destilados DQ-UFSCar como acetato de etila (AcOEt), hexano (Hex), metanol (MeOH) das marcas Synth[®] e Neon[®], assim como ácido fórmico da marca PANREAC[®].
- Solventes grau Cromatografia de alta eficiência (CLAE) como MeOH, Acetonitrila (ACN) das marcas Honeywell[®], Tedia[®] e LiChrosolv[®] Reag. Ph Eur MERCK[®] e água ultra pura, purificada em sistema Milli-Q[®].

3.1.3.2 Colunas e fases estacionárias para cromatografia

- Sílica em gel 60 (70-230 Mesh) MERCK[®];
- Coluna cromatográfica analítica para CLAE: Luna Phenyl-Hexyl, 5 µm (250 x 4.60 mm) Phenomenex[®];
- Coluna analítica para Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (CLUE): C18, 1,7 µm (2.1 x 100 mm) WATERS[®] ACQUITY UPLC CSH;
- Coluna cromatográfica preparativa: Luna Phenyl-Hexyl, 10 µm (250 x 21,20 mm) Phenomenex[®];
- Coluna cromatográfica preparativa: C18, 10 µm (250 x 21,20 mm) Supelco[®].

3.1.3.3 Outros materiais

- Papel filtro qualitativo 80g diâmetro 11 e 15 cm – Unifil[®];
- Sulfato de sódio anidro P.A. – Synth[®] e MERCK[®].

3.2 Equipamentos

3.2.1 Equipamentos utilizados para o cultivo dos fungos endolíticos, preparo do meio de cultivo e ensaios analíticos

- Autoclave vertical - Phoenix A V 75 e Soc. FABBE 103;
- Balança analítica – Shimadzu®;
- Balança semi-analítica – Tecnal®;
- Biochemical Oxygen Demand - BOD – Tecnal®;
- Capela de fluxo laminar – VECO VLFS-12M;
- Estufa de secagem – FANEM 315-SE.

3.1.3 Equipamentos utilizados para extração e concentração de amostras

- Rotaevaporador com banho de aquecimento BÜCHI® B-480
- Rotaevaporador com banho de aquecimento QUIMIS®
- Bomba de vácuo TE – 0581 TECNAL®;
- Bomba de vácuo Primatec®;
- Capela;
- Speed Vac – RVC 2 – 33IR Christc®.

3.1.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência(CLAE)

As análises de CLAE foram desenvolvidas em dois equipamentos:

- Análise de CLAE em escala analítica: equipamento da Shimadzu® com a controladora SCL-10AVp, detector de arranjo de iodo (DAD) SPD – M10AVp, injetor automático SIL-10ADVp, duas bombas dos modelos LC-10AD, o desgaseificador DGU-14A e software CLASS-VP ;
- Análise de CLAE em escala preparativa: equipamento da Shimadzu® com a controladora CBM-20A, detector UV/Vis 20AV, injetor manual, duas bombas LC-20AP, desgaseificador DGU-20AS e software LC-Solution.

3.1.5 Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (CLUE-DAD)

Algumas análises das etapas analíticas ocorreram no equipamento CLUE-DAD AcquityH class Waters[®] com amostrador automático SDI, detector DAD, sistema de bombas quaternária de solvente e software de processamento de dados MassLynx V4.1.

3.1.6 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

As análises por RMN uni e bidimensionais foram desenvolvidas em dois equipamentos do DQ-UFSCar, ambos fabricados pela empresa Bruker[®]. Um deles foi o NanoBay[®] de 9,4 Tesla para frequência de 400 MHz de hidrogênio e sonda de 5 mm (smarte probe com *Automatic Tunning Matching Adjustment*, ATMA[®]). O outro equipamento foi o AVANCE III[®] de 14,1 Tesla, para frequência de hidrogênio de 600 MHz com cryo-sonda de 5 mm com ATMA.

Os solventes deuterados usados nos experimentos foram clorofórmio-D (CDCl₃) e metanol-D₄ (CD₃OD).

3.1.7 Espectrometria de Massas (EM)

As análises de espectrometria de massas foram desenvolvidas no equipamento de alta resolução da UNESP de Araraquara, sendo um equipamento do sistema CLUE-QTOF Waters[®], com a fonte de ionização eletrospray ESI, analisador de tempo de voo (TOF) e software MassLynx. As amostras foram submetidas a injeção direta no modo positivo e negativo de ionização, com energia de capilar de 2,0 kV, cone de voltagem de 30 V, temperatura da fonte 100 °C e temperatura do probe 200 °C.

Além disso, foi efetuada análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao Espectrometria de Massa, CLAE-EM, no laboratório de Produtos Naturais - PN – UFSCar. O cromatógrafo líquido é da Agilent technologies® 1200 G1316A. O espectrômetro de Massas é o triploquadrupolo API 2000, Applied Biosystems®. O software usado foi o Analyst 1.5. As análises foram desenvolvidas na coluna Luna Phenyl-Hexyl (5 µm), com gradiente de eluição de 35 a 100% de ACN em H₂O durante em 35 min. Esse solventes formam acidificados 0,1% de ácido fórmico. O volume de injeção usado de amostra foi de 10 µL e a vazão de 0,8 mL/min. Os constituintes foram detectados no modo positivo de ionização.

3.3 Metodologia

3.3.1 Reativação de linhagem de fungos estabelecidos para estudo de triagem

Um estudo de triagem foi efetuado com cinco linhagens de fungos endofíticos depositadas na Micoteca do Laboratório de Bioquímica Micromolecular de Microorganismo (LaBioMMi). Duas dessas linhagens escolhidas são selvagens e três são modificadas geneticamente.

As linhagens selvagens escolhidas para estudo foram *Penicillium brasilianum* (F1) e *Aspergillus aculeatus* (F5) isoladas das folhas e do córtex da raiz de *Melia azedarach*, respectivamente. Esse gênero pertence à família Meliaceae conhecida popularmente como lírio, lilás da Índia ou cinamomo (ARAÚJO et al., 2009; SANTOS e RODRIGUES FILHO, 2003).

Ainda, foram estabelecidos para o estudo, fungos geneticamente modificados, como o *P. brasilianum* Δpal (F2) (FILL et al., 2018), *P. brasilianum* ΔNRPS 23 (F3) e *P. brasilianum* ΔNRPS 07 (F4). Estas duas últimas linhagens foram submetidas a modificações genéticas durante o trabalho de pós – doutorado da Dr. Luciana de Sousa Amaral. As modificadas genéticas, nesses trabalhos, ocorreram a partir da deleção de genes como *Phenylalanine Ammonia Lyase* (ΔPAL) e a *NonRibosomal Peptide Synthetases* (ΔNRPS).

A partir da escolha dos fungos, foram determinados códigos para facilitar a identificação das cinco cepas fúngicas neste trabalho de dissertação. Os códigos estão ilustrados na Tabela 3.1, juntamente com os seus respectivos números LaBioMMi até o momento depositados na Micoteca.

Tabela 3.1 – Código usado para as cinco linhagens de fungos estudadas

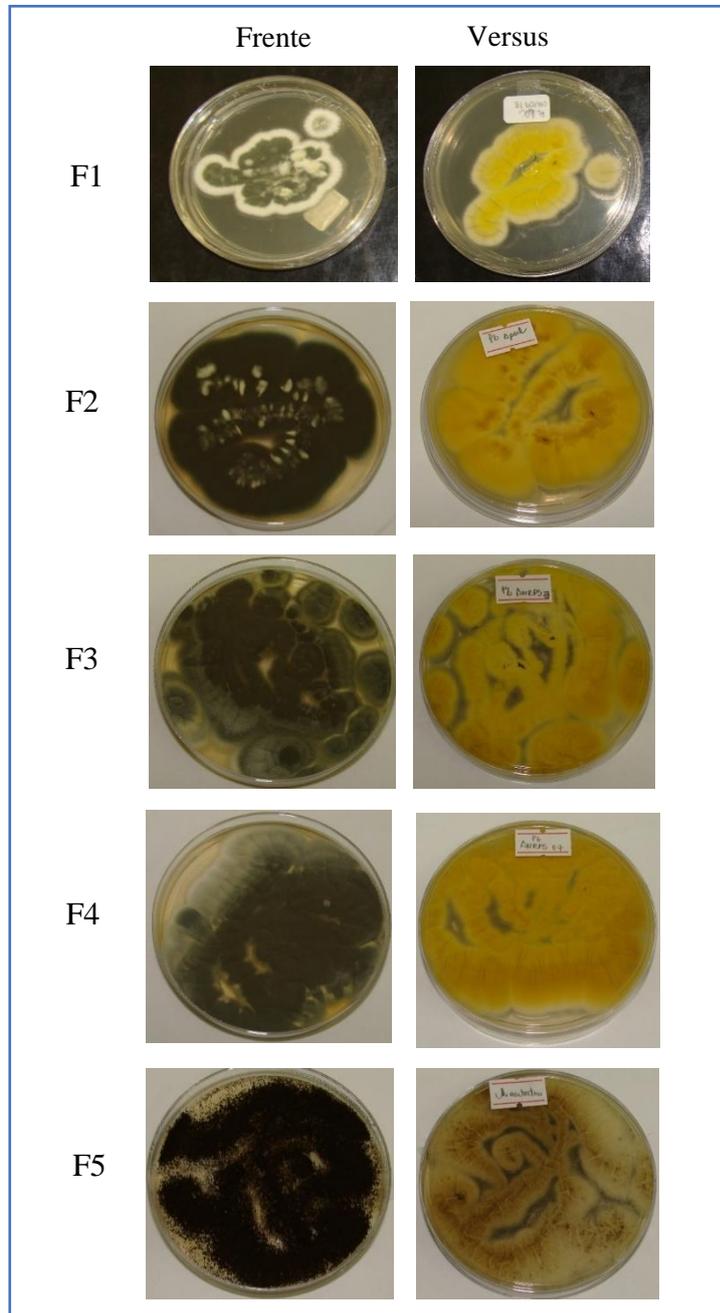
Código	Fungo	Número LaBioMMi
F1	<i>Penicillium brasilianum</i> selvagem	LaBioMMi 136
F2	<i>Penicillium brasilianum</i> Δpal	LaBioMMi 620
F3	<i>Penicillium brasilianum</i> ΔNRPS 23	-
F4	<i>Penicillium brasilianum</i> ΔNRPS 07	-
F5	<i>Aspergillus. aculeatus</i>	LaBioMMi 481

Fonte: Autor.

A reativação das linhagens foi realizada por meio da retirada do material celular de cada cultivo disposto a -20°C em solução aquosa contendo 20% de glicerol (Micoteca). Cada material celular foi depositado separadamente em uma placa Petri contendo meio sólido de Batata, Dextrose, Ágar (BDA). Posteriormente, as linhagens foram crescidas no meio sólido durante aproximadamente uma semana (Figura 3.1). Após esse período foi realizado o repique das linhagens em outra placa contendo BDA, para que em seguida fossem preparadas as conservas.

Os cultivos foram dispostos em suspensão de esporos, através do procedimento de raspagem de cada linhagem de fungo crescida em BDA com a alça de platina, e posteriormente o desprendimento dos esporos em 10 eppendorfs contendo 1,0 mL de água destilada previamente esterilizada em autoclave. As conservas foram armazenadas em temperatura ambiente. O material da conserva foram usados para os demais experimentos.

Figura 3.1 – Reativação das linhagens utilizadas no trabalho em meio BDA. F1= *P. brasilianum* selvagem, F2= *P. brasilianum* Δ pal, F3= *P. brasilianum* Δ NRPS 23, F4= *P. brasilianum* Δ NRPS 07 e F5= *A. aculeatus*



Fonte: Autor.

3.3.2 Meios de cultura modificados com sais inorgânicos estabelecidos para etapa de triagem

Para realizar o estudo de triagem definiu-se diferentes condições de cultivo, com o objetivo de avaliar a influência de diferentes aditivos inorgânico nas linhagens de *P. brasilianum* (F1 - F4) e *A. aculeatus* (F5).

Na Tabela 3.2 estão ilustrados os diferentes meios de cultivos determinados para o desenvolvimento do trabalho, que foram modificados a partir do meio líquido Czapek enriquecido com 2% de extrato de levedura, M_{0a}. Os meios modificados com sais inorgânicos foram diferenciados com base no aumento da concentração de sulfato de ferro nos meios M_{0b} e M_{0c}; na substituição do sulfato de ferro por aditivos clorados, como os sais MnCl₂, CoCl₂, NiCl₂ e ZnCl₂ nos meios M₁, M₂, M₃ e M₄, respectivamente; e na troca de sulfato de ferro por KBr no meio M₅.

Tabela 3.2 - Composição dos meios de cultivos em g/L variando os aditivos inorgânicos

Composição	M_{0a}	M_{0b}	M_{0c}	M₁	M₂	M₃	M₄	M₅
Glicose	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0
Extrato de levedura	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0
NaNO ₃	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
KCl	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
K ₂ HPO ₄	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
FeSO₄.7H₂O	0,01	0,1	1,0	-	-	-	-	-
MnCl₂	-	-	-	0,5	-	-	-	-
CoCl₂	-	-	-	-	0,5	-	-	-
NiCl₂	-	-	-	-	-	0,5	-	-
ZnCl₂	-	-	-	-	-	-	0,5	-
KBr	-	-	-	-	-	-	-	1,0

Fonte: Autor.

Antes do preparo dos meios líquidos foram realizadas as reativações e o repiques em meio BDA das cinco linhagens, a partir dos cultivos previamente preparados.

Todos os meios líquidos listados na Tabela 3.2, (M_{0a} , M_{0b} , M_{0c} e M_1 ao M_5) foram solubilizados separadamente em água destilada, em seguida 70 mL de cada meio foram distribuídos num frasco de Erlenmeyer de 250 mL para o cultivo em triplicata. A partir disso, todas as triplicatas foram esterilizadas em autoclave por 121°C e 1 atm, durante 15 minutos (Figura 3.2). Depois, aguardou-se três dias para avaliar algum indicio de contaminação e, então, foi realizado o inóculo dos fungos endofíticos através do recorte do micélio em placa, com o auxílio de um bisturi esterilizado na chama de um bico de Bunsen (AMARAL, 2014).

Após o inóculo, os fungos cresceram de forma estática nos diferentes meios, em temperatura ambiente, durante 14 dias (Figura 3.2). Neste período, foram observadas as diferenças morfológicas dos micélios das linhagens, bem como a coloração dos meios de cultivo. Após esse período de crescimento, foi interrompido o cultivo para realizar o procedimento de extração dos metabólitos secundários.

Figura 3.2 – Esquema das etapas de cultivo dos endófitos nos meios modificados com aditivos inorgânicos

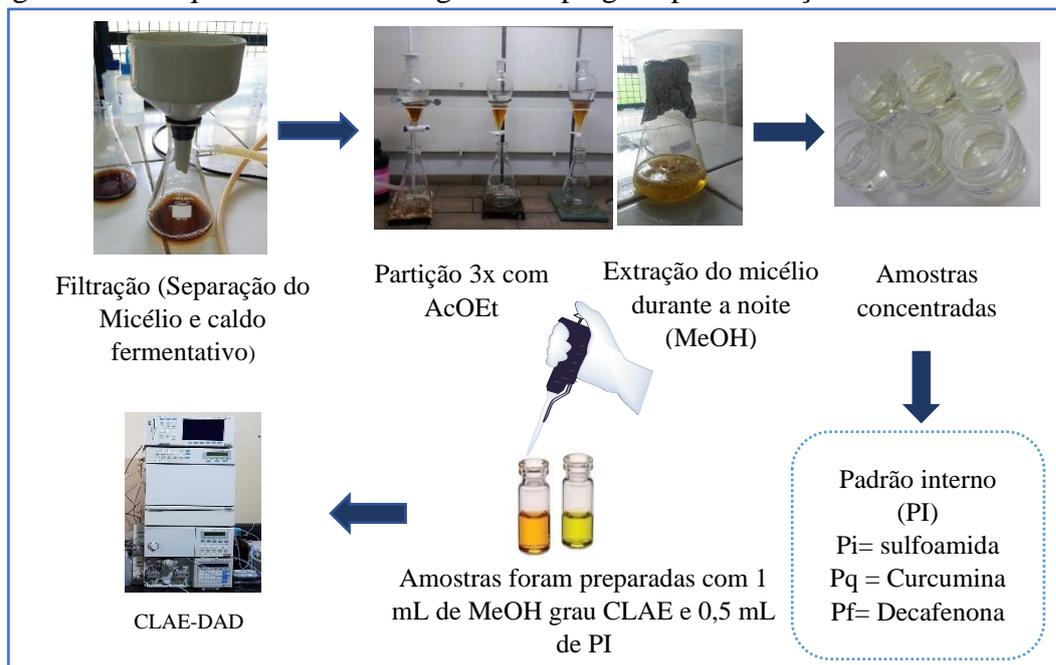


Fonte: Autor.

O procedimento de extração foi aplicado no micélio e no caldo fermentativo de formas distintas. O micélio foi separado do caldo fermentativo por filtração a vácuo, e posteriormente extraído com 70 mL de MeOH, grau P.A., durante o período da noite. O caldo fermentativo separado na filtração, foi extraído através do procedimento de partição com AcOEt (3 vezes com 70 mL). Em seguida, os extratos foram concentrados em rotaevaporador e submetidos a análise por CLAE-DAD.

O preparo da amostra consistiu na diluição de 1,0 mL do extrato com MeOH grau CLAE que foi transferido para um vial com capacidade para 2,0 mL. À cada vial foi adicionado também 0,5 mL de uma solução contendo os três padrões internos (PI) sulfonamida, curcumina e decafenona a 0,1 mg/mL cada (Figura 3.3).

Figura 3.3 – Esquema da metodologia de empregada para extração e análise dos extratos

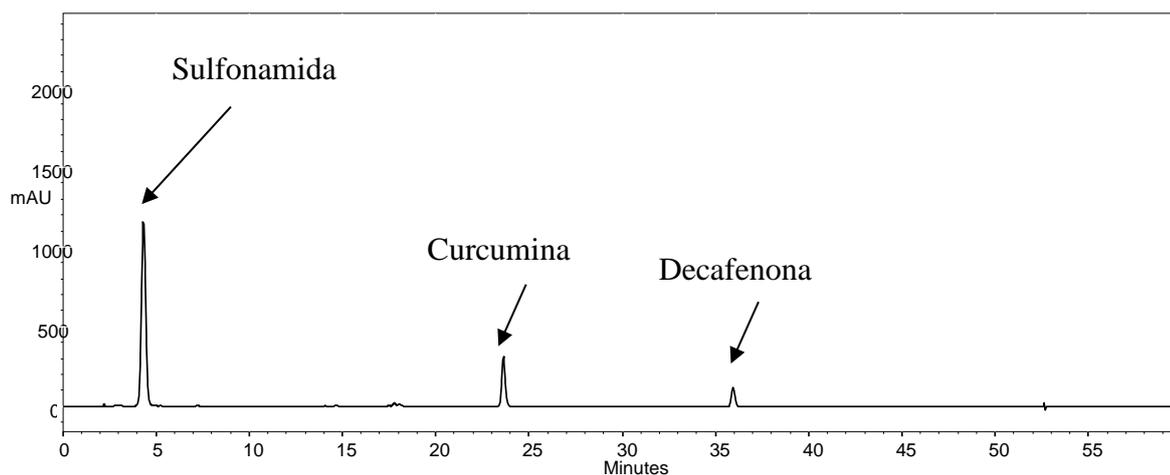


Fonte: Autor.

Os padrões internos foram utilizados no preparo de amostra para avaliar a reprodutibilidade dos dados por meio das comparações dos perfis cromatográficos dos extratos, usando os tempos de retenção desses três padrões

como parâmetro (sulfonamida= 4,5 min, curcumina= 23,9 min e decafenona= 35,9 min) em todos os extratos avaliados (Figura 3.4).

Figura 3.4- Cromatograma do padrões internos usados por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Luna Phenyl-Hexyl; 15 a 100% ACN:H₂O v/v a 0,8 mL/min 45 minutos; modo analítico) em 268 nm



Para análises por CLAE-DAD, foi utilizado o equipamento da Shimadzu[®], com a coluna analítica Luna Phenyl-Hexyl de 5 µm, no modo reverso de eluição. Foi empregado um gradiente linear exploratório de 15 a 100 % ACN:H₂O em 45 min, com uma vazão de 0,8 mL/min e o volume de injeção de amostra de 20 µL. Os tratamentos dos dados foram realizados usando o software CLASS-VP.

3.3.4 Ensaios em escala analítica

Após a análise dos perfis cromatográficos optou-se por cultivar em maior escala o fungo *Aspergillus aculeatus* (F5), juntamente com os meios modificados suplementados com sais halogenados como cloreto de cobalto (M₂) e brometo de potássio (M₅). Antes do cultivo em maior escala, foram efetuados três ensaios analíticos com o intuito de avaliar a tolerância de F5 a diferentes concentrações de sais dos meios suplementados com KBr e CoCl₂; a produção de

metabólitos secundários a partir da adição de sulfato de ferro ao meio contendo KBr; e a cinética de produção de metabólitos através do tempo ótimo de cultivo de F5.

3.3.4.1 Avaliação da tolerância de F5 em diferentes concentrações de sais dos meios suplementados com KBr e CoCl₂

Avaliou-se a produção de metabólitos secundários em seis diferentes concentrações de cloreto de cobalto e brometo de potássio em meio Czapek's, de acordo com a Tabela 3.3.

O preparo destes meios ocorreu de forma semelhante ao desenvolvido na etapa de triagem, de forma que foram preparadas triplicadas em frasco de Erlenmeyer de 250 mL contendo 70 mL de cada meio, solubilizados em água destilada.

O inóculo foi realizado através da retirada de 50 µL do material celular do cultivo de suspensão de esporo, com o propósito de obter maior reprodutibilidade dos dados. O fungo foi crescido, de forma estática, durante 5 e 9 dias para KBr e CoCl₂, respectivamente. Após ser interrompido o crescimento dos fungos, foi avaliada a massa micelial seca produzida em cada concentração de sal, além da quantidade de extrato AcOEt obtidos do caldo enzimático e o perfil de metabólitos secundários adquiridos desses extratos por CLUE-DAD.

Tabela 3.3 – Diferentes concentrações avaliadas no ensaio analítico

	<i>KBr</i>		<i>CoCl₂</i>	
	<i>g/L</i>	<i>Mol/L</i>	<i>g/L</i>	<i>Mol/L</i>
C₁	10	8,4.10 ⁻²	0,1	7,7.10 ⁻⁴
C₂	20	1,7.10 ⁻¹	1,0	7,7.10 ⁻³
C₃	40	3,4.10 ⁻¹	2,0	1,5.10 ⁻²
C₄	60	4,2.10 ⁻¹	8,0	6,2.10 ⁻²
C₅	80	6,7.10 ⁻¹	13,0	1,0.10 ⁻²
C₆	100	8,4.10 ⁻¹	15,0	1,2.10 ⁻²

Fonte: Autor.

A massa micelial foi separada do caldo enzimático através da filtração à vácuo com papéis filtros previamente pesados em balança analítica. Após a filtração, os micélios foram levados a uma estufa com controle de temperatura para secagem em 80 °C por 48h, em seguida pesou-se e quantificou-se a quantidade de micélio produzido. As massas foram registradas após a avaliação da estabilidade de massa seca por mais 24h.

O caldo enzimático separado foi submetido à partição com AcOEt grau P.A. (3 vezes com 70 mL cada). Com base nos extratos obtidos, foram avaliadas as quantidades de extrato AcOEt produzidas para as diferentes concentração de sais halogenados usados, por meio da pesagem dos extratos numa balança analítica. Posteriormente, foi preparada uma solução a 2,0 mg/mL de extrato em um vial com 0,03 mg/mL de padrões internos (PI), que foi analisada por CLUE-DAD.

As análises por CLUE-DAD foram feitas no equipamento Acquity UPLC da Waters[®], com a coluna analítica C18 de 1,7 µm, empregando o modo reverso de eluição e gradiente linear exploratório de 15 a 100 % ACN:H₂O durante 12min. Para estas análises, foi usada a vazão de 0,5 mL/min e volume de injeção de amostra de 5 µL.

3.3.4.2 Avaliação da influência da adição de sulfato de ferro ao meio contendo KBr

Realizou-se um ensaio com o intuito de avaliar, de forma qualitativa, a produção de metabólitos secundários no meio de cultivo contendo brometo de potássio na presença de sulfato de ferro (M-KBr-Fe) em comparação ao cultivo de F5 no meio suplementado com brometo de potássio sem a presença de sulfato de ferro (M-KBr), conforme ilustrado na Tabela 3.4.

Tabela 3.4 - Composição do meio de cultivo (g/L) utilizado para os testes qualitativos contendo KBr na presença de sulfato de ferro

Composição	M-KBr-Fe	M-KBr
Glicose	30,0	30,0
Extrato de levedura	20,0	20,0
NaNO ₃	3,0	3,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5	0,5
KCl	0,5	0,5
K ₂ HPO ₄	1,0	1,0
FeSO₄.7H₂O	0,01	-
KBr	100,0	100,0

Fonte: Autor.

Uma triplicata de cada meio preparada em água, esterilizados em autoclave, foi inoculada com 50 µL da suspensão de esporos.

Os cultivos de M-KBr-Fe e M-KBr foram efetuados de modo estático, durante o período de 14 dias. Em seguida, foi realizada a extração do micélio e do caldo fermentativo por meio da mesma metodologia de extração realizada anteriormente (Figura 3.2), obtendo-se os extratos AcOEt e MeOH.

As soluções dos extratos MeOH e AcOEt, a 2,0 mg/mL, contendo 0,03 mg/mL de PI, foram analisadas por CLAE-DAD. O método empregado na análise foi o método de gradiente linear exploratório de 15 a 100 % ACN:H₂O, com a vazão de 0,8 mL/min e volume de injeção de amostra de 20 µL.

3.3.4.3 Avaliação do tempo ótimo de cultivo do fungo

Um estudo cinético foi conduzido para avaliar a produção de metabólitos secundários produzidos no micélio e no caldo fermentativo em dois estágios de crescimento de *A. aculeatus*, sendo o período antes de esporular com 4 dias de cultivo e após esporular com 14 dias de cultivo. As análises foram feitas usando CLUE-DAD.

O cultivo se desenvolveu nos meios modificados com 100 g/L de KBr e 2 g/L de CoCl_2 , em triplicata, com o crescimento da linhagem de forma estática, durante o tempo de 4 e 14 dias. Depois desses períodos, o crescimento do fungo foi interrompido e os metabólitos secundários foram extraídos através do mesmo método de extração aplicado nas etapas anteriores (Figura 3.2).

Os extratos AcOEt e MeOH obtidos foram analisados por CLUEDAD, usando amostra a uma concentração de 2 mg/mL dos extrato contendo uma solução de 0,03 mg/mL de PI.

As análises foram efetuadas no equipamento Acquity UPLC da Waters®, com a coluna analítica C18 de 1,7 μm , aplicando um gradiente linear exploratório de 15 a 100 % ACN em H_2O durante 12 min. A separação cromatográfica foi efetuada numa vazão de 0,4 mL/min e um volume de injeção de amostra de 5 μL .

3.3.5 Cultivo em larga escala KBr e CoCl_2

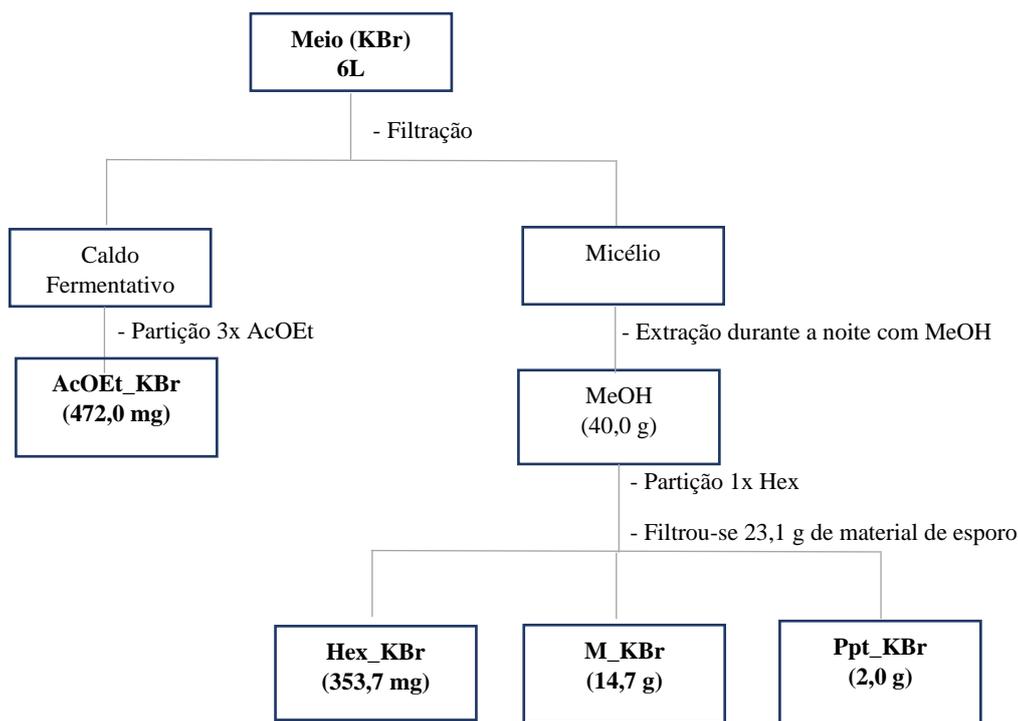
A partir das condições ótimas de cultivo, preestabelecidas pelos testes analíticos, foi sucedido o cultivo em larga escala de 6 L de meios líquidos Czapek suplementados com KBr (10 g/L) e CoCl_2 (2 g/L). O cultivo desenvolveu-se em 40 frascos de Erlenmeyer de 500 mL, contendo 150 mL de meio de cultura cada. O fungo foi inoculado e crescido durante o período de 14 dias. Após este tempo, foi realizada a extração dos 6 L do caldo fermentativo e do micélio pela mesma metodologia de extração desenvolvidas anteriormente (Figura 3.1), que originou os extratos AcOEt e MeOH.

O extrato (MeOH), obtido do micélio desse cultivo em larga escala, continha ainda esporos. Então, esse extrato foi submetido a mais uma purificação. O extrato extratos metanólico foi solubilizados em MeOH e submetidos a uma filtração sob vácuo para retirada do esporo contido nele. Posteriormente, foi efetuada mais uma filtração com papel filtro pregueado, e em seguida o filtrado

adquirido foi submetido à partição com Hex para retirada de qualquer material lipofílico, o qual ainda poderia estar contido no extrato metanólico.

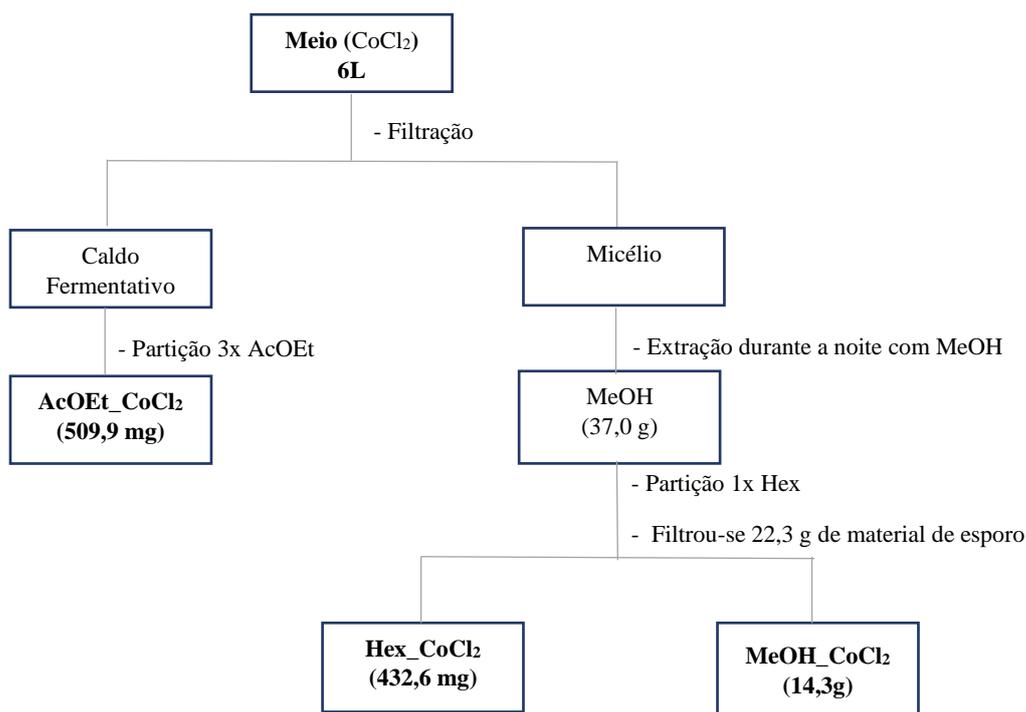
À medida que realizou-se a partição com hexano, foram gerados os extratos hexânico, metanólico e um precipitado para o extrato do micélio suplementado com KBr, conforme apresentado no Esquema 3.1. Ao empregar o mesmo procedimento de partição para o extrato metanólico obtido do cultivo com CoCl_2 , não foi observada a formação de um precipitado, mas a formação do extrato hexano e metanólico, de acordo com o Esquema 3.2. Os rendimentos dos extratos obtidos para o cultivo em KBr e CoCl_2 estão ilustrados no Esquema 1 e 2, de modo respectivo.

Esquema 3.1 – Rendimentos dos extratos obtidos no cultivo em larga escala de KBr



Fonte: Autor.

Esquema 3.2 – Rendimentos dos extratos obtidos no cultivo em larga escala de CoCl_2



Fonte: Autor.

3.3.5.1 Estudo da Fração MeOH_KBr

O extrato metanólico da fração MeOH_KBr foi sujeito a uma pré-purificação por meio de uma coluna, sob vácuo, em que utilizou-se uma fase estacionária de sílica gel ($\varnothing = 5,0$ cm, $h = 15$ cm; 163,4 g de sílica), empregando uma eluição gradiente de fase móvel (Hex, AcOEt e MeOH), e aplicando 14,7 g de amostra. As frações obtidas, bem como as proporções da fase móveis empregadas no procedimento de purificação, estão ilustradas na Tabela 3.5.

Tabela 3.5 – Frações obtidas a partir da purificação do extrato MeOH_KBr em sílica gel

Eluente	Frações	Massa (g)
Hex:AcOEt (9:1) 0,3% AF	MeOH_KBr_A	0,022
Hex:AcOEt (7:3) 0,3% AF	MeOH_KBr_A'	0,081
Hex:AcOEt (1:1) 0,3% AF	MeOH_KBr_B	0,115
AcOEt (100%) 0,3% AF	MeOH_KBr_C	0,158
AcOEt: MeOH (9:1)	MeOH_KBr_D	0,204
AcOEt: MeOH (7:3)	MeOH_KBr_E	3,06
AcOEt: MeOH (1:1)	MeOH_KBr_F	2,49
MeOH (100%)	MeOH_KBr_G	2,30

AF= Ácido Fórmico.

Fonte: Autor.

As frações (3,0 mg/mL) foram submetidas a avaliação analítica de metabólitos por meio da análise por cromatografia no equipamento analítico CLAE-DAD da Shimadzu[®], utilizando uma coluna analítica Luna Phenyl-Hexyl de 5 µm, no modo reverso de eluição. Foi aplicando um gradiente linear exploratório de 15 a 100 % de ACN em H₂O com a vazão de 0,8 mL/min, e injetado um volume de 20 µL de amostra.

A partir das comparações dos perfis cromatográficos, optou-se por realizar a purificação em escala preparativa das frações que apresentavam componentes diferentes do controle, como as frações MeOH_KBr_C, MeOH_KBr_D e MeOH_KBr_E.

Inicialmente, as frações escolhidas para isolamento foram analisadas por CLAE-DAD analítico, para se obter condições cromatográficas para purificá-las em escala preparativa.

3.3.5.1.1 Estudo da Fração MeOH_KBr_C

A fração MeOH_KBr_C (138 mg) foi submetida a purificação em escala preparativa no equipamento CLAE da Shimadzu[®], com detector DAD ($\lambda =$

277 e 293 nm), usando uma coluna Luna Phenyl-Hexyl (250 x 21,20 mm; 10 μ), empregando um gradiente linear de 30 a 90% ACN em H₂O por 60 minutos e vazão de 8,0 mL/min.

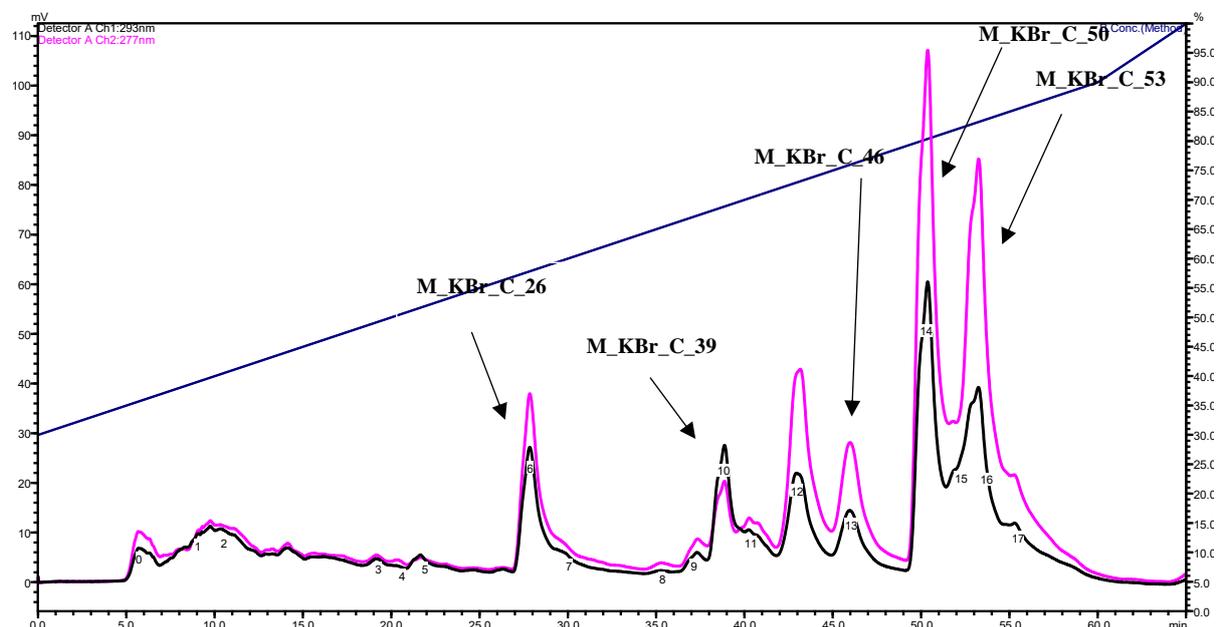
Desse fracionamento coletou-se 15 frações, descritas na Tabela 3.6, que foram analisadas por RMN de ¹H a 400 MHz. A partir dos dados obtidos optou-se por estudar as substâncias M_KBr_C_26, M_KBr_C_39, M_KBr_C_46 e M_KBr_C_50 que estão destacadas na cromatograma da Figura 3.5. As substâncias isoladas foram elucidadas pelas técnicas espectroscópica de RMN 2D e massas de alta resolução.

Tabela 3.6 – Frações obtidas por CLAE-DAD em escala preparativa da fração MeOH_KBr_C

Fração	t_R(min.)	Massa (mg)	Substância isolada
M_KBr_C_5,5	4,0 – 5,5	10,9	
M_KBr_C_10	10,0	4,7	
M_KBr_C_12	12,0	2,8	
M_KBr_C_15	15,0	3,6	
M_KBr_C_25	25,0	0,3	M_KBr_C_26
M_KBr_C_26	26,0	2,6	
M_KBr_C_35	35,0	0,4	
M_KBr_C_37	37,0	0,1	
M_KBr_C_37	39,0	1,7	M_KBr_C_39
M_KBr_C_43	43,0	1,8	
M_KBr_C_46	46,0	1,3	M_KBr_C_46
M_KBr_C_50	50,0	2,8	M_KBr_C_50
M_KBr_C_52	52,0	1,3	
M_KBr_C_53	53,0	2,2	M_KBr_C_53
Limpeza	65,5- 80	20,0	

Fonte: Autor.

Figura 3.5 – Perfil cromatográfico (coluna Phenomenex Luna Phenyl-Hexyl; gradiente 30 a 90% ACN:H₂O v/v a 8,0 mL/min; 60 minutos; modo preparativo; $\lambda = 277$ e 293 nm) da fração **MeOH_KBr_C**



Fonte: Autor.

3.3.5.1.2 Estudo da Fração MeOH_KBr_D

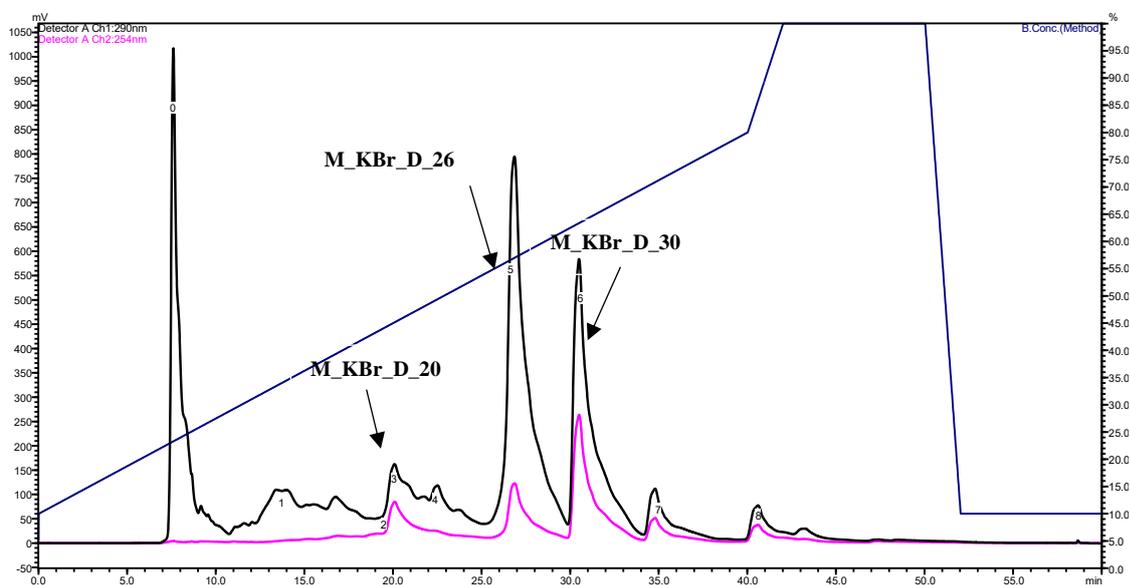
Para fração MeOH_KBr_D (180,4 mg) o isolamento em escala preparativa foi feito também no equipamento CLAE da Shimadzu[®], com detector de UV/Vis ($\lambda = 254$ e 290 nm), e utilizando a coluna Luna Phenyl-Hexyl (250 x 21,20 mm; 10 μ). Foi aplicado um gradiente linear de 10 a 80% ACN em H₂O durante 40 minutos e operado uma vazão de 8,0 mL/min. Obteve-se as 9 frações descritas na Tabela 3.7, que foram analisadas por RMN de ¹H. Conforme os resultados obtidos, decidiu-se estudar as substâncias M_KBr_D_20, M_KBr_D_26 e M_KBr_D_30 (Figura 3.6.). Essas substâncias isoladas foram submetidas a análise por RMN 2D e espectrometria de massas para identificação das suas estruturas moleculares.

Tabela 3.7 – Frações obtidas por CLAE-DAD em escala preparativa da fração MeOH_KBr_D

Fração	tr(min.)	Massa (mg)	Substância isolada
M_KBr_D_7,0	0 - 7,0	2,1	
M_KBr_D_12,5	12,5	0,4	
M_KBr_D_20	20,0	1,1	M_KBr_D_20
M_KBr_D_22,5	22,5	0,1	
M_KBr_D_26	26,0	2,2	M_KBr_D_26
M_KBr_D_30	30,0	2,2	M_KBr_D_30
M_KBr_D_35	35,0	0,3	
M_KBr_D_41	41,0	0,7	
Limpeza	42,0 – 50,0	30,0	

Fonte: Autor

Figura 3.6 – Perfil cromatográfico (coluna Phenomenex Luna Phenyl-Hexyl; gradiente 10 a 80% ACN:H₂O v/v a 8,0 mL/min; 40 minutos; modo preparativo; $\lambda = 254$ e 290 nm) da fração MeOH_KBr_D



Fonte: Autor

3.3.5.1.3 Estudo da Fração MeOH_KBr_E

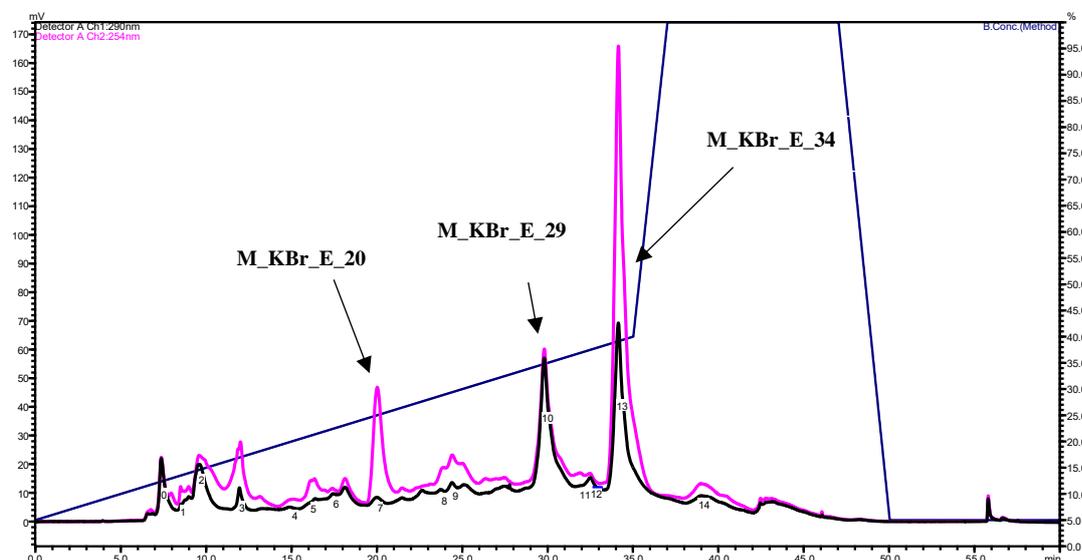
A fração MeOH_KBr_E (2,0 g) foi sujeita a análise de CLAE em escala preparativa, conforme as separações anteriores, usando um gradiente linear de 5 a 40% ACN:H₂O por 35 minutos e vazão de 8,0 mL/min. Foram coletadas 15 frações (Tabela 3.8), que ao serem analisadas por RMN de ¹H. Optou-se por estudar as substâncias M_KBr_E_20, M_KBr_E_29 e a M_KBr_E_34, destacadas no cromatograma da Figura 3.7. As substâncias isoladas foram submetidas a análise por RMN 2D e espectrometria de massas.

Tabela 3.8 – Frações obtidas por CLAE-DAD em escala preparativa da fração MeOH_KBr_E

Fração	tr(min.)	Massa (mg)	Substância isolada
M_KBr_E_5,0	0– 5,0	2,0	
M_KBr_E_7,5	7,5	319,4	
M_KBr_E_9,0	9,0	17,6	
M_KBr_E_10	10,0	8,2	
M_KBr_E_12	12,0	3,4	
M_KBr_E_15	15,0	1,9	
M_KBr_E_17	17,0	2,1	
M_KBr_E_18	18,0	4,2	
M_KBr_E_20	20,0	1,6	M_KBr_E_20
M_KBr_E_24	24,0	0,6	
M_KBr_E_29	29,0	0,7	M_KBr_E_29
M_KBr_E_32	32,0	30,7	
M_KBr_E_34	34,0	3,3	M_KBr_E_34
M_KBr_E_39	39,0	1,4	
Limpeza	40,0 – 50,0	10,0	

Fonte: Autor.

Figura 3.7 – Perfil cromatográfico (coluna Phenomenex Luna Phenyl-Hexyl; gradiente 5 a 40% ACN:H₂O v/v a 8,0 mL/min; 35 minutos; modo preparativo; $\lambda = 254$ e 290 nm) da fração **MeOH_KBr_E**



Fonte: Autor.

3.3.5.2 Estudo da fração MeOH_CoCl₂

Uma quantidade de 14 g extrato metanólico particionado (MeOH_CoCl₂), obtido do micélio, foi submetido a uma purificação em sílica gel, sob vácuo, ($\varnothing = 5,0$ cm, h = 15 cm, massa da sílica = 164 g) e utilizando como fases móveis no modo gradiente de eluição os solventes Hex, AcOEt e MeOH. As frações coletadas com suas proporções de fase móveis utilizadas no procedimento de purificação estão ilustradas na Tabela 3.9.

Tabela 3.9 – Frações obtidas a partir da purificação do extrato MeOH_CoCl₂ em sílica gel

Eluente	Frações	Massa (g)
Hex:AcOEt (9:1) 0,3% AF	MeOH_CoCl ₂ _A	0,077
Hex:AcOEt (7:3) 0,3% AF	MeOH_CoCl ₂ _A'	0,136
Hex:AcOEt (1:1) 0,3% AF	MeOH_CoCl ₂ _B	0,230
AcOEt (100%) 0,3% AF	MeOH_CoCl₂_C	0,200
AcOEt: MeOH (9:1)	MeOH_CoCl ₂ _D	0,288
AcOEt: MeOH (7:3)	MeOH_CoCl ₂ _E	2,13
MeOH (100%)	MeOH_CoCl ₂ _F	7,40

Fonte: Autor.

As frações obtidas foram analisadas em CLAE-DAD da Shimadzu[®], com a coluna analítica Luna Phenyl-Hexyl de 5 µm, no modo reverso de eluição, empregando o gradiente linear exploratório de 15 a 100 % ACN:H₂O durante 45min e vazão de 0,8 mL/min. O volume de injeção aplicado para análise foi de 20 µL. Os extratos foram analisados a uma concentração de 3,0 mg/mL.

Quando avaliou-se os perfis cromatográficos juntamente com os espectros de UV/Vis de cada fração, verificou-se que a fração MeOH_CoCl₂_C deveria ser escolhida para estudo, pois esta fração apresentou um componente que se diferenciava do controle.

Antes de partir para o isolamento, as condições cromatográficas empregadas para separação em escala preparativa foram estudadas no CLAE-DAD analítico da Shimadzu[®].

3.3.5.2.1 Estudo da fração MeOH_CoCl₂_C

Uma quantidade de 180 mg da fração MeOH_CoCl₂_C foi submetida à análise por CLAE, em escala preparativa, com detector de UV/Vis ($\lambda = 257$ e 285 nm), usando uma coluna C18 (250 x 21,20 mm; 10 µm) SUPELCO[®], com

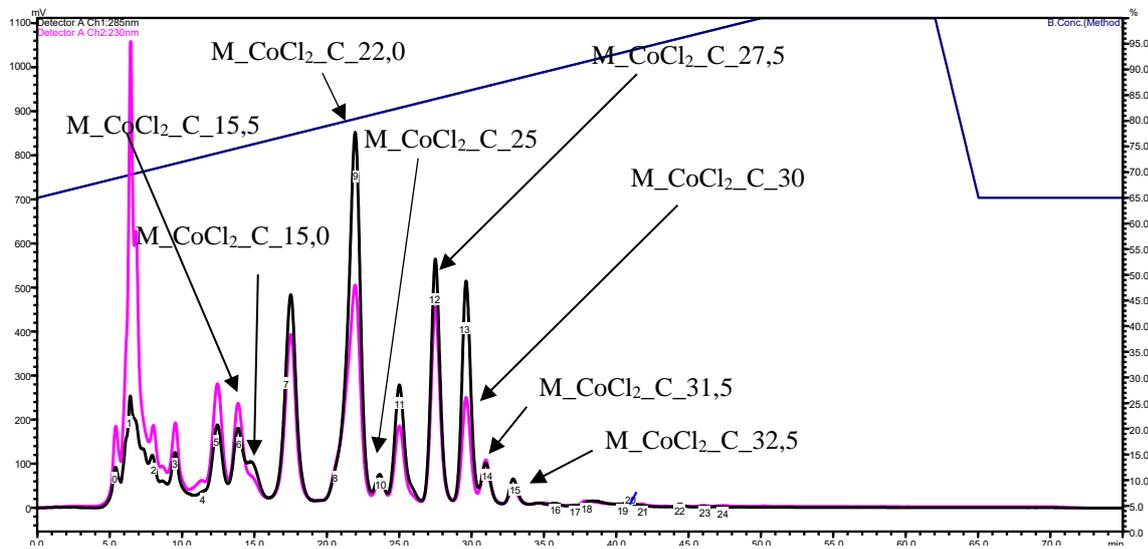
gradiente linear de 65 a 100% MeOH:H₂O durante 50 minutos, e com vazão de 8,0 mL/min. Deste fracionamento, foram coletadas 24 frações (Tabela 3.10) que, ao serem submetidas a análise por RMN de ¹H, pode-se observar a purificação das substâncias M_CoCl₂_C_15,0, M_CoCl₂_C_15,5, M_CoCl₂_C_22, M_CoCl₂_C_27,5, M_CoCl₂_C_30, M_CoCl₂_C_31,5 e M_CoCl₂_C_32,5 conforme destacado no cromatograma da Figura 3.8. Estas substâncias foram submetidas a análise por RMN bidimensional.

Tabela 3.10 – Frações obtidas por CLAE-DAD em escala preparativa da fração MeOH_CoCl₂_C

Fração	tr(min.)	Massa (mg)	Substância isolada
M_CoCl ₂ _C_5,5	0– 5,5	22,0	
M_CoCl ₂ _C_6,5	6,5	23,1	
M_CoCl ₂ _C_9,5	9,5	1,0	
M_CoCl ₂ _C_10,5	10,5	9,9	
M_CoCl ₂ _C_15	15,0	1,6	M_CoCl₂_C_15,0
M_CoCl ₂ _C_15,5	15,5	1,7	M_CoCl₂_C_15,5
M_CoCl ₂ _C_17	17,0	1,7	
M_CoCl ₂ _C_18	18,0	3,4	
M_CoCl ₂ _C_22	22,0	1,0	M_CoCl₂_C_22,0
M_CoCl ₂ _C_22,5	22,5	1,3	
M_CoCl ₂ _C_25	25,0	0,9	
M_CoCl ₂ _C_26	26,0	1,4	
M_CoCl ₂ _C_27,5	27,5	11,2	M_CoCl₂_C_27,5
M_CoCl ₂ _C_30	30,0	2,1	M_CoCl₂_C_30,0
M_CoCl ₂ _C_31,5	31,5	0,8	M_CoCl₂_C_31,5
M_CoCl ₂ _C_32,5	32,5	1,2	M_CoCl₂_C_32,5
M_CoCl ₂ _C_36	36,0	0,4	
M_CoCl ₂ _C_38	38,0	0,5	
M_CoCl ₂ _C_41	41,0	0,5	
M_CoCl ₂ _C_42	42,0	0,4	
M_CoCl ₂ _C_45	45,0	0,1	
M_CoCl ₂ _C_46	46,0	0,2	
M_CoCl ₂ _C_50	50,0	0,2	
limpeza	55,0 – 65,0	30,0	

Fonte: Autor.

Figura 3.8 – Perfil cromatográfico (coluna Sulpelco C-18; gradiente 65 a 100% MeOH:H₂O v/v a 8,0 mL/min 50 minutos; modo preparativo; $\lambda = 230$ e 285 nm) da fração **MeOH_CoCl₂_C**



Fonte: Autor.

4. Resultados e discussão

4.1 Triagem

4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Influência dos sais halogenados no cultivo de F1, F2, F3, F4 e F5

4.1.1 Avaliação das diferenças morfológicas apresentadas no cultivo dos fungos endofíticos

Ao observar o crescimento dos microrganismos expostos aos sais halogenados durante 14 dias, foram notadas diferenças na coloração do micélio, bem como nas tonalidades dos meios líquidos de cultivo, nas linhagens de *P. brasilianum* (F1 ao F4). Porém, tais modificações não ficaram tão evidentes nos cultivos de *A. aculeatus*.

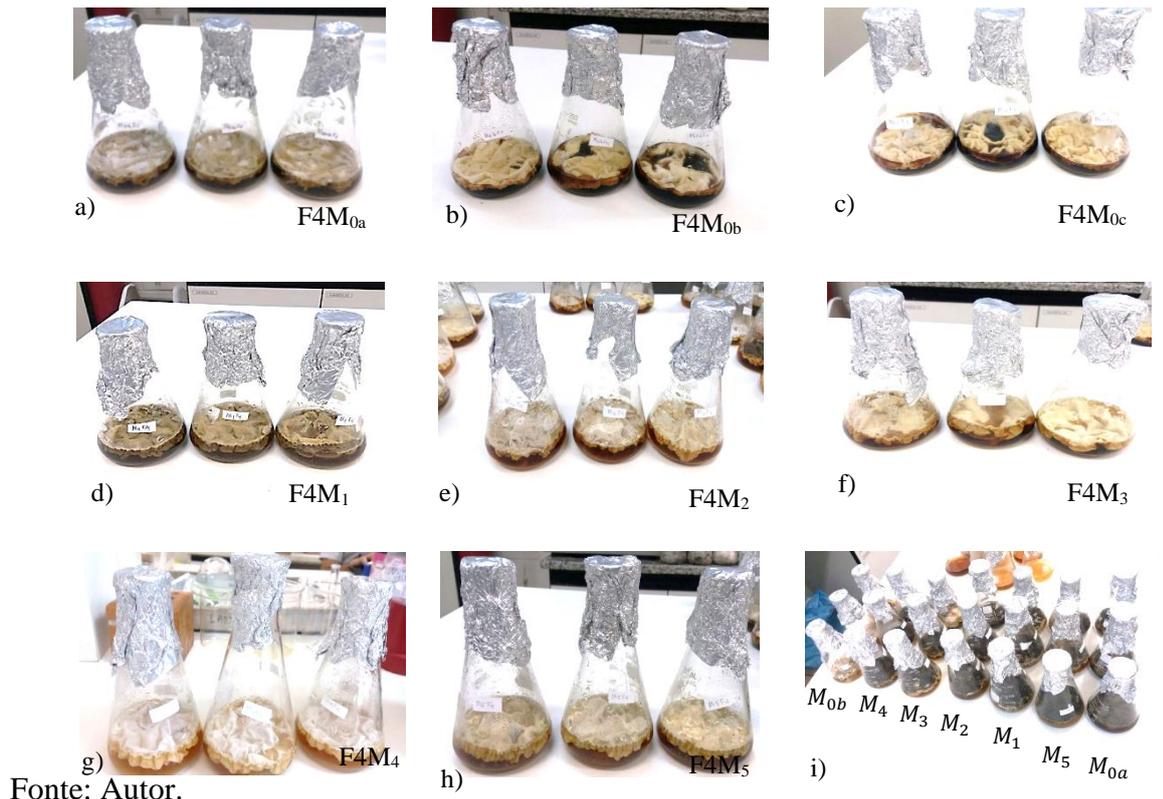
Na Figura 4.1, estão destacadas fotos do experimento de triagem, com 14 dias de crescimento de *P. brasilianum* ΔNRPS 07 (F4). As demais linhagens do gênero *Penicillium* (F1, F2 e F3) manifestaram as mesmas modificações morfológicas à medida que cresciam na presença dos diferentes sais (Czapek's modificados).

O controle Czapek padrão apresentou-se com desenvolvimento de duas cores no micélio (amarelo claro e branco) F4M_{0a} e o caldo enzimático com uma tonalidade amarela (Figura 4.1, a). Logo, ao efetuar a comparação do cultivo do controle com os demais sais, foram verificadas as mesmas características físicas apresentadas por ele no meio suplementado com CoCl₂ (F4M₂ (Figura 4.1, e).

Observaram-se características diferentes para os crescimentos nos meios contendo maiores concentrações de sulfato de ferro (F4M_{0b} e F4M_{0c}), a partir do crescimento do micélio com uma coloração amarela intensa e do caldo enzimático com uma tonalidade vinho (Figura 4.1, b e c). Uma diferença bastante perceptível foi verificada no desenvolvimento do micélio esbranquiçado e sem formação de esporo no meio contendo ZnCl₂, F4M₄ (Figura 4.1, g). Outras modificações observadas no micélio foram examinadas nos meios suplementados com MnCl₂ (F4M₁), NiCl₂ (F4M₃) e KBr (F4M₄) que exibiram um micélio esverdeado (Figura 4.1, d), amarelo intenso (Figura 4.1, f) e amarelo claro

(Figura 4.1, g), respectivamente. Porém, todos eles apresentaram um caldo fermentativo amarelo.

Figura 4.1 – Cultivo de *P. brasilianum* ΔNRPS 07 (F4). a) controle Czapek enriquecido com 2% de extrato de levedura e os meios modificados com b) 0,1 g/L FeSO₄, c) 1,0 g/L FeSO₄, d) MnCl₂, e) CoCl₂, f) NiCl₂, g) ZnCl₂, h) KBr e i) *A. aculeatus* (F5) durante 14 dias



Fonte: Autor.

Dessa forma, pode-se relacionar as diferenças das colorações exibidas no crescimento de *P. brasilianum* com a atuação dos metais (Fe²⁺, Mn²⁺, Co²⁺, Ni²⁺ e Zn²⁺) como cofatores de proteínas que podem ser responsáveis pelos processos de transferência de elétrons através de reações redox. Essas proteínas podem atuar doando elétrons- π ou pares de elétrons- n para quelação desses metais, promovendo o processo de transferência de elétrons, conforme relatado na literatura. Por exemplo, para diferentes grupos *hemes* nos citocromos, quando complexados com diferentes metais, exibem diferentes absorções no espectro do ultravioleta visível (LIU et al., 2014).

Percebeu-se ainda, uma inibição do crescimento de *A. aculeatus* (F5) nos meios contendo maiores concentrações de sulfato de ferro. Não se observou crescimento do fungo no meio suplementado com 1,0 g/L de FeSO₄ (M_{0c}), bem como, pouco desenvolvimento desse micro-organismo no meio contendo 0,1 g/L de FeSO₄ (M_{0b}).

Assim, esta linhagem demonstrou ser pouco tolerante ao cátion Fe²⁺. Essa intolerância pode ser atribuída ao fato do Fe²⁺ interferir em processos enzimáticos que são essenciais para o desenvolvimento do fungo. Outra explicação seria a capacidade de aceitar e doar pares de elétron desse metal que acarretaria, portanto, na interconversão da forma ferrosa (Fe³⁺) em férrica (Fe²⁺) ou vice versa. A partir desse processo, o Fe²⁺ pode se torna tóxico aos tecidos celulares, por formar radicais livres, a partir do peróxido de hidrogênio que seria o catalisador do processo de oxidação em Fe³⁺ (BENITE; MACHADO, 2002).

Quando foram avaliados os demais meios (M₁ ao M₅), não foram observadas diferenças no desenvolvimento do micélio e nas tonalidades dos meios (Figura 4.1, i).

4.1.2 Avaliação das mudanças apresentadas na produção de metabólitos na etapa de triagem

4.1.2.1 *P. brasilianum*

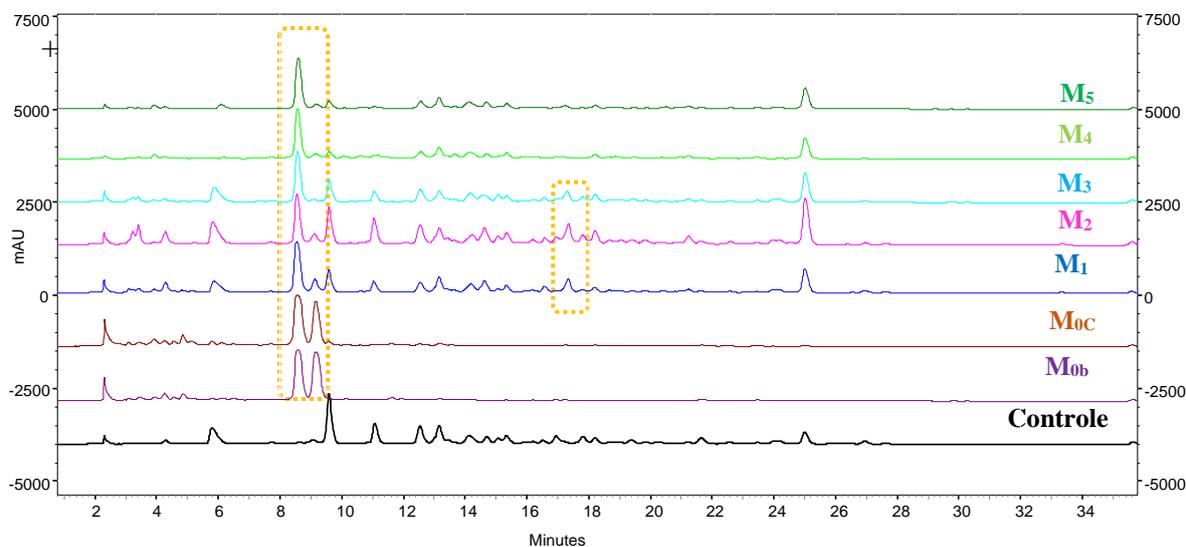
Além das diferenças observadas durante o crescimento das linhagens de *P. brasilianum* na etapa de triagem, foram verificadas também modificações nas repostas dos fungos endofíticos para produção de metabólitos ao variar os aditivos inorgânicos, através da análise por CLAE-DAD. Tais mudanças na produção de metabólitos, foram percebidas nos extratos AcOEt, obtidos do caldo fermentativo. Ao examinar a produção de metabólitos nos extratos metanólicos,

obtidos dos micélios, não foram perceptíveis diferenças na produção de substâncias entre os meios modificados e o controle.

A Figura 4.2, ilustra as diferenças observadas nos perfis cromatográficos obtidos do extrato AcOEt da linhagem selvagem de *Penicillium brasilianum* (F1), cultivados em diferentes meios. Foi verificada a produção de dois novos compostos detectáveis entre 8 a 10 min, sendo os componentes majoritários produzidos nos meios contendo maiores concentrações de FeSO₄ (M_{0b} e M_{0c}). Os espectros de absorção no UV/Vis dessas substâncias exibiram absorção máxima na região de 220 nm (Figura 4.3, a). Esses dois constituintes foram também, produzidos nos meios contendo sais halogenados do M₁ ao M₅. Além disso, nesses meios notou-se a produção de compostos de média polaridade que apareciam também no controle, não sendo, portanto, suprimida a rota desses componentes nos meios suplementados com sais halogenados, como foi observado no meio contendo maiores concentrações de FeSO₄.

Para o cultivo com MnCl₂ (M₁), CoCl₂ (M₂) e NiCl₂ (M₃) observou-se a presença de um composto de média polaridade em 17,50 min, que não estava presente no controle. A Figura 4.3, b, apresenta o espectros de absorção no UV/Vis, da substância eluída em 17,50 min, mostrando absorção em 220 e 260 nm.

Figura 4.2 – Cromatogramas dos extratos AcOEt obtido do cultivo de *P. brasilianum selvagem* (F1) por CLAE-DAD (colula: Phenomenex Luna Phenyl-Hexyl; 15 a 100% ACN:H₂O v/v a 0,8 mL/min 45 minutos; modo analítico) em 235 nm.



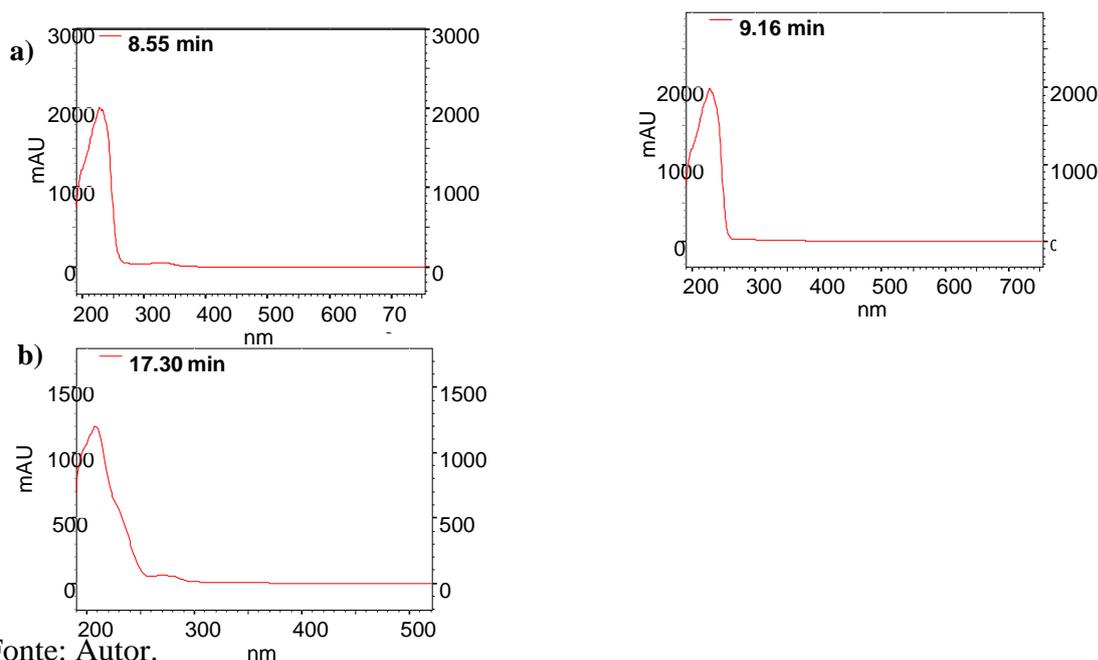
Legenda

Compostos de indução: (dashed yellow line)

Meios: M_{0a}= FeSO₄·7H₂O a 0,01 g/L, M_{0b}= FeSO₄·7H₂O a 0,1 g/L, M_{0c}= FeSO₄·7H₂O a 1,0 g/L, M₁= MnCl₂ a 0,5 g/L, M₂= CoCl₂ a 0,5 g/L, M₃= NiCl₂ a 0,5 g/L, M₄= ZnCl₂ a 0,5 g/L e M₅= KBr a 1,0 g/L

Fonte: Autor.

Figura 4.3 – Espectros de UV/Vis dos componentes de indução de F1 observados nos meios a) M_{0b} e M_{0c} nos tempos de 8 a 10 min e b) composto de média polaridade presentes nos meios M₁, M₂ e M₃



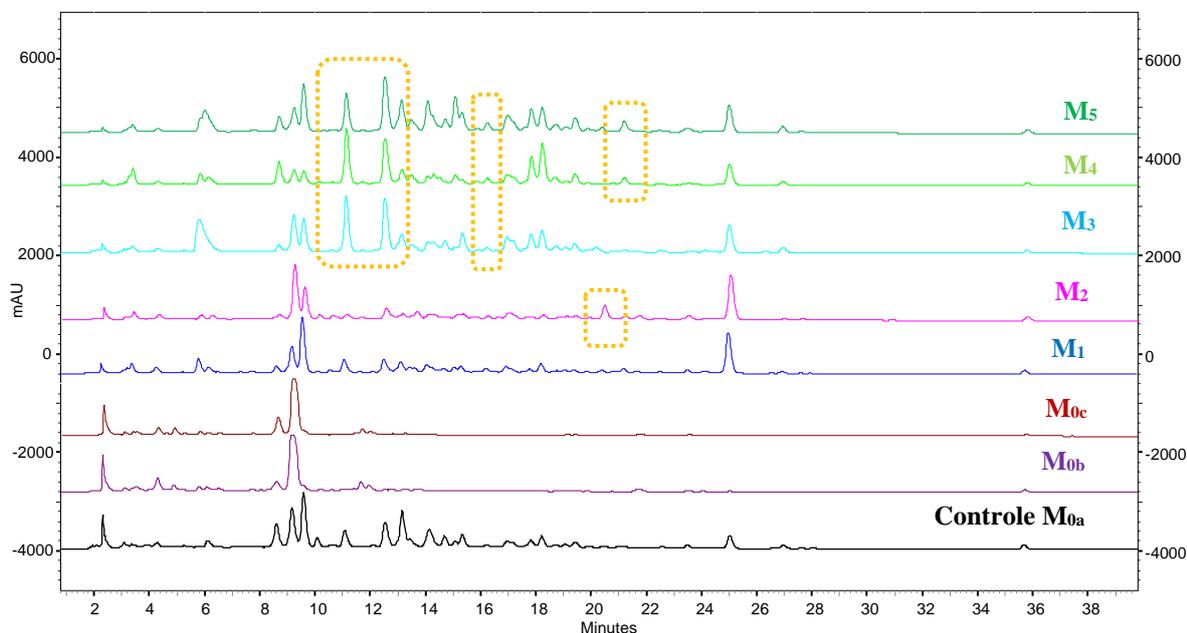
Fonte: Autor.

A partir dos perfis cromatográficos adquiridos de *Penicillium brasilianum* Δ pal (F2) (Figura 4.4), pode-se perceber que nos tempos de 8 a 10 min, a presença predominante de duas substâncias nos meios M_{0b} e M_{0c} , contendo maiores concentrações de $FeSO_4$, que também foram observados para F1. Ao avaliar o espectro de UV/Vis desses compostos, percebeu-se a presença de substâncias que co-eluíam em 9,09 min e 9,30 min, de modo que a substância em 9,30 min não aparecia no controle, e, portanto, pode ser considerada um componente de indução. Assim, na Figura 4.5, a, está ilustrado o espectro de UV/Vis das substâncias que co-eluíram.

Verificou-se ainda, nos meios contendo $NiCl_2$ (M_3), $ZnCl_2$ (M_4) e KBr (M_5), a produção de dois compostos que foram mais estimulada nesses sais do que no controle Czapek, no período de 10 a 15 min. Foi também observada para esses sais a produção de um composto no tempo de 16,3 min, que não era produzido no controle.

Para o meio suplementado com $CoCl_2$ (M_2) foi observada a biossíntese de uma substância de indução em 20,5 min. Além disso, verificou-se a ocorrência de uma nova substância nos meios suplementados com $ZnCl_2$ (M_4) e KBr (M_5) em 21,2 min, que não se apresentava no meio M_{0a} . A Figura 4.5 ilustra os espectros de absorção no UV/Vis adquiridos dessas substâncias, provavelmente induzidas pelos meios, com absorção máxima em 220, 260 e 300 nm.

Figura 4.4- Cromatogramas dos extratos AcOEt obtido do cultivo de *P. brasilianum* Δ pal (F2) em gradiente exploratório de por CLAE-DAD (coluna: Phenomenex Luna Phenyl-Hexyl; 15 a 100% ACN:H₂O v/v a 0,8 mL/min; 45 minutos; modo analítico) em 235 nm



Legenda

Compostos de indução: (yellow dashed line)

Meios: M_{0a}= FeSO₄.7H₂O a 0,01 g/L, M_{0b}= FeSO₄.7H₂O a 0,10 g/L, M_{0c}= FeSO₄.7H₂O a 1,00 g/L, M₁= MnCl₂ a 0,5 g/L, M₂= CoCl₂ a 0,5 g/L, M₃= NiCl₂ a 0,5 g/L, M₄= ZnCl₂ a 0,5 g/L e M₅= KBr a 1,0 g/L

Fonte: Autor

Figura 4.5 – Espectros de UV/Vis dos componentes de indução de F2. Observados nos meios a) M_{0b} e M_{0c} das substâncias que coeluíram em 9,09 e 9,30, bem como nos meios b) M₃, M₄ e M₅ maior abundância das substâncias em 11, 1 e 12,5 min comparado ao controle. Além, da presença de c) um composto de indução em 16,3 min; d) no meio M₂ apresentou-se com um novo compostos 20,5; e) e os meios M₄ e M₅ apresentaram-se com um novo componente em 21,2 min.

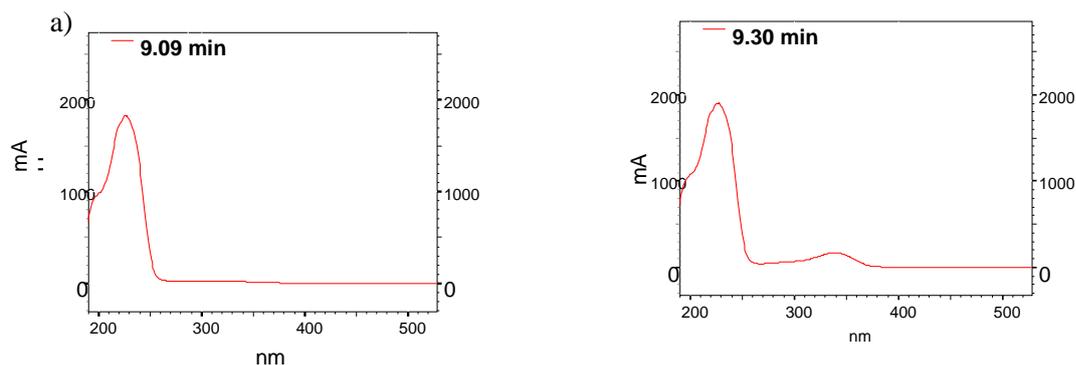
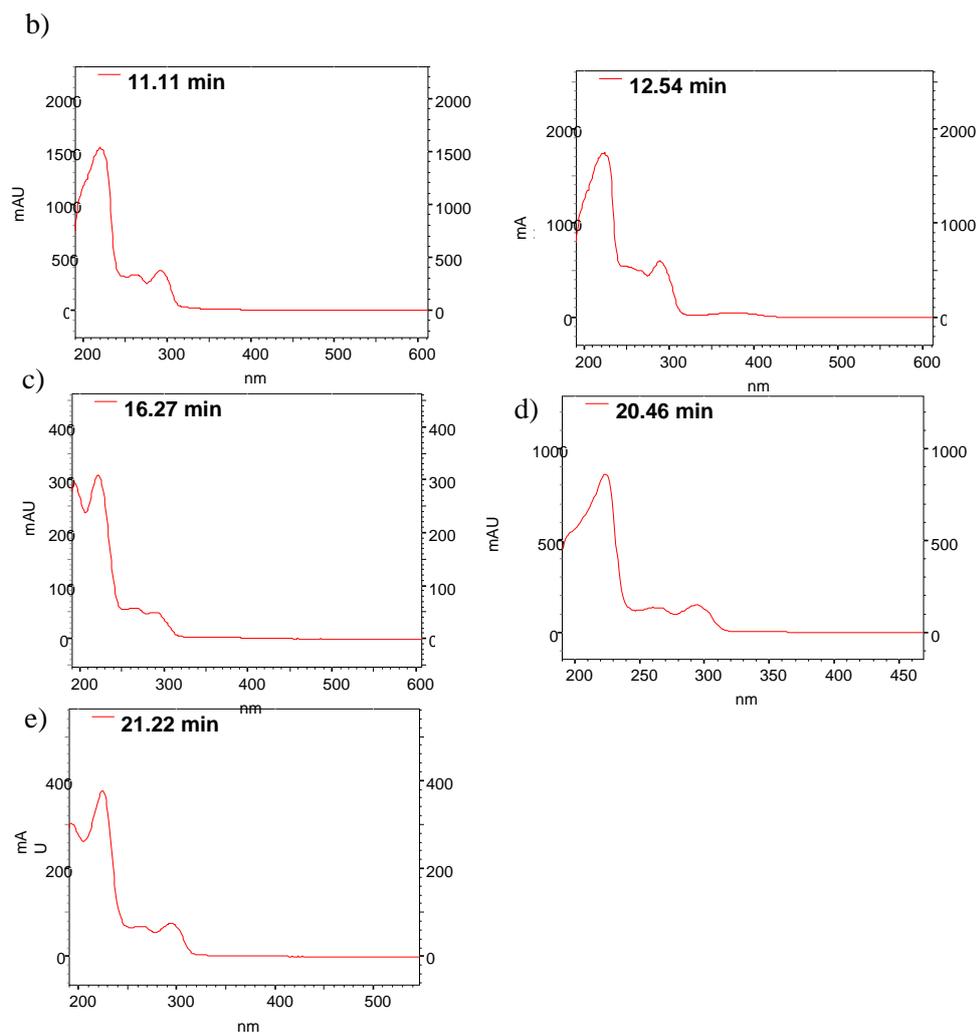


Figura 4.5 (Continuação)– Espectros de UV/Vis dos componentes de indução de **F2**. Observados nos meios a) M_{0b} e M_{0c} das substâncias que coeluíram em 9,09 e 9,30, bem como nos meios b) M_3 , M_4 e M_5 maior abundância das substâncias em 11,1 e 12,5 min comparado ao controle. Além, da presença de c) um composto de indução em 16,3 min ;d) no meio M_2 apresentou-se com um novo compostos 20,5; e) e os meios M_4 e M_5 apresentaram-se com um novo componente em 21,2 min.



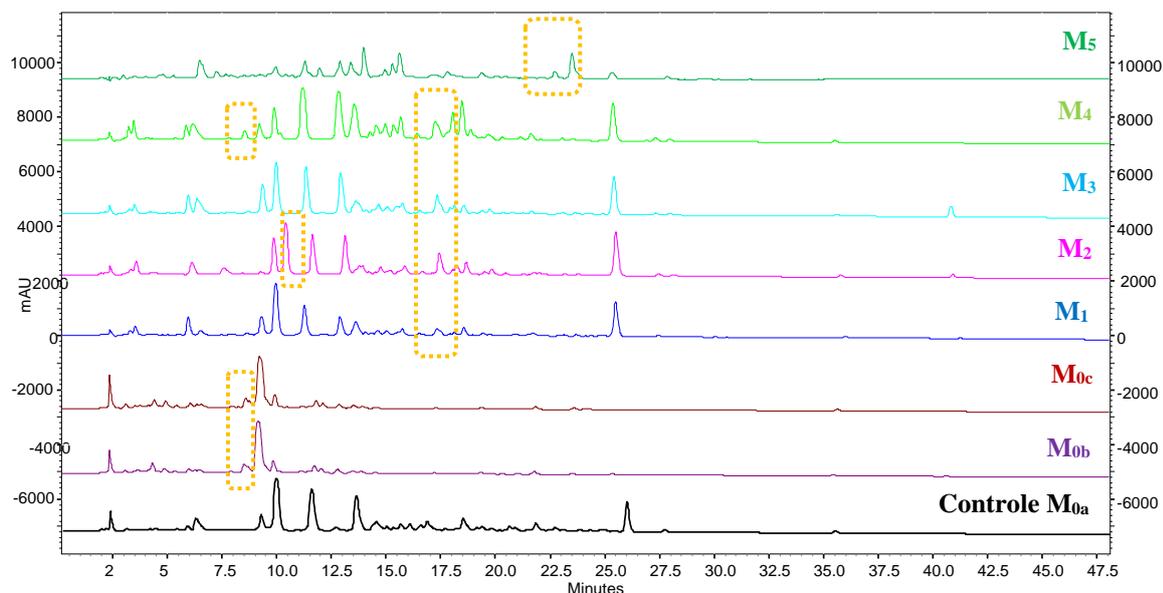
Fonte: Autor.

Baseado nas comparações de **F3** dos perfis cromatográficos por CLAE-DAD (Figura 4.6), adquiridos dos extratos AcOEt obtidos dos diferentes meios (Figura 4.6), pode-se perceber a presença abundante de três compostos na região de 7,5 a 10 min, no cultivo com maiores concentrações de $FeSO_4$ (M_{0b} e M_{0c}). Um desses compostos (8,5 min) não foi detectado no experimento controle,

mas estava presente também em M_4 , contendo $ZnCl_2$. Este composto apresentou absorção no espectro de UV/Vis na região de 225 e 300 nm (Figura 4.7, a).

Além dessas modificações, verificou-se a produção de novas substâncias no meio suplementados com $CoCl_2$ (M_2) em torno de 9,97 min (Figura 4.7, b), bem como nos demais meios com sais halogenados em 17,30 min, (Figura 4.7, c) e em 23,20 min no meio suplementado com KBr (M_5) (Figura 4.7, d), que exibiram absorção em 210, 250 e 300 nm.

Figura 4.6 – Cromatogramas dos extratos AcOEt obtido do cultivo de *P. brasilianum* $\Delta NRPS$ **23 (F3)** por CLAE-DAD (coluna: Phenomenex Luna Phenyl-Hexyl; 15 a 100% ACN:H₂O v/v a 0,8 mL/min; 45 minutos; modo analítico) em 235 nm



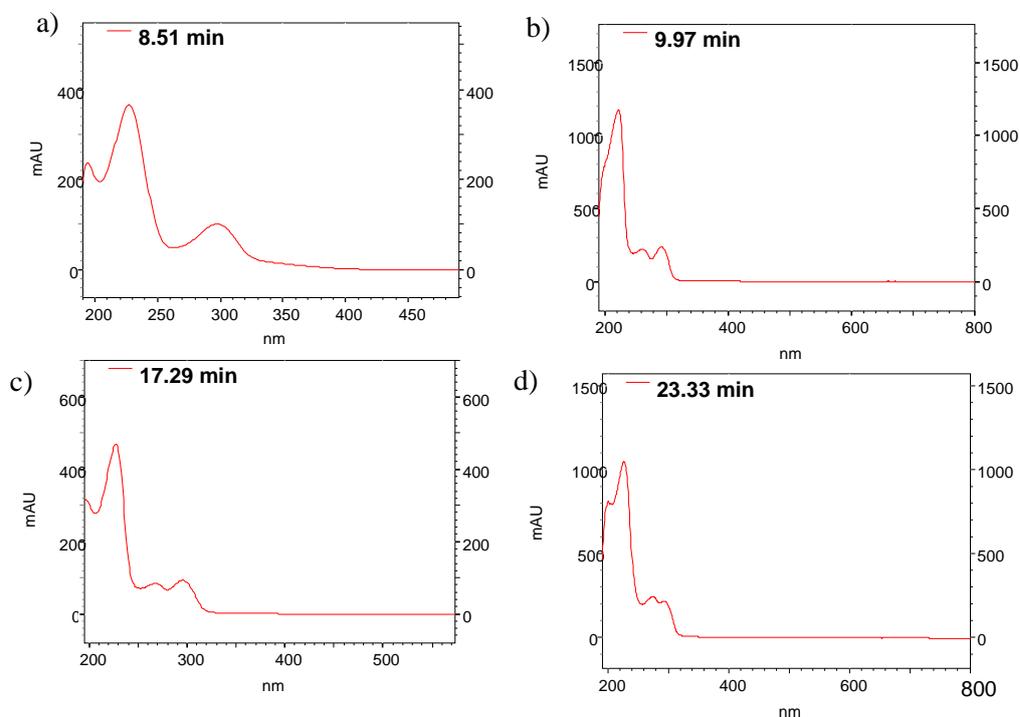
Legenda

Compostos de indução: (orange dashed line)

Meios: M_{0a} = $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ a 0,01 g/L, M_{0b} = $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ a 0,1 g/L, M_{0c} = $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ a 1,0 g/L, M_1 = $MnCl_2$ a 0,5 g/L, M_2 = $CoCl_2$ a 0,5 g/L, M_3 = $NiCl_2$ a 0,5 g/L, M_4 = $ZnCl_2$ a 0,5 g/L e M_5 = KBr a 1,0 g/L

Fonte: Autor.

Figura 4.7 – Espectros de UV/Vis dos componentes de indução de F3 observados nos meios a) M_{0b} e M_{0c} em 8,5 min b) M_2 em 9,9 min c) M_1 , M_2 , M_3 , M_4 e M_5 em 17,3 min e d) M_5 em 23 min.

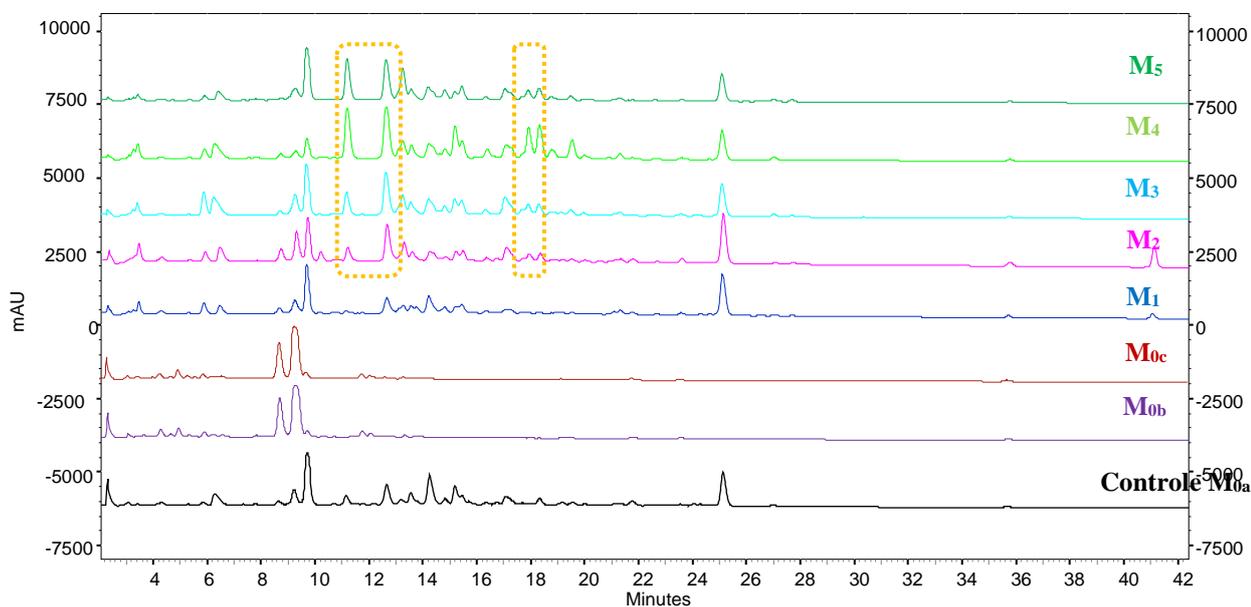


Fonte: Autor.

Para *P. brasilianum* Δ NRPS 07 (F4) (Figura 4.8), pode-se destacar a produção majoritária de duas substâncias nos meios contendo maiores concentrações de $FeSO_4$, M_{0b} e M_{0c} , nos tempos entre 8 a 10 min, como foi verificado nas demais linhagens. Além disso, foi possível constatar a produção em maior escala de duas substâncias (10 a 13 min) para os meios contendo sais halogenados, como $CoCl_2$ (M_2), $NiCl_2$ (M_3), $ZnCl_2$ (M_4) e KBr (M_5), conforme observado em F1, sendo que estas substâncias produzidas estavam em menor abundância no controle.

Além do mais, foi evidenciada em 17,5 min a presença de um novo constituinte, que não apresentou-se no controle, para os meios suplementados com sais halogenados, como $CoCl_2$ (M_2), $NiCl_2$ (M_3), $ZnCl_2$ (M_4) e KBr (M_5). Os espectros de UV/Vis dessa substâncias está em destaque na Figura 4.9, no qual pode-se observar bandas na região de 200, 230, 260 e 300 nm.

Figura 4.8 - Cromatogramas dos extratos AcOEt obtido do cultivo de *P. brasilianum* ΔNRPS 07 (F4) por CLAE-DAD (coluna: Phenomenex Luna Phenyl-Hexyl; 15 a 100% ACN:H₂O v/v a 0,8 mL/min; 45 minutos; modo analítico) em 235 nm



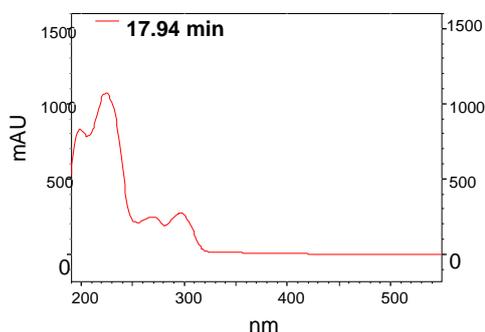
Legenda

Compostos de indução: (dashed orange line)

Meios: M_{0a}= FeSO₄·7H₂O a 0,01 g/L, M_{0b}= FeSO₄·7H₂O a 0,1 g/L, M_{0c}= FeSO₄·7H₂O a 1,0 g/L, M₁= MnCl₂ a 0,5 g/L, M₂= CoCl₂ a 0,5 g/L, M₃= NiCl₂ a 0,5 g/L, M₄= ZnCl₂ a 0,5 g/L e M₅= KBr a 1,0 g/L

Fonte: Autor.

Figura 4.9 – Espectros de UV/Vis dos componentes de indução de F4 observados nos meios M₂, M₃, M₄ e M₅ em 17,9min



Fonte: Autor.

A partir desses resultados descritos acima, pode-se perceber diferenças nos compostos detectáveis por UV/Vis nas linhagens de *P. brasilianum*, conforme se verificou para os cultivos contendo os aditivos

inorgânicos. Essas modificações podem ser atribuída a interferência desses sais no aumento da expressão de um metabólito, ou, no desenvolvimento de um novo metabólito, por meio da indução de rotas biossintética.

Assim, em todas as linhagens cultivadas com maiores concentração de FeSO_4 foi perceptível a indução dos compostos de alta polaridade nos tempos de 8 a 10 min e a supressão na produção de compostos de média polaridade que foram detectados no controle. A modificação que ficou mais evidente foi no cultivo com maiores concentração de FeSO_4 do fungo *P. brasilianum* nativo, F1, devido a produção majoritária de duas substâncias de indução.

A justificativa para essa modificação no metabolismo do micro-organismo cultivado em maiores concentrações de FeSO_4 , nos meios M_{0b} e M_{0c} , pode estar atribuída ao fato que, quando o micro-organismo foi exposto a concentrações elevadas Fe^{2+} deve ter ocorrido uma complexação desse metal com metaloenzimas específicas. Isso pode possibilitar a indução de uma classe de metabólitos, pois os espectros de UV/Vis adquiridos para essas substâncias são bastante parecidos, com absorção em 220 nm e outros com absorções de 220 e 300 nm.

Pode-se atribuir ainda, que estas substâncias induzidas podem ser espécies que complexam com metais, como os ácidos carboxílicos orgânicos. Como um exemplo na literatura, já foi descrito o isolamento do ácido ascórbico complexado ao Fe^{3+} (FORNARO; COICHEV, 1997).

Outra possibilidade se baseia no processo de oxidação que o Fe^{2+} possa sofrer formando o Fe^{3+} . Assim, o Fe^{3+} é insolúvel em pH fisiológico e portanto necessita de grupamento sideróforos para captura-lo e conseqüentemente efetuar o seu transporte pelas células. Embora, em condições de altas concentrações de Fe^{3+} esse processo de complexação do metal com grupos sideróforos possa ser inibido (BUTTLER, 1998). Isso pode ser uma explicação para supressão das rotas metabólicas dos constituintes de média polaridade que

estavam presentes no controle, onde havia baixas concentrações de sulfato de ferro.

Para os sais halogenados foram observadas respostas ao metabolismo de substâncias de formas distintas nas linhagens selvagens e modificadas geneticamente. Contudo, a linhagem que se apresentou com maiores modificações na produção de metabólitos diante dos diferentes aditivos inorgânicos foi a *P. brasilianum* Δ NRPS 023. Além disso, pode-se perceber que as rotas metabólicas de substâncias de média polaridade, detectadas no controle, não foram interferidas pelos sais halogenados como foi observado para maiores concentrações de sulfato de ferro.

Nestes sais foi verificada a produção de dois novos compostos de média polaridade nos tempos de 16 a 18 min. No entanto, eles devem ser da mesma classe de metabólito devido as substâncias apresentarem espectros de absorção no UV semelhantes, com absorção em 200, 230, 260 e 300 nm.

O fato dessas novas substâncias terem sido produzidas pode ser atribuída ao estresse osmótico ocasionado pela suplementação dos sais halogenados, que pode ter expresso enzimas específicas para efetuar a biossíntese de novos compostos (PAN et al, 2019).

4.1.2.2 *Aspergillus aculeatus*

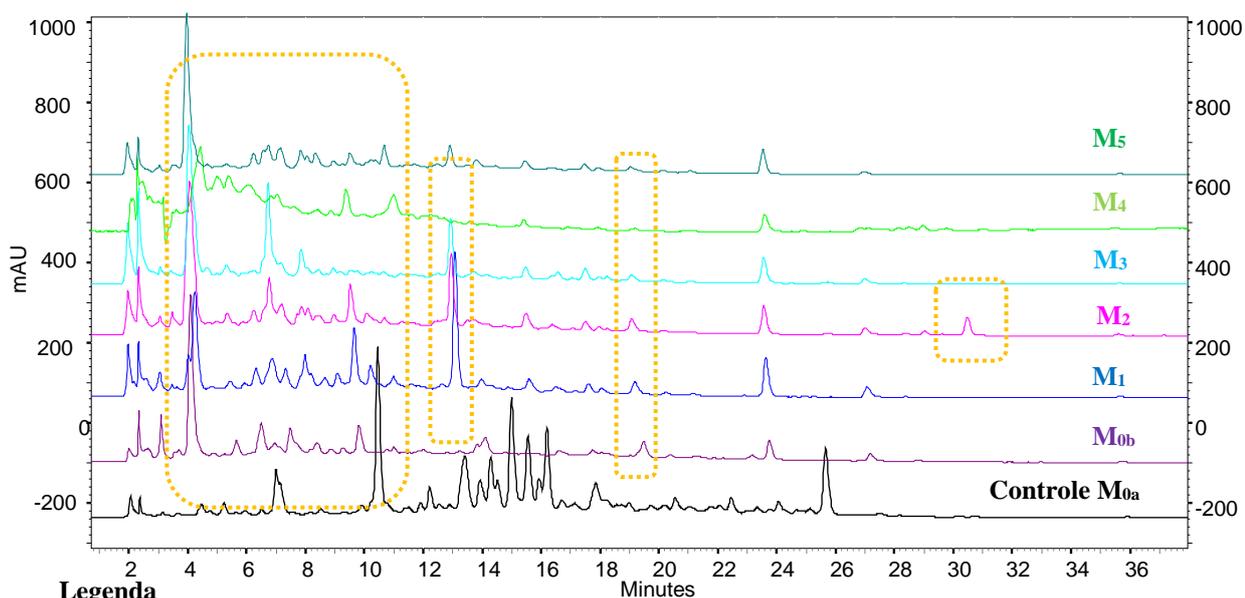
Quando foram avaliados os perfis cromatográficos dos extratos obtidos do micélio (extrato metanólico) e do caldo fermentativo (extrato acetato) por CLAE-DAD do fungo endofítico *A. aculeatus* (F5), notou-se diferenças na produção de metabólitos nos dois extratos produzidos a partir dos meios modificados com sais, comparados ao controle Czapek, M_{0a}.

Os perfis cromatográficos obtidos do extrato AcOEt (Figura 4.10) dos meios modificados com sais para F5 se destacaram por produzir substâncias de alta polaridade, eluídas entre 4 a 10 min. Enquanto que o seu cultivo no meio controle Czapek, produziu substâncias de média polaridade entre 10 a 20 min.

Além disso, foi percebida a produção de substâncias de média polaridade, que não foram detectadas no controle, no intervalo de 12,93 e 19,40 min nos meios modificados com MnCl_2 (M_1), CoCl_2 (M_2), NiCl_2 (M_3) e KBr (M_5). No meio contendo CoCl_2 (M_2) ainda foi verificada a presença de uma substância de baixa polaridade em 30,5 min.

A Figura 4.11, apresenta os espectros de absorção no UV/Vis de alguns compostos de alta polaridade em 4,0 min com absorção em 200 e 250 nm, bem como em 9,51 min com absorção em 220, 230 e 250 nm, os quais não estavam presentes no controle. Além dos compostos de média (12,93 min com absorção em 220, 280 e 300 nm) e baixa polaridade em 30,73 min.

Figura 4.10 - Cromatograma do extrato AcOEt em gradiente exploratório de *A. aculeatus* (F5) por CLAE-DAD (coluna: Phenomenex Luna Phenyl-Hexyl; 15 a 100% ACN:H₂O v/v a 0,8 mL/min; 45 minutos; modo analítico) em 310 nm



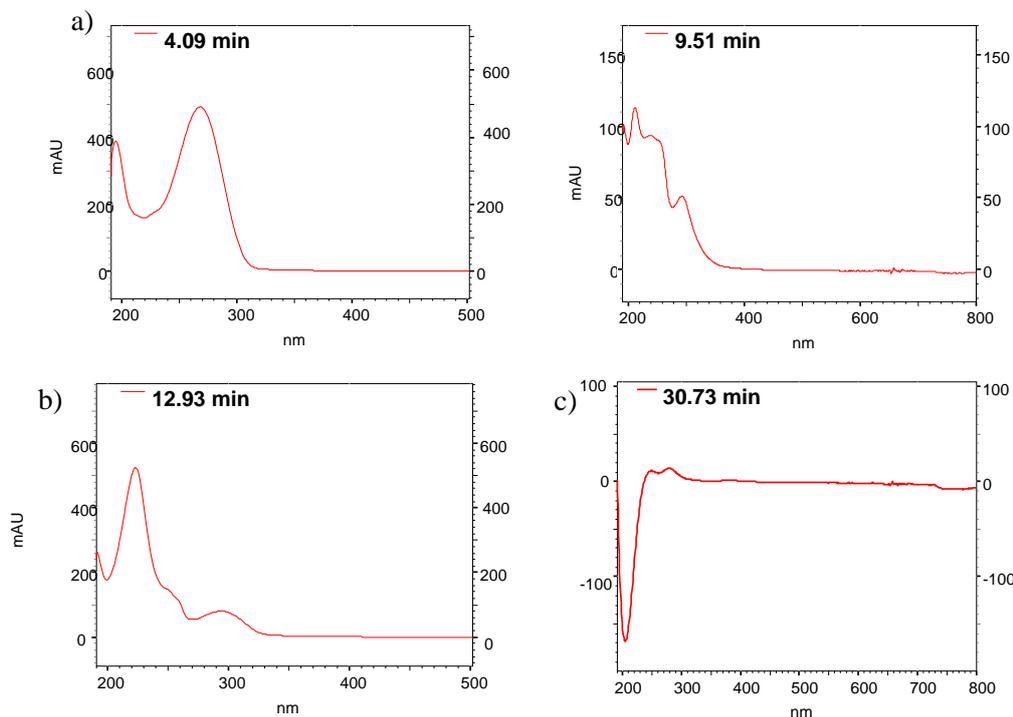
Legenda

Compostos de indução: - - - - -

Meios: M_{0a} = $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a 0,01 g/L, M_{0b} = $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a 0,1 g/L, M_{0c} = $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a 1,0 g/L, M_1 = MnCl_2 a 0,5 g/L, M_2 = CoCl_2 a 0,5 g/L, M_3 = NiCl_2 a 0,5 g/L, M_4 = ZnCl_2 a 0,5 g/L e M_5 = KBr a 1,0 g/L

Fonte: Autor.

Figura 4.11 – Espectros de UV/Vis dos componentes de indução observados no extrato AcOEt de F5 a) de alta polaridade b) média e c) baixa para CoCl_2



Fonte: Autor.

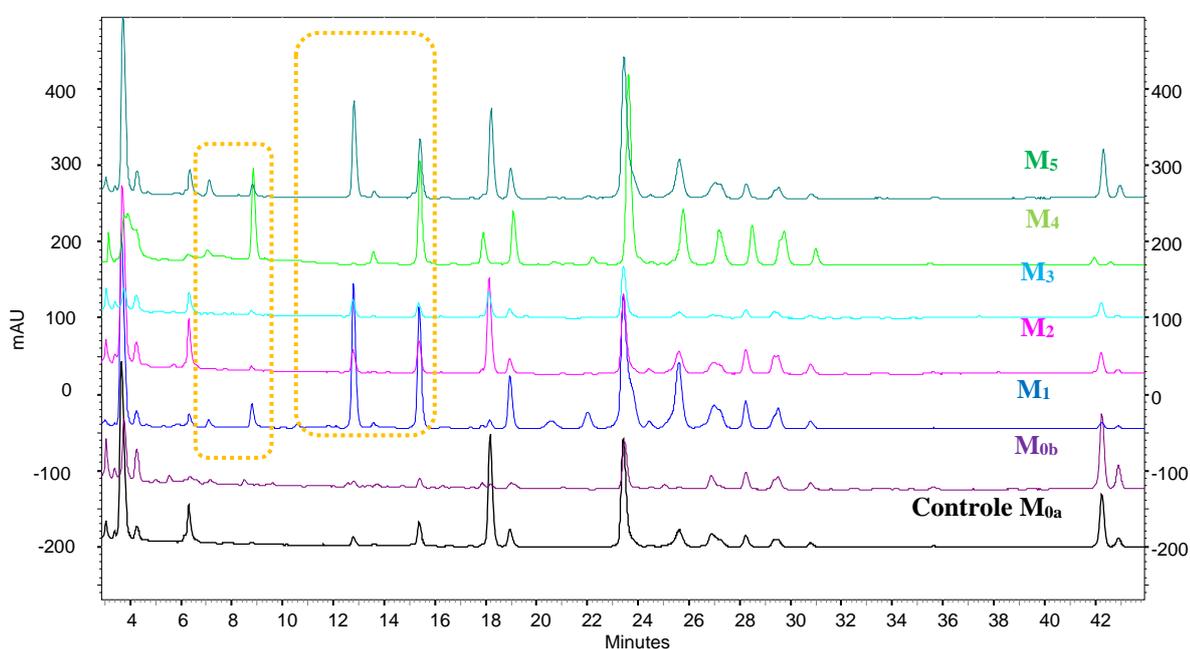
Foram também observadas diferenças nos componentes produzidos pelo micélio nos diferentes meios obtidos dos extratos metanólicos de F5, conforme ilustrado nos cromatogramas da Figura 4.12.

Assim, verificaram-se diferenças nos perfis cromatográficos dos extratos obtidos dos meios suplementados com MnCl_2 (M_1), ZnCl_2 (M_4) e KBr (M_5), que mostraram duas novas substâncias nos tempos de 7,0 e 8,8 min. Estes componentes apresentam absorção na região UV/Vis em 220, 250 e 300 nm (Figura 4.13). Observou-se também uma maior abundância na biossíntese de duas substâncias nos meios suplementado com MnCl_2 (M_1), CoCl_2 (M_2), ZnCl_2 (M_4) e KBr (M_5) no período de 12,74 e 15,42 min.

As demais substâncias apresentam espectro de absorção no UV/Vis característicos de nafto- γ -pironas, com duas bandas de absorbância fortes na região de 215-239 nm e 270-285 nm, assim como duas bandas de absorbâncias fracas na região de 330 – 340 e 395 – 410, mostrados na Figura 4.13. Esse sistema

absorção é característico de sistemas aromáticos altamente conjugados. Além disso, a região de absorção desses policetídeos depende principalmente da isomeria e do grau de polimerização das moléculas (FANG et al, 2016; LIMA et al., 2019).

Figura 4.12- Cromatograma do extrato MeOH em gradiente exploratório de *A. aculeatus* (F5) por CLAE-DAD (coluna: Phenomenex Luna Phenyl-Hexyl; 15 a 100% ACN:H₂O v/v a 0,8 mL/min; 45 minutos; modo analítico) em 296 nm



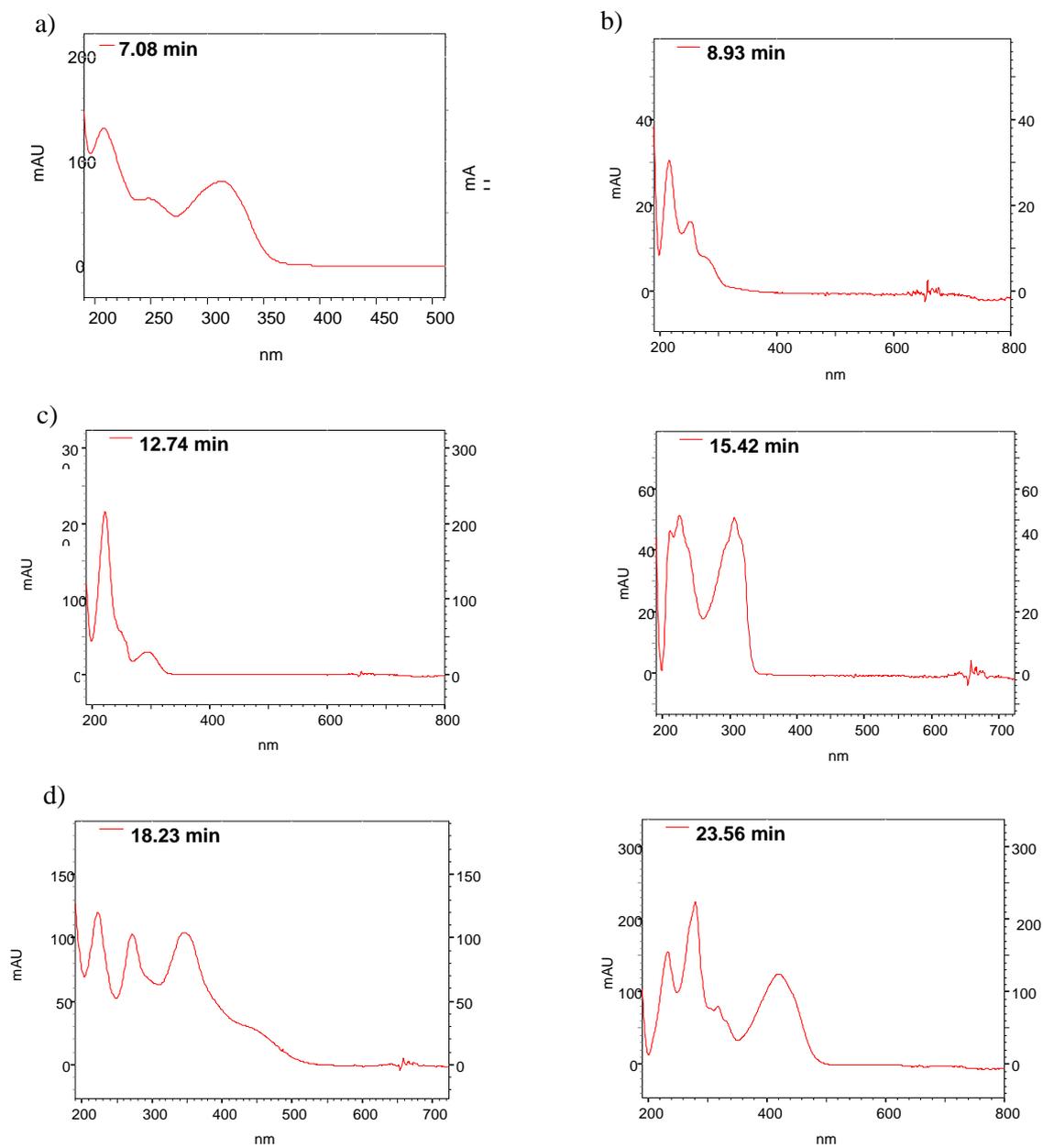
Legenda

Compostos de indução:

Meios: M_{0a}= FeSO₄.7H₂O a 0,01 g/L, M_{0b}= FeSO₄.7H₂O a 0,1 g/L, M_{0c}= FeSO₄.7H₂O a 1,0 g/L, M₁= MnCl₂ a 0,5 g/L, M₂= CoCl₂ a 0,5 g/L, M₃= NiCl₂ a 0,5 g/L, M₄= ZnCl₂ a 0,5 g/L e M₅= KBr a 1,0 g/L

Fonte: Autor.

Figura 4.13 – Espectros de UV/Vis dos componentes observados no extrato MeOH de F5 dos meios a) M₁, M₄ e M₅ em 7,08 e b) 8,93 min; c) maior produção dos composto em 12,7 e 15,4 nos meios M₁, M₂, M₄ e M₅ do que no controle e d) derivados de naftopronas



Fonte: Autor.

Baseado nos dados apresentados acima, pode-se perceber que o extrato AcOEt apresentou grandes modificações na produção de metabólitos, com a biossíntese predominantemente de compostos de alta polaridade em todos os meios modificados com sais. Isso pode estar atrelado às características dos metais. Por eles apresentarem orbitais *d* vazios, e poderem promover processos oxidativos com proteínas, formando metaloproteínas, que são capazes de produzir novas substâncias (DUBEY et al, 2019).

Quando avaliados os componentes do extrato MeOH, foram percebidas diferenças nos extratos modificados com sais halogenados. O halogeneto pode ser indutor desses novos compostos, ativando processos enzimáticos que seriam capazes de usá-los para efetuar a biossíntese de novas substâncias, ou até mesmo acionar novos processos enzimáticos para minimizar o estresse que ele possa ocasionar, principalmente, no sistema osmótico do micro-organismo (PAN et al, 2019).

A partir desses dados, pôde-se escolher para o estudo em maior escala o fungo F5, *A. aculetaus*, uma vez que os dois extratos obtidos dessa linhagem (AcOEt e MeOH) mostraram modificações na sua composição, indicando ser mais promissor para produção de novas substâncias nos meios suplementados com sais halogenados.

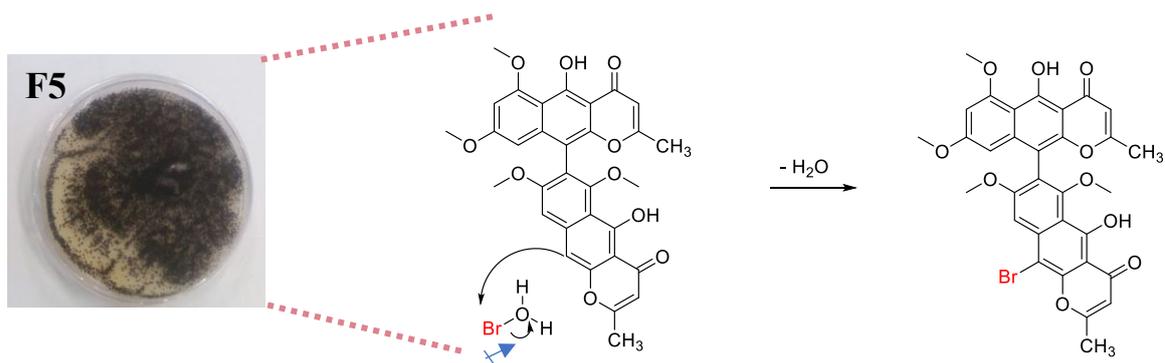
Para o prosseguimento do estudo em escala ampliada, também foram escolhidos os meios que ofereceram maiores modificações nos dois extratos obtidos, que foram o meio M₂ suplementado com CoCl₂ e o meio M₅ com KBr.

Outro fator que contribuiu bastante para escolha dessa linhagem foi que os espectros de absorção no UV/Vis apresentaram bandas na região de cromóforos aromáticos, sendo característicos de nafto- γ -pirona. Além disso, estas substâncias aromáticas são espécies susceptíveis a sofrerem substituição eletrolítica aromática.

As nafto- γ -pironas, além disso, são espécies que apresentam vários grupamentos doadores de elétrons, o que a torna bastante nucleofílica. Logo, esses

policetídeos podem sofrer reações de substituição eletrofílica aromática, inserindo átomos de halogênio em suas estruturas, em processos catalisados por enzimas halogenase ou haloperoxidases (BLASIAK; DRENNAN, 2009) (Figura 4.14).

Figura 4.14 – Representação do processo de halogenase da aurosperona A (nafto- γ - pirona) visando formar moléculas halogenada



Fonte: Autor.

4.2 Ensaaios analíticos

4.2 Ensaio em escala analítica de *Aspergillus aculeatus* (F5) nos meios suplementados com KBr e CoCl₂

4.2.1 Avaliação da tolerância de F5 em diferentes concentrações de sais de KBr e CoCl₂ suplementados ao meio de cultivo

Um testes analítico foi realizado objetivando avaliar a suscetibilidade do fungo endofítico *A. aculeatus* nas diferentes concentrações salinas de KBr e CoCl₂, visto que o estudo deste fungo para o cultivo com estes sais não foi explorado até o momento na literatura.

4.2.1.1 KBr

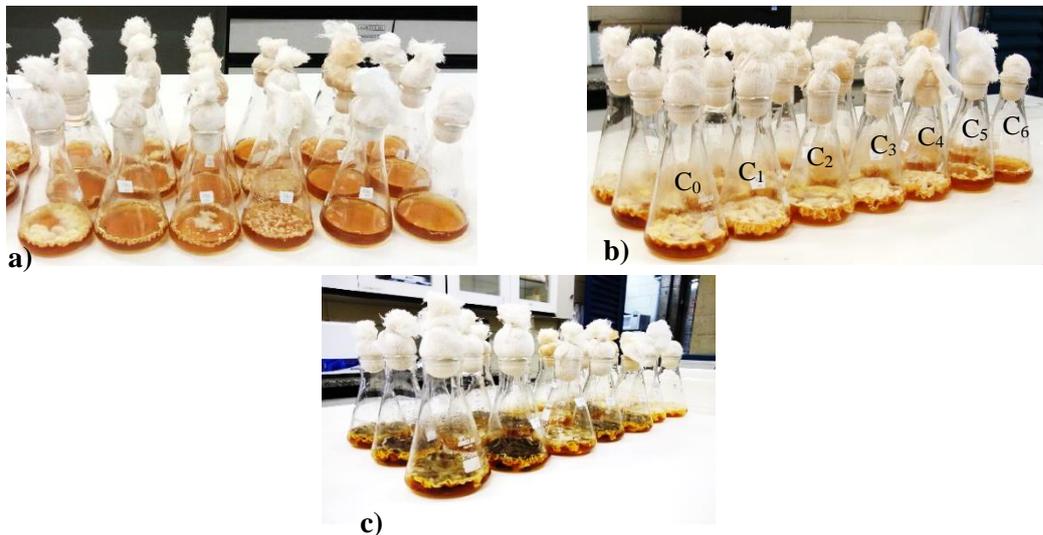
A tolerância de F5 foi avaliada usando uma faixa de concentrações de 10 a 100 g/L de KBr. A escolha dessa faixa de concentrações explorada baseou-se no teste analítico de tolerância a sais bromados desenvolvido em um trabalho anterior do grupo LaBioMMi com o fungo endofítico *Penicillium chrysogenum*. A partir desse ensaio notou-se o crescimento do endófito em altas concentrações de NH₄Br (65 g/L), o que levou à produção de constituintes de indução (SILVA et al., 2014).

Além disso, é conhecido na literatura que os micro-organismos marinhos conseguem se desenvolver em alta concentração do ânion brometo, que é encontrados na água do mar à concentração de 0,0663 g/L.

O crescimento de *A. aculeatus* nos meios suplementados com diferentes concentrações de KBr foi observado já no segundo dia de inóculos (Figura 4.15, a). No terceiro dia (Figura 4.15, b) foi notado o crescimento de F5 em todos os cultivos, com diferenças perceptíveis no desenvolvimento massa micelial. No quinto dia (Figura 4.15, c) o estágio de esporulação se iniciou em alguns meios de cultivo suplementados com diferentes concentrações de KBr (C₁= 10 g/L, C₂= 20 g/L, C₃= 40 g/L, C₄= 60 g/L), bem como no controle Czapek.

Assim, interrompeu-se o crescimento e foram avaliadas as quantidades de massa micéial e a quantidade de extrato AcOEt produzidas.

Figura 4.15 – Fotos do cultivo de *A. aculeatus* em meio Czapek suplementado com KBr durante a) 2 dias b) 3 dias e c) 5 dias de crescimento



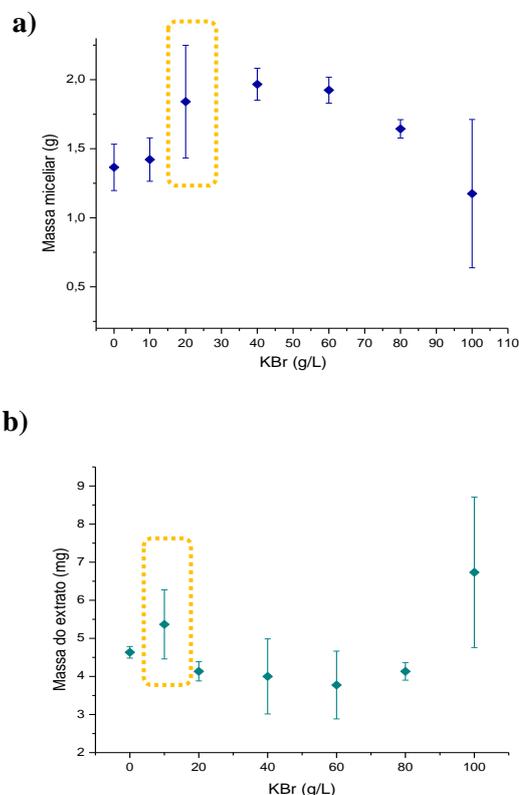
Legenda: C₀= controle Czapek; Czapek's as seguintes concentrações de suplemento de KBr: C₁= 10 g/L, C₂= 20 g/L, C₃= 40 g/L, C₄= 60 g/L, C₅=80 g/L e C₆=100 g/L

Fonte: Autor.

A Figura 4.16, a e b ilustram os dados experimentais fornecidos das quantidades de massa micéial e de extratos obtidos, assim como os desvios padrões obtidos a partir da média desses valores amostrais.

Dessa maneira, ao avaliar esses dados obtidos, foi verificada pouca reprodutibilidade no cultivo contendo 100 g/L de KBr, que apresentou-se com um desvio padrão elevado dos valores de massa micéial e de extrato. Quando observou-se os demais meios suplementados com KBr comparado ao controle, foi verificado que a concentração de 20 g/L de KBr apresentou-se com uma maior massa micéial produzida por F5 (Figura 4.16, a). Ao analisar as quantidade de extrato AcOEt produzidos, observou-se uma maior concentração de extrato produzido no cultivo com 10 g/L de KBr em relação ao controle (Figura 4.16, b).

Figura 4.16 – Gráfico de comparação **a)** da quantidade de massa micelar e **b)** quantidade de massa de extrato AcOEt adquiridos nas diferentes concentrações de sais para KBr

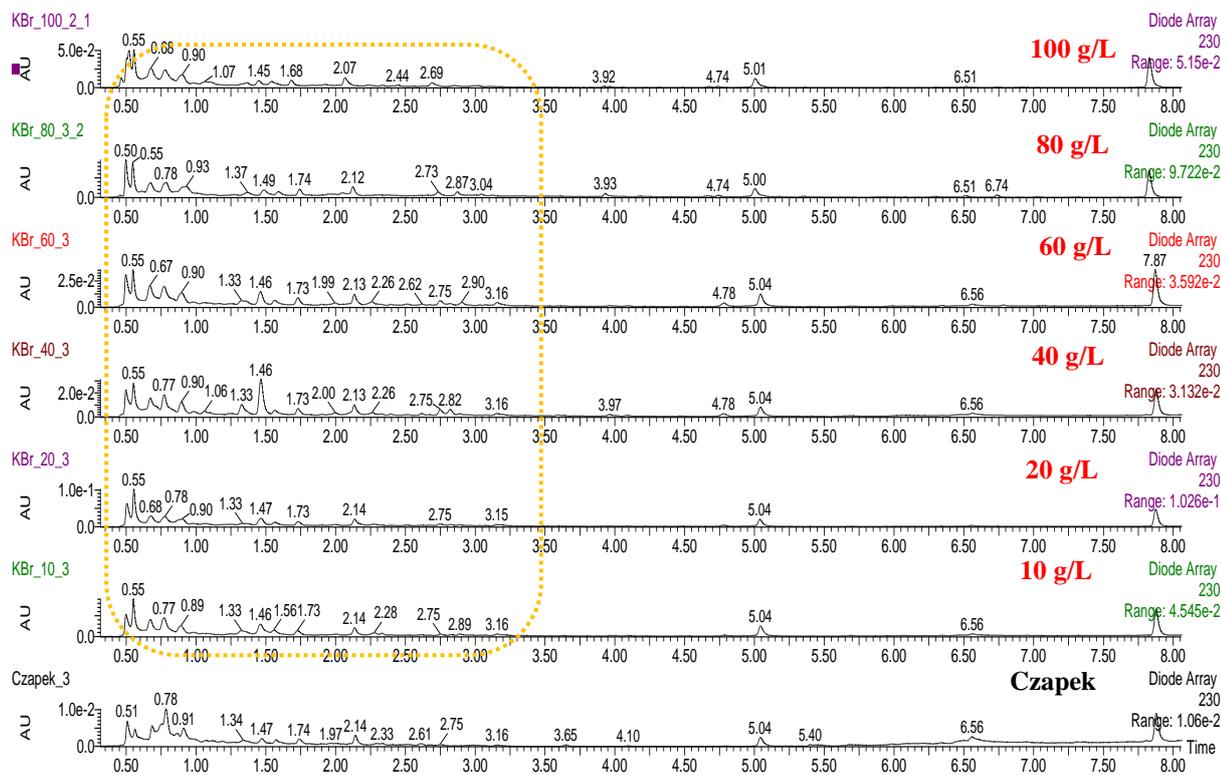


Fonte: Autor.

Quando foi avaliada a produção de metabólito secundário utilizando as diferentes concentrações de sais, observou-se a biossíntese dos mesmos compostos de indução em todas as concentrações de sais comparadas (Figura 4.17). As modificações observadas nos perfis cromatográficos evidenciaram variações da abundância relativa dos metabólitos produzidos. No entanto, quando avaliou-se a reprodutibilidade desses dados, levando em conta a abundância dos compostos de indução nas triplicatas de cada concentração de KBr, foi verificada uma aleatoriedade desses dados.

Diante disso, a escolha da concentração do suplemento para o cultivo em escala ampliada foi de 10 g/L de KBr, pois nesta concentração percebeu-se uma maior produção da quantidade de extrato AcOEt em relação ao controle, com menor desvio padrão dos dados amostrais.

Figura 4.17 – Cromatograma dos extratos AcOEt para diferentes concentrações de KBr obtido por CLUE-DAD (coluna C-18; 15 a 100% ACN:H₂O v/v a 0,5 mL/min; 12 minutos; modo analítico) em 231 nm



Fonte: Autor

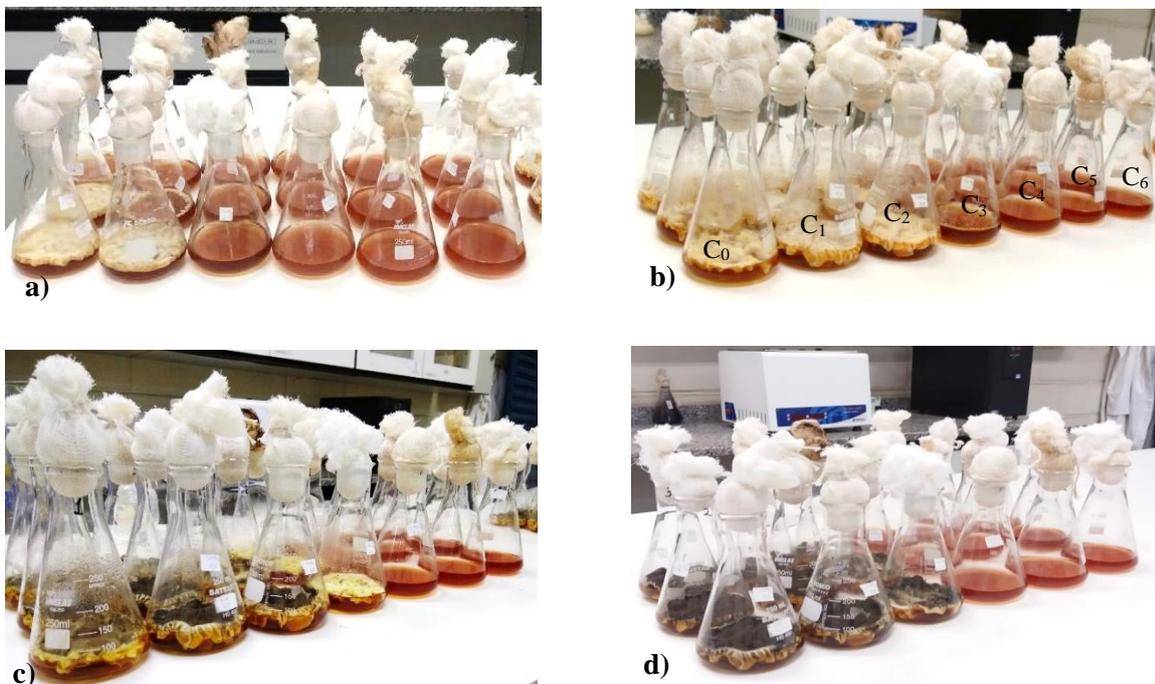
4.2.1.2 CoCl₂

Estudos na literatura apontam que o cultivo usando uma concentração inferior a 30 μM de CoCl₂ pode regular expressões de genes em microrganismo, podendo afetar, por exemplo, processos regulatórios de *Fusarium graminearum*, como produtor de ergosterol e 3-acetildeoxinivalenol (SILVA, 2011; TSUYUKI et al., 2011). Então, com intuito de desenvolver o estresse no micro-organismo foram escolhidas uma faixa de concentrações de 770 μM a 12000 μM para os teste analítico com CoCl₂ em *A. aculeatus*.

No segundo dia de cultivo foi observado o crescimento de F5 nos meios contendo 0,1 g/L e 1,0 g/L CoCl₂, conforme verificado na Figura 4.17, a.

Além disso, no terceiro dia, foi evidenciado o desenvolvimento do fungo no meio contendo 2,0 g/L de CoCl_2 (Figura 4.18, b), enquanto que nos meios suplementados com 8,0 g/L, 13,0 g/L e 15 g/L de CoCl_2 não foram observados o crescimento do endófito até o quinto dia (Figura 4.18, c). Por conta disso, foi aguardado o desenvolvimento do micro-organismos nesses meios até o nono dia, o qual não foi verificado, conforme visto na Figura 4.17, d. Desse modo, pode-se verificar que o fungo *A. aculeatus* foi tolerante até a concentração máxima de 2 g/L de CoCl_2 .

Figura 4.18 – Fotos do cultivo de *A. aculeatus* em meio Czapek suplementado com CoCl_2 em a) 2 dias b) 3 dias e c) 5 dias d) 9 dias de crescimento



Fonte: Autor.

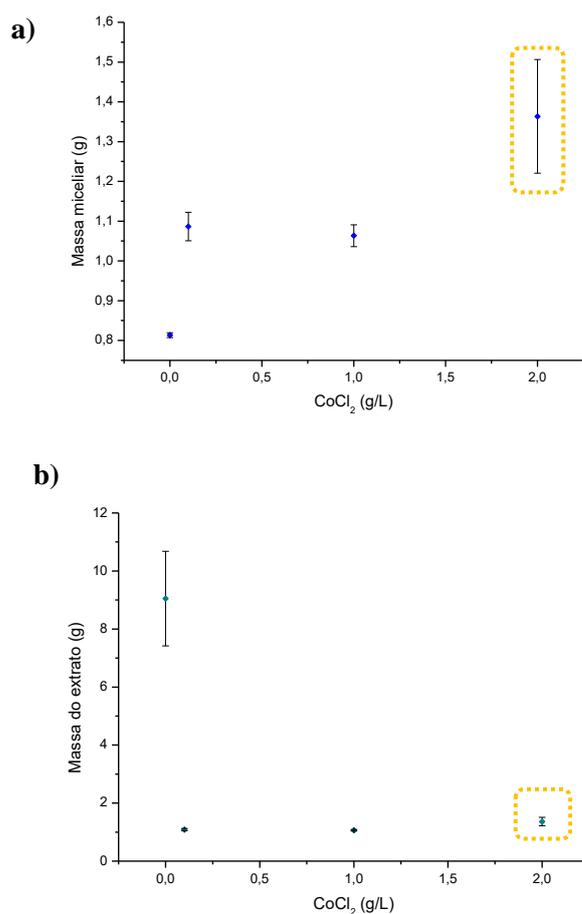
A partir do nono dia de experimento, foi interrompido o crescimento de F5 e avaliadas as quantidades de massa micelial e de extratos AcOEt produzidas.

Ao analisar a massa micelial das diferentes concentrações foi verificado que a concentrações de 2,0 g/L de CoCl_2 levou a uma maior quantidade que os demais meios suplementados e o controle, embora com desvio amostrais

de dados elevado, sendo menos reprodutível do que os dados adquiridos com 1,0 g/L de CoCl_2 , por exemplo (Figura 4.19, a).

Assim, quando avaliou-se as quantidades de extratos obtidos, foi observado que, com relação ao controle, os meios que foram suplementados com CoCl_2 apresentaram-se com uma quantidade de extrato inferior. Porém, com desvios amostrais muito pequeno, demonstrando reprodutibilidade dos dados. Diante disso, observou-se que a concentração de 2 g/L de CoCl_2 , apresentou-se com maior produtividade de extrato que os demais meios suplementados com CoCl_2 (Figura 4.19, b).

Figura 4.19 – Gráfico de comparação **a)** da quantidade de massa micelial produzidas, **b)** quantidade de massa de extrato AcOEt adquirido nas diferentes concentrações de sais de KBr

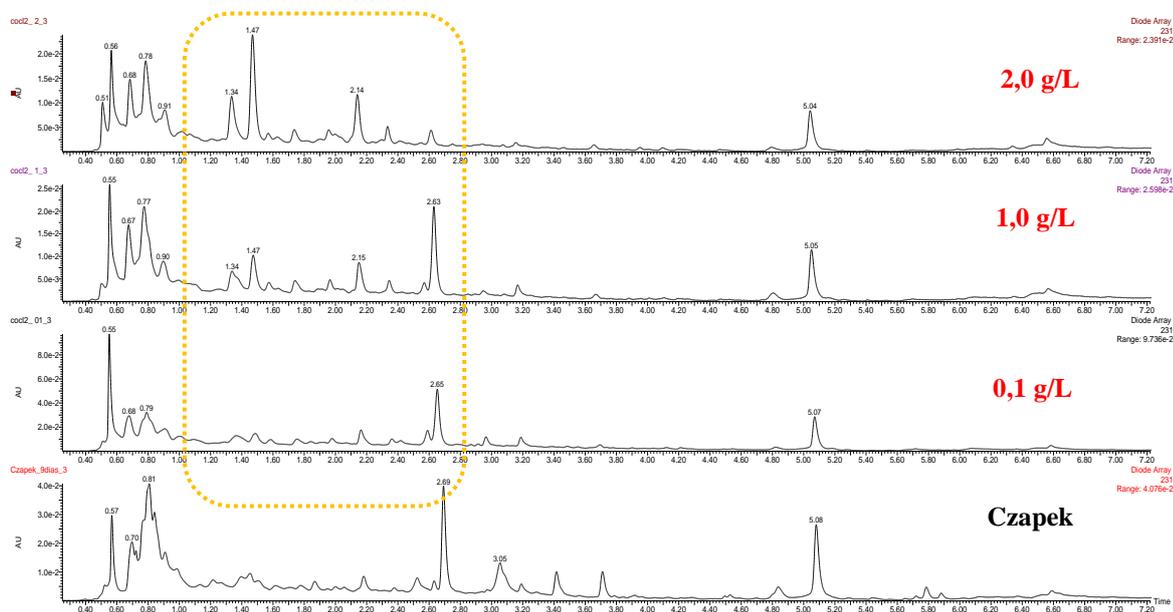


Fonte: Autor.

Ao fazer um paralelo dos metabólitos detectados nos extratos AcOEt dos cultivos nas diferentes concentrações de CoCl_2 , ficou evidente que os componentes de indução se mantiveram iguais em todos os extratos analisados (Figura 4.20). As modificações observadas foram na biossíntese de compostos de alta polaridade, aparentemente de indução, nos meios suplementados com CoCl_2 com relação ao controle, que produziu compostos de média polaridade. Já no meio suplementado com 2 g/L de CoCl_2 foi observada uma maior abundância relativa das substâncias de indução. Além disso, avaliou-se as triplicatas dos meios, no qual observou-se uma reprodutibilidade na abundância relativa desses compostos.

Assim, para o cultivo em larga escala foi escolhida a concentração de 2 g/L de CoCl_2 .

Figura 4.20 – Cromatograma dos extratos AcOEt para diferentes concentrações de CoCl_2 obtido por CLUE-DAD (coluna C-18; 15 a 100% ACN:H₂O v/v a 0,5 mL/min; 12 minutos; modo analítico) em 231 nm



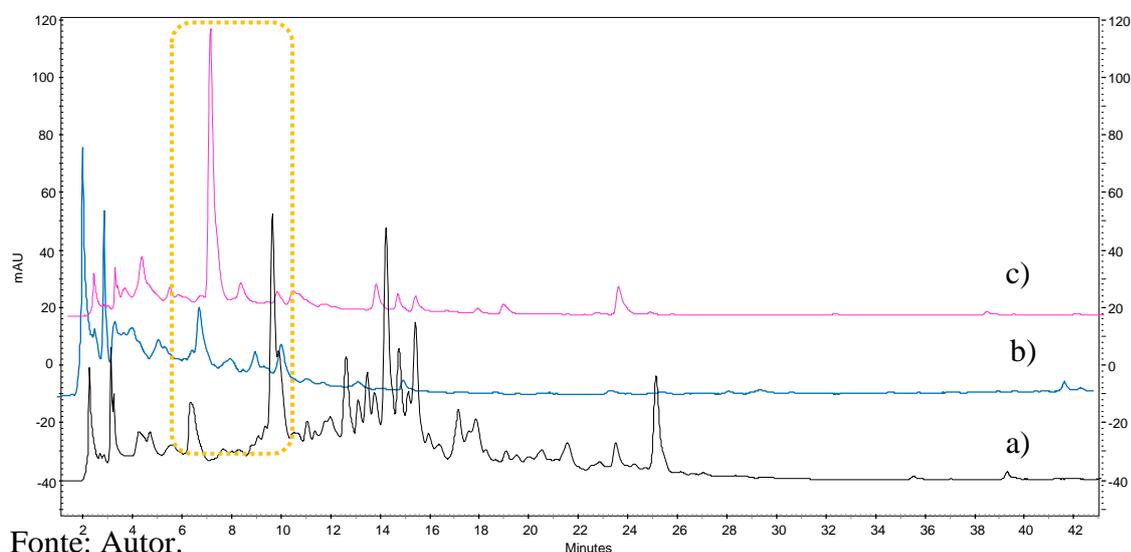
Fonte: Autor.

4.2.1 Avaliação da produção de metabólitos no meio KBr com a presença de Sulfato de Ferro

Foi efetuado um estudo qualitativo com o intuito de verificar a influência do Fe^{2+} no meio suplementado com KBr. Logo, comparou-se os metabólitos detectáveis por UV/Vis produzidos nos meios suplementado com KBr na presença de FeSO_4 e na ausência de FeSO_4 . Assim, comparou-se os dados obtidos dos ensaios analíticos por CLAE-DAD do extrato AcOEt obtidos do caldo fermentativo (Figura 4.21) e do extrato MeOH obtido do micélio (Figura 4.22). Pode-se verificar modificações na produção de metabólitos nesses extratos.

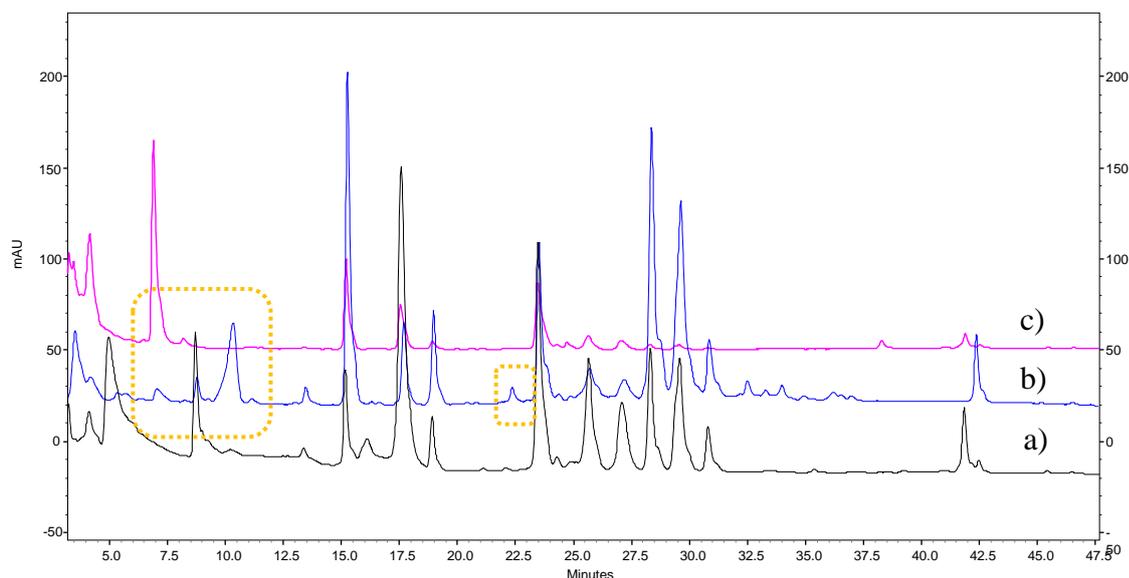
Na presença de Fe^{2+} ocorreu uma inibição na produção de novos metabólitos biossintetizados no meio contendo apenas KBr, sendo detectáveis no tempo de 7,80, 10,5 e 22,2 min. Além disso, foi verificado que na presença de Fe^{2+} ocorreu a produção majoritariamente de uma substância, aparentemente de indução, em 7,4 min nos extratos AcOEt e MeOH.

Figura 4.21 – Cromatograma do extrato AcOEt em gradiente exploratório de *A.culeatus* em meio a) Czapek b) meio Czapek suplementado com KBr na ausência de FeSO_4 e b) meio Czapek suplementado com KBr na presença de FeSO_4 . Analisados por CLAE-DAD (coluna: Phenomenex Luna Phenyl-Hexyl; 15 a 100% ACN:H₂O v/v a 0,8 mL/min; 45 minutos; modo analítico) em 293 nm.



Fonte: Autor.

Figura 4.22 – Cromatograma do extrato MeOH em gradiente exploratório de *A.culeatus* em meio a) Czapek b) meio Czapek suplementado com KBr na ausência de FeSO_4 e b) meio Czapek suplementado com KBr e FeSO_4 . Analisados por CLAE-DAD (coluna: Phenomenex Luna Phenyl-Hexyl; 15 a 100% ACN:H₂O v/v a 0,8 mL/min; 45 minutos; modo analítico) em 293 nm.



Fonte: Autor.

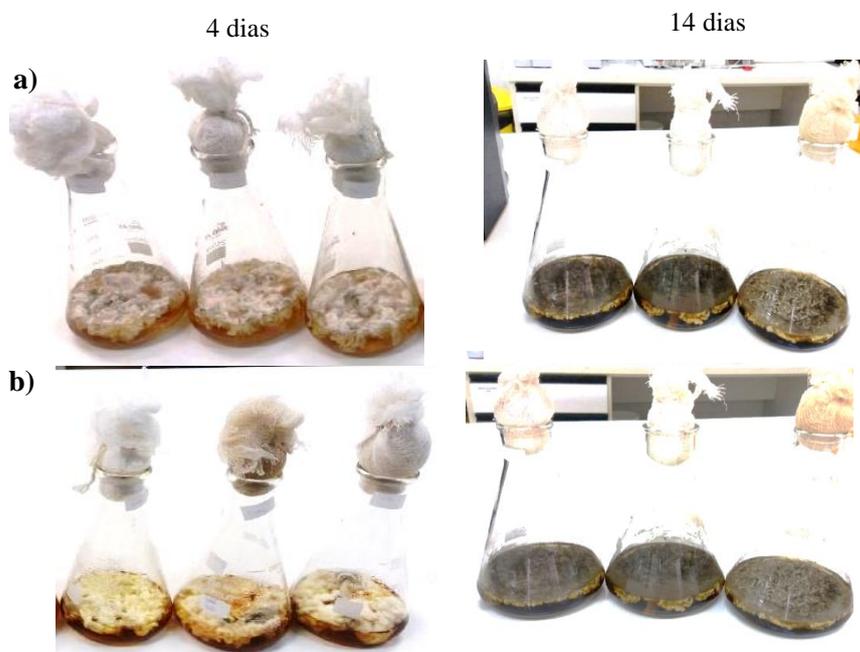
Sendo assim, foi selecionado para cultivo em escala ampliada o meio suplementado com KBr sem sulfato de ferro, por apresentar, nesta condição de nutrição, mais substância biossintetizadas que se diferenciavam do controle.

A explicação para a inibição desses metabólitos pode ser pautada no fato do íon Br^- ser responsável pela biossíntese desses compostos, através da complexação desse átomos a enzimas responsáveis por esse mecanismo. Assim, o Fe^{2+} pode atuar suprimindo esse processo.

4.2.1 Avaliação do tempo ótimo de cultivo para os meios contendo KBr e CoCl₂

Foi efetuado um ensaio analítico para avaliar o tempo ótimo de cultivo do microrganismos nos meios modificados com KBr e CoCl₂. Neste estudo avaliou-se cinética de produção de metabólitos do micro-organismo em dois estágios de crescimento, antes do período de esporular, com 4 dias e após o período de esporular, e com 14 dias de cultivo. A Figura 4.23 mostra os cultivos nesses dois estágios.

Figura 4.23 – Cultivo do fungo antes do período de esporular (4 dias) e após esporular (14 dias) com meio suplementados com a) KBr e b) CoCl₂



Fonte: Autor.

Avaliou-se a produção de metabólitos no micélio, bem como do caldo fermentativo por CLUE-DAD (Figura 4.24 - 4.28), objetivando verificar em qual estágio de crescimento ocorre a produção de uma maior quantidade de metabólitos secundários. Além disso, analisou-se a cinética de produção das nafto- γ -pironas, nestes dois estágios, através das absorções dos espectros de absorção no UV/Vis destas espécies.

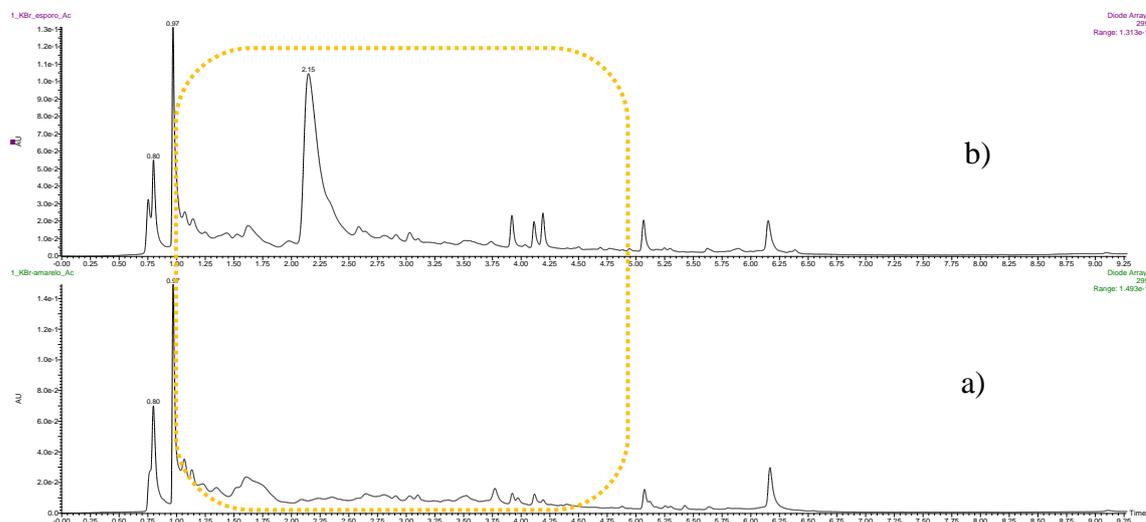
Ficou evidente que ocorreu a biossíntese de uma maior quantidade de metabólitos detectáveis por UV/Vis após a esporulação e principalmente no micélio obtido para CoCl_2 (Figura 4.25). No estágio de esporulação, ainda foi verificada uma maior incidência de substâncias com absorção características de nafto- γ -pirona.

Além disso, foi verificada nos dois extratos obtidos para KBr a maior produção de compostos após a esporulação. Nos dois extratos, avaliou-se os constituintes por UV/Vis e observou-se a produção de substâncias com absorção na região de nafto- γ -pironas (na faixa de 215 a 410 nm).

A explicação para biossíntese de metabólitos após o período de esporulação pode ser atribuída ao fato do processo fermentativo existir em duas fases distintas e primordiais para o desenvolvimento do micro-organismo. A primeira fase (trofofase) é destinada ao crescimento logarítmico da massa micelial e dos conídeos (esporos). A segunda fase, após esporulação, (idiofase) é onde o crescimento é interrompido e ocorre a produção de metabólitos secundários (BU'LOCK et al.,1965).

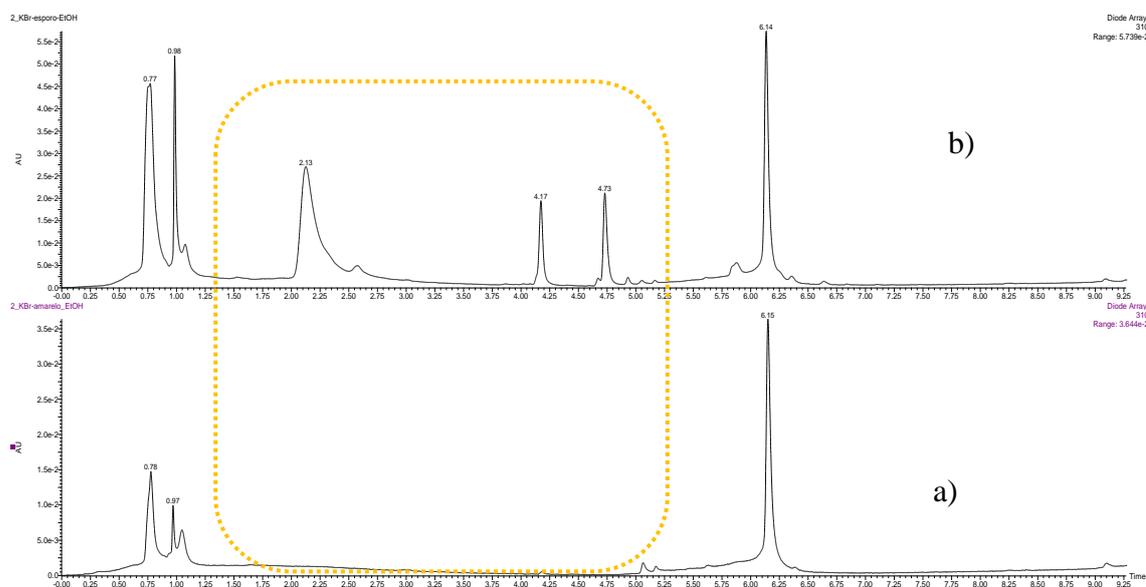
Logo, decidiu-se efetuar o cultivo em larga escala durante 14 dias, em que foi observada uma maior quantidade de substâncias produzidas por *A. aculeatus* em ambos os extratos obtidos para os dois aditivos inorgânicos (Figura 4.23 – 4.26).

Figura 4.24 – Cromatograma obtido por CLUE-DAD dos extratos AcOEt. Para o período de cultivo a) antes de esporular (4 dias) e b) após esporular (14 dias) em 100 g/L de KBr (coluna C-18; 15 a 100% ACN:H₂O v/v a 0,5 mL/L; 12 minutos; modo analítico) em 230 nm



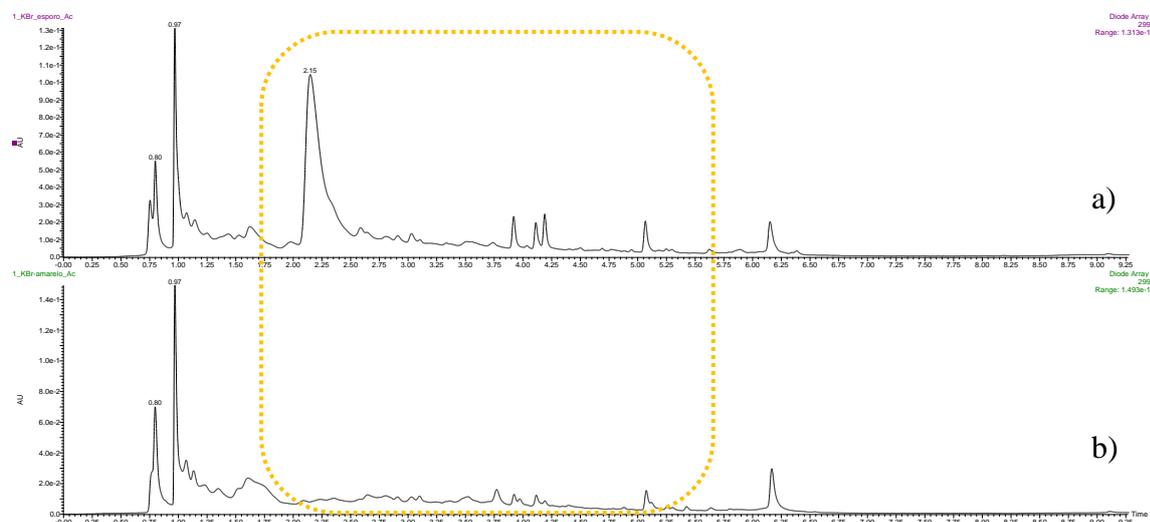
Fonte: Autor.

Figura 4.25 – Cromatograma obtido por CLUE-DAD dos extratos MeOH. Para o período de cultivo a) antes de esporular (4 dias) e b) após esporular (14 dias) em 100 g/L de KBr (coluna C-18; 15 a 100% ACN:H₂O v/v a 0,5 mL/L; 12 minutos; modo analítico) em 230 nm



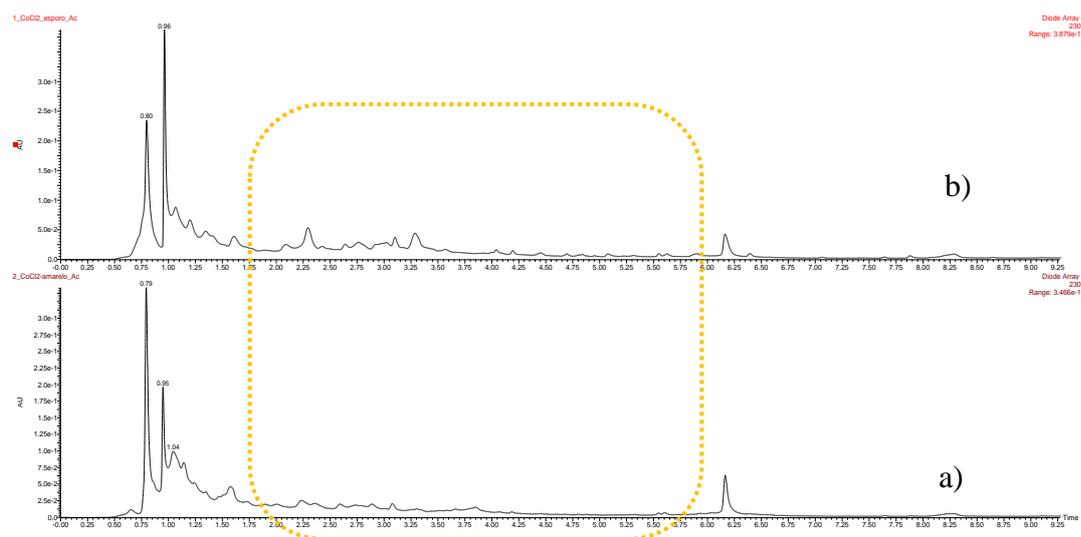
Fonte: Autor.

Figura 4.26 – Cromatograma obtido por CLUE-DAD dos extratos AcOEt. Para o período de cultivo a) antes de esporular (4 dias) e b) após esporular (7 dias) e 100 g/L de KBr (coluna C-18; 15 a 100% ACN:H₂O v/v a 0,5 mL/L; 12 minutos; modo analítico) em 299 nm



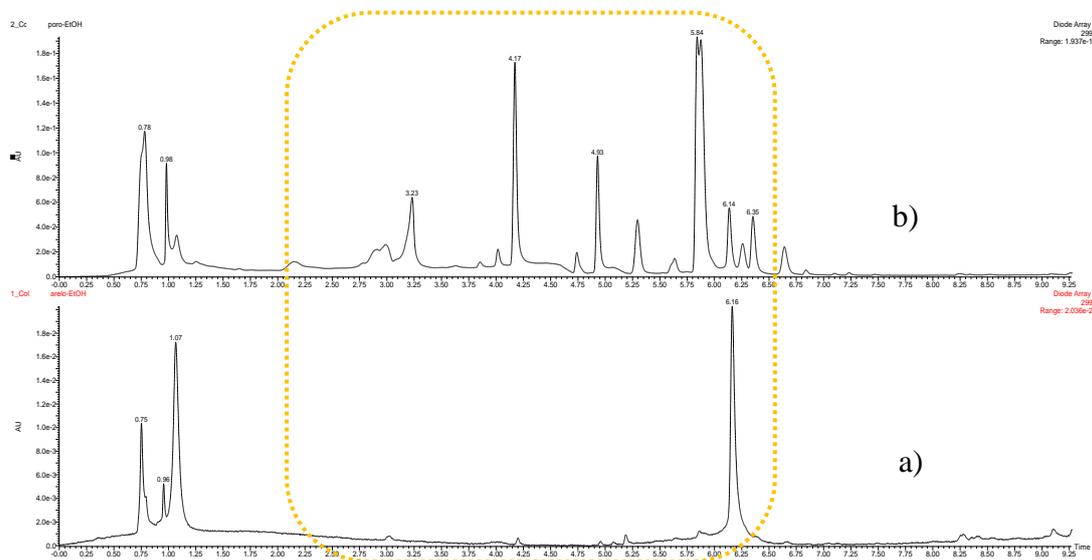
Fonte: Autor.

Figura 4.27 – Cromatograma obtido por CLUE-DAD dos extratos AcOEt. Para o período de cultivo a) antes de esporular (4 dias) e b) após esporular (7 dias) e 100 g/L de KBr (coluna C-18; 15 a 100% ACN:H₂O v/v a 0,5 mL/min; 12 minutos; modo analítico) em 230 nm



Fonte: Autor.

Figura 4.28 – Cromatograma obtido por CLUE-DAD dos extratos AcOEt. Para o período de cultivo a) antes de esporular (4 dias) e b) após esporular (7 dias) e 100 g/L de KBr (coluna C-18; 15 a 100% ACN:H₂O v/v a 0,5 mL/min; 12 minutos; modo analítico) em 296 nm



Fonte: Autor.

4.3 Isolamento e identificações de compostos

4.3 Isolamento e identificação de compostos

4.3.1 Escolha das frações estudadas e isolamento de compostos

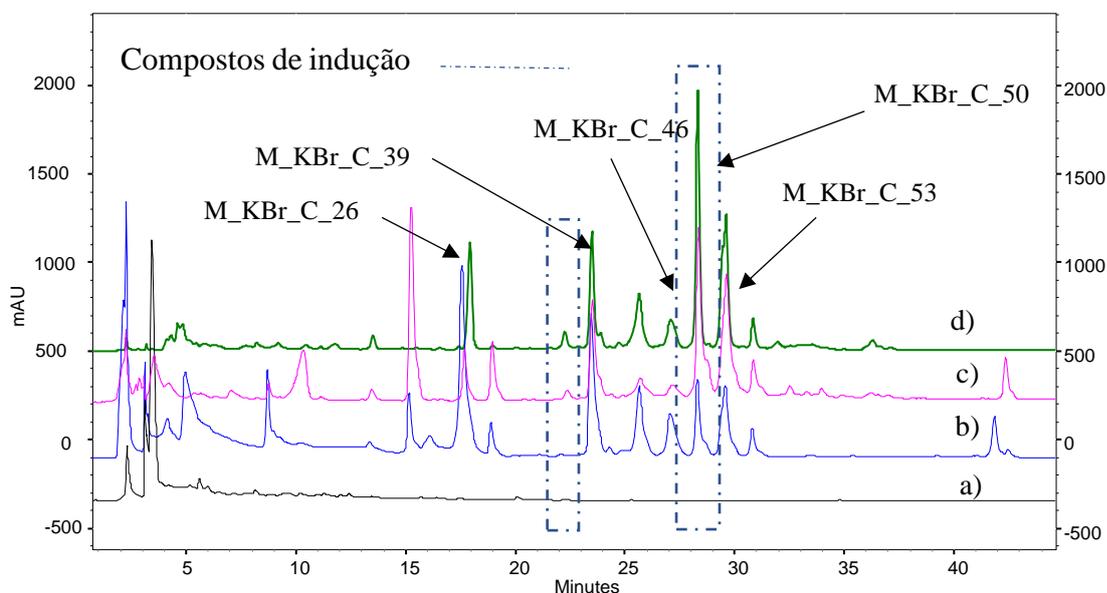
O estudo químico dos metabólitos produzidos por *A. aculeatus* nos meios suplementados com KBr e CoCl_2 foram realizados nos extratos metanólicos obtidos do cultivo em larga escala. Os extratos metanólicos apresentaram maior rendimento do que os demais extratos adquiridos.

O estudo foi efetuado principalmente nas frações MeOH_KBr_C, MeOH_KBr_D e MeOH_KBr_E obtidos do fracionamento em sílica gel do extrato metanólico a partir do cultivo em KBr. Nesses extratos, foram observadas a presença de compostos de indução (linha tracejada em azul), conforme verificou-se nas comparações dos perfis cromatográficos apresentados nas Figuras 4.29 - 4.31.

Nessas frações foram purificados compostos de indução, como também os componentes que aparentemente não eram induzidos pelos sais. Os compostos isolados foram nomeados de acordo com o tempo de retenção obtidos do CLAE preparativo.

A partir da purificação da fração MeOH_KBr_C foram isolados cinco compostos, sendo eles M_KBr_C_26, M_KBr_C_39, M_KBr_C_46, M_KBr_C_50 e M_KBr_C_53. Entre estes compostos, M_KBr_C_50 (28 min) é considerada um constituinte de indução, devido ele ter sido produzido em maior abundância relativa em meio contendo KBr do que no controle. O composto de indução em 22,0 min não foi purificado (Figura 4.29). A substância M_KBr_C_46 ainda está em processo de elucidação estrutural.

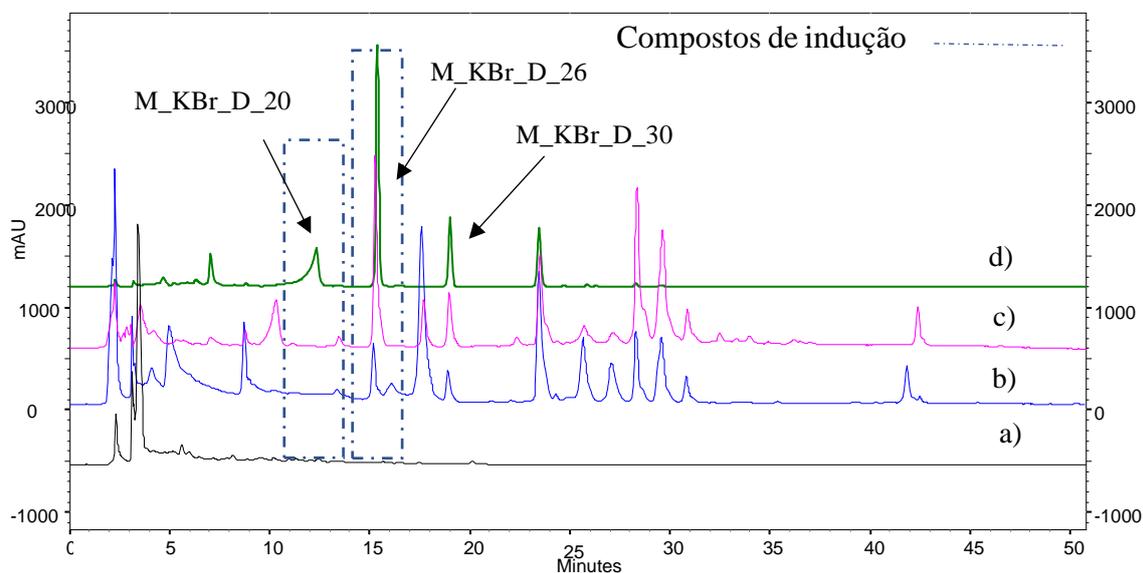
Figura 4.29 – Cromatograma obtido por CLAE-DAD do a) branco do meio KBr, b) do extrato obtido do cultivo de *A. aculeatus* no controle Czapek, c) do extrato obtido do cultivo no meio suplementado com KBr e c) da fração **MeOH-KBr-C** em 293 nm. O método de separação foi com a (coluna: Phenomenex Luna Phenyl-Hexyl; 15 a 100% ACN:H₂O v/v a 0,8 mL/min; 40 minutos; modo analítico) .



Fonte: Autor.

Da fração MeOH_KBr_D foram purificadas três substâncias, dentre as quais foram identificadas as duas M_KBr_D_26 e M_KBr_D_30. Foi observado que os compostos M_KBr_D_26 (15,52 min) e M_KBr_D_30 (19,00 min) estavam em maior abundância no meio suplementado com KBr do que no controle, sendo portanto considerados compostos induzidos. O terceiro composto M_KBr_D_20 (12,5 min) é apontado como uma substância que não foi produzida no controle. Porém ela ainda está em processo de elucidação estrutural (Figura 4.30).

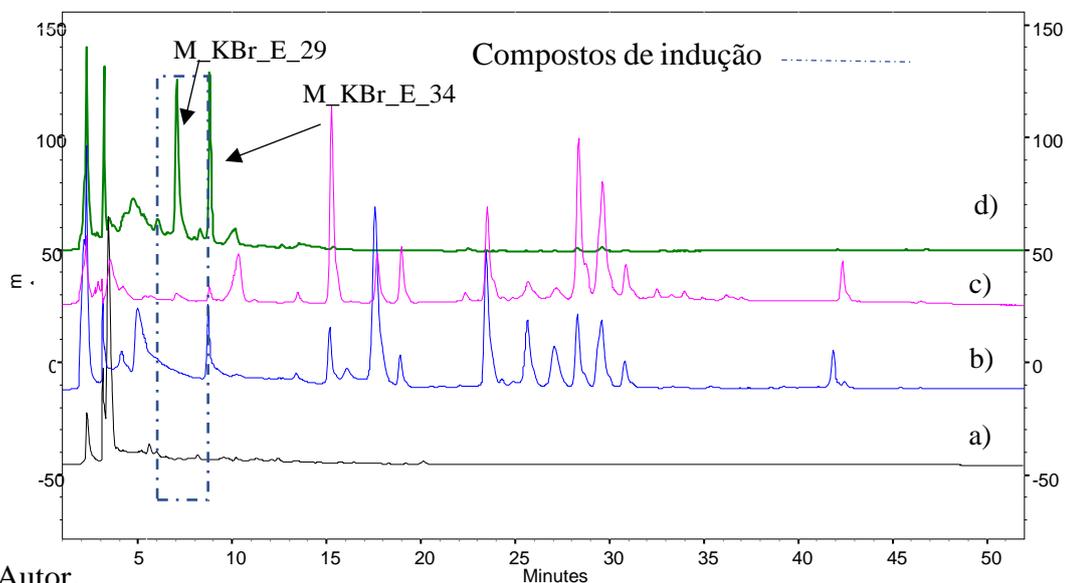
Figura 4.30 – Cromatograma obtido por CLAE-DAD do a) branco do meio KBr b) do extrato obtido do cultivo de *A. aculeatus* no controle, c) do extrato obtido do cultivo no meio suplementado com KBr e c) da fração **MeOH-KBr-D** em 293 nm. O método de separação foi com a (coluna Phenomenex Luna Phenyl-Hexyl; 15 a 100% ACN:H₂O v/v a 0,8 mL/min; 40 minutos; modo analítico)



Fonte: Autor.

O fracionamento de MeOH_KBr_E, resultou no isolamento de três compostos, tais como M_KBr_E_20, M_KBr_E_29 e M_KBr_E_34. Desses compostos M_KBr_E_34 foi elucidada. Os demais foram submetidos a mais investigação estrutural, incluindo o constituinte de indução em 7,0 min (M_KBr_E_29) (Figura 4.31).

Figura 4.31 – Cromatograma obtido por CLAE-DAD do a) branco do meio KBr, b) do extrato obtido do cultivo de *A. aculeatus* no controle, c) do extrato obtido do cultivo no meio suplementado com KBr e c) da fração **MeOH-KBr-E** em 293 nm. O método de separação foi com a (coluna Phenomenex Luna Phenyl-Hexyl; 15 a 100% ACN:H₂O v/v a 0,8 mL/min; 40 minutos; modo analítico)

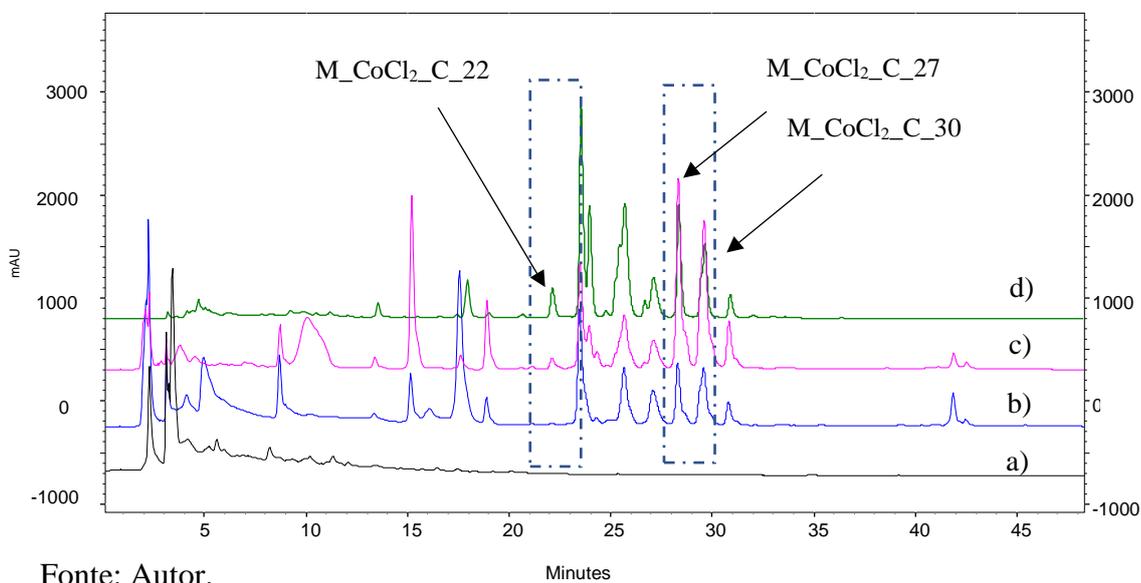


Fonte: Autor.

Da fração MEOH-CoCl₂ obtida do fracionamento em gel de sílica do extrato metanólico do cultivo de CoCl₂ (Figura 4.32) foi verificada a presença de um composto indução em 22,0 min, quando comparado ao controle Czapek. Além disso, observou-se um maior estímulo de produção de dois compostos em 27,2 e 30,0 min, que foram biossintetizados em menor abundância no controle.

O isolamento dos compostos de indução e de não indução contidos nos extratos foi efetuado por CLAE em escala preparativa e analisados por RMN ¹H. Embora estejam em processo de elucidação estrutural, esses compostos já foram verificados serem pertencentes à classe dos policetídeos e derivados de fenilalanina. O dados de RMN ¹H mostraram que as substâncias de indução em 22,0, 27,5 e 30,0 min (M_CoCl₂_C_22, M_CoCl₂_C_27, M_CoCl₂_C_30) foram purificadas.

Figura 4.32 – Cromatograma obtido por CLAE-DAD do a) branco do meio CoCl_2 b) do extrato obtido do cultivo de *A. aculeatus* no controle, c) do extrato obtido do cultivo no meio suplementado com CoCl_2 e c) e da fração **MeOH-CoCl₂-C** em 293 nm. . O método de separação foi com a (coluna Phenomenex Luna Phenyl-Hexyl; 15 a 100% ACN:H₂O v/v a 0,8 mL/min; 40 minutos; modo analítico).



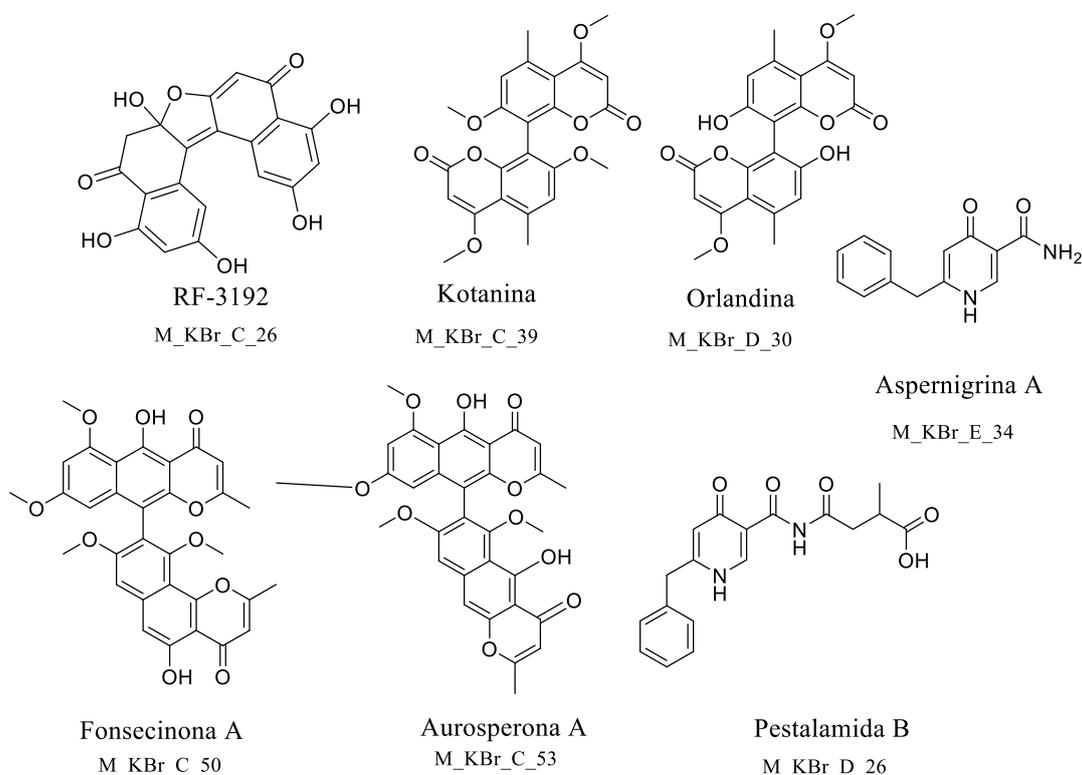
Fonte: Autor.

4.3.2 Identificações dos compostos isolados do extrato MeOH_KBr

A partir do fracionamento cromatográfico das frações metanólicas por CLAE foram obtidos os compostos da classe dos poliketóides identificados como RF 3192C, (M_KBr_C_26), foncesinona A (M_KBr_C_50) e aurosperona A (M_KBr_C_53), bem como as bicumarina kotanina (M_KBr_C_39) e orlandina (M_KBr_D_30). Foram também obtidas as substâncias derivadas da fenilalanina como a pestalamida B (M_KBr_D_26) e Aspernigrina A (M_KBr_E_34) (Figura 4.33).

Dentre estes constituintes, a foncesinona A, a orlandina e a pestalamida B que foram produzidos em maior abundância no cultivo suplementado com KBr, sendo constituintes provavelmente induzidos pela presença dos sais.

Figura 4.33 - Substâncias isoladas no extrato metanólico do cultivo com KBr

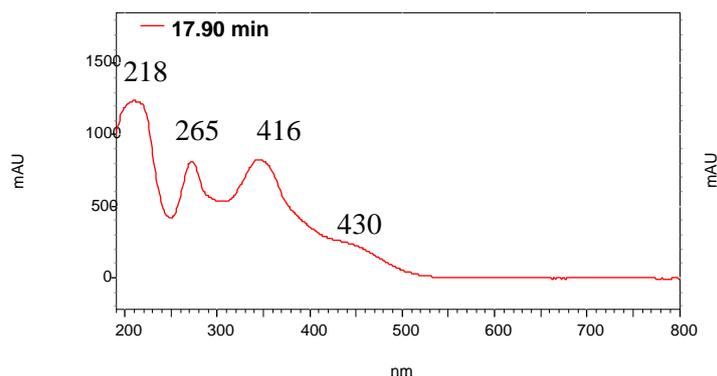


Fonte: Autor.

4.3.2.1 Identificação da estrutura M_KBr_C_26

O constituinte M_KBr_C_26 (2,6 mg), obtido da fração MeOH_KBr_C, apresentou-se como um cristal alaranjado intenso e com absorção máxima no espectro de UV em 218, 265, 316, 430 nm (Figura 4.34).

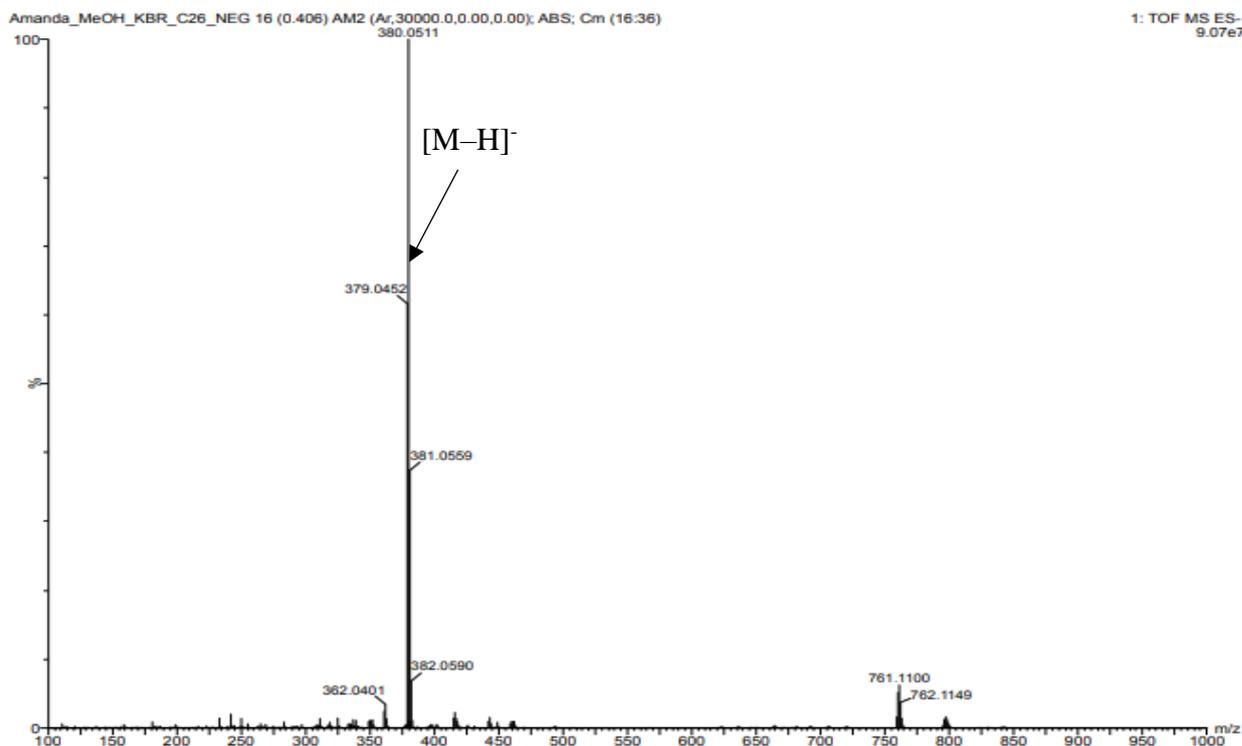
Figura 4.34 – Espectro de absorção do composto M_KBr_C_26 em 50% ACN:H₂O v/v



Fonte: Autor.

O espectro de massas de alta resolução do constituinte M_KBr_C_26 no modo negativo de ionização (HRMS) apresentou íon molecular ($[M-H]^-$) em 379,0452 (Figura 4.35). A partir desse dado determinou-se a fórmula molecular da substância como C₂₀H₁₂O₈ (380,0530 Da), que indicou a presença de 15 insaturações.

Figura 4.35 – Espectro de massas de alta resolução no modo negativo de M_KBr_C_26

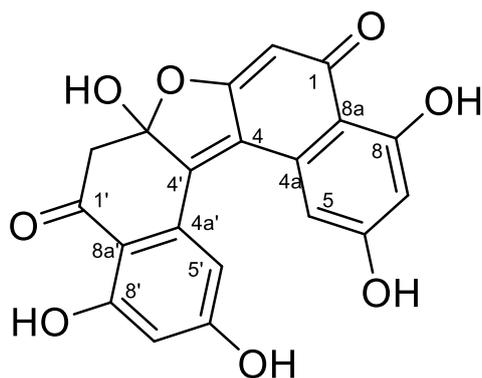


Fonte: Autor.

A partir do espectro de RMN de ¹H, pode-se verificar a presença de cinco prótons aromáticos, sendo que quatro deles exibem acoplamentos característicos de sistemas *meta* substituídos δ_H 5,81 (1H, *s*), 6,36 (1H, *d*; $J= 1,6$), 6,46 (1H, *d*; $J= 2,0$), 7,16 (1H, *d*; $J= 2,0$) e 7,58 (1H, *d*, $J= 1,6$). Observou-se também a presença de hidrogênios metilênicos diastereotópicos, pelos sinais dupletos em δ_C 3,15 (1 H, *d*; 16,8) e 3,31 (1H, *d*; 16,8) (Figura 4.36). Este sistema de acoplamento foi confirmado a partir das suas correlações com o mesmo carbono (δ_C 49,8) apresentadas no mapa de contorno do HSQC (Figura 4.38).

Além disso, foram observados 20 sinais de carbonos no espectro de ¹³C. Desses sinais, 13 são considerados carbonos quaternários incluindo regiões de carbonilas em δ_C 198,4 e 190,8 (Figura 4.37).

A estrutura foi atribuída como sendo RF 3192C a partir dos dados de RMN ¹H, ¹³C e HRMS em comparação com os dados da literatura, ilustrados na Tabela 4.1 (YOSHIDA et al, 1993).



RF 3192C

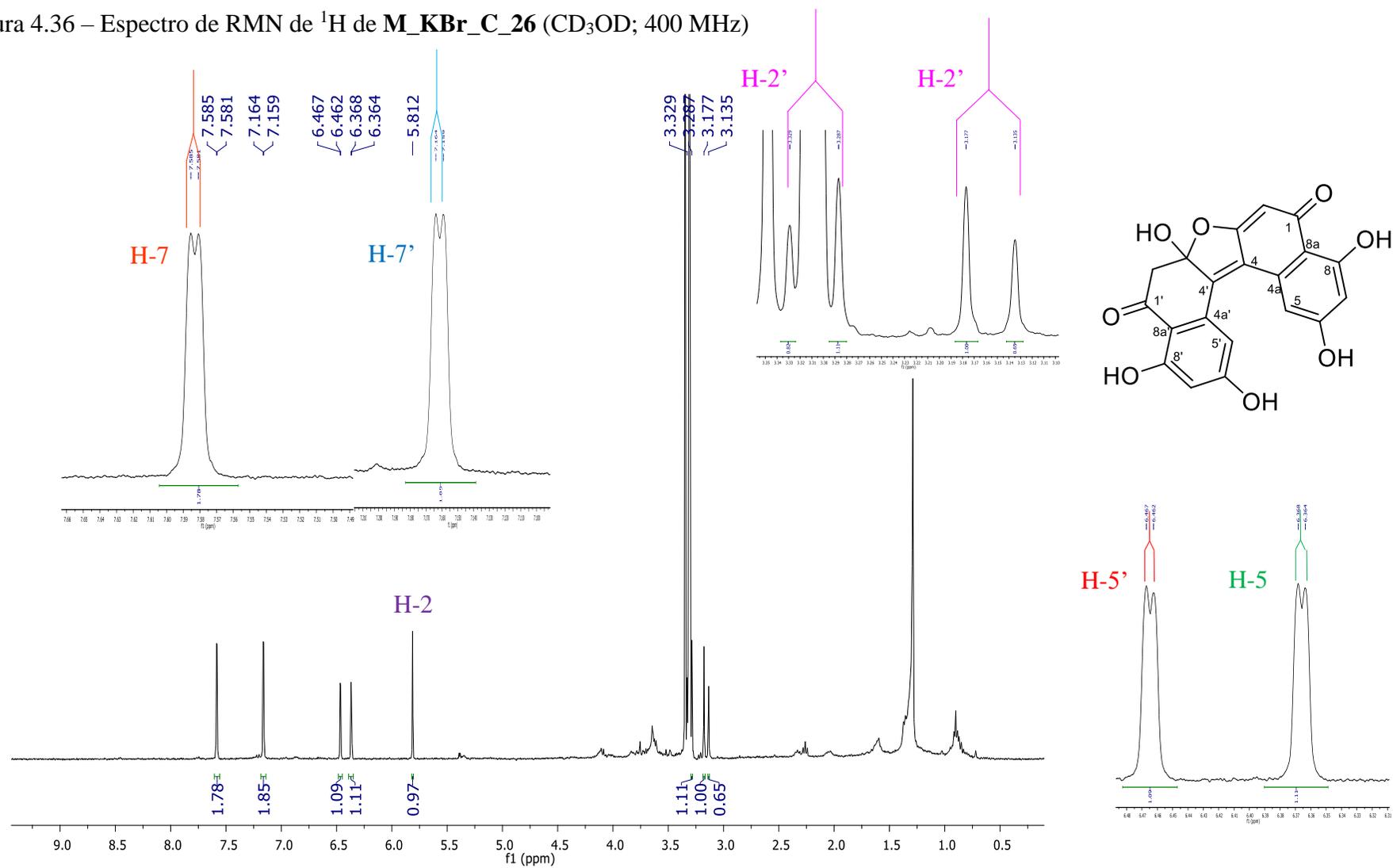
A identificação desta substância foi confirmada ainda pelas correlações observadas no mapa de contornos de HSQC (Figura 4.38), que apresentou correlação dos hidrogênios dos sistemas aromáticos em δ_H 5,81 (H-2) com o carbono em δ_C 100,0 (C-2), δ_H 6,36 (H-5) com o carbono em δ_C 106,0 (C-5), em δ_H 6,46 (H-5') com o carbono em δ_C 106,1 (C-5'), em δ_H 7,16 (H-7') com o carbono em δ_C 110,1 (C-7'), e em δ_H 7,58 (H-7) com o carbono em δ_C 106,4 (C-7).

Além disso, as correlações observadas no mapa de contornos de HMBC (Figura 4.39) desse poliketide também auxiliaram a confirmação dessa estrutura, como as correlações entre os prótons metilênicos em δ_H 3,15, 3,31 (H-2') com a carbonila em δ_C 198,4 (C-1'), bem com as correlações desses hidrogênios metilênicos com o carbono quaternário em δ_C 112,0 (C-3') e o carbono ligado ao sistema aromático em δ_C 145,8 (C-4'). Outras correlações observadas foram dos prótons ligados ao sistema quinoide em δ_H 5,81 (H-2) com os carbonos em δ_C 172,0 (C-3) 121,9 (C-8a), bem como do hidrogênio do sistema aromático em δ_H 6,36 (H-5) com os carbonos em δ_C 165,5(C-8) e 106,4 (C-5). Outras correlações importantes foram apresentadas pelos hidrogênios em δ_H 6,46 (H-5') com os carbonos em δ_C 110,1 (C-7') e 165,5 (C-8'); em δ_H 7,16 (H-7') com os carbonos em δ_C 110,0 (C-4a'), 105,7(C-5), 165,5(C-8) e 145,8 (C-8a). Por fim, a correlação do hidrogênio em δ_H 7,58 (H-7) com os carbonos em δ_C 106,1(C-5), 162,8 (C-6), 121,9 (C-8a). A partir do espectro de RMN ^{13}C foi possível

atribuir os sinais em δ_C 131,0 como C-4 e 135,0 como C-4' dos quais não foram verificadas correlações no HMBC (Figura 4.39).

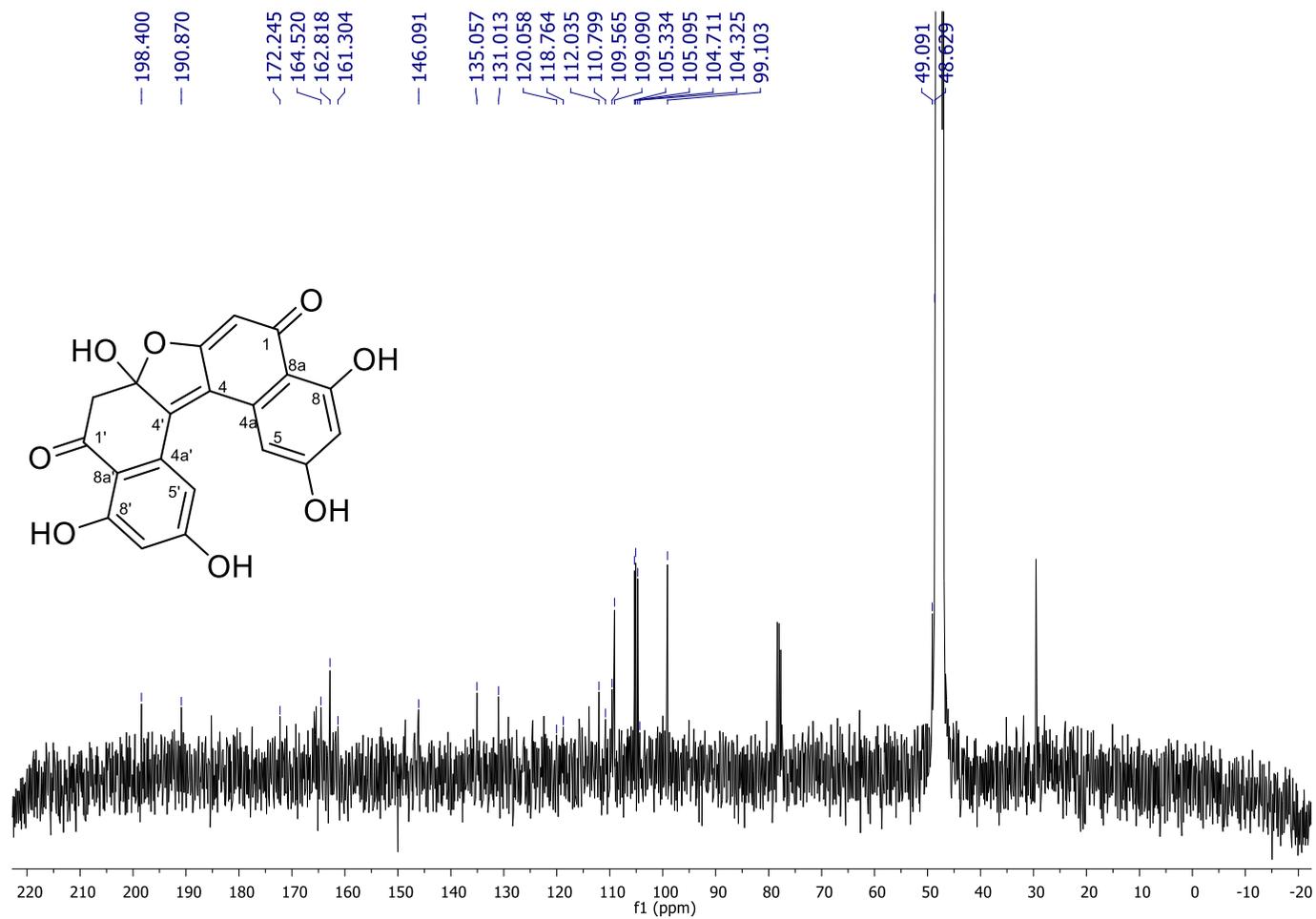
O primeiro isolamento de RF 3192C reportado na literatura foi de *Chaetomella circinoseta*. Assim verificou-se a aplicação farmacológica desse composto para o tratamento de doenças diabéticas, como neuropatia diabética, catarata diabética, ceratopatia diabética, retinopatia diabética e nefropatia diabética (YOSHIDA et al, 1993). Isômeros dessa substância, (\pm)-Asperlona A e B, já foram reportados como constituintes produzidos por fungos do gênero *Aspergillus* sp (XIAO et al., 2015); e também recentemente, foram mencionadas como constituintes isolados de *Aspergillus aculeatus* (WANG et al., 2018), embora os autores não tenham reportado dados de RMN da estrutura molecular e nem como realizaram a identificação estrutural.

Figura 4.36 – Espectro de RMN de ^1H de **M_KBr_C_26** (CD_3OD ; 400 MHz)



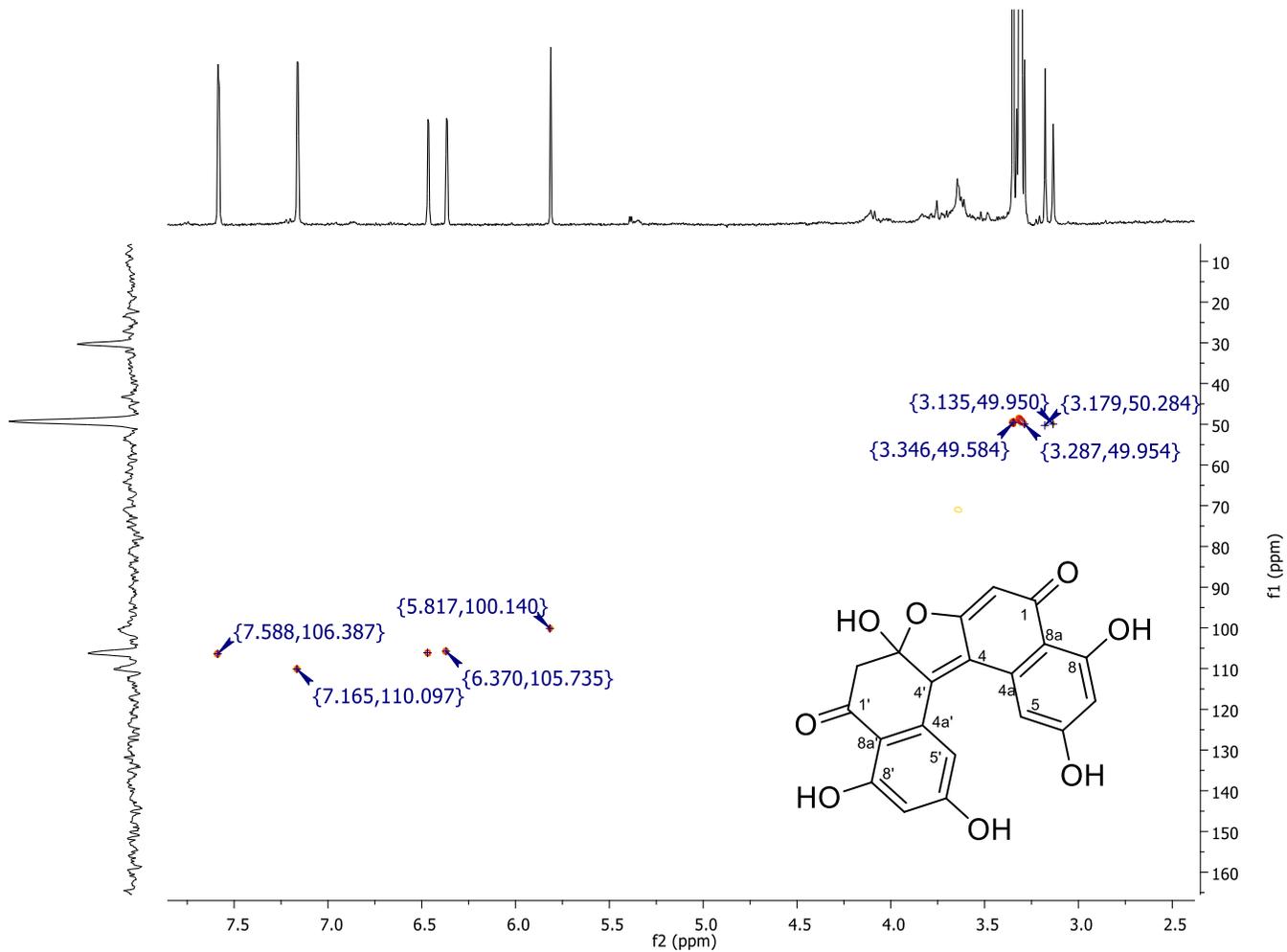
Fonte: Autor.

Figura 4.37 – Espectro de RMN de ^{13}C de **M_Br_C_26** (CD_3OD ; 100 MHz)



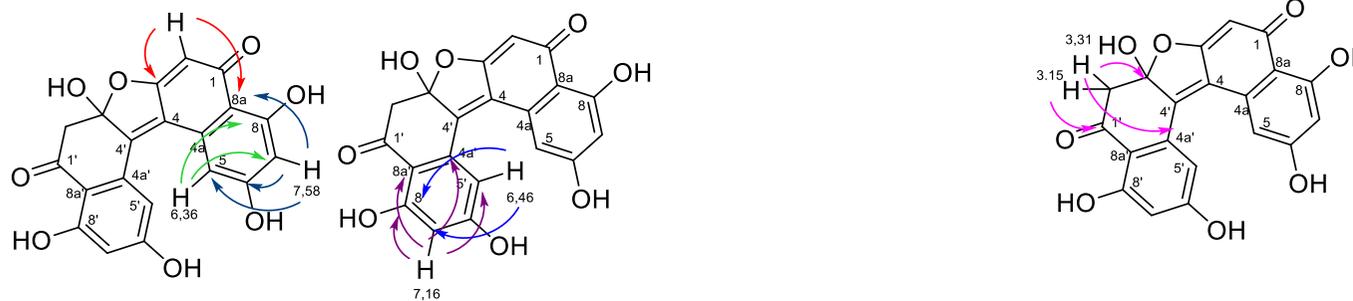
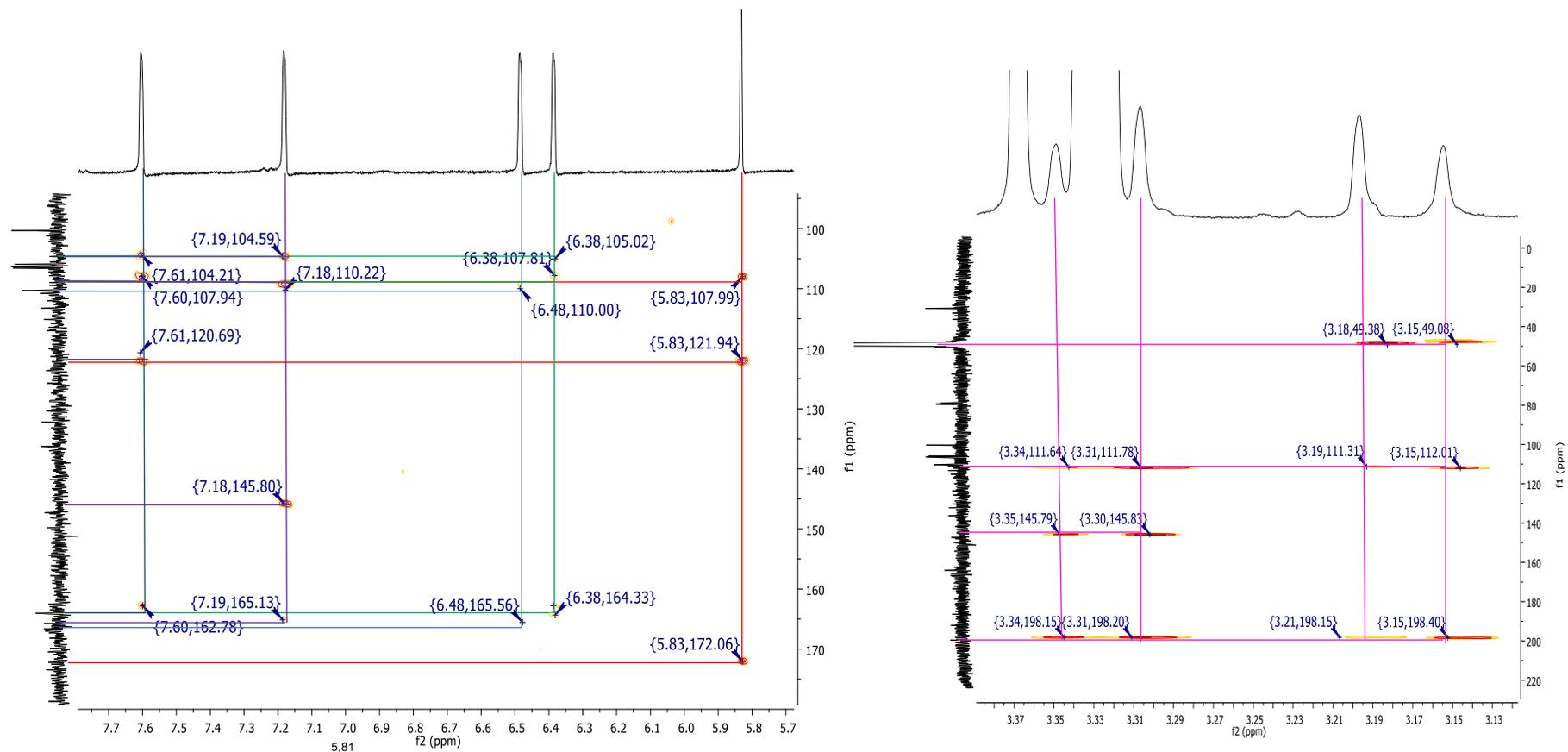
Fonte: Autor.

Figura 4.38 – Espectro bidimensional de HSQC M_KBr_C_26 (CD₃OD; 400 MHz e 100 MHz)



Fonte: Autor.

Figura 4.39 – Espectro bidimensional de HMBC ampliado de **M_KBr_C_26** (CD₃OD; 400 MHz e 100 MHz)



Fonte: Autor.

Tabela 4.1 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para M_KBr_C_26 (400 e 100 MHz;).

MeOH_KBr_c_26 ^a			RF 3192C ^b	
N ^o	δ_{H} (mult., J em Hz)	δ_{C}	δ_{H} (mult., J em Hz)	δ_{C}
1		190,8		190,3
2	5,81 (1H, s)	100,0	5,84 (1H, s)	99,3
3		172,0		172,0
4		131,0		130,8
4a		121,9		122,0
5	6,36 (1H, d; 1,6)	106,1		105,4
6		162,3		162,9
6-OH				
7	7,58 (1H, d, 1,6)	106,1	7,506 (1H, d, J=2.0)	107,9
8		165,5		165,2
8a		110,0		109,4
8-OH		-		-
1'		198,4		199,1
2'	3,15 (1 H, d; 16,8) 3,31 (1H, d; 16,8)	49,8	3,23 (1H, d, J=16.8), 3,408 (1H, d, J=16.8)	49,6
3'		112,0		112,6
3'-OH		-		-
4'		135,0		135,1
4a		110,0		112,6
5'	6,46(1H, d; 2,0)	106,4	6,36 (1H, d; 1,6)	109,50
6'		164,3		164,3
6-OH		-		-
7'	7,16 (1H, d; 2,0)	106,4	7,099 (1H, J=2.0)	105,1
8'		165,2		165,2
8a'		145,8		146,5

^aDados de RMN de ^1H e ^{13}C EM 400 E 100 MHz obtidos em CD_3OD .

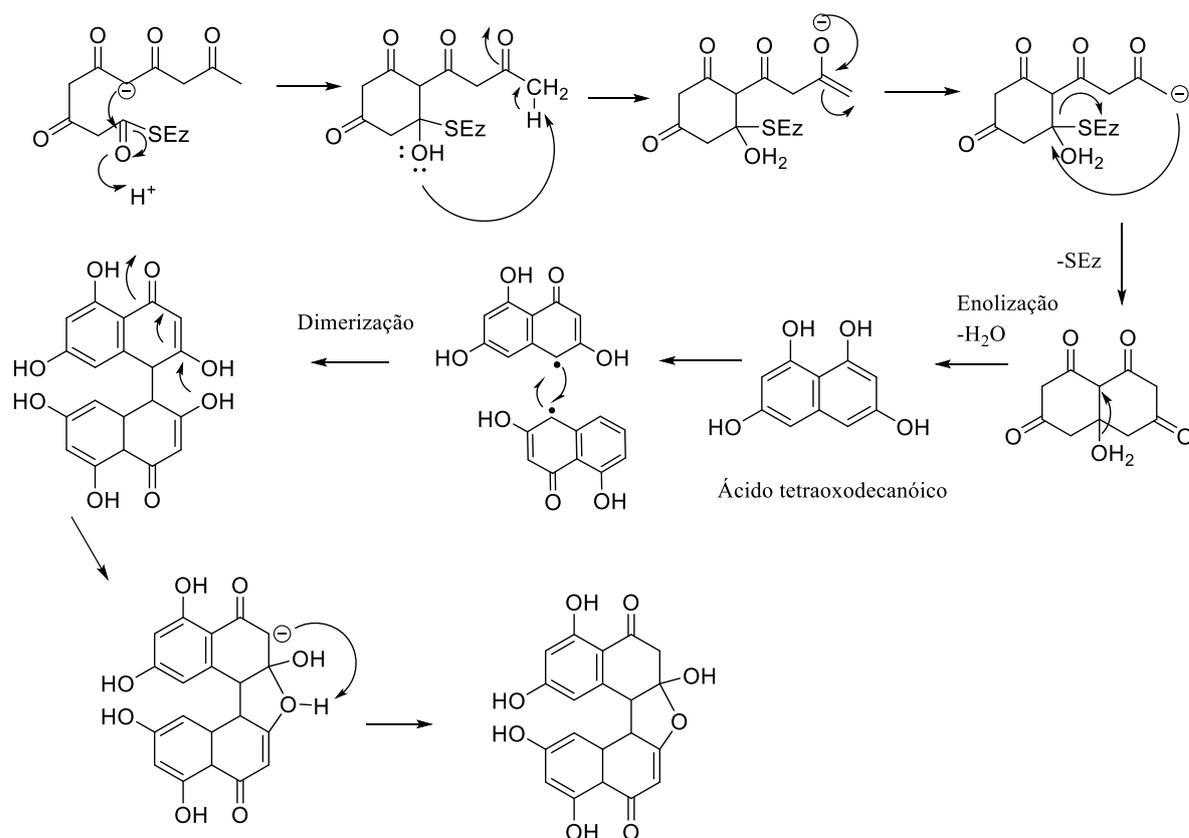
^bDados obtidos em d_6 -DMSO por YOSHIDA et al., 1993.

4.3.2.1.1 Proposta Biossintética para o constituinte RF-3192

XIAO et al., (2015), retratou uma proposta biossintética para os isômeros de RF-3192, sendo (\pm) asperlonas A e B. A rota mecanística proposta nesse trabalho para (\pm) asperlonas A e B foi a partir da rota policetídic sintase de fungos. A partir dessa proposta abordada por XIAO et al., (2015) foi feita uma proposição biossintética para a produção de RF-3192 em *A. aculeatus*.

Assim, supõem-se que a biossíntese partir de cinco unidades de acetato que sofreram a condensação do tipo Claisen, seguida do equilíbrio ceto-enólico para formar o ácido tetraoxodecanóico. Em seguida ocorreu uma dimerização dos policetídeos por meio de um mecanismo radicalar (Figura 4.73).

Figura 4.40 – Proposta biossintética para RF-3192

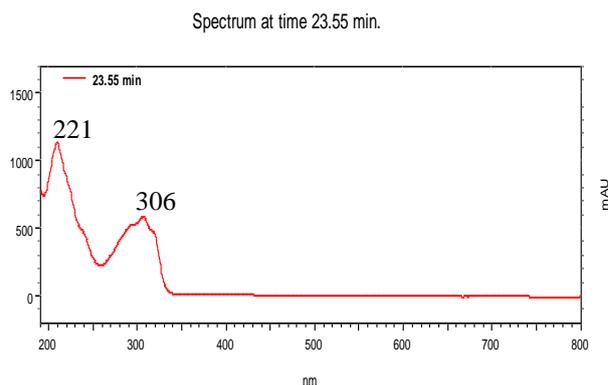


Fonte: Autor.

4.3.2.2 Identificação da estrutura M_KBr_C_39

O constituinte M_KBr_C_39 (1,7 mg) foi isolado como sólido amarelo pálido amorfo da fração MeOH_KBr C, que apresentou absorção no espectro de UV na região de 221 e 306 nm, (Figura 4.39).

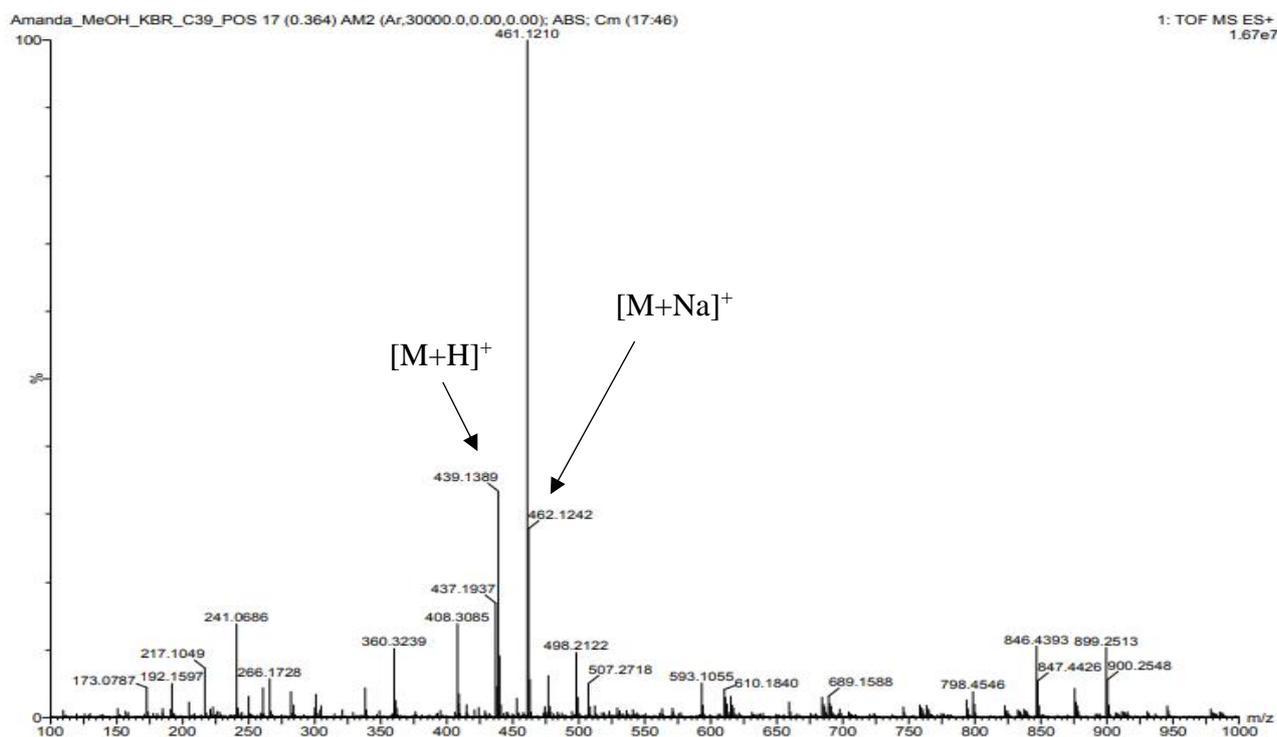
Figura 4.41 – Espectro de absorção do composto M_KBr_C_39 em ACN:H₂O v/v



Fonte: Autor.

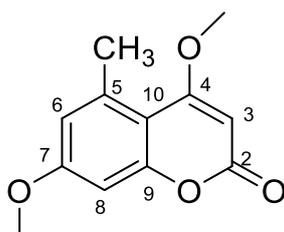
A partir do experimento de massas de alta resolução, no modo positivo de ionização, pode-se perceber a presença do íons molecular de m/z 439,1389 [M+H]⁺ e 462,1242 [M+Na]⁺ (Figura 4.40). Assim, os resultados sugeriram a formula molecular como sendo C₂₄H₂₂O₈ (438,1310 Da).

Figura 4.42 – Espectro de massas de alta resolução no modo positivo de M_KBr_C_39



Fonte: Autor.

Os dados de RMN de ^1H (Figura 4.43) apresentaram-se com pouca presença de sinais, podendo indicar uma estrutura dimérica, pela elevada massa molecular observada no experimento de HRMS. Todos os sinais apresentados no de RMN de ^1H foram singletos, com regiões de hidrogênio alifínicos e de aromáticos em δ_{H} 5,51 (1H, s) e 6,72 (1H, s), respectivamente. Além disso, observou-se sinais referente a região de metoxilas em δ_{H} 3,80 (3H, s) e 3,93 (3H, s) e a presença de sinais referente a metilas em δ_{H} 2,70(3H, s). A partir desses dados, pode-se indicar que o composto M_KBr_C_39 como sendo uma cumarina, ou seja, a dimetilsiderina.

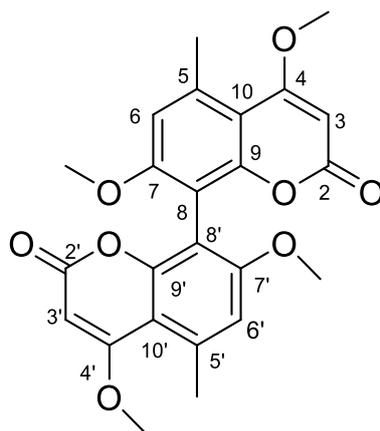


Dimetilsiderina

Os dados de RMN de ^{13}C (Figura 4.44) apresentou 12 carbonos, que pode confirmar a ocorrência de uma molécula simétrica, como uma bicumarina. No espectro de RMN de ^1H foram observadas a presença de sinais na região de carboxila de éster α,β -insaturada em δ_{C} 163,0 (C-2), sinais na região de metoxilas ligadas a anéis aromáticos e olefínicos em δ_{C} 56,3(7-OCH₃) e 56,0 (4-OCH₃), respectivamente. Bem como, a presença de sinal na região de metila ligada a anel aromático em δ_{C} 24,3 (5-CH₃). Ainda, verificou-se a incidência de sinais na região de carbono olefínico ligado a metoxilas em δ_{C} 170,0 (C-4) e carbono aromático ligado a metoxila em δ_{C} 159,7 (C-7). Assim como, a ocorrência de sinais na região de aromático em δ_{C} 153,6 (C-9), 138,7 (C-5), 111,6(C-6), 108,6(C-9), 107,6(C-8) e carbonos alefínicos em δ_{C} 87,9(C-3).

A partir dos comparações com os dados da literatura (Tabela 4.2) (CAMPOS, 2005; STOLHERS e STOESSL, 1988) e as correlações observadas no mapa de contorno do HSQC e HMBC, pode-se atribuir a substância como kotanina.

Foram verificadas as correlações no mapa de contorno no HSQC (Figura 4.45) do hidrogênio em δ_{H} 2,70 (H-5) com o carbono em δ_{C} 24,2 (5-CH₃), bem como das metoxilas em δ_{H} 3,93 (H-4) e 3,80 (H-7) com os carbonos em δ_{C} 56,0 (4-OCH₃) e 56,3 (7-OCH₃), de modo respectivo. Além disso, foram verificadas correlações do hidrogênio olefínico em δ_{H} 5,51 (H-3) com o carbono em δ_{C} 87,9 (C-3) e do próton ligado ao sistema aromático em δ_{H} 6,72 (H-6) com o carbono em δ_{C} 111,6 (C-6). Contudo, não foi verificada correlações do C-8 em δ_{C} 107,6 com o hidrogênio no HSQC, levando a considerar que a formação da dimerização ocorreu nessa posição, formando a 8,8'-bicumarina (Kotanina).

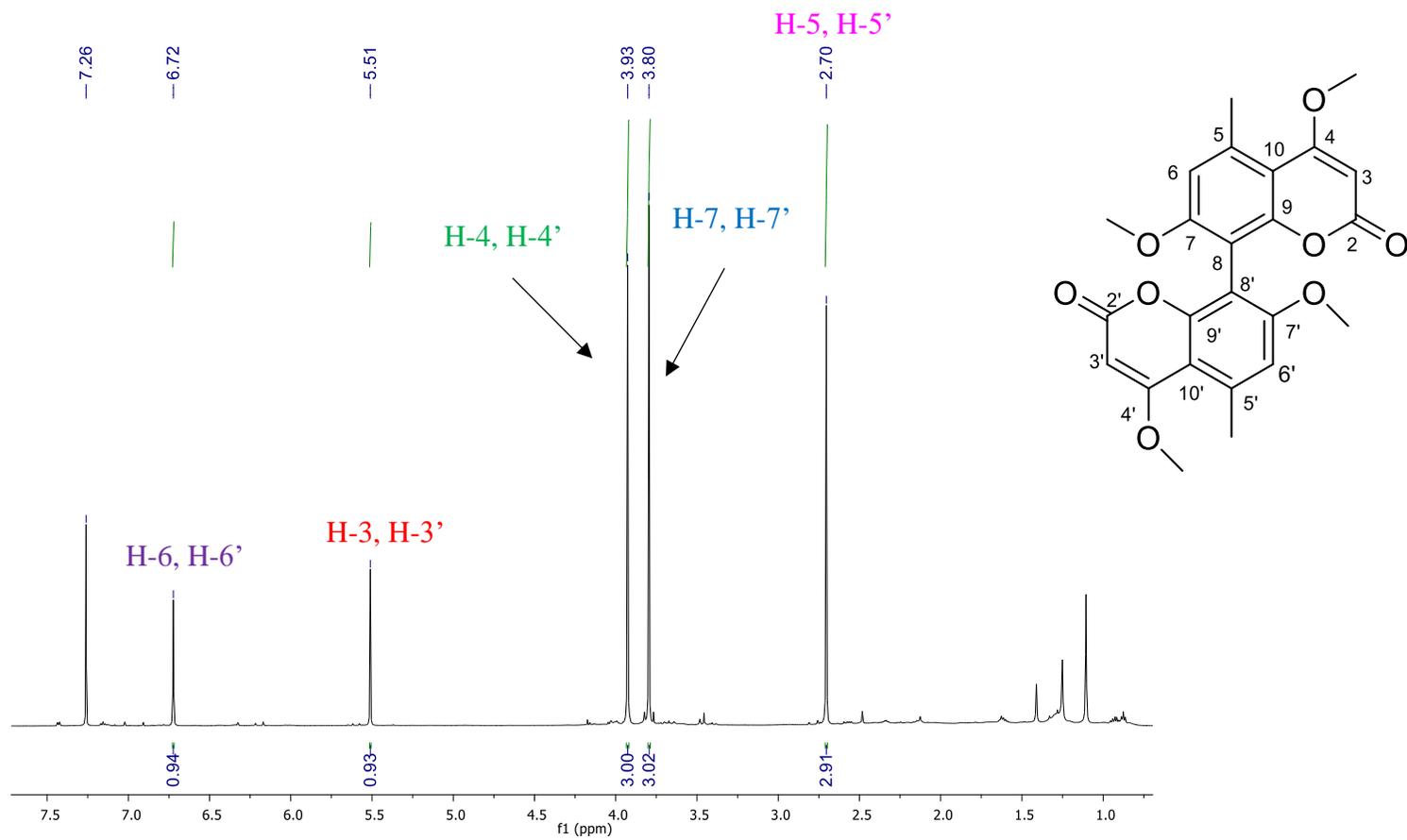


8,8'-bicumarina (Kotanina)

Os mapas de contorno do HMBC (Figura 4.46) confirmam a estrutura como sendo a kotanina. Através das correlações dos hidrogênios da metila em δ_H 2,70 (5-CH₃, 5'-CH₃) com os carbonos em δ_C 170,0 (C-4,C- 4'), 138,7(C-5,C-5'), 111,6 (C-6,C-6'), 108,6 (1C-0, C-10') e 153,6 (C-9,C-9'). Além disso, foi verificado correlações das metoxilas: em δ_H 3,80 (7-OCH₃, 7'-OCH₃) com o carbono em δ_C 159,7 (C-7, C-7') e em δ_H 3,93 (4-OCH₃, 4'-OCH₃) com o carbono em δ_C 170,0 (C-4, C-4'). Como também, foram observadas correlações dos prótons em δ_H 5,51 (H-3,H- 3') com o carbono em δ_C 170,0(4,4') e 108,6 (10,10'). Por fim, foram verificadas correlações do hidrogênio ligado ao anel aromático em δ_H 6,72(H-6, H-6') com os carbonos em δ_C 108,6 (10,10') e 159,7(7,7'). As correlações estão ilustradas na Figura 4.46.

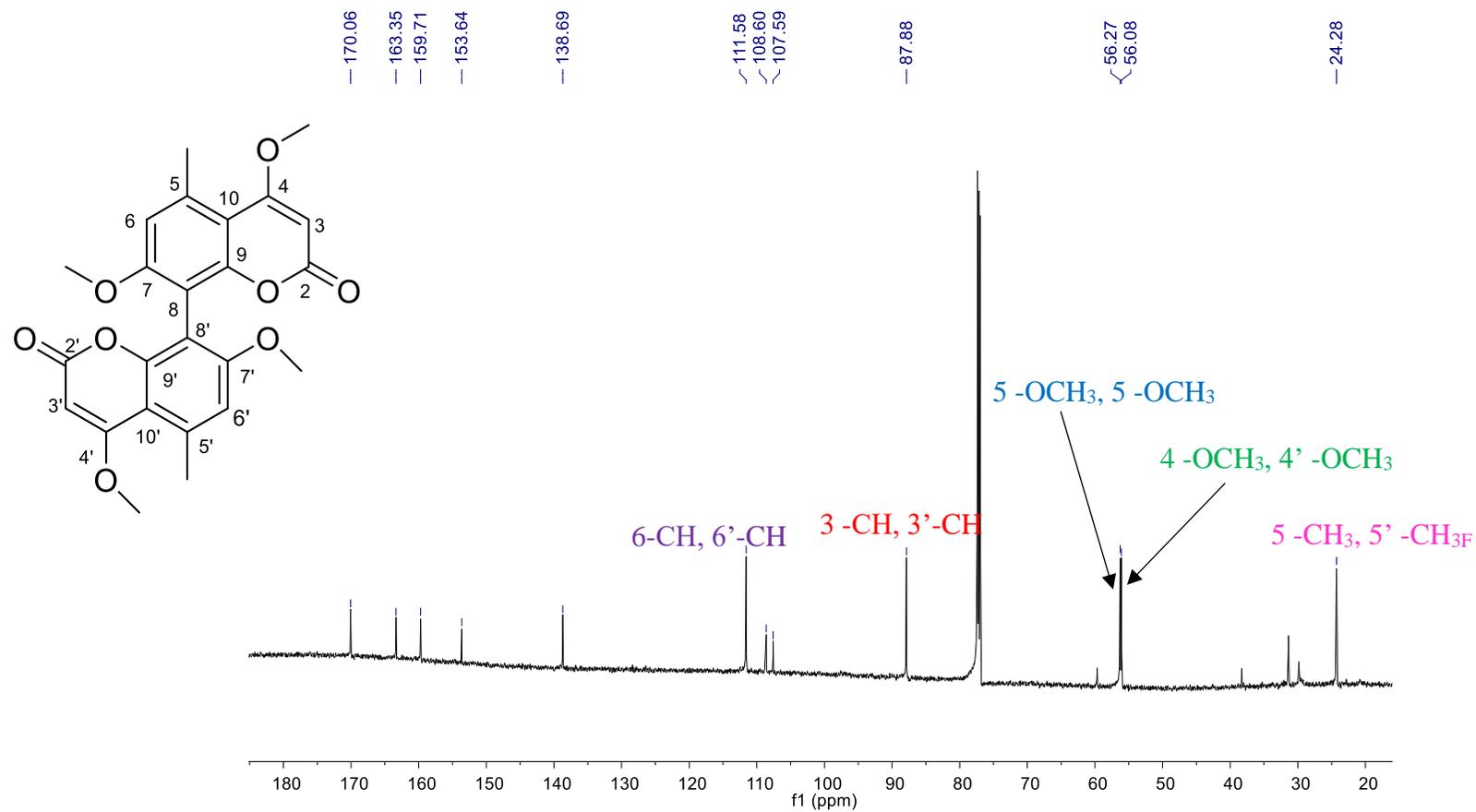
Na literatura é assinalado que dentre o grupo das bisiderinas, a kotanina é uma das mais biossintetizadas por espécies de *Aspergillus* (HÜTTEL e MÜLLER, 2007). O seu primeiro isolamento ocorreu na espécie de *A. glaucus* por BÜCHI et al., (1971). Além disso, posteriormente STOTHERS e STOESSL, (1988) fizeram um experimento de incorporação de acetato (¹³C) em *A. niger*, para confirmar a origem policetíidica desse composto. Este composto já foi reportado por CAMPOS, (2005) como constituinte biossintetizado por *A. aculetus*.

Figura 4.43 – Espectro de RMN de ^1H de **M_KBr_C_39** (CDCl_3 ; 600 MHz)



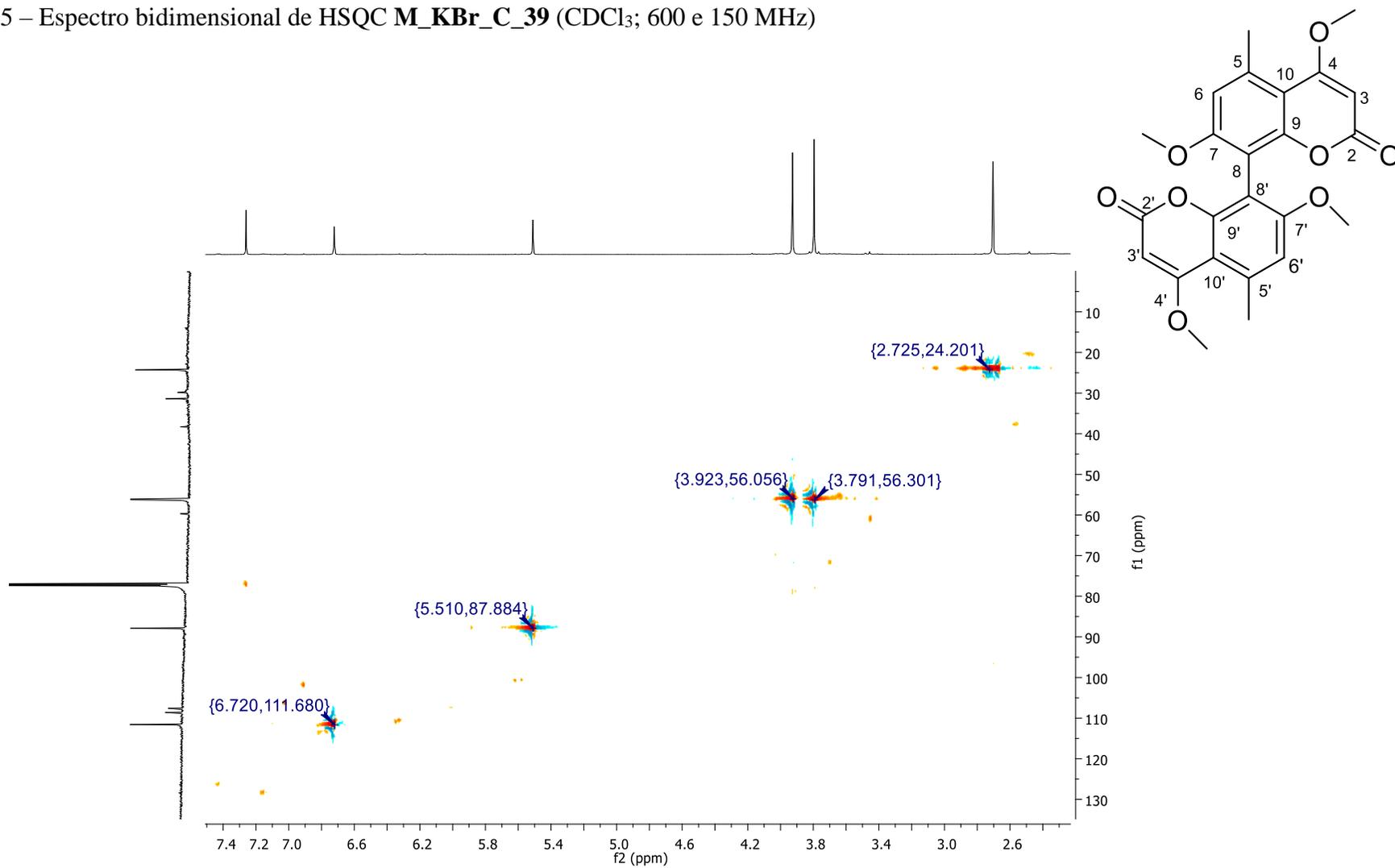
Fonte: Autor.

Figura 4.44 – Espectro de RMN de ^{13}C de **M_KBr_C_39** (CDCl_3 ; 150 MHz)



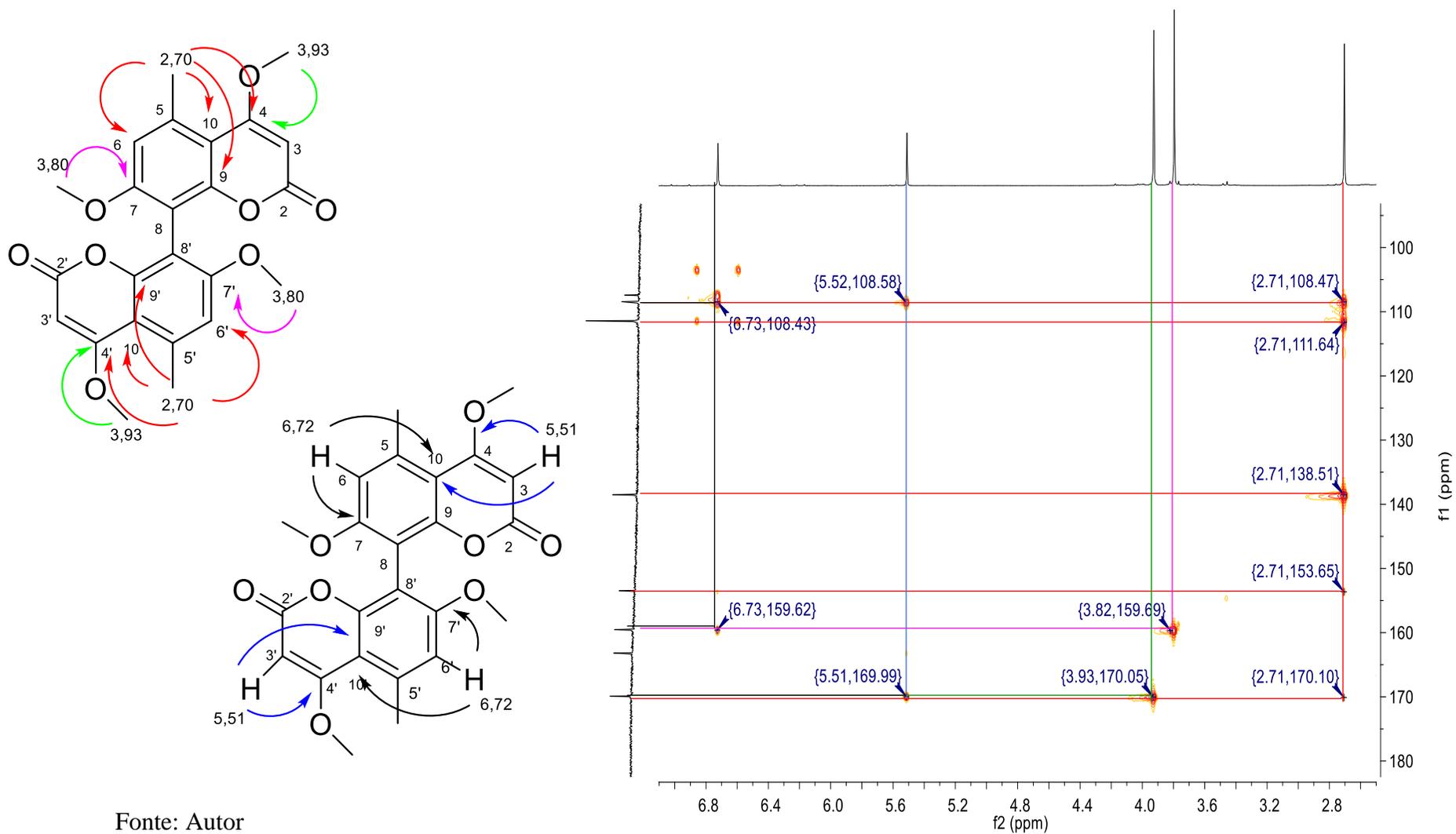
Fonte: Autor.

Figura 4.45 – Espectro bidimensional de HSQC M_KBr_C_39 (CDCl₃; 600 e 150 MHz)



Fonte: Autor.

Figura 4.46 – Espectro bidimensional de HMBC de **M_KBr_C_39** (CDCl₃; 600 e 150 MHz)



Fonte: Autor

Tabela 4.2-Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para **M_KBr_C_39** (600 e 150 MHz).

MeOH_KBr_C_39^a			Kotamina		
N^o	δ_{H} (mult., <i>J</i> em Hz) ^a	δ_{C} ^a	δ_{H} (mult., <i>J</i> em Hz) ^b	δ_{C} ^b	δ_{C} ^c
2		163,3		163,3	163,0
3	5,51 (1H, <i>s</i>)	87,9	5,51 (1H, <i>s</i>)	87,7	87,7
4		170,0		169,9	159,5
4-OCH₃	3,93 (3H, <i>s</i>)	56,0	3,93 (3H, <i>s</i>)	55,9	56,1
5		138,7		138,6	138,5
5-CH₃	2,70 (3H, <i>s</i>)	24,3	2,70 (3H, <i>s</i>)	24,1	24,2
6	6,72 (1H, <i>s</i>)	111,6	6,72 (1H, <i>s</i>)	111,4	111,4
7		159,7		159,5	169,8
7-OCH₃	3,80 (3H, <i>s</i>)	56,3	3,79 (3H, <i>s</i>)	56,1	55,9
8		107,6		107,4	107,4
9		153,6		153,3	153,5
10		108,6		108,4	108,5
2'		163,3		163,2	163,0
3'	5,51 (1H, <i>s</i>)	87,9	5,51 (1H, <i>s</i>)	87,7	87,7
4'		170,0		169,9	159,5
4'-OCH₃	3,93 (3H, <i>s</i>)	56,0	3,93 (3H, <i>s</i>)	55,9	56,1
5'		138,7		138,6	138,5
5'-CH₃	2,70 (3H, <i>s</i>)	24,3	2,70 (3H, <i>s</i>)	24,1	24,2
6'	6,72 (1H, <i>s</i>)	111,6	6,72 (1H, <i>s</i>)	111,4	111,4
7'		159,7		159,5	169,8
7'-OCH₃	3,80 (3H, <i>s</i>)	56,3	3,79 (3H, <i>s</i>)	56,1	55,9
8'		107,6		107,4	107,4
9'		153,6		153,3	153,5
10'		108,6		108,4	108,5

^aDados de espectro em CDCl_3 dos RMN de ^1H e ^{13}C em 600 MHz e 150 MHz, respectivamente.

^bDados extraídos de CAMPOS, 2005.

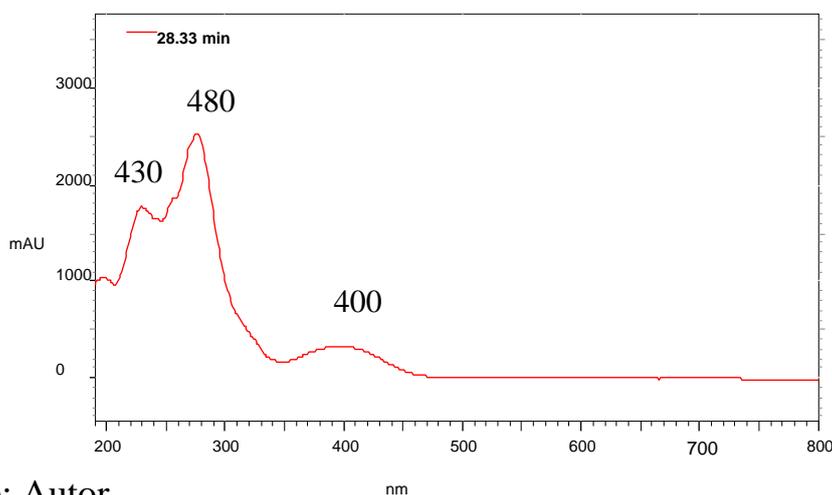
^cDados extraídos de STOLHERS e STOESSL, 1988.

4.3.2.3 Identificação da estrutura M_KBr_C_50

O constituinte M_KBr_50 (2,8 mg) é um constituinte considerado de indução, por está mais abundante no meio contendo KBr do que no controle Czapek.

O composto M_KBr_C_50 apresentou-se com uma coloração amarela intensa e amorfa. Ao avaliar o espectro de UV dessa substância percebeu-se regiões de absorção em 230, 280 e 400 nm característico de nafto- γ -piroras (Figura 4.47).

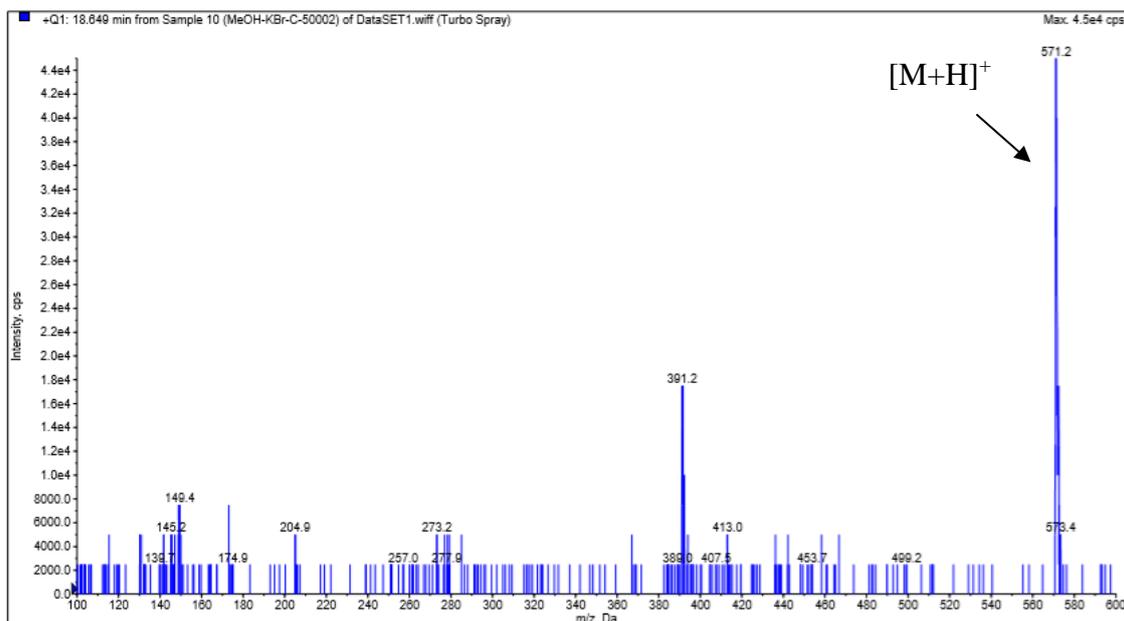
Figura 4.47 – Espectro de absorção do composto M_KBr_C_50 em 59% ACN:H₂O v/v



Fonte: Autor.

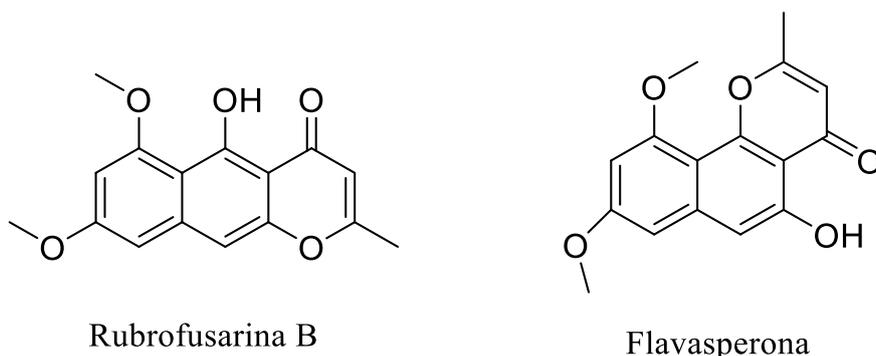
O espectro de massas foi realizado no triploquadrupolo, no modo positivo de ionização, que indicou como íon molecular m/z 571 $[M+H]^+$ (Figura 4.47).

Figura 4.48 – Espectro de massas no modo positivo de ionização em *elétron spray* para M_KBr_C_50



Fonte: Autor.

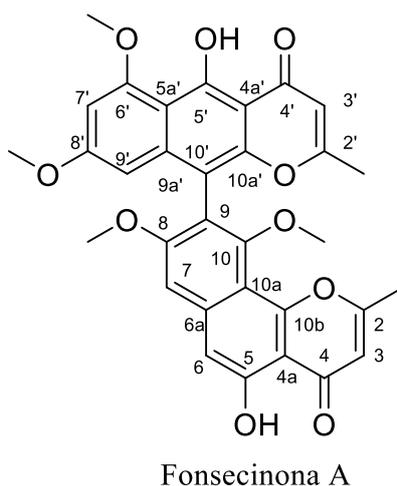
A partir do espectro de RMN ¹H (Figura 4.49) pode-se perceber a presença de sinais hidroxilas fenólicas em δ_H 15,23 e 12,83. Sendo que a região de deslocamento químico dessas hidroxilas é característica de nafto- γ -piroras, pelas quais apresentam um anel linear de rubrofusarina B (δ_H 15,23) e um anel angular de flavasperona (δ_H 12,83). Assim, o hidrogênio da hidroxila do anel em δ_H 15,23 está interagindo por meio de ligação de hidrogênio com o oxigênio das metoxilas e carbonilas no sistema rubrofusarina B. Por conta disso, essa hidroxila fenólica apresenta deslocamento químico maior do que a hidroxila do sistema angular da flavasperona em δ_H 12,83.



O espectro de RMN de hidrogênio ainda mostrou a ocorrência de quatro sinais na região de metoxilas em δ_H 3,78, 3,43, 4,03 e 3,62. Bem como, apresentou dois sinais na região metilas em δ_H 2,52 e 2,12 e seis sinais na característicos de sistemas aromático e alefínico em δ_H 6,33, 7,05, 6,79, 6,00, 6,43 e 6,18.

O espectro de carbono mostrou a incidência de carbonila de cetona α,β -insaturada com sinais de ^{13}C na região de δ_C 184,7 e 183,1(Figura 4.50).

A molécula foi atribuída como fonsecinona A com base nos dados apresentados RMN de 1H , ^{13}C e pelo valor adquirido no massas. O RMN bidimensional e as comparações desses dados com a literatura (Tabela 4.3) confirmou a substância sugerida (CAMPOS, 2005).



Os mapa de contorno do HSQC (Figura 4.51) mostrou correlação dos hidrogênios na região de aromático e olefínicos em δ_H 6,33 (H-3), 7,05 (H-6), 6,79 (H-7), 6,00 (H-3'), 6,43 (H-7') e 6,18 (H-9') com os carbonos δ_C 110,8 (C-3), 106,2 (C-6), 101,1(C-7), 107,5 (C-3'), 97,1 (C-7') e 96,5(C-9'), de modo

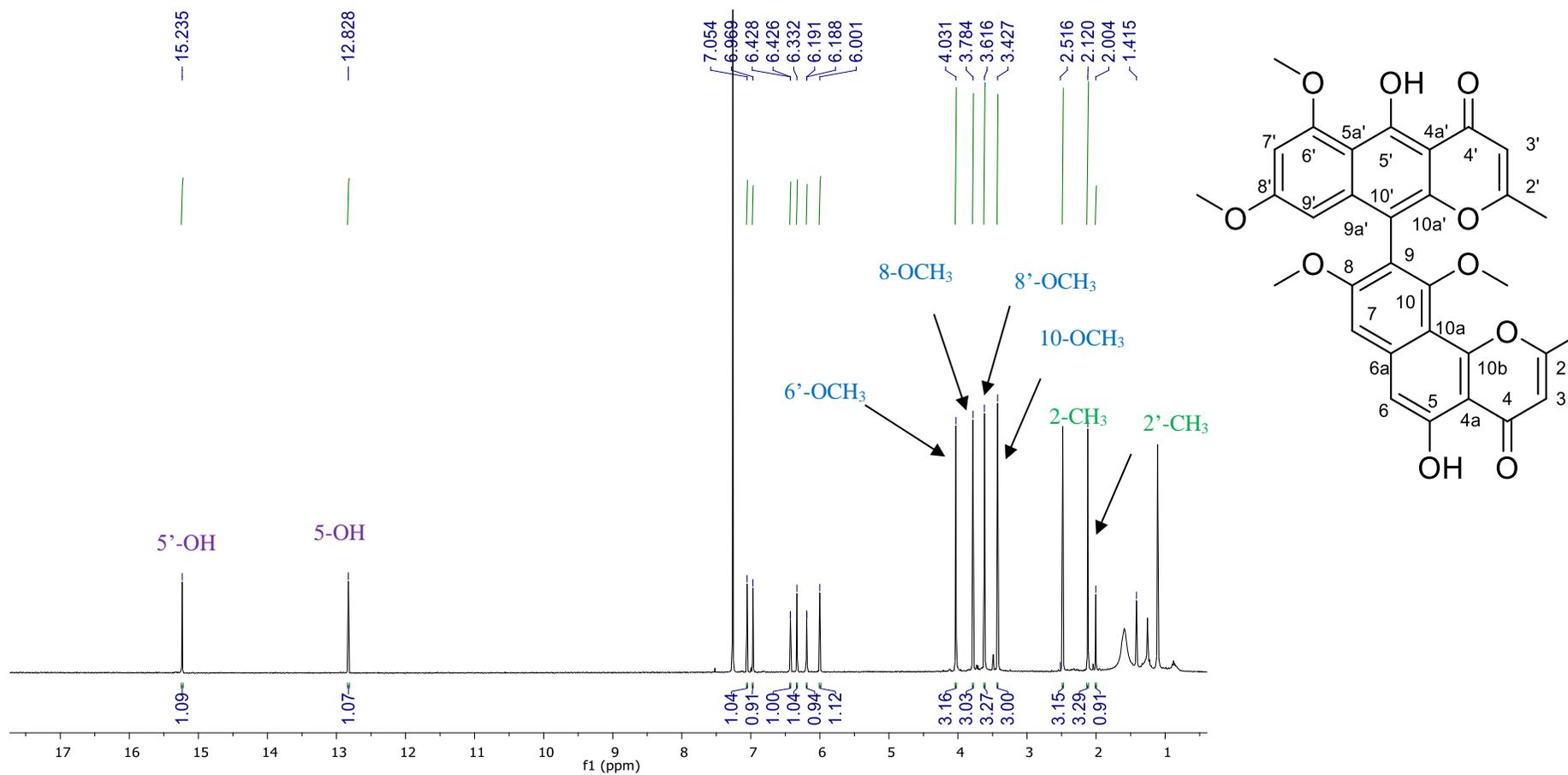
respectivo. Além disso, foram observadas as correlações dos hidrogênios das metoxilas em δ_H 3,78 (CH₃O-8), 3,43 (CH₃O-10), 4,03(CH₃O-6') e 3,62 (CH₃O-8') com os carbonos em δ_C 56,1(C-8), 61,3(C-10), 56,4(C-6') e 55,3(C-8'). Bem como, as correlações das metilas em δ_H 2,52 (CH₃-2) e 2,12 (CH₃-2') com os carbonos em δ_C 20,7 (C-2) e 20,4 (C-2').

Os mapa de contorno do HMBC mostrou correlações das hidroxilas fenólicas em δ_H 15,23 (OH-5') com os carbonos em δ_C 104,4 (C-4a'), 163,3 (C-5') e 108,8 (5a'). Bem como, a hidroxila em δ_H 12,83 (OH-5) com os carbonos em δ_C 109,6 (C-4a), 156,9 (C-5) e 106,2 (C-6). Além das correlações das metilas em δ_H 2,52(CH₃-2) com o carbono olefínico em δ_C 110,0 (C-3). Além disso, foram verificadas as correlações da metila em δ_H 2,12 (CH₃-2') com o carbono em δ_C 107,6 (C-3'). Além, das correlações dos hidrogênios das metoxilas em δ_H 3,78 (CH₃O-8), 3,43 (CH₃O-10), 4,03(CH₃O-6') e 3,62 (CH₃O-8') com os carbonos em δ_C 160,2 (C-8), 157,1 (C-10), 161,3 (C-6') e 161,7 (C-8'), respectivamente. As demais correlações dos hidrogênio alicíclicos e aromáticos que confirmaram a elucidação estrutural está em destaque na Figura 4.52.

A foncesinona A é um policetídeo que foram produzidos em várias espécies do gênero *Aspergillus*, incluindo *Aspergillus niger* (CHIANG et al, 2011). Para a espécie de *Aspergillus aculeatus* foi documentada pelo isolamento desse composto por CAMPOS, 2005.

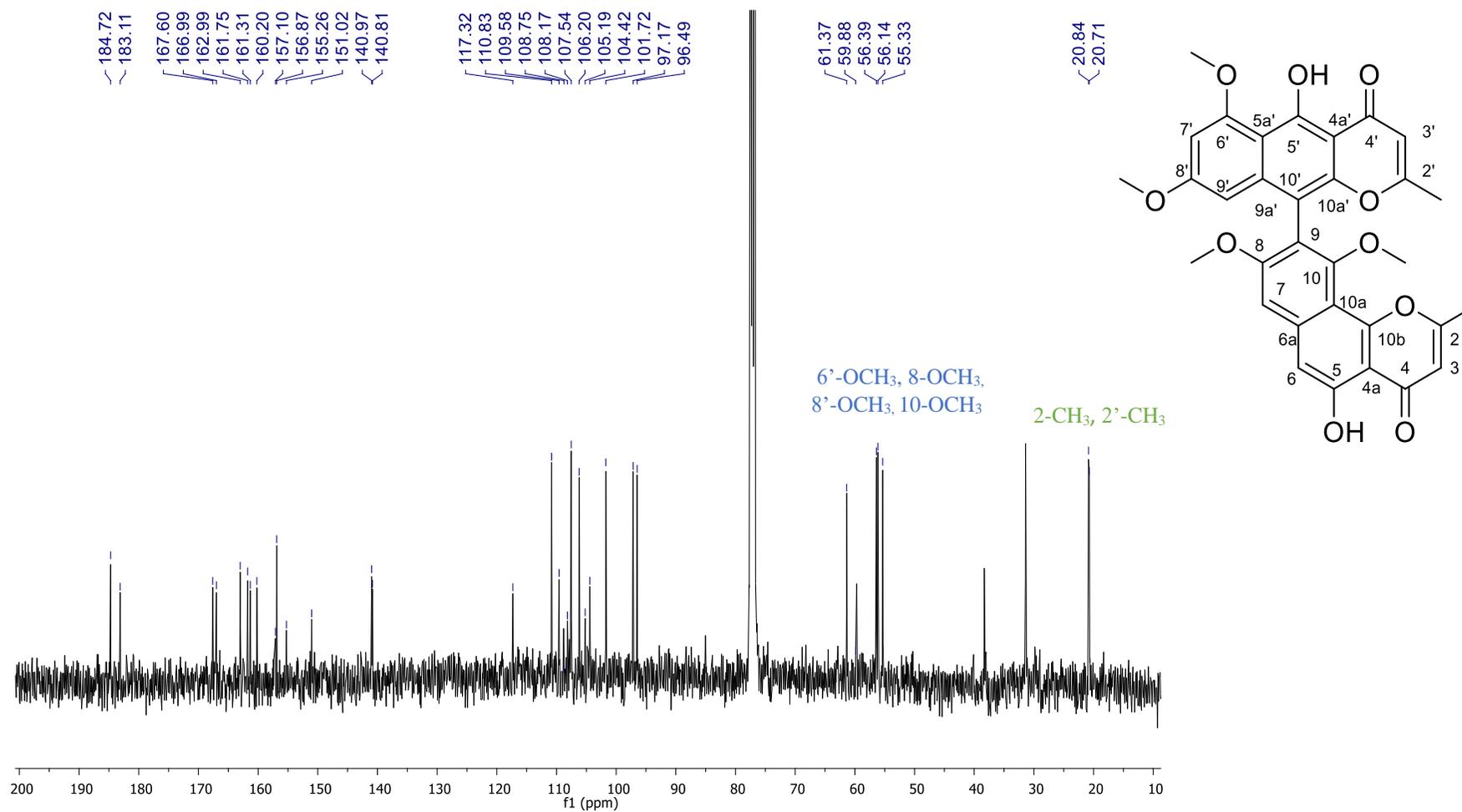
HE et al., (2016), avaliou a ação das um grupo de nafto- γ -piroras contra bactéria patogênica e a partir desse estudo foi verificado que a fonsecinona A apresentou-se com uma maior atividade antibacteriana dentre as estudadas nesse trabalho. Apresentando uma concentrações inibitórias mínimas (MICs) de 4,26, 17,04 e 4,26 $\mu\text{g} / \text{mL}$ contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococcus faecalis*, respectivamente.

Figura 4.49 – Espectro de RMN de ^1H de **M_KBr_C_50** (CDCl_3 ; 400 MHz)



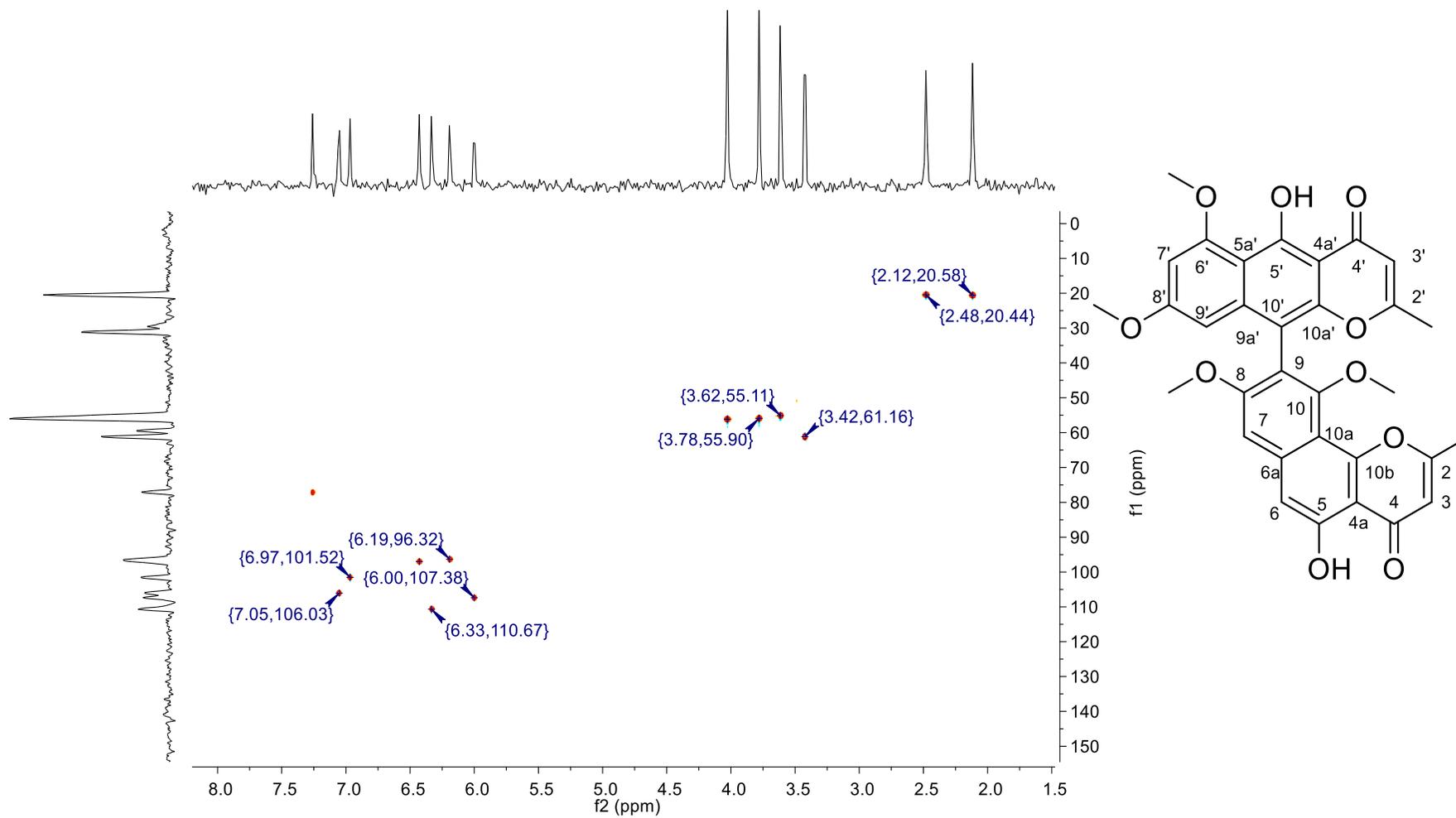
Fonte: Autor.

Figura 4.50 - Espectro de RMN de ^{13}C de **M_KBr_C_50** (CDCl_3 ; 100 MHz)



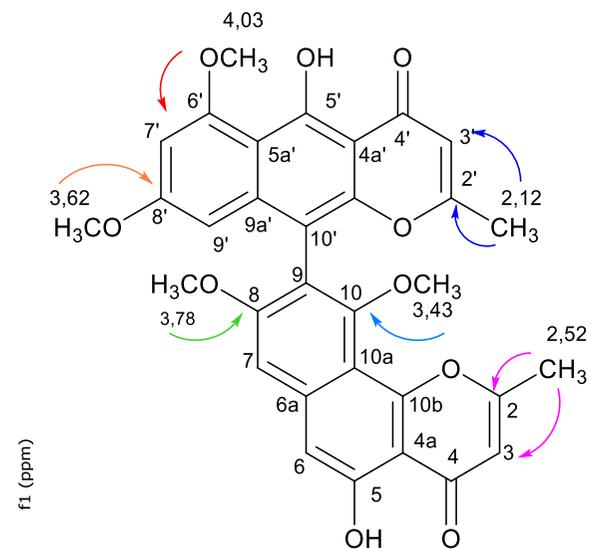
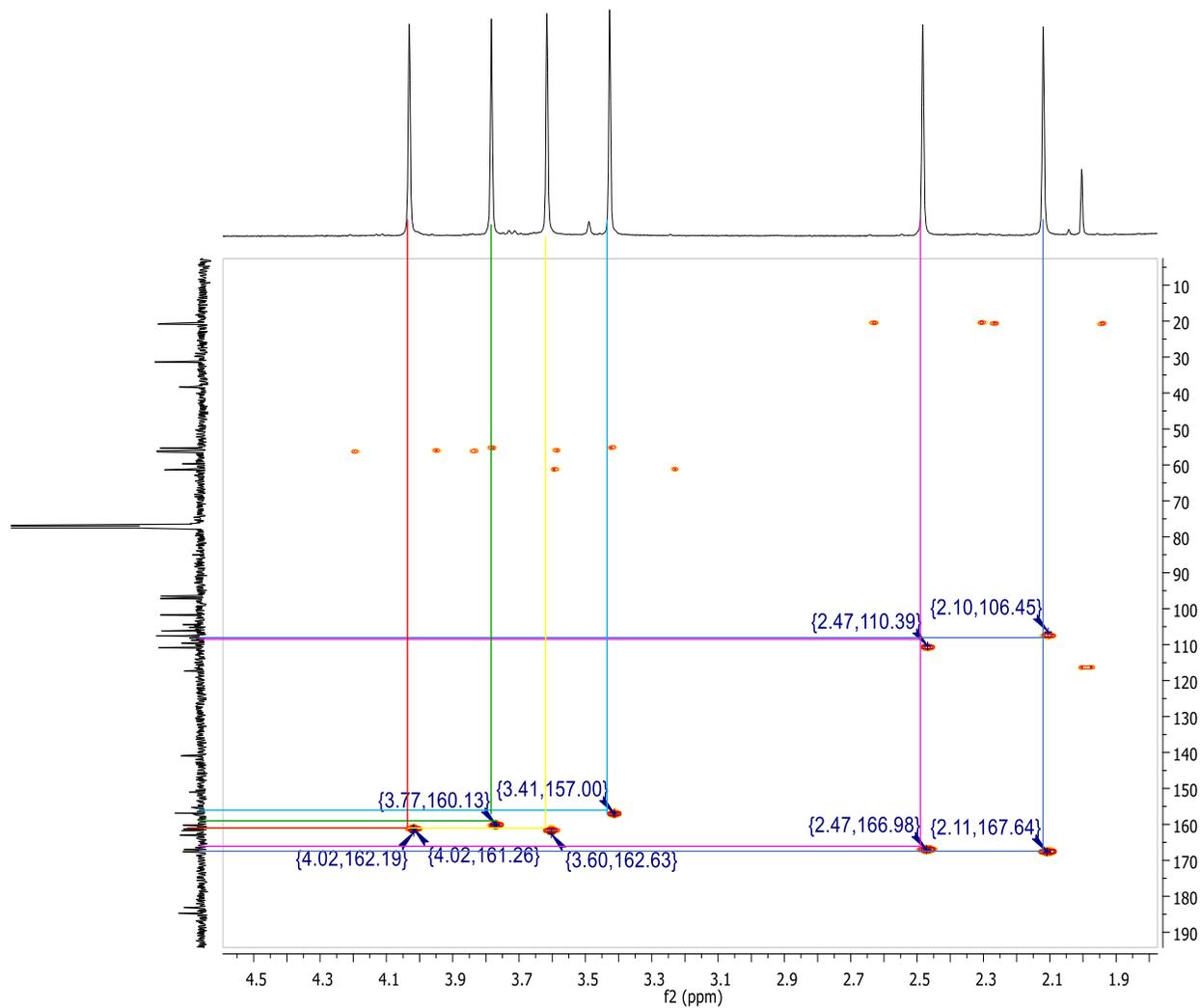
Fonte: Autor.

Figura 4.51 – Espectro bidimensional de HSQC M_KBr_C_50 (CD₃OD; 400 MHz)



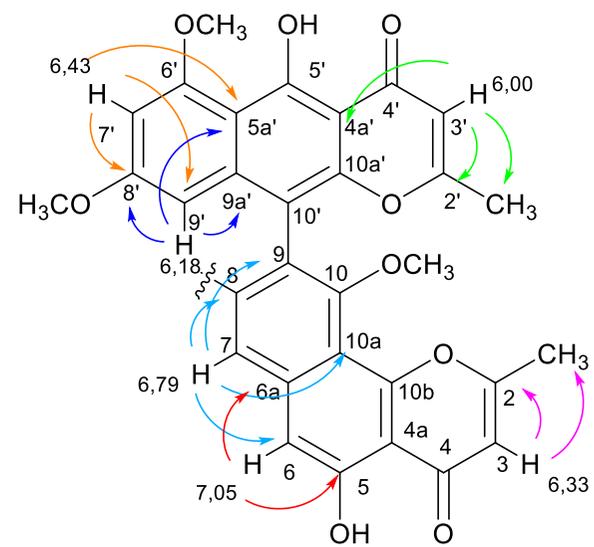
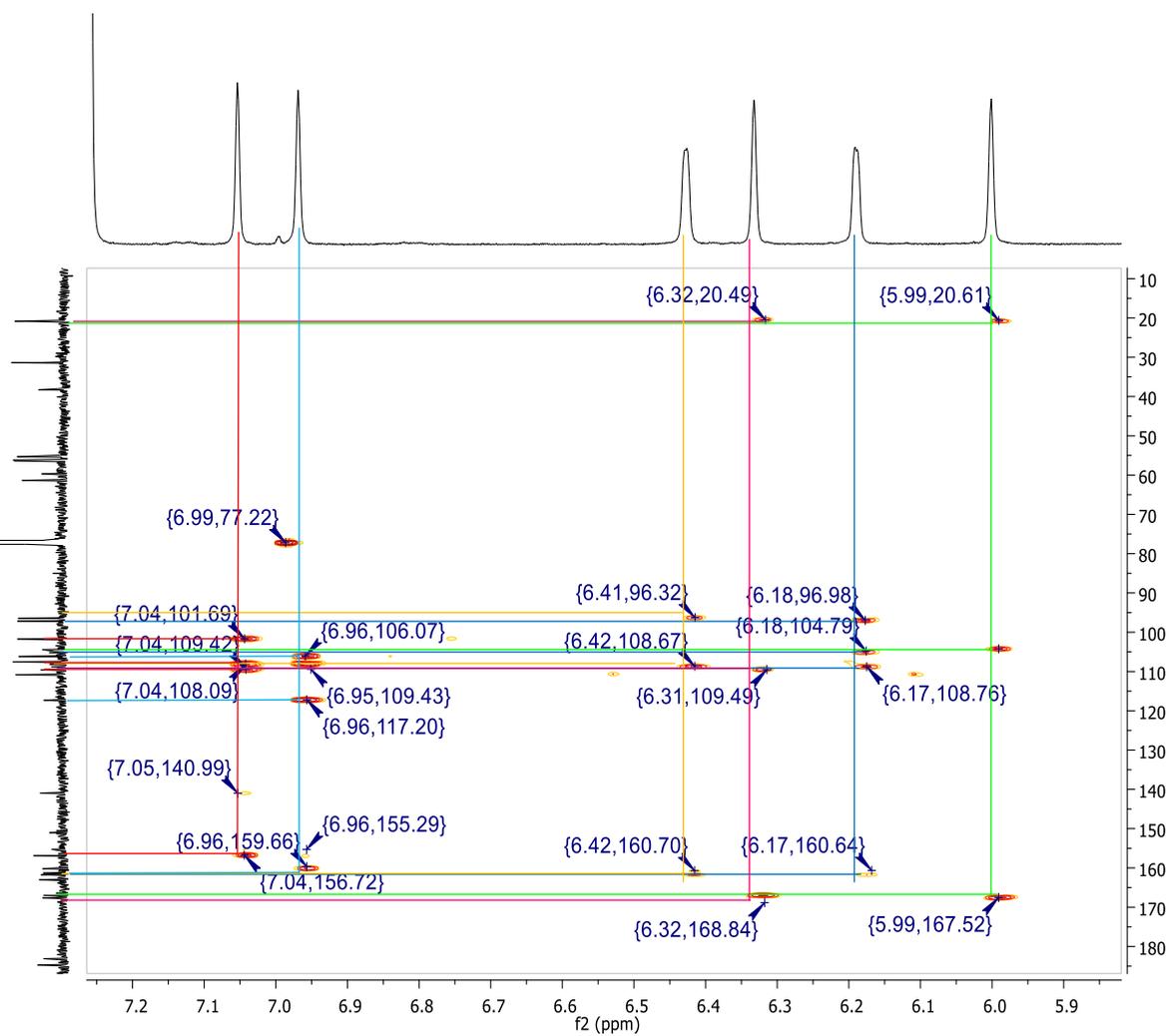
Fonte: Autor.

Figura 4.52 – Espectro bidimensional de HMBC M_KBr_C_50 (CD₃OD; 400 MHz)



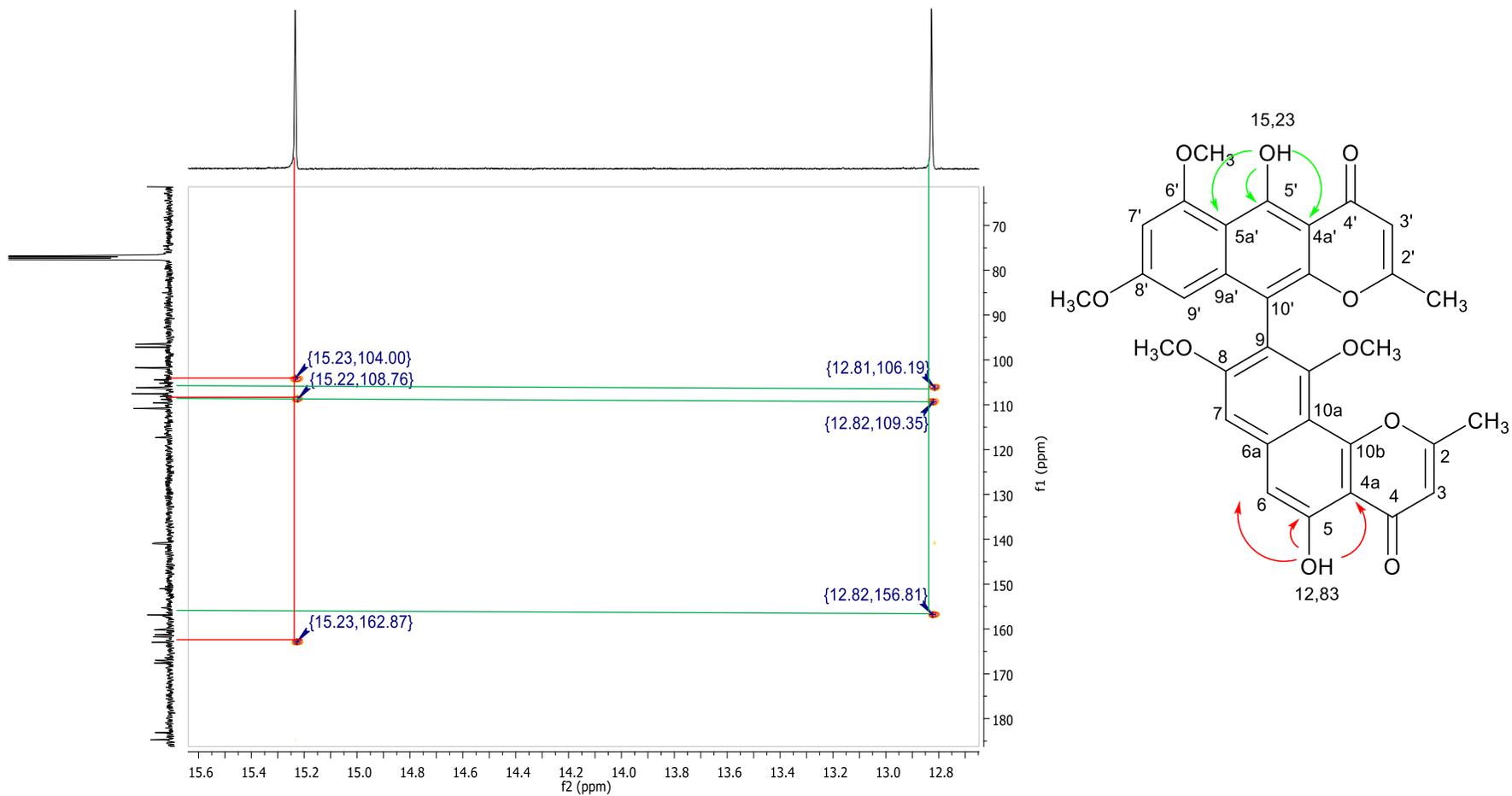
Fonte: Autor.

Figura 4.52 - (Continuação) Espectro bidimensional de HMBC M_KBr_C_50 (CD₃OD; 400 MHz)



Fonte: Autor.

Figura 4.52 - (Continuação) Espectro bidimensional de HMBC M_KBr_C_50 (CD₃OD; 400 MHz)



Fonte: Autor.

Tabela 4.3 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para **M_KBr_C_50** (400 e 100 MHz).

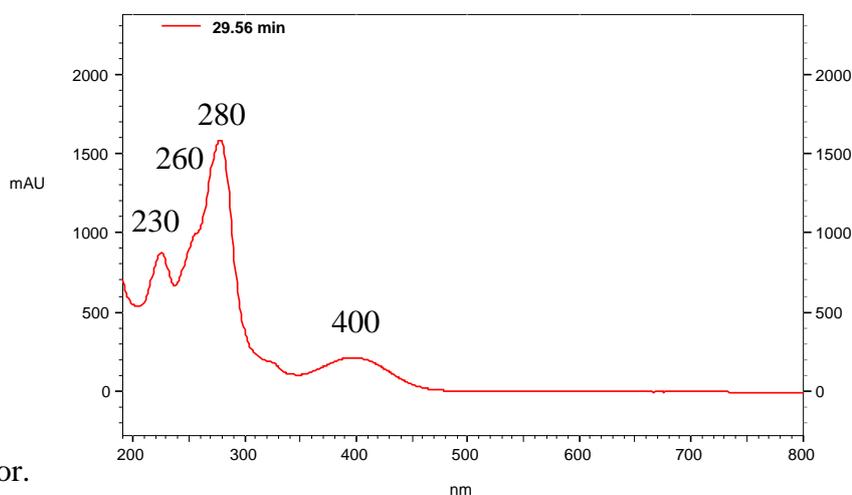
MeOH_KBr_C_50^a			Fonsecinona A^b	
Nº	δ_{H} (mult., <i>J</i> em Hz)	δ_{C}	δ_{H} (mult., <i>J</i> em Hz)	δ_{C}
2		167,6		167,5
2-CH₃	2,52 (3H, <i>s</i>)	20,7	2,49 (3H, <i>s</i>)	20,6
3	6,33 (1H, <i>s</i>)	110,8	6,34 (1H, <i>s</i>)	110,7
4		183,1		182,9
4a		109,6		109,4
5-OH	12,83 (1H, <i>s</i>)	156,9	12,85 (1H, <i>s</i>)	156,7
6	7,05 (1H, <i>s</i>)	106,2	7,06 (1H, <i>s</i>)	106,0
6a		140,9		140,8
7	6,79 (1H, <i>s</i>)	101,1	6,97 (1H, <i>s</i>)	101,6
8		160,2		160,0
8-OCH₃	3,78 (3H, <i>s</i>)	56,1	3,79 (3H, <i>s</i>)	56,0
9		117,3		117,1
10		157,1		156,9
10-OCH₃	3,43 (3H, <i>s</i>)	61,3	3,43 (3H, <i>s</i>)	61,3
10a		108,1		108,0
10b		155,2		155,1
2'		167,0		166,9
2'-CH₃	2,12 (3H, <i>s</i>)	20,4	2,13 (3H, <i>s</i>)	20,7
3'	6,00 (1H, <i>s</i>)	107,5	6,01 (1H, <i>s</i>)	107,4
4'		184,7		184,5
4a'		104,4		104,3
5'-OH	15,23 (1H, <i>s</i>)	163,0	15,27 (1H, <i>s</i>)	162,8
5a'		108,7		108,6
6'		161,3		161,1
6'-OCH₃	4,03 (3H, <i>s</i>)	56,4	4,04 (3H, <i>s</i>)	56,3
7'	6,43 (3H, <i>d</i> ;1,2)	97,1	6,43 (1H, <i>d</i> ;2,2)	97,0
8'		161,7		161,6
8'-OCH₃	3,62	55,3	3,62 (3H, <i>s</i>)	55,2
9'	6,18(3H, <i>d</i> ;1,2)	96,5	6,19 (1H, <i>d</i> ;2,2)	96,3
9a'		140,8		140,6
10'		105,1		105,0
10a'		151,0		150,8

^aDados de espectro em CDCl₃ dos RMN de ^1H e ^{13}C em 400 MHz e 100 MHz, respectivamente.^bDados obtidos em CDCl₃ por CAMPOS, 2005.

4.3.2.4 Identificação da estrutura M_KBr_C_53

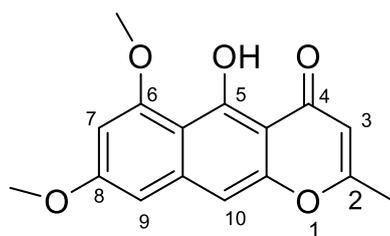
A substância M_KBr_C_53 (2,2 mg) apresentou-se com uma coloração amarela e amorfa, pigmento característico de nafto- γ -piroras. O espectro de UV da substância mostrou absorção característica desse grupo de constituinte com absorção máxima em 230, 260, 280, 400 nm (Figura 4.53).

Figura 4.53 – Espectro de absorção do composto M_KBr_C_53 em 60% ACN:H₂O v/v



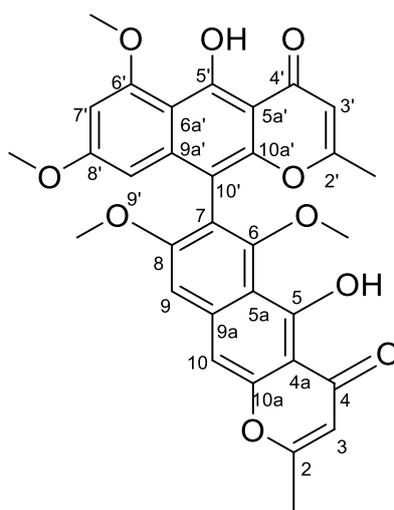
Fonte: Autor.

Os espectros de RMN de ¹H (Figura 4.54) apresentaram sinais de hidroxilas fenólicas em δ_H 15,23 e 14,82, característicos de bis-naftopironas que apresentam anéis lineares como de rubrofusarina B. Assim, posteriormente foi confirmada pela presença de quatro sinais de próton na região de metoxilas em δ_H 4,02, 3,78, 3,61 e 3,46, bem como sinais de metilas ligadas a sistemas olefínicos em δ_H 2,41 e 2,11. Além disso, verificou-se a ocorrência de sinais na região de sistemas olefínicos/aromáticos em δ_H 7,15, 6,97, 6,41, 6,21, 6,05, 5,98.



rubrofusarina B

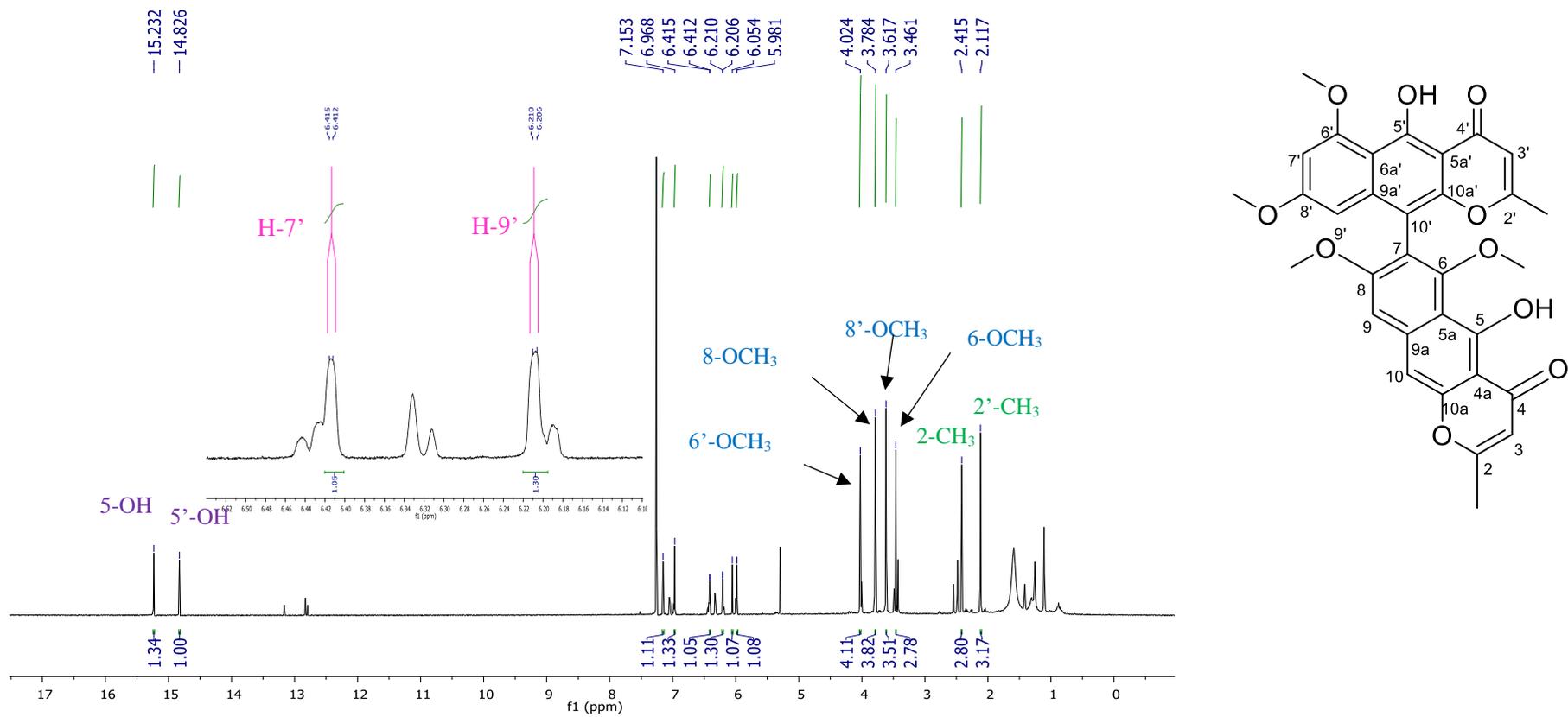
Os sinais obtidos no espectro de RMN de ^{13}C (Figura 4.55) e ^1H foram comparado os dados da literatura de nafto- γ -piroras que são poliketídeos já reportado como sendo biossintetizado por *A. aculeatus*. A partir da comparações dos sinais obtidos com os dados de CAMPOS, (2005) atribuiu-se a substância **M_KBr_C_53** como Aurosperona A (Tabela 4.4).



Aurosperona A

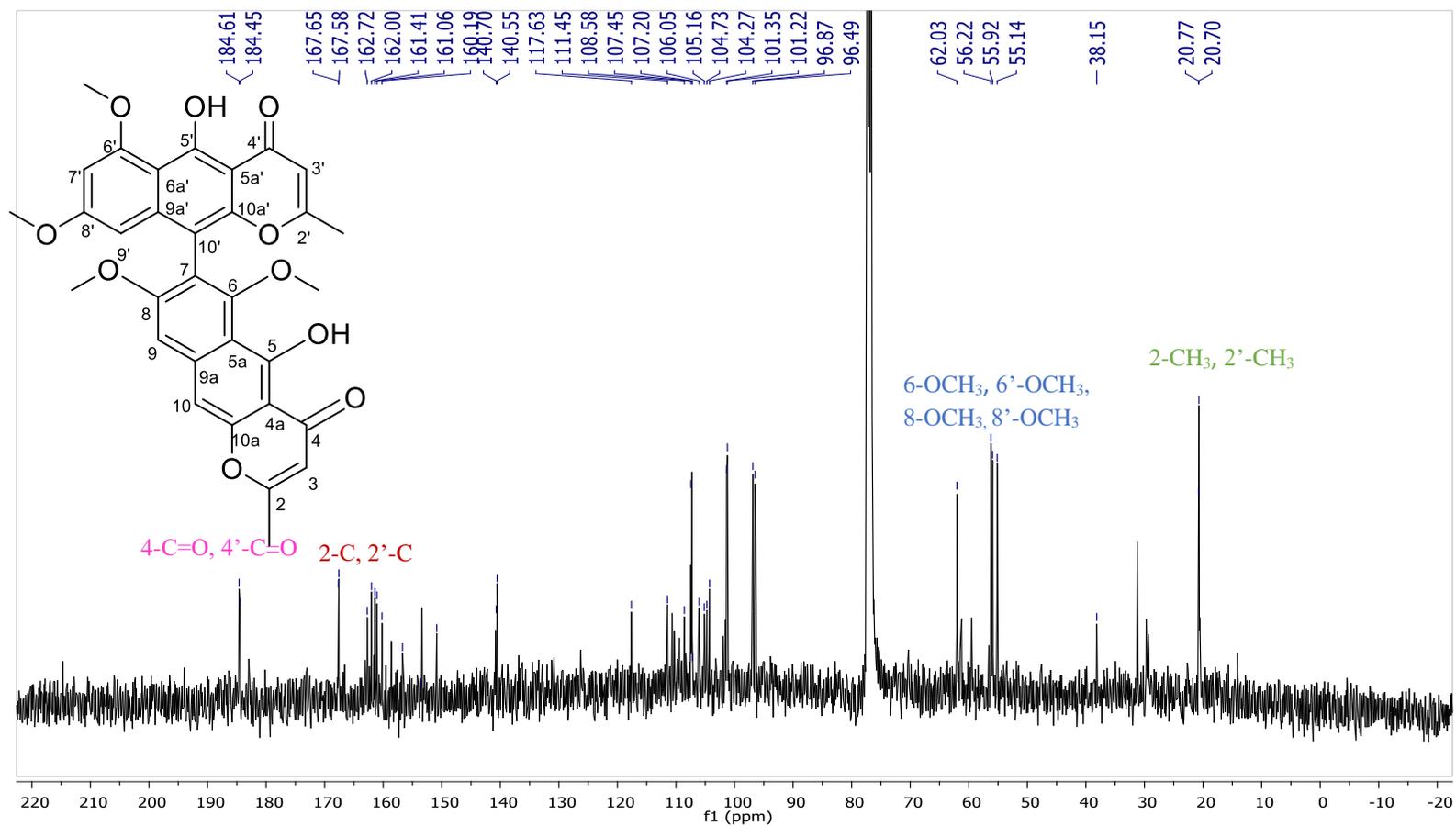
A aurosperona A foi descrita na literatura como uma nafto- γ -pirora que apresenta um potencial atividade antibacteriana contra *Escherichia coli* (HE et al., 2016). Esta substância foi documentada pela primeira vez como sendo biossintetizada por *Aspergillus niger* (TANAKA et al.,1966).

Figura 4.54 – Espectro de RMN de ^1H M_KBr_C_53 (CDCl_3 ; 400 MHz)



Fonte: Autor.

Figura 4.55 – Espectro de RMN de ^{13}C de **M_KBr_C_53** (CDCl_3 ; 100 MHz)



Fonte : Autor.

Tabela 4.4- Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para **M_KBr_C_53** (400 e 100 MHz).

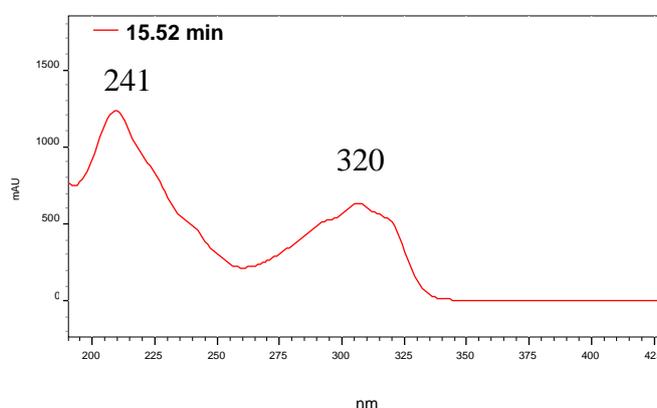
MeOH_KBr_C_53^a			Aurosperona A^b	
N^o	δ_{H} (mult., <i>J</i> em Hz)	δ_{C}	δ_{H} (mult., <i>J</i> em Hz)	δ_{C}
2		167,7		167,6
2-CH₃	2,42 (3H, <i>s</i>)	20,8	2,42 (3H, <i>s</i>)	20,8
3	6,05 (1H, <i>s</i>)	107,4	6,06 (1H, <i>s</i>)	107,4
4		184,5		184,5
4a		104,7		104,6
5-OH	14,83 (1H, <i>s</i>)	162,0	14,84 (1H, <i>s</i>)	161,9
5a		111,5		111,4
6		158,6		158,4
6-OCH₃	3,46 (3H, <i>s</i>)	62,0	3,46 (3H, <i>s</i>)	61,9
7		117,6		117,6
8		160,2		160,0
8-OCH₃	3,78 (3H, <i>s</i>)	55,9	3,79 (3H, <i>s</i>)	55,8
9	6,97(1H, <i>s</i>)	101,3	6,67 (1H, <i>s</i>)	101,3
9a		140,7		140,8
10	7,15(1H, <i>s</i>)	101,2	7,16 (1H, <i>s</i>)	101,2
10a		153,5		153,3
2'		167,6		167,5
2'-CH₃	2,12 (3H, <i>s</i>)	20,7	2,12 (3H, <i>s</i>)	20,6
3'	5,98 (1H, <i>s</i>)	107,2	5,98 (1H, <i>s</i>)	107,2
4'		184,6		184,6
4a'		104,3		104,2
5'-OH	15,23 (1H, <i>s</i>)	162,7	15,26 (1H, <i>s</i>)	162,6
5a'		108,6		108,5
6'		161,1		160,9
6'-OCH₃	4,02 (3H, <i>s</i>)	56,2	4,03 (3H, <i>s</i>)	56,2
7'	6,41 (1H, <i>d</i> ;1,2)	96,9	6,41 (1H, <i>d</i> ;2,2)	96,8
8'		161,4		161,4
8'-OCH₃	3,62 (3H, <i>s</i>)	55,1	3,62 (3H, <i>s</i>)	55,1
9'	6,21(1H, <i>d</i> ;1,6)	96,5	6,20 (1H, <i>d</i> ;2,2)	96,4
9a'		140,5		140,5
10'		105,2		105,1
10a'		150,7		150,7

^aDados de espectro em CDCl_3 dos RMN de ^1H e ^{13}C em 400 MHz e 100 MHz, respectivamente.^bDados extraídos de Campos (2005).

4.3.2.5 Identificação da estrutura M_KBr_D_26

Este constituinte (1,9 mg) foi isolado da fração MeOH_KBr_D, sendo considerada uma substância mais biossintetizada no meio suplementado com KBr do que no cultivo Czapek (controle). A substância apresentou-se como um óleo amarelo pálido apresentando absorção no espectro de UV nas regiões de em 210 e 318 nm (Figura 4.56).

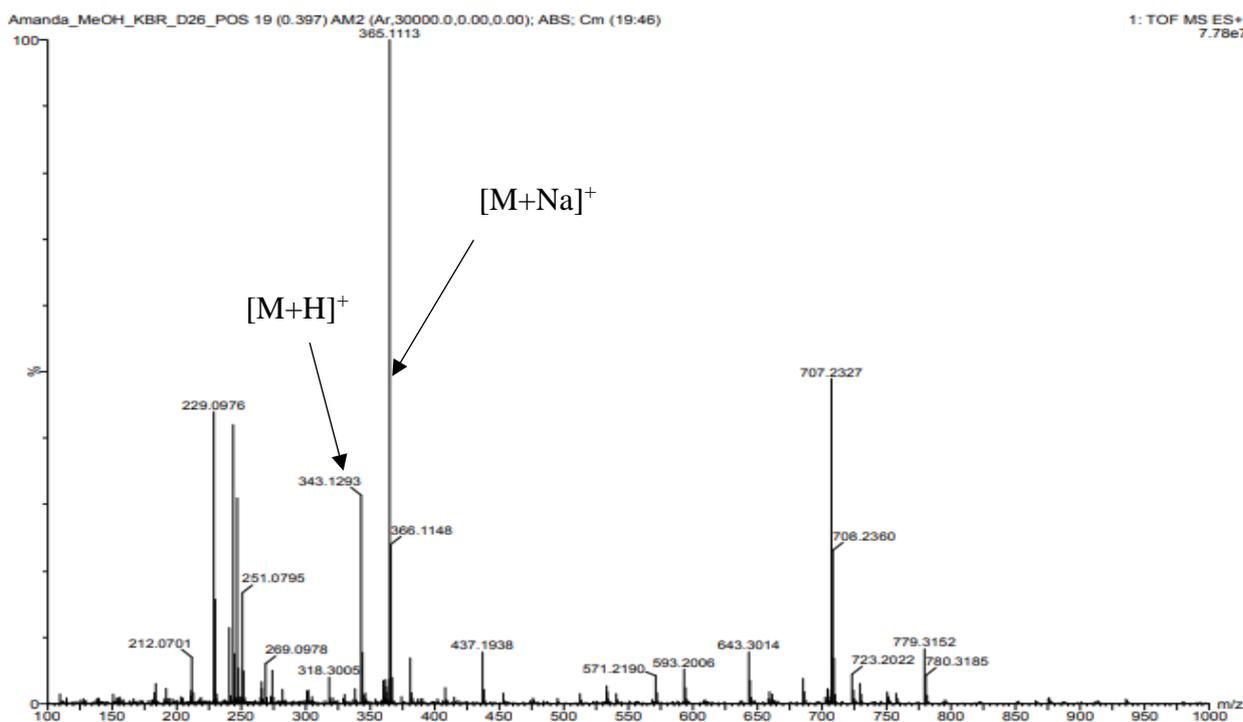
Figura 4.56 – Espectro de absorção do composto M_KBr_D_26 em 37 % ACN:H₂O v/v



Fonte: Autor.

A partir da análise de massas de alta resolução (Figura 4.57) verificou-se a presença de um íon molecular em m/z 365,1113 $[M+Na]^+$ e 343,1293 $[M+H]^+$. A partir desse dados de massas foi atribuída a fórmula molecular de $C_{18}H_{18}N_2O_5$, apresentando 11 insaturações.

Figura 4.57 – Espectro de massas de alta resolução no modo positivo de M_KBr_D_26

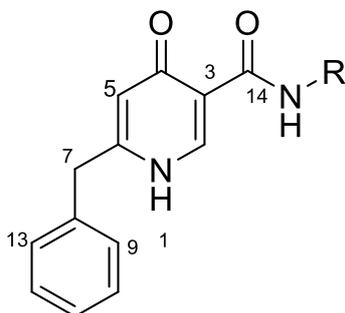


Fonte: Autor.

Os dados de RMN de ^1H (Figura 4.58) indicaram a ocorrência de um grupamento fenil com sistemas de acoplamento de anel mono-substituído em δ_{H} 7,33(2H, *m*; 8,0), 7,37 (2H, *m*; 7,6) ,7,28 (1H, *m*; 8,0). E ainda, foi verificado a presença de sinais de hidrogênios olefínicos/aromáticos, como singletos em δ_{H} 8,54 (1H, *s*) e 6,41 (1H, *s*), podendo estar inseridos num grupamento piridin-4-ona. Esta atribuição foi baseado na formula molecular, no deslocamento dos prótons, bem como na multiplicidade deles, por estarem como singletos, mostrando que a molécula se encontra *para*-substituída.

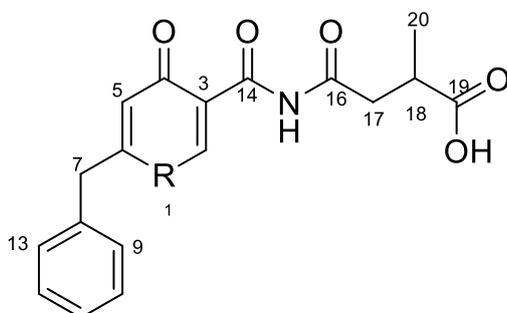
A presença do anel piridin-4-ona foi confirmada pelas correlações apresentadas no mapa de contornos de HMBC (Figura 4.62). Por meio das correlações do hidrogênio em δ_{H} 3,99 (H-7) com os carbonos em δ_{C} 117,3 (C-3), 128 (C-11), 137,1 (C-8) e 154 (C-8). Além disso, foram verificadas correlações dos hidrogênios olefínicos δ_{H} 6,41(H-5) com os carbonos em δ_{C} 39,5(C-7), 117,3(C-3), 154,0 (C-6), 164,7 (C-14) e 180,0 (C-4) e do próton em δ_{H} 8,53(H-2)

com os carbonos em δ_C 154,0 (C-6), 164,7 (C-14) e 180,0 (C-4). A partir desses dados pode-se sugerir uma parte da estrutura:



A partir dos acoplamentos observados no RMN de ^1H e correlações observadas no mapa de contornos de HMBC e HSQC, pode-se atribuir a estrutura como sendo a pestalamida B, com a presença de um grupamento α -metilsuccínico na posição 3.

Essa atribuição foi possível pelo HMBC (Figura 4.62) por apresentar sinais de próton em δ_H 1,25 (CH_3 -20, *d*; 7,2) que se correlaciona com os carbonos em δ_C 179,8(C-19), 36,6 (C-18) e 42,8(C-17). Além dos sinais, dos hidrogênios em δ_H 3,38 (1H, *dd*; $J=18,3; 8,8$) e 2,81 (1H, *dd*, $J=17, 0; 5,2$), que estão inseridos num sistema diasterotópico, pois apresentam correlações no HSQC (Figura 4.60) com um único carbono em δ_C 42,8 (C-17) como também apresentam constantes de acoplamento características desse sistema. Assim, esses hidrogênios (CH_2 -17) se correlacionam no HMBC com os carbonos em δ_C 17,6 (C-20), 36,6 (C-18), 174,8 (C-16) e 179,8 (C-19). O próton em δ_H 2,94 (H-18) se correlaciona com os carbonos em δ_C 17,6(C-20), 174,8 (C-16) e 179,8 (C-19).



pestalamida B, R – NH

pestalamida A, R- O

A elucidação estrutural foi confirmada por comparação dos sinais de RMN de ^{13}C (Figura 4.59) e ^1H com os sinais relatados da literatura, atribuindo-a como pestalamida B (Tabela 4.5) (CHIANG et al, 2010; DING et al.,2008). Além desses dados, foram observadas correlações no mapa de contornos de COSY ilustrados na Figura 4.61.

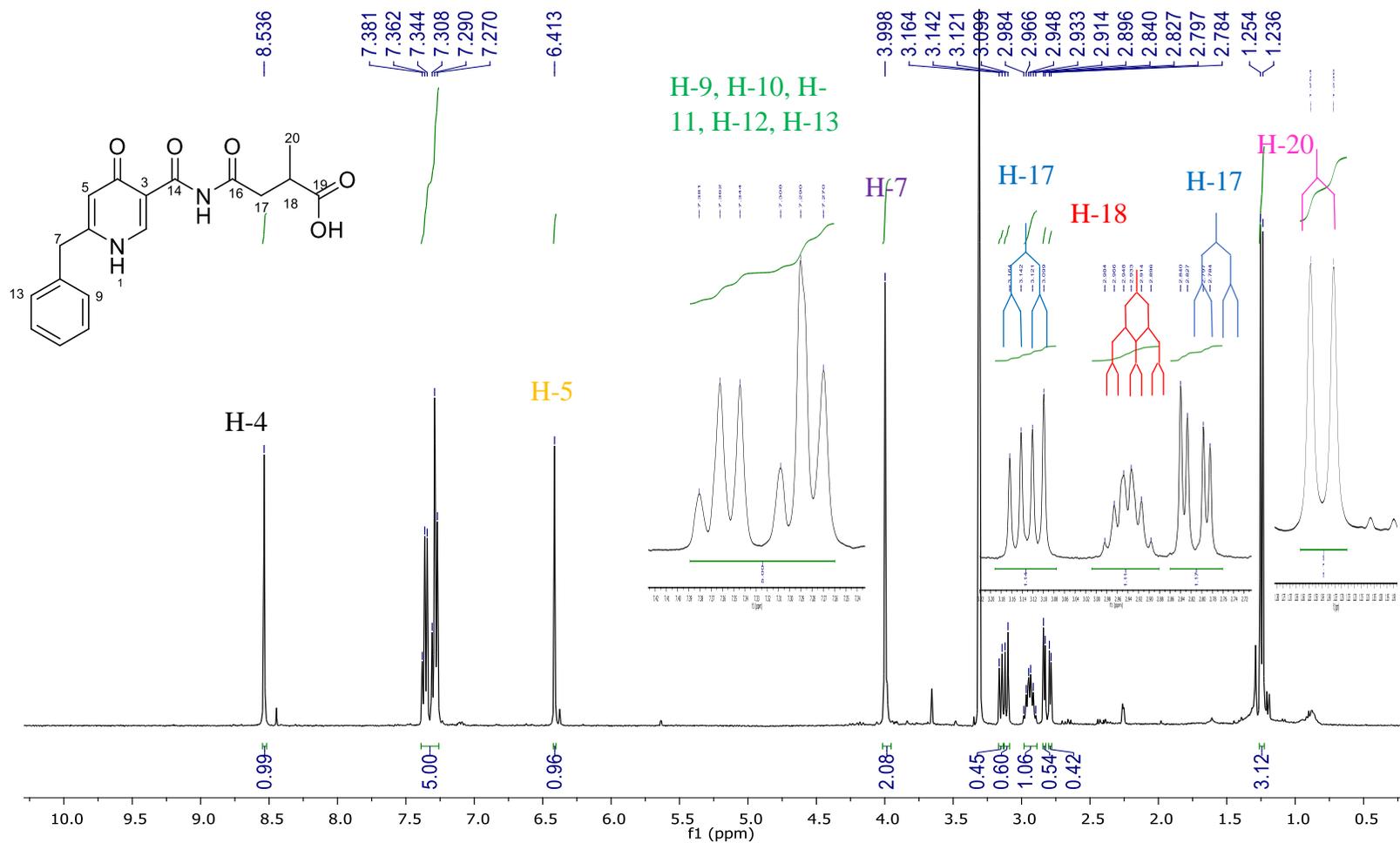
Dessa forma, os sinais de RMN obtidos para M_KBr_D_26 foram comparados com os dados adquiridos com o seu primeiro isolamento, no fungo patogênico *Pestalotiopsis theae* que produziu as pestalamidas A, B e C (DING et al., 2008). Porém, os valores de deslocamento químico de ^{13}C apresentados no trabalho de DING et al., (2008) indicou os mesmos valores para pestalamida A e B, que não se mostrou semelhante aos sinais adquiridos M_KBr_D_26, principalmente nos C-2 e C-6.

Logo, os sinais de RMN de M_KBr_D_26 foram comparados também com os dados obtidos por CHIANG et al., (2011), que isolou a pestalamida B em *A. niger*. A partir desse trabalho pôde-se identificar M_KBr_D_26 como Pestalamida B. CHIANG et al., (2011) questiona os valores obtidos por DING et al.,2008, já que não faz sentido a semelhança dos deslocamentos químicos das substâncias pestalamida A e B, visto que a diferença de eletronegatividade do oxigênio e nitrogênio acarreta variação de campo de 20 ppm, isto é, os deslocamentos químicos de C-2 e C-6 cairiam em regiões bem abaixo para a pestalamida B.

Portanto, esse é o primeiro relato da substância pesticilamida B, como constituinte produzido por *Aspergillus aculeatus*.

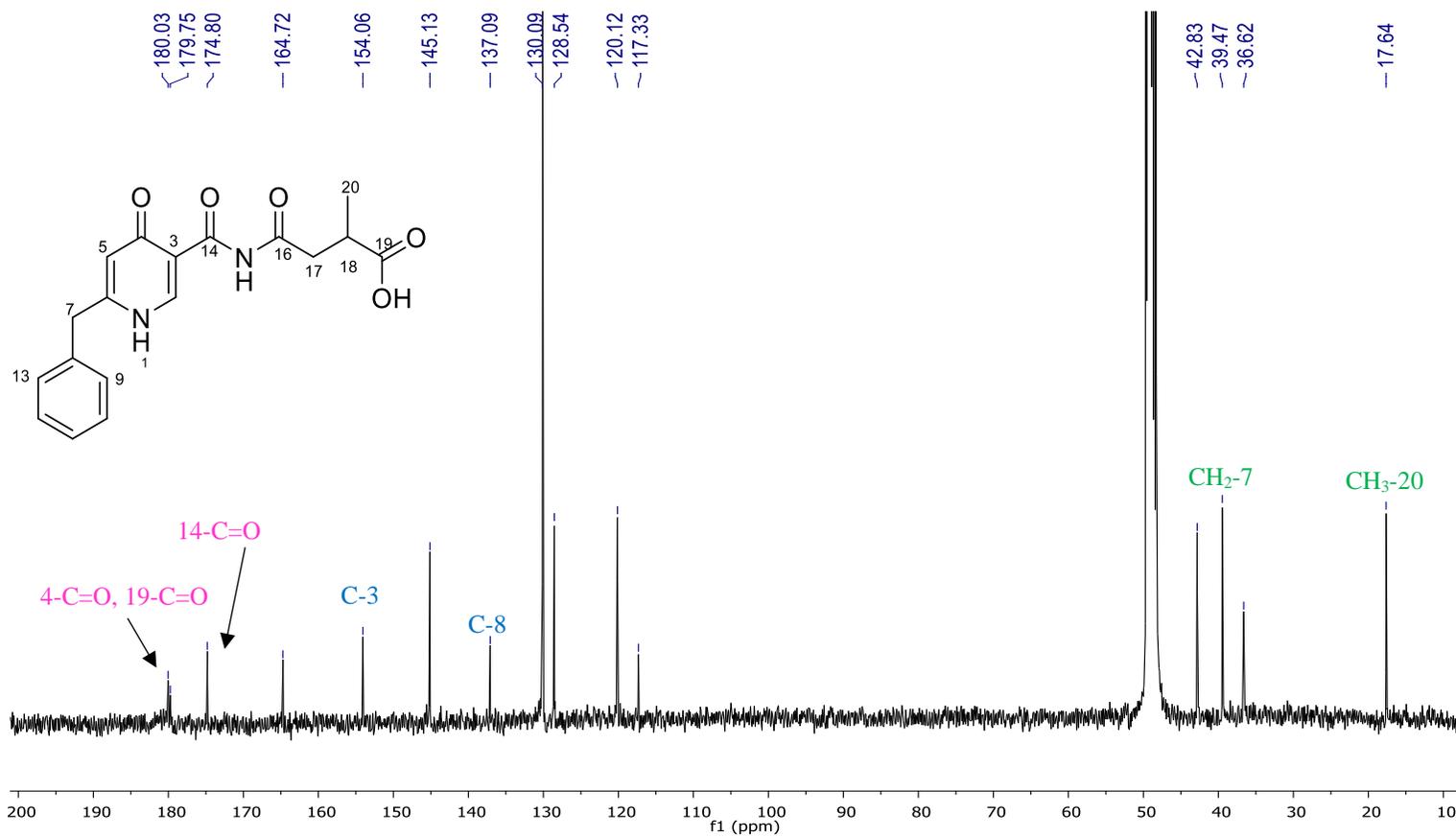
Além disso, na literatura é reportado que a pestalamida B exibe capacidade de inibição da replicação das células do HIV, bem como apresenta-se como um potente antifúngico (XU et al., 2010).

Figura 4.58 – Espectro de RMN ¹H M_KBr_D_26 (CD₃OD; 400 MHz)



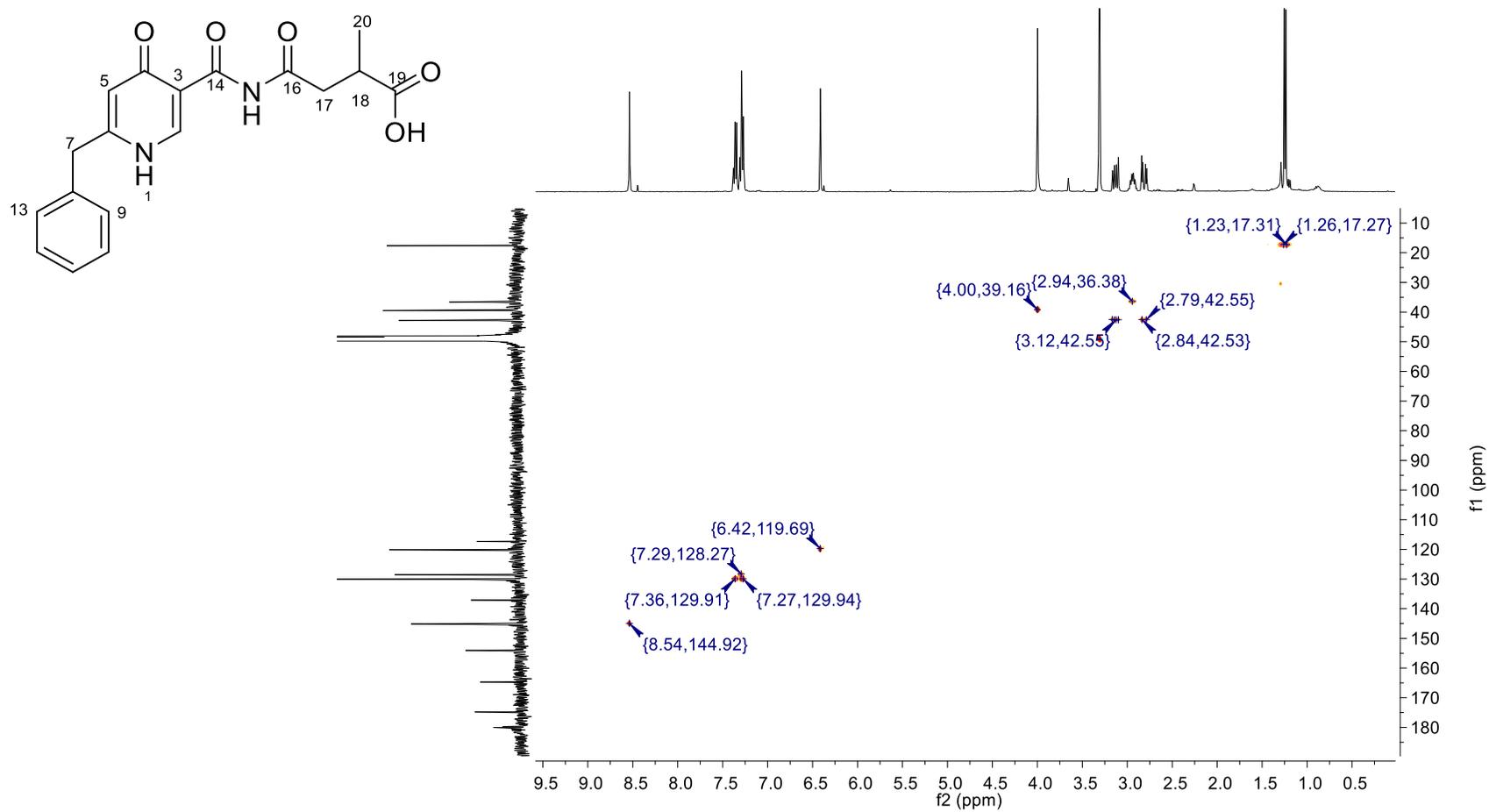
Fonte: Autor.

Figura 4.59 - Espectro de RMN ¹³C M_KBr_D_26 (CD₃OD; 100 MHz)



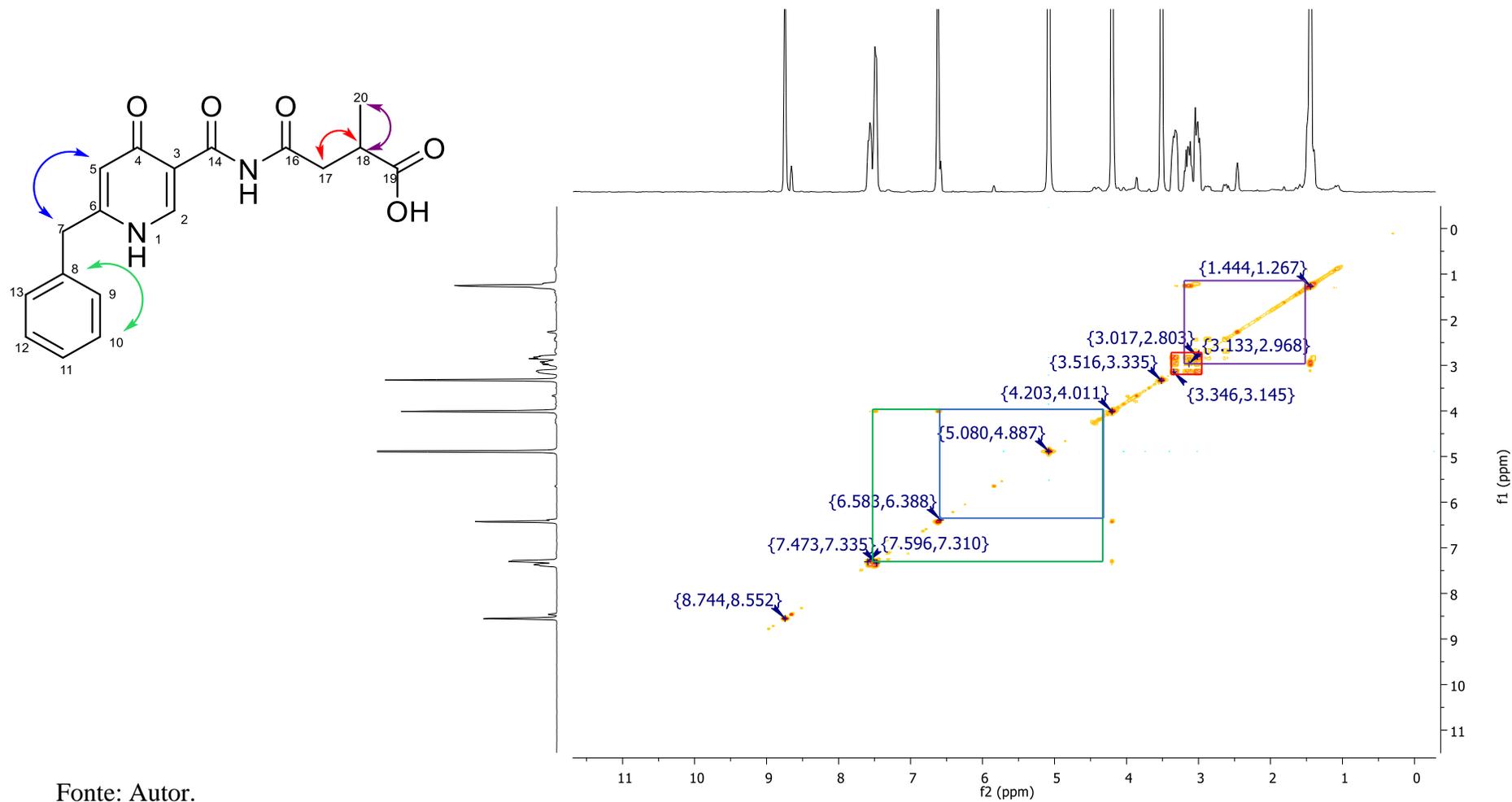
Fonte: Autor.

Figura 4.60 – Espectro bidimensional de HSQC M_KBr_D_26 (CD₃OD; 400 MHz e 100 MHz)



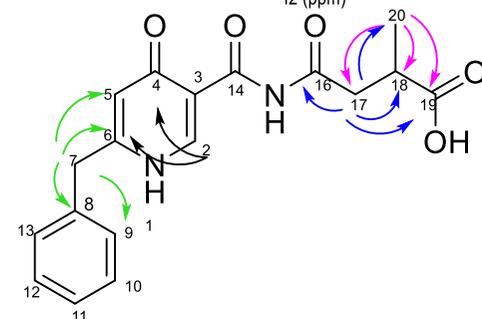
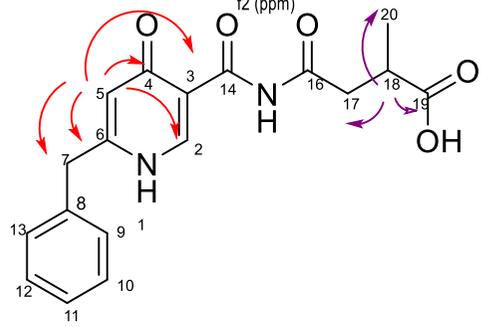
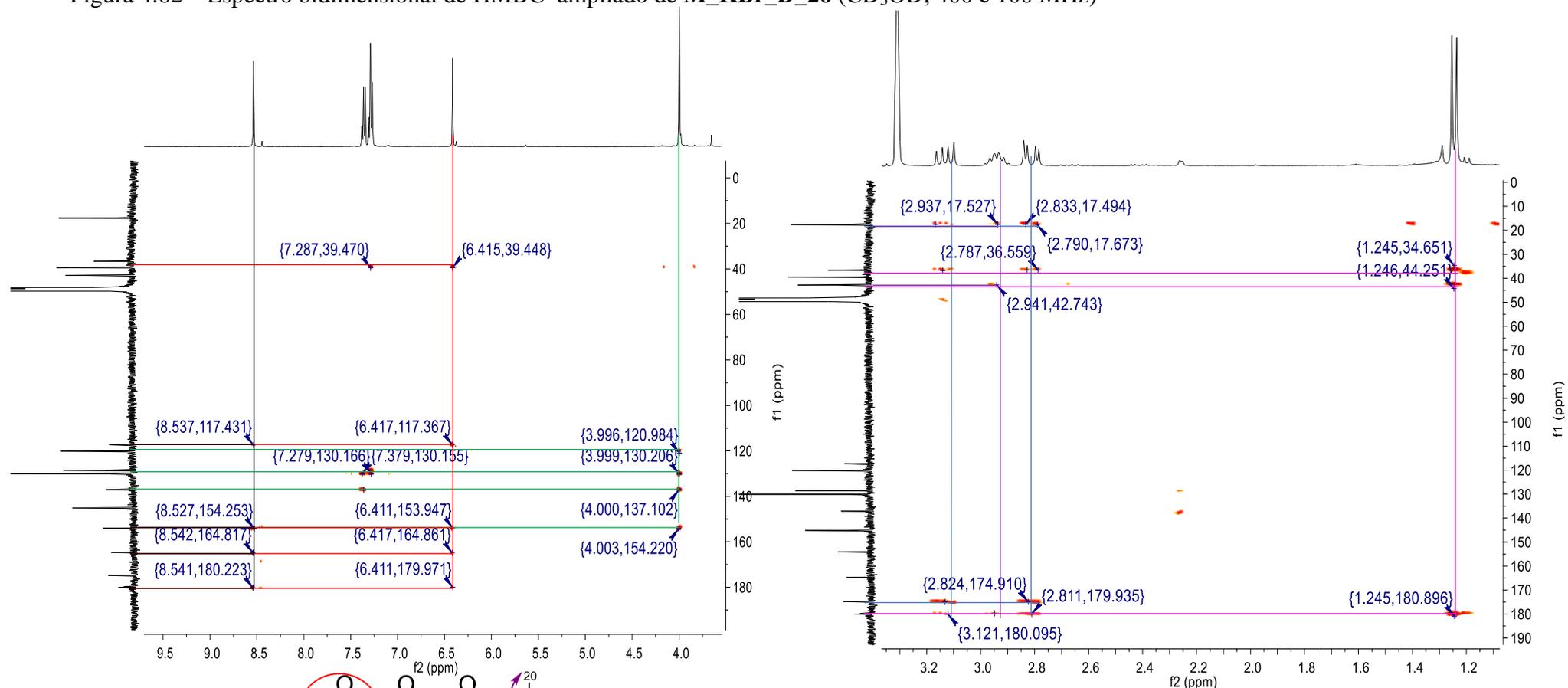
Fonte:Autor.

Figura 4.61 – Espectro bidimensional de COSY M_KBr_D_26 (CD₃OD; 400 MHz)



Fonte: Autor.

Figura 4.62 – Espectro bidimensional de HMBC ampliado de **M_KBr_D_26** (CD₃OD; 400 e 100 MHz)



Fonte: Autor.

Tabela 4.5 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para **M_KBr_D_26** (400 e 100 MHz).

MeOH_KBr_D_26^a			Pestalamida B^b		
N^o	δ_{H} (mult., <i>J</i> em Hz)	δ_{C}	δ_{H} (mult., <i>J</i> em Hz)	$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{c}}$
2	8,54 (1H, <i>s</i>)		8,52 (1H, <i>s</i>)	164,4	144,5
3		145,2			
4		117,3		119,2	116,9
5	6,41 (1H, <i>s</i>)	180,0	6,36 (1H, <i>s</i>)	178,8	179,1
6		120,1		116,5	120,0
7	3,99 (2H, <i>s</i>)	154,0	4,06 (2H, <i>s</i>)	170,7	152,6
8		39,5		39,6	39,1
9,13	7,33(2H, <i>m</i> ; 8,0)	137,1	7,34(2H, <i>m</i> ; 8,0)	135,8	137,5
10,12	7,37(2H, <i>m</i> ; 7,6)	130,1	7,37(2H, <i>m</i> ; 8,0)	129,7	129,8
11	7,28 (1H, <i>m</i> ; 8,0)	128,5	7,20 (1H, <i>m</i>)	130,1	130,1
14		128,3		128,3	128,1
16		164,7		162,1	164,5
17	3,38 (1H, <i>dd</i> ; 18,3, 8,8), 2,81 (1H, <i>dd</i> , 17, 5,2)	174,8	3,29 (1H, <i>dd</i> ; 18,0, 8,0), 2,96 (1H, <i>dd</i> , 18,0, 5,0)	173,7	174,1
18	2,94 (1H, <i>ddd</i> , 7,6, 7,2, 6,0)	42,8	2,90 (1H, <i>ddd</i> , 8,0, 7,0, 5,0)	42,5	42,6
19		36,6		39,3	
20	1,25 (3H, <i>d</i> ; 7,2)	179,8	1,12 (3H, <i>d</i> ; 7,0)	176,7	177,2
		17,6		17,4	17,6

^aDados de espectro em metanol-d₄ dos RMN de ^1H e ^{13}C em 400 MHz e 100 MHz, respectivamente.

^bDados extraídos de DING et al., 2008.

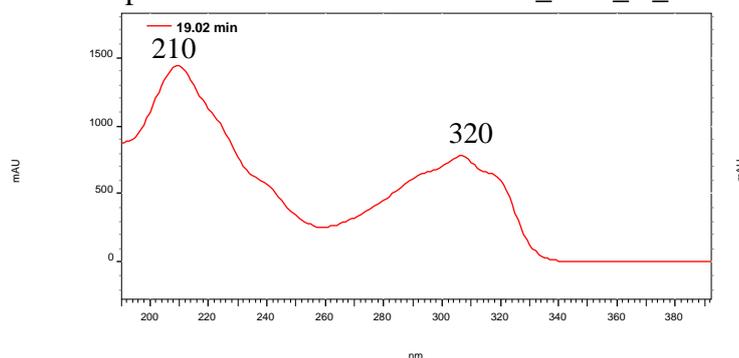
^cDados extraídos de CHIANG et al., 2011.

4.3.2.6 Identificação da estrutura M_KBr_D_30

O constituinte M_KBr_D_30 estava mais abundante no meio suplementado com KBr do que no meio Czapek (controle).

O constituinte M_KBr_D_30 (2,2 mg) foi isolado como um sólido amarelo pálido e amorfo da fração M_KBr_D. Além disso, apresentou-se absorção máxima no UV/Vis em regiões de 210 e 320 nm (Figura 4.63).

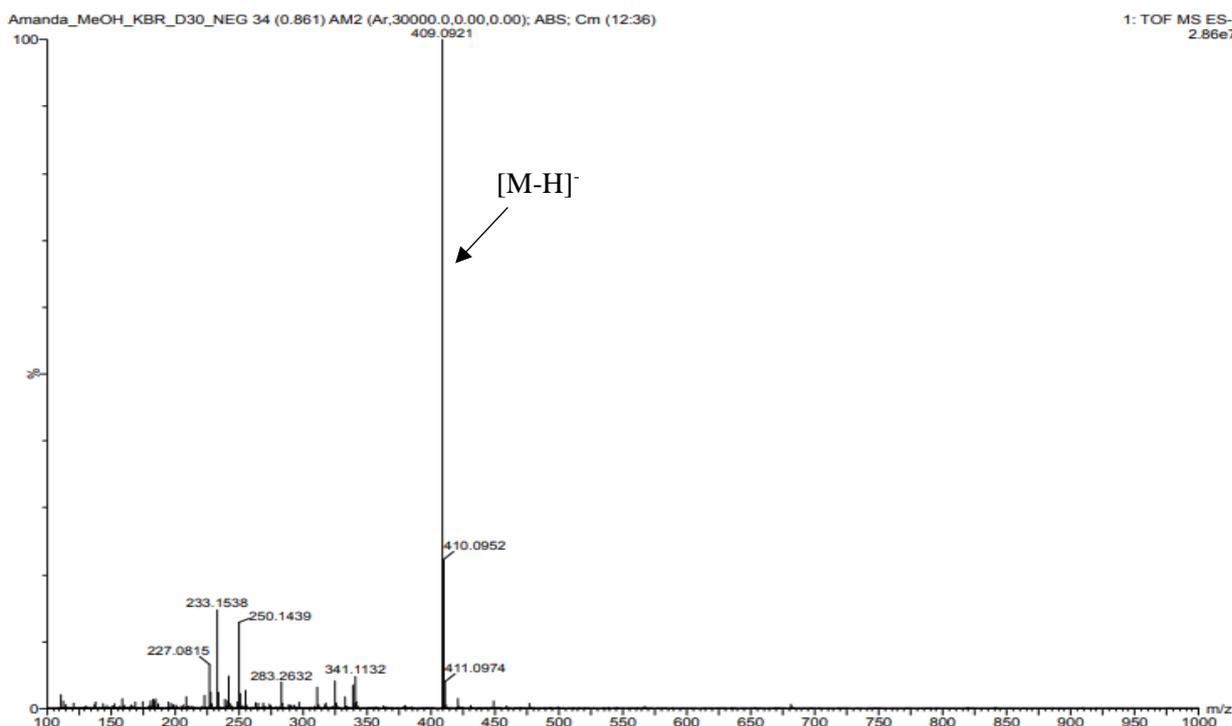
Figura 4.63 – Espectro de UV do constituinte M_KBr_D_30 em 43% ACN:H₂O v/v



Fonte: Autor.

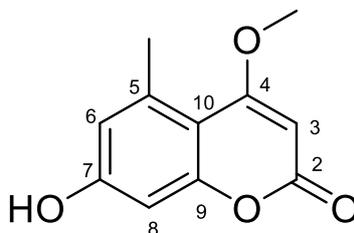
Através do experimento de massas de alta resolução pode-se verificar o íon molecular, no modo negativo, de m/z 409,0921 $[M-H]^-$. Esse íon indicou a fórmula molecular $C_{22}H_{18}O_8$ (408,0843 Da), pelo qual apresenta 13 insaturações (Figura 4.64).

Figura 4.64 – Espectro de massas de alta resolução no modo positivo de M_KBr_D_30



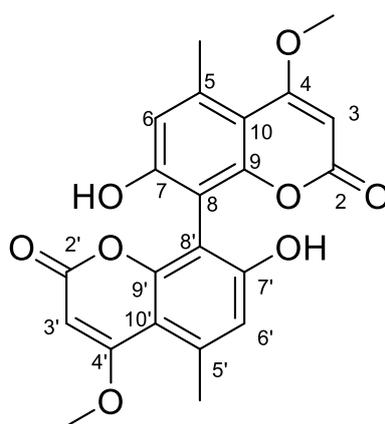
Fonte: Autor.

No espectro de RMN de ^1H (Figura 4.65) foram observados a presença de sinais de metilas ligado a olefinas em δ_{H} 2,54 (3H, *s*) e de sinais de metoxilas ligadas a anéis aromáticos em δ_{H} 3,86 (3H, *s*). Assim como, a presença de sinais de hidrogênios ligados ao sistema olefínico em δ_{H} 5,40 (1H, *s*) e ligado a anel aromático em δ_{H} 6,64 (1H, *s*). No entanto, o espectro de RMN de ^1H apresentaram poucos sinais com apenas singletos, sendo característico de dihidroxicumarina. Essa atribuição foi suportada pela presença de somente um sinal na região de metoxila.



Dihidroxicumarina

No espectro de ^{13}C (Figura 4.66) verificou-se a presença de 11 sinais de carbono indicando que o constituinte M_KBr_D_30 é uma molécula simétrica, atribuindo-a como orlandina. Tal atribuição, foi posteriormente confirmada quando fez um paralelo com os sinais adquiridos por RMN de ^1H e ^{13}C com os apresentados pela molécula na literatura (CAMPOS, 2005) apresentados na Tabela 4.6. Ainda, foi confirmado através das correlações observadas no mapa de contorno dos RMN bidimensionais como HSQC e HMBC.



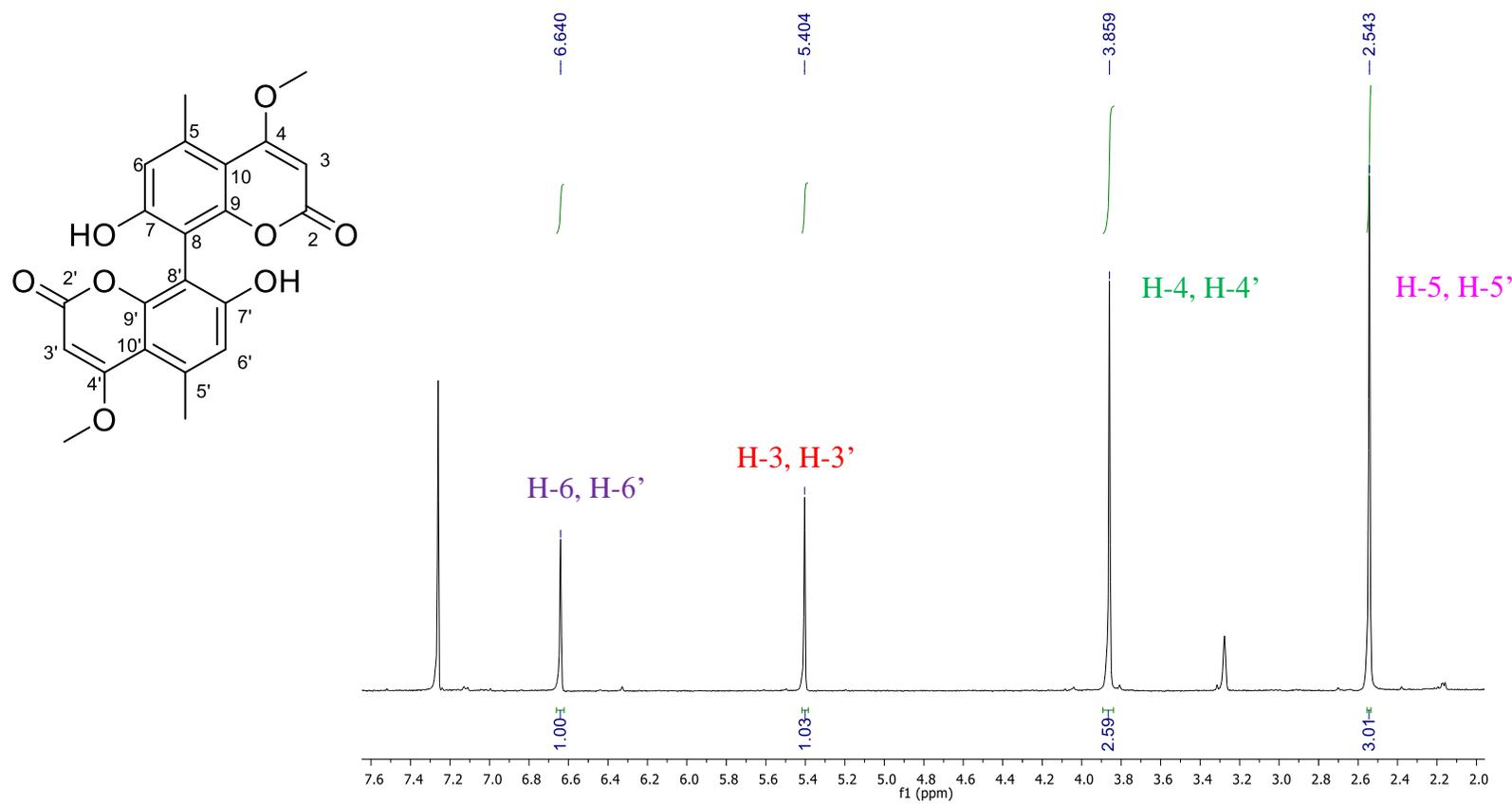
Orlandina

No mapa de contorno do HSQC (Figura 4.67) foram percebidas correlações do hidrogênio em δ_{H} 2,54 (5- CH_3) com o carbono em δ_{C} 23,1(5- CH_3 , 5'- CH_3), além das correlações dos hidrogênios em δ_{H} 3,86 (4- OCH_3 ,4'- OCH_3), 5,40 (H-3,H-3'), 6,64 (H-6,H6') com os carbonos em δ_{C} 55,6 (4- OCH_3 ,4'- OCH_3), 86,2(3-C, 3'-C), 115,9(6-C, 6'-C), respectivamente.

No mapa de contorno do HMBC (Figura 4.68) observou-se correlações dos hidrogênios das metilas em δ_{H} 2,54 (5- CH_3 , 5- CH_3) com os carbonos em δ_{C} 138,1(C-5, C-5'), 115,9(C-6, C-6'), 105,5 (C-10, C-10'). Além disso, notou-se as correlações das metoxilas em δ_{H} 3,86 (4- OCH_3 ,4'- OCH_3) com o carbono em δ_{C} 170,5(C-4, C-4') e do hidrogênio olefínico em δ_{H} 5,40 (H-3,H-3') com os carbonos em δ_{C} 170,5 (C-4, C-4') e 105,5 (C-10, C-10'). Por fim, observou-se ainda as correlações dos próton em δ_{H} 6,64 (H-6,H6') com o carbono em δ_{C} 105,5(C-10, C-10').

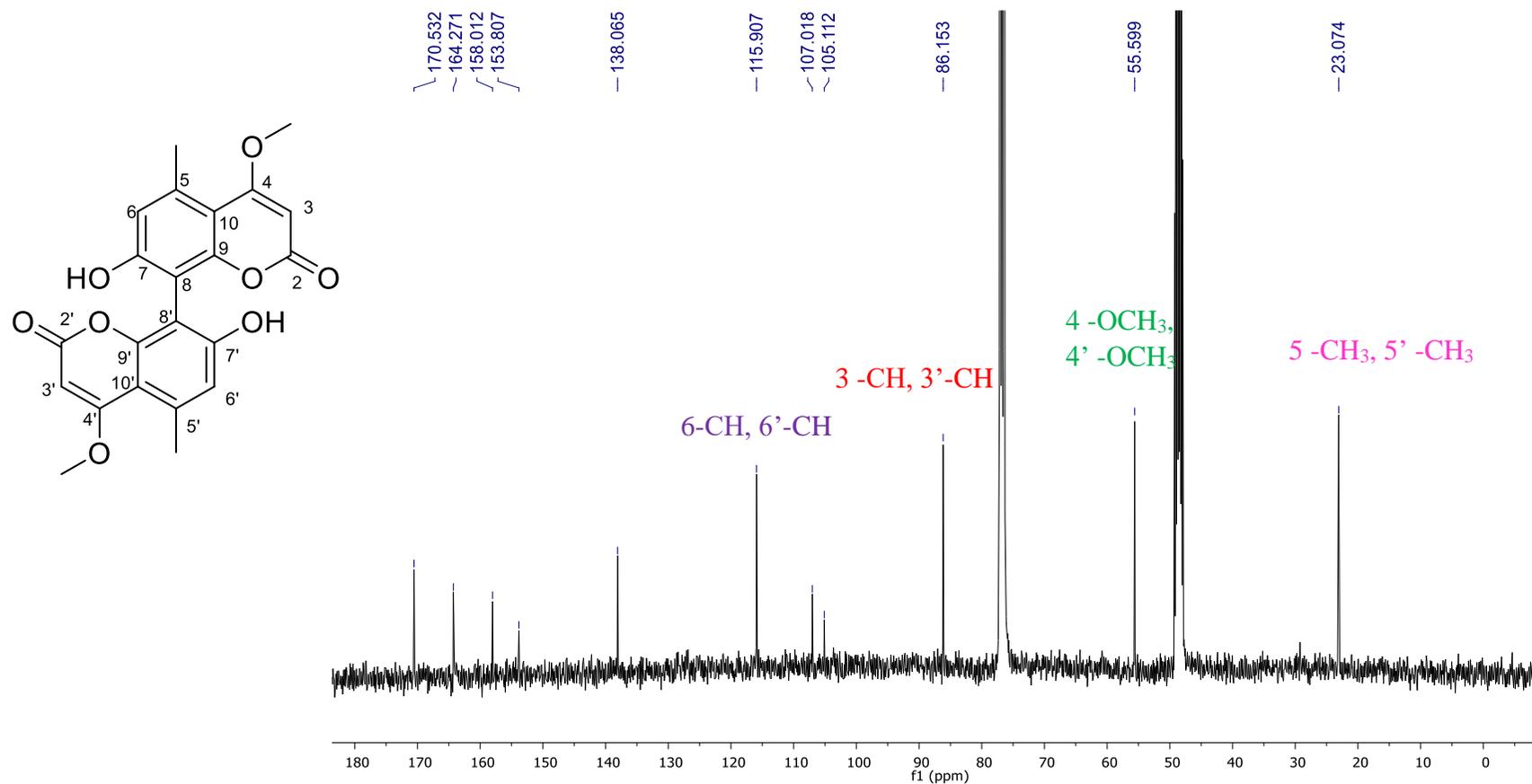
A kotanina e a orlandina foram reportadas por CAMPOS, (2005) como sendo constituintes biossintetizados por *Aspergillus aculeatus* no cultivo do fungo em trigo e arroz, de modo respectivo. Além disso, CAMPOS, (2005) retratou a diferença no assinalamento de ^{13}C dessas espécies, na época do seu isolamento por CUTLER, (1979) e NOZOWA et al., (1987). Na literatura ainda é abordado que estas espécies podem biossintetizar estereoisômeros por diferentes posições de dimerização, como por exemplo: 3-6'-bisiderina, 8-6'-bisiderina e 6-6'-bisiderina. Estas diferentes tipos de dimerização das bicumarinas já foram encontradas em várias espécies do gênero *Aspergillus* (HÜTTEL e MÜLLER et al.,2007).

Figura 4.65 – Espectro de RMN de ^1H de **M_KBr_C_30** (CDCl_3 e CD_3OD ;400 MHz)



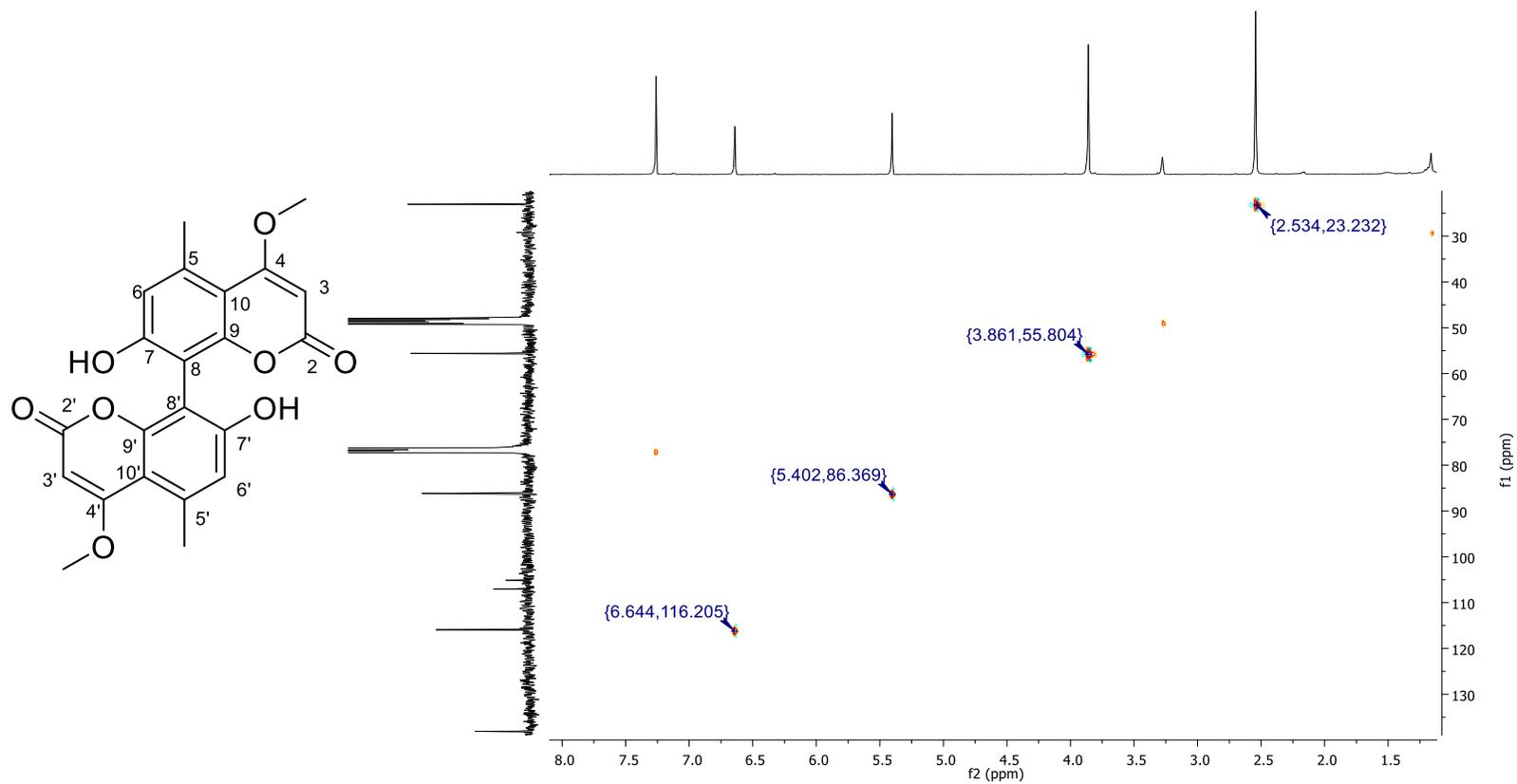
Fonte: Autor.

Figura 4.66 – Espectro de RMN de ^{13}C de **M_KBr_C_30** (CDCl_3 e CD_3OD ;400 MHz)



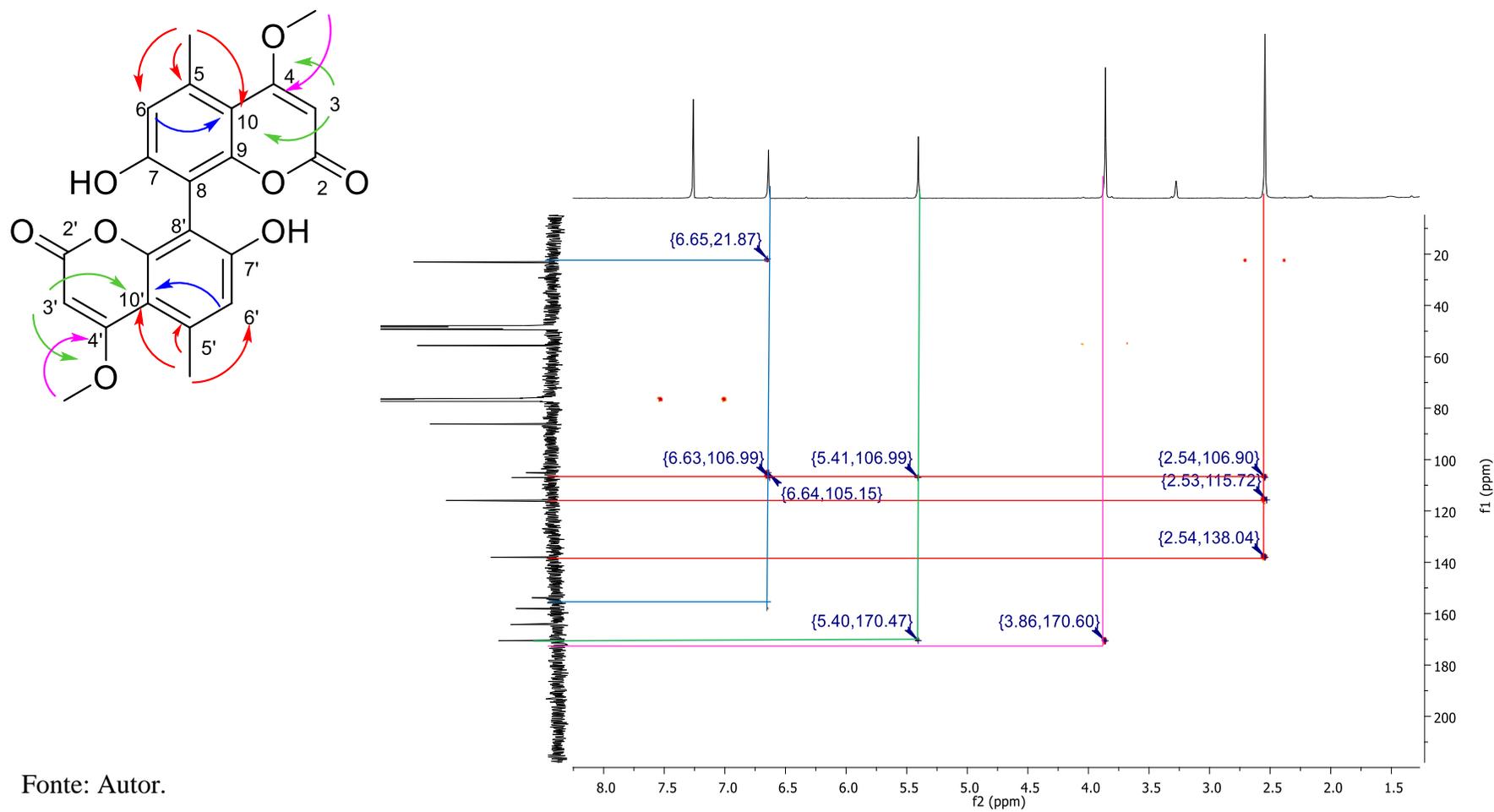
Fonte: Autor.

Figura 4.67 – Espectro bidimensional de HSQC M_KBr_D_30 (CD₃OD; 400 MHz)



Fonte: Autor.

Figura 4.68 – Espectro bidimensional de HMBC M_KBr_D_30 (CD₃OD; 400 MHz)



Fonte: Autor.

Tabela 4.6 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para **M_KBr_D_26** (400 e 100 MHz).

MeOH_KBr_D_30^a			Orlandina^b		
N^o	δ_{H} (mult., <i>J</i> em Hz)	δ_{C} ^a	δ_{H} (mult., <i>J</i> em Hz)	δ_{C} ^b	δ_{C} ^c
2		164,3		169,4	161,4
3	5,40 (1H, <i>s</i>)	86,2	5,50 (1H, <i>s</i>)	86,3	86,3
4		170,5		153,7	169,4
4- OCH₃	3,86 (3H, <i>s</i>)	55,6	4,00 (3H, <i>s</i>)	56,4	56,4
5		138,1		136,8	136,8
5- CH₃	2,54 (3H, <i>s</i>)	23,1	2,60 (3H, <i>s</i>)	23,1	23,1
6	6,64 (1H, <i>s</i>)	115,9	6,70 (1H, <i>s</i>)	115,3	115,3
7-OH		158,0		158,3	158,3
8		107,2		105,9	105,9
9		153,8		161,4	153,7
10		105,5		105,5	105,5
2		164,3		169,4	161,4
3	5,40 (1H, <i>s</i>)	86,2	5,50 (1H, <i>s</i>)	86,3	86,3
4		170,5		153,7	169,4
4- OCH₃	3,86 (3H, <i>s</i>)	55,6	4,00 (3H, <i>s</i>)	56,4	56,4
5		138,1		136,8	136,8
5- CH₃	2,54 (3H, <i>s</i>)	23,1	2,60 (3H, <i>s</i>)	23,1	23,1
6	6,64 (1H, <i>s</i>)	115,9	6,70 (1H, <i>s</i>)	115,3	115,3
7-OH		158,0		158,3	158,3
8		107,2		105,9	105,9
9		153,8		161,4	153,7
10		105,5		105,5	105,5

^aDados obtidos em CDCl_3 e CD_3OD nos RMN de ^1H e ^{13}C em 400 MHz e 100 MHz, respectivamente.

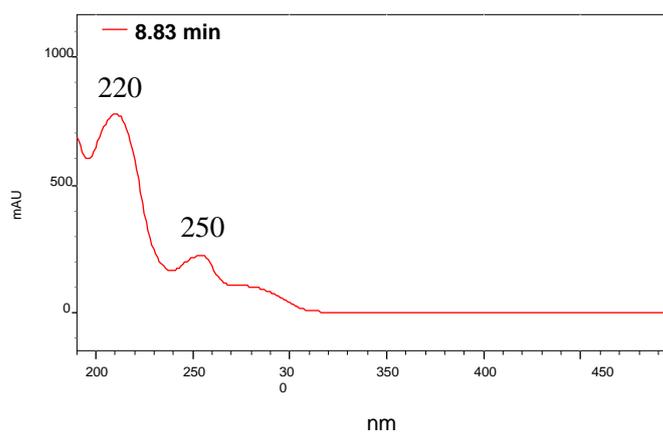
^bDados obtidos em $\text{DMSO}-d_6$ de CUTLER et al, 1979.

^cDados obtidos em $\text{DMSO}-d_6$ de NOZOWA et al, 1987.

4.3.2.6 Identificação da estrutura M_KBr_E_34

A substância M_KBr_E_34 (3,3 mg) foi isolada da fração MeOH-KBr-E e apresentou-se como cristais de coloração marrom. O espectro UV dessa substância mostrou máxima em 220 e 250 nm (Figura 4.69).

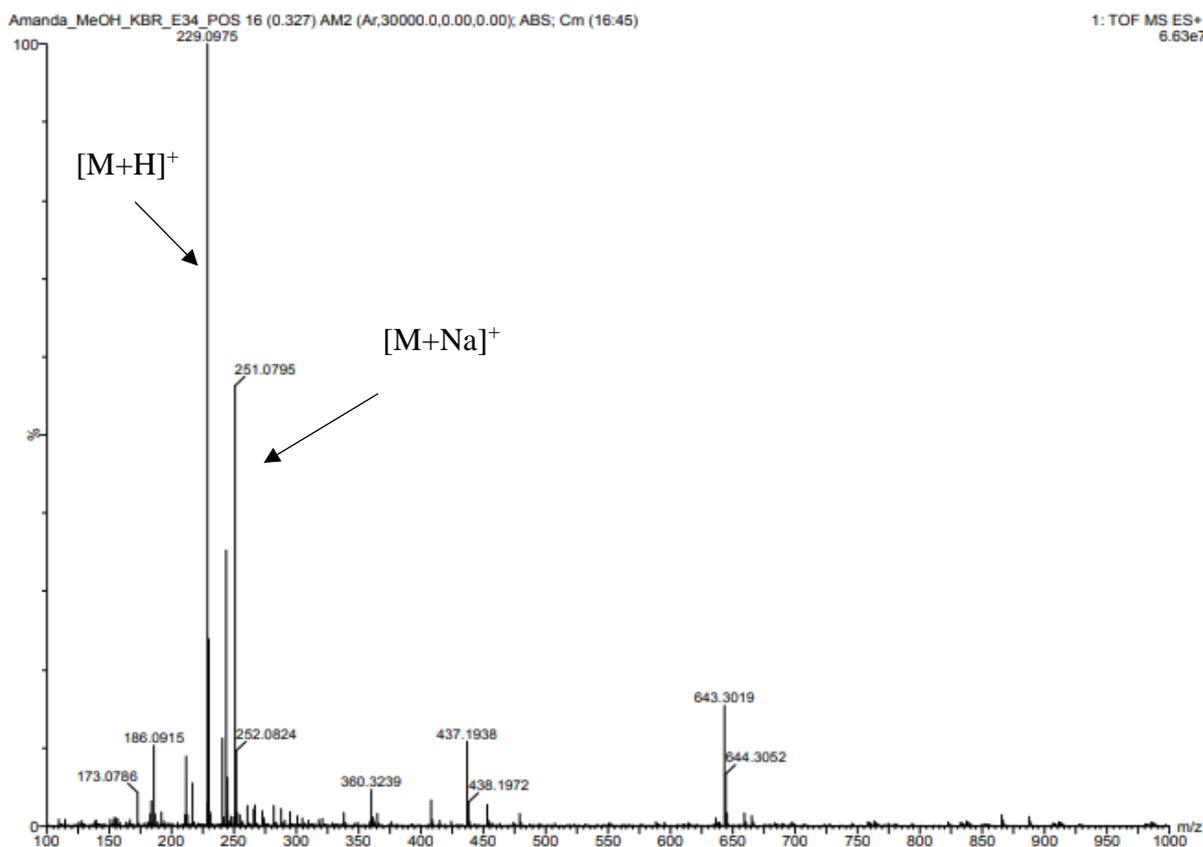
Figura 4.69 – Espectro de UV da substância M_KBr_E_34 em 14% ACN:H₂O v/v



Fonte: Autor.

O espectro de massas de alta resolução (Figura 4.70) revelou um íon molecular no modo positivo de ionização com m/z 251,0795 $[M+Na]^+$ e de 229,0975 $[M+H]^+$. A partir dessa análise de massas pode-se assinalar uma fórmula molecular de $C_{13}H_{12}N_2O_2$ (228,0897 Da).

Figura 4.70 – Espectro de massas no modo positivo da substância **M_KBr_E_34**



Fonte: Autor.

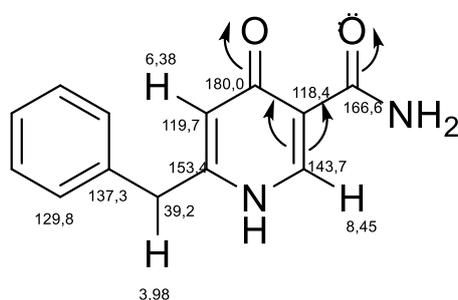
No espectro de RMN de ^1H (Figura 4.71) foram observados sinais de hidrogênios ligados a sistemas aromáticos mono-substituídos em δ_{H} 7,27 (1H, *m*), 7,37 (2H, *m*) e 7,34 (2H, *m*). Além do mais, foi verificado a presença de sinais de prótons ligados a sistemas alifáticos em δ_{H} 8,44(1H, *s*) e 6,38 (1H, *s*), bem como a ocorrência de sinais de hidrogênios metilênicos em δ 3,98 (2H, *s*), sendo característico de CH_2 ligado a anel aromático.

No espectro de ^{13}C (Figura 4.72) verificou-se a presença de sinais de 11 carbonos, sendo que o sinal em δ_{C} 130,0 estava bastante intenso podendo ser decorrente a sobreposição de alguns sinais de carbono que podem ter deslocamento químico na mesma região. Foi verificado no espectro, ainda, sinais de carbonila de cetona α,β -insaturada em δ_{C} 180,0 podendo indicar a ocorrência

de um grupamento piridin-4-ona. Essa atribuição ocorreu a partir dos valores de deslocamentos químicos dos hidrogênios ligados ao sistema olefínico, bem como pelas correlações notadas nos mapas de contornos de HSQC e HMBC.

No mapa de contornos do HSQC (Figura 4.73) foram verificadas correlações dos hidrogênios em δ_H 3,98 (H-7), 6,38(H-5), 8,44 (H-2) com os carbonos em δ_C 39,5(C-7), 119,8 (C-5) e 143,7(C-2), respectivamente.

O HMBC (Figura 4.74) mostrou correlações dos prótons metilênicos em δ_H 3,98 (H-7) com o carbonos da fenila em δ_C 137,3 (C-8) e 130,0 (C-9, C-13), bem como com os carbonos do sistema piridin-4-ona em δ_C 119,8 (C-5) e 153,4 (C-6), sendo portanto um dos substituintes desse sistema. Desse modo, também foi verificada correlações do hidrogênio em δ_H 6,38(H-5) com os carbonos em δ_C 39,5(C-7), 118,3(C-3), 153,4(C-6), 166,6 (C-14) e 180,0(C-4). Para o hidrogênio mais desblindado em δ_H 8,44 (H-2) foi atribuído que ele estaria em posição β a dois grupamentos retiradores de elétrons, como carbonilas por ressonância, além de estar em posição α ao grupamento piridina (N-H). Isso foi confirmado pelas correlações observadas no mapa de contornos de HMBC desse sinal com os carbonos em δ_C 118,3 (C-3), 153,4 (C-6), 166,6 (C-14) e 180,0 (C-4). Diante de todas essas observações pode-se atribuir a estrutura abaixo, que foi confirmada com o valor verificado por espectrometria de massas de m/z 229,0975 [M+ H]⁺.



A partir dos assinalamentos de valores de carbonos e hidrogênios, a molécula foi atribuída como sendo a Aspernigrina A e posteriormente foi confirmada, por meio de comparações dos valores de deslocamento químico de RMN de ¹³C e ¹H com os relatados na literatura, como mostrado na Tabela 4.7.

A Aspernigrina A foi isolada primeiramente no fungo marinho *Aspergillus niger*, que foi assinalada por HIORT et al., 2004 como a estrutura (1), que apresenta o anel 2-piridona. Posteriormente foi isolada do fungo endofítico *Cladosporium herbarum* por YE et al., (2005), que revisou a estrutura com base na análise cristalográfica de raios-X e no reassinalamento de sinais de RMN de ^{13}C observados para C-4 (δ 178.1), C-6 (δ 151.2) e C-14 (δ 165,9). Logo, YE et al., (2005) atribuiu que a Aspernigrina A apresentava o anel 4-piridona - estrutura (2).

Este é o primeiro relato de Aspernigrina A sendo produzida por *A. aculeatus*.

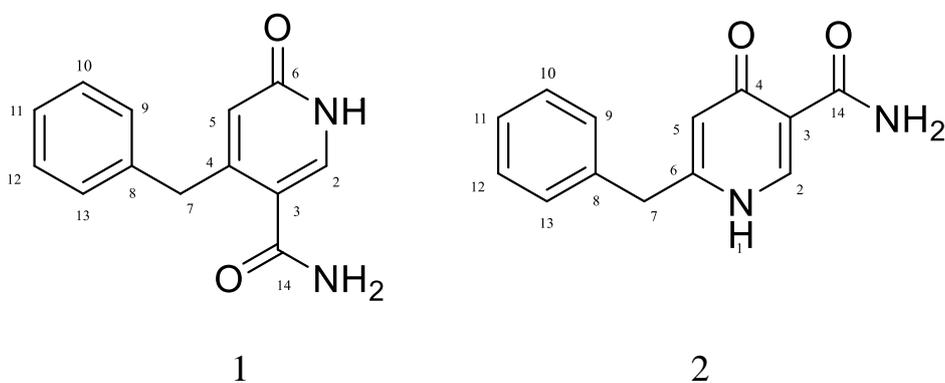
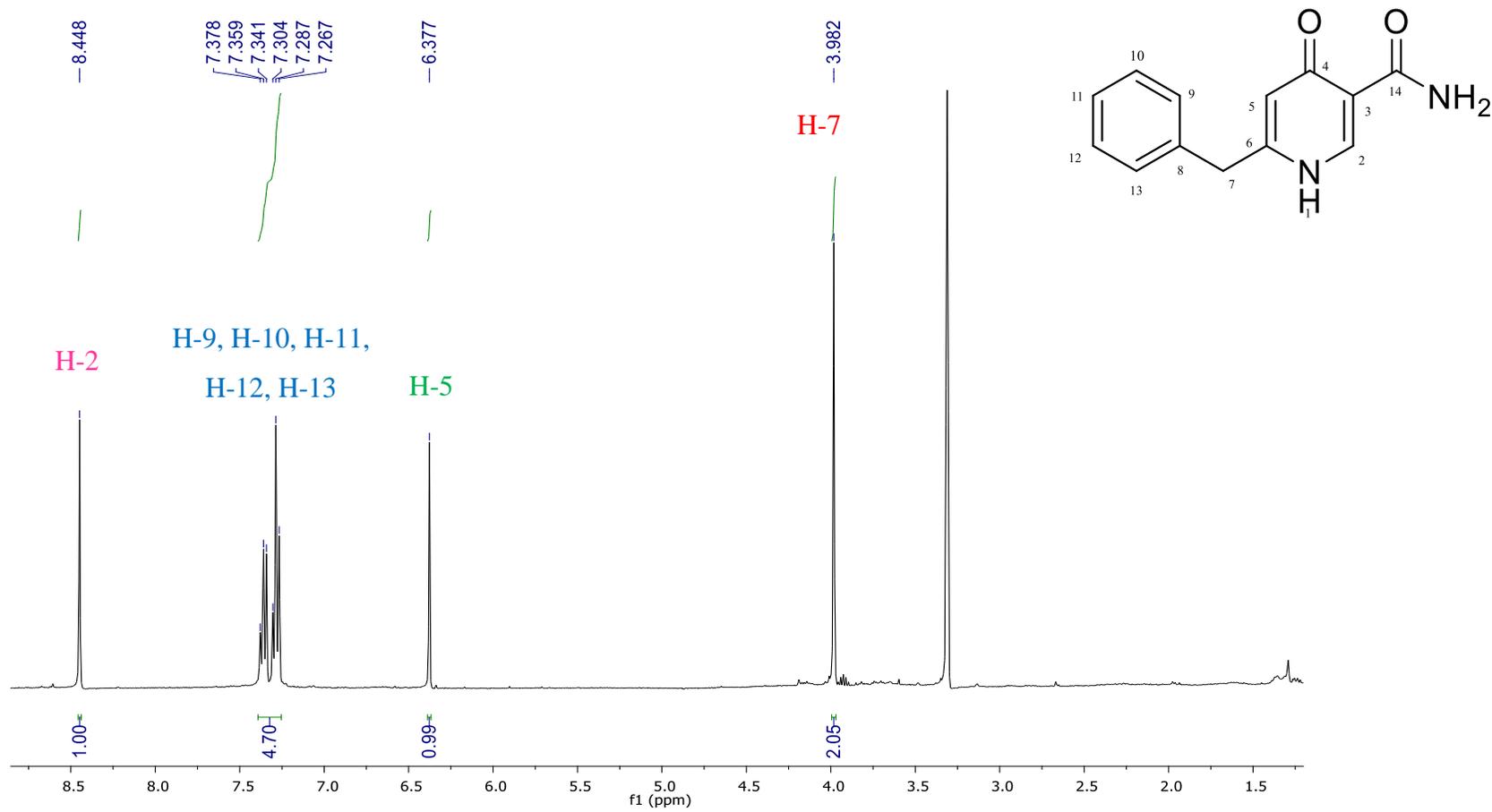
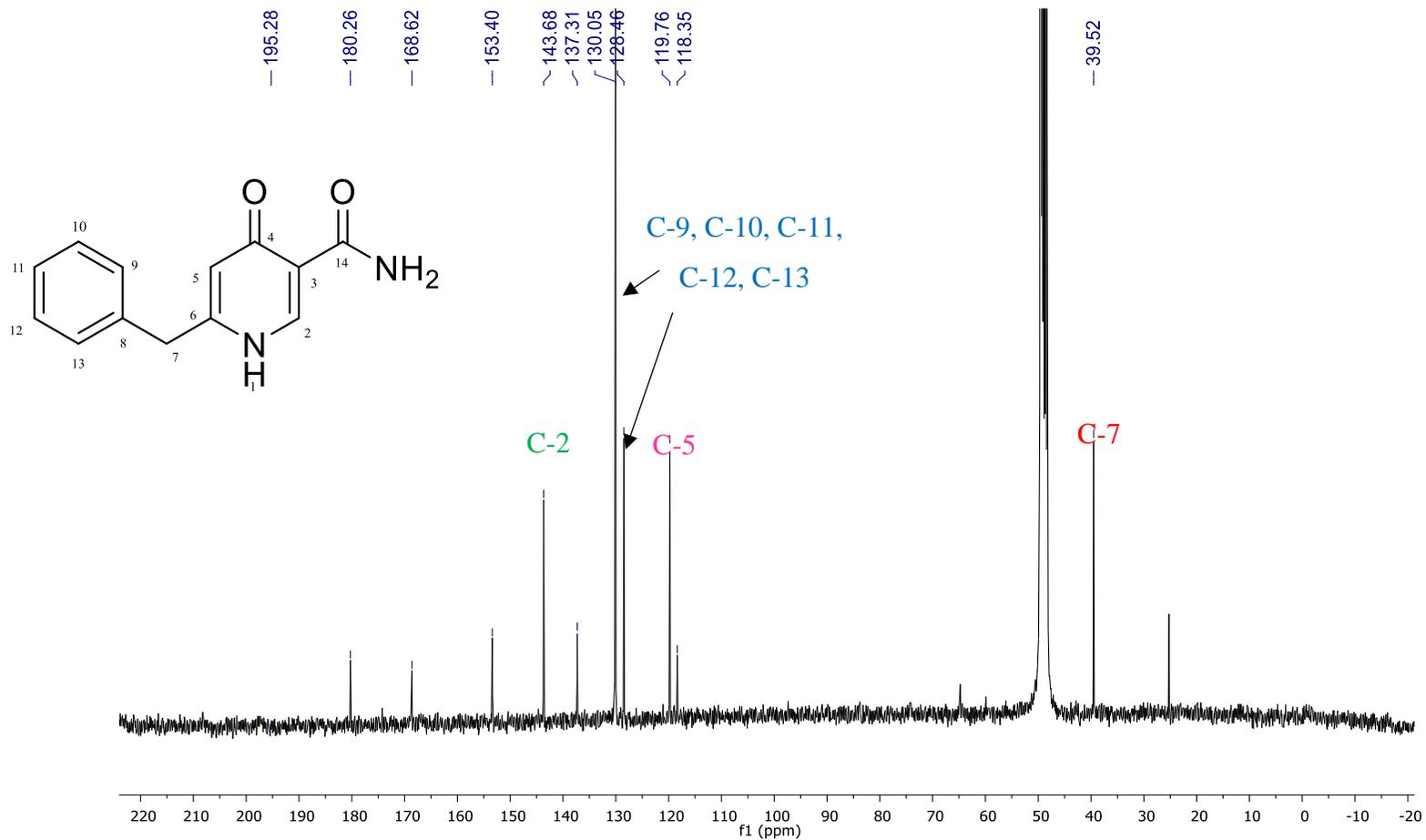


Figura 4.71 – Espectro de RMN de ^1H de **M_KBr_E_34** (CD_3OD ; 400 MHz)



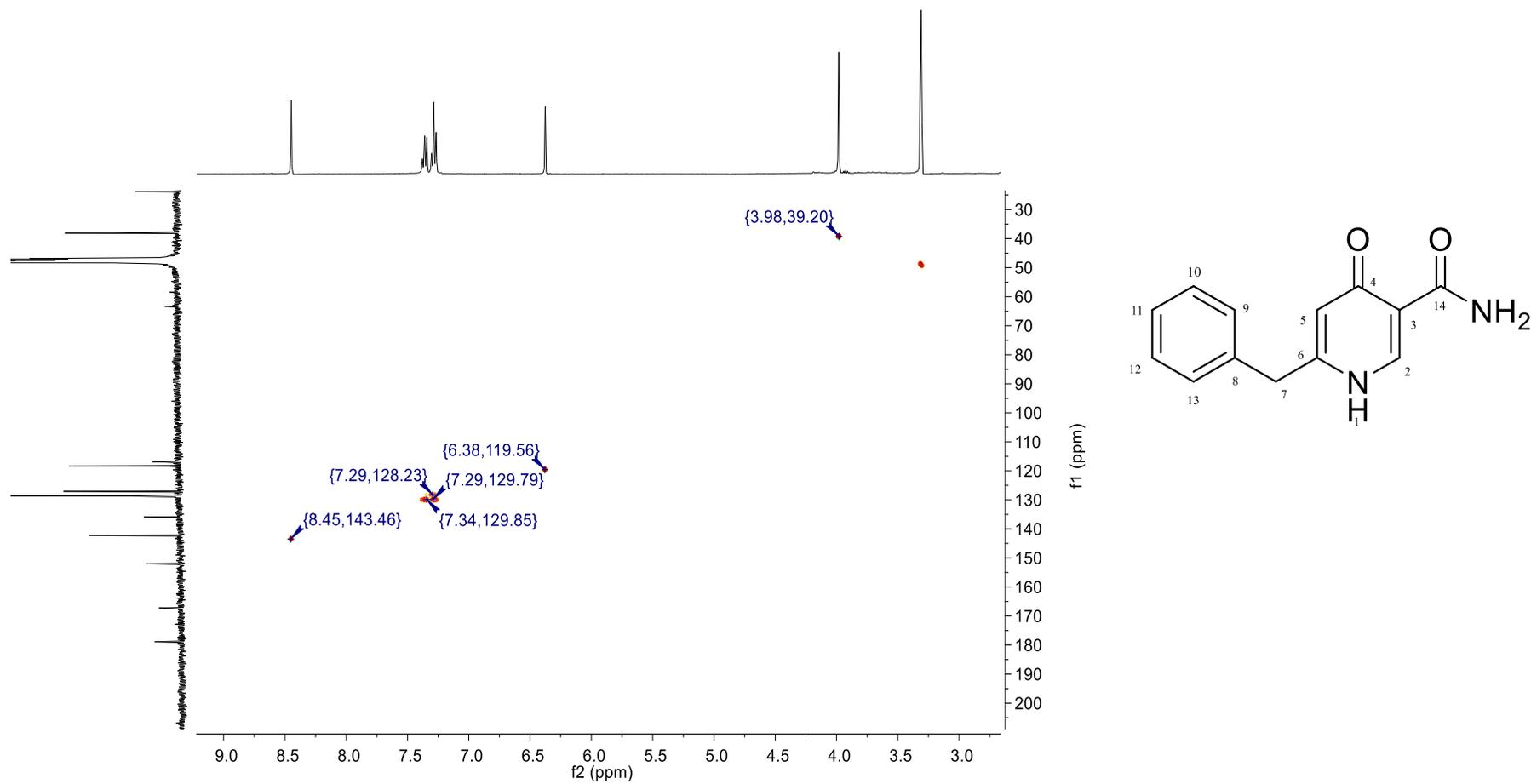
Fonte: Autor.

Figura 4.72 – Espectro de RMN de ^{13}C de **M_KBr_E_34** (CD_3OD ;100 MHz)



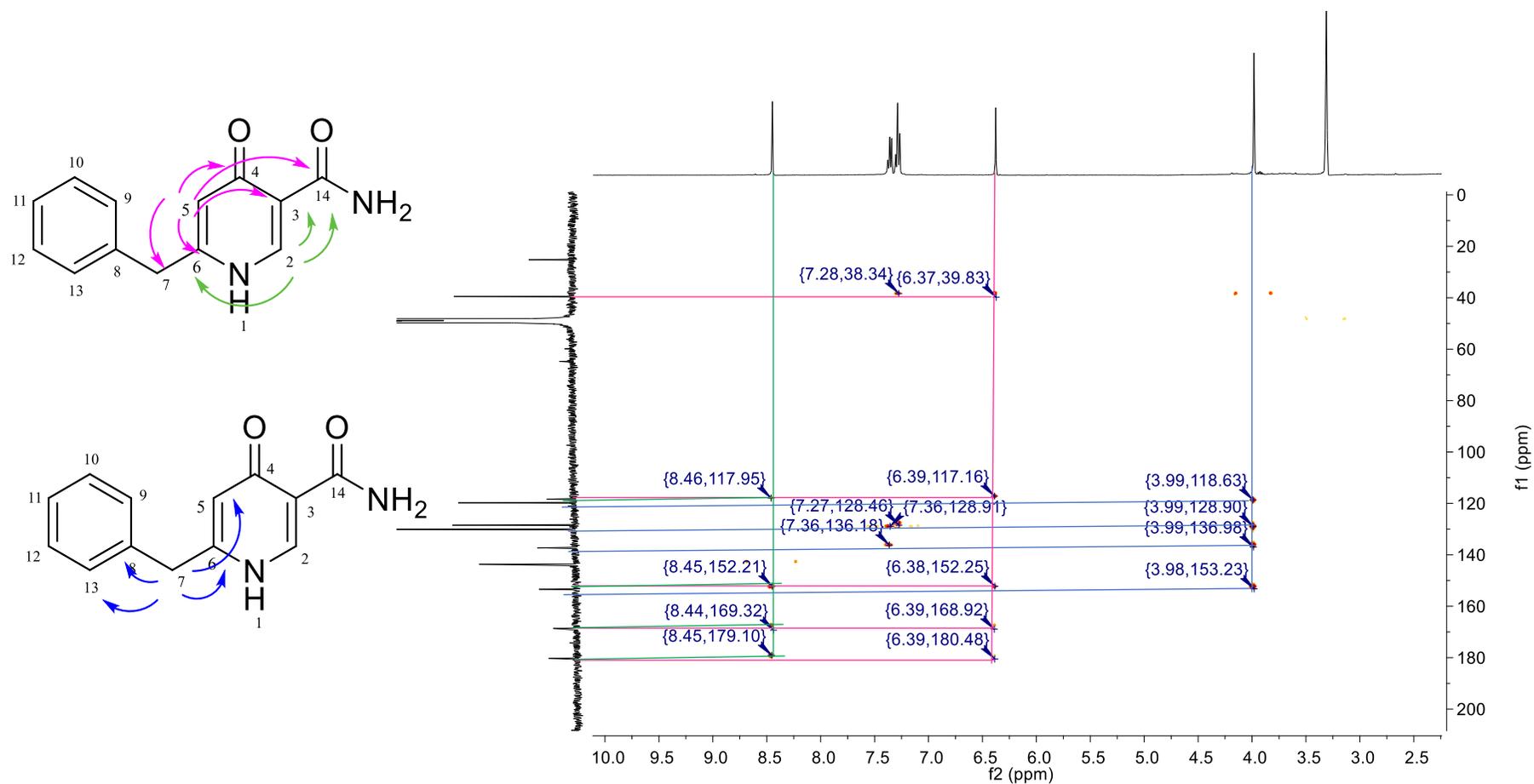
Fonte: Autor.

Figura 4.73 – Espectro bidimensional de HSQC M_KBr_E_34 (CD₃OD; 400 e 100 MHz)



Fonte: Autor.

Figura 4.74 – Espectro bidimensional de HMBC M_KBr_E_34 (CD₃OD; 400 e 100 MHz)



Fonte: Autor.

Tabela 4.7 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para **M_KBr_E_34** (400 e 100 MHz).

MeOH_KBr_E_34^a			Aspernigrina B^b	
N^o	δ_{H} (mult., <i>J</i> em Hz)	δ_{C}	δ_{H} (mult., <i>J</i> em Hz)	δ_{C}
2	8,44(1H, <i>s</i>)	143,7	8,32(1H, <i>s</i>)	142,2
3		118,3		118,0
4		180,0		178,1
5	6,38 (1H, <i>s</i>)	119,8	6,22 (1H, <i>s</i>)	118,9
6		153,4		151,2
7	3,98 (2H, <i>s</i>)	39,5	3,90 (2H, <i>s</i>)	38,2
8		137,3		137,4
9 e 13	7,34 (2H, <i>m</i>)	130,0	7,28 (2H, <i>m</i>)	129,2
10 e 12	7,37 (2H, <i>m</i>)	130,0	7,34 (2H, <i>m</i>)	129,3
11	7,27 (1H, <i>m</i>)	128,5	7,27 (1H, <i>m</i>)	127,5
14		166,6		165,9

^aDados de RMN de ^1H e ^{13}C EM 400 E 100 MHz obtidos em CD_3OD

^bDados obtidos em em CDCl_3 por YE et al., 2005.

5. Conclusão

5. CONCLUSÃO

Na etapa de triagem os fungos endofíticos *Penicillium brasilianum* (F1) e *Penicillium brasilianum* modificados geneticamente (F2-F4) e *Aspergillus aculeatus* (F5) produziram diferentes metabólitos secundários, quando submetidos a diferentes condições de cultivos com sais inorgânicos. Logo, a partir do aumento da concentração do sulfato de ferro no meio de cultivo pôde-se observar principalmente a produção de dois metabólitos secundário, de alta polaridade, no extrato AcOEt de todas as linhagens *P. brasilianum* estudadas. Além disso, verificou-se que no cultivo com sais halogenados ocorreu a produção de novas substâncias nos períodos de 15 a 22 min para as linhagens de *P. brasilianum*.

A partir do cultivo com *Aspergillus aculeatus* foram verificadas a biossíntese principalmente de compostos de alta polaridade (4 a 10 min) em todos os meios modificados para o extrato AcOEt. Para o extrato metanólico foram observados modificações na expressão de metabólitos nos meios contendo $MnCl_2$, $CoCl_2$, $ZnCl_2$ e KBr. Assim, as modificações que ficaram mais evidentes foram em *A. aculeatus* nos meios suplementados com KBr e $CoCl_2$, escolhidos para cultivá-los em larga escala.

A partir dos ensaios analíticos de *A. aculeatus* nesses meios suplementados, pôde-se perceber que nas concentração de 10 g/L e 2 g/L foram as condições que apresentaram uma maior quantidade de extrato produzidos pelos meios suplementados com KBr e $CoCl_2$, respectivamente. Além disso, com este estudo verificou-se que as diferentes concentrações testadas para $CoCl_2$ influenciou a abundância relativa dos metabólitos de indução.

O melhor tempo de cultivo para *A. aculeatus* foi verificado com 14 dias, o qual o endófito produziu mais metabólitos secundários. Além do mais, no teste analítico para avaliar a influência do $FeSO_4$ para produção de metabólitos no cultivo com KBr, verificou-se que na ausência de sulfato de ferro ocorreu a produção de uma quantidade maior de compostos de indução.

A purificação cromatográfica das frações MeOH_KBr_C, MeOH_KBr_D e MeOH_KBr_E resultaram no isolamento de sete compostos, sendo eles da classe de policetídeos (RF3192 C, foncesinona A e aurosperona A), cumarinas (orlandina e kotanina) e derivados de fenilalanina (Aspernigrina A e pestalamida B). Dessas sete substâncias isoladas pôde-se atribuir que a fonsecinona A, orlandina e pestalamida B foram mais produzida no meio Czapek suplementado com KBr do que no controle Czapek. Portanto, o brometo de potássio pode ter influenciado no aumento da biossíntese desses compostos produzidos por *A. aculeatus*.

Além disso, foi verificado que houve um aumento na produção de Pestalamida B e uma redução na produção de Aspernigrina A no meio suplementado com KBr. Sendo assim, pode-se considerar que na presença de KBr houve mais reação de desidratação para incorporação do grupamento α -metilsuccínico na posição 3 da Aspernigrina A formando mais Pestalamida B.

Os constituintes derivados de fenilalanina isolados neste trabalho, como pestalamida B e Aspernigrina A ainda não foram reportados como substâncias biossintetizadas por *A. aculeatus*.

Enfatizando, que o estudo de modificação de cultivo do micro-organismos estudados nesse trabalho, ainda não responde a influência dos sais na biossíntese de compostos, ou seja, não sabe-se como os sais estão interferindo na alteração da conformação enzimática ou na modificação da expressão genética para produzir essas novas substâncias. Embora, por meio deste trabalho pode-se demonstrar que os fungos estudados apresentam metabolismo secundário bastante sensível à variações sais inorgânicos. Considerando, portanto, esta estratégia de modificação do meio de cultivo com sais promissora para aumentar quimiodiversidade de substâncias descobertas, e a partir de então, viabilizar suas aplicações.

6. Referências

6. REFERÊNCIA

- AMARAL, L. S. Estudos metabolômicos e biossintéticos visando contribuições para a química e taxonomia de micro-organismos da família Xylariaceae. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2014. Tese de Doutorado, 209 p.
- AWAN, A. R.; SHAW, W. M.; ELLIS, T. “Biosynthesis of therapeutic natural products using synthetic biology”. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **105**: 96, 2016.
- BAZIOLI, J. M.; AMARAL, L. S.; FILL, T. P.; RODRIGUES-FILHO, E. “Insights into *Penicillium brasilianum* Secondary Metabolism and It’s Biotechnological Potential”. *Molecules*, **22**(6): 858, 2017.
- BENITE, A. M. C.; MACHADO, S. P. MACHADO, B.C. “Sideróforos: uma resposta dos micro-organismos”. *Química Nova*, **25**(6b):1155, 2002.
- BLASIAK, L. C.; DRENNAN, C. L. “Structural Perspective on Enzymatic Halogenation”. *Accounts of Chemical Research*, **42**(1):147, 2009.
- BODE, B. H.; BETHE, B.; HÖFS, R.; ZEECK, A. “Big Effects from Small Changes: Possible Ways to Explores Natures’s Chemical Diversity”. *ChemBiochem*, **3**: 619, 2002.
- BÜCHI, G.; KLAUBERT, D. H.; SHANK, R.C.; WEINREB, S. M.; WOGAN, G. N. “Structure and Synthesis of Kotanin and Desmethylkotanin, Metabolites of *Aspergillus glaucus*”. *Journal of Organic Chemistry*, **36**(8), 1971.
- BU’LOCK, L. D.; HAMILTON, D.; HULME, M. A.; POWELL, A. J.; SMALLEY, H. M.; SHEPHERD, D. SMITH, G. N. Metabolic development and secondary biosynthesis in *Penicillium urticae*. *Canadian Journal of Microbiology*, **11**: 765, 1965.
- BUTLER, A. “Acquisition and Utilization of Transition Metal Ions by Marine Organisms”. *Science*, **281** (5374): 207, 1998.
- BUTLER, A.; SANDY, M. “Mechanistic considerations of halogenating enzymes”. *Nature*, **460** (7257): 848, 2009.
- CAMPOS, F. R. Metabolismo secundário de *Aspergillus aculeatus* e *Microbispora* sp isolados como microrganismo endofítico de *Melia azedarach* L. (MELIACEAE). São Carlos, Programa de Pós- Graduação em Química- UFSCar, 2005, Tese de doutorado, 284p.

CHEN, X.; VAN PÉE, K.H. “Catalytic mechanisms, basic roles, and biotechnological and environmental significance of halogenating enzymes”. *Act Biochim Biophys Sin*, 40(3):183, 2008.

CHIANG, Y.M.; MEYER, K. M.; PRASEUTH, M.; BAKER, S.E.; BRUNO, K.S.; WANG, C.C. “Characterization of a polyketide synthase in *Aspergillus niger* whose product is a precursor for both dihydroxynaphthalene (DHN) melanin and naphtho- γ -pyrone”. *Fungal Genetics and Biology*, 48(4): 430, 2011.

CULOTTA, V. C.; DALY, M. J. “Manganese Complexes: Diverse Metabolic Routes to Oxidative Stress Resistance in Prokaryotes and Yeast”. *Antioxidants & redox signaling*, **00**, 2013.

CUTLER, H. G.; CRUMLEY, F. G.; COX, R.H.; HERNANDEZ, O.; COLER, R.J.; DORNER, J. W. Orlandin: a nontoxic fungal metabolite with plant growth inhiviting properties. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 27(3): 592, 1979.

DE LAZARO, S.; CAMPOS, F. R.; RODRIGUES-FILHO, E.; BARISON, A.; DAOLIO, C.; FERREIRA, A. G.; POLO, V.; LONGO, E.; ANDRÉS, J. “Combined ^{13}C NMR and DFT/GIAO studies of the polyketides Aurasperone A and Fonsecainone A”. *International Journal of Quantum Chemistry*, **108**: 2408, 2008.

DING, G.; JIANG, L. GUO, L. CHEN, X.; ZHANG, H.; CHE, Y. “Pestalazines and Pestalamides, Bioactive Metabolites from the Plant Pathogenic Fungus *Pestalotiopsis theae*”. *Journal of Natural Products*, 71(11): 1861, 2008.

DUBEY, M. K.; MEENA, M.; AAMIR, M.; ZEHRA, A.; UPADHYAY, R. S. Chapter 19 - Regulation and Role of Metal Ions in Secondary Metabolite Production by Microorganisms. *Microbial Secondary Metabolites Biochemistry and Applications*, Elsevier, 2019, p.259.

FANG, W.; LIN, X.; WANG, J.; LIU, Y.; TAO, H.; ZHOU, X. Aspergynone-Type Bis-Naphtho- γ -pyrone with COX-2-Inhibitory Activities from Marine-Derived Fungus *Aspergillus niger*. *Molecules*, 21(7): 941, 2016.

FILL, T. P.; BARETTA, J. F.; DE ALMEIDA, L. G. P.; MALAVAZI, I.; CERDEIRA, L. T.; SAMBORSKY, M.; DE VASCONCELOS, A. T. R.; LEADLAY, P.; RODRIGUES-FILHO, E. “Draft Genome Sequence of the Fungus (Strain LaBioMMi 136) a plant Endophyte from *Melia azedarach*”. *Microbiology Resource Announcements*, **7**:1, 2018.

FILL, T. P.; PALLINI, H. F.; AMARAL, L. S.; SILVA, J. V.; BIDÓIA, D. L.; PERON, F.; GARCIA, F. P.; NAKAMURA, C. V.; RODRIGUES FILHO, E.

“Copper and Manganese Cations Alter Secondary Metabolism in the Fungus *Penicillium brasilianum*”. Journal of the Brazilian Chemical Society, 27(8), 2016.

FORNARO, A.; COICHEV, N. “Ácido L-ascórbico: reações de complexação e de óxido-redução com alguns íons metálicos de transição”. Química Nova, 21 (5): 642, 1998.

FOSTER, A. W.; OSMAN, D.; ROBINSON, N. J. “Metal Preferences and Metallation”. The Journal of Biological Chemistry, 289(41):28095, 2014.

GAO, Y. Q.; GUO, C. J.; ZHANG, Q.; ZHOU, W. M. WANG, C. C. GAO, J.M. “Asperaculanes A and B, Two Sesquiterpenoids from the Fungus *Aspergillus aculeatus*”. Molecules, 20(1): 325, 2014.

GESHEVA, V.; IVANOVA, V.; GESHEVA, R. “Effects of nutrients on the production of AK-111-81 macrolide antibiotic by *Streptomyces hygroscopicus*”. Microbiological Research, 160 (3): 243, 2005.

GULDER. T. A. M.; HONG, H.; CORREA, J.; EGEREVA. E. WIESE, J. IMHOFF, J.F. GROSS, H. “Isolation, structure elucidation and total synthesis of lajollamide A from the marine fungus *Asteromyces cruciatus*”. Marine Drugs, 10(12): 2912, 2012.

HAYASHI, H.; FURUTSUMA, K.; SHIONO, Y. “Okaramines H and I, new okaramine congeners, from *Aspergillus aculeatus*”. Journal of Natural Products, 62: 315, 1999.

HE, Y.; TIAN, J.; CHEN, X.; SUN, W.; ZHU, H.; LI, Q.; LEI, L. YAO, G.; XUE, Y.; WANG, J.; LI, H.; ZHANG, Y. “Fungal naphtho- γ -pyrones: Potent antibiotics for drug-resistant microbial pathogens”. Scientific Reports, 6: 24291, 2016.

HIORT, J.; MAKSIMENKAM, K.; REICHERT, M.; PEROVIĆ-OTTSTADT, S.; LIN, W. H.; WRAY, V.; STEUBE, K.; SCHAUMANN, K.; WEBER, H.; PROKSCH, P.; EBEL, R.; MÜLLER, W. E. G.; BRINGMANN, G. “New Natural Products from the Sponge-Derived Fungus *Aspergillus niger*”. Journal of Natural products, 2010, 67(9):1532, 2004.

HÜTTEL, W.; MÜLLER, MICHAEL. “Regio- and Stereoselective Intermolecular Oxidative Phenol Coupling in Kotanin Biosynthesis by *Aspergillus Niger*”. ChemBioChem, 8: 521, 2007.

JAREMKO, M. J. DAVIS, T. D. CORPUZ, J. C. BURKART, M. D. “Type II non-ribosomal peptide synthetase proteins: structure, mechanism, and protein–protein interactions”. Natural Product Reports, 2020.

LI, G.; LOU, H. X. “Strategies to diversify natural products for drug Discovery”. *Medicinal Reserach Reviews*, 38 (4): 1255, 2018.

LIMA, M. A. S.; OLIVEIRA, M. C. F.; PIMENTA, A. T. Á.; UCHOA, P. K. S. “*Aspergillus niger*: A Hundred Years of Contribution to the Natural Products Chemistry”. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 30 (10): 2029, 2019.

LIU, J.; CHAKRABORTY, S.; HOSSEINZADEH, P.; YU, Y.; TIAN, S.; PETRIK, I.; BHAGI, A.; LU, Y. “Metalloproteins Containing Cytochrome, Iron–Sulfur, or Copper Redox Centers”. *Chemical Reviews*, **114**: 4366, 2014.

MAO, X. B.; EKSRIWONG, T.; CHAUVATCHARIN, S.;ZHONG, J. J. “Optimization of carbon source and carbon/nitrogen ratio for cordycepin production by submerged cultivation of medicinal mushroom *Cordyceps militaris*”. *Process Biochemistry*, **40**: 1667, 2005.

MIZUNO, K.; YAGI, A. SATOI, S. TAKADA, M. HAYASHI, M. ASANO, K. MATSUDA, T. “Studies on aculeacin. I isolation and characterization of aculeacin A”. *The journal of antibiotics*, 30 (1): 297, 1976.

MORGENSTERN, A.; PAETZ, C.; BEHREND, A.; SPITELLER, D. “Divalent Transition-Metal-Ion Stress Induces Prodigiosin Biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* M145: Formation of Coeligiosins”. *Chemistry A European Journal*, 21 (16): 6027, 2015.

NEUMANN, C. S.; FUJIMORI, D.G.; WALSH, C.T. “Halogenation Strategies In Natural Product Biosynthesis”. *Chemistry & Biology*, 22(2): 99, 2008.

NOZAWA, K.; SEYEA, H.; NAKAJIMA, S.; UDAGAWA, S.; KAWAI, K.”Studies on fungal products. Part 10. Isolation and structures of novel bicoumarins, desertorins A, B and C, from *Emiricella desertorum*”. *Journal of the Chemical Society Perkin Transactions I*, 1735, 1987.

ÖZKAYA, F. C.; EBRAHIM, W.; EL-NEKETI, M.; TANRIKUL, T.; KALSCHUEER, R.; MÜLLERD, W. E.G.; GUOE, Z.; ZOUE, K.; LIUA, Z.; PROKSCHA, P. “Induction of new metabolites from sponge-associated fungus *Aspergillus carneus* by OSMAC approach”. *Fitoterapia*, **131**: 9, 2018.

PAN, R.; BAI, X.; CHEN, J.; ZHANG, H.; WANG, H. “Exploring Structural Diversity of Microbe Secondary Metabolites Using OSMAC Strategy: A literature Review”. *Frontiers in Microbiology*, **10**: 294, 2019.

PATRIDGE, E.; GAREISS, P.; KINCH, M. S.; HOYER, D. “Na analysis od FAD – approved drugs: natural products and their derivaties”. *Drug Discovery Today*, 21 (2): 204, 2016.

PARK, H.E.; JUN, S. C.; HAN, K. H. “Diversity, Application, and Synthetic Biology of Industrially Important *Aspergillus* Fungi”. *Advances in Applied Microbiology*, **100**: 161, 2017.

PETERSEN, L. M.; HOECK, C. FRISVAD, J. C.; GOTFREDSEN, C. H. LARSEN, T. O. “Dereplication Guided Discovery of Secondary Metabolites of Mixed Biosynthetic Origin from *Aspergillus aculeatus*”. *Molecules*, 19(8) 10898, 2014.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. *Aspergillus* and related teleomorphs. *Food Spoilage Microorganisms*, Springer, 2009. p.145.

REEN, F. J.; ROMANO, S.; DOBSON, A. D. W.; O’GARA, F. “The Sound of Silence: Activating Silent Biosynthetic Gene Clusters in Marine Microorganisms”. *Marine Drugs*, 13 (8): 4754, 2015.

ROKAS, A.; MEAD, M. E.; STEENWYK, J. L.; RAJA, H. A.; OBERLIES, N. H. “Biosynthetic gene clusters and the Evolution of fungal chemodiversity”. *Natural Product Report*, 2019.

ROMANO, S.; JACKSON, S. A.; PATRY, S.; DOBSON, A. D. W. “Extending the “One Strain Many Compounds” (OSMAC) Principle to Marine Microorganisms”. *Marine Drugs*, **16**: 244, 2018.

ROMSDAHL, J.; WANG, C. C. C. “Recent advances in the genome mining of *Aspergillus* secondary metabolites (covering 2012– 2018)”. *Medicinal Chemistry Communications*, **10**: 840, 2019.

RUTLEDGE, P. J.; CHALLIS, G. L. “Discovery of microbial natural products by activation of silent biosynthetic gene clusters”. *Nature Reviews Microbiology*, 13(8): 509, 2015.

SANTOS, R. G.; RODRIGUES-FILHO, E. “Endophytic Fungi from *Melia azedarach*”. *World journal of Microbiology and Biotechnology*, 19(8):767, 2003.

SHEN, B. “A New Golden Age of Natural Products Drug Discovery”. *Cell*, 163 (3): 1297, 2015.

SILVA, J. V. Estudo de alterações metabólicas nos fungos endofíticos *Penicillium brasilianum* e *Penicillium griseoroseum*. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2011. Dissertação de mestrado, 142 p.

SILVA, J. V.; FILL, T. P.; LOTUFO, L. V.; PESSOA, C. O.; FILHO RODRIGUES, E. “Biosynthesis of Bromoroquefortines in a High Saline Medium

by *Penicillium chrysogenum*, a Terrestrial Endophyte Collected from *Coffea arabica*". *Helvetica Chemical Acta*, **97**(10): 1345, 2014.

STOTHERS, J. B.;STOESSL, A. "Confirmation of the palyketide origin of kotanin by incorporation of [1,2-¹³C₂]acetate^{1,2}". *Canadian Journal of Chemistry*, **66**(11): 2816, 1988.

SURERAM, S.; KESORNPUN, C.; MAHIDOL, C. RUCHIRAWAT, S. KITTAKOOP, P. "Directed biosynthesis through biohalogenation of secondary metabolites of the marine-derived fungus *Aspergillus unguis*". *RSC Advance*, **3**: 1781, 2013.

TANAKA, H.; WANG, P.; YAMADA, O.; TAMURA, T. "Yellow pigments of *Aspergillus niger* and *Asp. Awamori*. Part I. Isolation of aurasperone A and related pigments". *Agricultural and Biological Chemistry*, **30**: 1, 1984.

TSUYUKI, R.; YOSHINARI, T.; SAKAMOTO, N.; NAGASAWA, H.; SAKUDA, S. "Enhancement of Trichothecene Production in *Fusarium graminearum* by Cobalt Chloride". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **59**: 1760, 2011.

XIAO, Z. E.; LIN, S. E.; TAN, C.; LU, Y.; HE, L.; HUANG, X.; SHE, Z. "Asperlones A and B, dinaphthalenone derivatives from a mangrove endophytic fungus *Aspergillus* sp. 16-5C". *Marine drugs*, **13**(1), 366, 2015.

XU, J.; EBADA, S. S.; PROKSCH, P. "*Pestalotiopsis* a highly creative genus: chemistry and bioactivity of secondary metabolites". *Fungal Diversity*, **44**:15, 2010.

YE, Y. H. ZHU, H. L. SONG, Y. C. LIU, J. Y. TAN, R. X. "Structural Revision of Aspernigrin A, Reisolated from *Cladosporium herbarum* IFB-E002". *Journal of Natural Product*, **68**:1106, 2005.

YOSHIDA, TADASHI et al. Aldose reductase inhibitor. Depositante: Kato Toshiyuk. 93102793.2. Depósito: 23 fev. 1993. Concessão: 01 Set. 1993.

