

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

APLICAÇÃO DE LC-SPE/NMR NA
CARACTERIZAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS ISOLADAS
DE CULTIVOS DA BACTÉRIA MARINHA
Streptomyces cebimarensis SS99BA-2.

Sérgio Scherrer Thomasi*

Tese apresentada como parte dos requisitos
para obtenção do título de DOUTOR EM
CIÊNCIAS, área de concentração: QUÍMICA
ORGÂNICA.

Orientador: Prof. Dr. Tiago Venâncio

*** bolsista CAPES**

**São Carlos - SP
2014**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

T463ac

Thomasi, Sérgio Scherrer.

Aplicação de LC-SPE/NMR na caracterização de substâncias isoladas de cultivos da bactéria marinha *Streptomyces cebimarensis* SS99BA-2 / Sérgio Scherrer Thomasi. -- São Carlos : UFSCar, 2014.
193 p.

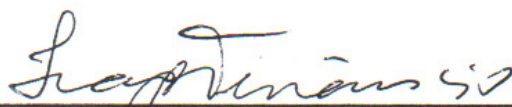
Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2014.

1. Química orgânica. 2. *Streptomyces*. 3. LC-SPE/NMR.
4. Metabólitos secundários. I. Título.

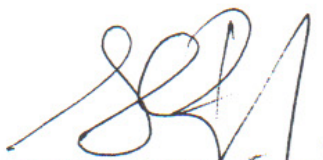
CDD: 547 (20^a)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Departamento de Química
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
Curso de Doutorado

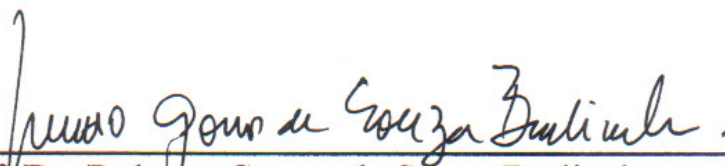
*Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a defesa de tese de doutorado do candidato **Sérgio Scherrer Thomasi**, realizada em 21 de março de 2014:*



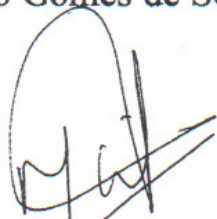
Prof. Dr. Tiago Venâncio



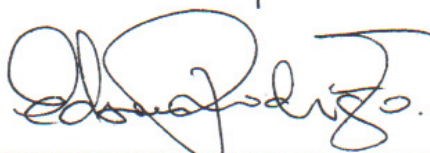
Prof. Dr. Alberto Colli Badino Junior



Prof. Dr. Roberto Gomes de Souza Berlinck



Profa. Dra. Mônica Tallarico Pupo



Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho

“É fácil ser sábio depois que o fato já aconteceu, muito mais difícil enquanto está acontecendo...”

Wallace Steg

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela presença constante em minha vida.

Aos meus pais, Lilo e Noemi, dois excelentes professores.

Ao professor Dr. Tiago Venâncio pela orientação, pela disposição em ajudar sempre e pela amizade durante esses quatro anos.

A professora Dra. Maria da Paz Lima e aos professores Dr. Antonio Gilberto Ferreira e Dr. Alberto Colli Badino Jr. pelo apoio constante.

Aos professores Dr. Daniel Rodrigues Cardoso (IQSC-USP), Dr. Edson Rodrigues Filho (DQ-UFSCar), Dra. Ana Cláudia Malpass e aos pesquisadores Dr. Eduardo Sanchez Pereira do Nascimento e Dra. Liene Dhooghe pelo auxílio na parte experimental.

A Giovana, por toda paciência, compreensão e por ser a pessoa maravilhosa que é.

A toda minha família: irmão, tios, tias, primos, primas e minhas avós, por estarem sempre perto, mesmo de muito longe.

Aos amigos de laboratório pelos ensinamentos, discussões e muitos agradáveis momentos de descontração.

Aos amigos de Linhares/ES, de Viçosa/MG e de São Carlos/SP.

A CAPES, FAPESP e INCT-CBIP pelo auxílio financeiro.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACE	Automatic Cartridges Exchanger
ADP	Adenosil difosfato
AQ	Tempo de aquisição
AQ-F1	Tempo de aquisição no domínio indireto
AQ-F2	Tempo de aquisição no domínio direto
ATMA	Automatic Tuning e Matching
ATP	Adenosil trifosfato
BSFU-HP	Bruker Stopped Flow Unit – High Performance
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CN	Cianopropil
d1	Tempo de relaxação.
DAD	Diode Array Detector
EFS	Extração em Fase Sólida
EM	Espectometria de Massa
F1	Domínio de tempo indireto
F2	Domínio direto
gCOSY	Correlation Spectroscopy
gHMBC	Heteronuclear Multiple-Bond Correlation
gHSQC	Heteronuclear Single-Quantum Coherence
GP	General Phase
HD	High Density
HPD	High Pressure Dispenser
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HSCoA	Coenzima A

Me₂SO-<i>d</i>₆	Dimetilsulfóxido deuterado
MeOH-<i>d</i>₄	Metanol deuterado
MS	Mass Spectrometry
NADH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido
NAD⁺	Dinucleótido de nicotinamida e adenina oxidado
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
ns	Número de promediações
p1 – ¹³C	Duração do pulso de 90° ¹³ C
p1 ¹H	Duração do pulso de 90° ¹ H
PSNR	Peptídeo sintetase não ribossomal
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
S.A.M.	S-adenosilmetionina
SH	Strong Hydrophobic
sp.	Espécie
SPE	Solid Phase Extraction
SW	Janela espectral
SW1	Janela espectral do domínio indireto
SW2	Janela espectral do domínio direto
tr	Tempo de retenção
TD	Número de pontos
TDF1	Número de pontos do domínio de tempo indireto
TDF2	Número de pontos do domínio de tempo direto
TFA	Trifluor Acetic Acid (Ácido Trifluoracético)
UV- DAD	Detector Ultravioleta com Arranjo de Diodos

LISTA DE TABELAS

TABELA 3.1	Fases estacionárias disponíveis no cartuchos Hysphere™.....	37
TABELA 3.2	Parâmetros de aquisição dos espectros de RMN.....	40
TABELA 4.1	Resultado dos bioensaios de atividade com os extratos obtidos a partir do micro-organismo <i>S. cebimarensis</i> SS99BA-2	44
TABELA 4.2	Ensaio de atividade citotóxica com os extratos obtidos a partir do micro-organismo <i>S. cebimarensis</i> SS99BA-2.....	45
TABELA 4.3	Dados espectroscópicos para os compostos majoritários das frações AE1SH, AE2SH, AE3SH, AE4SH e AE7SH.....	51
TABELA 4.4	Dados espectroscópicos para o composto majoritário da fração AE10GP (^{13}C , 150MHz; ^1H , 600 MHz, 500 μg em 250 μL de MeOH- d_4).....	63
TABELA 4.5	Dados espectroscópicos para o composto majoritário da fração AE11GP (^{13}C , 150MHz; ^1H , 600 MHz, 300 μg em 250 μL de MeOH- d_4).....	70
TABELA 4.6	Dados espectroscópicos para o composto majoritário da fração AE12GP (^{13}C , 150 MHz; ^1H , 600 MHz, 300 μg em 250 μL de MeOH- d_4).....	77
TABELA 4.7	Dados espectroscópicos para o composto majoritário da fração AE13GP (^{13}C , 150 MHz; ^1H , 600 MHz, 200 μg em 250 μL de MeOH- d_4).....	85
TABELA 4.8	Estruturas e nomenclatura dos compostos pirazinônicos identificados.....	86
TABELA 4.9	Dados espectroscópicos para o composto majoritário da fração AE8GP (^{13}C , 150 MHz; ^1H , 600 MHz, 300 μg em 250 μL de MeOH- d_4).....	96
TABELA 4.10	Integração dos sinais selecionados (círculo vermelho) na FIGURA 4.86.....	98
TABELA 4.11	Dados espectroscópicos para o composto majoritário da fração AE9GP (^{13}C , 150 MHz; ^1H , 600 MHz, 200 μg em 250 μL de MeOH- d_4).....	100

TABELA 4.12	Dados espectroscópicos para o composto majoritário da fração B1SH, 2-acetil-3-hidróxifuran-3-O- α -D-glicopiranosídeo (^{13}C , 150 MHz; ^1H , 600 MHz, 100 μg em 250 μL de $\text{MeOH-}d_4$).....	117
TABELA 4.13	Dados espectroscópicos para o composto majoritário da fração B5GP (^{13}C , 150MHz; ^1H , 600 MHz, 200 μg em 250 μL de $\text{MeOH-}d_4$).....	131
TABELA 4.14	Dados espectroscópicos para o composto majoritário da fração B7bGP (^{13}C , 150MHz; ^1H , 600 MHz, 500 μg em 250 μL de $\text{MeOH-}d_4$).....	137
TABELA 4.15	Dados espectroscópicos para o composto majoritário da fração B7aGP (^{13}C , 150MHz; ^1H , 600 MHz, 300 μg em 250 μL de $\text{MeOH-}d_4$).....	150
TABELA 4.16	Estruturas e nomenclatura dos policetídeos identificados.....	157
TABELA 4.17	Dados espectroscópicos para o composto majoritário da fração NB6 desidróxinocardamina (^{13}C , 150MHz; ^1H , 600 MHz, 300 μg em 250 μL de $\text{MeOH-}d_4$).....	172
TABELA 4.18	Dados espectroscópicos para o composto majoritário da fração NB7, nocardamina (^{13}C , 150MHz; ^1H , 600 MHz, 600 μg em 250 μL de $\text{MeOH-}d_4$).....	178

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1	Estruturas dos compostos (1) – (8).....	3
FIGURA 1.2	Estruturas dos compostos (9) – (21).....	5
FIGURA 1.3	Estruturas dos compostos (22) – (25).....	7
FIGURA 1.4	Estruturas dos compostos (26) – (31).....	8
FIGURA 1.5	Estruturas dos compostos (32) – (37).....	9
FIGURA 1.6	(a) Reação geral de acoplamento entre aminoácidos para formar dicetopiperazinas. (b) Reação geral de acoplamento entre aminoácidos para formar pirazin-2(1 <i>H</i>)-onas dissustituídas. (c) Substituição eletrofílica aromática levando à pirazin-2(1 <i>H</i>)-onas trissustituídas.....	11
FIGURA 1.7	Estruturas dos compostos (38) – (47).....	12
FIGURA 1.8	Rota biossintética para o composto Aureosimine A (47).....	15
FIGURA 1.9	Estrutura dos compostos (48) – (52).....	16
FIGURA 1.10	Fórmula estrutural do ácido 5-amino-salicílico (A) e da impureza N1 (B).....	21
FIGURA 1.11	Fórmula estrutural do icofungipen (A) e da impureza A1 (B)..	22
FIGURA 3.1	Cultivo em mesa incubadora rotativa.....	32
FIGURA 3.2	Fases do cultivo em mesa incubadora rotativa.....	32
FIGURA 3.3	Fluxograma de extração do caldo de cultivo da bactéria <i>Streptomyces cebimarensis</i> SS99BA-2.....	33
FIGURA 3.4	Sistema HPLC-SPE do laboratório de RMN / Departamento de Química – UFSCar.....	34
FIGURA 3.5	Visão da unidade Prospekt 2.....	35
FIGURA 3.6	Ponto de Interseção do fluxo da bomba quaternária e bomba <i>Knauer</i>	36
FIGURA 3.7	Visão interna da unidade A.C.E. (<i>Automated Cartridges Exchanger</i>).....	38
FIGURA 3.8	Braço mecânico em operação.....	38
FIGURA 3.9	Interface do Software <i>Hystar</i> 2.3 para controle do sistema acoplado LC-SPE.....	39
FIGURA 4.1	Cromatograma (λ 254) do extrato acetato de etila (EA) do caldo de fermentação da bactéria <i>S. cebimarensis</i> SS99BA-2. Eluente A (H ₂ O mili Q) e eluente B (Acetonitrila). Eluição isocrática nos 5 minutos iniciais (5% de B / 95% de A), eluição gradiente 5-100% de B durante 45 minutos.....	46

FIGURA 4.2	Cromatograma ($\lambda 254$) do extrato acetato de etila (EA) do caldo de fermentação da bactéria <i>S. cebimarensis</i> SS99BA-2. Eluente A (H_2O mili-Q, 0,05% de TFA) e eluente B (Metanol, 0,05% de TFA). Eluição isocrática nos 5 minutos iniciais (5% de B / 95% de A), eluição gradiente 5-100% de B durante 45 minutos.....	47
FIGURA 4.3	Cromatograma ($\lambda 254$) do extrato acetato de etila (EA) do caldo de fermentação da bactéria <i>S. cebimarensis</i> SS99BA-2. Modificador orgânico = Metanol, 0,05% de TFA.....	48
FIGURA 4.4	Cromatograma otimizado ($\lambda 200$) do extrato acetato de etila (EA) do caldo de fermentação da bactéria <i>S. cebimarensis</i> SS99BA-2, compostos com menores fatores de retenção (k). Modificador orgânico = Metanol, 0,05% de TFA.....	49
FIGURA 4.5	Espectros de RMN de 1H para as frações AE1C18, AE2C18, AE3C18, AE4C18, AE5C18, AE6C18 e AE7C18. ns = 32.....	50
FIGURA 4.6	Cromatograma otimizado ($\lambda 300$) do extrato acetato de etila (EA) do caldo de fermentação da bactéria <i>S. cebimarensis</i> SS99BA-2, compostos com fatores de retenção (k) médio. Eluente A (H_2O mili-Q, 0,05% de TFA) e eluente B (Metanol, 0,05% de TFA). Eluição isocrática nos 5 minutos iniciais (20% de B / 70% de A), eluição gradiente 20 – 70% de B durante 40 minutos.....	54
FIGURA 4.7	Espectro de massa (<i>Full scan</i>) via <i>Electrospray</i> modo positivo para fração AE10GP.....	55
FIGURA 4.8	HRMS, modo negativo de ionização ESI – Fração AE10GP.....	55
FIGURA 4.9	Espectro de RMN de 1H da fração AE10GP, 500 μg em 250 μL de $MeOH-d_4$	56
FIGURA 4.10	Mapa de contorno gCOSY da fração AE10GP.....	57
FIGURA 4.11	Subestruturas identificadas com os dados apresentados até o momento. Os valores em vermelho são os deslocamentos químicos (em ppm) de RMN de 1H e em azul, RMN de ^{13}C	58
FIGURA 4.12	Mapa de contorno gHSQC da fração AE10GP.....	58
FIGURA 4.13	Mapa de contorno gHMBC da fração AE10GP.....	59
FIGURA 4.14	Subestruturas identificadas a partir das análises do espectro de gHMBC.....	60
FIGURA 4.15	Espectro de ^{13}C da fração AE10GP. ns= 92K, td= 32K, sw= 238,8 ppm, aq=0,45 s e d1= 0,20 s.....	61
FIGURA 4.16	Mapa de contorno HMBC 1H - ^{15}N da fração AE10GP.....	62
FIGURA 4.17	Correlações HMBC 1H - ^{15}N observadas.....	62

FIGURA 4.18	Fórmula estrutural do composto presente em maior quantidade na fração AE10GP.....	63
FIGURA 4.19	Espectro de fragmentação do íon $[M+H]^+$ m/z 239,2 em MS^2	64
FIGURA 4.20	Fragmentação em MS^3 do íon m/z 221,2.....	64
FIGURA 4.21	(A) Espectro de Massas (<i>Full scan</i>) via <i>Electrospray</i> modo positivo (B) HRMS, modo negativo – Fração AE11GP.....	65
FIGURA 4.22	Espectro de RMN de 1H da fração AE11GP, 300 μg em 250 μL de MeOH- d_4).....	66
FIGURA 4.23	Espectro de RMN de ^{13}C da fração AE11GP. ns= 92K, td= 32K, sw= 238,8 ppm, aq=0,45 s e d1= 0,20 s.....	67
FIGURA 4.24	Mapa de contorno gHSQC para o pico AE11GP.....	68
FIGURA 4.25	Mapa de contorno gHMBC para o pico AE11GP.....	69
FIGURA 4.26	Principais correlações gHMBC e proposta estrutural para o composto presente em maior quantidade na fração AE11GP.....	69
FIGURA 4.27	Espectro de fragmentação do íon $[M+H]^+$ m/z 209,2 em MS^2	70
FIGURA 4.28	Fragmentação em MS^3 do íon m/z 191,2.....	71
FIGURA 4.29	Espectro de massa (<i>Full scan</i>) via <i>Electrospray</i> modo positivo para a fração AE12GP.....	72
FIGURA 4.30	HRMS, modo negativo de ionização ESI – Fração AE12GP.....	72
FIGURA 4.31	Espectro de RMN de 1H da fração AE12GP, 300 μg em 250 μL de MeOH- d_4 . * - Impurezas.....	73
FIGURA 4.32	Espectro de RMN de ^{13}C da fração AE12GP. ns= 92K, td= 32K, sw= 238,8 ppm, aq=0,45 s e d1= 0,20 s. * - Impurezas.....	74
FIGURA 4.33	Mapa de contorno gHSQC da fração AE12GP.....	75
FIGURA 4.34	Mapa de contorno gHMBC da fração AE12GP.....	76
FIGURA 4.35	Principais correlações gHMBC e proposta estrutural para o composto presente em maior quantidade na fração AE12GP.....	76
FIGURA 4.36	Espectro de fragmentação do íon $[M+H]^+$ m/z 223,2 em MS^2	77
FIGURA 4.37	Fragmentação em MS^3 do íon m/z 205,3.....	78
FIGURA 4.38	HRMS, modo negativo de ionização ESI – Fração AE12GP.....	78
FIGURA 4.39	Espectro de RMN de 1H da fração AE13GP, 200 μg em 250 μL de MeOH- d_4).....	80

FIGURA 4.40	Espectro de RMN de ^{13}C da fração AE13GP. ns = 92K, td = 32K, sw = 238,8 ppm, aq = 0,45 s e d1 = 0,20 s.....	81
FIGURA 4.41	Mapa de contorno gCOSY da fração AE13GP.....	82
FIGURA 4.42	Mapa de contorno gHSQC da fração AE13GP.....	83
FIGURA 4.43	Mapa de contorno gHMBC da fração AE13GP.....	84
FIGURA 4.44	Fórmula estrutural do composto presente em maior quantidade na fração AE13GP.....	85
FIGURA 4.45	Retrobiogênese do composto giovaninona A.....	87
FIGURA 4.46	Proposta biogenética para giovaninona A.....	88
FIGURA 4.47	Proposta biogenética para os compostos giovaninonas B, C e D.....	89
FIGURA 4.48	HRMS, modo positivo – Fração AE8GP.....	90
FIGURA 4.49	Espectro de RMN de ^1H da fração AE8GP, 300 μg em 250 μL de $\text{MeOH-}d_4$).....	91
FIGURA 4.50	Mapa de contorno gCOSY da fração AE8GP.....	92
FIGURA 4.51	Mapa de contorno gHSQC da fração AE8GP.....	93
FIGURA 4.52	Mapa de contorno gHMBC da fração AE8GP.....	94
FIGURA 4.53	Espectro de massa da fração AE6GP em <i>electrospray</i> no modo positivo de ionização. A) espectro de íons totais (<i>Full scan</i>). B) fragmentação do íon $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 239,1 e C) fragmentação em MS^3 do íon de m/z 221,0.....	95
FIGURA 4.54	Proposta estrutural para o composto presente em maior quantidade na fração AE8GP. As setas representam as correlações gHMBC observadas.....	96
FIGURA 4.55	Ampliação da região de hidrogênios olefínicos do espectro de RMN de ^1H da fração AE6GP a diferentes temperaturas.....	98
FIGURA 4.56	Representação das duas conformações possíveis para o composto giovaninona A. Os deslocamentos químicos em vermelhos são ressonância de hidrogênio e os deslocamentos químicos em azul são ressonância de carbono.....	99
FIGURA 4.57	Representação das duas conformações possíveis para o composto giovaninona C. Os deslocamentos químicos em vermelhos são ressonância de hidrogênio e os deslocamentos químicos em azul são ressonância de carbono.....	100
FIGURA 4.58	HRMS, modo positivo – Fração AE9GP.....	101
FIGURA 4.59	Espectro de RMN de ^1H da fração AE9GP, 200 μg em 250 μL de $\text{MeOH-}d_4$	101
FIGURA 4.60	Mapa de contorno gCOSY da fração AE9GP.....	102

FIGURA 4.61	Mapa de contorno gHSQC da fração AE9GP.....	103
FIGURA 4.62	Mapa de contorno gHMBC da fração AE9GP.....	104
FIGURA 4.63	Espectro de massa da fração AE9GP em <i>electrospray</i> no modo positivo de ionização. A) espectro de íons totais (<i>Full scan</i>). B) fragmentação do íon $[M+H]^+$ m/z 223,0 e C) fragmentação em MS ³ do íon de m/z 205,0.....	105
FIGURA 4.64	Cromatograma otimizado (λ 300) do extrato acetato de etila (EA) do caldo de fermentação da bactéria <i>S. cebimarensis</i> SS99BA-2, compostos com fatores de retenção (k) médio. Modificador orgânico = Metanol, 0,05% de TFA. Estruturas pirazinônicas identificadas.....	106
FIGURA 4.65	Cromatograma (λ 254) do extrato butanólico (EB) do caldo de fermentação da bactéria <i>S. cebimarensis</i> SS99BA-2. Eluente A (H ₂ O mili Q), eluente B (Metanol). Eluição isocrática nos 5 minutos iniciais (5% de B / 95% de A), eluição gradiente 5-100 % de B durante 60 minutos.....	107
FIGURA 4.66	Cromatograma (λ 235) do extrato butanólico (EB) do caldo de fermentação da bactéria <i>S. cebimarensis</i> SS99BA-2. Modificador orgânico = Eluente A (H ₂ O mili-Q, 0,05% de TFA) e eluente B (Metanol, 0,05% de TFA). Eluição isocrática nos 5 minutos iniciais (5% de B / 95% de A), eluição gradiente 5-100 % de B durante 60 minutos.....	108
FIGURA 4.67	Cromatograma otimizado (λ 254) do extrato butanólico (EB) do caldo de fermentação da bactéria <i>S. cebimarensis</i> SS99BA-2, compostos com menores fatores de retenção (k). Eluente A (H ₂ O mili Q, 0,05% de TFA), eluente B (Metanol, 0,05% de TFA). Eluição isocrática nos 5 minutos iniciais (5% de B / 95% de A), eluição gradiente 5-30 % de B durante 10 minutos.....	109
FIGURA 4.68	Espectro de ¹ H do pico B1SH. Linha preta – sem adição de ácido. Linha azul – com adição de ácido. ns = 32.....	110
FIGURA 4.69	Espectro de ¹ H do pico B2SH. Linha preta – sem adição de ácido. Linha azul – com adição de ácido. ns = 32.....	111
FIGURA 4.70	Espectro de ¹ H do pico B3SH. Linha azul – sem adição de ácido. Linha preta – com adição de ácido. ns = 32.....	111
FIGURA 4.71	Espectro de RMN de ¹ H da fração B1SH, 100 μ g em 250 μ L de MeOH- <i>d</i> ₄ . * - Impurezas.....	113
FIGURA 4.72	A - Mapa de contorno gCOSY da fração B1SH. B – Ampliação da região entre δ H 3,00 e 6,00 ppm, com ampliação de simetria (<i>sym</i>) no espectro.....	114
FIGURA 4.73	Mapa de contorno de gHSQC da fração B1SH.....	115
FIGURA 4.74	Mapa de contorno de gHMBC da fração B1SH.....	116

FIGURA 4.75	Espectro de RMN de ^1H da fração B2SH. Maltol.....	118
FIGURA 4.76	Espectro de RMN de ^1H da fração B3SH. Ácido <i>p</i> -hidróxibenzóico.....	119
FIGURA 4.77	Cromatograma otimizado ($\lambda 210$) do extrato butanólico (EB) do caldo de fermentação da bactéria <i>S. cebimarensis</i> SS99BA-2, compostos com maiores fatores de retenção (k). Eluente A (H_2O mili Q, 0,05% de TFA), eluente B (Metanol, 0,05% de TFA). Eluição isocrática nos 5 minutos iniciais (35% de B / 65% de A), eluição gradiente 35-53 % de B durante 10 minutos, eluição gradiente 53-100 % de B durante 10 minutos.....	120
FIGURA 4.78	Espectro de RMN de ^1H da fração B4GP. Giovaninona A.....	122
FIGURA 4.79	HRMS, modo positivo – Fração B5GP.....	123
FIGURA 4.80	Espectro de RMN de ^1H da fração B5GP.*-Sinais suprimidos pela sequência de dupla pré-saturação lc1pnf2. (Pser) – fenil-serina. (Cap) – capreomicidina. (Thr A) – treonina A. (Thr B) – treonina B. (Val) – Valina.....	124
FIGURA 4.81	A - Espectro de $g\text{COSY}$ da fração B5GP. B – Ampliação da região próxima à supressão do sinal (δH 4,98 ppm), nível de corte baixo e aplicação de simetrização (<i>sym</i>) no espectro..	125
FIGURA 4.82	Espectro de $g\text{HSQC}$ da fração B5GP, 200 μg em 250 μL de $\text{MeOH-}d_4$. (Pser) – fenil-serina. (Cap) – capreomicidina. (Thr A)– treonina A. (Thr B) – treonina B. (Val) – Valina. (Leu) – leucina.....	126
FIGURA 4.83	Fragmentos de peptídeos identificados a partir da análise principalmente dos espectros de RMN de ^1H , $g\text{COSY}$ e $g\text{HSQC}$. As setas representam as correlações $g\text{HMBC}$ observadas de alguns hidrogênios. Os valores em vermelho são os deslocamentos químicos (em ppm) de RMN de ^1H e em azul, RMN de ^{13}C	127
FIGURA 4.84	Mapa de contorno $g\text{HMBC}$ da fração B5GP.....	128
FIGURA 4.85	Uma das propostas possíveis para a estrutura do composto presente em maior quantidade na fração B5GP.....	130
FIGURA 4.86	Fórmula estrutural da Gymnangiamide (MILANOWSKI et al., 2003.).....	132
FIGURA 4.87	Espectro de RMN de ^1H da fração B6GP. Giovaninona C. * - Impureza (etanol) no solvente deuterado – $\text{MeOD-}d_4$	133
FIGURA 4.88	Espectro de RMN de ^1H da fração B7GP.....	134
FIGURA 4.89	Cromatograma ($\lambda 230$) do extrato butanólico (EB) do caldo de fermentação da bactéria <i>S. cebimarensis</i> SS99BA-2. Resolução da fração B7GP. Eluente A (H_2O mili Q, 0,05% de TFA), eluente B (Acetonitrila, 0,05% de TFA). Eluição isocrática nos 5 minutos iniciais (50% de B / 50% de A), eluição gradiente 50-60 % de B durante 2 minutos.....	135

FIGURA 4.90	Espectro de Massa (<i>Full scan</i>) via <i>Electrospray</i> modo negativo para fração B7bGP.....	136
FIGURA 4.91	Subestrutura A. As setas representam as correlações gHMBC principais que levaram à proposta estrutural.....	138
FIGURA 4.92	Subestrutura B. As setas representam as correlações gHMBC principais que levaram à proposta estrutural.....	139
FIGURA 4.93	Fórmula estrutural do composto presente em maior quantidade na fração B7bGP.....	140
FIGURA 4.94	Atribuição da configuração relativa e absoluta através das constantes de acoplamento obtidas por espectroscopia de RMN de ¹ H.....	141
FIGURA 4.95	Acoplamentos observados de H10 com outros núcleos.....	141
FIGURA 4.96	Simulação do sinal de H10 através do programa computacional <i>NMR Simulator</i> – (CASTILLO et al., 2010). * Sobreposição parcial com o sinal de H18.....	142
FIGURA 4.97	Fórmula estrutural do composto presente em maior quantidade na fração B7bGP com a atribuição das configurações absolutas dos centros estereogênicos a partir da análise de configuração relativa.....	143
FIGURA 4.98	Fragmentação em MS ² do íon [M-H] ⁻ m/z 443,6.....	143
FIGURA 4.99	Espectro de RMN de ¹ H da fração B7bGP, 500 µg em 250 µL de MeOH- <i>d</i> ₄ . * - Impurezas.....	144
FIGURA 4.100	Espectro de ¹³ C do pico B7bGP. ns= 92K, td= 32K, sw= 238,8 ppm, aq=0,45 s e d1= 0,20 s. * - Impurezas.....	145
FIGURA 4.101	Mapa de contorno gCOSY da fração B7bGP.....	146
FIGURA 4.102	Mapa de contorno gHSQC da fração B7bGP.....	147
FIGURA 4.103	Mapa de contorno gHMBC da fração B7bGP.....	148
FIGURA 4.104	Espectro de Massa (<i>Full scan</i>) via <i>Electrospray</i> modo negativo para fração B7aGP.....	149
FIGURA 4.105	Fragmento da estrutura que contém a diferença entre as substâncias identificadas nas frações B7aGP e B7bGP.....	151
FIGURA 4.106	Fórmula estrutural do composto presente em maior quantidade na fração B7aGP.....	151
FIGURA 4.107	Espectro de RMN de ¹ H fração B7aGP, 300 µg em 250 µL de MeOH- <i>d</i> ₄ . * - Impurezas.....	152
FIGURA 4.108	Espectro de RMN de ¹³ C da fração B7aGP. ns= 92K, td= 32K, sw= 238,8 ppm, aq=0,45 s e d1= 0,20 s. * - deslocamento determinado por gHSQC e gHMBC.....	153
FIGURA 4.109	Mapa de contorno gCOSY da fração B7aGP.....	154
FIGURA 4.110	Mapa de contorno gHSQC da fração B7aGP.....	155

FIGURA 4.111	Mapa de contorno gHMBC da fração B7aGP.....	156
FIGURA 4.112	Fórmulas estruturais do policetídeos naturais produzidos por <i>Streptomyces</i> sp.....	157
FIGURA 4.113	Retrobiogênese do composto thomasicina A. o. = carbono oxidado; n.o. = carbono não oxidado.....	158
FIGURA 4.114	Proposta biogenética para formação dos compostos thomasicina A e B.....	159
FIGURA 4.115	Cromatograma (λ 254) do extrato butanólico (B) do caldo de fermentação da bactéria <i>S. cebimarensis</i> SS99BA-2. <i>Time-slice</i> . Eluente A (H ₂ O mili Q) e o eluente B (Metanol). Eluição isocrática nos 3 minutos iniciais (30% de B / 70% de A), eluição gradiente 30-80 % de B durante 23 minutos.....	161
FIGURA 4.116	Cromatograma (λ 210) do extrato aquoso (A) do caldo de fermentação da bactéria <i>S. cebimarensis</i> SS99BA-2 com as estruturas das substâncias identificadas por espectro de RMN de ¹ H. Eluente A (H ₂ O mili Q, 0,05% de TFA), eluente B (Metanol, 0,05% de TFA). Eluição isocrática nos 7 minutos iniciais (20% de B / 70% de A), eluição gradiente 20-65 % de B durante 28 minutos.....	163
FIGURA 4.117	Cromatograma (λ 210) do extrato butanólico do novo caldo de fermentação (NB) da bactéria <i>S. cebimarensis</i> SS99BA-2 com as estruturas das substâncias identificadas por espectro de RMN de ¹ H. Eluente A (H ₂ O mili Q, 0,05% de TFA), eluente B (Metanol, 0,05% de TFA). Eluição isocrática nos 5 minutos iniciais (5% de B / 95% de A), eluição gradiente 5-53 % de B durante 17 minutos.....	165
FIGURA 4.118	Espectro de Massa (<i>Full scan</i>) via <i>Electrospray</i> modo positivo para fração NB6.....	166
FIGURA 4.119	Espectro de RMN de ¹ H da fração NB6. * - Impurezas.....	167
FIGURA 4.120	Mapa de contorno gCOSY da fração NB6.....	168
FIGURA 4.121	Mapa de contorno gHSQC da fração NB 6.....	169
FIGURA 4.122	Mapa de contorno gHMBC da fração NB6.....	170
FIGURA 4.123	Fórmula estrutural da desidróxinocardamina.....	171
FIGURA 4.124	Espectro de Massa (<i>Full scan</i>) via <i>Electrospray</i> modo positivo para fração NB7.....	173
FIGURA 4.125	Espectro de RMN de ¹ H da fração NB7.....	174
FIGURA 4.126	Mapa de contorno gCOSY da fração NB7.....	175
FIGURA 4.127	Mapa de contorno gHSQC da fração NB7.....	176
FIGURA 4.128	Mapa de contorno gHMBC da fração NB7.....	177
FIGURA 4.129	Fórmula estrutural da nocardamina.....	178

FIGURA 5.1	Estruturas caracterizadas neste estudo através da técnica hifenada LC-SPE/NMR.....	180
------------	--	-----

RESUMO

APLICAÇÃO DE LC-SPE/NMR NA CARACTERIZAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE CULTIVOS DA BACTÉRIA MARINHA *Streptomyces cebimarensis* SS99BA-2. Micro-organismos marinhos são seres com habilidades extraordinárias, uma vez que apresentam características fisiológicas e metabólicas que lhes permitem sobreviver num ambiente repleto de condições adversas, como alta pressão, salinidade excessiva e temperaturas extremas. Muitos deles também apresentam um grande potencial para a produção de metabólitos que normalmente não podem ser produzidos por bactérias terrestres. Diante disso, o objetivo geral do presente estudo foi elucidar o perfil metabólico de uma linhagem de bactéria isolada de sedimento marinho em São Sebastião, litoral norte do estado de São Paulo, *Streptomyces cebimarensis* SS99BA-2, utilizando a técnica hifenada LC-SPE/NMR. Extratos de acetato de etila e butanólicos dos caldos fermentativos dessa bactéria apresentaram, respectivamente, atividade biológica contra *Escherichia coli* e *Candida albicans* e atividade citotóxica contra células tumorais SF-295 (sistema nervoso central). A otimização da separação cromatográfica, somada à otimização dos parâmetros de retenção por SPE e de aquisição e processamento de RMN, levou à identificação de pelo menos oito substâncias conhecidas sem a necessidade de isolamento de bancada a partir de quantidades muito pequenas, aproximadamente 3 mg, de extratos brutos: maltol, 5-hidroximaltol, ácido 4-hidroxibenzóico, isomaltol, *N*-acetiltiramina, ácido 3-(*N*-morfolino)-propanossulfônico, dehidroxinocardamine e nocardamine, além de seis compostos inéditos na literatura, sendo quatro pertencentes à uma classe rara de metabólitos secundários pirazin-2(1*H*)-ônicos: giovaninona A, giovaninona B, giovaninona C e giovaninona D e dois pertencentes à uma classe de policetídeos fosfatados antitumorais com potencial citotóxico: thomasicina A e thomasicina B. Os resultados mostram que a técnica hifenada LC-SPE/NMR é extremamente valiosa na área de produtos naturais, uma vez que substâncias orgânicas podem ser identificadas de forma rápida, segura e reproduzível. Além disso, verifica-se que a química de micro-organismos marinhos ainda é muito pouco explorada e revela um campo promissor na obtenção de possíveis candidatos a fármacos, uma vez que esses organismos são passíveis de cultivos em larga escala através do uso de bioreatores.

ABSTRACT

LC-SPE/NMR APPLICATION TO THE CHARACTERIZATION OF SUBSTANCES ISOLATED FROM CULTIVATIONS OF THE MARINE BACTERIUM *Streptomyces cebimarensis* SS99BA-2. Marine microorganisms are living beings with extraordinary abilities, once they have developed physiological and metabolic capabilities that allow them to survive in an environment filled with adverse conditions, such as high pressure, excessive salinity and extreme temperatures. Thus, these living beings have great potential for the production of metabolites which normally cannot be produced by soil bacteria. The overall objective of this study was to elucidate the metabolite profile of the bacterium *Streptomyces cebimarensis* SS99BA-2 isolated from marine sediment in São Sebastião, a city located in the northern coast of São Paulo State, using the LC-SPE/NMR hyphenated technology. Ethyl acetate and butanol extracts of bacterial fermentation broths showed, respectively, biological activity against *Escherichia coli* and *Candida albicans*, and cytotoxic activity against tumour cells SF-295 (central nervous system). The optimization of the chromatographic conditions, together with the optimization of parameters for SPE retention, and for NMR acquisition and processing, led to the identification of at least eight known substances. This strategy did not require bench isolation methods, from very small amounts, approximately 3 mg, of crude extracts and permitted to identify: maltol, 5-hydroxymaltol, 4-hydroxybenzoic acid, *N*-acetyltyramine, isomaltol, 3-(*N*)-propanesulfonic acid, dehydroxinocardamine and nocardamine. In addition, six new compounds were isolated, including four belonging to a rare class of pyrazin-2(1*H*)-onic secondary metabolites named: giovaninone A, giovaninone B, giovaninone C and giovaninone D, and two belonging to an extremely cytotoxic class of antitumor phosphated polyketides: thomasicine A and thomasicine B. The results show that the LC-SPE/NMR coupling technology is extremely useful in the natural products field, since organic compounds can be identified in a rapid, safe and reproducible way. Moreover, it can be observed that the chemistry of marine microorganisms is still very little explored and reveal a promising field in the obtaining of potential candidates for pharmaceuticals, since these organisms are able to be cultivated in large scale through the use of bioreactors.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	vi
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS.....	x
RESUMO.....	xix
ABSTRACT	xx
1 - Introdução	2
1.1 - Metabólitos produzidos por bactérias marinhas do gênero <i>Streptomyces</i>	2
1.2 - Produção de pirazin-2(1 <i>H</i>)-onas por micro-organismos	10
1.3 – <i>Streptomyces cebimarensis</i> SS99BA-2	16
1.4 - Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à ressonância magnética nuclear (LC-NMR).....	17
1.4.1 - “ <i>On-flow</i> ” LC-NMR.....	18
1.4.2 - “ <i>Stopped-flow</i> ” LC-NMR	19
1.4.3 - “ <i>Loop storage mode</i> ” LC-NMR	22
1.4.4 - “ <i>CapLC-NMR</i> ”	23
1.4.5 - LC-SPE-NMR.....	24
1.5 - Aumento da sensibilidade na técnica de ressonância magnética nuclear	26
1.6 - Considerações.....	27
2 - Objetivos	37
3 - Materiais e métodos	31
3.1 – Micro-organismo	31
3.2 - Meio de cultura	31
3.3 - Metodologia experimental – cultivos e tratamento do caldo de fermentação.	31
3.4 - Equipamento acoplado HPLC-SPE.	34
3.5 - Equipamento de ressonância magnética nuclear (RMN).....	39
3.6 - Equipamentos de espectrometria de massa	41
3.7 - Materiais e equipamentos gerais	42
4 - Resultados e discussão.....	44
4.1 - Ensaio de atividade biológica e antitumoral	44
4.2 - Análise do extrato de acetato de etila	45
4.2.6 - Fração AE10GP	54

4.2.7 - Fração AE11GP	65
4.2.8 - Fração AE12GP	71
4.2.9 - Fração AE13GP	78
4.2.10 - Nomenclatura e proposta biogenética para as pirazin-2(1 <i>H</i>)-onas inéditas	85
4.2.11 - Fração AE8GP	89
4.2.12 - Fração AE9GP	99
4.3 - Análise do extrato butanólico	107
4.3.1 - Fração B1SH.....	112
4.3.2 - Fração B2SH.....	118
4.3.3 - Fração B3SH.....	119
4.3.4 - Fração B4GP.....	121
4.3.5 - Fração B5GP.....	122
4.3.6 - Fração B6GP.....	132
4.3.7 - Fração B7GP.....	133
4.3.8 - Fração B7bGP.....	136
4.3.9 - Fração B7aGP.....	148
4.3.10 - Nomenclatura e proposta biogenética para os policetídeos fosfatados inéditos	156
4.3.11 - “ <i>Time-slice</i> ” do extrato butanólico	160
4.4 - Análise do extrato aquoso	162
4.5 - Novo cultivo	164
4.5.1 - Fração NB6	166
4.5.2 - Fração NB7	173
5 - Conclusão	180
6 - Referências bibliográficas	184

INTRODUÇÃO

1 - Introdução

1.1 - Metabólitos produzidos por bactérias marinhas do gênero *Streptomyces*

Bactérias da ordem Actinomycetales são habitantes comuns do solo, mas também podem ser encontrados em ambiente aquático e possuem uma grande habilidade em produzir antibióticos e outros metabólitos com atividade biológica. Estima-se que mais de 80% dos antibióticos isolados de micro-organismos são de actinomicetos, e dentre estes muitos são isolados dos gêneros *Streptomyces* (CHALLIS e HOPWOOD, 2003). De forma geral, os actinomicetos são os procariotos mais valiosos do ponto de vista econômico e biotecnológico. Estes são responsáveis pela produção de cerca da metade dos metabólitos secundários bioativos: antibióticos, agentes antitumorais, agentes imunossupressores e enzimas (FENICAL e JENSEN, 2006).

Em se tratando de estreptomicetos marinhos, apesar de seu estudo para a descoberta de novos metabólitos bioativos ainda estar relativamente no início, vários compostos novos têm sido isolados nos últimos anos. MITCHELL et al. (2004) realizaram um programa de seleção destinada a descobrir novos agentes anti-infecciosos a partir de micro-organismos marinhos, utilizando uma cepa de *Streptomyces aureoverticillatus* (NPS001583) isolado de um sedimento marinho. Foi elucidada a estrutura de um macrocíclico lactâmico chamado de aureoverticillactam [FIGURA 1.3 – (1)], com citotoxicidade contra várias linhagens de células tumorais, utilizando espectrometria de massa, UV e RMN.

As substâncias chinikomycin A [FIGURA 1.1 – (2)] e chinikomycin B (a forma quinona da chinikomycin A) foram isolados de *Streptomyces* sp. (M045) derivados de sedimentos da Baía de Kiauchau na China (LI et al., 2005). As suas estruturas foram elucidadas através de uma interpretação detalhada de seus espectros, principalmente por RMN uni e bidimensional. Os compostos mostraram atividade antitumoral moderada. A chinikomycin A inibiu seletivamente a proliferação em linhagens de células de câncer mamário MAXF 401NL (IC₅₀ de 2,41 mg.mL⁻¹), melanoma MEXF 462NL (IC₅₀ de 4,15 mg.mL⁻¹), e cancro renal RXF 944L (IC₅₀ de 4,02 mg.mL⁻¹). Enquanto a chinikomycin B mostrou atividade antitumoral seletiva contra o câncer de mama linhagem celular MAXF 401NL (IC₅₀ de 3,04 mg.mL⁻¹).

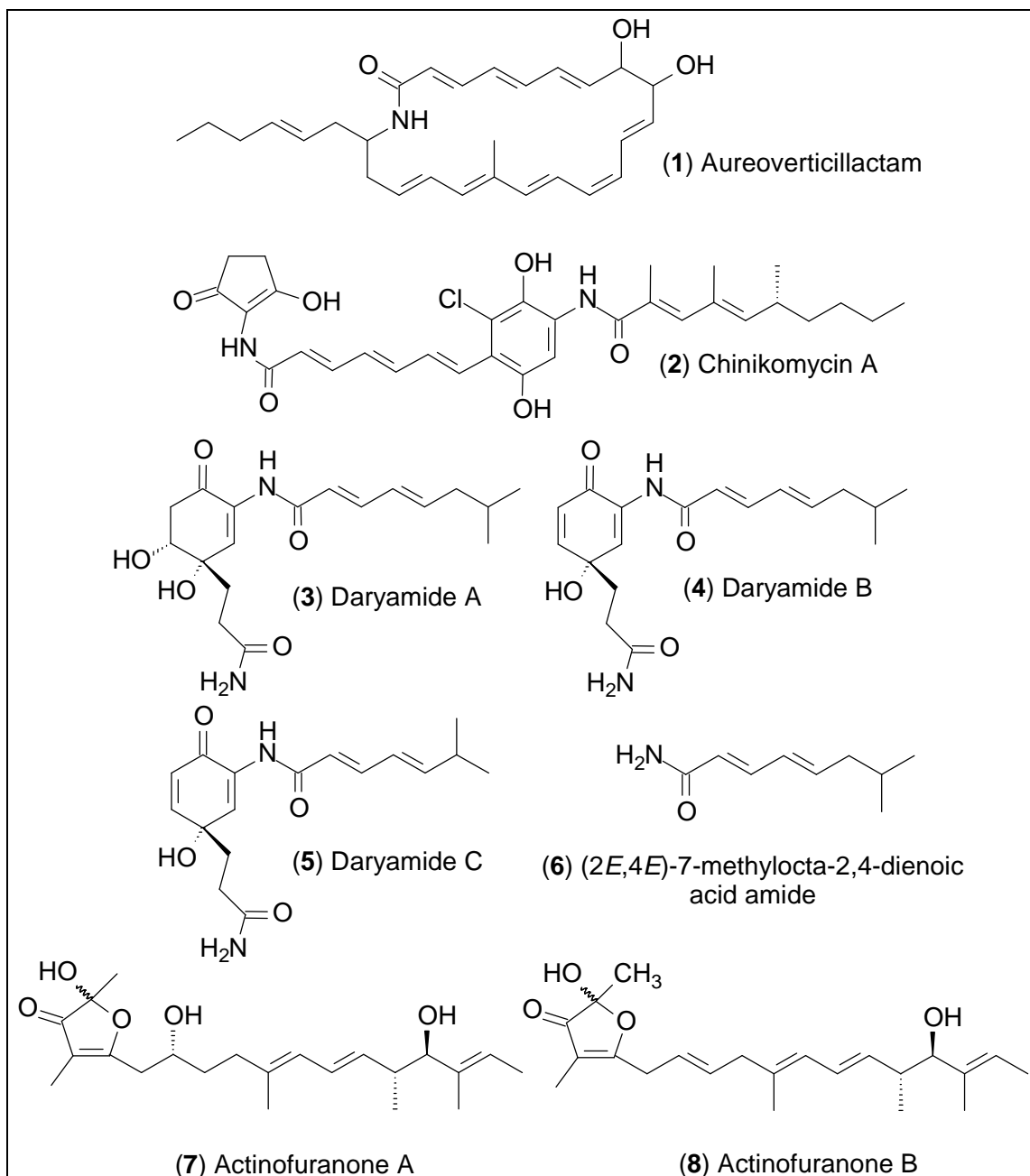


FIGURA 1.1 - Estruturas dos compostos (1) – (8).

Quatro novos compostos citotóxicos foram isolados a partir de *Streptomyces sp* (CNQ-085) obtidas de sedimentos marinhos coletados em uma profundidade de 50 m ao largo da costa de San Diego, Califórnia: Daryamides A, B e C e (2E,4E)-7-methylocta-2,4-dienoic acid amide [FIGURA 1.1 – (3), (4), (5) e (6)]. As estruturas destes novos compostos foram determinadas pela interpretação detalhada de dados espectroscópicos. As daryamides mostraram atividade citotóxica moderada contra o carcinoma de células do cólon humano linhagem HCT-116 (IC₅₀

de 3,15 mg.mL⁻¹) e atividade antifúngica muito fraca contra *Candida albicans* (ASOLKAR et al., 2006).

Os compostos actinofuranones A e B [FIGURA 1.1 – (7) e (8)] foram isolados de uma cultura da cepa *Streptomyces sp* (CNQ766) provenientes de uma amostra de sedimentos coletados em Guam, na Micronésia (CHO et al., 2006). A bactéria foi cultivada em mesa incubadora rotativa a 27°C, em Erlenmeyers contendo 1 litro de meio de cultura salina. As estruturas dos compostos foram elucidadas por interpretação detalhada de espectros de RMN. Os dois compostos identificados foram inativos contra o carcinoma de cólon humano células HCT-116.

MILLER et al. (2006) isolaram três potentes citotoxinas contra células cancerígenas a partir de caldo de fermentação de *Streptomyces sp* (CNQ 593). A bactéria foi isolada de uma amostra de sedimento marinho coletada nas proximidades da ilha de Guam, a 20 m de profundidade, em janeiro de 2002. As estruturas dos novos compostos foram atribuídas por uma combinação de métodos espectrais, químicos e cristalográficos. A cepa foi cultivada em meio contendo água salgada marinha e em shaker, a 230 rpm e 27°C. Após 8 dias de cultivo, todo o caldo de fermentação foi extraído com acetato de etila. As novas estruturas encontradas (piperazimycins A, B e C – [FIGURA 1.2 – (9), (10) e (11)] são compostas por uma combinação de aminoácidos raros. Piperazimicina A mostrou potente atividade antitumoral contra múltiplas linhagens de células tumorais, com IC₅₀ de 100 nM.

Um ano mais tarde, identificou-se um novo composto: a chalcomycin [FIGURA 1.2 – (12)]. A elucidação estrutural foi feita principalmente através de espectrometria de RMN uni e bidimensional. Esse macrolídeo é produzido por *Streptomyces sp*. (M491), bactéria isolada na costa de Qingdao, na China (WU et al., 2007). Este é o primeiro relato de produção de sesquiterpenos por bactérias.

O cultivo de uma cepa de *Streptomyces* marinho, designada CNQ418 coletados perto de La Jolla, Califórnia, a uma profundidade de 51 m, forneceu dois novos compostos: marinopyrroles A e B [FIGURA 1.2 – (13) e (14)], densamente halogenados com uma estrutura incomum bipirrol. Os dois novos compostos mostraram atividade antibiótica contra *Staphylococcus aureus* (HUGHES et al., 2007).

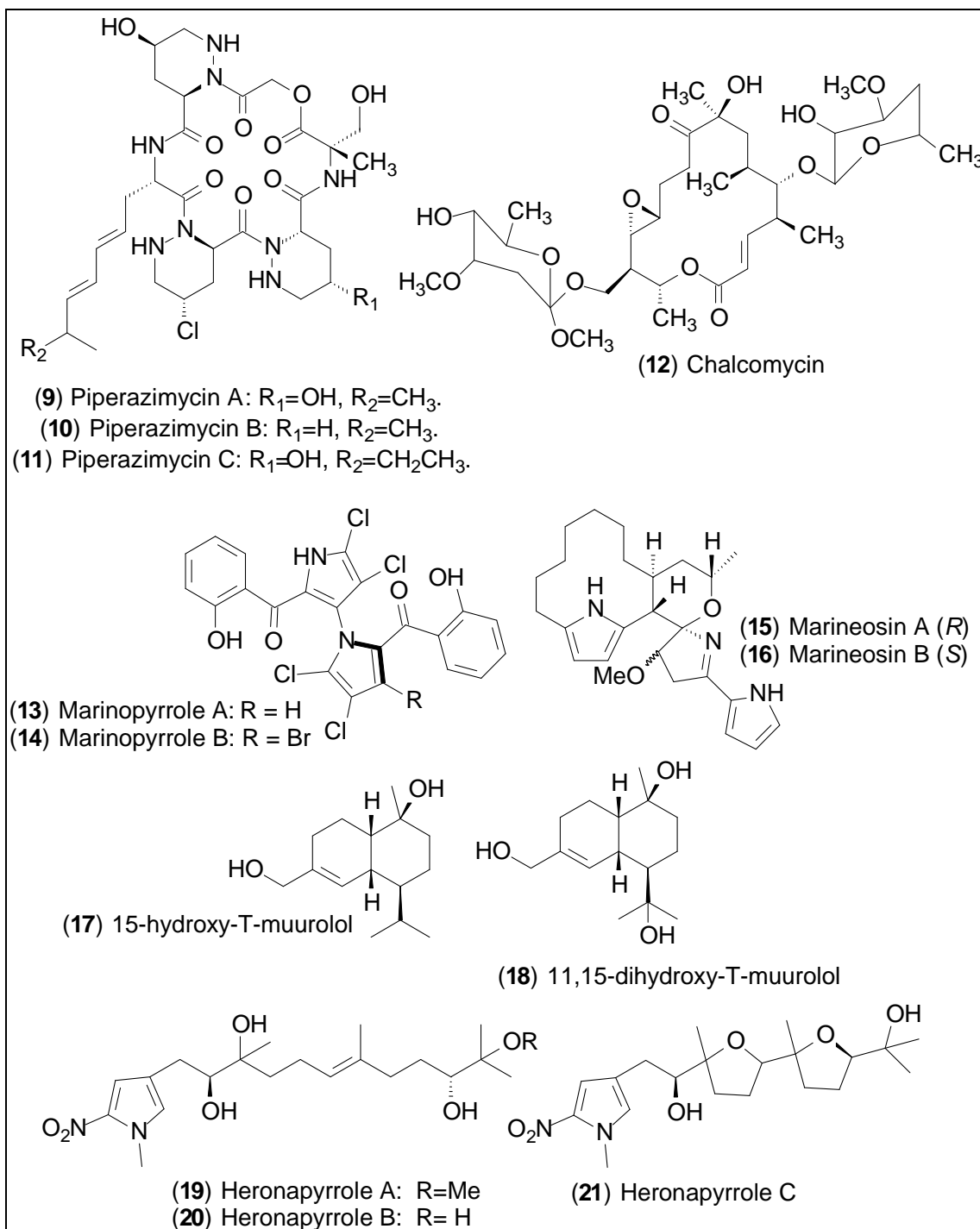


FIGURA 1.2 - Estruturas dos compostos (9) – (21).

Dois compostos inéditos, marineosins A e B [FIGURA 1.2 – (15) e (16)], foram separados de culturas de actinomicetos do gênero *Streptomyces*, isolados de sedimentos marinhos (BOONLARPPRADAB et al., 2008). As estruturas foram determinadas através de interpretações de espectro de RMN 1D e 2D. Foram feitos testes de atividade antitumoral (tumor de cólon HCT-116 humano) e atividade antifúngica (*Candida albicans*) com as duas substâncias identificadas. A atividade

antifúngica contra *Candida albicans* mostrou-se extremamente fraca. Com relação à atividade antitumoral, apesar de suas semelhanças estruturais, as marineosins A e B mostraram certas diferenças em sua atividade citotóxica. A marineosin A foi mais ativa no ensaio de citotoxicidade contra HCT-116 apresentando um valor de IC₅₀ de 0,5 mM. Em contrapartida, marineosin B mostrou citotoxicidade mais fraca (IC₅₀ de 46 mM).

DING et al. (2009) isolaram dois novos sesquiterpenos (15-hydroxy-T-muurolol e 11,15-dihydroxy-T-muurolol - [FIGURA 1.2 – (17) e (18)]) foram isolados a partir de uma cultura de *Streptomyces sp* M491. As estruturas foram determinadas através de espectroscopia de RMN e cristalografia de raios X. Apenas a 15-hydroxy-T-muurolol apresentou atividade frente às células de câncer de mama, com um IC₅₀ de 6,7 µg.mL⁻¹.

RAJU et al. (2010) isolaram três novos membros de uma classe rara pirrolterpeno, a partir de uma cultura de *Streptomyces sp* CMB-M0423 isolada da areia da praia Heron Island, Austrália. Os compostos foram identificados por análise espectroscópica detalhada fornecendo as estruturas heronapyrroles A, B e C [FIGURA 1.2 – (19), (20) e (21)]. É o primeiro relato de ocorrência natural de 2-nitropirrois. Os compostos apresentaram promissora atividade biológica contra bactérias gram-positivas.

O composto orgânico streptobactin [FIGURA 1.3 – (22)] foi isolado a partir de uma cultura da bactéria marinha *Streptomyces sp*. YM5-799 (MATSUO et al., 2011). A elucidação estrutural foi feita completamente por análise de dados espectroscópicos de RMN e espectrometria de massas de alta resolução. Os autores demonstraram que a produção desse composto é regulada através da concentração de íons de ferro no meio de cultura.

Dois tetrapeptídeos lineares altamente modificados, padanamides A e B [FIGURA 1.3 – (23) e (24)] foram produzidos por uma linhagem de um estreptomiceto marinho *Streptomyces sp*. RJA2928 (WILLIAMS et al., 2011). Padanamide B apresentou atividade contra células tumorais ATCC TIB-152 com IC₅₀ de 20 µg.mL⁻¹, enquanto padanamide A apresentou uma menor atividade neste mesmo ensaio: 60 µg.mL⁻¹.

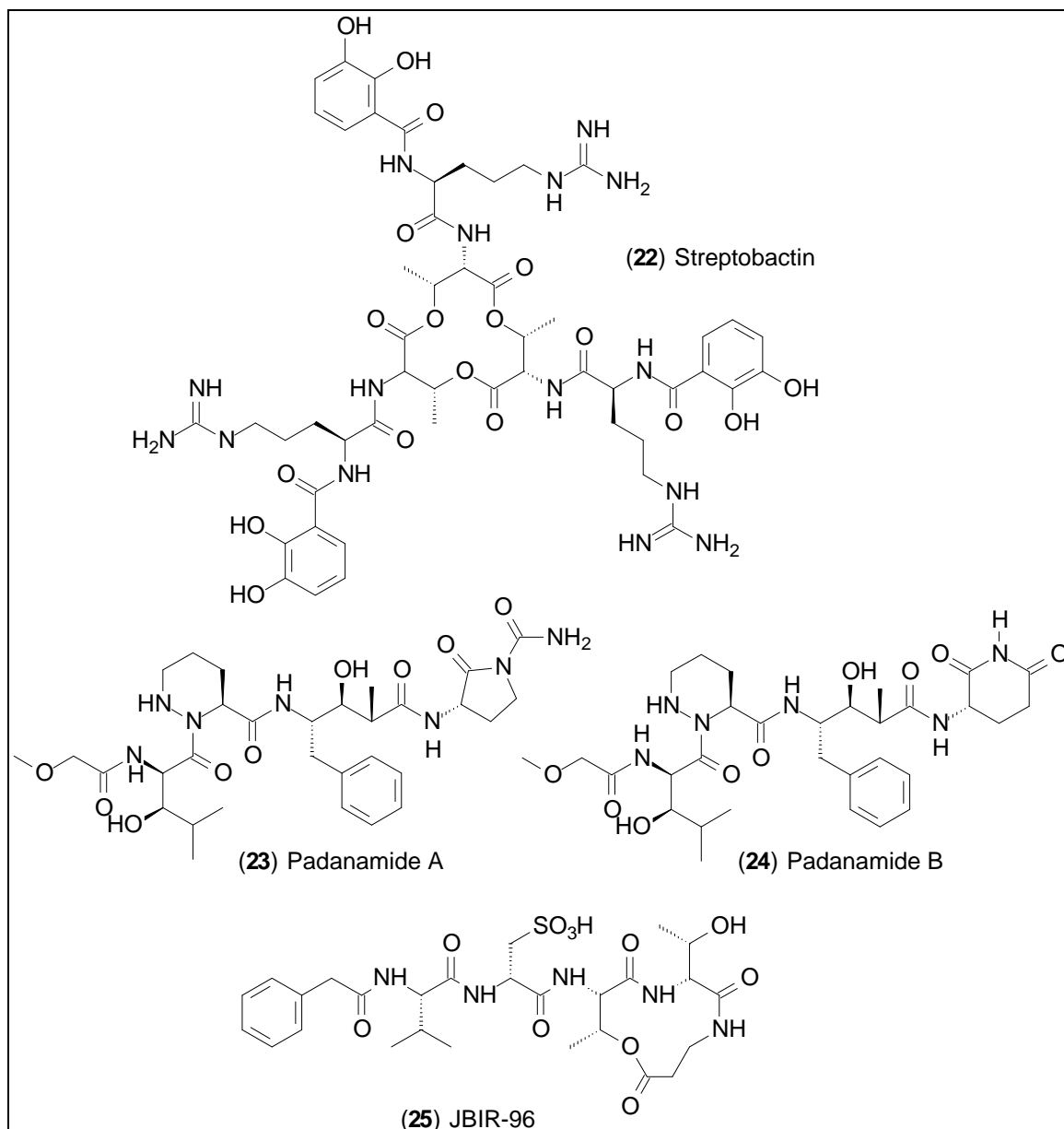


FIGURA 1.3 - Estruturas dos compostos (22) – (25).

UEDA et al (2011) isolaram um novo depsipeptídeo, designado JBIR-96 [FIGURA 1.3 – (25)], a partir de uma cultura de *Streptomyces* sp. RI051-SDHV6. A estrutura foi completamente elucidada através da análise de dados espectroscópicos. A configuração absoluta foi estabelecida pelos métodos de Marfey e Mosher. Não foram feitos testes de atividades biológicas ou citotóxicas.

PAN et al. (2012) isolaram e identificaram o composto ammosamide D [FIGURA 1.4 – (26)] a partir de um cultivo da bactéria marinha *Streptomyces variabilis*. O composto contendo um ciclo heteroaromático foi descrito como derivado do triptofano e apresentou atividade citotóxica modesta contra linhagem de células de câncer pancreático MIA PaCa-2.

Os compostos streptocarbazoles A e B [FIGURA 1.4 – (27) e (28)] foram isolados de um cultivo da bactéria marinha *Streptomyces* sp. FMA. As estruturas foram determinadas por análises espectroscópicas. Apenas o composto **27** apresentou atividade citotóxica contra linhagens de células tumorais HL-60 e A-549 (FU et al., 2012). As antraquinonas inéditas galvaquinone A-C [FIGURA 1.4 – (29)-(31)] foram isoladas e identificadas a partir de um cultivo da bactéria marinha *Streptomyces spinoverrucosus*. Apenas a substância **31** apresentou atividade antitumoral contra linhagens de células de câncer de pulmão (NSCLC) (HU et al., 2012).

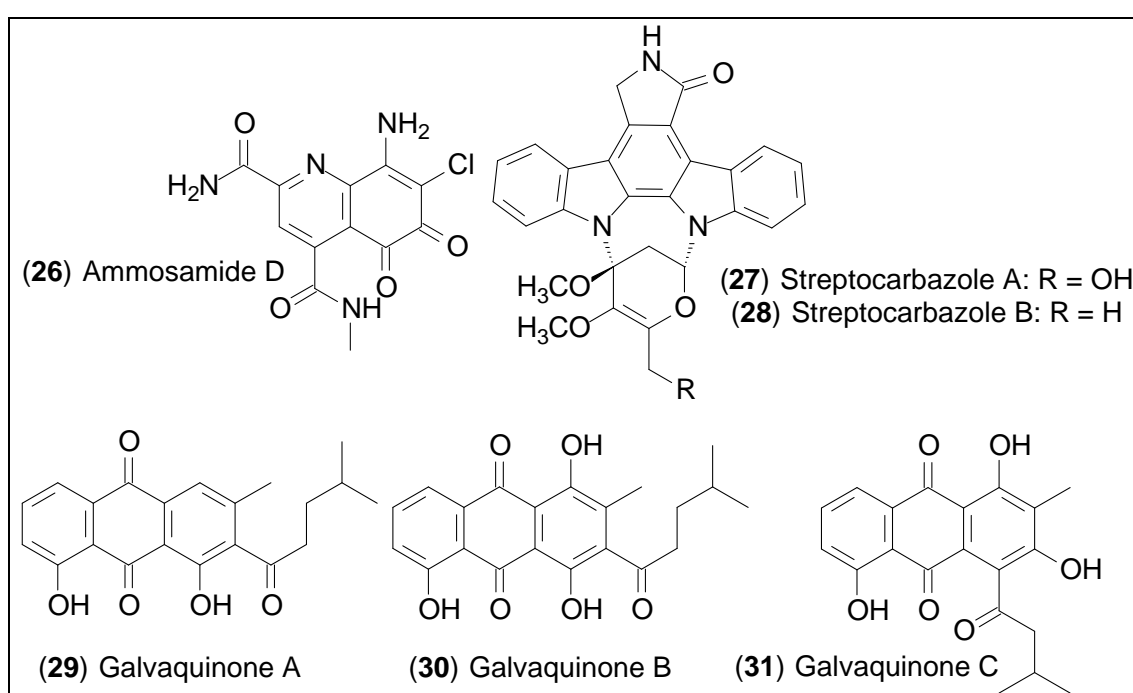


FIGURA 1.4 - Estruturas dos compostos (26) – (31).

Três derivados inéditos da tricostatina foram isolados e identificados a partir de um caldo de fermentação da bactéria de origem marinha *Streptomyces* sp. RM72 (HOSOYA et al., 2012). JBIR-109 – 111 [FIGURA 1.5 – (32) e (33)] tiveram suas estruturas elucidadas por métodos espectroscópicos e a configuração absoluta dos centros estereogênicos foi determinada pelo método de Marfey. Chlorizidine [FIGURA 1.5 – (35)] foi isolado do caldo de fermentação da bactéria marinha *Streptomyces* sp. CNH-287. O composto apresentou atividade citotóxica contra linhagens de células tumorais HCT-116 (ALVAREZ-MICO et al., 2013).

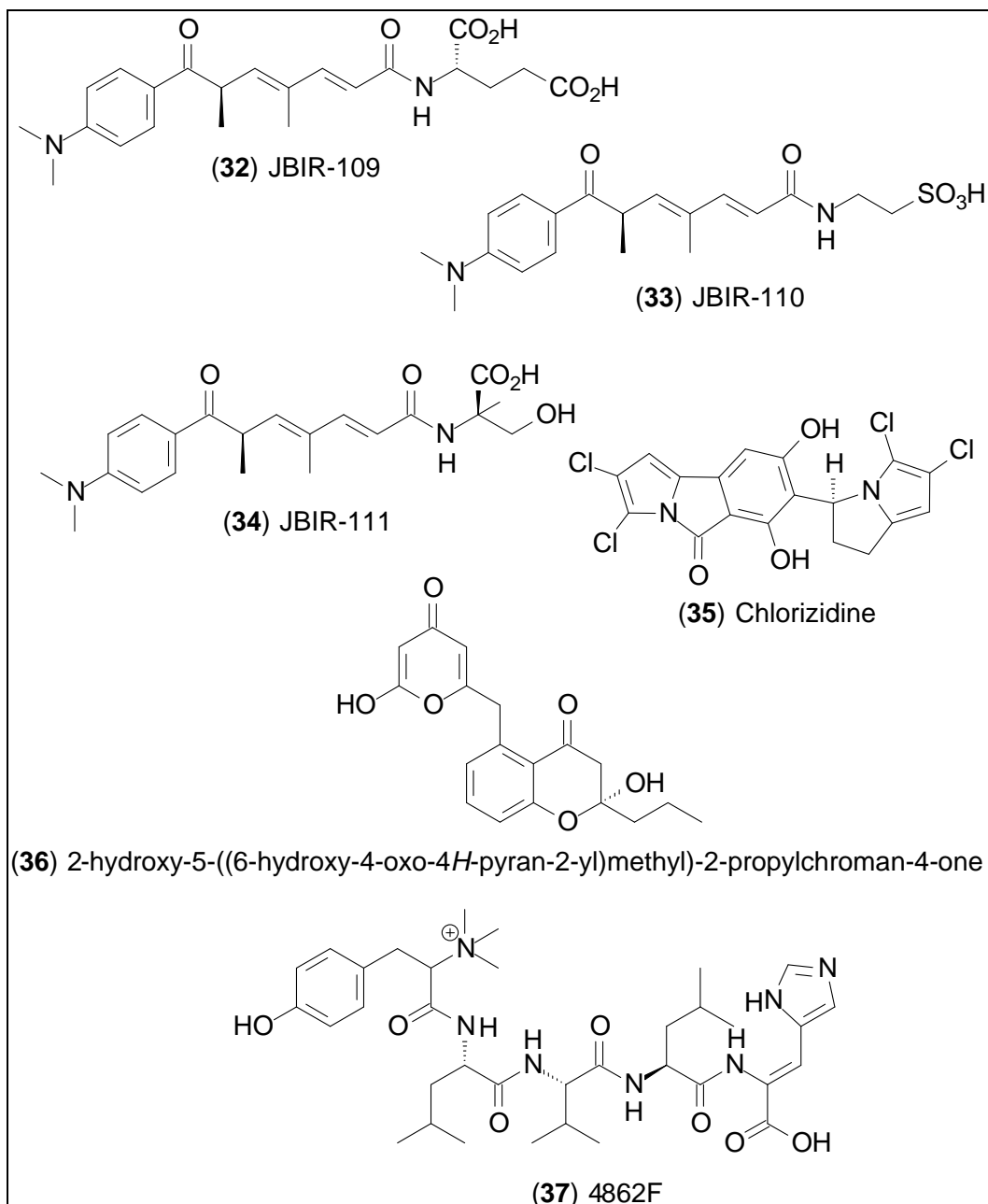


FIGURA 1.5 - Estruturas dos compostos (32) – (37).

O policetídeo inédito **36** (nomenclatura IUPAC não traduzida do inglês para o português) [FIGURA 1.5 – (36)] foi isolado de um cultivo da bactéria marinha *Streptomyces sundarbansensis*. O composto foi obtido como o metabólito majoritário do cultivo e teve sua estrutura elucidada por métodos espectroscópicos. O policetídeo encontrado mostrou atividade biológica contra *Staphylococcus aureus* (DJINNI et al., 2013). O pentapeptídeo 4862F [FIGURA 1.5 – (37)] foi isolado de uma cultura da bactéria *Streptomyces albosporus* I03A-04862. Os autores utilizaram a cromatografia preparativa e elucidaram a estrutura através de métodos

espectroscópicos. O composto apresentou atividade contra a enzima HIV-1 protease com um valor de IC_{50} de 15.26 nM (LIU et al., 2013).

1.2 - Produção de pirazin-2(1*H*)-onas por micro-organismos

Pirazin-2(1*H*)-onas são compostos heterocíclicos raros na área de produtos naturais, quando comparado a outras classes bem conhecidas como policetídeos ou alcalóides. Os relatos apontam para caldos fermentativos de bactérias de origem marinha e do solo. A estrutura principal desses compostos é formada pelo acoplamento de dois aminoácidos, que podem ser iguais ou distintos, levando à dipeptídeos. Esses dipeptídeos são normalmente isolados em duas formas distintas: as monocetopiperazinas (pirazin-2(1*H*)-onas) e as dicetopiperazinas. Tanto o primeiro como o segundo grupo têm sido reportados com atividade antibacteriana e antiviral. Existem mais relatos de compostos do segundo grupo em comparação ao primeiro e, apesar de uma bibliografia relativamente abundante (quando somado os compostos publicados dos dois grupos), até o início do ano 2000, alguns autores ainda não estavam convencidos de que dipeptídeos eram produtos do metabolismo secundário de bactérias (KANZAKI et al., 2000). Segundo esses autores, esses compostos seriam artefatos produzidos pelo processo de extração e isolamento que se formariam através da hidrólise das proteínas presentes no meio de cultura.

Esses dipeptídeos são formados através de duas reações de substituição nucleofílica acílica: o nitrogênio de um primeiro aminoácido (1) promove um ataque nucleófilo à carboxila de um segundo aminoácido (2). Na sequência, o nitrogênio do aminoácido (2) promove o mesmo ataque à carboxila do aminoácido (1) levando ao dipeptídeo cíclico dicetopiperazina [FIGURA 1.6 (a)]. No caso das pirazin-2(1*H*)-onas, o caminho é o mesmo, mas o carbono 5 do produto final encontra-se na forma reduzida levando à um sistema aromático [FIGURA 1.6 (b)]. Além de relatos de pirazin-2(1*H*)-onas 3,6-dissubstituídas, alguns poucos grupos de pesquisa têm encontrado compostos pirazin-2(1*H*)-onas 3,5,6-trissubstituídos, indicando que o carbono 5 do anel é suscetível à substituição eletrofílica aromática, graças ao nitrogênio (1) do ciclo, que promove o ataque nucleofílico (como em uma alquilação de enamina) e estabiliza o intermediário carbocátion por ressonância.

Todas essas reações são catalisadas por enzimas e seu papel na produção desses metabólitos só foi elucidado recentemente (WILSON et al., 2013).

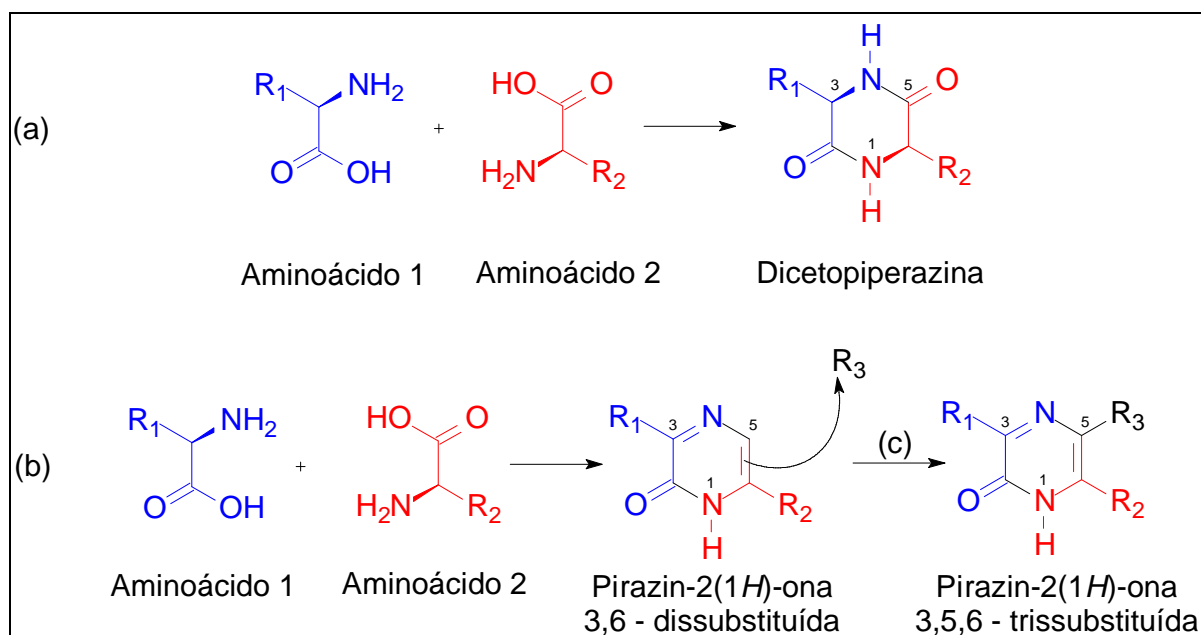


FIGURA 1.6 – (a) Reação geral de acoplamento entre aminoácidos para formar dicetopiperazinas. (b) Reação geral de acoplamento entre aminoácidos para formar pirazin-2(1H)-onas dissustituídas. (c) Substituição eletrofílica aromática levando à pirazin-2(1H)-onas trissustituídas.

O primeiro relato de um composto contendo o ciclo pirazin-2(1H)-ona data do início da década de 70. TATSUTA et al. (1971) relataram a produção de um antibiótico com esse sistema cíclico a partir de uma cultura da bactéria *Streptomyces toxytricini* sp. (KA57-AG3). O composto foi nomeado de arglecin [FIGURA 1.7 – (38)], pois apesar de os autores não terem feitos estudos biossintéticos, a estrutura é tentativamente conclusiva. Anos depois, uma cultura desse mesmo micro-organismo foi enriquecida com L-arginina e L-leucina em um estudo de ¹⁴C marcado (MACDONALD e BISHOP, 1977). Além da prova definitiva de que Arglecin é produto do acoplamento desses aminoácidos, os autores obtiveram outros produtos de acoplamento, formando outras pirazin-2(1H)-onas, quando enriqueceram o caldo de fermentação com aminoácidos diferentes.

Dois anos após o composto Arglecin ter sido relatado, o mesmo grupo de pesquisa publicou um novo metabólito microbiano da mesma classe: Argvalin [FIGURA 1.7 – (39)]. O metabólito foi encontrado em uma cultura da bactéria

Streptomyces filipensis sp. (KG62-AGI). O composto é claramente resultado de um acoplamento entre *L*-arginina e *L*-valina (TATSUTA et al., 1973).

O composto nomeado dragmacidin D [FIGURA 1.7 – (40)] foi isolado e identificado na forma de um sal de trifluoracetato a partir de uma esponja marinha do gênero *Spongosorites* (WRIGHT et al., 1992). O grupo de pesquisa da Flórida, Estados Unidos, relatou que dragmacidin D apresenta atividade antifúngica contra *Cryptococcus neoformans* e *Candida albicans*. Além disso, apresenta atividade antitumoral contra as linhagens de células P388 e A549.

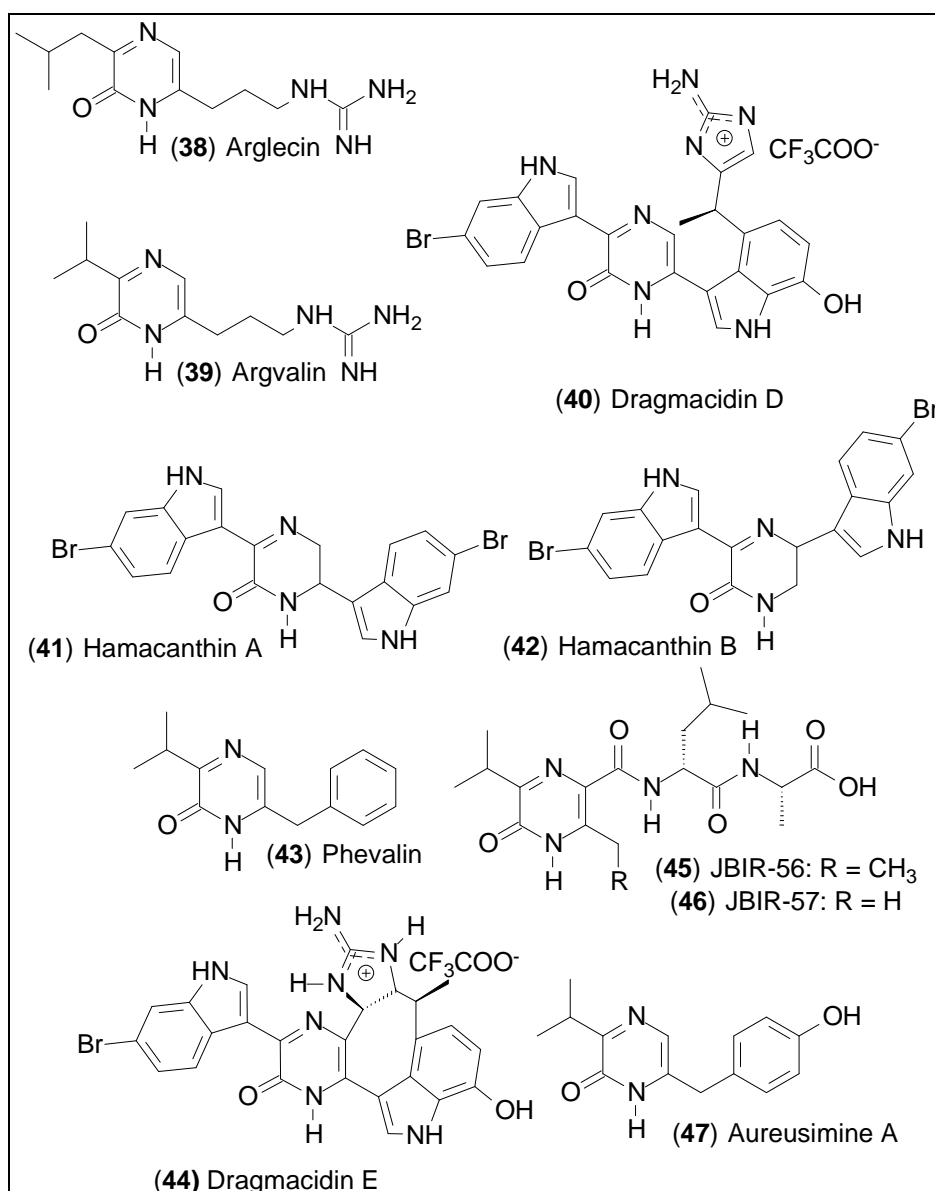


FIGURA 1.7 – Estruturas dos compostos (38) – (47)

Em 1994, o mesmo grupo de pesquisa isolou e identificou dois alcalóides indólicos também a partir de um cultivo de uma espécie de esponja marinha: Hamacanthin A [FIGURA 1.7 – (41)] e hamacanthin B [FIGURA 1.7 – (42)] (GUNASEKERA et al., 1994). Embora esses compostos sejam dihidropirazinonas substituídas, os autores sugerem que a via biosintética que deu origem à eles seja a mesma que origina os compostos pirazin-2(1*H*)-onas.

Depois de pouco mais de 20 anos que os compostos arglecin e argvalin [FIGURA 1.7 – (38) e (39)] foram publicados, o composto pirazinônico phevalin [FIGURA 1.7 – (43)] foi relatado pela primeira vez (ALVAREZ et al., 1995). O phevalin foi isolado de uma cultura de *Streptomyces* sp. (SC433) e apesar de nenhum estudo biosintético ter sido conduzido, os autores afirmam que o composto é um dipeptídeo resultante do acoplamento de *L*-fenilalanina e *L*-valina. O composto foi relatado na época como um inibidor da proteína calpain.

Em 1998, um grupo de pesquisa da Austrália isolou e identificou a pirazinona Dragmacidin E [FIGURA 1.7 – (44)] a partir da esponja marinha *Spongosorites* sp. O composto é claramente um derivado de uma ciclização do composto Dragmacidin D [FIGURA 1.7 – (40)]. O composto apresentou a mesma atividade antifúngica e antitumoral que Dragmacidin D, e é o primeiro relato de pirazin-2(1*H*)-ona 3,5,6-trissubstituída de origem natural (CAPON et al., 1998).

Recentemente, dois compostos pirazinônicos inéditos foram isolados de uma cultura de *Streptomyces lucensis* sp [NBRC 13056^T (AB184280)]: JBIR-56 [FIGURA 1.7 – (45)] e JBIR-57 [FIGURA 1.7 – (46)]. Os autores sugerem que a estrutura única desses compostos foi biossintetizada por uma enzima desconhecida. Os compostos consistem em um esqueleto carbônico incomum, em que uma cadeia peptídica está ligada ao carbono (5) do sistema cíclico. Não foram feitos testes de atividades biológicas, e é o segundo relato de pirazin-2(1*H*)-onas 3,5,6-trissubstituída (MOTOHASHI et al., 2011).

Em 2010, um grupo de pesquisa da Universidade do Canadá publicou um artigo intrigante a respeito dos compostos pirazin-2(1*H*)-onas (WYATT et al., 2010). Neste trabalho foi relatada a produção de dois dipeptídeos Aureusimine A [FIGURA 1.7 – (47)] e Aureusimine B (Phevalin – [FIGURA 1.7 – (43)] produzidos pela bactéria *Staphylococcus aureus*. Os autores sugerem que os compostos seriam reguladores de virulência. Toda infecção bacteriana é governada por uma série de fatores de virulência, que na maioria das vezes são toxinas com alta massa molar,

enzimas e proteínas que agem concomitantemente por um mecanismo ainda desconhecido. O grupo de pesquisa identificou a enzima responsável pela produção desses compostos pirazinônicos e criou uma linhagem mutante incapaz de sintetizar essa enzima (*S. aureus* Δ *ausA* mutante). Os autores verificaram que os dipetídeos não estão relacionados com o crescimento da bactéria e, na verdade, a linhagem incapaz de produzir os metabólitos apresentou um melhor crescimento celular (WYATT et al., 2010).

Em testes subsequentes, um grupo de ratos recebeu uma injeção intravenosa da bactéria *S. aureus* e outro grupo de ratos recebeu a mesma dose de *S. aureus* Δ *ausA* mutante. Durante quatro dias os ratos infectados com a linhagem selvagem de *S. aureus* perderam, em média, 22% do peso original, o que é consistente com uma infecção produzida por *S. aureus*. Em contrapartida, os ratos infectados com a linhagem *S. aureus* Δ *ausA* mutante perderam em média 7,5% do peso original. De acordo com a análise posterior, a partir de órgãos internos dos ratos, a infecção bacteriana só foi de fato bem sucedida para a linhagem selvagem de *S. aureus*. A linhagem incapaz de produzir os compostos pirazinônicos não promoveu uma infecção significativa. Isso abriria uma nova estratégia no combate às infecções, uma vez que os problemas relacionados à resistência bacteriana impedem um tratamento adequado em alguns casos de contaminação. Entretanto, mais estudos nessa área são necessários.

No mesmo ano, um grupo de pesquisas de Chicago, EUA, publicou um artigo afirmando que os compostos pirazinônicos não são fatores de virulência (SUN et al., 2010). Os autores sugerem que os resultados obtidos por WYATT et al., 2010, seriam devido à algum artefato de laboratório que causou uma mutação não compreendida.

Em 2013 foi publicado um artigo caracterizando a enzima *AusA*, responsável pela produção dos dipeptídeos que formam um ciclo pirazin-2(1*H*)-ona (WILSON et al., 2013). A FIGURA 1.8 mostra seu mecanismo de ação e como o ciclo é obtido.

A enzima em questão é uma enzima peptídeo sintetase não ribossomal (PSNR). Ela é formada por três domínios: um domínio de adenilação (Domínio A) responsável pela seleção e ativação de um aminoácido. Um domínio de tiolação (Domínio T), responsável por ligar covalentemente o aminoácido selecionado pelo domínio A, e um domínio de condensação (Domínio C) responsável pela ligação

nitrogênio-carbono que une os dois aminoácidos do dipeptídeo (FIGURA 1.10). A desconexão do novo peptídeo da enzima é feita através do domínio redutor (Domínio R), que converte o tioéster em um aldeído. O intermediário linear aminoaldeído rapidamente assume a conformação cíclica promovida por um ataque nucleofílico do grupo α -amino da *L*-valina no grupamento aldeído da *L*-tirosina. O estudo mostrou que a oxidação que ocorre na sequência, produzindo o ciclo pirazin-2(1*H*)-ona, ocorre espontaneamente devido à grande estabilidade associada à aromatização do sistema. Este trabalho deixa evidente a justificativa para a ausência de um carbono oxidado (carbonila) na posição 5 do ciclo pirazinona.

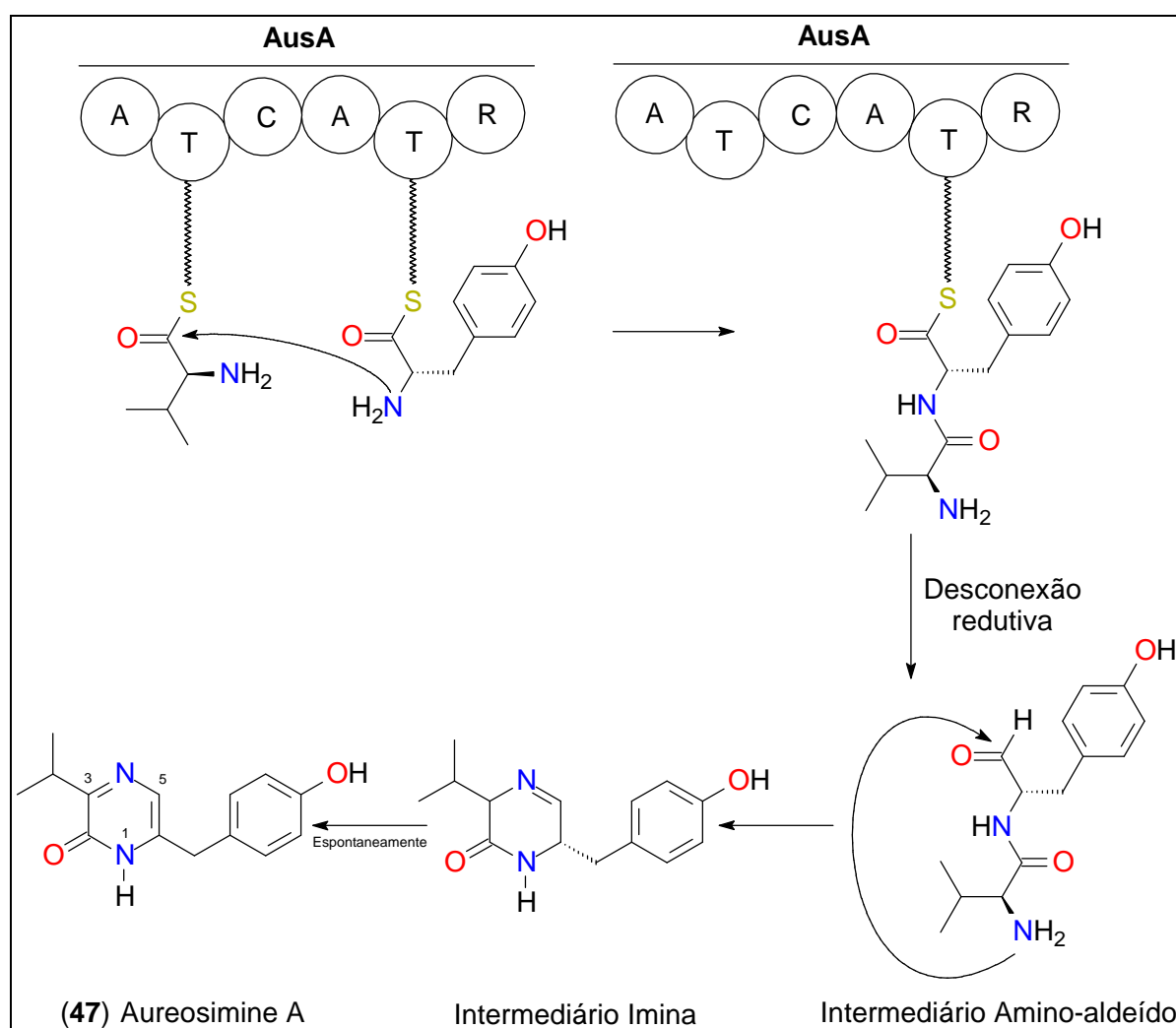


FIGURA 1.8 – Rota biossintética para o composto Aureosimine A (47)

1.3 – *Streptomyces cebimarensis* SS99BA-2

A linhagem de bactéria utilizada neste trabalho foi isolada em São Sebastião, litoral norte do estado de São Paulo, a partir de amostras de sedimentos marinhos coletados entre 12 e 15 m de profundidade. As análises de composição da parede celular e sequenciamento de 16S rRNA mostraram 95% de correlação com *Streptomyces violaceus*, *Streptomyces albofaciens* e *Streptomyces rimosus* (BERLINCK et al., 2004). Até o momento, apenas um estudo sobre identificação de metabólitos secundários foi publicado. HERNANDEZ et al. (2000) mostraram que essa bactéria é produtora da *N*-acetyl- γ -hydroxyvaline, composto de estrutura inédita isolado e purificado a partir do filtrado da cultura líquida [FIGURA 1.9 – (48)].

No mesmo programa de seleção e isolamento de micro-organismos marinhos, também foram obtidos outros dois actinomicetos: *Streptomyces acrymicini* e *Streptomyces carpaticus*, além do fungo marinho *Scolecobasidium arenarium*. (BERLINCK et al., 2004). A análise do extrato de acetato de etila obtido a partir do meio de cultura da bactéria *S. acrymicini* levou ao isolamento do novo composto leucyl-4-hydroxyproline [FIGURA 1.9 – (49)] e do dipeptídeo cíclico inédito 6-amino-[1,4]diazonane-2,5-dione [FIGURA 1.9 – (50)]. No mesmo estudo também foram isolados e identificados os compostos já conhecidos *N*-acetyltyramine e *cyclo*[Gly-Orn] [FIGURA 1.9 – (51) e (52)] (HERNANDEZ et al. 2004).

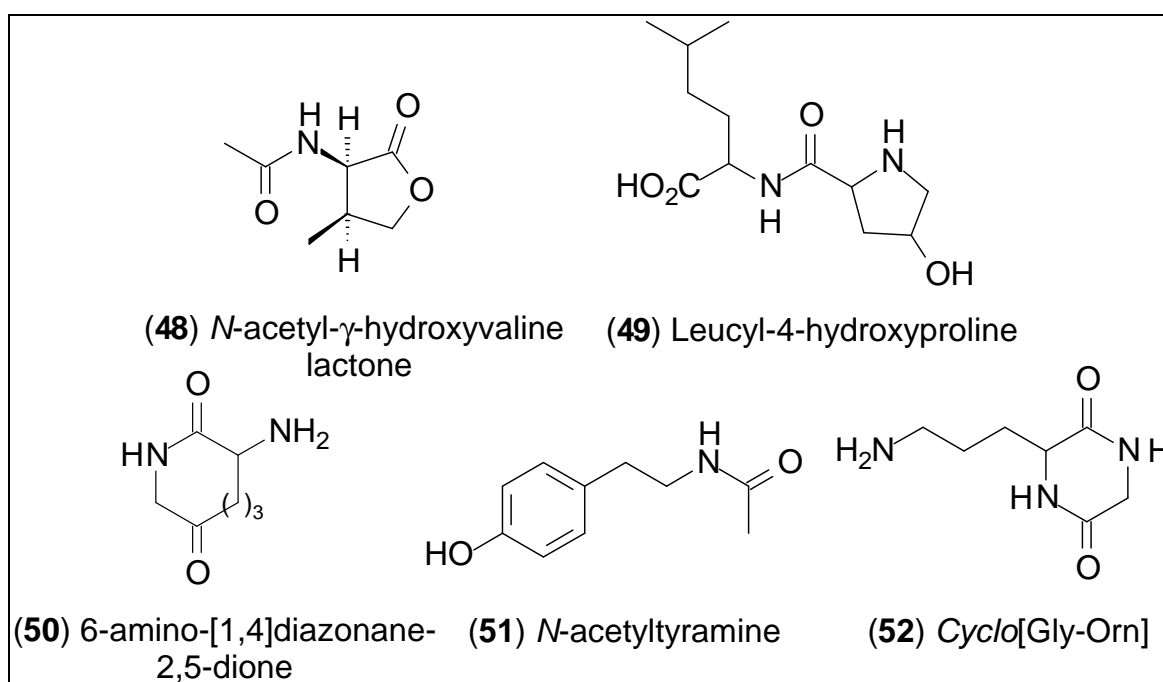


FIGURA 1.9 - Estruturas dos compostos (48) – (52)

1.4 - Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à ressonância magnética nuclear (LC-NMR)

O caldo de fermentação bruto constitui uma mistura complexa contendo centenas de metabólitos, que diferem consideravelmente em seus parâmetros físico-químicos e espectroscópicos. Por isso, uma eficiente separação aliada a uma rápida caracterização tem papel fundamental na pesquisa de produtos naturais biologicamente ativos.

A determinação do perfil metabólico do caldo de fermentação bruto não é um trabalho fácil de ser executado devido à variedade de compostos químicos presentes no mesmo. Porém, o avanço tecnológico de técnicas analíticas, sobretudo das técnicas hífenadas, proporcionou um avanço importante na elucidação de estruturas químicas dos produtos de origem bacteriana. Os níveis de sensibilidade e seletividade alcançados atualmente eram impensáveis até poucos anos atrás (LEVSEN et al 2000). Isso possibilitou o estudo do caldo bruto, sem a necessidade do exaustivo trabalho de isolamento que, muitas vezes, leva ao isolamento de substâncias já conhecidas. Sendo assim, estratégias de triagem química têm sido desenvolvidas através do uso de técnicas hífenadas.

O termo técnica hífenada refere-se ao acoplamento entre duas ou mais técnicas analíticas com o objetivo de obter uma ferramenta analítica mais eficiente e rápida que as técnicas convencionais. As técnicas analíticas químicas mais empregadas na análise de produtos à base de micro-organismos e plantas são a cromatografia e a espectroscopia (LEVSEN et al 2000).

As técnicas acopladas geram informações distintas. É o caso do acoplamento de métodos eficientes de separação como a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e a cromatografia gasosa (GC), com técnicas espectrométricas como espectrofotômetro de UV-Vis (DAD), espectrômetro de massas (MS e MS-MS) e ressonância magnética nuclear (NMR, do inglês Nuclear Magnetic Resonance), que fornecem informações adicionais sobre a estrutura química dos componentes da amostra, funcionando como detectores (EXARCHOU et al., 2005).

Os primeiros experimentos de LC-NMR foram realizados no final da década de 70 por WATANABE e NIKI 1978, que demonstraram medições de fluxo interrompido (“*stopped-flow*”) em uma mistura de compostos conhecidos. Logo em

seguida, BAYER et al., 1979 também trabalharam com uma mistura de compostos conhecidos, mas desta vez operaram em fluxo contínuo (“*on-flow*”) e em fluxo interrompido (“*stopped-flow*”). A comparação dos espectros adquiridos através do acoplamento LC-NMR com espectros convencionais dos compostos purificados revelaram que a resolução dos segundos ainda era melhor. De qualquer forma, este trabalho foi um passo muito importante para o desenvolvimento da técnica de LC-NMR

Ao longo das décadas de 1980 e 1990, grandes progressos foram feitos no desenvolvimento e otimização desta técnica, resultando no estabelecimento do LC-NMR como uma poderosa ferramenta analítica para a elucidação estrutural de compostos desconhecidos com uma grande variedade de aplicações (EXARCHOU et al., 2005). A importância dessa técnica na análise de produtos naturais se tornou imensa, uma vez que extratos brutos geralmente contêm um grande número de compostos e muitas vezes de difícil separação, o que faz do trabalho de elucidação de novas substâncias biologicamente ativas, um procedimento mais simples e rápido.

Normalmente, a aquisição de um espectro convencional de RMN, requer a dissolução da amostra de interesse em um solvente deuterado, introdução dessa solução em um tubo de amostra cilíndrico e posteriormente, esse tubo deve ser introduzido em uma sonda de RMN convencional que deverá estar dentro do magneto. Em se tratando da tecnologia de LC-NMR, a sonda deve ser modificada para permitir o fluxo contínuo da solução em estudo. Além disso, fatores como sensibilidade do RMN, técnicas de supressão de solvente, compatibilidade de solventes entre os aparelhos e volume do pico cromatográfico em relação ao volume da cela do RMN devem ser levados em consideração.

Atualmente, existem vários modos de operação para o LC-NMR, que podem ser distinguidos pela situação da amostra durante a aquisição dos espectros de RMN. Na sequência, um breve detalhamento acerca desses modos de operação será apresentado.

1.4.1 - “*On-flow*” LC-NMR

Neste modo de operação, o espectrômetro de RMN funciona de maneira similar ao uso de um detector de UV em um cromatógrafo, pois as

aquisições dos espectros de RMN são feitas sem interrupção do fluxo. A vazão ideal de fluxo é, normalmente, um intermediário entre a velocidade mínima requerida para a melhor resolução cromatográfica e a velocidade mínima necessária para obtenção de espectros de RMN com uma relação sinal-ruído adequada.

Este modo de operação permite uma rápida triagem, com espectros de ^1H -RMN, de uma mistura de compostos em estudo, mas funciona apenas para os componentes majoritários. Para a análise de todos os componentes individuais, são necessários outros modos de operação, isso porque o curto tempo de residência da amostra na cela do RMN não permite a obtenção de uma adequada relação sinal-ruído para os compostos presentes em menores quantidades (LEVSEN *et al.*, 2000). Recentemente, este modo de operação foi aplicado em conjunto com a técnica de *Ultrafast* NMR na aquisição de mapas de contorno $g\text{COSY}$ em uma mistura conhecida de 3 compostos orgânicos naturais. Os resultados mostram que a aquisição ultrarrápida de espectros bidimensionais pode reascender esse modo de operação que havia caído em desuso nos últimos anos (QUEIROZ JÚNIOR *et al.*, 2012).

1.4.2 - “*Stopped-flow*” LC-NMR

No modo de operação denominado “*stopped-flow*” LC-NMR, o fluxo é interrompido quando a fração de interesse alcança a cela de detecção do RMN. Dessa forma, o tempo de atraso (t_d), correspondente ao tempo necessário para transportar o analito do detector de UV até a posição ideal dentro da cela em fluxo, deve ser determinado (ELIPE, 2003). Após a aquisição dos dados de RMN, o processo pode ser repetido para a próxima fração, e dessa forma, uma série de picos cromatográficos pode ser estudada.

Apesar de ter sido amplamente utilizado, este modo de operação também foi muito criticado, pois constantes paradas diminuem a eficiência da separação cromatográfica, além de que analitos altamente concentrados podem contaminar a cela em fluxo e causar o problema de efeito memória. Dessa forma, o modo “*stopped-flow*” é recomendado para análise de misturas com um número relativamente pequeno de componentes cromatograficamente resolvíveis. Normalmente, os modos de operação “*on-flow*” e “*stopped-flow*” eram aplicados em

conjunto, como técnicas complementares em relação às informações adquiridas (LEVSEN et al., 2000).

BRINGMANN e LANG (2003) aplicaram uma tríade LC na caracterização de produtos naturais sem a necessidade de isolamento e purificação. A tríade LC consiste na combinação de cromatografia líquida com RMN (LC-NMR), com espectrometria de massas (LC-MS) e com dicroísmo circular (LC-CD). Assim, é possível elucidar completamente a estrutura de compostos, incluindo a configuração absoluta.

Um importante campo de aplicação da tríade LC, LC-MS, LC-NMR e LC-CD é a identificação rápida de compostos conhecidos, já a partir extratos. A grande quantidade de informações fornecidas pelas diversas técnicas de detecção espectroscópicas juntamente com LC, e diversas bases de dados, permite uma desrepliação simples. Os autores conseguiram identificar, por meio dessa técnica, três principais compostos produzidos por uma espécie de *Penicillium* isoladas da esponja *Spongia officinalis*. Após as análises em “*stopped-flow*” e “*on-flow*”, os dados espectrais obtidos foram comparados com bancos de dados de produtos naturais e os compostos foram prontamente identificados como os metabólitos griseofulvina C, roquefortina, e ácido ciclopiazônico, e até mesmo as configurações absolutas puderam ser atribuídos através da aplicação da técnica de LC-CD (BRINGMANN et al., 2003).

NOVAK et al. (2005) demonstraram a utilidade da combinação de técnicas hífenadas (LC-NMR e LC-MS) na identificação rápida de uma impureza desconhecida (N1) do medicamento ácido 5-amino-salicílico, formada durante sua síntese orgânica. Informações complementares, obtidas a partir dos dois métodos, revelaram muitas informações estruturais e levaram à rápida determinação estrutural da impureza N1 antes de seu isolamento e purificação. A análise dos espectros de LC-NMR, obtidos no modo “*stopped-flow*” e LC-MS espectros revelou que N1 e o ácido 5-amino-salicílico são compostos estruturalmente relacionados, conforme pode ser visualizado na FIGURA 1.15. A abordagem dada pelos autores mostra que essa técnica se adequa eficientemente no acompanhamento de processos de produção.

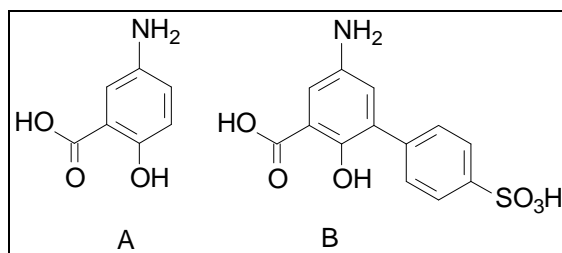


FIGURA 1.10 – Fórmula estrutural do ácido 5-amino-salicílico (A) e da impureza N1 (B).

TODE et al. (2009) aplicaram a técnica de LC-NMR, no modo “stopped-flow”, para análise de carotenóides em suco de tomate, óleo de palma e suco de laranja *Satsuma mandarin*. Os extratos dos carotenóides, obtidos com extração por solvente orgânico, foram analisados após um pré-processamento. Três, quatro, e dois tipos de carotenóides foram identificados para suco de tomate, óleo de palma, e *Satsuma mandarina*, respectivamente, principalmente por comparação entre os seus espectros de RMN com os de padrão puro. A utilização da técnica de LC-NMR mostrou-se extremamente útil na análise de carotenóides, principalmente os frágeis e sensíveis à luz e ao ar.

NOVAK et al. (2009) aplicaram, com sucesso, duas técnicas hifenadas para a identificação rápida de uma impureza em um medicamento denominado icofungipen: LC-NMR e LC-MS. Icofungipen encontrava-se em fase de desenvolvimento para o tratamento de infecções por *Candida*. A estratégia de combinação das duas técnicas, LC-NMR, em “stopped-flow” e LC-MS, foi usada como instrumento eficaz para a caracterização de impurezas e produtos de degradação da droga. O trabalho basicamente consistiu na identificação rápida e confiável, com elucidação estrutural, de uma impureza desconhecida A1, sem que houvesse necessidade de extração e purificação. A impureza A1 foi formada durante a preparação do icofungipen e os autores não encontraram relatos na literatura desse composto.

Os espectros de RMN (^1H e DQFCOSY) e LC-MS mostraram que A1 está estruturalmente relacionada com o icofungipen, conforme pode ser visto na FIGURA 1.16.

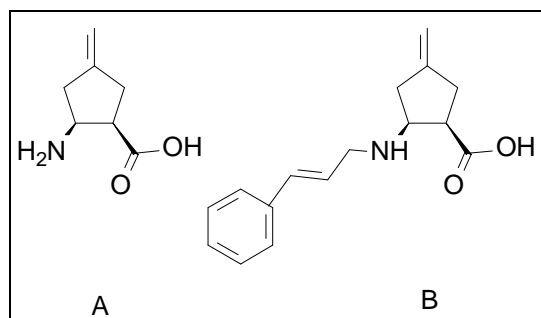


FIGURA 1.11 – Fórmula estrutural do icofungipen (A) e da impureza A1 (B).

AKIRA et al. (2010) descreveram a identificação espectroscópica, exclusivamente por LC-NMR nos modos “*on-flow*” e “*stopped-flow*”, de um metabólito endógeno urinário, encontrado como principal contribuinte para a distinção entre espectros de RMN de urinas de ratos geneticamente hipertensos e ratos normotensos utilizados como controle. Urina de rato normotenso, de 26 semanas de idade, foi analisada por LC-NMR equipado com uma coluna de fase reversa de alta retenção de compostos polares. Os espectros de ¹H foram obtidos no modo “*on-flow*”, e os espectros bidimensionais foram feitos em “*stopped-flow*”. O metabólito desconhecido foi identificado com succinil-aurina. Este metabólito é característico dos ratos normotensos, sendo que essa substância não é detectada na urina de ratos geneticamente hipertensos. Os significados biológicos e fisiopatológicos da succinil-aurina continuam a ser investigados.

Em se tratando de produtos naturais obtidos a partir de plantas, a técnica de LC-NMR tem sido também muito utilizada na determinação de substâncias inéditas com novos esqueletos e em misturas biologicamente ativas. Alcalóides e flavonóides foram identificados, primordialmente (HANSEN et al., 1999, QU et al., 2001, LE GALL et al., 2003 e RIJKE et al., 2004).

1.4.3 - “*Loop storage mode*” LC-NMR

No modo de operação denominado “*Loop storage mode*”, a corrida cromatográfica não é interrompida. As frações separadas são armazenadas em “*loops*” capilares para posterior aquisição dos espectros de RMN. Neste modo de operação, o tempo de atraso (t_d) também deve ser determinado. Um importante requisito para o uso dessa modalidade da técnica é que os analitos armazenados, para posteriores análises, devem ser estáveis durante todo o período da aquisição

dos espectros. Mas isso é muito difícil de prever se a matriz é desconhecida, portanto não é um método muito recomendado. Após as análises os “*loops*” podem ser lavados com um solvente. (ELIPE, 2003).

1.4.4 - “*CapLC-NMR*”

Um dos desenvolvimentos mais promissores da sonda de RMN, que garante aumento da sensibilidade, é a introdução de sistemas miniaturizados de bobinas solenoidal. Neste caso, uma microsonda solenóide, que passa pelo tubo de amostra, é orientada transversalmente ao campo magnético estático promovendo assim, um aumento de várias vezes na sensibilidade de detecção. O volume de detecção dessas sondas é da ordem de 1,5 μL , permitindo inclusive a detecção de metabólitos de baixo peso molecular (KRUCKER et al., 2004).

Neste modo de operação, o baixo consumo de solventes na cromatografia, torna economicamente viável o uso de solventes deuterados e elimina a necessidade de supressão do sinal do solvente no experimento de RMN. Entretanto, para se tirar máximo proveito das técnicas capilares, a substância a ser analisada deve ser solúvel em concentrações elevadas, e são desejáveis fases estacionárias com capacidade de carga elevada. Portanto, a preparação da amostra e ajuste das condições cromatográficas podem ser as partes mais difíceis na análise (JAYAWICKRAMA e SWEEDLER, 2003).

EXARCHOU et al. (2005) relataram um exemplo de aplicação para a técnica *CapLC-NMR* ou “*microflow*” NMR. Os autores utilizaram a técnica na análise de um extrato de alecrim disponível comercialmente. A separação cromatográfica foi feita com um programa de gradiente de eluição com acetonitrila/ D_2O (cada solvente contendo 0,1% de ácido trifluoracético). A separação cromatográfica revelou a presença de três picos principais que, de acordo com seus tempos de retenção, puderam ser atribuídos ao ácido rosmarínico, ácido carnósico e carnosol. Informações adicionais para esses analitos foram obtidas por espectros de $^1\text{H-NMR}$.

REHBEIN et al. (2007) fizeram um estudo utilizando técnicas de análise para o isolamento, separação e identificação estrutural de carotenóides essenciais bioativos bixina, extraídos de semente de urucum. O extrato foi analisado através do método “*on-flow*” de *CapLC-NMR* e LC-MS. Especialmente para os carotenóides, onde o padrão de fragmentação por espectrometria de massa não é significativa, a

técnica hifenada LC-NMR mostrou-se insubstituível e hábil a determinar estrutura de compostos, mesmo com pequenas concentrações disponíveis, como é o caso quando se utiliza de fontes naturais. Trabalhando no modo “*stopped-flow*”, os autores ainda mostraram a possibilidade de obtenção de espectros de RMN multidimensionais, gerando assim mais informações e possibilidade de elucidação estrutural de componentes totalmente desconhecidos.

1.4.5 - LC-SPE-NMR

Para aumentar a sensibilidade de detecção no LC-NMR, mesmo com pequenos volumes, uma alternativa viável é concentrar as amostras de interesse para atingir a maior quantidade possível do analito. A técnica de extração em fase sólida (SPE) é uma poderosa técnica para uma rápida e reprodutível preparação de amostras. O acoplamento LC-SPE-NMR proporciona um aumento muito grande de sensibilidade quando comparado ao acoplamento LC-NMR convencional (EXARCHOU et al., 2005).

Neste modo de operação, os picos cromatográficos são enviados para cartuchos individuais de SPE. Nesses cartuchos, os solventes da cromatografia são evaporados com nitrogênio, e posteriormente eluídos com solvente deuterado e enviados à sonda de cela em fluxo do RMN. A técnica de LC-SPE-NMR permite o uso de solventes protonados normais na separação cromatográfica, e por isso, minimiza o custo da análise e também a necessidade de supressão do sinal do solvente é drasticamente reduzida.

Cartuchos de poliestireno, divinilbenzeno e C-18 são mais comumente utilizados nessas análises, e CD_3CN , CD_3OD ou $CDCl_3$ são normalmente usados como solventes de eluição. Clarkson et al., 2007 mostraram que esses materiais retêm uma grande variedade de compostos orgânicos, permitindo a concentração dos mesmos para posterior eluição e análise.

O primeiro relato do uso da técnica de LC-SPE-NMR (EXARCHOU et al., 2003) descreveu uma análise automatizada de um extrato de orégano grego. Vários compostos puderam ser identificados. Os autores concluíram que a técnica automatizada é muito útil para análise de produtos naturais, pois melhora em muito a sensibilidade, o que leva a uma significativa melhora nos espectros de RMN.

GODEJOHANN et al. (2004) aplicaram a técnica de LC-SPE-NMR na elucidação estrutural de uma baixa concentração de um metabólito urinário do paracetamol, um analgésico amplamente conhecido. Os cartuchos de SPE foram empregados para aumentar a sensibilidade, e assim, adquirir melhores espectros de RMN quando comparados ao LC-NMR. Foi relatado o uso de acetonitrila deuterada para a eluição do metabólito do cartucho de SPE para a sonda de cela em fluxo. Além disso, foi utilizada uma sonda criogênica de RMN com objetivo de aumentar a sensibilidade do equipamento. A combinação dos resultados obtidos por espectrometria de massas e dos resultados de RMN, conduziram de forma inequívoca à elucidação da estrutura como o metóxi-3-glucoronide paracetamol.

MILIAUSKAS et al. (2006) compararam a aplicação de colunas analíticas e semi-preparativas em fase reversa no sistema LC-SPE-NMR. O objetivo principal do trabalho foi separar os compostos químicos, de uma só vez, de uma quantidade maior de amostra, reduzindo assim o tempo necessário para as análises, dos compostos separados, no RMN. Alguns parâmetros de separação de compostos e processos de retenção por SPE foram otimizados: vazão do HPLC, a escolha de cartuchos de fase estacionária e tempo de secagem. A separação e capacidade de carga de nove compostos em colunas analíticas e semi-preparativas foram determinadas, assim como a capacidade de concentração de cartuchos SPE tipo HysphereTM-resin *Strong Hydrophobic*, 10 mm x 2 mm, 35 µm, fase estacionária de polidivinilbenzeno. Os autores concluíram que colunas semi-preparativas fornecem resultados melhores que colunas analíticas padrão de 4,6 mm para os compostos não-polares, mas para os compostos polares, nenhuma vantagem foi detectada, ou era, até mesmo, desvantajoso. Os autores não verificaram compostos de polaridade média.

SORENSEN et al. (2007) isolaram e identificaram 2 sesquiterpenos já conhecidos e 1 inédito a partir de um cultivo de *Penicillium roqueforti* utilizando a técnica LC-MS-SPE/NMR. As estruturas foram completamente elucidadas com base apenas nos dados de espectrometria de massa e ressonância magnética nuclear. Não foram feitos testes de atividade com nenhum composto isolado, embora os autores afirmem que as estruturas sejam imunossupressores.

STÜLTEN et al. (2008) realizaram um estudo com o intuito de identificar um metabólito urinário gerado a partir do diclofenaco, um antiinflamatório. Amostras de urina de três pacientes que tinham tomado 50-150 mg de diclorofenaco

foram coletadas ao longo de 24 h pelo hospital municipal em Dortmund, Alemanha, para a realização deste trabalho. O 4-hidroxi-diclofenaco foi identificado como um novo metabólito urinário do diclofenaco, com o uso das técnicas de LC-SPE-NMR e LC-MS.

SOUZA et al. (2013) aplicaram a técnica de LC-SPE-NMR para analisar extratos não tratados de *Alternaria alternata*. Quatro substâncias foram isoladas e identificadas: Altenisin, Alternariol, 3'-hidróxi-alternatriol e Éter monometil alternatriol.

1.5 - Aumento da sensibilidade na técnica de ressonância magnética nuclear

O aumento na sensibilidade pode ocorrer a partir do aumento da intensidade do campo magnético (B_0) e da diminuição da temperatura através do uso de criossondas. Campos magnéticos mais intensos tem dado uma importante contribuição na área de LC-NMR nos últimos anos. A sensibilidade de detecção da técnica de RMN é proporcional à intensidade do campo magnético aplicado, portanto quanto maior o campo magnético aplicado, maior é a sensibilidade da técnica. Dessa forma, fica claro que o aumento da intensidade do campo magnético aplicado é muito importante para análises via LC-NMR. Atualmente, já se fabricam magnetos com 23,5 Tesla (1000 MHz para a frequência de ressonância do núcleo de H-1), e se comparados ao equipamento de 60 MHz (1,4 Tesla) utilizado no primeiro experimento de LC-NMR, em 1978 (WATANABI e NIKKI, 1978) a sensibilidade é incrivelmente maior.

Já se sabe há muito tempo (STYLES et al., 1984) que resfriando a bobina transmissora e receptora de radiofrequência, assim como os pré-amplificadores eletrônicos, à temperaturas criogênicas, enquanto a amostra é mantida à temperatura ambiente, o ruído eletrônico termal associado aos estágios iniciais da detecção é virtualmente eliminado. Isso leva a um aumento da relação sinal/ruído em um fator de 3-4. A primeira aplicação de uma sonda criogênica em LC-NMR foi reportada em 2003 (SPRAUL et al, 2003) e mostrou que é possível combinar as vantagens da sonda criogênica com o modo de operação "on-flow". Além disso, a tecnologia criogênica em combinação com a técnica de LC-SPE-NMR, instrumentação mencionada anteriormente, possibilitou pela primeira vez a

observação direta de um espectro de ^{13}C de produto natural. O ganho necessário resultou dessa poderosa combinação de tecnologias (EXARCHOU et al, 2003).

1.6 - Considerações

Conforme pôde ser observado nessa revisão bibliográfica, o uso de técnicas acopladas é, de longe, a mais moderna e poderosa estratégia que se tem registro atualmente no estudo de misturas complexas, como é o caso de caldos de fermentação de estreptomicetos, contendo metabólitos de grande importância terapêutica e comercial. Hoje, a técnica hifenada LC-NMR está muito bem estabelecida, com uma série de modos de operação disponíveis para resolver uma grande variedade de problemas analíticos.

Grandes avanços das técnicas hifenadas permitem agora um estudo muito mais preciso, proporcionando elucidações estruturais mais eficientes e inequívocas, e que contribuem para o desenvolvimento de novas drogas, muitas delas poderosas no tratamento de uma diversidade muito grande de moléstias. E, ainda, a pouca quantidade de relatos brasileiros de trabalhos analisando a química de estreptomicetos, revela uma área com possibilidade para pesquisas muito grande e ainda pouco explorada. Vale ressaltar que não foram encontrados estudos na literatura que aplicaram técnicas hifenadas na caracterização de caldos de fermentação gerados por estreptomicetos marinhos ou terrestres.

OBJETIVOS

2 - Objetivos

Com o crescente número de publicações na área de produtos naturais de micro-organismos marinhos descrevendo o isolamento de novos metabólitos bioativos, muitos dos quais se encontram em fase avançada de testes clínicos, fica claro a importância deste tipo de estudo. Diante disso, o objetivo geral do presente estudo foi elucidar o perfil metabólito de uma linhagem de bactéria isolada de sedimento marinho: *Streptomyces cebimarensis* SS99BA-2 utilizando a ferramenta analítica acoplada LC-SPE/NMR.

Para isso, foram cumpridos os seguintes objetivos específicos:

- Cultivos do micro-organismo em mesa incubadora rotativa com controle de agitação e temperatura, no Departamento de Engenharia Química da UFSCar.
- Testes de atividade citotóxica e biológicas dos extratos obtidos.
- Análise dos extratos obtidos por LC-SPE/NMR, para a determinação das estruturas do maior número possível de compostos orgânicos provenientes do meio de cultivo.

MATERIAIS E MÉTODOS

3 - Materiais e métodos

3.1 – Micro-organismo

O micro-organismo utilizado neste estudo foi a bactéria *Streptomyces cebimarensis* SS99BA-2, conservado na forma de células vegetativas em solução crioprotetora de glicerol 10% (v/v) à temperatura de -70°C.

3.2 - Meio de cultura

O meio de cultura utilizado no presente estudo foi descrito por ROMANO, 2009 como o que favorece o maior crescimento celular da linhagem de bactéria a ser avaliada. O meio é composto por glicose (4,0 g.L⁻¹), extrato de malte (10,0 g.L⁻¹), extrato de levedura (4,0 g.L⁻¹) e pH 7,2.

3.3 - Metodologia experimental – cultivos e tratamento do caldo de fermentação.

Os cultivos foram realizados no departamento de Engenharia Química (DEQ) da Universidade Federal de São Carlos, sob a supervisão do professor Dr. Alberto Colli Badino Jr.

Todos os cultivos foram feitos em três etapas básicas: reativação, crescimento e produção. Primeiramente, suspensão de células vegetativas da linhagem de bactéria mantida em criotubo, foi inoculada em dois Erlenmeyers (500 mL de volume útil) contendo o 50 mL de meio de reativação, em seguida incubados por 24 horas a 28°C e 250 rpm em mesa incubadora rotativa da *New Brunswick Scientific, Inc.*, modelo G-25 com controles de temperatura e agitação (FIGURA 3.1). Para garantir uma manipulação asséptica do micro-organismo foi utilizado uma câmara asséptica de fluxo laminar da marca VECO, contendo um bico de *Bunsen* e lâmpada germicida UV, em todas as etapas, bem como todos os materiais e meios de cultura foram autoclavados. Após 24 horas de reativação do micro-organismo observou-se visualmente o crescimento das culturas devido à turvação e mudança de coloração do caldo de cultivo além da formação de biofilme nas paredes dos

frascos. Em seguida um dos dois frascos Erlenmeyer foi selecionado, observando-se aquele em que o micro-organismo tivesse melhor crescimento, comparando-se a quantidade de biofilme formado e a turvação do meio visto a olho nu.

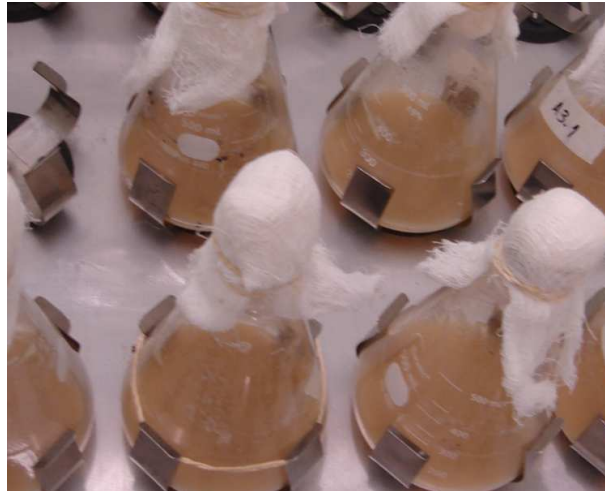


FIGURA 3.1 – Cultivo em mesa incubadora rotativa.

O caldo do frasco escolhido foi utilizado como inóculo para quatro frascos Erlenmeyers de 500 mL de volume, contendo 40 mL de meio de inóculo cada. Esses frascos foram inoculados com 10 mL (20%) do caldo de cultivo proveniente do frasco de reativação. Na sequência, obteve-se um volume final de meio de inóculo de 200 mL. 20 Erlenmeyers contendo 40 mL de meio de cultura receberam 10 mL de meio de inóculo cada, totalizando um volume final de 1000 mL de meio de produção. O cultivo teve duração de 72 horas. A FIGURA 3.2 ilustra o procedimento descrito.

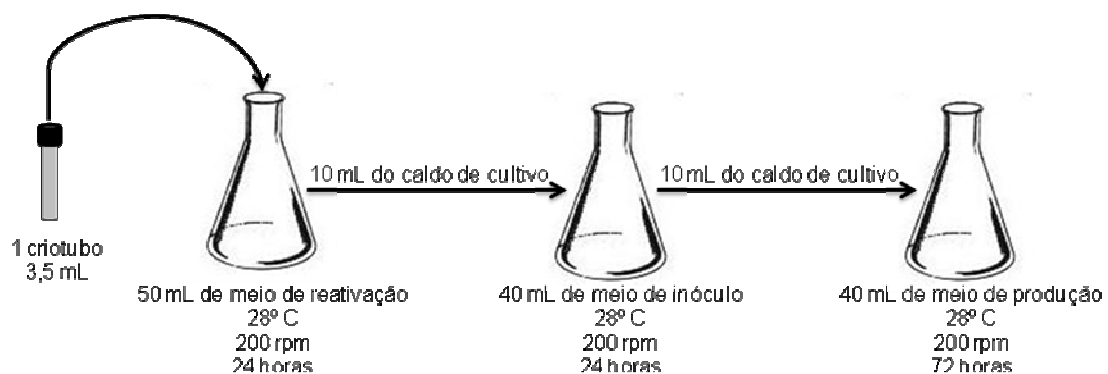


FIGURA 3.2 – Fases do cultivo em mesa incubadora rotativa.

Depois de 72 horas de cultivo, o caldo resultante foi centrifugado (10.000 rpm por 20 minutos) para separação das células. As soluções centrifugadas foram extraídas com acetato de etila e n-butanol, de acordo com o fluxograma apresentado na FIGURA 3.3, resultando em três extratos: extrato acetato de etila (**AE**), extrato n-butanólico (**B**) e extrato aquoso (**A**). Todas as extrações foram feitas em triplicatas, combinando-se 100 mL de fase aquosa com 100 mL de fase orgânica em um funil de separação. As fases foram agitadas e colocadas em repouso até que o equilíbrio fosse estabelecido. As fases foram separadas mecanicamente e coletadas em três diferentes frascos. Os extratos foram secos em *Speed-vac* (Centrivap Concentrator, Labconco Corp.) e foram obtidos 10 mg do extrato AcOEt (**AE**), 6 mg do extrato Butanólico (**B**) e 20 mg do extrato aquoso (**A**).

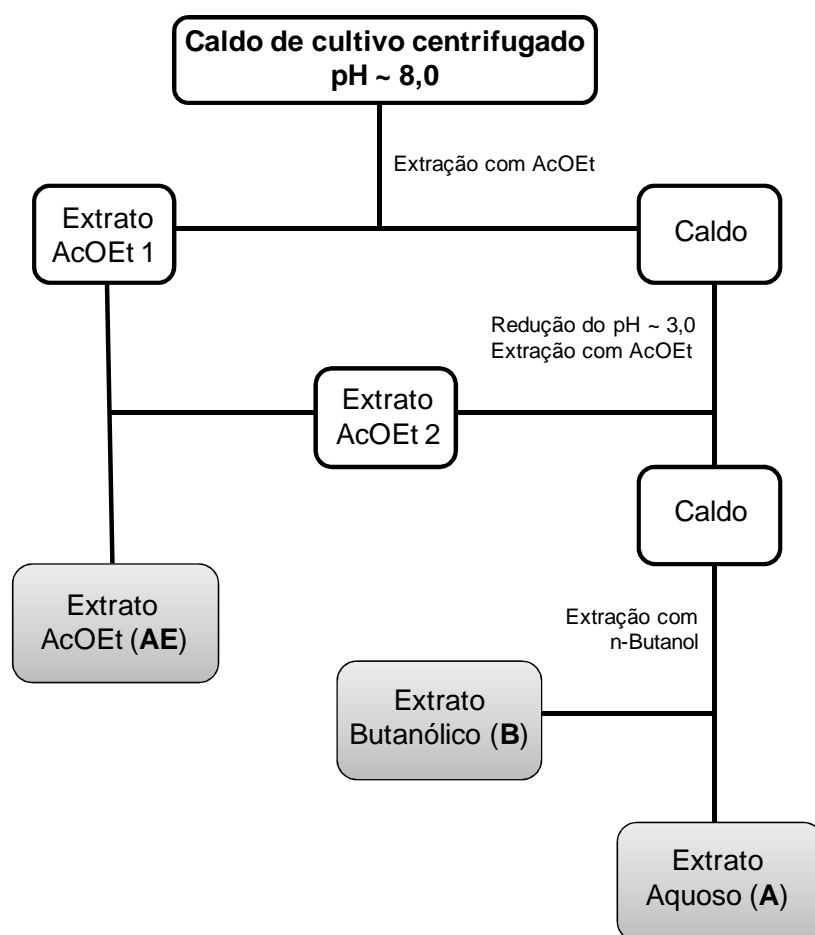


FIGURA 3.3 – Fluxograma de extração do caldo de cultivo da bactéria *Streptomyces cebimarensis* SS99BA-2.

3.4 - Equipamento acoplado HPLC-SPE.

O sistema acoplado constitui de um cromatógrafo Agilent (1200 series) acoplado a uma unidade Prospekt 2 conforme pode ser visualizado na FIGURA 3.4. O sistema de HPLC constitui de bomba quaternária (*Agilent Pump Control*, Bruker Daltonik GmbH©, G1311A), degaseificador (G1322A), detector de arranjo de diodos com comprimento de onda variável (*DAD Diode Array Detector Control*, G1315D) e amostrador automático (*LC Autosampler Control*, Bruker Daltonik GmbH©, G1329A).

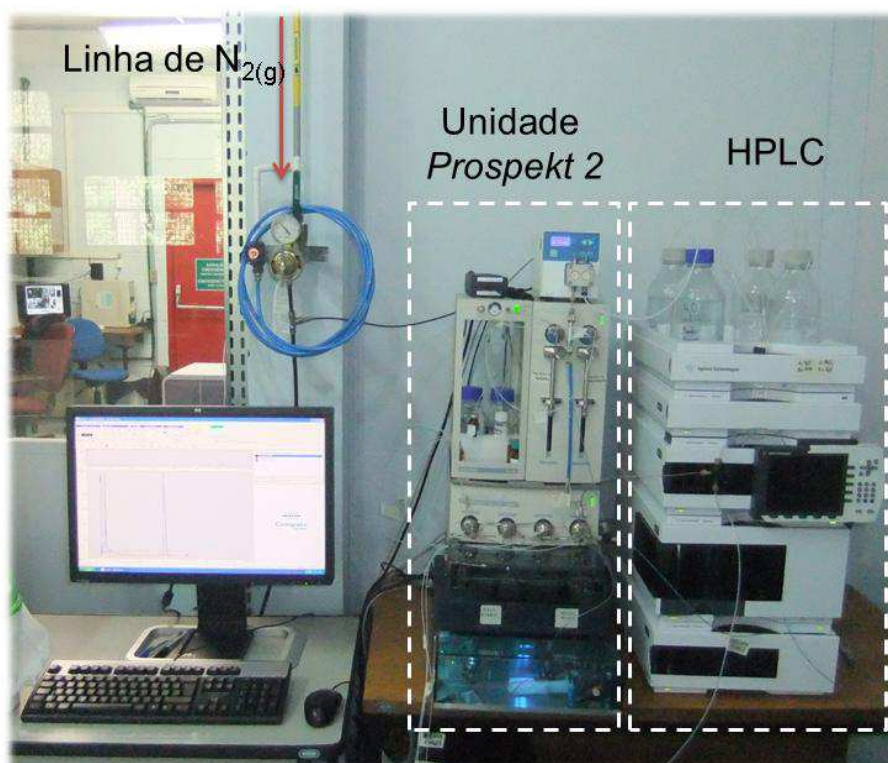


FIGURA 3.4 – Sistema HPLC-SPE do laboratório de RMN / Departamento de química – UFSCar.

A unidade Prospekt 2 é constituída por:

- Bomba extra (K120 *Knauer Smartline Pump Control 100*, Bruker Daltonik GmbH©, V01.11) (E) (FIGURA 3.5) que diminui a proporção de modificador orgânica da fase móvel que sai da coluna cromatográfica;
- Organizador (C) onde são alocados os frascos com solventes deuterados e não deuterados usados nos cartuchos de extração por fase sólida;

- Unidade trocadora automática de cartuchos (G) (ACE – *Automatic Cartridges Exchanger* – LC-SPE-NMR Interface, Propesket 2, Bruker Biospin GmbH©) que transporta automaticamente os cartuchos para a direção do fluxo da fase móvel contendo os compostos de interesse;
- Unidade de *Stopped-Flow* (H) (BSFU-HP – *Bruker Stopped Flow Unit* – High Performance Bruker Biospin GmbH©) e válvulas VALCO.

A válvula A controla a seringa 1, a qual injeta solvente não deuterado nos cartuchos nas etapas de equilíbrio e condicionamento. A válvula B controla a seringa 2, a qual injeta solvente deuterado nos cartuchos na etapa de eluição da amostra para análises posteriores, que pode ser, por exemplo, conectada diretamente com o espectrômetro de RMN. A área tracejada na FIGURA 3.5 (a) contém o “ponto de interseção”, um ponto fundamental para que a adsorção dos compostos de interesse nos cartuchos ocorra de fato. Esta região está ampliada na FIGURA 3.6.

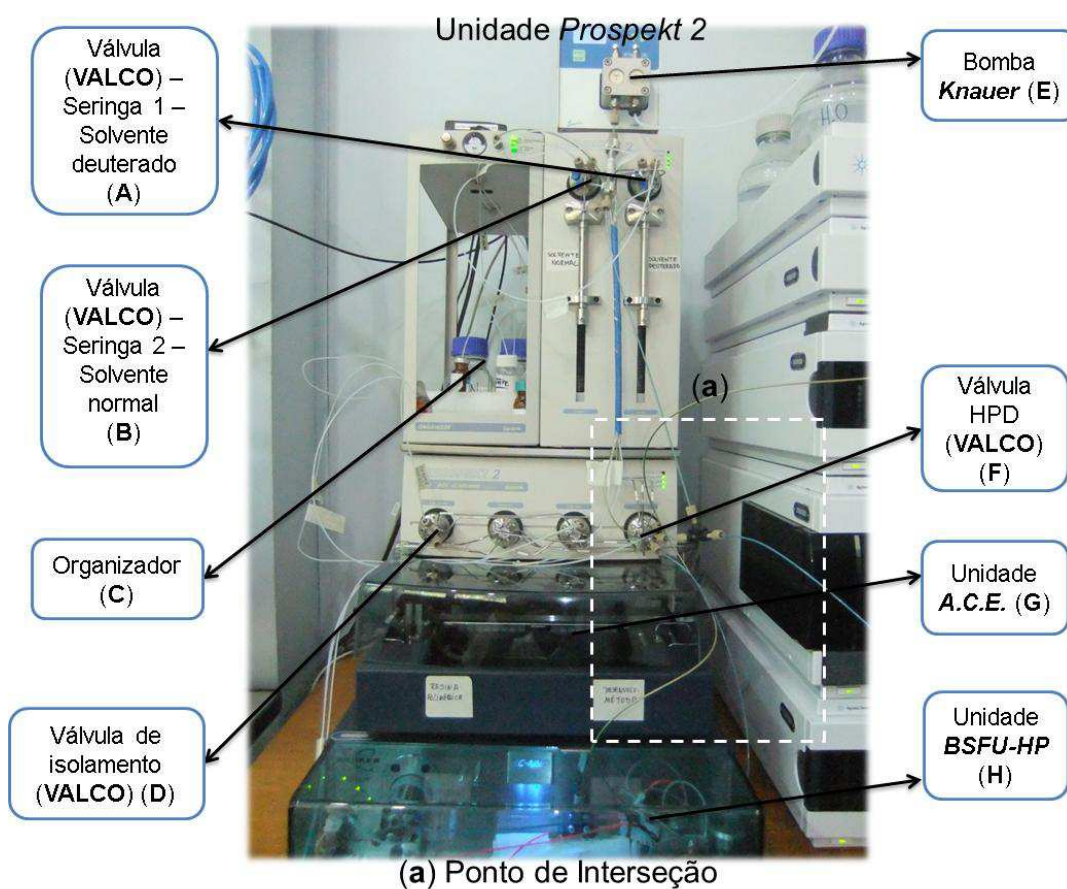


FIGURA 3.5 – Visão da unidade Prospekt 2.

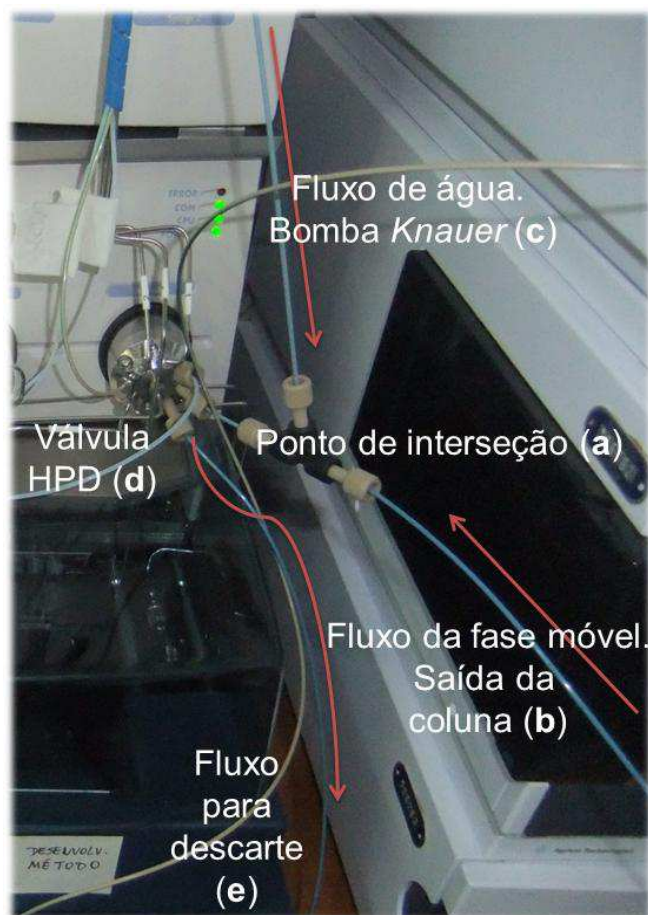


FIGURA 3.6 – Ponto de Interseção do fluxo da bomba quaternária e bomba *Knauer*.

A FIGURA 3.6 mostra o ponto de interseção responsável pela adsorção dos compostos nos cartuchos. Enquanto não existem frações de interesse no fluxo da fase móvel que sai da coluna cromatográfica (b), a válvula HPD (*High Pressure Dispenser*) (d) direciona o fluxo para o descarte (e). Quando uma fração de interesse surge no cromatograma, a válvula HPD desvia o fluxo na direção dos cartuchos de SPE, ao mesmo tempo em que a bomba *Knauer* (c) é acionada. Essa bomba aumenta a quantidade de água na fase móvel em uma proporção de 3:1, diminuindo assim a força de eluição e, dessa forma, ao passar pela fase estacionária dos cartuchos, o(s) composto(s) de interesse fica(m) retido(s).

O sistema que controla a etapa de extração por fase sólida é a unidade trocadora automática de cartuchos (*ACE – Automatic Cartridges Exchanger – LC-SPE-NMR Interface*, Propesket 2, Bruker Biospin GmbH©) equipada com duas linhas de fluxo onde os cartuchos são posicionados (FIGURA 3.7), um braço mecânico (*Gripper*) que transporta os cartuchos das linhas de fluxo para as bandejas e duas bandejas de cartuchos com diferentes fases estacionárias. Do lado esquerdo

da FIGURA 3.7, está a bandeja com cartuchos de fase estacionária *General Phase* (HysphereTM-resin, 10 mm x 2 mm, 10 µm, formato esférico e fase estacionária de polidivinibenzeno). A justificativa para uma bandeja completa com noventa e seis cartuchos da mesma fase estacionária é baseada nos resultados de CLARKSON *et al.*, 2007, que mostraram que essa fase polimérica é capaz de reter uma grande variedade de compostos orgânicos, cobrindo uma ampla faixa de polaridades. Do lado direito da FIGURA 3.7 está a bandeja para desenvolvimento de método. São 8 linhas de cartuchos, recheados com 8 fases estacionárias diferentes, conforme representado na TABELA 3.1.

TABELA 3.1 – Fases estacionárias disponíveis no cartuchos HysphereTM.

Linha	Fase estacionária
1	Hysphere TM -resin CN-SE, 10 mm x 2 mm, 7 µm, fase estacionária cianopropil)
2	Hysphere TM -resin C2-SE, 10 mm x 2 mm, 7 µm, fase estacionária etil)
3	Hysphere TM -resin C8 EC-SE, 10 mm x 2 mm, 10 µm, fase estacionária octil <i>end capped</i>)
4	Hysphere TM -resin C18 HD, 10 mm x 2 mm, 10 µm, fase estacionária octadecil <i>High Density</i>)
5	Hysphere TM -resin <i>General Phase</i> , 10 mm x 2 mm, 10 µm, fase estacionária polidivinibenzeno)
6	Hysphere TM -resin <i>Strong Hydrophobic</i> , 10 mm x 2 mm, 35 µm, fase estacionária de polidivinilbenzeno)
7	Hysphere TM -resin mixed mode cation, 10 mm x 2 mm, 10 µm)
8	Hysphere TM -resin mixed mode anion, 10 mm x 2 mm, 10 µm)

Na FIGURA 3.8 é possível visualizar o momento em que o braço mecânico (*Gripper*) vai até a bandeja de cartuchos e retira um deles. Na sequência, o braço transporta o cartucho para a linha de fluxo 1, onde haverá passagem da fase móvel diluída pela bomba *Knauer* quando a válvula HPD desvia o fluxo nessa direção.

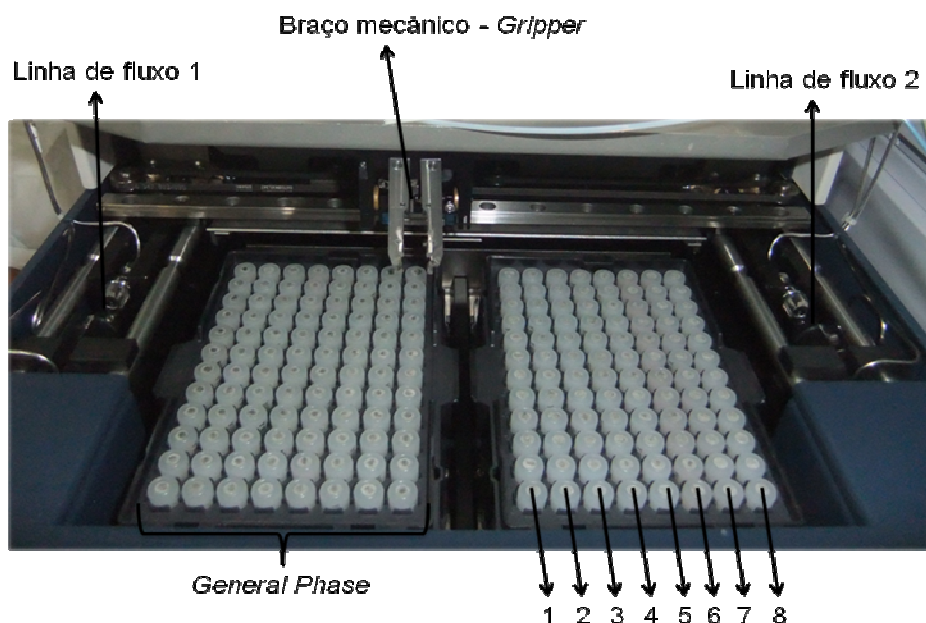


FIGURA 3.7 – Visão interna da unidade A.C.E. (*Automated Cartridges Exchanger*).



FIGURA 3.8 – Braço mecânico em operação.

O programa *Hystar 2.3* foi usado para controlar o sistema acoplado LC-SPE e o número de repetições para a adsorção dos compostos nos cartuchos. Embora existam seis diferentes formas de desviar o fluxo da fase móvel na direção da linha de fluxo que contém o cartucho, todas as análises deste trabalho foram feitas utilizando uma única modalidade conhecida como seleção pela intensidade da banda (*threshold*). Nessa forma de operação, o sistema direciona o fluxo do descarte para o cartucho toda vez que a intensidade de absorção no detector UV-DAD ultrapassa o valor estipulado pelo operador. Quando a intensidade do sinal

diminui, o fluxo volta a ser direcionado para o descarte. Uma grande vantagem desse modo de operação se deve ao fato de que mesmo que o tempo de retenção (t_R) varie entre uma corrida cromatográfica e outra (considerando que são realizadas múltiplas injeções), a região equivalente ao sinal sempre será direcionada para o cartucho. Dessa forma, é possível verificar que esta técnica é muito pouco produtiva, mas altamente seletiva, levando a compostos isolados com alto grau de pureza.

A FIGURA 3.9 mostra a interface gráfica do software *Hystar* 2.3 durante a aquisição. As regiões tracejadas do cromatograma indicam o momento em que o fluxo foi direcionado para os cartuchos.

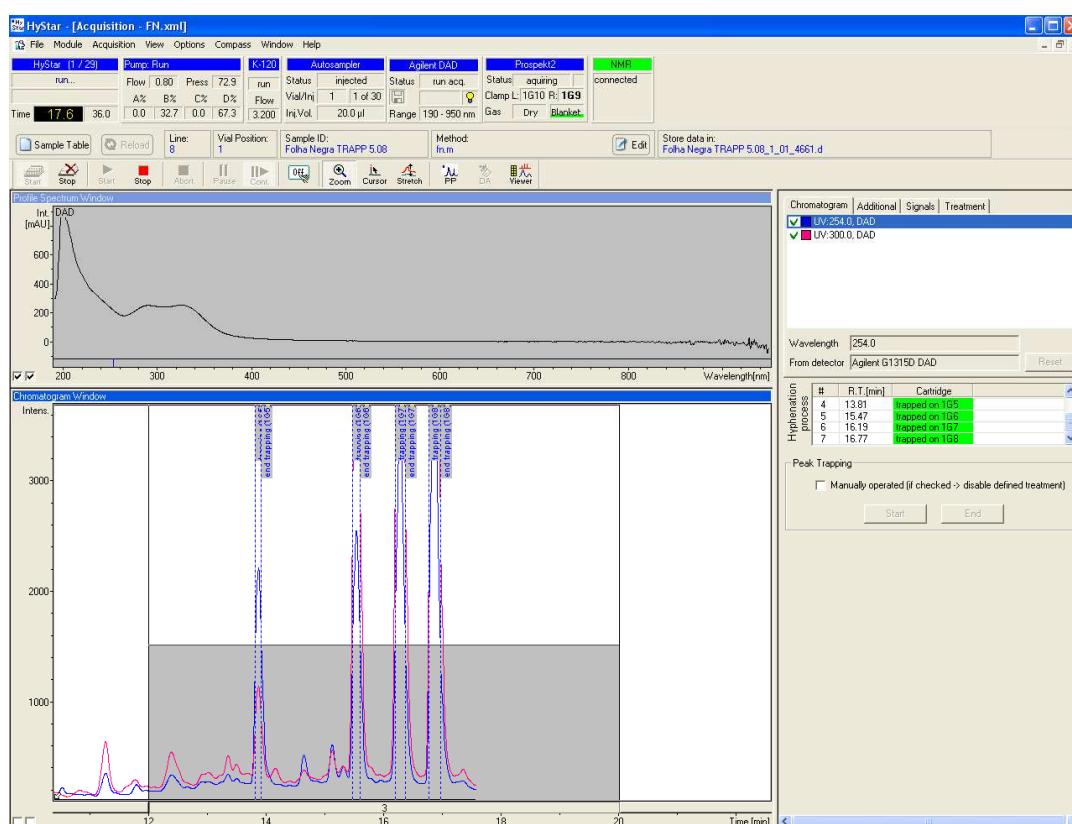


FIGURA 3.9 – Interface do Software *Hystar* 2.3 para controle do sistema acoplado LC-SPE.

3.5 - Equipamento de ressonância magnética nuclear (RMN).

Os espectros de RMN foram obtidos em um equipamento Bruker Avance III – 14,1 Tesla (600,23 MHz para frequência do hidrogênio) com magneto blindado (*Ultrashield Plus*[®]). O espectrômetro é equipado com sonda criogênica TCI (*Triple Resonance Cryoprobe Inverse*) de 5 mm, com bobinas de ¹H e ¹³C e pré-

amplificador refrigerados a uma temperatura de aproximadamente 77K. A sonda possui bobina de gradiente de campo no eixo z (53G/cm) e unidade de ajuste automático de sintonia – ATMA[®] (*Automatic Tunning e Matching*). O equipamento ainda possui uma unidade CryoFIT[®] com cela de detecção de 60 µL de volume útil, a qual permite o acoplamento direto do sistema CLAE-EFS à sonda de RMN para que realização dos experimentos seja feita de maneira totalmente acoplada. Neste trabalho optou-se por trabalhar de forma isolada, uma vez que se otimiza a utilização de ambos os equipamentos.

Após o processo de adsorção dos compostos de interesse, os cartuchos de SPE foram evaporados com nitrogênio gasoso por 30 minutos, e então eluidos dos mesmos com solvente deuterado (250 µL) diretamente em tubos de RMN (Bruker, 3 mm de diâmetro externo), à 25°C. Para todas as amostras, os primeiros experimentos de RMN obtidos foram: ¹H, gCOSY, gHSQC, gHMBC. Outros experimentos, como por exemplo, RMN de ¹³C e gHMBC ¹H-¹⁵N, só foram adquiridos quando a identificação não era possível com esse conjunto de espectros. Todos os espectros foram adquiridos em uma temperatura controlada de 25°C. Os parâmetros de aquisição de cada um desses experimentos estão detalhados na TABELA 3.2.

TABELA 3.2 Parâmetros de aquisição dos espectros de RMN

Parâmetros ^A	¹ H	gCOSY	gHSQC	gHMBC
seqüência de pulsos	<i>lcpnf2</i>	<i>cosygpprqf</i>	<i>hsqcetgp</i>	<i>hmbcgpplndqf</i>
TD - TDF2	65.536	4.096	4.096	4.096
TDF1*	-	256	256	256
SW - SW2 (ppm)	20,02	20,02	20,02	20,02
SW1*(ppm)	-	20,02	238,88	238,82
AQ - AQF2 (s)	2,72	0,17	0,17	0,17
AQF1* (s)	-	0,01	0,003	0,004
ns	32	16	32	96
p1 ¹H (µs)	7,00	7,00	7,00	7,00
p1 ¹³C* (µs)	-	-	14,00	14,00
d1 (s)	2,4	1,0	1,0	1,0

^A Nomenclatura Bruker. * somente para os experimentos bidimensionais. TDF2 - número de pontos do domínio de tempo direto; TDF1 - número de pontos do domínio de tempo indireto; SW2 - janela espectral do domínio direto; SW1 - janela espectral do domínio indireto; AQ-F2 - tempo de aquisição no domínio direto; AQ-F1 - tempo de aquisição no domínio indireto; ns - número de promediações; p1 ¹H - duração do pulso de 90° ¹H; p1 – ¹³C - duração do pulso de 90° ¹³C; d1 - tempo de relaxação.

O processamento para os espectros de RMN de ^1H , foi feito aplicando-se uma transformada de Fourier com 65.536 pontos (SI), a fase (apk) e a linha de base (abs) foram corrigidas automaticamente. Para os espectros bidimensionais, os dados foram processados aplicando-se uma transformada de Fourier com 2048 pontos em F2 (**SIF2**) e 512 em F1 (**SIF1**), utilizando a função de apodização seno quadrado (**QSINE**) e o fator SSB igual a 3, em ambos os eixos. A fase foi ajustada manualmente.

Os espectros de ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ necessários foram realizados com a sequência de pulso **zgpg30**, sem girar a amostra e numa temperatura de 25°C. Os parâmetros de aquisição foram: número de pontos do domínio de tempo (**TD**) 32.768; janela espectral (**SW**) 240,0 ppm; tempo de aquisição (**AQ**) 0,68 s; número de promediações (**ns**) 1024; duração do pulso de 30° (^{13}C) 4,95 μs ; frequência central do pulso (**O1P**) 100,0 ppm; tempo de relaxação (**d1**) 0,2 s; programa de desacoplamento (**CPDPRG**) waltz16; duração do pulso de 90° para desacoplamento 90 μs . Na sequência, os dados foram processados utilizando uma rotina que o fabricante denomina **c13cryo**. Esta rotina contempla a realização da transformada de Fourier, que foi realizada com 32.768 pontos (**SI**), as correções automáticas de fase (**apk**) e de linha de base (**abs**). Além dessas correções rotineiras o processamento ainda elimina ruídos eletrônicos típicos da criosonda, uma vez que a bobina transmissora e receptora de sinal é sensível a aplicações de pulsos de mais alta potência, como é o caso dos pulsos no carbono-13.

3.6 - Equipamentos de espectrometria de massa

Os espectros de massa de baixa resolução foram adquiridos em um espectrômetro de massa com fonte de *electrospray* e analisador tipo *ion trap* modelo Bruker HCT Ultra PTM Discovery EDT II[®] (Bruker Daltonics, Alemanha). Os espectros de massa foram registrados pelo software DataAnalysis. Para todos os casos, os parâmetros de aquisição foram: pressão do nebulizador (*nebulizer*) 15,0 psi, vazão do gás de secagem (*dry gas*) 4L/min, temperatura de secagem (*dry temperature*) 200°C e amplitude de fragmentação (*amplitude fragmentation*) 2,00 V. Os espectros de massa de alta resolução – *High Resolution Mass Spectrometry* (HRMS) foram obtidos em um equipamento LTQ Orbitrap Velos FT-MS (Thermo Fisher Scientific), equipado com fonte de *electrospray* (HSEI-II).

3.7 - Materiais e equipamentos gerais

- Filtro de membrana - (PVDF *Membrane Syringe Filter*, TEDIA BRAZIL, 25 mm, 0,45 μm)
- Solvente acetonitrila – grau HPLC. HPLC/SPECTRO, TEDIA BRAZIL, LOT# 1110358
- Solvente metanol grau HPLC. HPLC/SPECTRO, TEDIA BRAZIL, LOT# 1110358.
- Ácido trifluoracético (TFA). HPLC, TEDIA BRAZIL, LOT# 1011342
- Coluna cromatográfica - PRONTOSIL EUROBOND C18 (125 x 4,0 mm, 5 μm).
- Metanol deuterado – MeOH- d_4 , Cambridge Isotope Laboratories, Inc. (CIL) D, 99,8%, LOT# 10k-076.
- Acetonitrila deuterada – MeCN- d_3 , Cambridge Isotope Laboratories, Inc. (CIL) D, 99,8%, LOT# 10k-076.
- Dimetil-sulfóxido deuterado – DMSO- d_6 , Cambridge Isotope Laboratories, Inc. (CIL), LOT# 10k-076.
- Balança analítica digital Bioprecisa modelo FA-2104N, com precisão de 0,1 mg.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4 - Resultados e discussão

4.1 - Ensaio de atividade biológica e antitumoral

Primeiramente foram avaliadas as atividades biológicas e antitumorais dos extratos de acetato de etila (AE), butanólico (B) e aquoso (A) do caldo de fermentação da bactéria de origem marinha *Streptomyces cebimarensis* SS99BA-2. Os três extratos foram testados contra as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e contra a levedura *Candida albicans*. Os testes foram feitos no laboratório de fermentação do Departamento de Engenharia Química/UFSCar, pelo aluno de doutorado Luiz Henrique Romano. Os ensaios foram feitos por halos de inibição através da metodologia descrita por LIRAS e MARTIN (2005). Os resultados obtidos podem ser vistos na TABELA 4.1, e mostram que apenas o extrato de acetato de etila (AE) apresentou atividade biológica contra *E. coli* e *C. albicans*. Essa atividade observada justificou um estudo detalhado dessa fração, pois isso poderia representar a possibilidade de desenvolvimento de novas drogas no tratamento de infecções por esses micro-organismos. E ainda, a literatura não relata descrições de compostos com atividade biológica produzidos pela bactéria em estudo.

TABELA 4.1 - Resultado dos bioensaios de atividade com os extratos obtidos a partir do micro-organismo *S. cebimarensis* SS99BA-2.

Extrato	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>
Aquoso (A)	-	-	-
Acetato de Etila (AE)	-	+	+
Butanólico (B)	-	-	-

Na sequência, foi avaliado o potencial antitumoral desses mesmos extratos obtidos, uma vez que micro-organismos marinhos produzem frequentemente compostos com potencial citotóxico elevado. Os ensaios foram feitos no laboratório de Oncologia Experimental da Faculdade de Medicina/UFC, pelo aluno de doutorado Felipe Augusto Rocha Rodrigues, sob a supervisão da profa. Dra. Cláudia do Ó Pessoa. Foram feitos testes de atividade com as linhagens de células tumorais SF-295 (sistema nervoso central) e HCT-8 (côlon humano), utilizando a metodologia descrita por SKEHAN et al. (1990). A TABELA 4.2 mostra

os resultados obtidos e mostra que o extrato butanólico se destaca por apresentar uma elevada atividade citotóxica específica contra a linhagem SF-295. Isso justifica um estudo detalhado desse extrato em particular, uma vez que nenhum composto com atividade antitumoral foi relatado para essa espécie de estreptomiceto marinho.

TABELA 4.2 – Ensaio de atividade citotóxica com os extratos obtidos a partir do micro-organismo *S. cebimarensis* SS99BA-2.

Extrato	SF-295 – GI%¹	S.D.²	HCT-8 – GI%¹	S.D.²
Aquoso (A)	40,79	2,18	24,72	5,19
Acetato de Etila (AE)	47,67	6,39	23,54	5,64
Butanólico (B)	100,98	1,02	25,80	8,24

¹ Grau de inibição ² Desvio padrão

4.2 - Análise do extrato de acetato de etila

Aproximadamente 3 mg do extrato seco de acetato de etila foram dissolvidos em 1,5 mL de uma mistura 1/1 de água mili-Q/metanol. A solução foi submetida à filtração por filtro de membrana (PVDF) e encaminhada à análise por HPLC.

Inicialmente, a amostra foi submetida a uma análise exploratória do perfil cromatográfico com base nos fatores de retenção (k) dos compostos presentes no extrato. O cromatograma representado na FIGURA 4.1, realizado a um fluxo de 1,0 mL/min e volume de injeção de 20 µL, foi inicialmente monitorado com o comprimento de onda de 254 nm, utilizando o eluente A (H₂O mili Q) e eluente B (Acetonitrila). Após a eluição cromatográfica foi realizada a limpeza da coluna com 100 % de B por 5 minutos, acompanhado por retorno do gradiente em 5 minutos (100-5% de B). A coluna foi condicionada por 5 minutos, totalizando assim 65 minutos para essa análise.

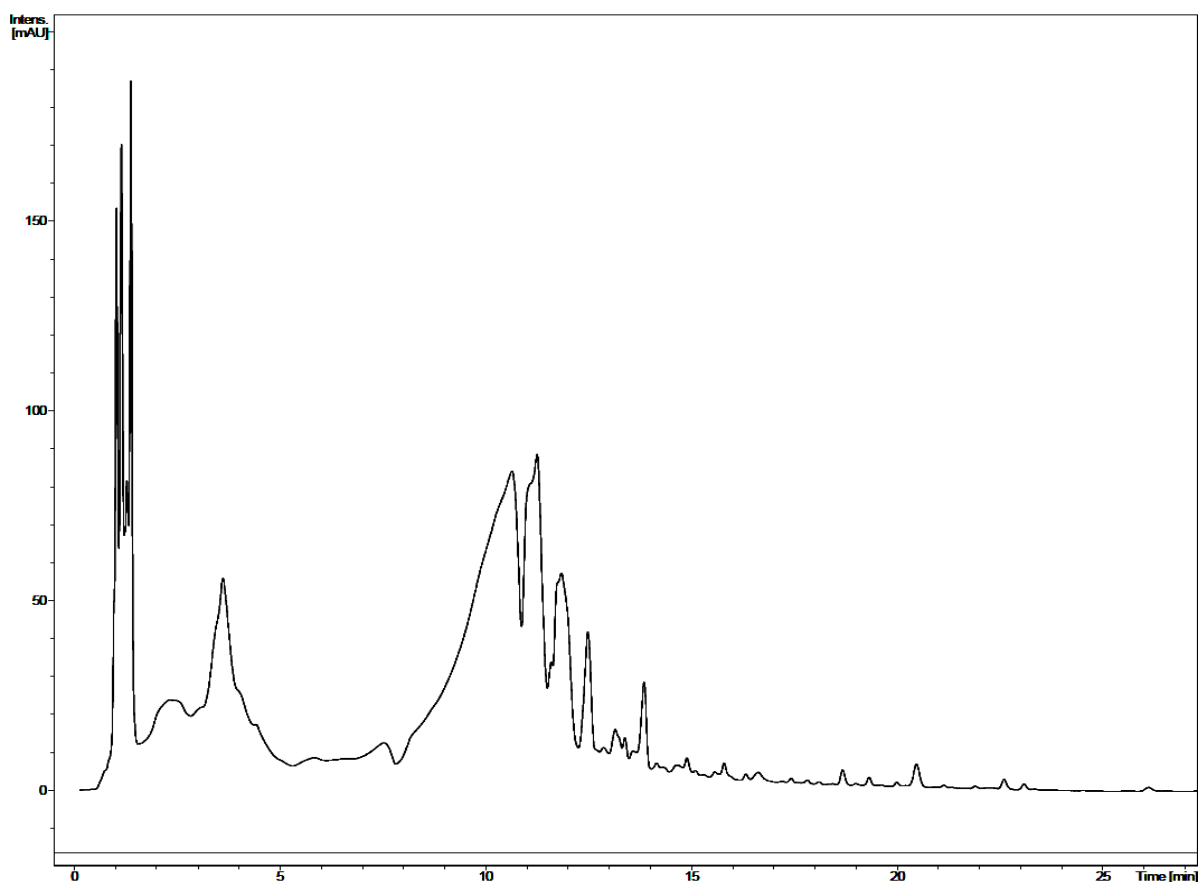


FIGURA 4.1 – Cromatograma ($\lambda 254$) do extrato acetato de etila (EA) do caldo de fermentação da bactéria *S. cebimarensis* SS99BA-2. Eluente A (H_2O mili Q) e eluente B (Acetonitrila). Eluição isocrática nos 5 minutos iniciais (5% de B / 95% de A), eluição gradiente 5-100% de B durante 45 minutos.

Analisando a FIGURA 4.1 é possível verificar a presença de bandas estreitas no começo do cromatograma e algumas bandas alargadas entre 2 e 15 minutos. Primeiramente, optou-se por utilizar o solvente orgânico metanol e o mesmo gradiente de eluição utilizado anteriormente com o objetivo de alterar a seletividade da separação cromatográfica, uma vez que acetonitrila é um solvente em que as interações dipolo-dipolo predominam no processo de solvatação, enquanto metanol, a solvatação ocorre preferencialmente por interações ácido-base de Lewis. O cromatograma resultante dessa modificação não mostrou qualquer melhora na seletividade.

Através da análise dos cromatogramas obtidos verifica-se que as bandas se apresentam alargadas sugerindo uma possível ionização não suprimida. Com base nisso, optou-se por adicionar 0,05 % de ácido trifluoracético (TFA) em cada um dos eluentes originado as seguintes fases móveis: Eluente A (H_2O mili-Q,

0,05% de TFA) e eluente B (Metanol, 0,05% de TFA). O gradiente utilizado foi o mesmo utilizado no método anterior. Os resultados dessa modificação podem ser vistos na FIGURA 4.2.

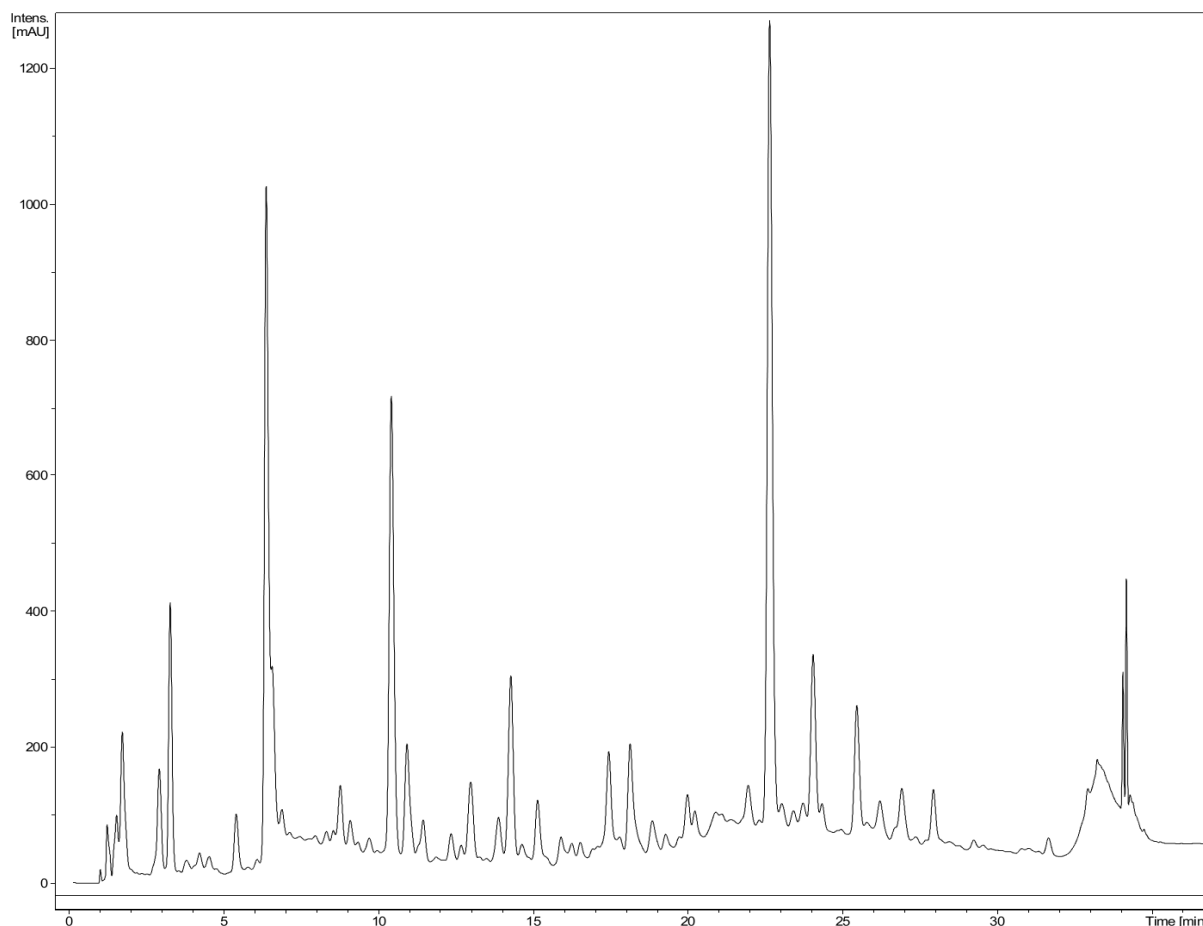


FIGURA 4.2 – Cromatograma ($\lambda 254$) do extrato acetato de etila (EA) do caldo de fermentação da bactéria *S. cebimarensis* SS99BA-2. Eluente A (H_2O mili-Q, 0,05% de TFA) e eluente B (Metanol, 0,05% de TFA). Eluição isocrática nos 5 minutos iniciais (5% de B / 95% de A), eluição gradiente 5-100% de B durante 45 minutos.

Através da análise da FIGURA 4.2, é possível notar a presença de bandas cromatográficas com resolução de linha de base em diversas partes do cromatograma. Através da análise de DAD-2D foi possível concluir sobre qual comprimento de onda é o mais adequado para as análises seguintes. A FIGURA 4.3 mostra o gráfico de DAD-2D. É possível verificar também a presença de outras bandas de absorção nessa mesma figura evidenciando a presença de compostos com alta e média polaridade. Optou-se então por seccionar o cromatograma em

duas partes, analisando então separadamente os compostos com fatores de retenção (k) menores e fatores de retenção (k) médios.

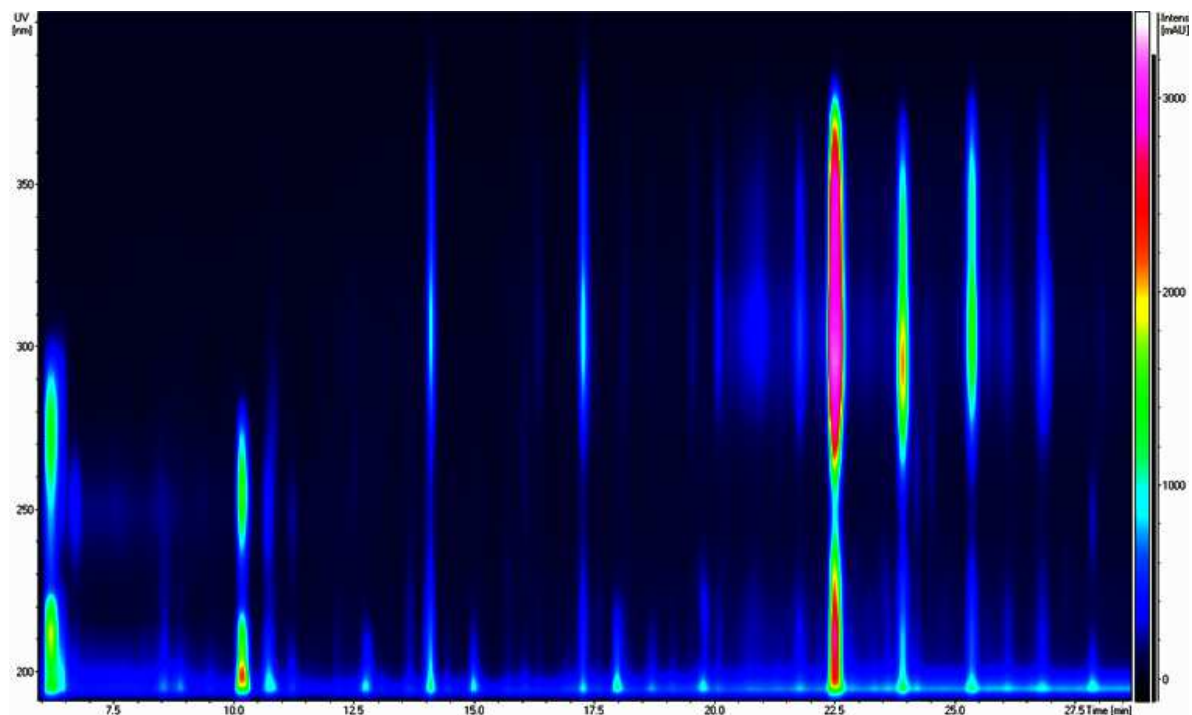


FIGURA 4.3 – Gráfico de DAD-2D para o cromatograma do extrato acetato de etila (EA) do caldo de fermentação da bactéria *S. cebimarensis* SS99BA-2. Modificador orgânico = Metanol, 0,05% de TFA.

Primeiramente foram analisadas as substâncias com fatores de retenção (k) menores. A otimização do método cromatográfico para esses compostos levou à obtenção do cromatograma representado na FIGURA 4.4, realizado a partir do seguinte método: volume de injeção 20 μ L, fluxo 1,0 mL/min, comprimento de onda monitorado 200 nm, eluente A (H_2O mili-Q, 0,05% de TFA) e eluente B (Metanol, 0,05% de TFA). Eluição isocrática nos 5 minutos iniciais (5% de B / 95% de A), eluição gradiente 5-30 % de B durante 25 minutos. Após a eluição cromatográfica foi realizada a limpeza da coluna com 100 % de B por 5 minutos acompanhados por retorno do gradiente em 5 minutos (100-5% de B). A coluna foi condicionada por 5 minutos, totalizando 45 minutos por análise. Pela FIGURA 4.5 pode-se identificar pelo menos sete bandas cromatográficas com resolução e intensidade de absorção suficientes para tentativa de adsorção por SPE utilizando o modo de operação *Threshold* descrito anteriormente. Essas bandas cromatográficas

são: AE1 (tr=9,77 min), AE2 (tr=10,20 min), AE3 (tr=15,61 min), AE4 (tr=17,72 min), AE5 (tr=18,35 min), AE6 (tr=25,24 min) e AE7 (tr=27,02 min).

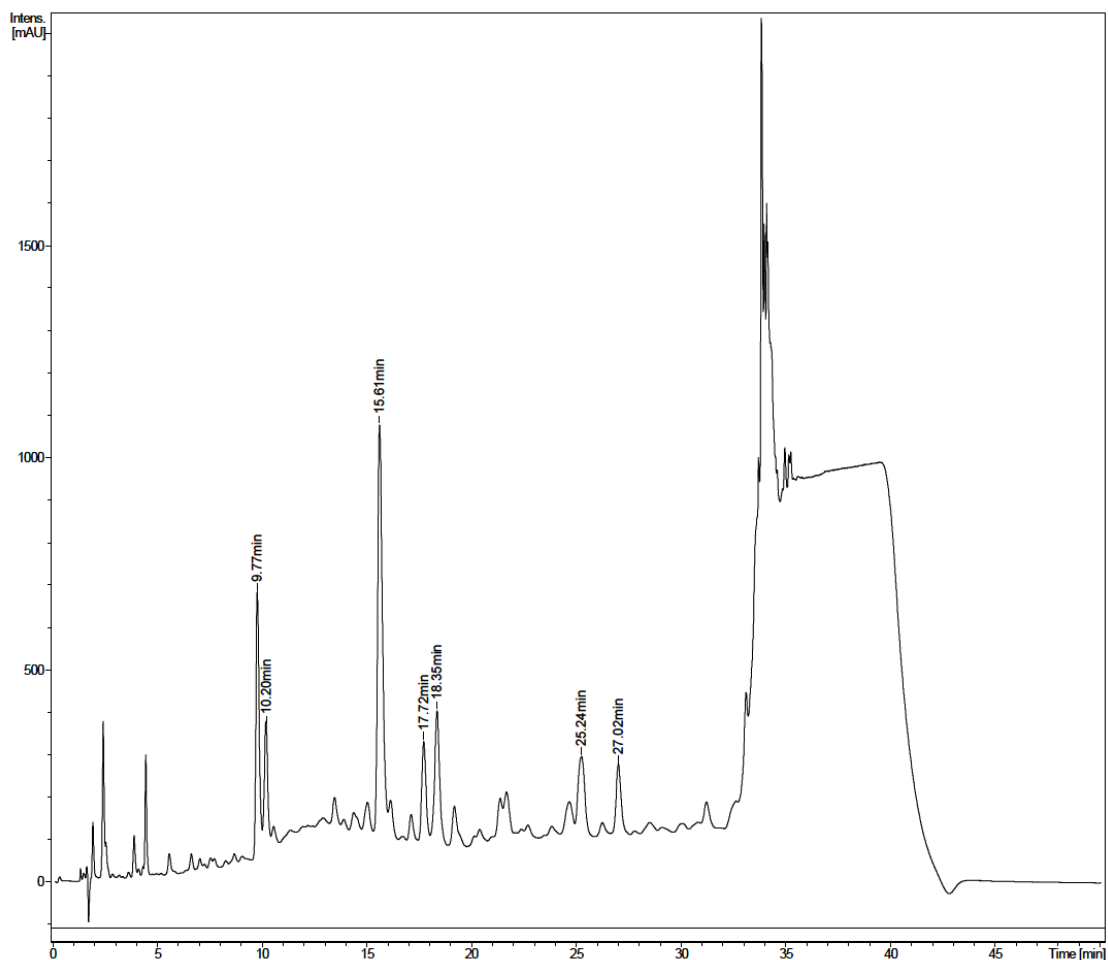


FIGURA 4.4 – Cromatograma otimizado ($\lambda 200$) do extrato acetato de etila (EA) do caldo de fermentação da bactéria *S. cebimarensis* SS99BA-2, compostos com menores fatores de retenção (k). Modificador orgânico = Metanol, 0,05% de TFA.

Primeiro tentou-se adsorver essas frações em cartuchos de fase estacionária *General Phase* (HysphereTM-resin) durante 30 corridas cromatográficas consecutivas gerando as amostras AE1GP, AE2GP, AE3GP, AE4GP, AE5GP, AE6GP e AE7GP. As sete amostras foram encaminhadas para análise por RMN, mas não houve retenção dos compostos em nenhuma das sete amostras analisadas. Na sequência trocou-se a fase estacionária dos cartuchos utilizados para HysphereTM-resin C18 HD na tentativa de alcançar alguma retenção dessas frações. Foram então geradas as amostras AE1C18, AE2C18, AE3C18, AE4C18, AE5C18, AE6C18 e AE7C18. Novamente não houve retenção em nenhum dos

casos. Para exemplificar, a FIGURA 4.5 mostra os espectros de RMN de ^1H para essas sete amostras. Os sinais observados são de baixa intensidade e relativos às impurezas provenientes por vezes dos cartuchos, mas em sua maior parte de *eppendorfs* e solventes deuterados.

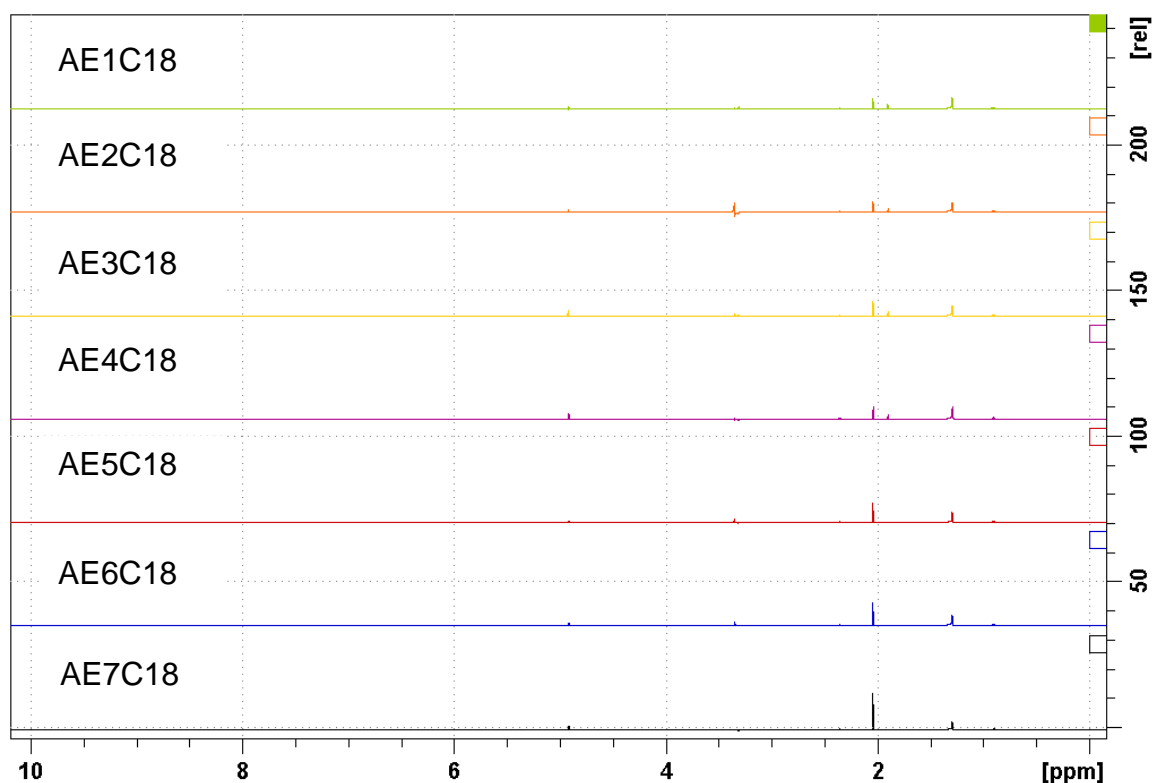
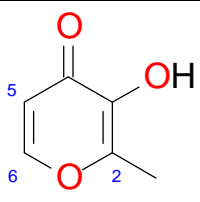
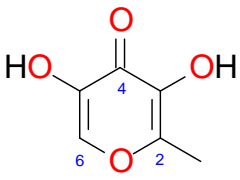
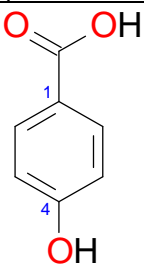
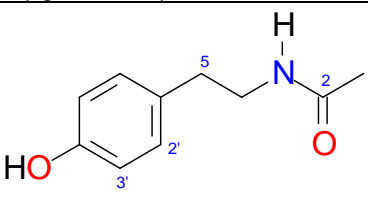
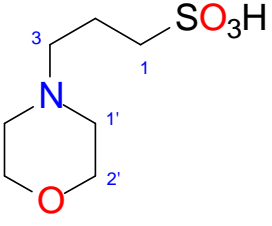


FIGURA 4.5 – Espectros de RMN de ^1H para as frações AE1C18, AE2C18, AE3C18, AE4C18, AE5C18, AE6C18 e AE7C18. ns = 32.

A próxima fase estacionária utilizada foi a HysphereTM-resin *Strong Hydrophobic* (SH) e as amostras AE1SH, AE2SH, AE3SH, AE4SH, AE5SH, AE6SH e AE7SH foram encaminhadas para análise por RMN. Das sete amostras analisadas, apenas as frações AE5SH e AE6SH não apresentaram retenção alguma, indicando que esta ainda não é a fase estacionária ideal para retenção desses analitos. As outras amostras apresentaram espectros com uma boa razão sinal/ruído, indicando a retenção eficiente dos compostos do extrato de acetato de etila e mostraram que a elucidação estrutural era possível. De posse dos dados espectroscópicos de RMN, apresentados na TABELA 4.3, foram identificados cinco compostos: maltol, 5-hidróxi-maltol, ácido 4-hidróxi benzoico, *N*-acetiltiramina e MOPS.

TABELA 4.3 – Dados espectroscópicos para os compostos majoritários das frações AE1SH, AE2SH, AE3SH, AE4SH e AE7SH.

		Dados de RMN		
Fração	Estrutura	no.	δ_C^*	δ_H , <i>mult.</i> (J em Hz)
AE1SH	 <p>Maltol – 200 μg em 250 μL de $\text{MeOH-}d_4$</p>	2 2' 3 4 5 6	152,0 13,4 144,5 175,0 113,9 155,9	2,34, s 6,37, <i>d</i> (5,54) 7,92, <i>d</i> (5,54)
AE2SH	 <p>5-hidróxi-maltol – 100 μg em 250 μL de $\text{MeOH-}d_4$</p>	2 2' 3 4 5 6	153,2 15,8 144,4 171,8 146,5 141,3	2,31, s 7,84, s
AE3SH	 <p>Ácido 4-hidróxi-benzoico – 300 μg em 250 μL de $\text{MeOH-}d_4$</p>	1' 1 2 3 4	171,5 124,3 132,5 115,4 163,6	7,87, <i>m</i> 6,80, <i>m</i>
AE4SH	 <p>N-acetiltiramina – 300 μg em 250 μL de $\text{MeOH-}d_4$</p>	1 2 4 5 1' 2' 3' 4'	23,1 174,2 43,6 37,3 131,9 131,6 117,6 157,9	1,89, s 3,29-3,33, <i>m</i> 2,67, <i>t</i> (7,3) 7,01-7,02, <i>m</i> 6,69-6,70, <i>m</i>
AE7SH	 <p>MOPS – 300 μg em 250 μL de $\text{Me}_2\text{SO-}d_6$</p>	-SO ₃ H 1 2 3 1'a 1'b 2'a 2'b	49,4 19,8 56,6 51,5 51,5 64,0 64,0	9,9 – 10,2, \hat{P} 2,65, <i>t</i> (6,8) 1,99, <i>q</i> (6,8) 3,14 - 3,29, <i>m</i> 2,92 - 3,08, <i>m</i> 3,38 - 3,55, <i>m</i> 3,50 - 3,65, <i>m</i> 3,90 - 4,05, <i>m</i>

* obtidos através dos dados de gHSQC e gHMBC. ^a = largo.

Os dados de RMN coletados sugerem que o composto presente em maior quantidade na fração AE1SH é o maltol (3-hidróxi-2-metil-4-pirona), um composto orgânico natural amplamente utilizado como aromatizante e edulcorante alimentício. Já foi descrito anteriormente como metabólito de micro-organismo (CUNNIGHAM e PICKARD, 1985), apresenta diversos tipos de atividade antifúngica e recentemente foi isolado das partes aéreas de *Abies pindrow* (SAMEJO *et al.*, 2009). Enquanto o composto presente em maior quantidade na fração AE2SH é o 5-hidróxi-maltol (3,5-dihidróxi-2-metil-4-pirona). Essa substância tem atividade antifúngica (KOSUGE *et al.*, 1983, ANDERSON *et al.*, 1988) comprovada contra *Pythium debaryanum*, um patógeno vegetal. Já foi isolado de cultivos da bactéria *Acetobacter cerinus* var. *ammoniacus* (SUZUKI e KINOSHITA, 1961) e do fungo *Penicillium echinulatum* (ANDERSON *et al.*, 1988). Este é o primeiro relato de produção de maltol e 5-hidróxi-maltol por estreptomiceto.

Após análise dos dados espectroscópicos coletados, pode-se concluir que o composto presente em maior quantidade na fração AE3SH é o ácido 4-hidróxi-benzóico. Esse composto orgânico é muito utilizado em indústrias químicas e eletrônicas, na produção de polímeros do tipo cristal líquido. Os ésteres correlatos, chamados de parabenos, têm sido utilizados como conservantes na indústria de alimentos e cosméticos. Já foi isolado de cultivos de bactérias marinhas *Strain A4B-17*, muitas outras do gênero *Microbulbifer*, (PENG *et al.*, 2006) e em cultivos de esponjas marinhas (ZHANG *et al.*, 2012). Não foram encontrados relatos de produção dessa substância por estreptomicetos.

A fração AE4SH é composto majoritariamente por *N*-acetiltiramina (*N*-[2-(4-hidróxifenil)etil]acetamida). Trata-se de um composto orgânico natural com atividade antibiótica, biosinteticamente formado por descarboxilação da *L*-tirosina seguida de acetilação. Foi isolada primeiramente a partir de um cultivo de fungo marinho *Fusarium sp.*, e na sequência outros pesquisadores a identificaram em cultivos das bactérias marinhas *Streptomyces acrymicini* (HERNÁNDEZ *et al.*, 2004), *Streptomyces griseus*, e *Streptomyces KMM 7210* (SOBOLEVSKAYA *et al.*, 2007). Ainda não havia sido descrita a produção dessa substância por *Streptomyces cebimarencis*.

O conjunto de dados de RMN levou à identificação da substância presente em maior quantidade na fração AE7SH como ácido 3-(*N*-morfolino)-propanossulfônico (MOPS). MOPS é um composto orgânico sintético, muito utilizado

em caldos de fermentação para controle de pH. É conhecido como “tampão biológico”, e bastante utilizado nas análises realizadas pelo grupo de pesquisa do laboratório de fermentação do Departamento de Engenharia Química da UFSCar. Uma vez que este não é um dos componentes adicionados ao meio de cultura realizado neste trabalho, suspeita-se que algum frasco de reagente estivesse contaminado com a substância encontrada na fração AE7SH. Para fins comparativos, o MOPS comercial (475922 MOPS, *Free Acid, Molecular Biology Grade*) foi analisado por RMN e os mesmos sinais foram verificados. Os dados espectroscópicos estão dispostos na TABELA 4.3.

Posteriormente, foi realizada uma otimização para a separação cromatográfica dos compostos com fatores de retenção (k) média no extrato de acetato de etila (EA). A otimização do método cromatográfico para esses compostos levou ao cromatograma representado na FIGURA 6, realizado a partir do seguinte método: volume de injeção 20 μ L, fluxo 1,0 mL/min, comprimento de onda monitorado 300 nm, eluente A (H_2O mili-Q, 0,05% de TFA) e eluente B (Metanol, 0,05% de TFA). Após a eluição cromatográfica foi realizada a limpeza da coluna com 100 % de B por 5 minutos acompanhado por retorno do gradiente em 5 minutos (100-5% de B). A coluna foi condicionada por 5 minutos, totalizando 45 minutos por análise. Pela FIGURA 4.6 podem-se identificar pelo menos seis bandas cromatográficas com resolução e intensidade de absorção suficientes para tentativa de adsorção por SPE utilizando o modo de operação *Threshold* descrito anteriormente. Foram feitas 30 corridas cromatográficas consecutivas na tentativa de adsorver os compostos presentes em maior quantidade nas bandas cromatográficas AE8 ($t_r=18,2$ min), AE9 ($t_r=21,6$ min), AE10 ($t_r=27,1$ min), AE11 ($t_r=28,5$ min), AE12 ($t_r=29,9$ min) e AE13 ($t_r=31,5$ min). As frações foram adsorvidas em cartuchos de fase estacionária *General Phase* (HysphereTM-resin).

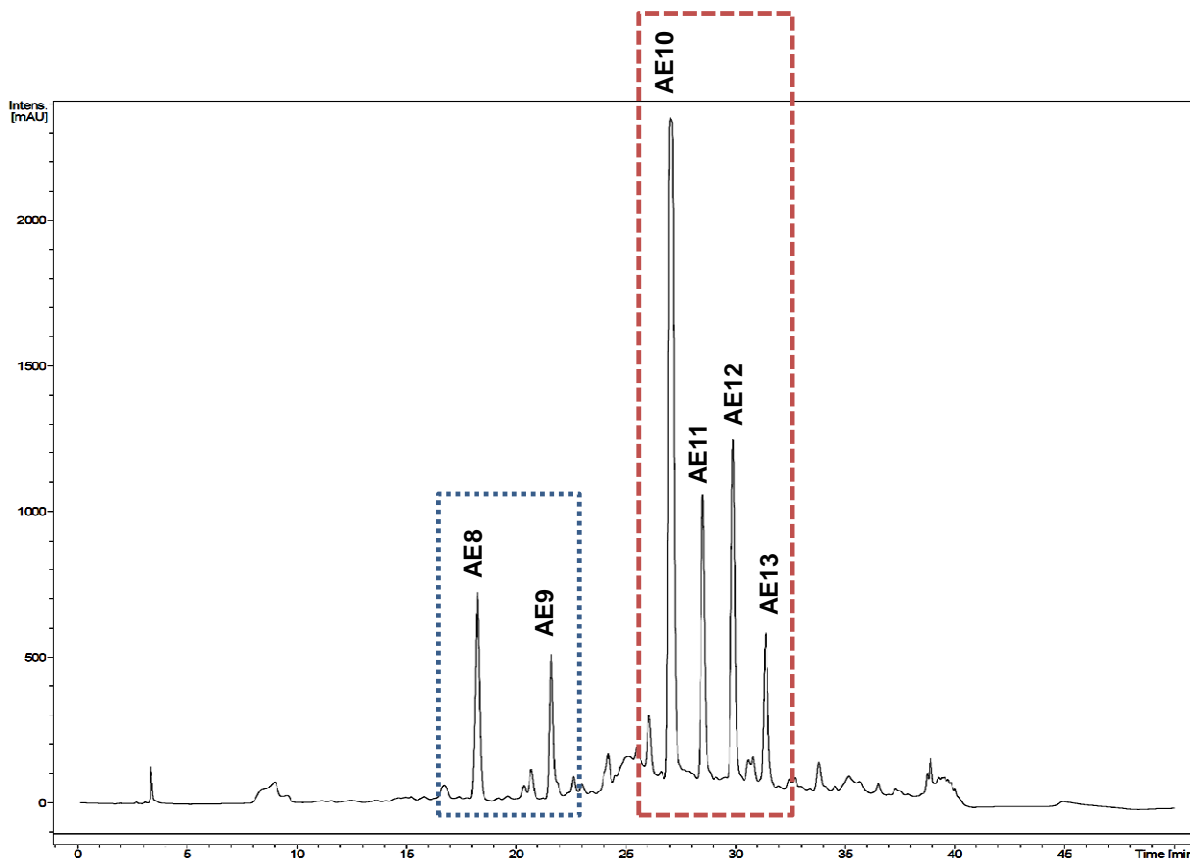


FIGURA 4.6 - Cromatograma otimizado ($\lambda 300$) do extrato acetato de etila (EA) do caldo de fermentação da bactéria *S. cebimarensis* SS99BA-2, compostos com fatores de retenção (k) médio. Eluente A (H_2O mili-Q, 0,05% de TFA) e eluente B (Metanol, 0,05% de TFA). Eluição isocrática nos 5 minutos iniciais (20% de B / 70% de A), eluição gradiente 20 – 70% de B durante 40 minutos.

Na sequência, serão descritas as elucidações estruturais dos compostos presentes em maior quantidade nas frações AE10GP, AE11GP, AE12GP e AE13GP (área tracejada em vermelho na FIGURA 4.31), e então, as elucidações estruturais dos compostos presentes em maior quantidade nas frações AE8GP e AE9GP (área tracejada em azul na FIGURA 4.31).

4.2.6 - Fração AE10GP

A fração identificada como fração AE10GP foi eluída do cartucho e analisada por RMN e espectrometria de massa (MS). A análise por MS foi feita utilizando um probe de *electrospray*, no modo positivo de ionização (FIGURA 4.7), e apresentou o pico $[M+H]^+$ m/z 239,2, equivalente à molécula protonada. Os dados

obtidos por espectrometria de massa de alta resolução (HRMS) indicaram a fórmula molecular $C_{11}H_{14}O_4N_2$ (FIGURA 4.8), com um índice de deficiência de hidrogênio igual a seis (6), relativo a duas ligações duplas carbono-nitrogênio, 2 ligações duplas carbono-carbono, uma ligação dupla carbono-oxigênio e um ciclo.

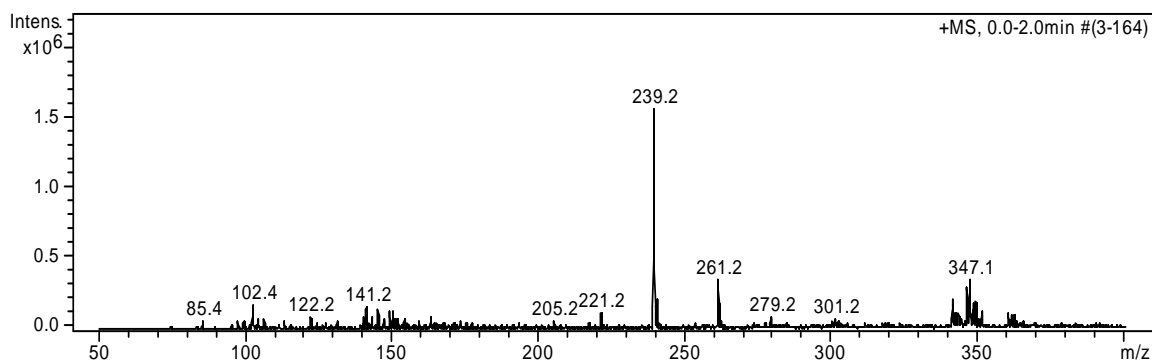


FIGURA 4.7 - Espectro de massa (*Full scan*) via *Electrospray* modo positivo para fração AE10GP.

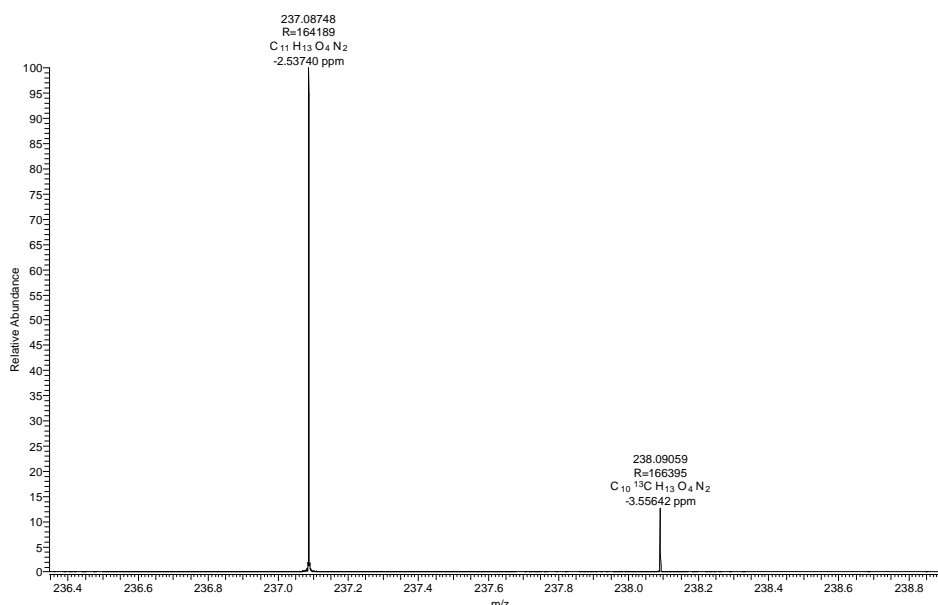


FIGURA 4.8 - HRMS, modo negativo de ionização ESI- Fração AE10GP.

Um espectro de RMN de 1H foi obtido utilizando a sequência de pulso lc1pnf2 (dupla pré-saturação). Na FIGURA 4.9 é possível visualizar esse espectro. Os resultados mostram dois dupletos na região de aromáticos e olefínicos, sendo um em δ_H 7,67 (H7, 1H, $^3J_{H7-H8} = 15,80$ Hz) e outro em δ_H 6,72 (H8, 1H, $^3J_{H8-H7} = 15,80$ Hz). Essa constante de acoplamento indica a presença de um sistema de ligação dupla dissustituída de configuração *trans*. É possível visualizar também um

simpleto em δ_H 4,64 (H6', 2H). Essa região indica possibilidade desses hidrogênios estarem próximos a um elemento eletronegativo, como por exemplo, oxigênio, e também a sistemas aromáticos. Na região alifática, um hepteto em δ_H 3,39 (H10, 1H, $^3J_{H10-H11,12} = 7,0$ Hz) e em δ_H 1,24, um duplete (H11 e H12, 6H, $^3J_{H11,12-H10} = 7,0$ Hz). De acordo com esses dados, é possível concluir que um grupo isoprópila faz parte da estrutura molecular.

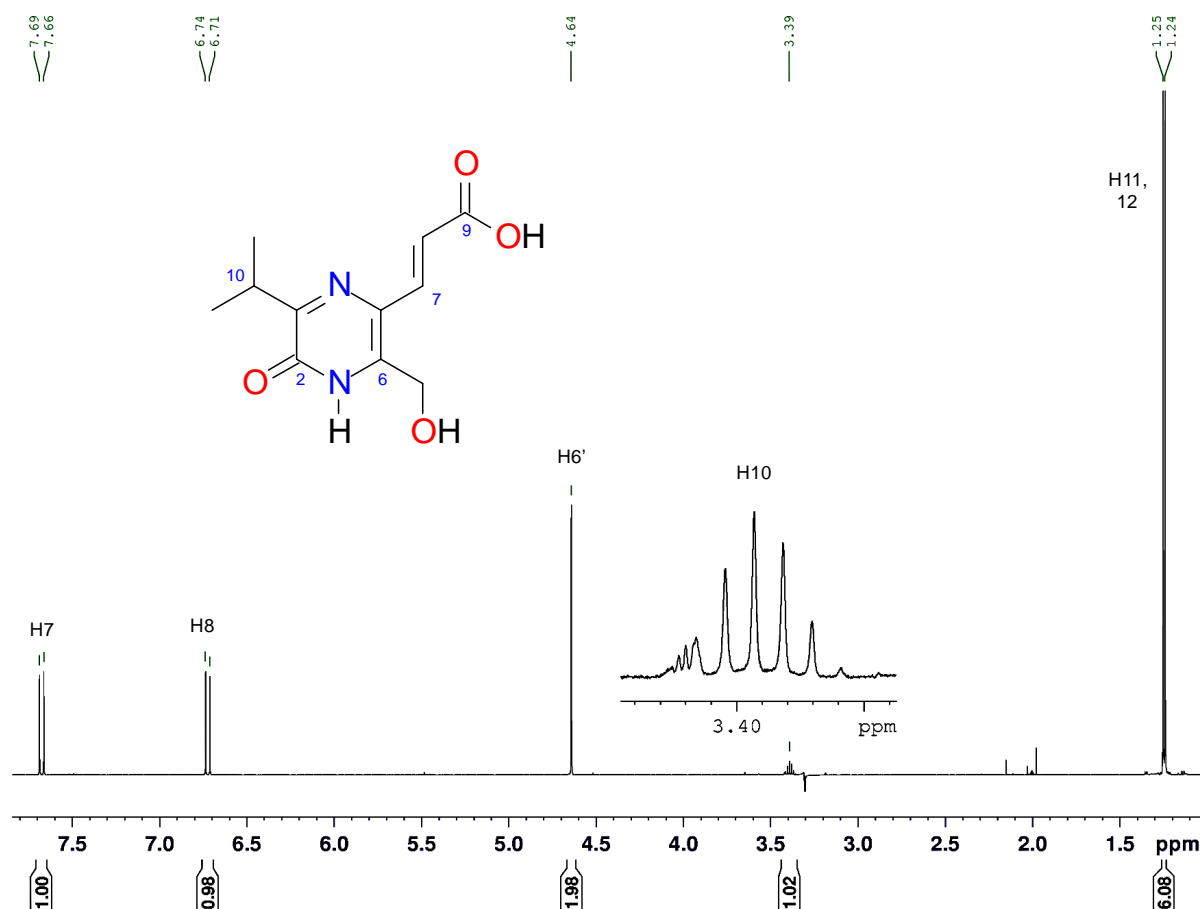


FIGURA 4.9 – Espectro de RMN de 1H da fração AE10GP, 500 μ g em 250 μ L de MeOH- d_4).

A confirmação dessas suposições foi realizada através da análise do mapa de contorno gCOSY. Esse experimento foi realizado utilizando a sequência de pulso cosyppprgf. A FIGURA 4.10 mostra esse espectro, onde é possível verificar a correlação entre os hidrogênios δ_H 7,67 (H7) e δ_H 6,72 (H8) e os hidrogênios δ_H 3,39 (H10) e δ_H 1,24 (H11 e H12).

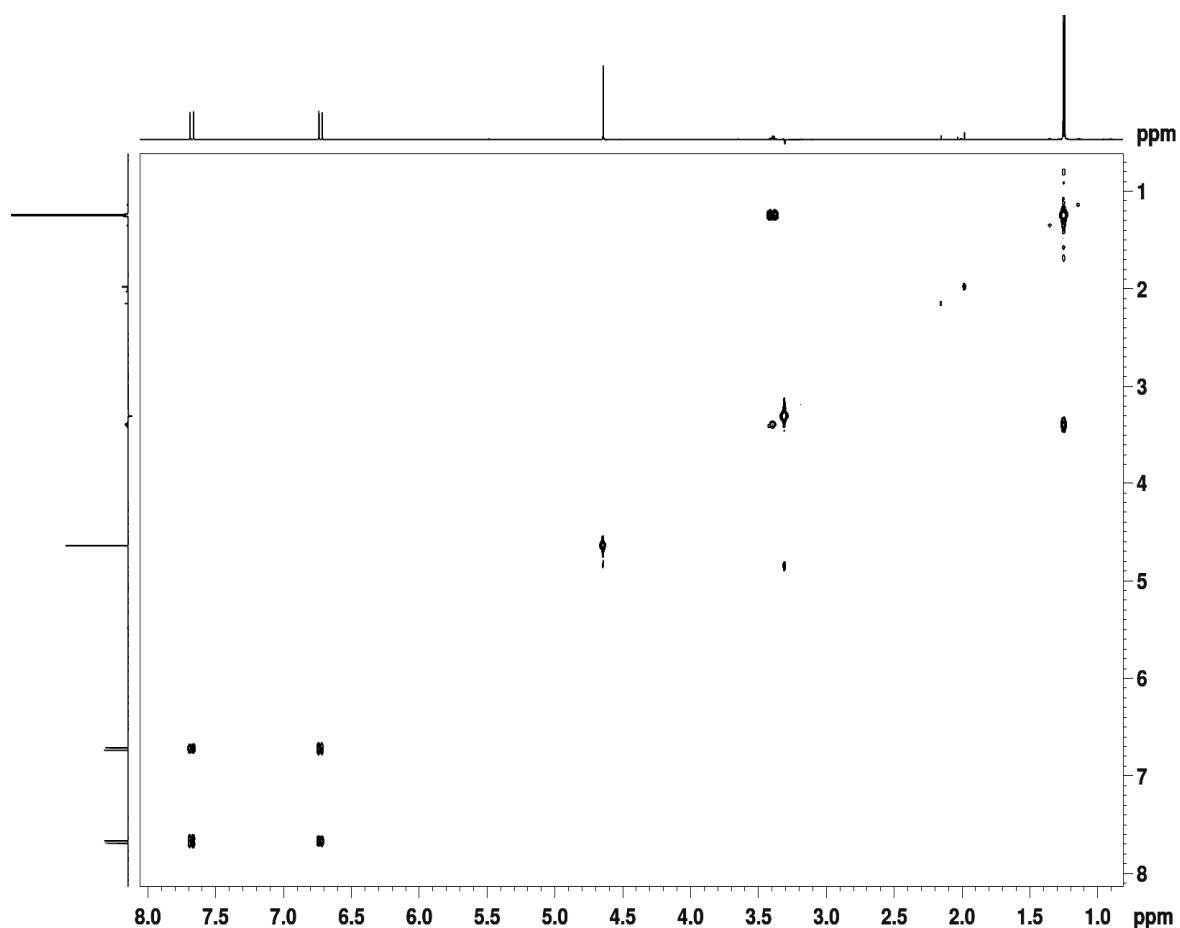


FIGURA 4.10 – Mapa de contorno gCOSY da fração AE10GP.

Os valores dos deslocamentos dos carbonos ligados diretamente a hidrogênios, foram atribuídos a partir do experimento de gHSQC – sequência de pulso hsqcetgp (FIGURA 4.12), sendo eles os carbonos em δ_C 138,7 (C7), ligado ao hidrogênio δ_H 7,67 (H7); δ_C 119,1 (C8), ligado ao hidrogênio δ_H 6,72 (H8) confirmando a presença de uma ligação dupla *trans*; δ_C 57,7 ppm (C6') ligado aos hidrogênios δ_H 4,64 (H6') confirmando a presença de um grupo carbinólico, δ_C 31,4 (C10) ligado ao hidrogênio δ_H 3,39 (H10) e δ_C 20,4 ppm (C11, C12) ligado aos hidrogênios δ_H 1,24 (H11, H12), confirmando a presença do grupamento isopropila (FIGURA 4.11).

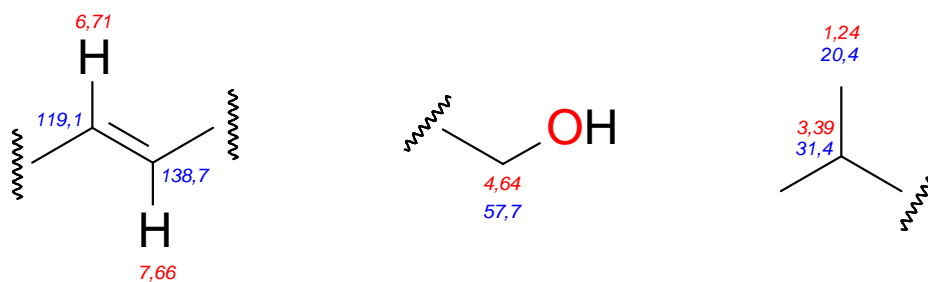


FIGURA 4.11 – Subestruturas identificadas com os dados apresentados até o momento. Os valores em vermelho são os deslocamentos químicos (em ppm) de RMN de ^1H e em azul, RMN de ^{13}C .

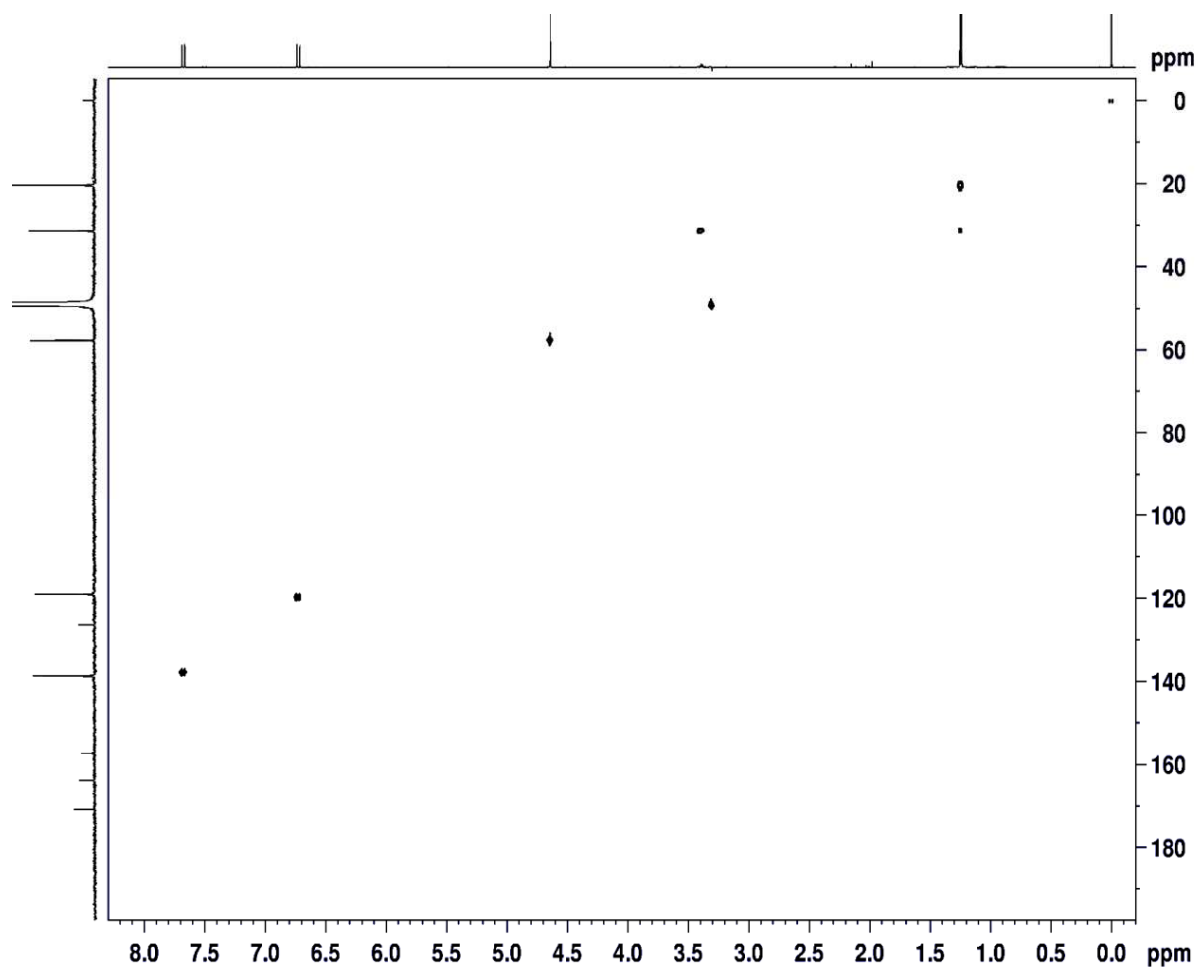


FIGURA 4.12 – Mapa de contorno gHSQC da fração AE10GP.

A FIGURA 4.13 mostra o mapa de contorno gHMBC– sequência de pulso hmbcgplpndqf obtido para a fração AE10GP.

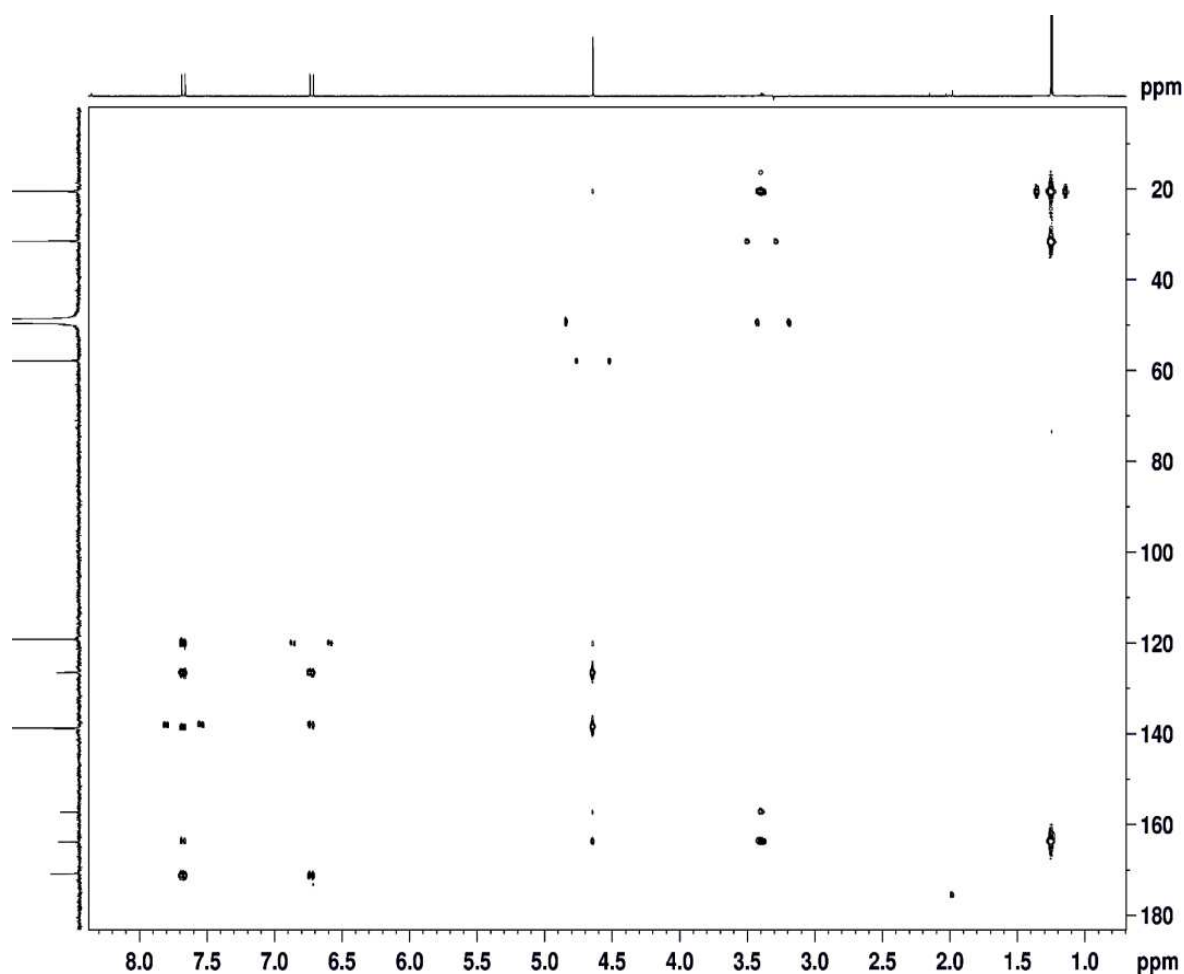


FIGURA 4.13 – Mapa de contorno gHMBC da fração AE10GP.

Os hidrogênios em δ_H 1,24 (H11, 12) apresentaram correlação com os carbonos em δ_C 31,4 (C10) relativo ao carbono metínico do grupo isopropila, e δ_C 163,8 (C3), atribuído à um carbono sp^2 não conectado à hidrogênio. O hidrogênio em δ_H 3,39 (H10) apresentou correlação com os carbonos δ_C 20,4 (C11, 12), δ_C 157,2 (C2), atribuído a uma carbonila e δ_C 163,8 (C3) fechando a subestrutura A, conforme pode ser observado na FIGURA 4.14. Os hidrogênios δ_H 4,64 (H6') apresentaram correlações com os carbonos em δ_C 126,4 (C5), atribuído a um carbono sp^2 não conectado a hidrogênio, δ_C 138,8 (C6), atribuído à um carbono sp^2 não conectado a hidrogênio, δ_C 157,2 (C2) e δ_C 163,8 (C3). O hidrogênio em δ_H 6,72 (H8) apresentou correlações com os carbonos em δ_C 126,4 (C5), δ_C 138,8 (C6) e δ_C 170,8 (C9), atribuído a uma carboxila. Por fim, o hidrogênio em δ_H 7,67 (H7) apresentou correlação com os carbonos δ_C 119,1 (C8), δ_C 126,4 (C5), δ_C 138,8 (C6), δ_C 163,8 (C3) e δ_C 170,8 (C9) fechando a subestrutura B (FIGURA 4.14).

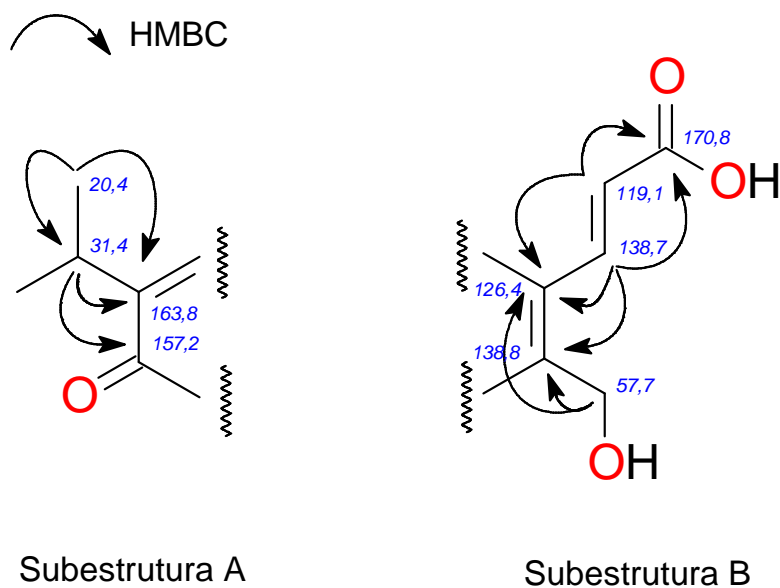


FIGURA 4.14 – Subestruturas identificadas a partir das análises do espectro de *g*HMBC.

Posteriormente foi realizado um espectro de RMN de ^{13}C , uma vez que a baixa resolução na dimensão F2 no espectro de *g*HMBC não permitiu identificar precisamente os carbonos sp^2 com deslocamentos químicos em aproximadamente δ_{C} 138 ppm. O experimento foi realizado utilizando a sequência de pulso *zpgg30*. O resultado pode ser visualizado na FIGURA 4.15. O espectro indicou a presença de 11 átomos de carbonos, sendo 4 sp^3 , 3 referentes ao grupamento isopropila e 1 ligado diretamente à oxigênio, 2 olefínicos referentes à ligação dupla *trans*, e 5 carbonos sp^2 não conectados a hidrogênio.

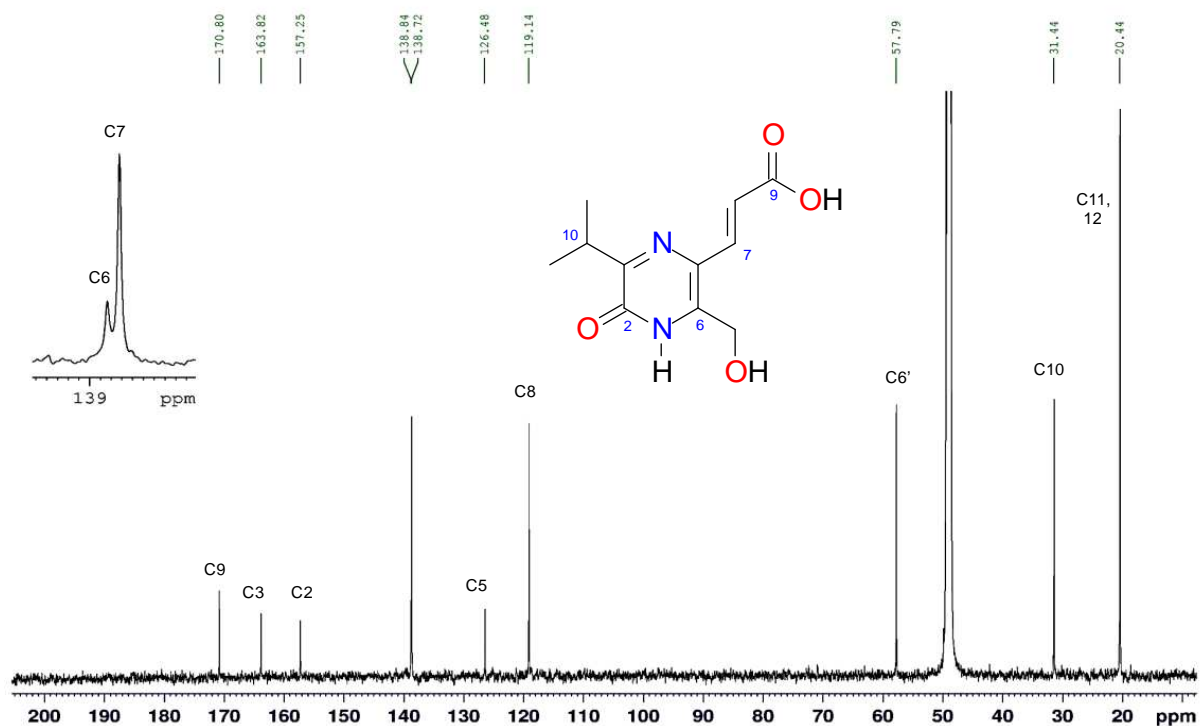


FIGURA 4.15 – Espectro de RMN de ¹³C da fração AE10GP. ns= 92K, td= 32K, sw= 238,8 ppm, aq=0,45 s e d1= 0,20 s.

De acordo com a análise por espectrometria de massa de alta resolução, a fórmula molecular é C₁₁H₁₄O₄N₂. Uma proposta plausível para todos os dados experimentais apresentados seria consistente com um sistema pirazina. A presença dos dois átomos de nitrogênio foi confirmada por RMN de nitrogênio-15 através de um espectro de HMBC ¹H-¹⁵N (FIGURA 4.16) que mostrou a presença de dois nitrogênios na molécula com deslocamento químico de δ_N 357,9 (N1) e δ_N 373,1 (N2), consistentes com nitrogênios pertencentes a sistema pirazina (LEVY e LICHTER, 1979). O hidrogênio em δ_H 4,64 (H6') apresentou correlação com o primeiro e os hidrogênios em δ_H 3,39 (H10) e δ_H 7,67 (H7) apresentaram correlação com o segundo (FIGURA 4.42). O deslocamento químico de nitrogênio-15 foi calibrado com referência externa utilizando nitro-metano (CH₃NO₂).

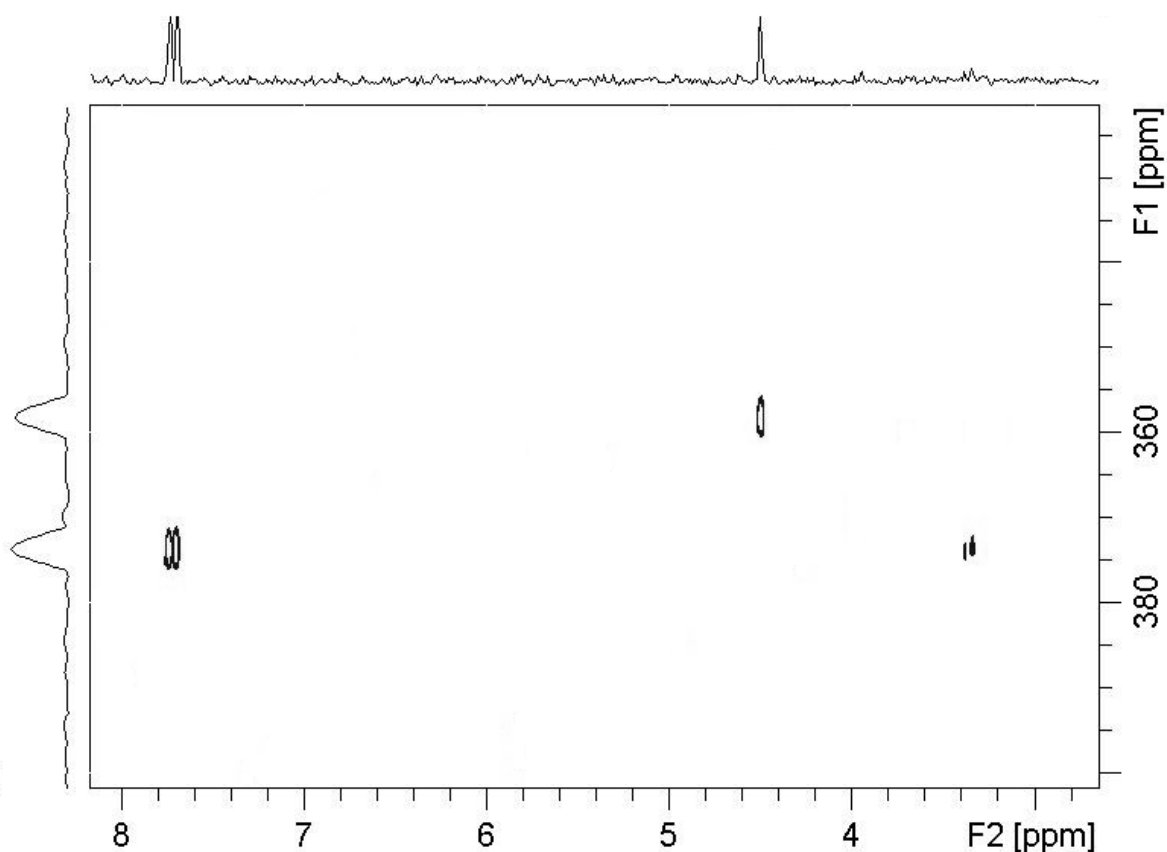


FIGURA 4.16 – Mapa de contorno HMBC ^1H - ^{15}N da fração AE10GP.

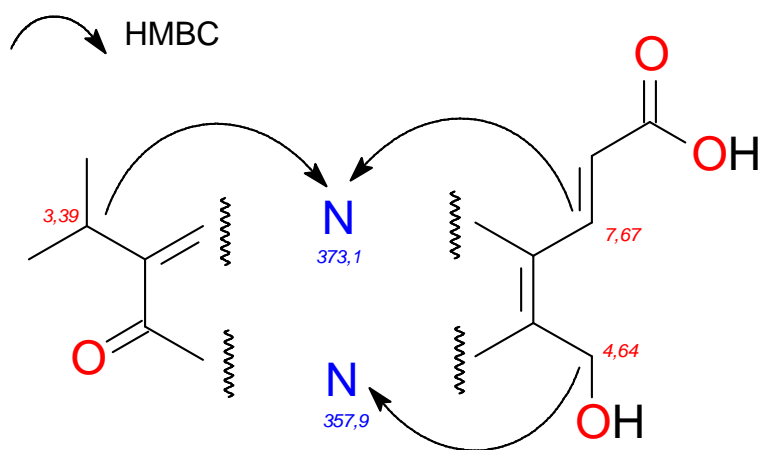


FIGURA 4.17 – Correlações HMBC ^1H - ^{15}N observadas.

Dessa forma conclui-se que o composto presente em maior quantidade na fração AE10GP tem sua fórmula estrutural consistente com um sistema pirazin-2(1*H*)-ona 3,5,6 trissubstituído (FIGURA 4.18). Essa proposta é a que melhor corresponde a todos os dados experimentais obtidos. Trata-se de uma substância inédita na área de produtos naturais, sendo o terceiro relato de pirazin-2(1*H*)-ona

3,5,6-trissubstituída natural. Todas essas informações experimentais foram colocadas em conjunto em uma mesma tabela (TABELA 4.4) para facilitar a visualização das informações.

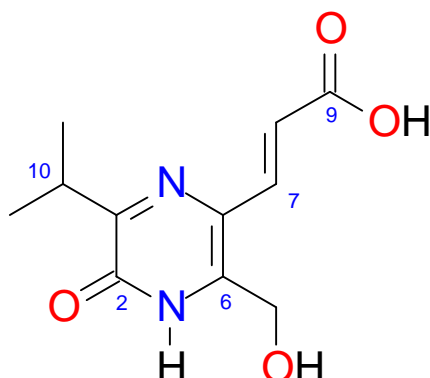


FIGURA 4.18 – Fórmula estrutural do composto presente em maior quantidade na fração AE10GP.

TABELA 4.4 – Dados espectroscópicos para o composto majoritário da fração AE10GP (^{13}C , 150 MHz; ^1H , 600 MHz, 500 μg em 250 μL de $\text{MeOH-}d_4$).

no.	δ_{C}	δ_{H} , <i>mult.</i> (J em Hz)	COSY	HMBC
2	157,2			
3	163,8			
5	126,4			
6	138,8			
6'	57,7	4,64, s		2, 3, 5, 6, 7
7	138,7	7,67, d (15,8)	8	3, 5, 6, 8, 9
8	119,1	6,72, d (15,8)	7	5, 6, 7, 9
9	170,8			
10	31,4	3,39, h (7,0)	11, 12	2, 3, 11, 12
11, 12	20,4	1,24, d (7,0)	10	3, 10

Tendo sido proposta, por RMN, uma possível estrutura inédita para o composto dessa fração, o perfil de fragmentação do espectro de massa (FIGURA 4.19) foi analisado. O pico mais intenso foi o de razão massa/carga m/z 221,2, atribuído à perda da hidroxila da carboxila, uma vez que essa fragmentação gera um íon acílio estabilizado por ressonância. O pico m/z 203,2 equivale a uma perda de uma molécula de água a partir do íon acílio. O pico m/z 193,2 equivale a uma

unidade de dióxido de carbono (CO₂) equivalente a perda do grupo carboxila da estrutura.

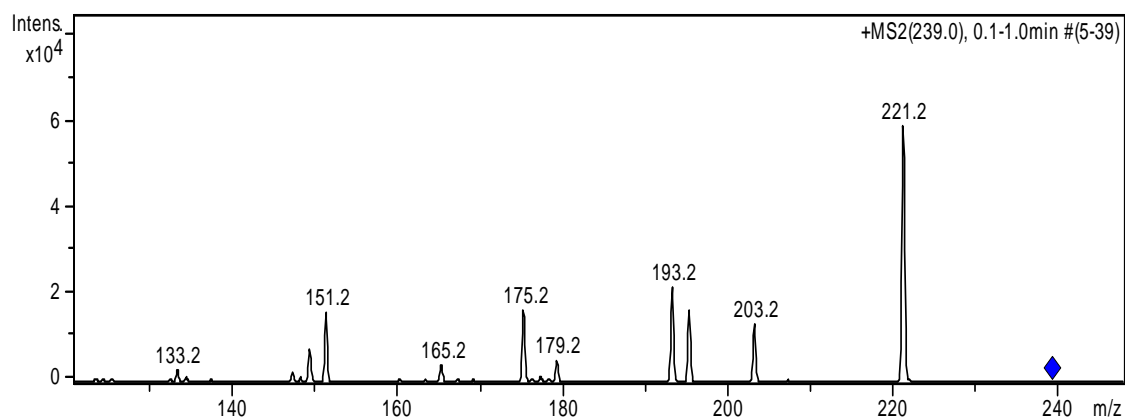


FIGURA 4.19 – Espectro de fragmentação do íon $[M+H]^+$ m/z 239,2 em MS².

Na sequência, foi feita a fragmentação do íon acílio m/z 221,2 em MS³, que originou os seguintes íons-filhos: m/z 203,2, 193,2, 175,2, 160,2, 151,2 e 132,4, conforme está apresentado na FIGURA 4.20.

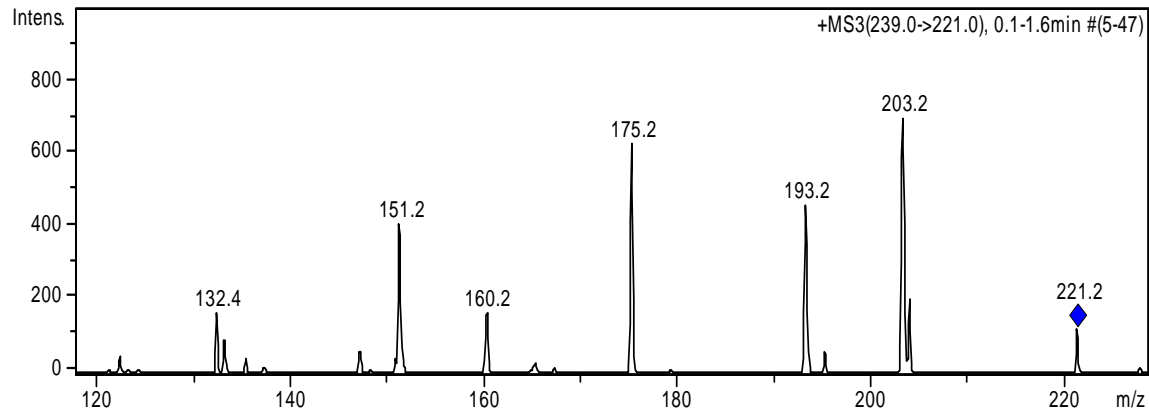


FIGURA 4.20 - Fragmentação em MS³ do íon m/z 221,2.

Uma análise desse perfil mostra que esses picos devem ser gerados pela perda de monóxido de carbono (CO), do grupamento isopropila e de uma molécula de água (H₂O). Os picos seriam gerados de acordo com a ordem de saída desses grupamentos. Quando o íon acílio (m/z 221,2) perde, nesta sequência, uma unidade de monóxido de carbono, o grupo isopropila e uma molécula de água, gera os íons m/z 193,2, 151,2 e 132,4. Quando o íon acílio perde, nesta sequência, uma unidade de água, o grupo isopropila e uma unidade de monóxido de carbono, gera

os íons m/z 203,2, 160,2 e 132,4. Os outros picos seriam todas variações dessa mesma proposta.

4.2.7 - Fração AE11GP

A fração identificada como AE11GP foi eluída do cartucho e analisada por RMN e espectrometria de massa (MS) (FIGURA 4.21 [A]) e espectrometria de massa de alta resolução (FIGURA 4.21 [B]). A análise por MS apresentou o pico $[M+H]^+$ m/z 209,2, equivalente à molécula protonada. Essa relação massa/carga indicou a fórmula molecular $C_{10}H_{12}O_3N_2$.

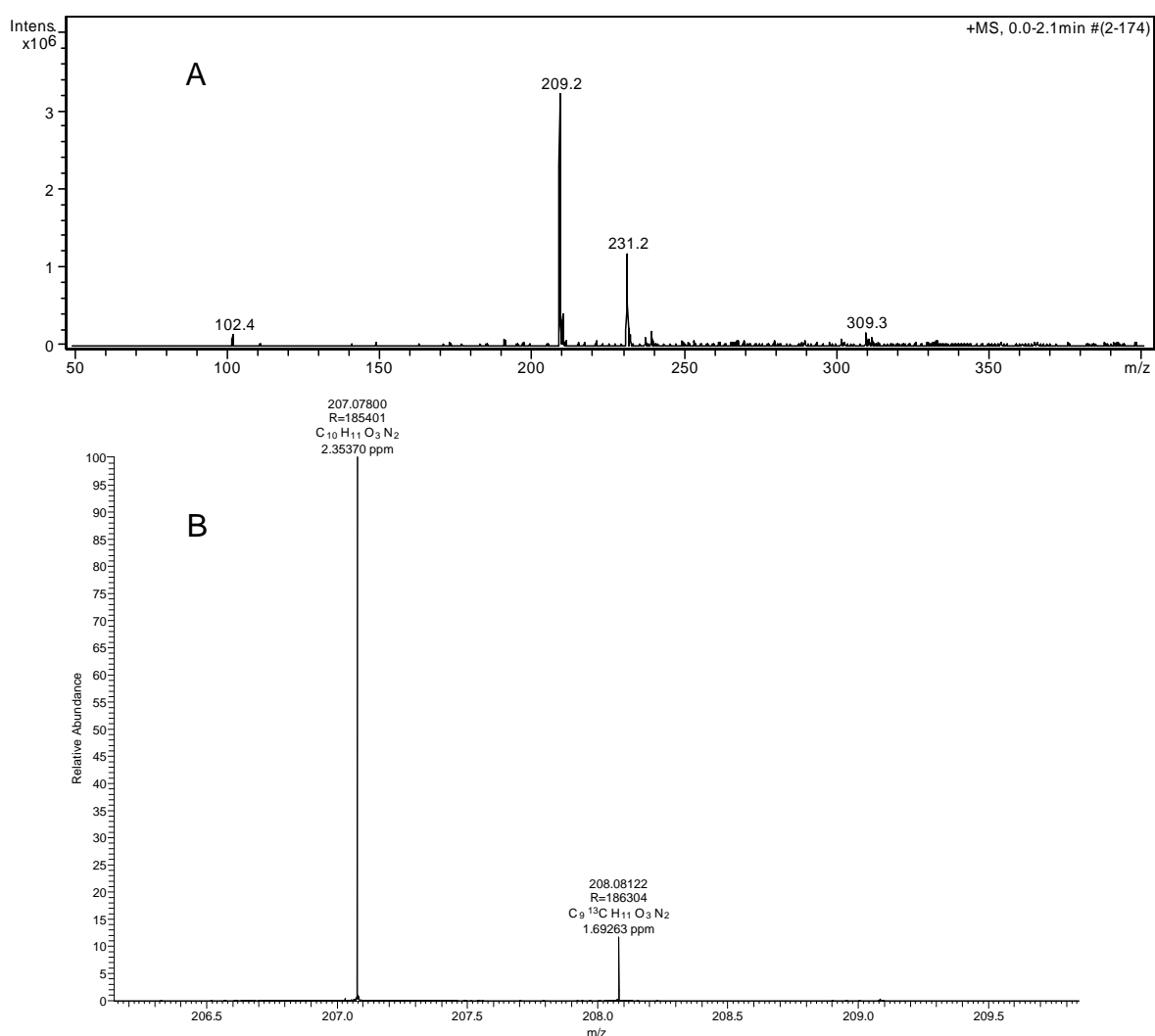


FIGURA 4.21 – (A) Espectro de Massas (*Full scan*) via *Electrospray* modo positivo (B) HRMS, modo negativo de ionização ESI– Fração AE11GP

Na sequência foi obtido um espectro de ^1H , utilizando a sequência de pulso lc1pnf2 (dupla pré-saturação). Na FIGURA 4.22 é possível visualizar o espectro obtido. Os resultados mostram dois dupletos na região de aromáticos e olefínicos, sendo um em δ_{H} 7,38 (H7, 1H, $^3J_{\text{H7-H8}} = 15,29$ Hz) e outro em δ_{H} 6,66 (H8, 1H, $^3J_{\text{H8-H7}} = 15,29$ Hz). Essa constante de acoplamento indica a presença do mesmo sistema de ligação dupla *trans*, verificado no composto eluído fração AE10GP. Ainda nessa região, agora é possível verificar a presença de um simpleto em δ_{H} 7,38 (H6, 1H) que indica a possibilidade desse hidrogênio estar conectado a um sistema aromático. Na região alifática, um hepteto em δ_{H} 3,40 (H10, 1H, $^3J_{\text{H10-H11,12}} = 7$ Hz) e em δ 1,24, um duplete (H11 e H12, 6H, $^3J_{\text{H11,12-H10}} = 7$ Hz). De acordo com esses dados, é possível concluir que o grupo isoprila verificado na estrutura anterior, também esta presente nesta molécula. A multiplicidade desses sinais pode ser melhor visualizada nas expansões apresentadas na parte superior da FIGURA 4.49. A confirmação dessas suposições foi realizada através da análise do espectro de *g*COSY. Nesse espectro foi possível verificar a correlação entre os hidrogênios δ_{H} 7,38 (H6) e δ_{H} 6,66 (H8) e os hidrogênios δ_{H} 3,40 (H10) e δ_{H} 1,24 (H11, 12).

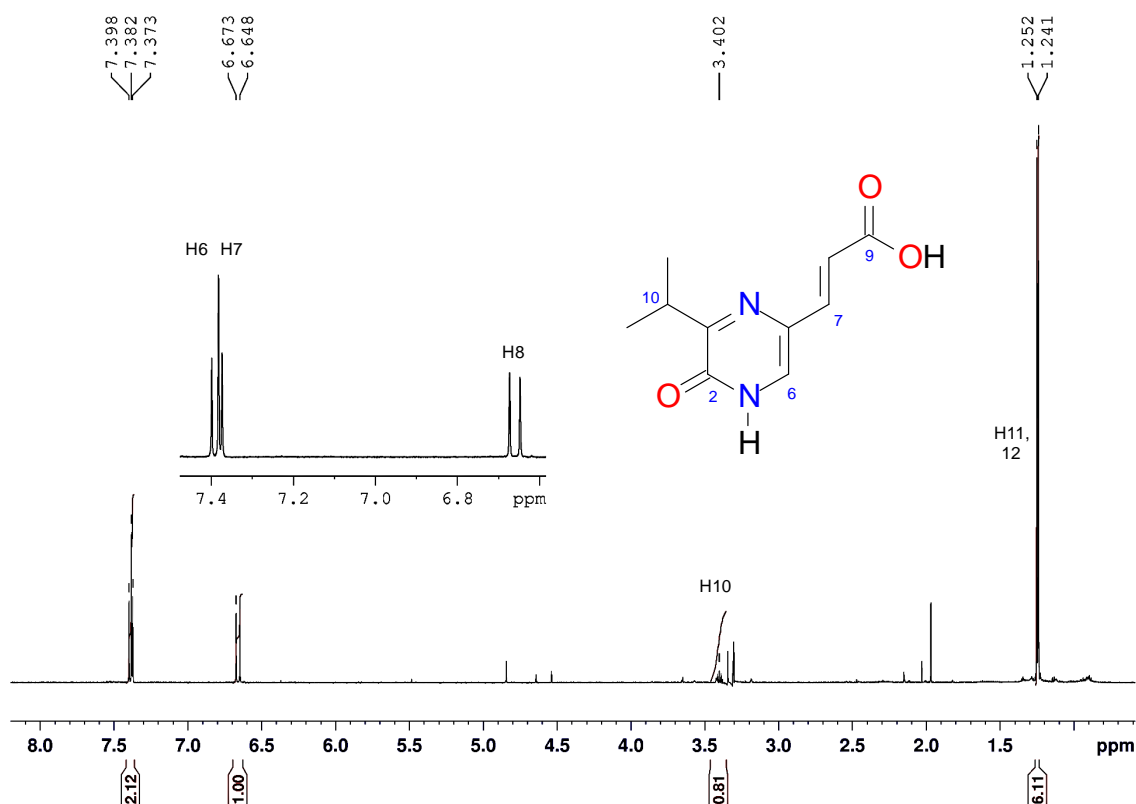


FIGURA 4.22 – Espectro de RMN de ^1H da fração AE11GP, 300 μg em 250 μL de $\text{MeOH-}d_4$).

O espectro de RMN de ^{13}C foi obtido utilizando a sequência de pulso zgpg30. O resultado pode ser visualizado na FIGURA 4.23. Foi verificada a presença de 10 átomos de carbonos, sendo 3 sp^3 , 2 olefínicos referentes à ligação dupla *trans*, e 5 carbonos sp^2 não conectados à hidrogênio.

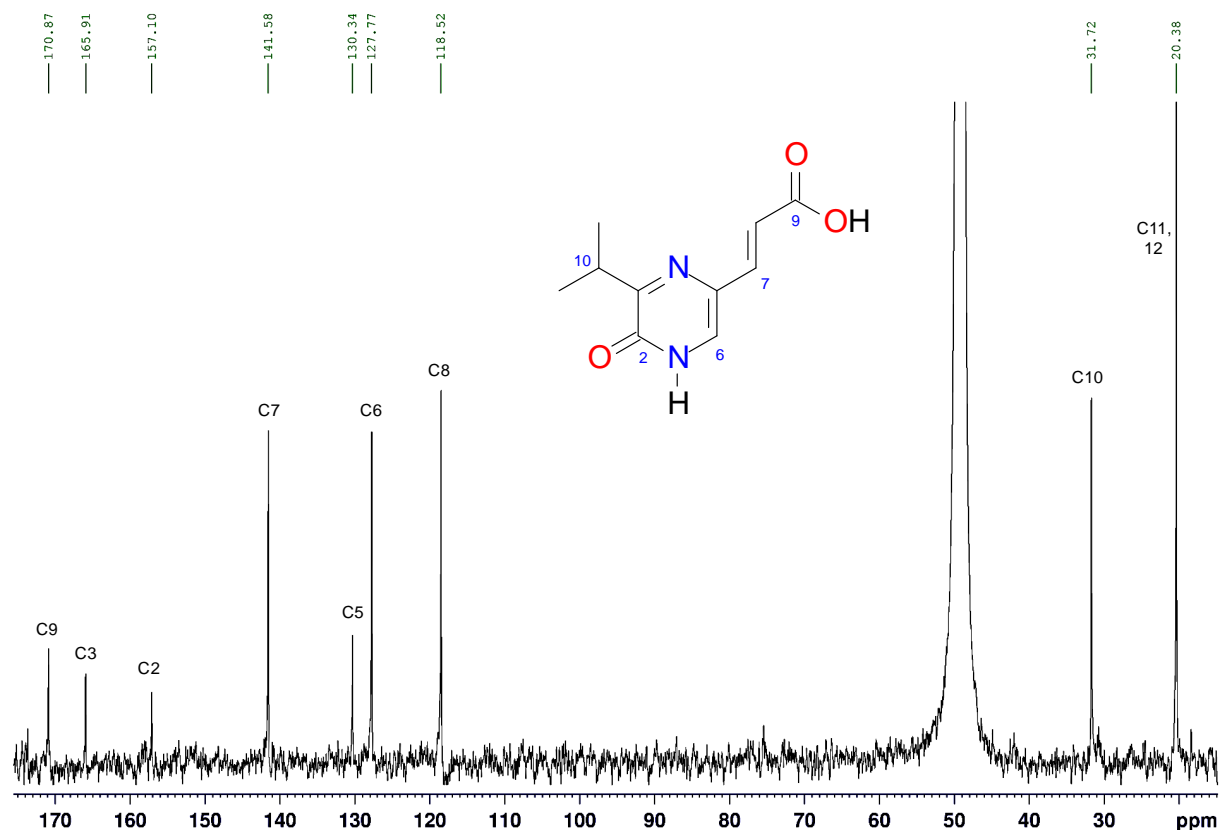


FIGURA 4.23 – Espectro de RMN de ^{13}C da fração AE11GP. ns= 92K, td= 32K, sw= 238,8 ppm, aq=0,45 s e d1= 0,20 s.

Os valores dos deslocamentos dos carbonos ligados diretamente a hidrogênios, foram atribuídos de acordo com o experimento de *g*HSQC (FIGURA 4.24), sendo eles os carbonos em δ_{C} 141,5 (C7) ligado ao hidrogênio δ_{H} 7,38 (H7); δ_{C} 118,5 (C8), ligado ao hidrogênio δ_{H} 6,66 (H8); δ_{C} 127,7 (C6) ligado ao hidrogênio δ_{H} 7,38 (H6); δ_{C} 31,7 (C10), ligado ao hidrogênio δ_{H} 3,40 (H10) e δ_{C} 20,3 (C11, 12) ligado aos hidrogênio δ_{H} 1,24 (H11, 12).

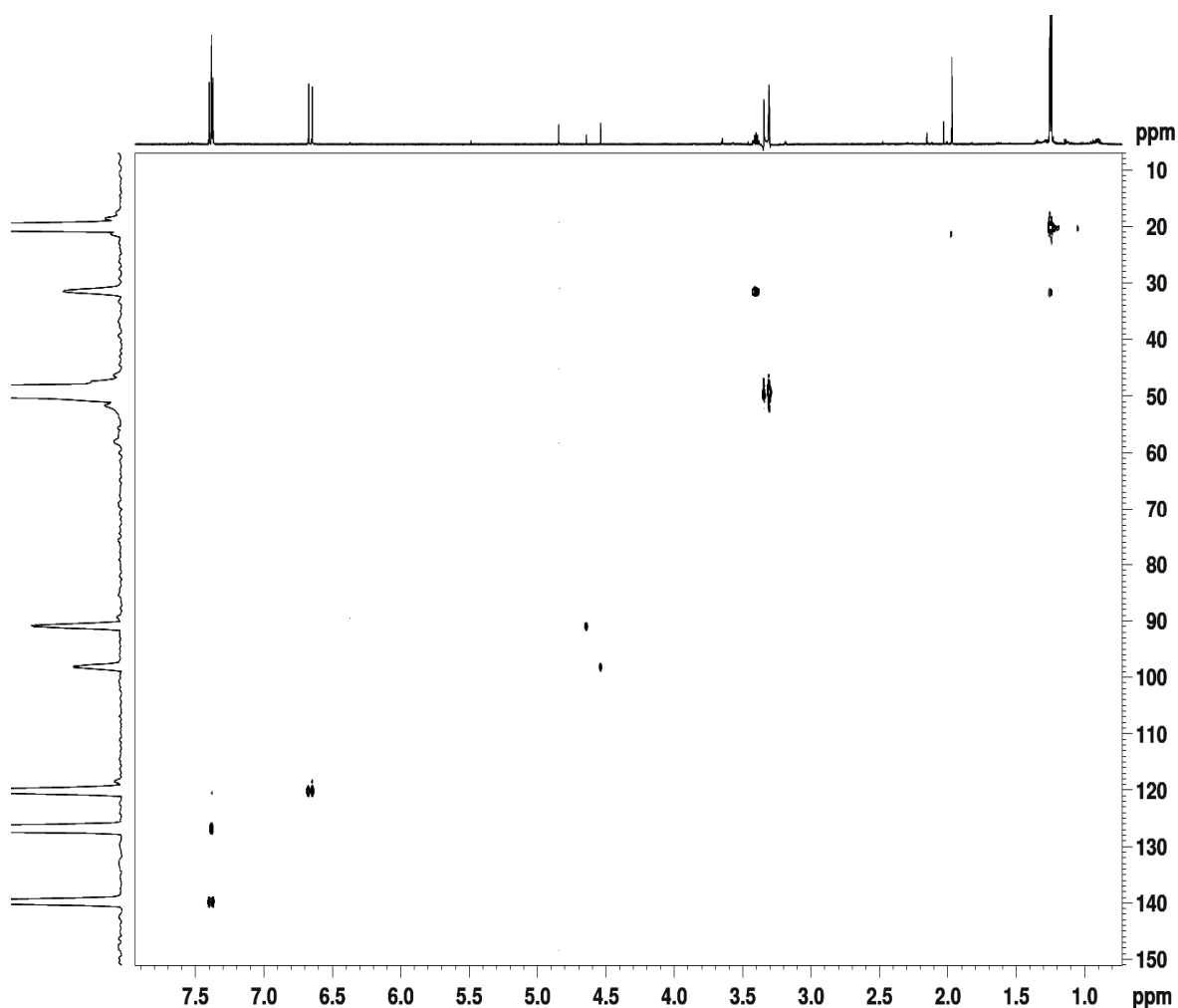


FIGURA 4.24 – Mapa de contorno gHSQC para o pico AE11GP.

No experimento de gHMBC (FIGURA 4.25), os hidrogênios em δ_{H} 1,24 ppm (H11, 12) apresentaram correlação com os carbonos em δ_{C} 31,7 (C10) e δ_{C} 165,9 (C3). O hidrogênio em δ_{H} 3,40 (H10) apresentou correlação com os carbonos em δ_{C} 20,3 (C11, 12), δ_{C} 157,1 (C2) e δ_{C} 165,9 (C3). O hidrogênio δ_{H} 6,66 ppm (H8) apresentou correlações com os carbonos δ_{C} 130,3 ppm (C5), δ_{C} 141,5 ppm (C7) e δ_{C} 170,8 ppm (C9). O hidrogênio em δ_{H} 7,38 (H7) apresentou correlação com os carbonos δ_{C} 118,5 (C8), δ_{C} 127,7 (C6), δ_{C} 130,3 (C5) e δ_{C} 170,8 (C9). Por fim, o hidrogênio δ_{H} 7,38 (H6) apresentou correlações com os carbonos δ_{C} 130,3 (C5), δ_{C} 157,1 (C2), δ_{C} 141,5 (C7) e δ_{C} 118,5 (C8). Com base nessas informações, é possível concluir que o composto presente em maior quantidade na fração AE11GP pertence à mesma classe do composto isolado e identificado na fração AE10GP. Entretanto, não existe substituinte na posição 6 do sistema cíclico, gerando uma

pirazin-2(1H)-ona 4,5 dissubstituída. As principais correlações gHMBC observadas, bem como a proposta estrutural estão apresentadas na FIGURA 4.26.

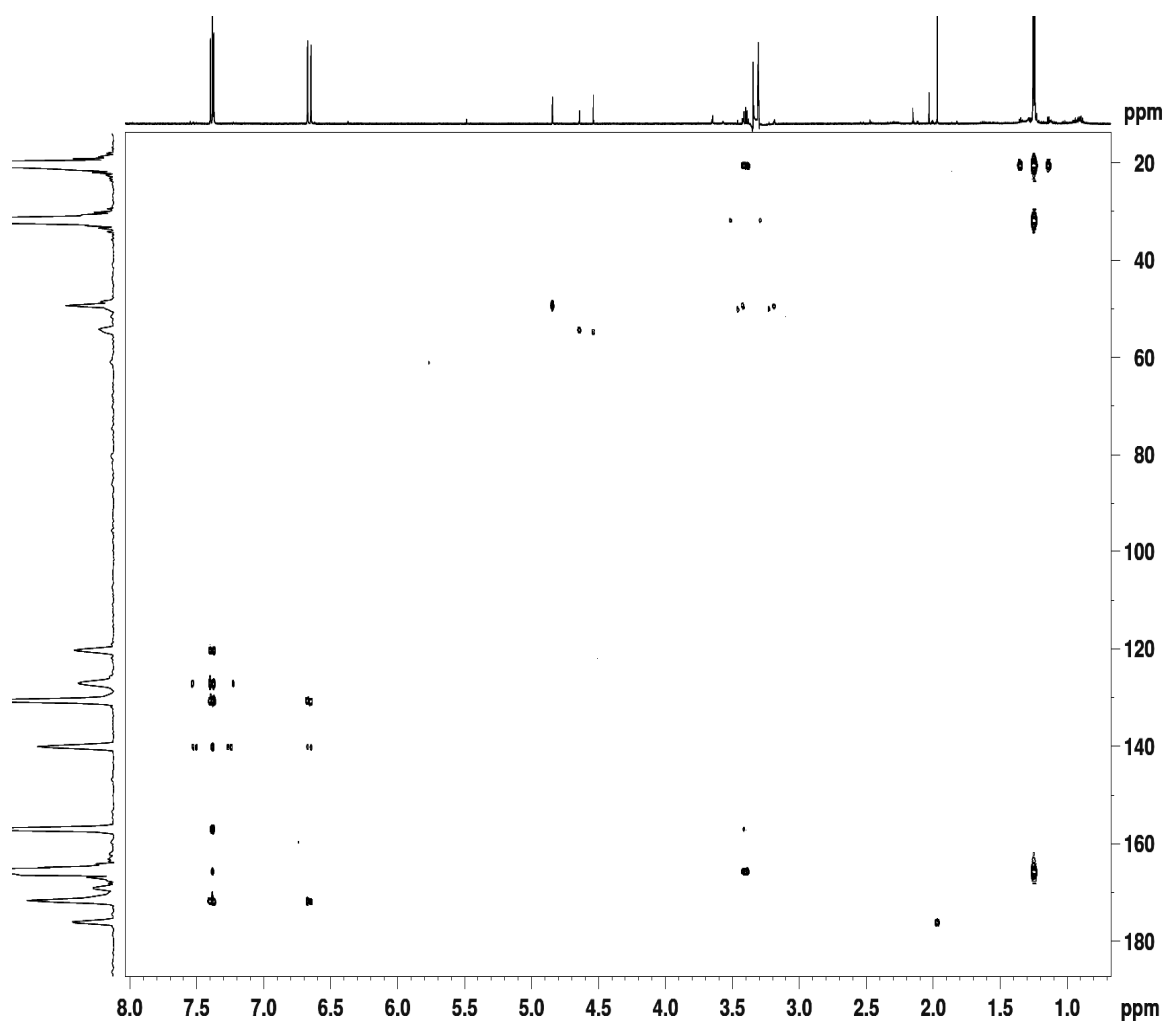


FIGURA 4.25 – Mapa de contorno gHMBC para o pico AE11GP.

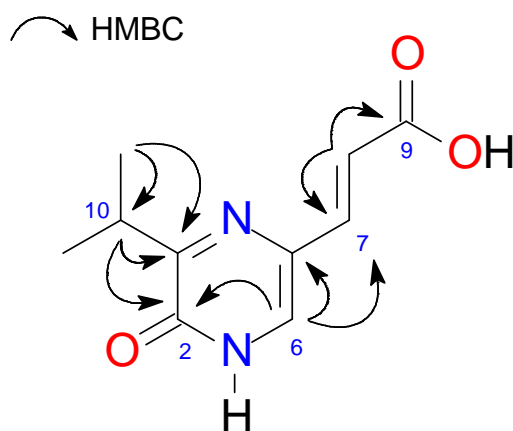


FIGURA 4.26 – Principais correlações gHMBC e proposta estrutural para o composto presente em maior quantidade na fração AE11GP.

Todas essas informações foram apresentadas em uma mesma tabela (TABELA 4.5) para facilitar a visualização das informações.

TABELA 4.5 – Dados espectroscópicos para o composto majoritário da fração AE11GP (^{13}C , 150MHz; ^1H , 600 MHz, 300 μg em 250 μL de $\text{MeOH-}d_4$).

no.	δ_{C}	δ_{H} , <i>mult.</i> (J em Hz)	COSY	HMBC
2	157,1			
3	165,9			
5	130,3			
6	127,7	7,38, s		2, 3, 5, 7
7	141,5	7,38, <i>d</i> (15,29)	8	3, 5, 8, 9
8	118,5	6,66, <i>d</i> (15,29)	7	5, 6, 7, 9
9	170,8			
10	31,7	3,40, <i>h</i> (6,82)	11, 12	2, 3, 11, 12
11, 12	20,3	1,24, <i>d</i> (6,82)	10	3, 10

A análise de fragmentação por espectrometria de massa (MS) apresentou o perfil apresentado na FIGURA 4.27. Assim como observado no composto da fração AE10GP, o pico mais intenso neste caso foi o m/z 191,2, também atribuído à perda da hidroxila da carboxila (C9), formando o íon acílio. O pico m/z 165,3 é relativo à perda do grupamento isopropila.

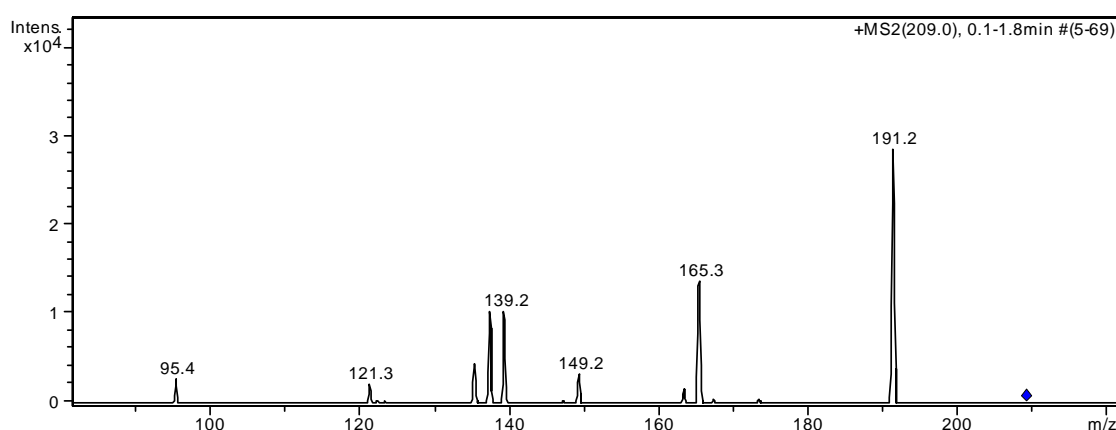


FIGURA 4.27 – Espectro de fragmentação do íon $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 209,2 em MS^2 .

Posteriormente, a fragmentação do íon acílio m/z 191,2 foi realizada em MS^3 , originando os seguintes íons-filhos: m/z 163,2, 149,2, 135,3 e 121,3 conforme mostra a FIGURA 4.28.

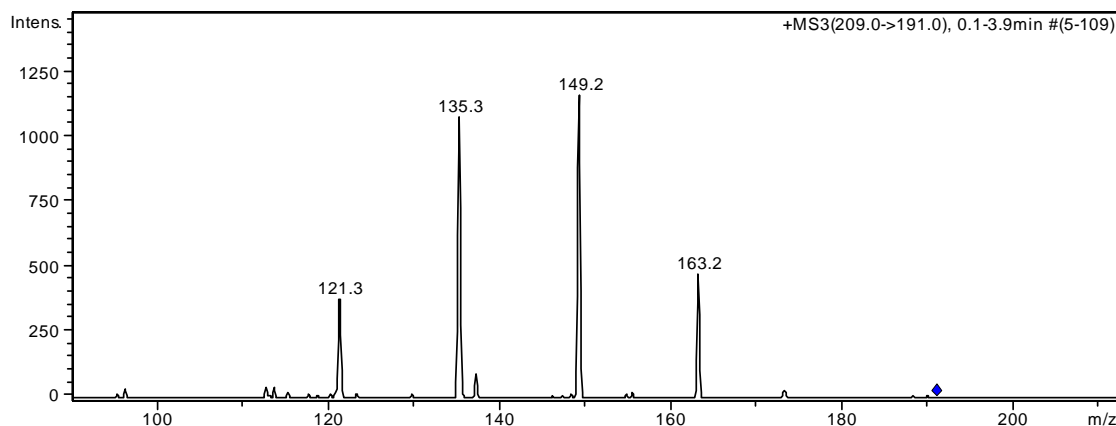


FIGURA 4.28 – Fragmentação em MS^3 do íon m/z 191,2.

Esses sinais equivalem à perda de alguns substituintes conectados à estrutura principal. A perda de monóxido de carbono (CO) seguido da perda do grupo isopropila a partir do íon acílio m/z 191,2 gera os íons m/z 163,2 e 121,3. Da mesma forma, a perda do grupo isopropila seguida pela perda de monóxido de carbono geraria os íons m/z 149,2 e 121,3. O íon m/z 135,3 é compatível com a perda de 28 unidades de massa a partir do íon m/z 163,2, o que indica a saída de outra molécula neutra de monóxido de carbono (CO) provavelmente originada a partir de um rearranjo da estrutura cíclica central da substância em estudo, com formação de sistema imidazol.

4.2.8 - Fração AE12GP

A análise por espectrometria de massa do composto presente na fração AE12GP utilizando probe de *electrospray*, no modo positivo de ionização, (FIGURA 4.29) apresentou o pico $[M+H]^+$ m/z 223,2, equivalente à molécula protonada. Em seguida, a espectrometria de massa de alta resolução (HRMS) confirmou essa proposta (FIGURA 4.30). Essa relação massa/carga indicou a fórmula molecular $C_{11}H_{14}O_3N_2$.

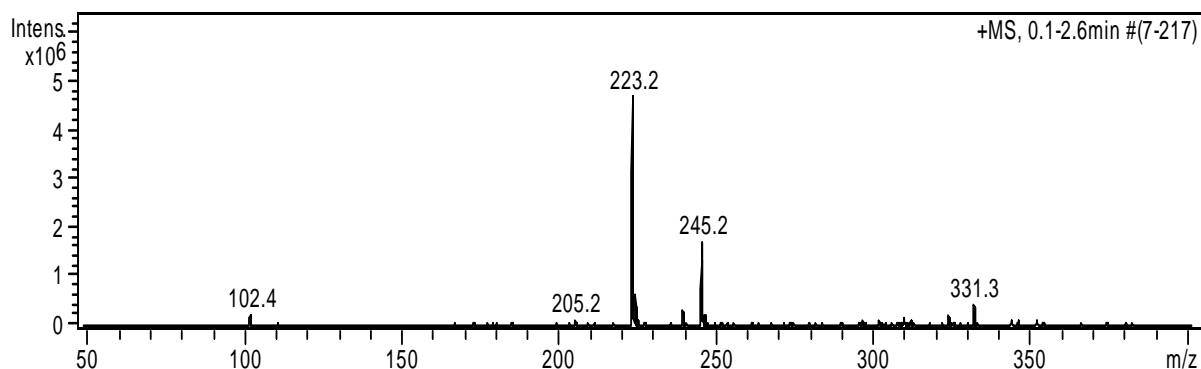


FIGURA 4.29 – Espectro de massa (*Full scan*) via *Electrospray* modo positivo para a fração AE12GP.

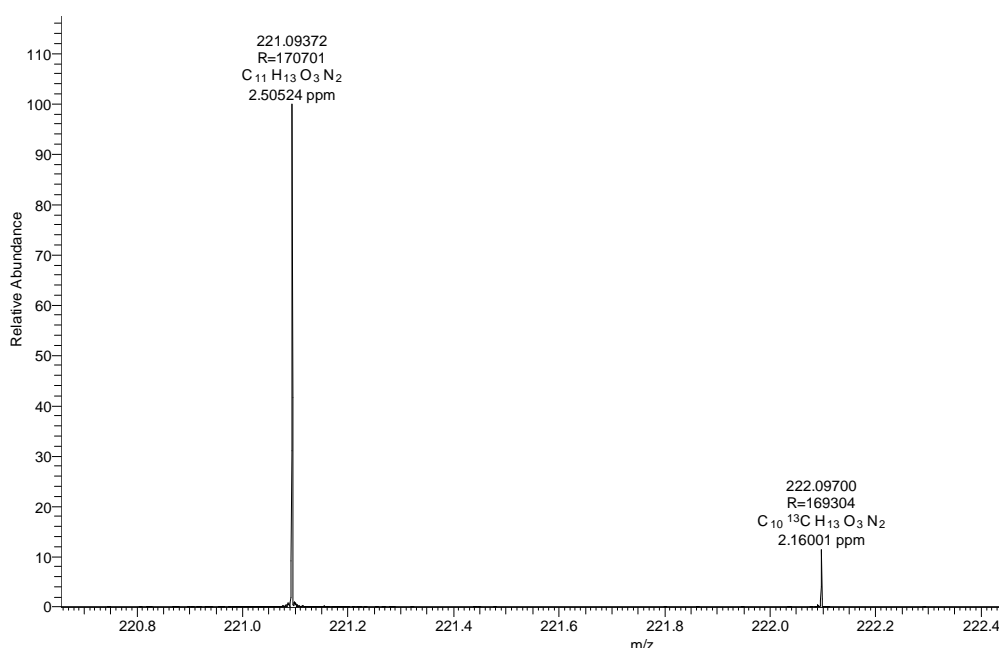


FIGURA 4.30- HRMS, modo negativo de ionização ESI – Fração AE12GP.

A partir da análise do espectro de RMN de ^1H (FIGURA 4.31), novamente os resultados mostram dois dupletos na região de aromáticos e olefínicos, sendo um em δ_{H} 7,65 (H7, 1H, $^3J_{\text{H7-H8}} = 15,03$ Hz) e outro em δ_{H} 6,68 (H8, 1H, $^3J_{\text{H8-H7}} = 15,03$ Hz). Essa constante de acoplamento indica a presença do mesmo sistema de ligação dupla *trans*, já observado nos compostos identificados nas frações AE10GP e AE11GP. Na região alifática, um hepteto em δ_{H} 3,34 (H10, 1H, $^3J_{\text{H10-H11,12}} = 6,78$ Hz) e em δ_{H} 1,23, um dupletto (H11 e H12, 6H, $^3J_{\text{H11,12-H10}} = 6,78$ Hz). De acordo com esses dados, é possível concluir que o grupo isopropila, verificado nas estruturas anteriores, também está presente nesta molécula. Também nessa região, um simpleto em δ_{H} 2,36 (H6', 3H) indicando um grupamento metila

conectado a um sistema conjugado. A confirmação dessas suposições foi realizada através da análise do espectro de gCOSY. Nesse experimento foi possível verificar a correlação entre os hidrogênios δ_H 7,65 (H7) e δ_H 6,68 (H8) e os hidrogênios δ_H 3,34 (H10) e δ_H 1,23 (H11, H12).

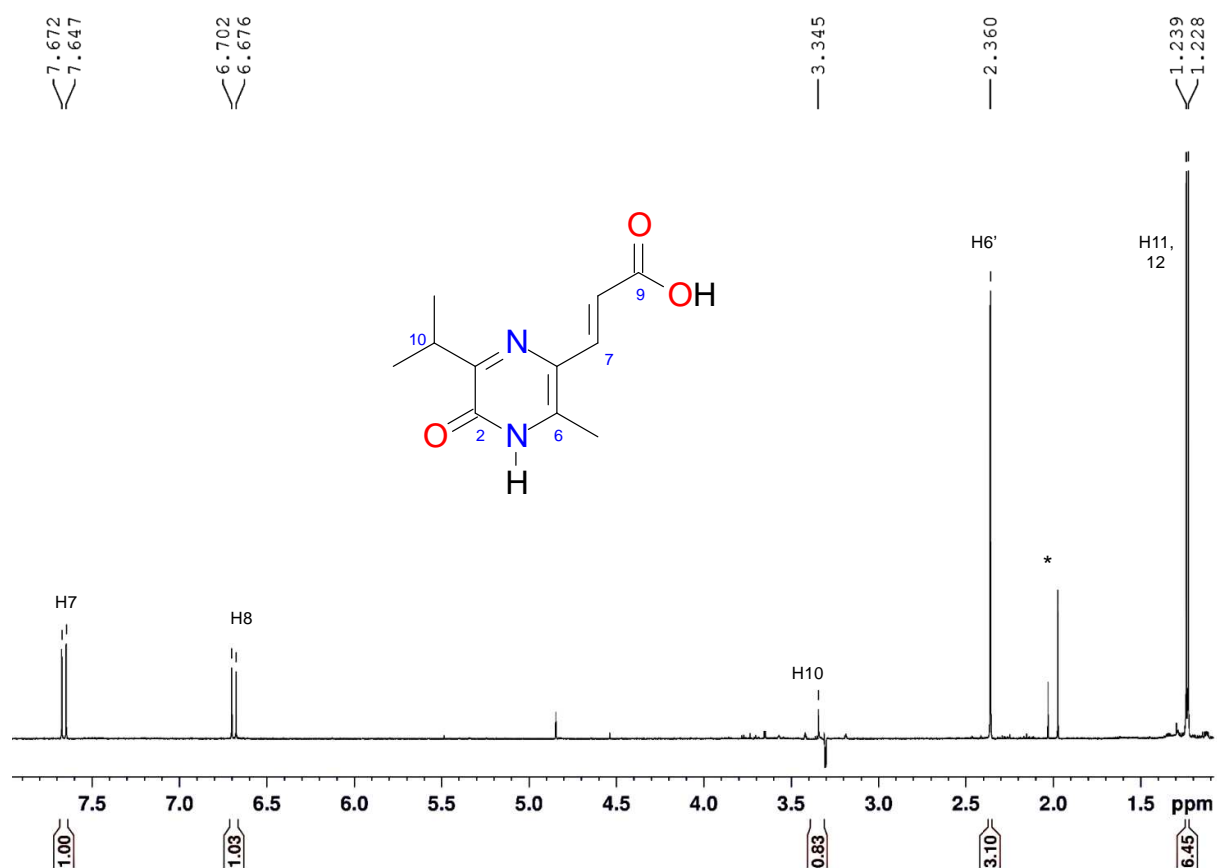


FIGURA 4.31 – Espectro de RMN de ^1H da fração AE12GP, 300 μg em 250 μL de $\text{MeOH-}d_4$. * - Impurezas.

Na sequência foi realizado um espectro de RMN de ^{13}C (sequência de pulso zgpg30) que pode ser visualizado na FIGURA 4.32. O espectro indicou a presença de 11 átomos de carbonos, sendo 4 sp^3 , 2 olefínicos referentes à ligação dupla *trans*, e 5 carbonos sp^2 não conectados à hidrogênio.

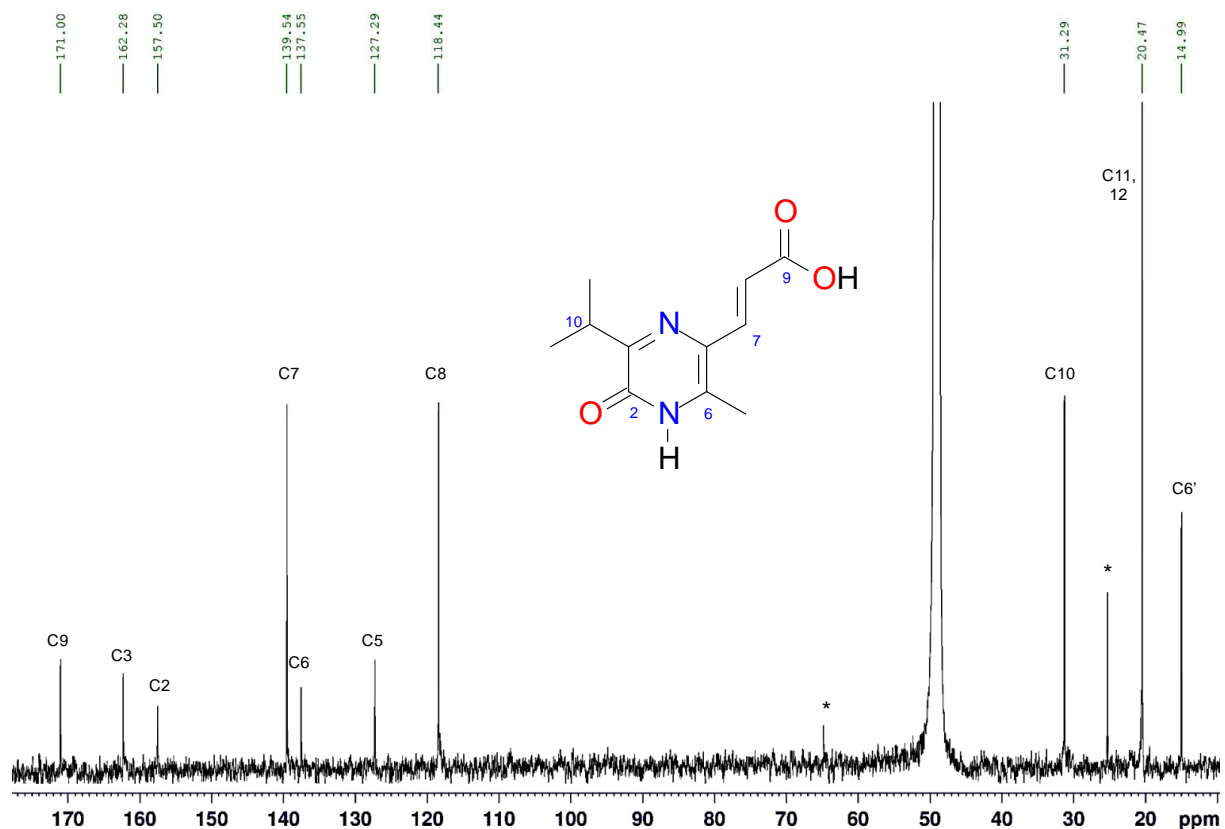


FIGURA 4.32 – Espectro de RMN de ^{13}C da fração AE12GP. ns= 92K, td= 32K, sw= 238,8 ppm, aq=0,45 s e d1= 0,20 s. * - Impurezas.

Os valores dos deslocamentos dos carbonos ligados diretamente a hidrogênios, foram atribuídos de acordo com o experimento de $g\text{HSQC}$ (FIGURA 4.33), sendo eles os carbonos em δ_{C} 139,5 (C7), ligado ao hidrogênio em δ_{H} 7,65 (H7), δ_{C} 118,4 (C8), ligado ao hidrogênio em δ_{H} 6,68 (H8); δ_{C} 14,9 (C6'), ligado aos hidrogênios em δ_{H} 2,36 (H6'); δ_{C} 31,2 (C10), ligado ao hidrogênio em δ_{H} 3,34 (H10) e δ_{C} 20,4 (C11, 12) ligado aos hidrogênio em δ_{H} 1,24 (H11, 12).

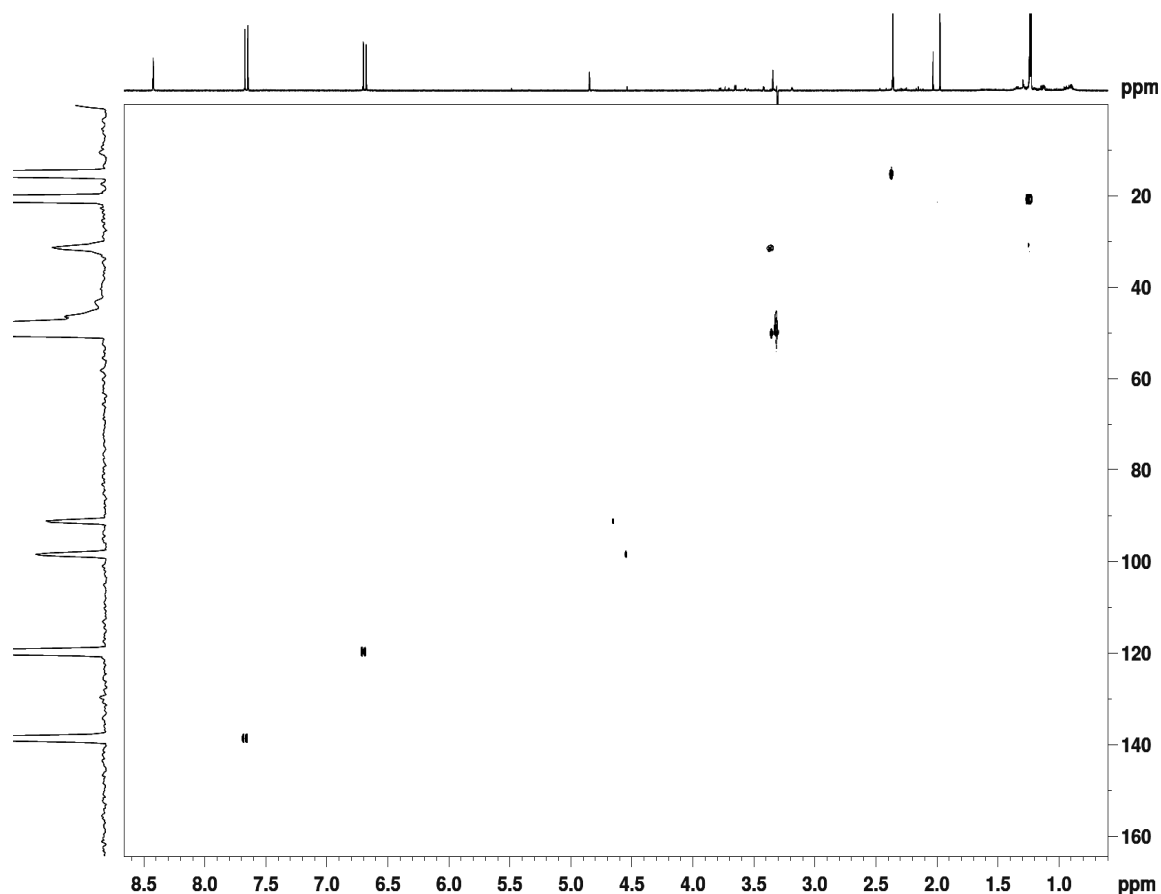


FIGURA 4.33 – Mapa de contorno gHSQC da fração AE12GP.

No experimento de gHMBC (FIGURA 4.34), os hidrogênios em δ_H 1,24 (H11, H12) apresentaram correlação com os carbonos em δ_C 20,4 (C11, C12), δ_C 31,2 (C10) e δ_C 162,2 (C3). O hidrogênio em δ_H 3,34 (H10) apresentou correlação com os carbonos em δ_C 20,4 (C11, 12) e δ_C 162,2 (C3). O hidrogênio em δ_H 6,68 (H8) apresentou correlações com os carbonos em δ_C 127,2 (C5), δ_C 139,5 (C7) e δ_C 171,0 (C9). O hidrogênio em δ_H 7,65 (H7) apresentou correlação com os carbonos em δ_C 118,4 (C8), δ_C 127,2 (C5), δ_C 137,5 (C6), δ_C 162,2 (C3) e δ_C 171,0 (C9). Por fim, o hidrogênio em δ_H 2,36 (H6') apresentou correlações com os carbonos em δ_C 118,4 (C8), δ_C 127,2 (C5), δ_C 137,5 (C6), δ_C 139,5 (C7) e δ_C 162,2 (C3). Todas essas informações foram colocadas em conjunto em uma mesma tabela (TABELA 4.6) para facilitar a visualização das informações e levam à conclusão de que a estrutura do composto eluído na fração AE12GP é muito semelhante às estruturas dos compostos eluídos nas frações AE10GP e AE11GP. A diferença principal nas estruturas identificadas até o momento está na posição 6 do sistema cíclico pirazin-

2(1H)-ona. A FIGURA 4.35 mostra fórmula estrutural proposta para o composto presente na fração AE12GP bem como as principais correlações gHMBC.

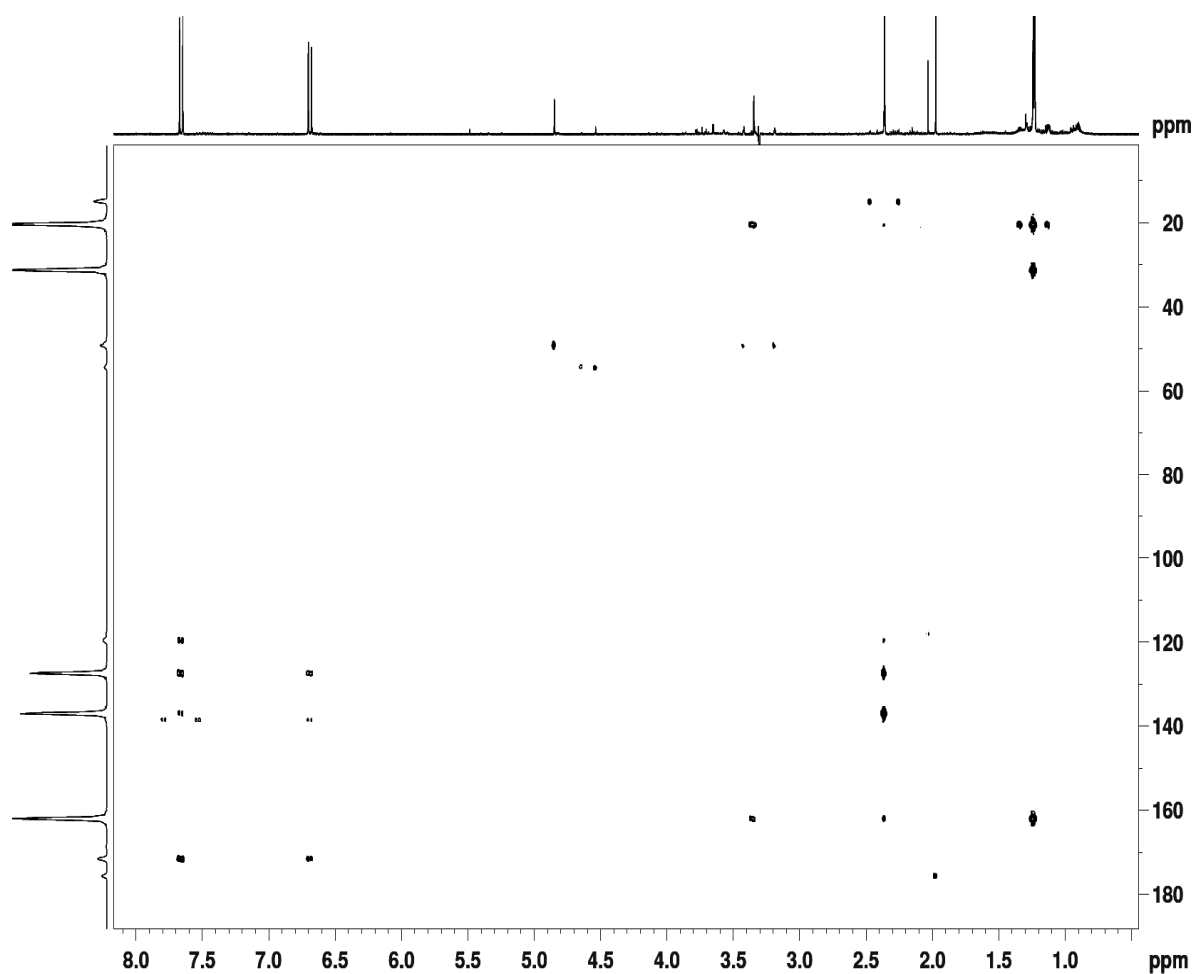


FIGURA 4.34 – Mapa de contorno gHMBC da fração AE12GP.

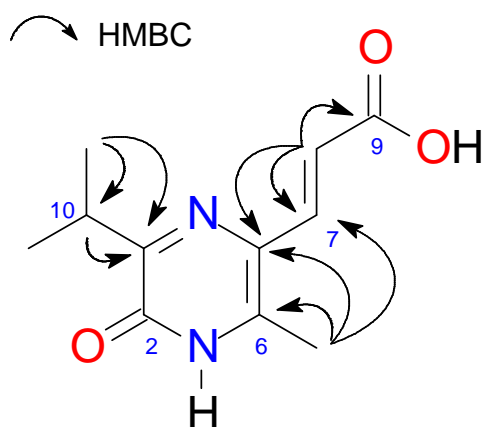


FIGURA 4.35 – Principais correlações gHMBC e proposta estrutural para o composto presente em maior quantidade na fração AE12GP.

TABELA 4.6 – Dados espectroscópicos para o composto majoritário da fração AE12GP (^{13}C , 150 MHz; ^1H , 600 MHz, 300 μg em 250 μL de $\text{MeOH-}d_4$).

no.	δ_{C}	δ_{H} , <i>mult.</i> (<i>J</i> em Hz)	COSY	HMBC
2	157,5			
3	162,2			
5	127,2			
6	137,5			
6'	14,9	2,36, s		5, 6, 7
7	139,5	7,65, <i>d</i> (15,03)	8	5, 8, 9
8	118,4	6,68, <i>d</i> (15,03)	7	5, 7, 9
9	171,0			
10	31,2	3,34, <i>h</i> (6,78)	11, 12	3, 11, 12
11, 12	20,4	1,23, <i>d</i> (6,78)	10	3, 10

A análise de fragmentação por espectrometria de massa (MS) (FIGURA 4.36) mostrou um perfil de íons originados de forma semelhante ao que foi descrito para os compostos identificados nas frações AE10GP e AE11GP. O pico mais intenso foi o m/z 205,3 compatível com, novamente, a formação de um íon acílio estabilizado por ressonância a partir da perda da hidroxila do carbono C9. O pico m/z 179,3 equivale à perda do grupamento isopropila. O pico m/z 163,2 é formado pela perda, respectivamente, da hidroxila (C9) seguida do grupo isopropila. E o pico m/z 151,3 equivale à perda do grupo isopropila seguida pela eliminação de uma molécula neutra de monóxido de carbono (CO).

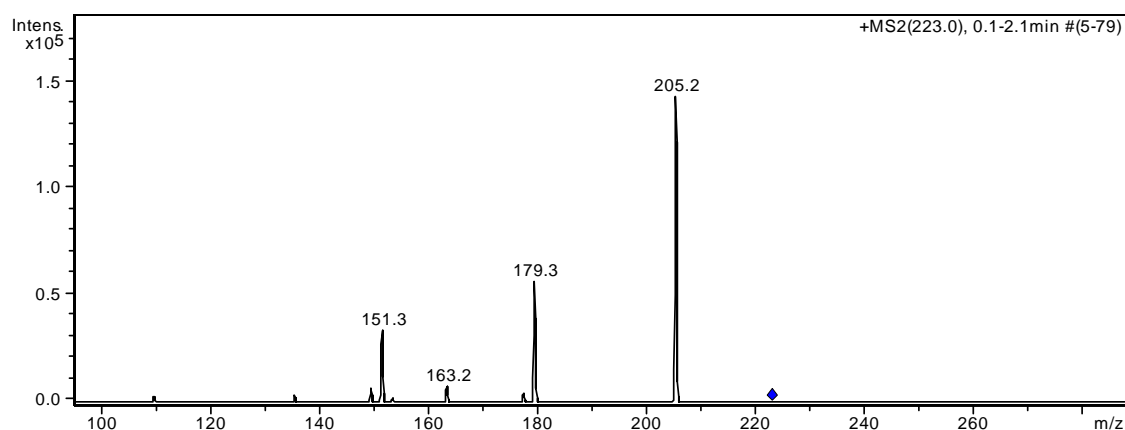


FIGURA 4.36 - Espectro de fragmentação do íon $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 223,2 em MS^2 .

A fragmentação do íon acílio m/z 205,2 em MS^3 , originou os seguintes íons-filhos: m/z 177,2, 163,2, 149,3 e 135,4. Esse espectro está representado na FIGURA 4.67.

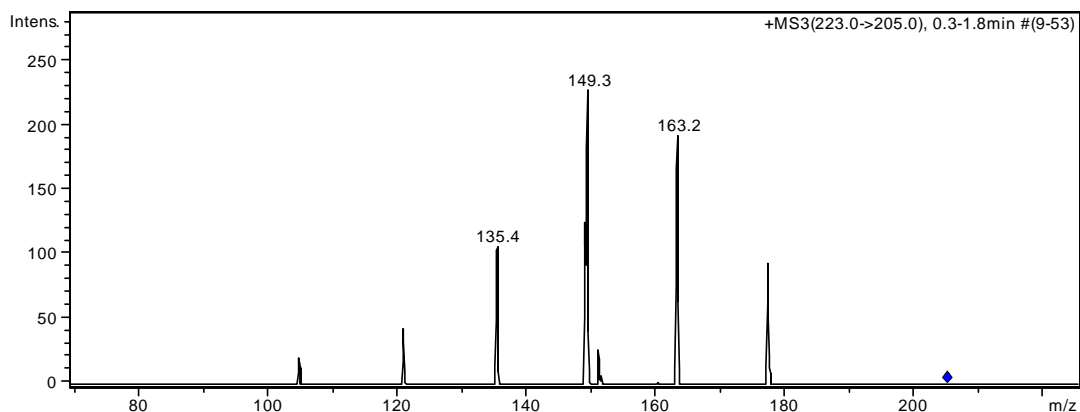


FIGURA 4.37 – Fragmentação em MS^3 do íon m/z 205,3.

4.2.9 - Fração AE13GP

A análise por espectrometria de massa de alta resolução (HRMS) da fração identificada como AE13GP (FIGURA 4.38) apresentou o pico $[M-H]^-$ m/z 251,1043, equivalente à molécula desprotonada, modo negativo de ionização, indicando a fórmula molecular $C_{12}H_{15}O_4N_2$.

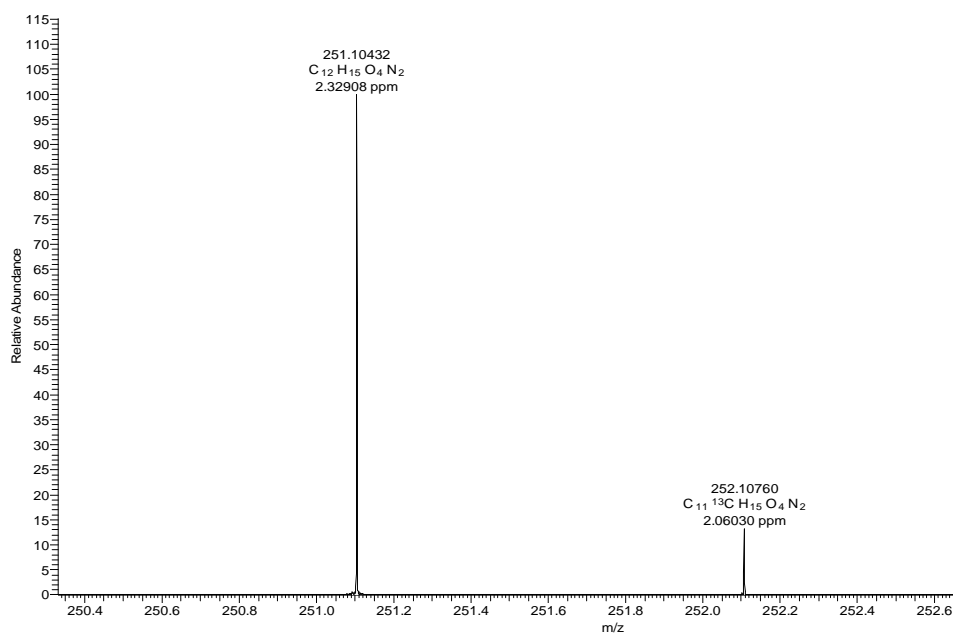


FIGURA 4.38 – HRMS, modo negativo de ionização ESI – Fração AE12GP.

Através da análise do espectro de RMN de ^1H , é possível perceber pelo padrão dos sinais que se trata de mais um representante da mesma classe de compostos pirazinônicos identificados até o momento. Os resultados mostram dois dupletos na região de aromáticos e olefínicos, sendo um em δ_{H} 7,60 (H7, 1H, $^3J_{\text{H7-H8}} = 15,06$ Hz) e outro em δ_{H} 6,74 (H8, 1H, $^3J_{\text{H8-H7}} = 15,06$ Hz) (FIGURA 4.39). Essa constante de acoplamento indica a presença do mesmo sistema de ligação dupla *trans* já observado nos compostos identificados nas frações AE10GP, AE11GP e AE12GP. Na região alifática, os sinais indicam a presença de uma cadeia carbônica lateral diferente dos demais compostos. Enquanto nos outros compostos havia um grupamento isopropila conectado à posição 3 do sistema cíclico, nesta estrutura existe um grupamento *sec*-butil.

Um sistema de spins acoplado foi completamente identificado na região de alifáticos pela presença de um duplete em δ_{H} 1,21 (H13, 3H, $^3J_{\text{H13-H10}} = 6,83$ Hz), que por *g*HSQC mostrou estar conectado diretamente ao carbono sp^3 C13 δ_{C} 12,6 ppm. Esse hidrogênio apresentou correlação *g*COSY com o hidrogênio δ_{H} 3,23 ppm (H10, 1H, *q*, $^3J_{\text{H10-H11a,11b}} = 6,83$ Hz) que está ligado diretamente ao carbono C10, em δ_{C} 37,8. Na sequência, dois hidrogênios diastereotópicos foram detectados no carbono C11, em δ_{C} 28,6: δ_{H} 1,55 (H11a, 1H, *ddq*, 6,83; 7,50; 13,50) e δ_{H} 1,86 (H11b, 1H, *ddq*, 6,83; 7,50; 13,50). Ambos os hidrogênios diastereotópicos apresentaram correlações *g*COSY com os hidrogênios em δ_{H} 3,23 (H10) e δ_{H} 0,90 (H12, 3H, $^3J_{\text{H12-H11a,11b}} = 7,50$ Hz). O último ligado diretamente ao carbono sp^3 C12 em δ_{C} 12,4. Essas informações levam a uma cadeia carbônica do tipo $\sim\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$. Através da análise por *g*HMBC é possível concluir que essa cadeia carbônica está conectada diretamente a posição 3 do sistema cíclico pirazin-2(1*H*)-ona, uma vez que H10 e H13 apresentaram correlações com C3, em δ_{C} 163,5.

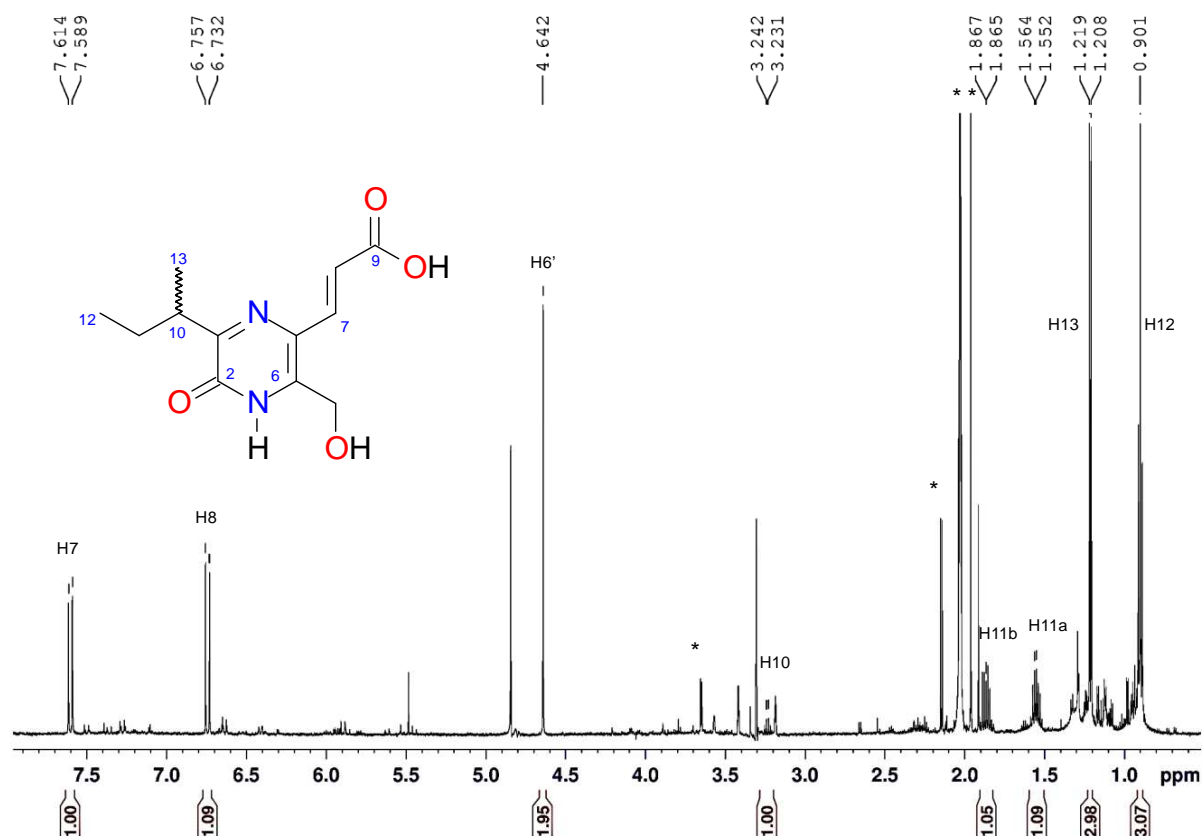


FIGURA 4.39 – Espectro de RMN de ¹H da fração AE13GP, 200 μg em 250 μL de MeOH-d₄).

Também foi feito o experimento de RMN de ¹³C com a sequência de pulso zgpg30. O resultado pode ser visto na FIGURA 4.40. O espectro indicou a presença de 12 átomos de carbono, sendo 5 *sp*³, 4 referentes ao grupamento metil-propil e ligado diretamente à oxigênio, 2 olefínicos referentes à ligação dupla *trans* e 5 carbonos *sp*² não conectados à hidrogênio.

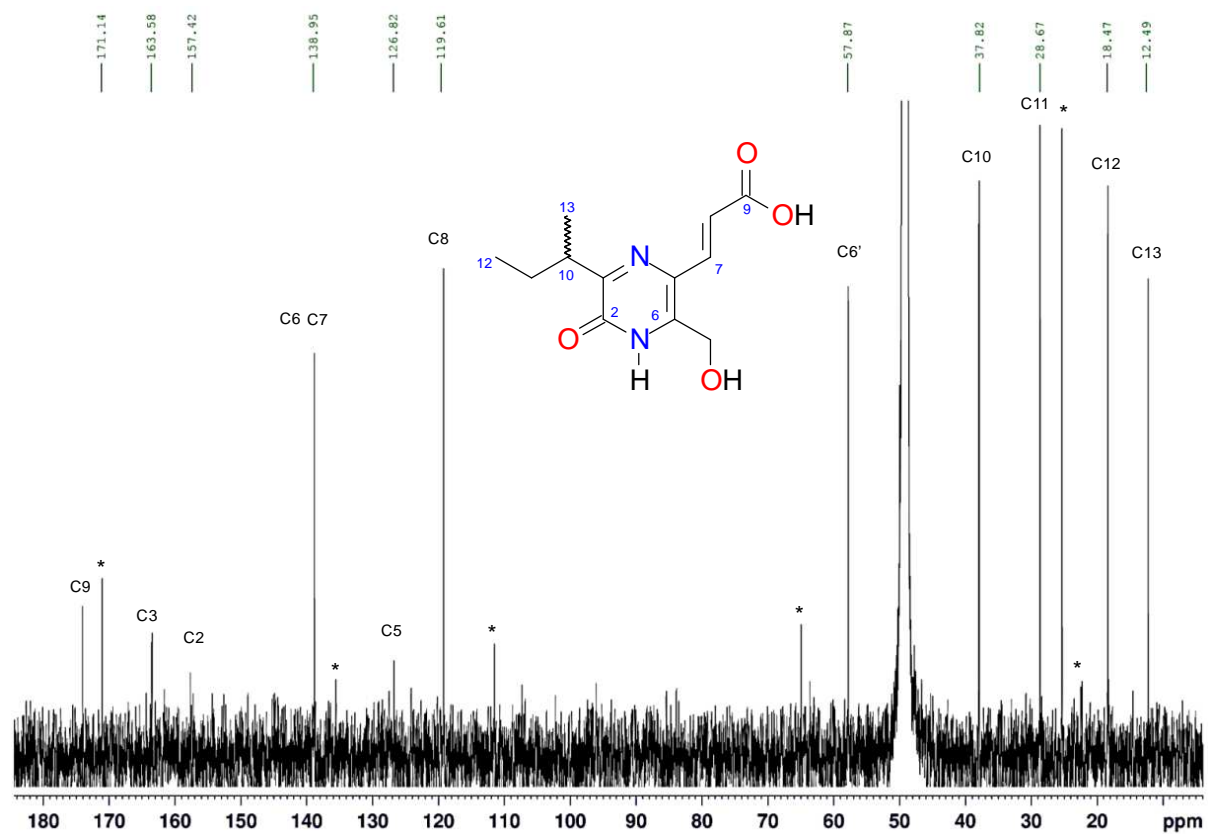


FIGURA 4.40 – Espectro de RMN de ¹³C da fração AE13GP. ns = 92K, td = 32K, sw = 238,8 ppm, aq = 0,45 s e d1 = 0,20 s. * - Impurezas.

A FIGURA 4.41 mostra o mapa de contorno gCOSY, a FIGURA 4.42 o mapa de contorno gHSQC e a FIGURA 4.43 o mapa de contorno gHMBC.

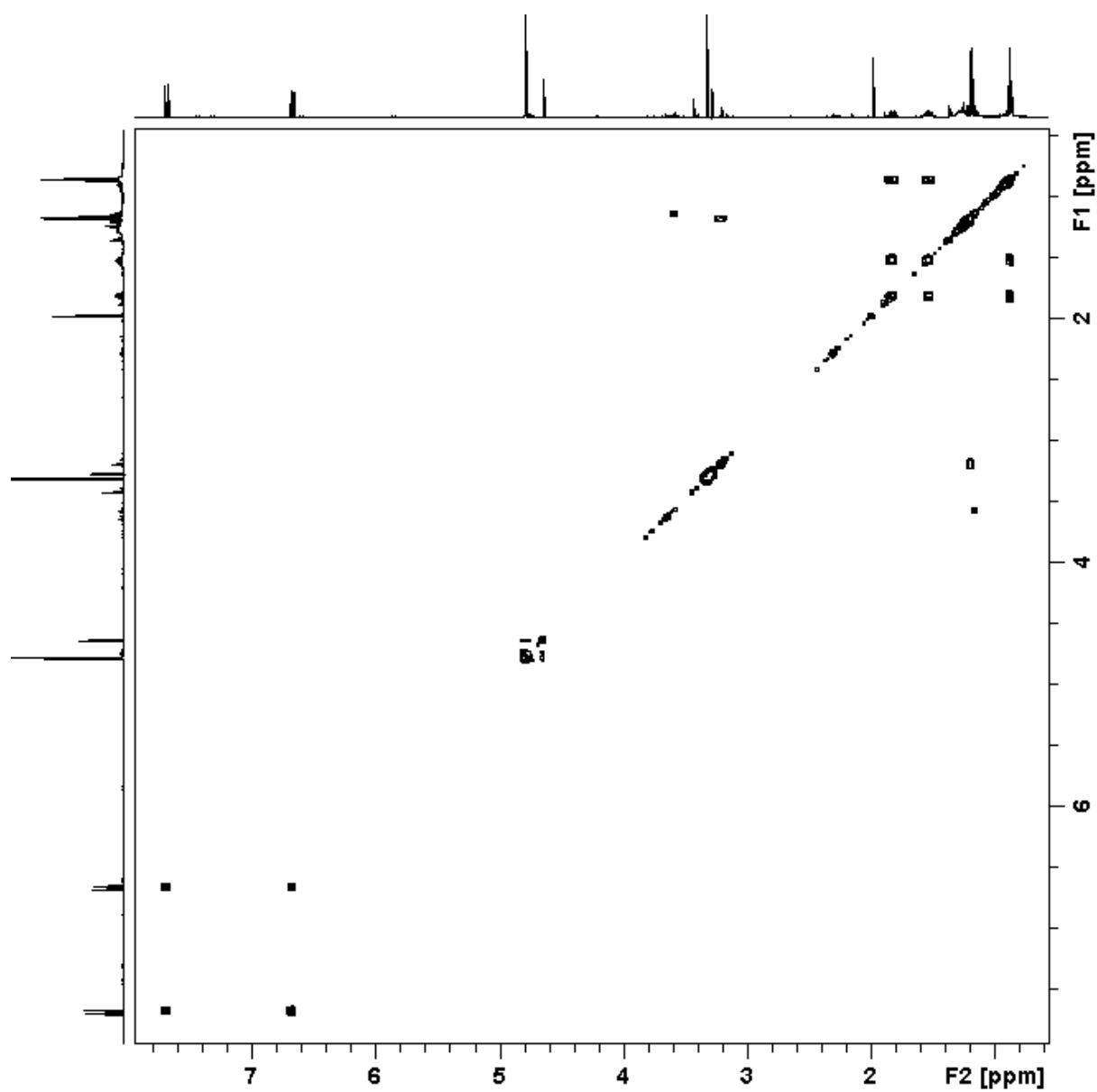


FIGURA 4.41 – Mapa de contorno gCOSY da fração AE13GP.

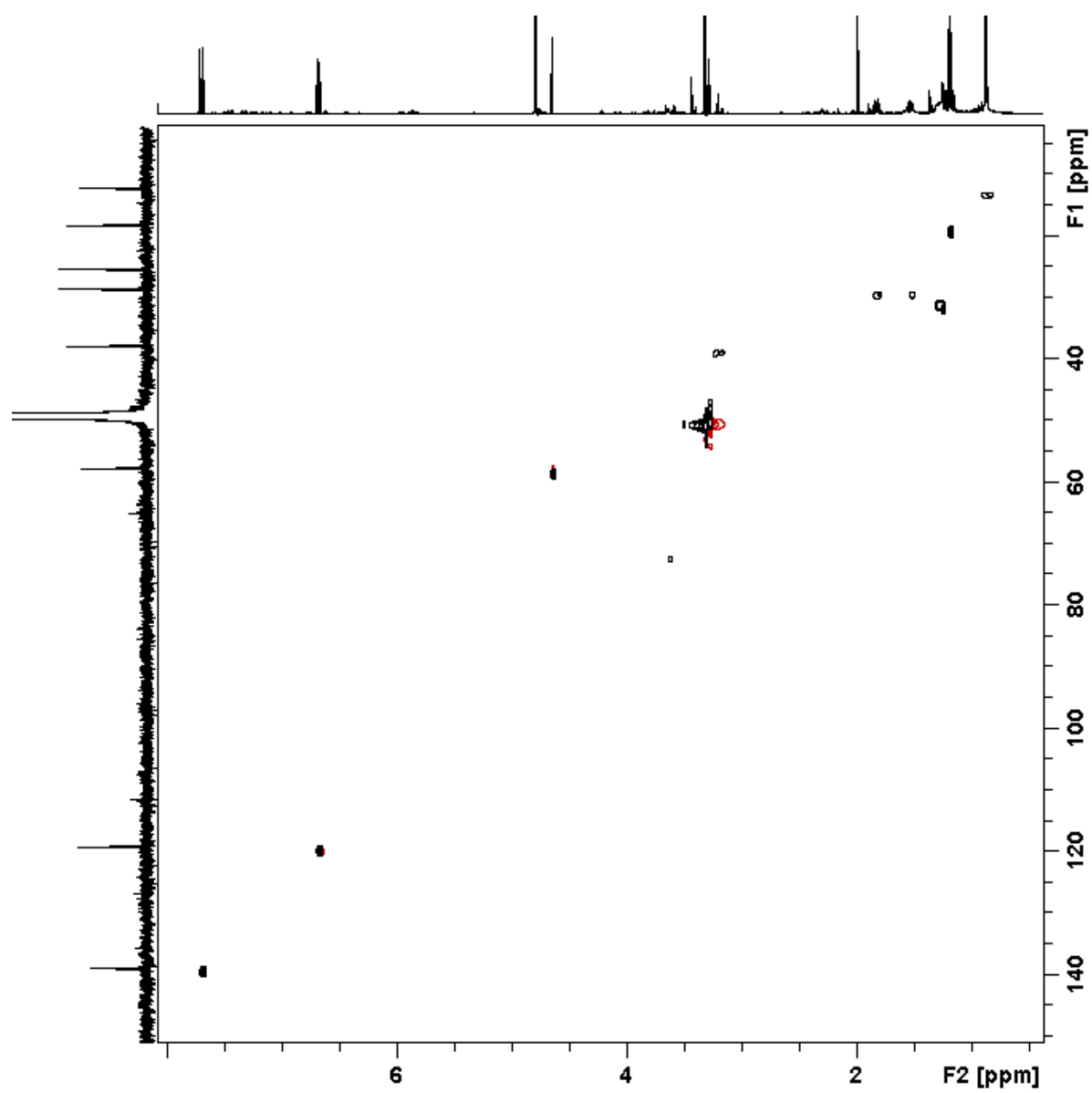


FIGURA 4.42 – Mapa de contorno gHSQC da fração AE13GP.

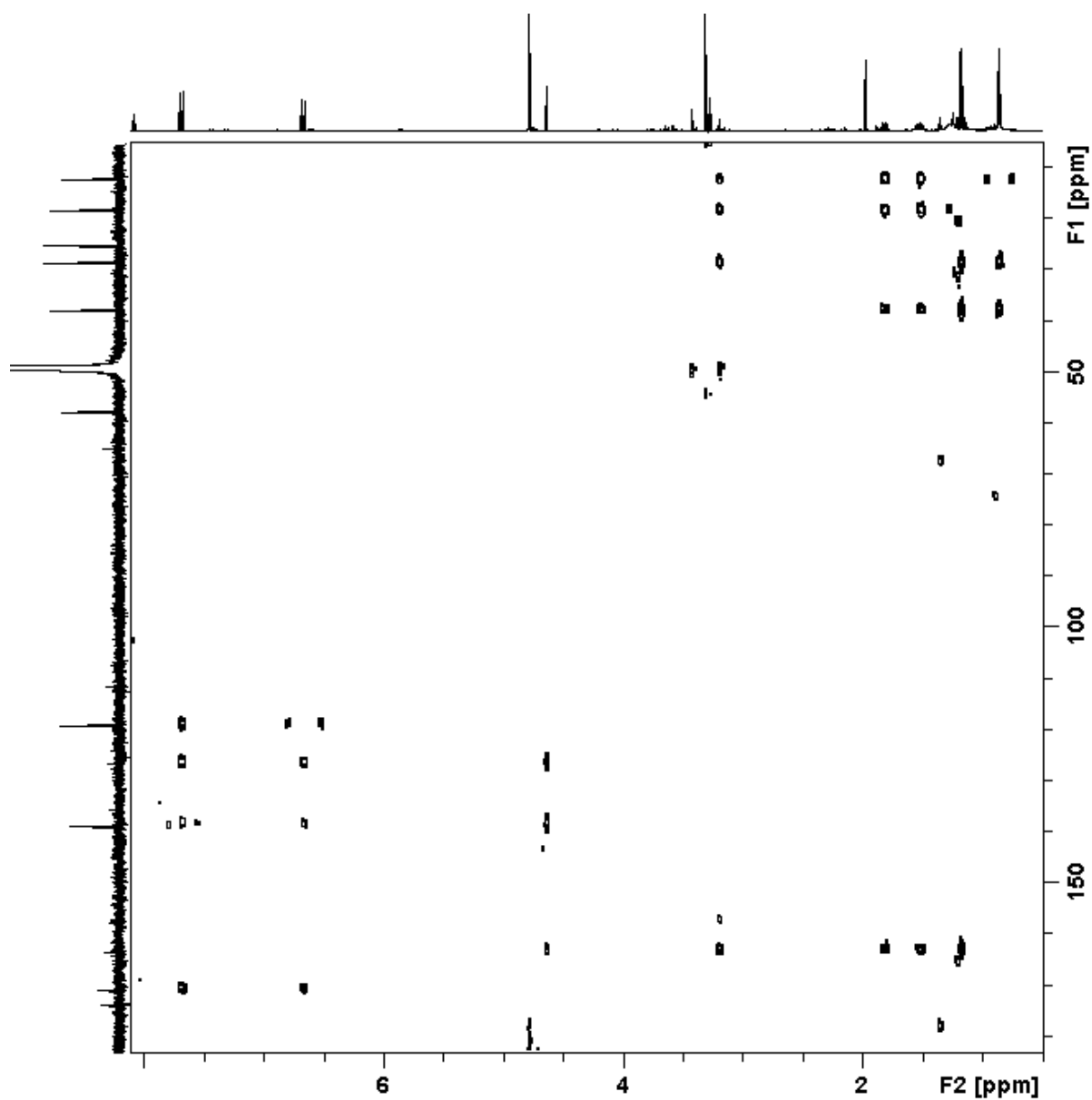


FIGURA 4.43 – Mapa de contorno *g*HMBC da fração AE13GP.

A proposta estrutural para o composto presente em maior quantidade na fração AE13GP está apresentada na FIGURA 4.44. A TABELA 4.7 mostra todos os dados espectroscópicos coletados para essa estrutura.

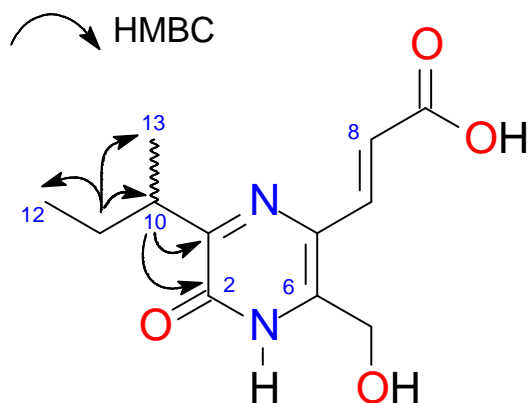


FIGURA 4.44 – Fórmula estrutural do composto presente em maior quantidade na fração AE13GP.

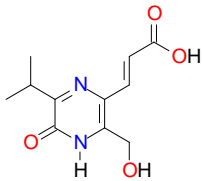
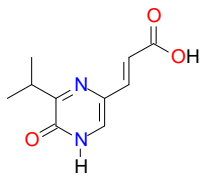
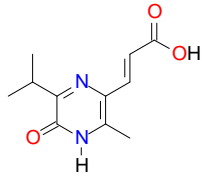
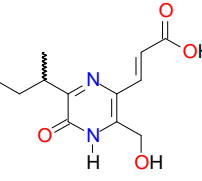
TABELA 4.7 – Dados espectroscópicos para o composto majoritário da fração AE13GP (^{13}C , 150 MHz; ^1H , 600 MHz, 200 μg em 250 μL de $\text{MeOH-}d_4$).

no.	δ_{C}	δ_{H} , <i>mult.</i> (<i>J</i> em Hz)	COSY	HMBC
2	157,4			
3	163,5			
5	126,6			
6	138,9			
6'	57,8	4,64, s		5, 6, 7
7	138,9	7,60, <i>d</i> (15,03)	8	5, 6, 8, 9
8	119,6	6,74, <i>d</i> (15,03)	7	5, 6, 7, 9
9	171,1			
10	37,8	3,23, <i>q</i> (6,83)	11, 11', 13	3, 11, 12, 13
11a	28,6	1,55, <i>ddq</i> (6,83; 7,50; 13,50)	10, 11', 12	3, 10, 12, 13
11b	28,6	1,86, <i>ddq</i> (6,83; 7,50, 13,50)	10, 11, 12	3, 10, 12, 13
12	12,4	0,90, <i>t</i> (7,50)	11, 11'	10, 11, 13
13	12,6	1,21, <i>d</i> (6,83)	10	3, 10, 11, 12

4.2.10 - Nomenclatura e proposta biogenética para as pirazin-2(1H)-onas inéditas

Os quatro compostos inéditos receberam nomes baseados no sistema de nomenclatura IUPAC, bem como respectivos nomes triviais. Essas informações encontram-se dispostas na TABELA 4.8.

TABELA 4.8 – Estruturas e nomenclatura dos compostos pirazinônicos identificados.

Estrutura	Nome IUPAC	Nome trivial
 <p>Fração AE10GP</p>	Ácido (2 <i>E</i>)-3-[3-(hidróximetil)-5-oxo-6-(propan-2-il)-4,5-dihidropirazin-2-il] prop-2-enoico	giovaninona A
 <p>Fração AE11GP</p>	Ácido (2 <i>E</i>)-3-[5-oxo-6-(prop-2-il)-4,5-dihidropirazin-2-il] prop-2-enoico	giovaninona B
 <p>Fração AE12GP</p>	Ácido (2 <i>E</i>)-3-[3-metil-5-oxo-6-(prop-2-il)-4,5-dihidropirazin-2-il] prop-2-enoico	giovaninona C
 <p>Fração AE13GP</p>	Ácido (2 <i>E</i>)-3-[6-(but-2-il)-3-(hidróximetil)-5-oxo-4,5-dihidropirazin-2-il] prop-2-enoico	giovaninona D

Baseado na revisão bibliográfica, sobretudo no estudo de WILSON et al. (2013) é possível propor que esses compostos pirazinônicos tenham se formado por uma rota biossintética que envolve uma enzima peptídeo sintetase não ribossomal (PSNR). Uma análise por retrobiogênese do composto giovaninona A, mostra que essa substância possui em sua estrutura fragmentos de *L*-valina, *L*-serina e malonil-CoA, conforme ilustrado na FIGURA 4.45.

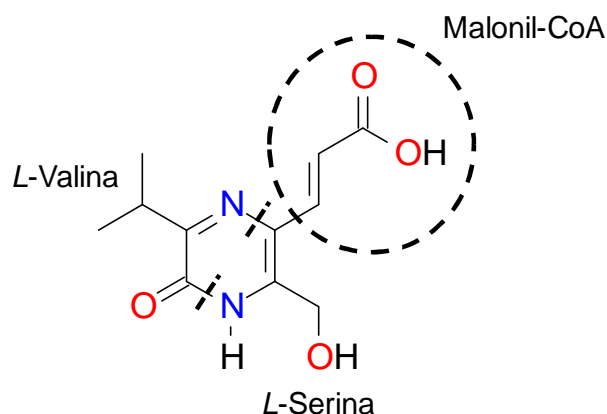


FIGURA 4.45 – Retrobiogênese do composto giovaninona A.

Aparentemente, as giovaninonas A-D são biossintetizadas pelo mesmo sistema de acoplamento de aminoácidos mostrado na FIGURA 1.8. Existem duas diferentes possibilidades. A primeira é de que exista uma nova enzima peptídeo sintetase não ribossomal (PSNR) envolvida na produção desses metabólitos a qual produz os compostos com a participação de uma enzima policetídeo sintetase gerando os produtos híbridos. Segundo: a enzima peptídeo sintetase não ribossomal (PSNR) acopla dois diferentes aminoácidos, levando ao intermediário imina que espontaneamente forma o composto aromático. Como a posição 5 do anel é suscetível à substituição eletrofílica, ocorre uma condensação com malonil-CoA seguida de redução e eliminação de água para formar o sistema conjugado final – FIGURA 4.46.

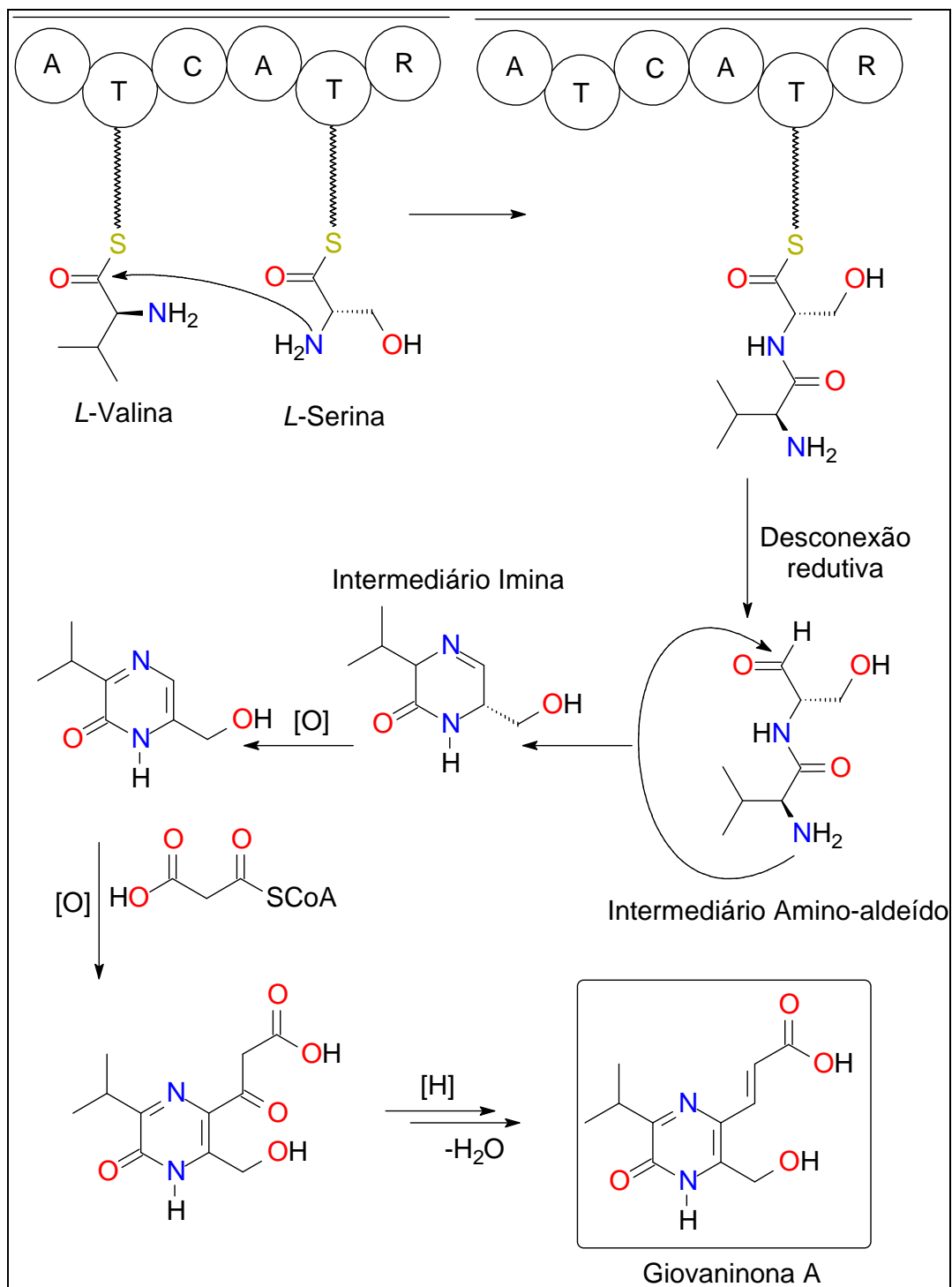


FIGURA 4.46 – Proposta biogénica para giovanninona A.

As outras giovanninonas seriam formadas de acordo com a mesma rota biogénica sugerida. Giovanninona B é provavelmente um acoplamento entre *L*-valina e glicina. Giovanninona C é provavelmente um acoplamento entre *L*-valina e *L*-alanina e giovanninona D é um acoplamento entre *L*-isoleucina e *L*-serina, de acordo com a FIGURA 4.47.

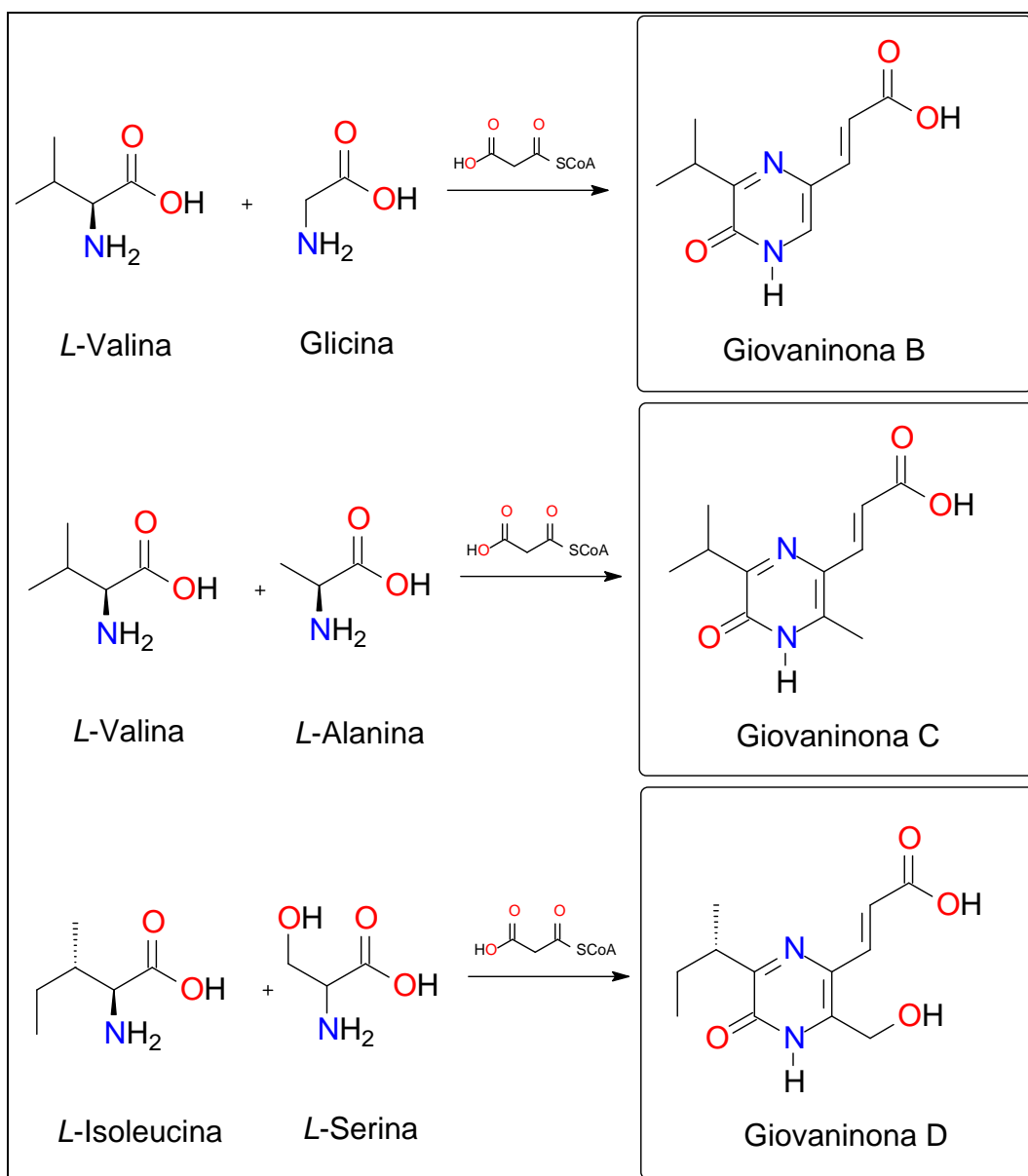


FIGURA 4.47 – Proposta biogénica para os compostos giovaninonas B, C e D.

Na sequência serão descritos os trabalhos de elucidação estrutural para os compostos presentes em maior quantidade nas frações AE8GP e AE9GP (área tracejada em azul na FIGURA 4.6).

4.2.11 - Fração AE8GP

Inicialmente foi realizada a análise por espectrometria de massa de alta resolução (HRMS), conforme mostra a FIGURA 4.48. A fração AE8GP apresentou o pico, no modo positivo de ionização, $[M+H]^+$ m/z 239,1020, levando à fórmula

molecular $C_{11}H_{15}O_4N_2$. Essa fórmula é exatamente a mesma para o composto giovaninona A (FIGURA 4.18).

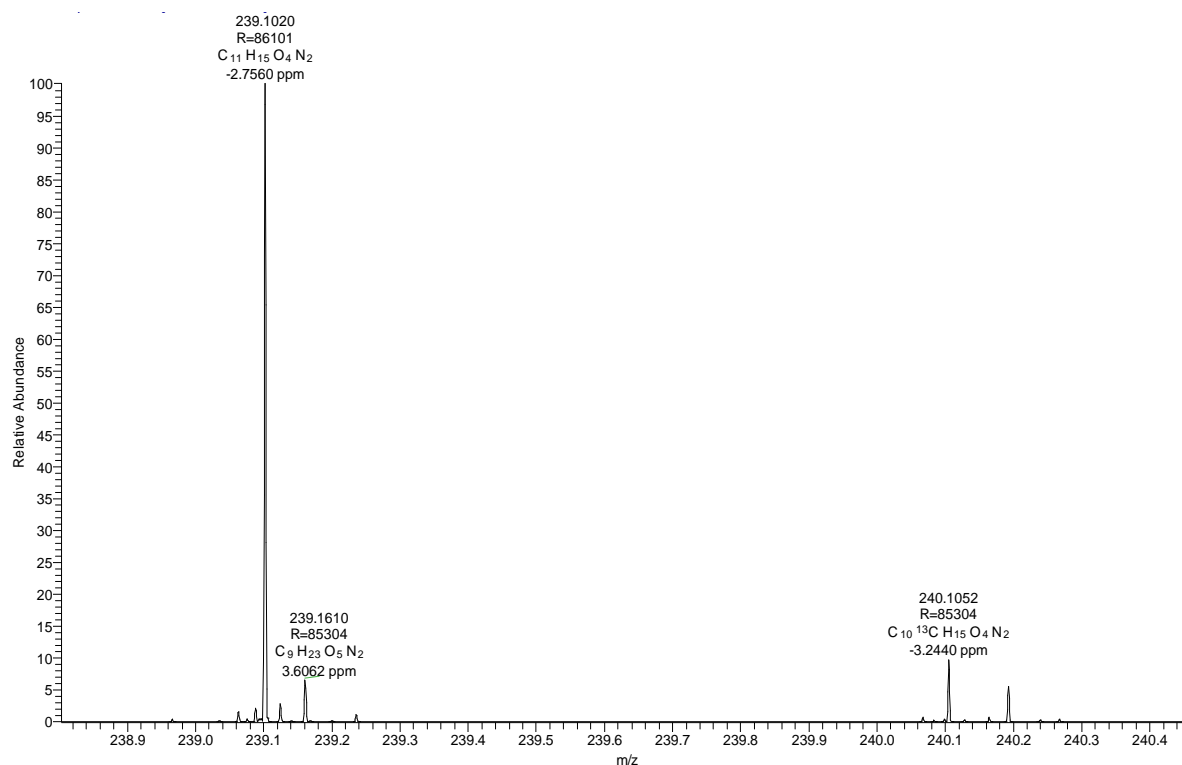


FIGURA 4.48 - HRMS, modo positivo – Fração AE8GP

A análise do espectro de RMN de 1H obtido, mostrou a presença de dois dupletos na região de aromáticos e olefínicos, sendo um em δ_H 6,92 (1H, H7, $^3J_{H7-H8} = 13,02$ Hz) e outro em δ_H 5,87 (1H, H8, $^3J_{H8-H7} = 13,02$ Hz). Essa constante de acoplamento ainda indica a presença de um sistema de ligação dupla *trans*, embora evidencie um menor alinhamento dos orbitais, o que torna o acoplamento mais forte. Esses hidrogênios olefínicos também estão mais blindados em comparação com os hidrogênios da ligação dupla *trans* no composto giovaninona A (FIGURA 4.18), em que esses hidrogênios olefínicos apresentam constante de acoplamento de 15,80 Hz. É possível visualizar também um simpleto em δ_H 4,67 (2H). Na região alifática, um hepteto em δ_H 3,50 (1H, H10, $^3J_{H10-H11,12} = 6,69$ Hz) e em δ_H 1,27, um duplete (6H, H11, H12, $^3J_{H11,12-H10} = 6,69$ Hz). De acordo com esses dados, é possível concluir que ambos os grupos hidróxi-metil e isopropil estão também presentes nesta estrutura. A FIGURA 4.49 mostra o espectro de RMN de 1H obtido.

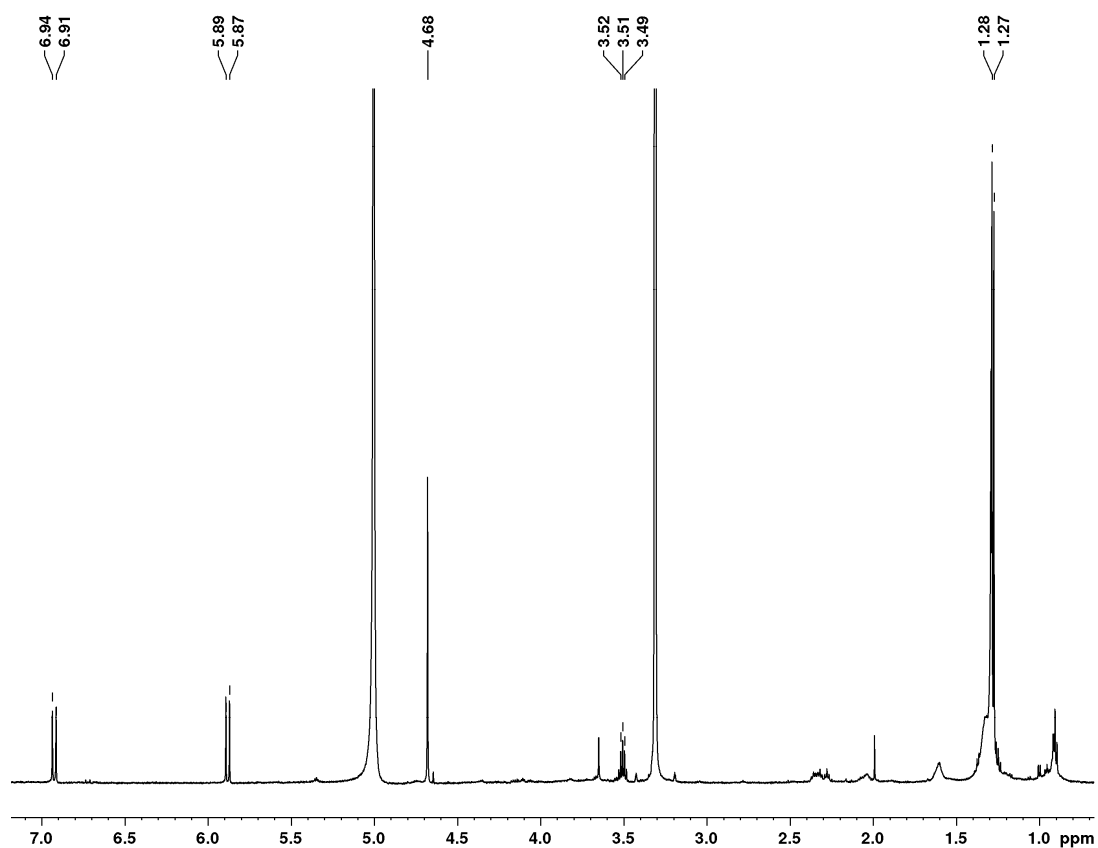


FIGURA 4.49 – Espectro de RMN de ^1H da fração AE8GP, 300 μg em 250 μL de $\text{MeOH-}d_4$).

O mapa de contorno $g\text{COSY}$ confirmou as suposições feitas a partir da análise do espectro de RMN de ^1H . A FIGURA 4.50 mostra o mapa de correlação $g\text{COSY}$, onde verifica-se claramente as correlações homonucleares entre os hidrogênios δ_{H} 6,92 (H7) e δ_{H} 5,87 (H8) e os hidrogênios δ_{H} 3,50 (H10) e δ_{H} 1,27 (H11, H12).

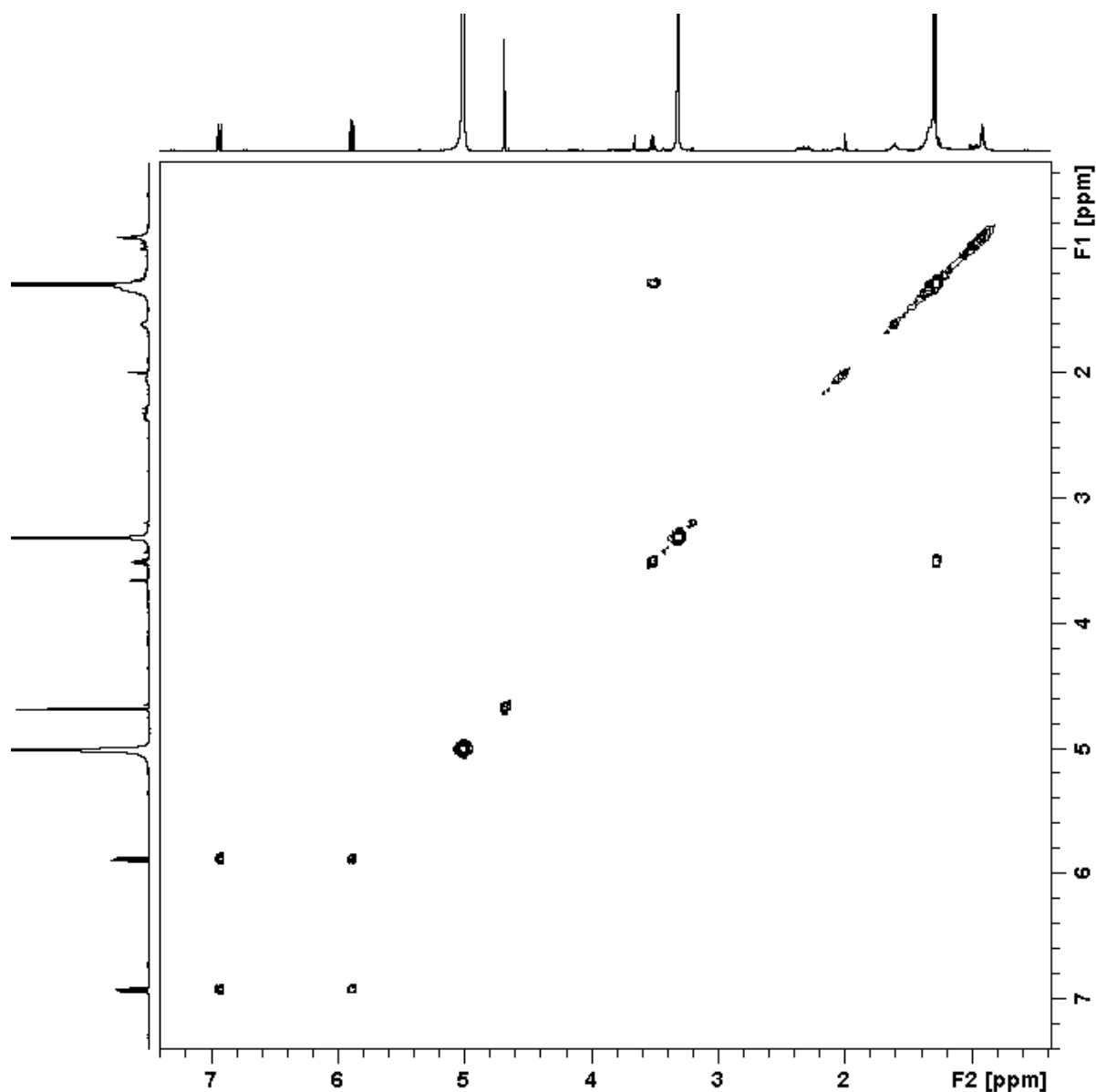


FIGURA 4.50 – Mapa de contorno gCOSY da fração AE8GP.

Através da análise do mapa de contorno gHSQC (FIGURA 4.51) foram atribuídos os deslocamentos químicos dos carbonos em δ_C 132,3 (C7), ligado ao hidrogênio δ_H 6,92 (H7); δ_C 120,6 (C8), ligado ao hidrogênio δ_H 5,87 (H8); δ_C 58,2 (C6'), ligado aos hidrogênios δ_H 4,67 (H6'); δ_C 30,9 (C10), ligado ao hidrogênio δ_H 3,50 (H10) e δ_C 20,0 (C11, C12) ligado aos hidrogênios δ_H 1,27 (H11, H12). Mais uma vez, todos esses dados são compatíveis com a estrutura do composto giovaninona A (FIGURA 4.18), exceto pelo deslocamento químico dos carbonos e hidrogênios da ligação dupla *trans*, além da constante de acoplamento menor.

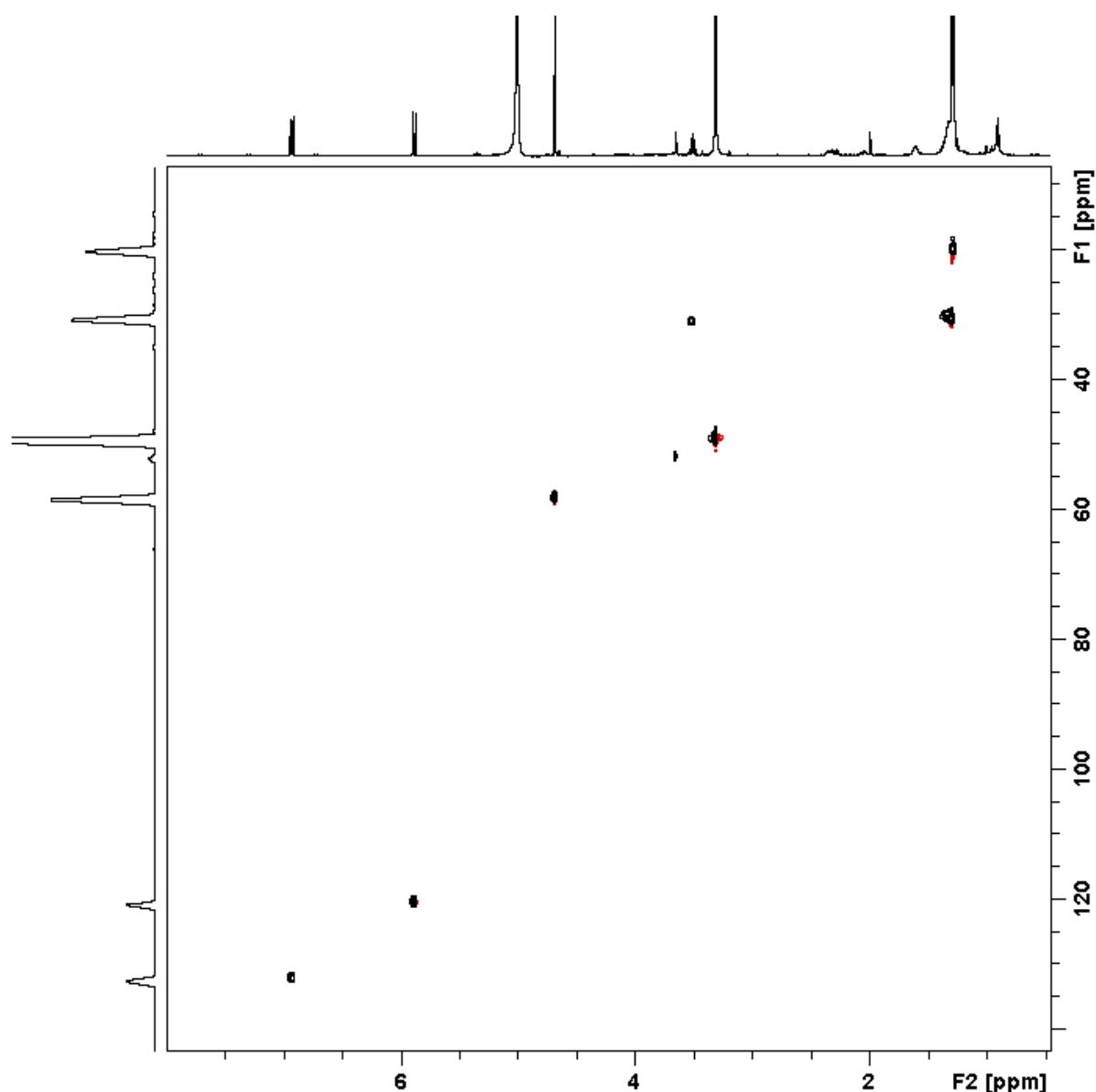


FIGURA 4.51 – Mapa de contorno gHSQC da fração AE8GP.

A FIGURA 4.52 mostra o espectro de gHMBC obtido para a fração AE6GP. Os hidrogênios em δ_H 1,27 (H11, 12) apresentaram correlação com os carbonos em δ_C 30,9 (C10) e δ_C 163,0 (C3). O hidrogênio em δ_H 3,50 (H10) apresentou correlação com os carbonos δ_C 20,0 (C11, C12), δ_C 156,8 (C2) e δ_C 163,0 (C3). Os hidrogênios em δ_H 4,67 apresentaram correlações com os carbonos em δ_C 120,6 (C8), δ_C 125,0 (C5), δ_C 132,3 (C7), δ_C 143,6 (C6) e δ_C 163,0 (C3). O hidrogênio em δ_H 5,87 (H8) apresentou correlações com os carbonos em δ_C 125,0 (C5), δ_C 132,3 (C7) e δ_C 170,6 (C9). Por fim, o hidrogênio em δ_H 6,92 (H7) apresentou correlação com os carbonos em δ_C 120,6 (C8), δ_C 125,0 (C5), δ_C 143,6 (C6), δ_C 163,0 (C3) e δ_C 170,6 (C9). Dessa forma, já é possível inferir que a

substância presente em maior quantidade na fração AE8GP tem uma grande semelhança estrutural com o composto giovaninona A (FIGURA 4.18).

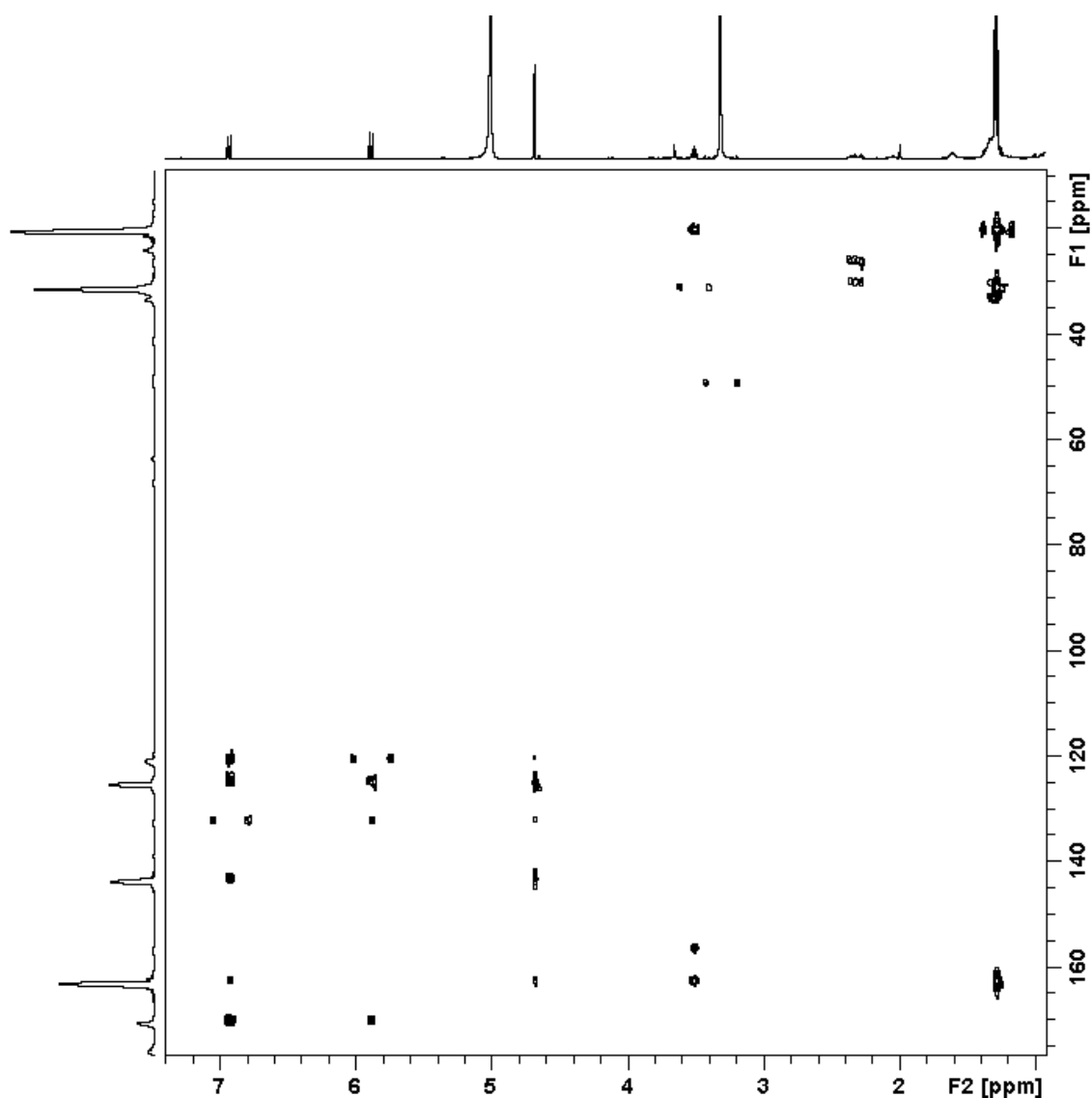


FIGURA 4.52 – Mapa de contorno gHMBC da fração AE8GP.

A análise de fragmentação por espectrometria de massa (MS) mostrou exatamente o mesmo padrão de fragmentação observada no composto giovaninona A. A fragmentação em MS² gerou os íons de m/z 221,0, 203,0 e 195,2. A fragmentação em MS³ do íon de m/z 221,0 gerou os íons-filhos de m/z 203,0, 193,0, 175,0 151,0 e 132,4. Esses resultados dão um forte indício de que a conectividade dos átomos no composto presente na fração AE8GP é a mesma que a encontrada na giovaninona A (FIGURA 4.18) e estão apresentados na FIGURA 4.53.

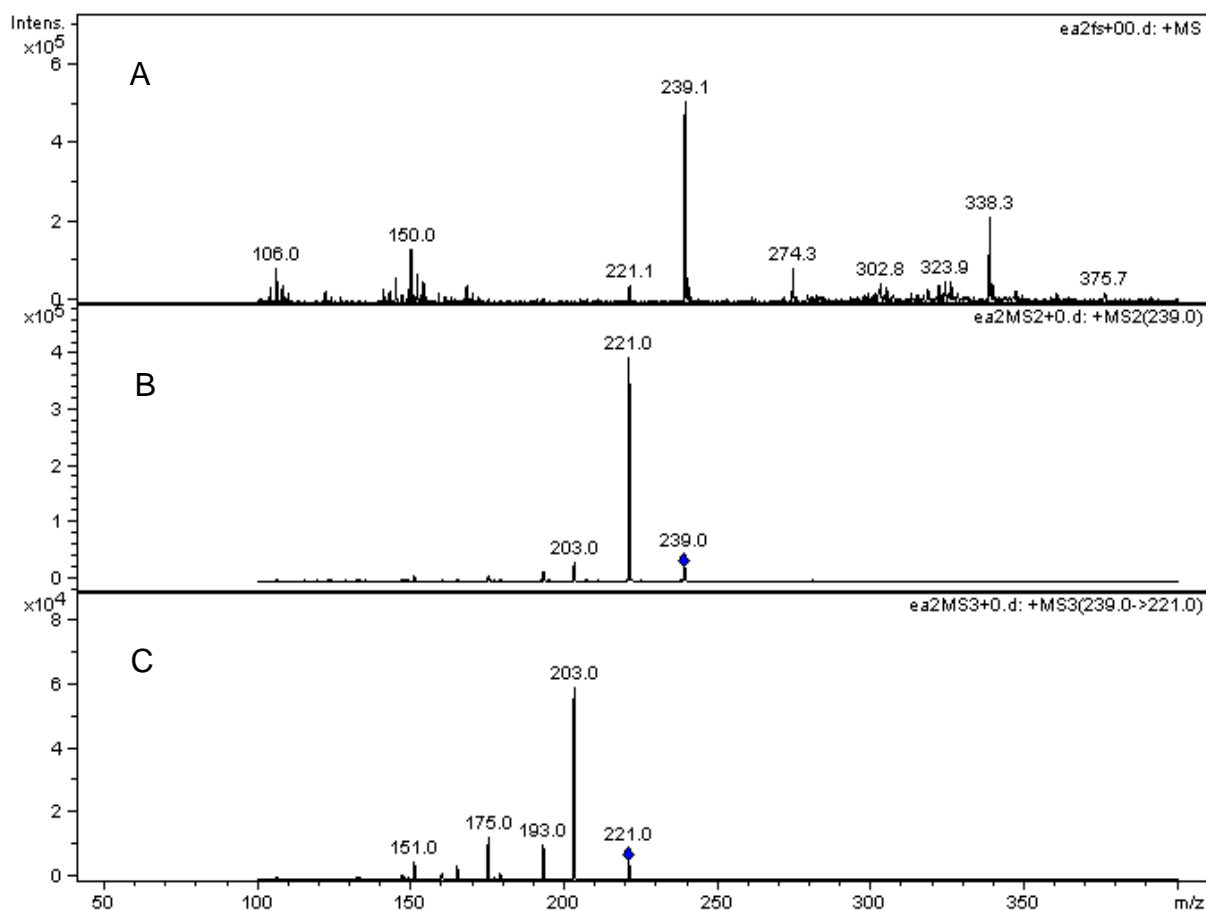


FIGURA 4.53 – Espectro de massa da fração AE6GP em *electrospray* no modo positivo de ionização. A) espectro de íons totais (*Full scan*). B) fragmentação do íon [M+H]⁺ *m/z* 239,1 e C) fragmentação em MS³ do íon de *m/z* 221,0.

Baseado nesses resultados, a fórmula estrutural proposta para o composto presente em maior quantidade na fração AE8GP está apresentada na FIGURA 4.54. É exatamente a mesma que a identificada para o composto giovaninona A (FIGURA 4.18), exceto pelos deslocamentos químicos e constante de acoplamento para a ligação dupla *trans* conectada à posição 5 do sistema cíclico, o que sugere uma diferença espacial nessa cadeia lateral. Para uma melhor visualização das informações, os dados espectroscópicos estão dispostos na TABELA 4.9.

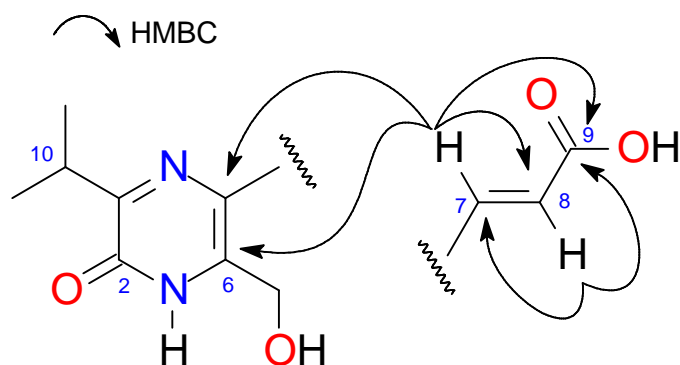


FIGURA 4.54 – Proposta estrutural para o composto presente em maior quantidade na fração AE8GP. As setas representam as correlações gHMBC observadas.

TABELA 4.9 – Dados espectroscópicos para o composto majoritário da fração AE8GP (^{13}C , 150 MHz; ^1H , 600 MHz, 300 μg em 250 μL de $\text{MeOH-}d_4$).

no.	δ_{C}	δ_{H} , <i>mult.</i> (J em Hz)	COSY	HMBC
2	156,8			
3	163,0			
5	125,0			
6	143,6			
6'	58,2	4,67, s		3, 5, 6, 7, 8
7	132,3	6,92, <i>d</i> (13,02)	8	3, 5, 6, 8, 9
8	120,6	5,87, <i>d</i> (13,02)	7	5, 6, 7, 9
9	170,6			
10	30,9	3,50, <i>h</i> (6,96)	11, 12	2, 3, 11, 12
11, 12	20,0	1,27, <i>d</i> (6,96)	10	3, 10

Por fim, um estudo por RMN com variação de temperatura foi realizado. Foram obtidos espectros de RMN de ^1H em três diferentes temperaturas: 0, 25 e 50°C. O espectro de RMN de ^1H a 0°C mostrou o aparecimento de dois novos sinais na região de olefínicos: dupletos, um em δ_{H} 7,67 ($^3J = 15,80$ Hz) e outro em δ_{H} 6,72 ($^3J = 15,80$ Hz). Esses deslocamentos químicos, bem como a constante de acoplamento são o suficiente para afirmar que houve conversão de parte do composto da fração AE8GP na estrutura giovaninona A (FIGURA 4.18) com a diminuição da temperatura. No espectro de RMN de ^1H à 25°C esses dupletos ainda estavam presentes, mas em uma intensidade menor. E, no espectro de RMN de ^1H à 50°C, os dupletos equivalentes ao composto giovaninona A ainda estavam

presentes, mas em menor relação sinal ruído do que nos casos anteriores. A FIGURA 4.55 mostra a comparação dos espectros obtidos em diferentes temperaturas. Os sinais circulosados em vermelho foram escolhidos para integração e comparação da quantidade relativa dos compostos. A TABELA 4.10 compara a integração e proporção desses sinais.

O estudo de variação de temperatura foi repetido e o mesmo resultado foi obtido, indicando que os compostos presentes nas frações AE8GP e AE10GP são confôrmeros interconversíveis por variação de temperatura e separáveis por cromatografia líquida (HPLC). O giro na ligação C5-C7 é restrito, por se trata de um sistema conjugado. A conformação de menor energia deve ser a *conformação 1* (FIGURA 4.56), uma vez que ela prevalece à temperaturas menores. A *conformação 2* deve ser a de maior energia, já que prevalece à maiores temperaturas. A maior energia na *conformação 2* provavelmente está relacionada à repulsão entre H8 e H6', que deve existir quando a molécula assume esse alinhamento espacial. A constante de acoplamento de H7-H8 de 13,02 Hz, mostra que o ângulo diedro entre esses hidrogênios não é tão favorável para o acoplamento homonuclear quanto no caso da *conformação 1* (constante de acoplamento 15,08 Hz), uma vez que essa repulsão espacial entre H8 e H6' não existe. Dessa forma, a fração AE8GP trata-se da *conformação 2* do composto nomeado giovaninona A, enquanto a fração AE10GP trata-se da *conformação 1* do mesmo composto.

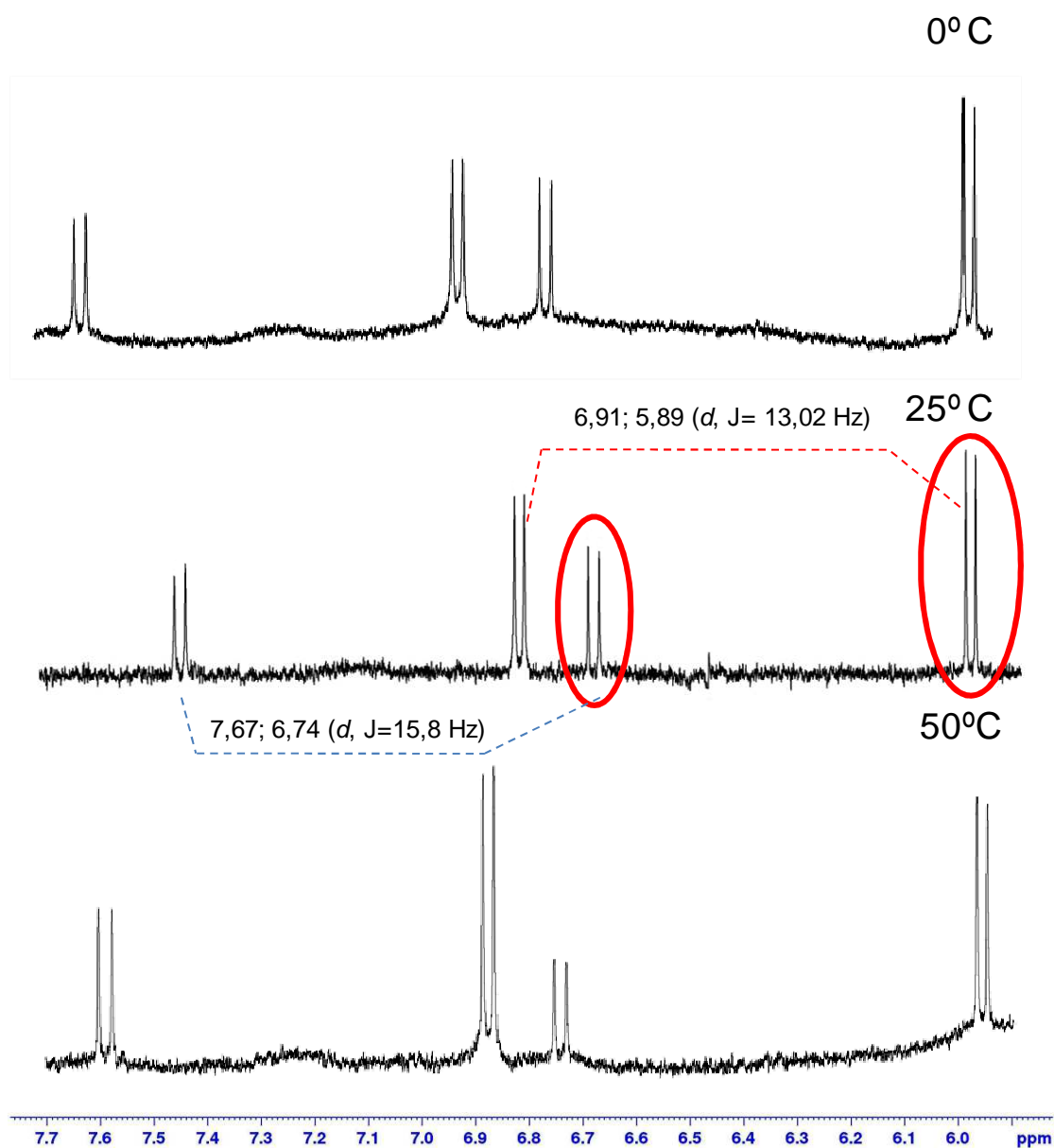


FIGURA 4.55 – Ampliação da região de hidrogênios olefínicos do espectro de RMN de ^1H da fração AE6GP a diferentes temperaturas

TABELA 4.10 – Integração dos sinais selecionados (círculo vermelho) na FIGURA 4.86.

T(°C)	Integral δ_{H} 6,74 – $^3J = 15,8 \text{ Hz}$	Integral δ_{H} 5,89 – $^3J = 13,02 \text{ Hz}$	Proporção
0	100	104	1:1
25	100	175	1:1,75
50	100	400	1:4

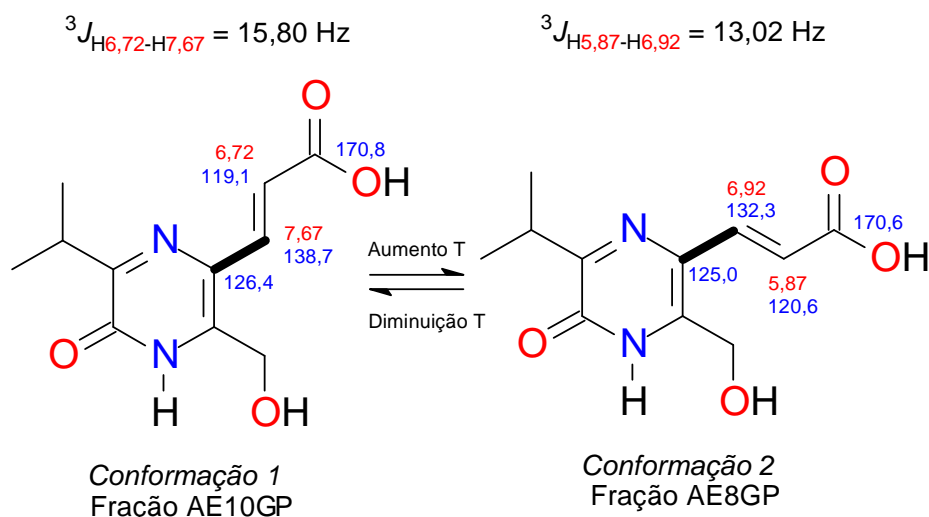


FIGURA 4.56 – Representação das duas conformações possíveis para o composto giovaninona A. Os deslocamentos químicos em vermelhos são ressonância de hidrogênio e os deslocamentos químicos em azul são ressonância de carbono.

4.2.12 - Fração AE9GP

A fração AE9GP apresenta outro confômero, desta vez da giovaninona C. Os dados espectroscópicos de RMN e de espectrometria de massa (MS) novamente apontam para uma estrutura com a mesma conexão de átomos, já identificados na fração AE12GP. As diferenças novamente se encontram na ligação dupla *trans* conectada à posição 5 do sistema cíclico. A FIGURA 4.57 mostra as conformações presentes em maior quantidade nas frações AE9GP e AE12GP, bem como as diferenças nos deslocamentos químicos de hidrogênio e carbono dos dois confômeros.

Na sequência serão apresentados os dados de RMN coletados para o composto presente em maior quantidade na fração AE9GP, na TABELA 4.11. A FIGURA 4.58 mostra o espectro de massa de alta resolução (HRMS), a FIGURA 4.59 mostra o espectro de RMN de ${}^1\text{H}$, a FIGURA 4.60 mostra o espectro de gCOSY, a FIGURA 4.61 mostra o mapa de contorno gHSQC, a FIGURA 4.62 mostra o espectro de gHMBC e a FIGURA 4.63 mostra os dados de espectrometria de massa – *Full scan* e fragmentação.

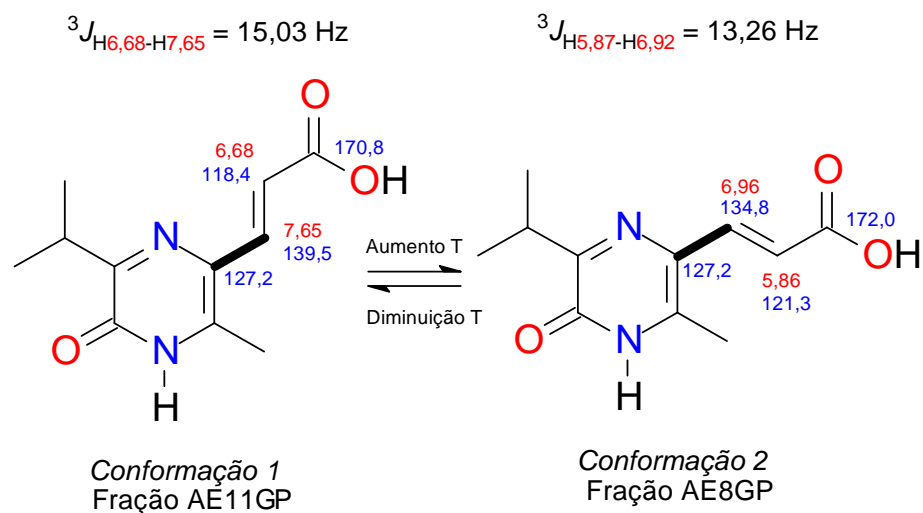


FIGURA 4.57 – Representação das duas conformações possíveis para o composto giovaninona C. Os deslocamentos químicos em vermelhos são ressonância de hidrogênio e os deslocamentos químicos em azul são ressonância de carbono.

TABELA 4.11 – Dados espectroscópicos para o composto majoritário da fração AE9GP (${}^{13}\text{C}$, 150 MHz; ${}^1\text{H}$, 600 MHz, 200 μg em 250 μL de $\text{MeOH-}d_4$).

no.	δ_{C}	δ_{H} , <i>mult.</i> (J em Hz)	COSY	HMBC
2	157,6			
3	163,8			
5	127,2			
6	144,0			
6'	17,4	2,43, s		3, 5, 6, 7, 8
7	134,8	6,96, <i>d</i> (13,26)	8	3, 5, 6, 8, 9
8	121,3	5,86, <i>d</i> (13,26)	7	5, 6, 7, 9
9	172,0			
10	32,3	3,47, <i>h</i> (6,96)	11, 12	2, 3, 11, 12
11, 12	21,1	1,27, <i>d</i> (6,96)	10	3, 10

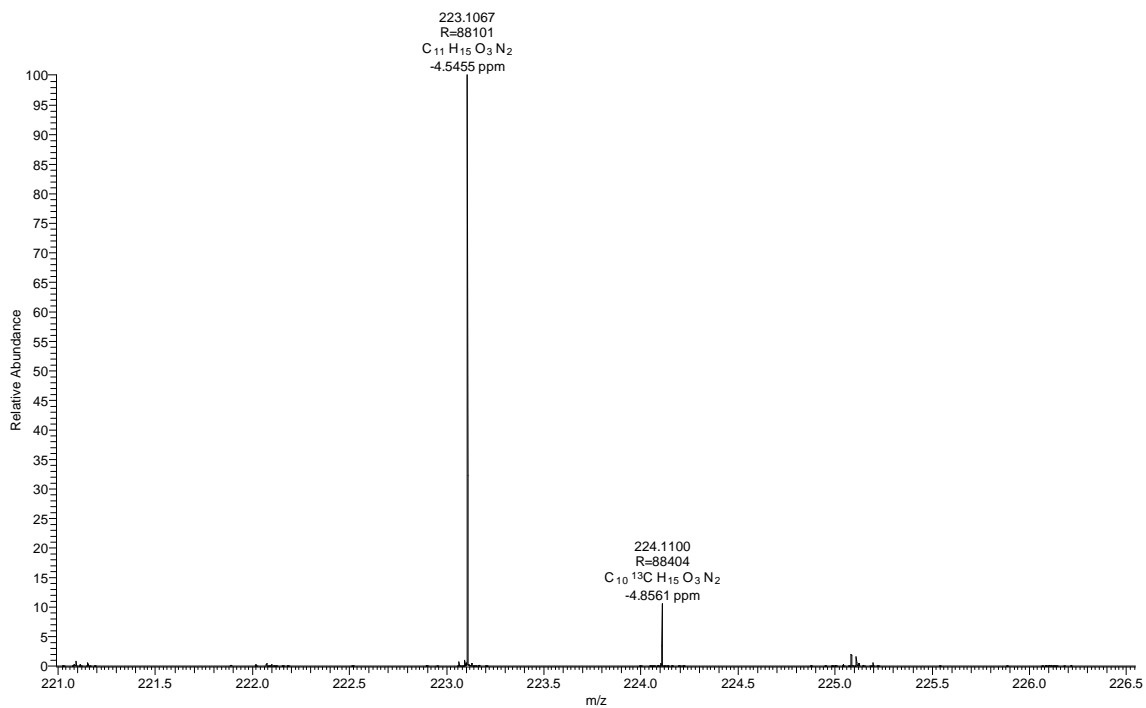


FIGURA 4.58 - HRMS, modo positivo – Fração AE9GP.

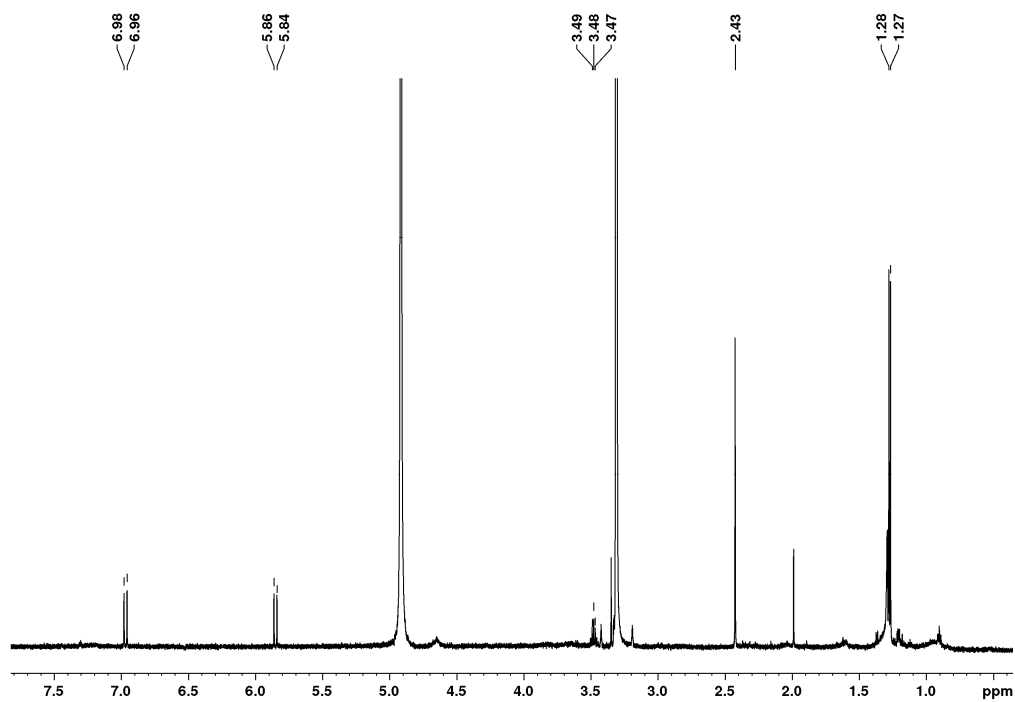


FIGURA 4.59 – Espectro de RMN de ¹H da fração AE9GP, 200 µg em 250 µL de MeOH-*d*₄.

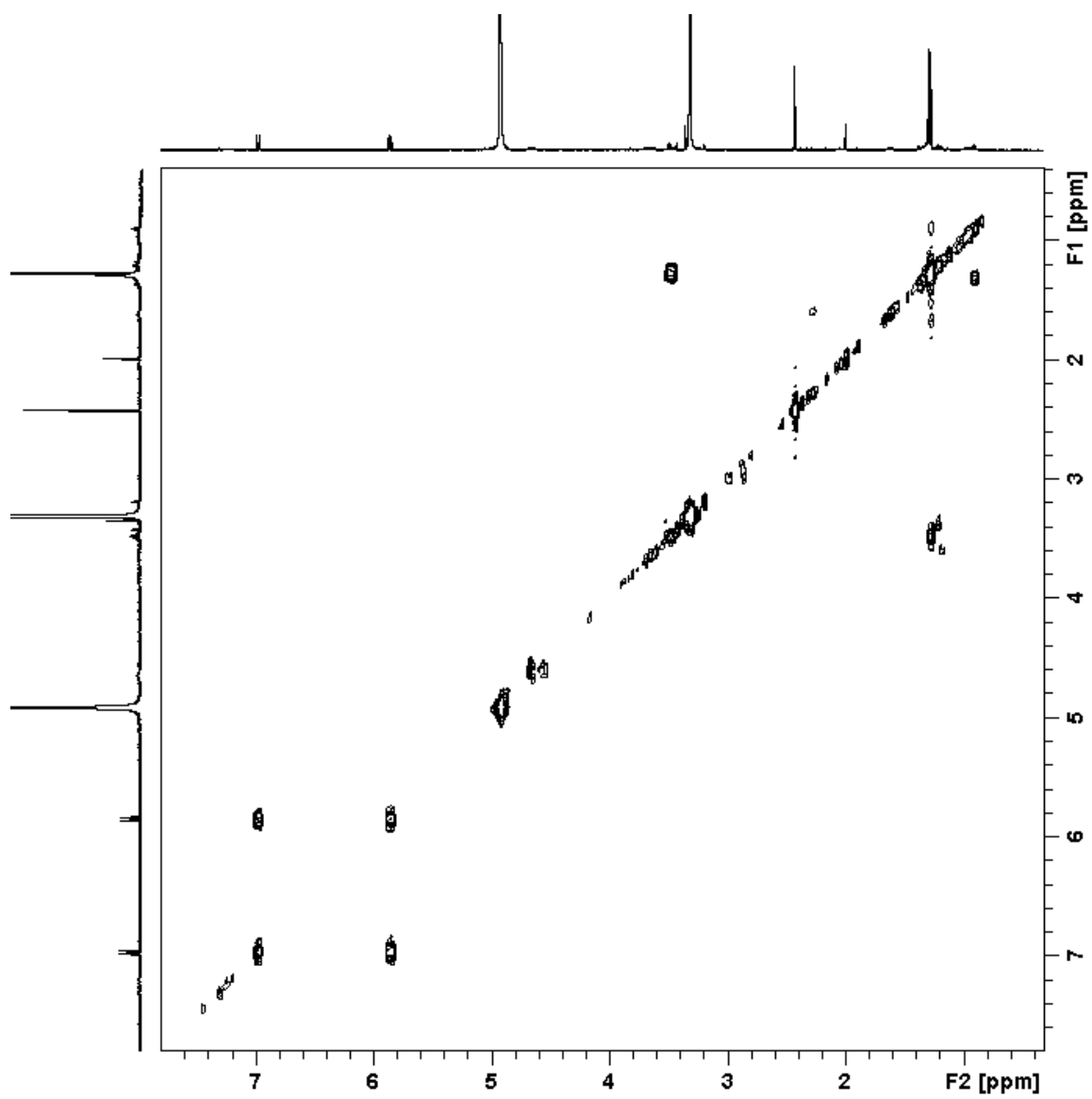


FIGURA 4.60 – Mapa de contorno gCOSY da fração AE9GP.

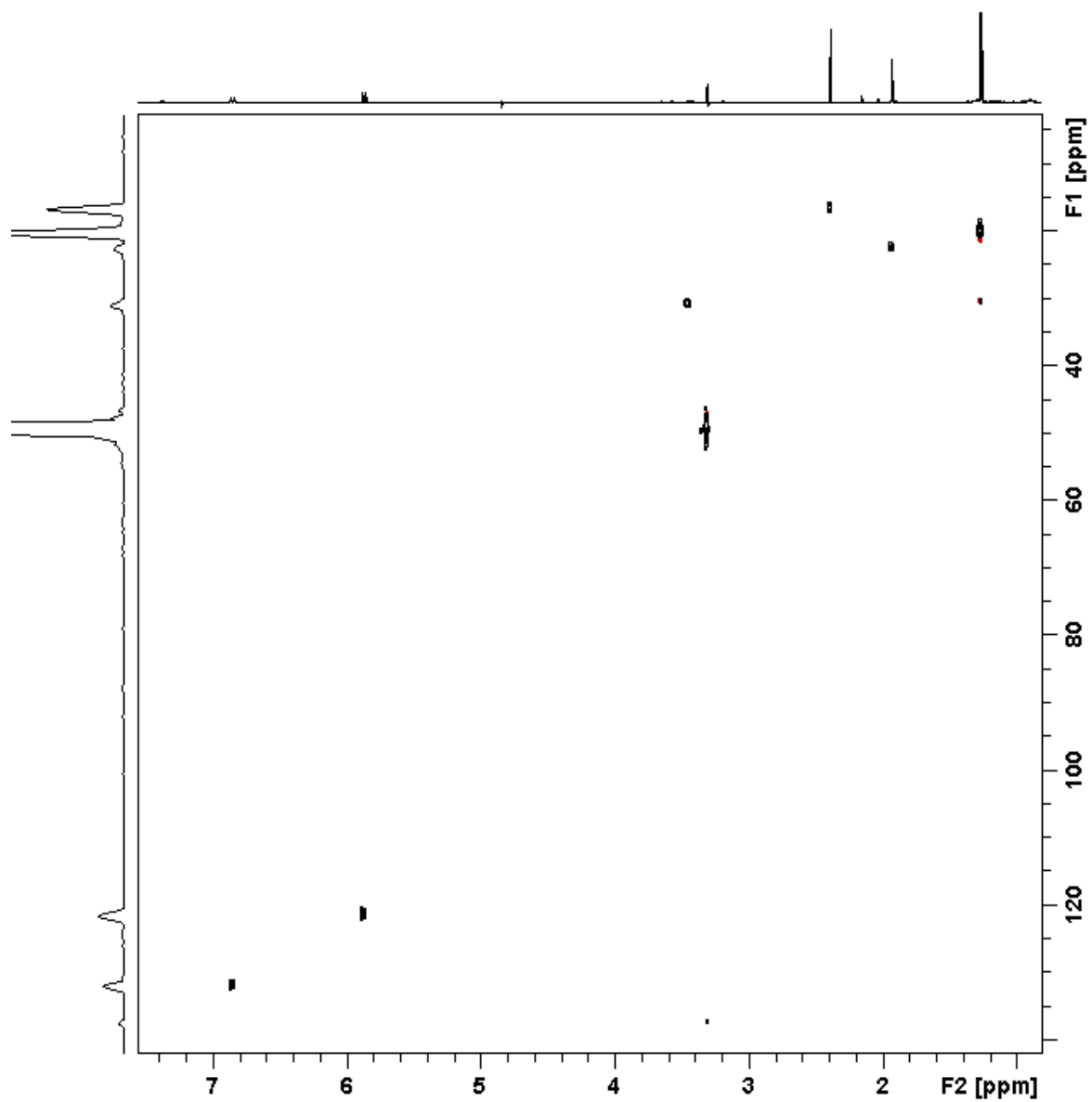


FIGURA 4.61 – Mapa de contorno gHSQC da fração AE9GP.

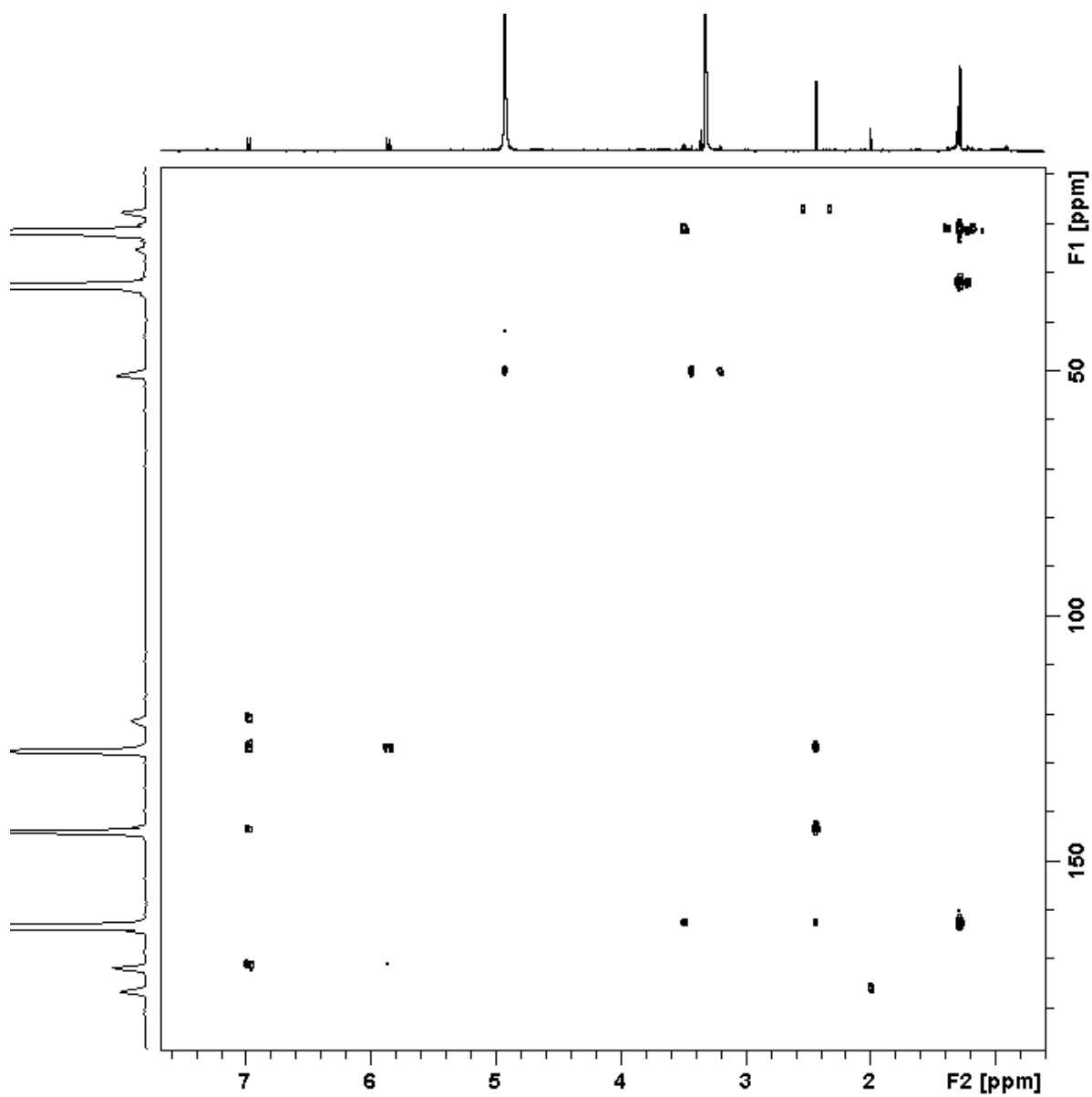


FIGURA 4.62 – Mapa de contorno gHMBC da fração AE9GP.

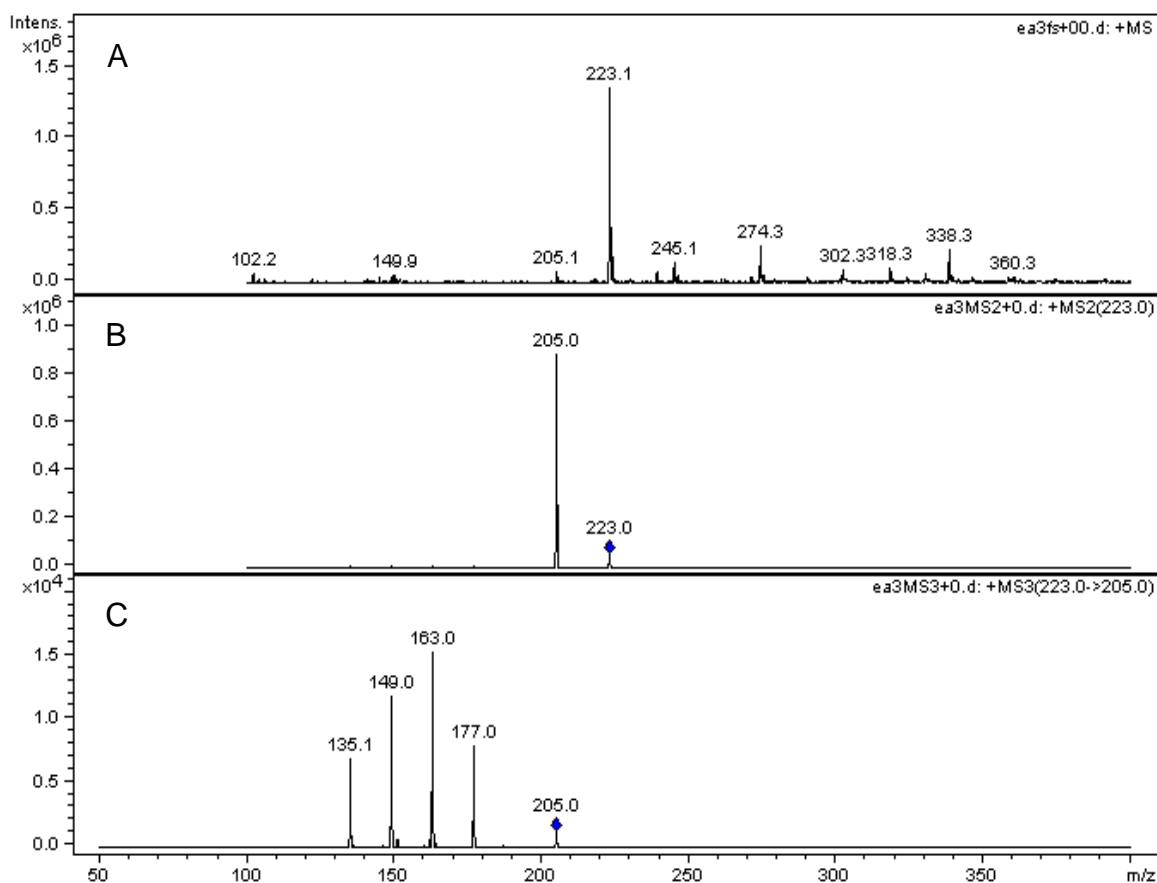


FIGURA 4.63 – Espectro de massa da fração AE9GP em *electrospray* no modo positivo de ionização. A) espectro de íons totais (*Full scan*). B) fragmentação do íon $[M+H]^+$ m/z 223,0 e C) fragmentação em MS³ do íon de m/z 205,0.

Dessa forma, a FIGURA 4.64 mostra novamente o cromatograma e as estruturas identificadas a partir das análises dos dados espectroscópicos. A fração AE8GP (tr = 18,2 min) é o confômero de maior energia da giovaninona A (fração AE10GP – tr = 27,1 min). A fração AE9GP (tr = 21,6 min) é o confômero de maior energia da giovaninona C (fração AE12GP – tr = 29,9 min). Não foram identificados os confômeros dos compostos giovaninonas B e D. Para giovaninona B isso pode estar provavelmente relacionado à ausência de um substituinte na posição 6 do sistema cíclico. Para giovaninona D, esse confômero provavelmente existe, mas está em quantidade abaixo do limite de detecção e resolução por cromatografia.

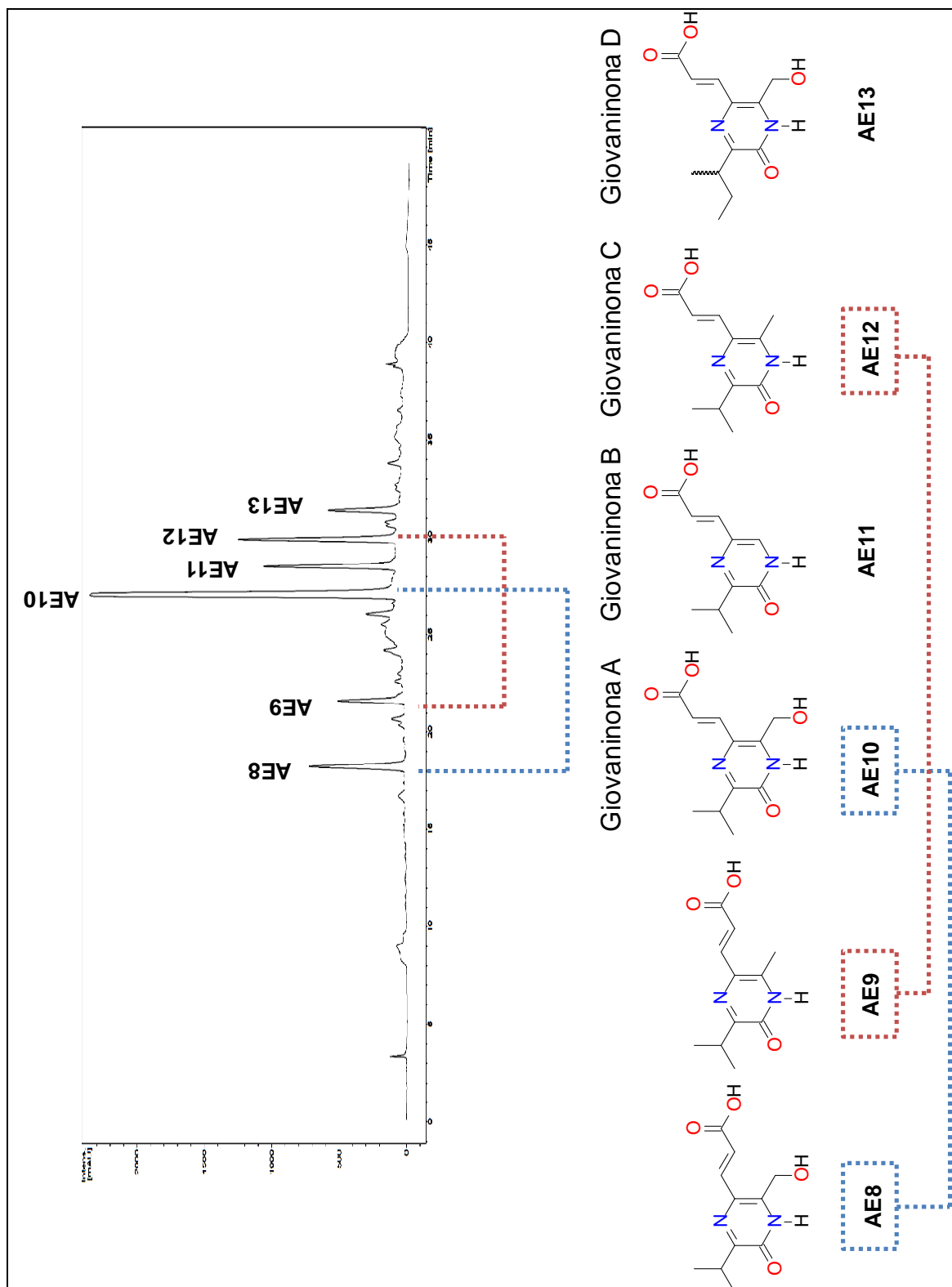


FIGURA 4.64 – Cromatograma otimizado ($\lambda 300$) do extrato acetato de etila (EA) do caldo de fermentação da bactéria *S. cebimarensis* SS99BA-2, compostos com fatores de retenção (k) médio. Modificador orgânico = Metanol, 0,05% de TFA. Estruturas pirazinônicas identificadas.

4.3 - Análise do extrato butanólico

De maneira semelhante ao que foi feito com o extrato de acetato de etila, 3 mg do extrato seco de n-butanol foram dissolvidos em 1,5 mL de uma mistura 1/1 de água milli-Q/metanol. A solução foi filtrada com filtro de membrana de 0,45 μm e encaminhada à análise por HPLC.

Inicialmente, a amostra foi submetida a uma análise exploratória para prever os fatores de retenção (k) dos compostos presentes no extrato butanólico. O cromatograma representado na FIGURA 4.65 foi realizado a partir do seguinte método: volume de injeção 20 μL , fluxo de 1,0 mL/min, monitorando o comprimento de onda de 254 nm (com DAD-2D obtido simultaneamente), eluente A (H_2O mili Q), eluente B (Metanol). Após a eluição cromatográfica foi realizada a limpeza da coluna com 100 % de B por 5 minutos acompanhados por retorno do gradiente em 5 minutos (100-5% de B). A coluna foi condicionada por 5 minutos, totalizando 80 minutos por análise.

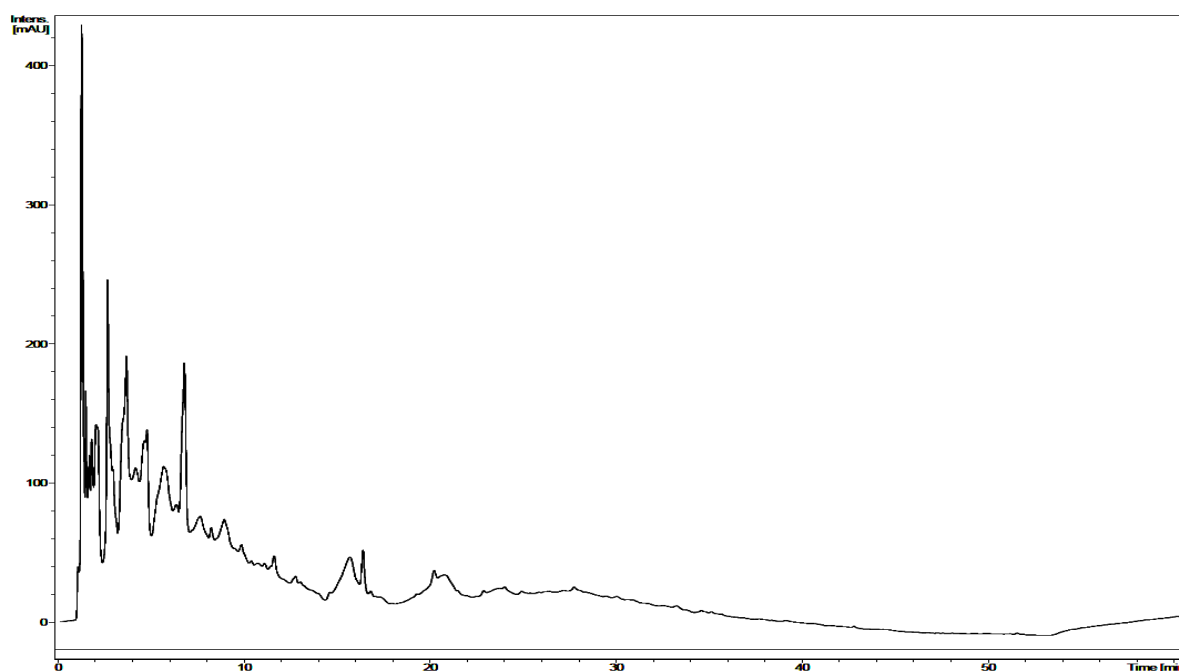


FIGURA 4.65 – Cromatograma ($\lambda 254$) do extrato butanólico (EB) do caldo de fermentação da bactéria *S. cebimarensis* SS99BA-2. Eluente A (H_2O mili Q), eluente B (Metanol). Eluição isocrática nos 5 minutos iniciais (5% de B / 95% de A), eluição gradiente 5-100 % de B durante 60 minutos.

Analisando a FIGURA 4.65 é possível verificar a presença de bandas cromatográficas no começo do cromatograma e poucas bandas após 10 minutos de corrida. Aparentemente, os compostos presentes têm baixa retenção na coluna, ou possivelmente existe ionização não suprimida. Com base nisso, optou-se por adicionar 0,05 % de ácido trifluoracético (TFA) em cada um dos eluentes originando as seguintes fases móveis: Eluente A (H₂O mili-Q, 0,05% de TFA) e eluente B (Metanol, 0,05% de TFA). Além disso, com base nos dados obtidos por DAD-2D, optou-se por monitorar o comprimento de onda 235 nm. A FIGURA 4.66 mostra o resultado dessa modificação no método.

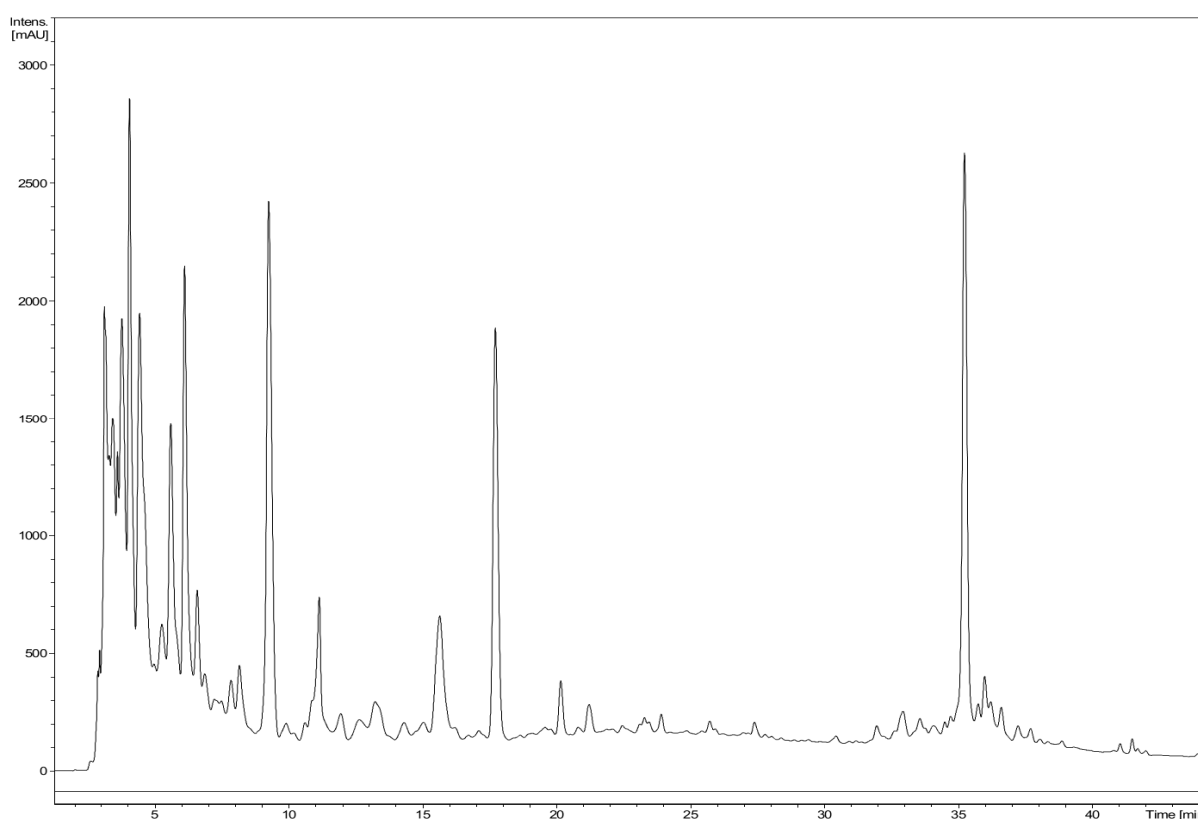


FIGURA 4.66 – Cromatograma (λ 235) do extrato butanólico (EB) do caldo de fermentação da bactéria *S. cebimarensis* SS99BA-2. Modificador orgânico = Eluente A (H₂O mili-Q, 0,05% de TFA) e eluente B (Metanol, 0,05% de TFA). Eluição isocrática nos 5 minutos iniciais (5% de B / 95% de A), eluição gradiente 5-100 % de B durante 60 minutos.

Analisando a FIGURA 4.66, é possível verificar que houve um grande aumento da resolução das bandas cromatográficas e maior retenção dos compostos. É possível verificar também a presença de outras bandas de absorção

nessa mesma figura, evidenciando a presença de compostos com alta e média polaridade. Optou-se, então, por seccionar o cromatograma em duas partes, assim como foi feito com o extrato de acetato de etila (AE), analisando separadamente os compostos com fatores de retenção (k) menores e fatores de retenção (k) médios.

Assim, foi desenvolvido um método para a separação dos compostos de maior polaridade: volume de injeção 20 μ L, fluxo de 1,0 mL/min, monitorando o comprimento de onda de 254 nm, eluente A (H₂O mili Q, 0,05% de TFA), eluente B (Metanol, 0,05% de TFA). Após a eluição cromatográfica foi realizada a limpeza da coluna com 100 % de B por 5 minutos acompanhados por retorno do gradiente em 5 minutos (100-5% de B). A coluna foi condicionada por 5 minutos, totalizando 30 minutos por análise. O resultado pode ser visto na FIGURA 4.67, que mostra o cromatograma resultante contendo as bandas cromatográficas identificadas como B1 (tr=4,68 min), B2 (tr=7,48 min) e B3 (tr=12,94 min).

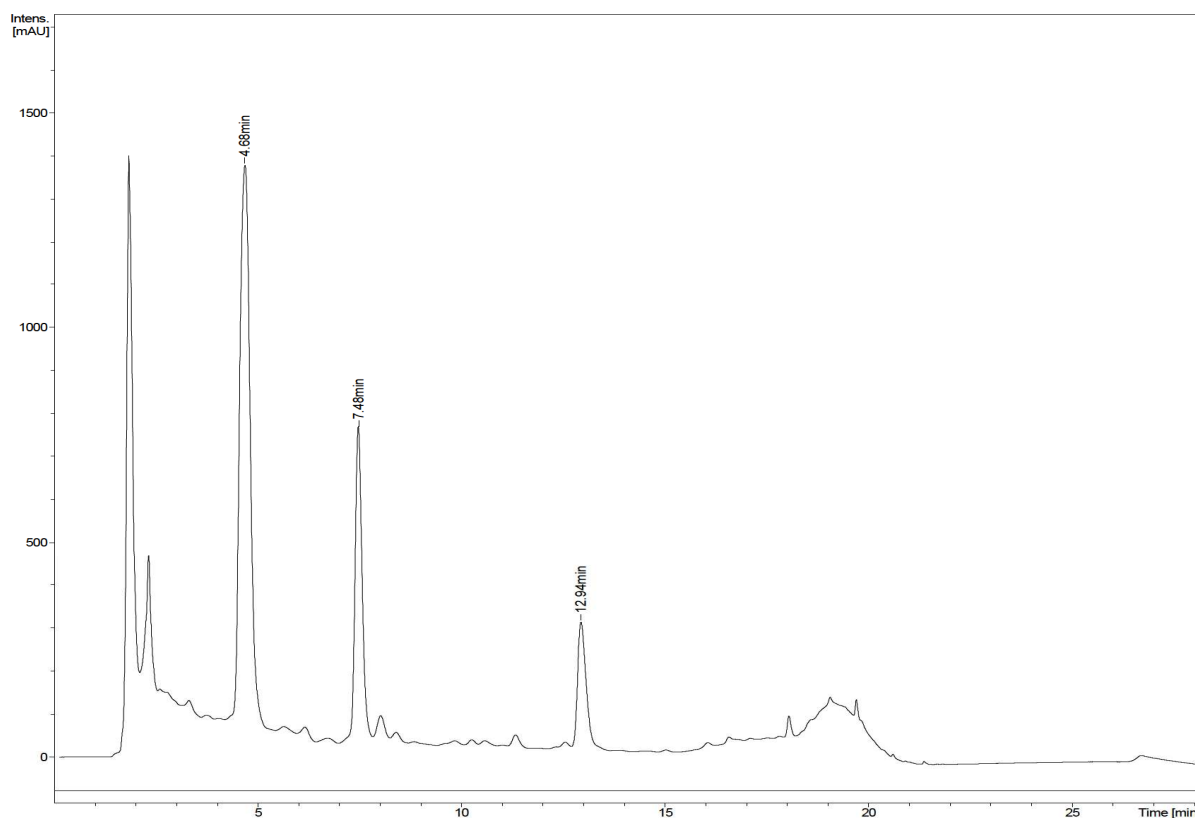


FIGURA 4.67 – Cromatograma otimizado (λ 254) do extrato butanólico (EB) do caldo de fermentação da bactéria *S. cebimarensis* SS99BA-2, compostos com menores fatores de retenção (k). Eluente A (H₂O mili Q, 0,05% de TFA), eluente B (Metanol, 0,05% de TFA). Eluição isocrática nos 5 minutos iniciais (5% de B / 95% de A), eluição gradiente 5-30 % de B durante 10 minutos.

Dessa forma, as frações B1 ($t_r=4,68$ min), B2 ($t_r=7,48$ min) e B3 ($t_r=12,94$ min) foram selecionadas para análise. Primeiro tentou-se adsorver essas frações em cartuchos de fase estacionária *General Phase* (HysphereTM-resin), gerando as amostras B1GP, B2GP, B3GP. As três amostras foram encaminhadas para análise por RMN, mas não houve retenção dos compostos em nenhuma das três amostras analisadas. Na sequência trocou-se a fase estacionária dos cartuchos utilizados para HysphereTM-resin C18 HD, na tentativa de alcançar alguma retenção dessas frações. Foram então geradas as amostras B1C18, B2C18 e B3C18. Novamente não houve retenção em nenhum dos casos.

A próxima fase estacionária utilizada foi a HysphereTM-resin *Strong Hydrophobic*, as amostras B1SH, B2SH e B3SH foram encaminhadas para análise por RMN. As amostras ainda apresentaram sinais poucos intensos nos espectros de RMN, necessitando de muitas varreduras para a visualização adequada dos sinais. Com intuito de aumentar a retenção, o processo de isolamento por LC-SPE foi feito utilizando água acidificada com 0,05% de TFA na bomba extra (FIGURA 3.5 (E)), ou seja, o mesmo pH dos solventes de eluição na corrida cromatográfica, com o objetivo de diminuir ao máximo a hidrofília dos analitos durante a separação e o processo de adsorção. Os resultados dessas modificações podem ser vistos nas FIGURAS 4.68, 4.69 e 4.70.

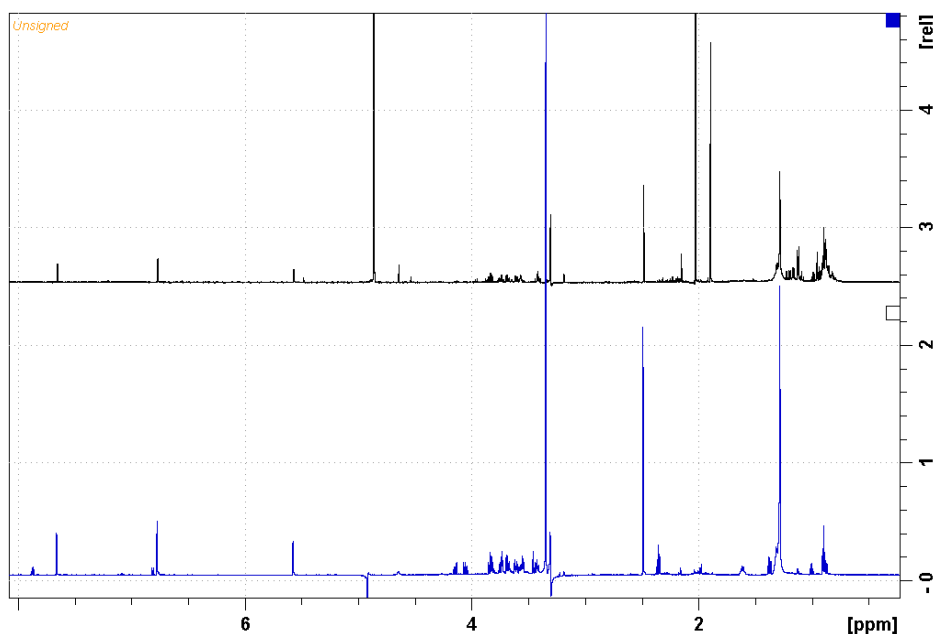


FIGURA 4.68 – Espectro de ¹H do pico B1SH. Linha preta – sem adição de ácido. Linha azul – com adição de ácido. ns = 32.

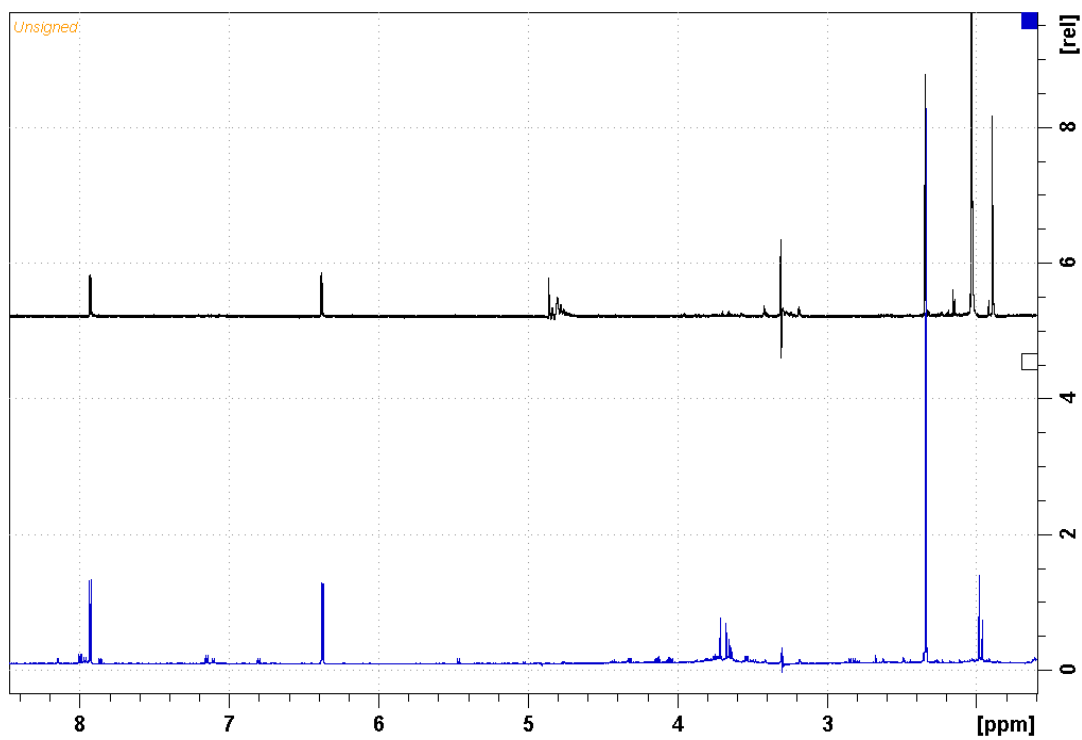


FIGURA 4.69 – Espectro de ^1H do pico B2SH. Linha preta – sem adição de ácido. Linha azul – com adição de ácido. ns = 32.

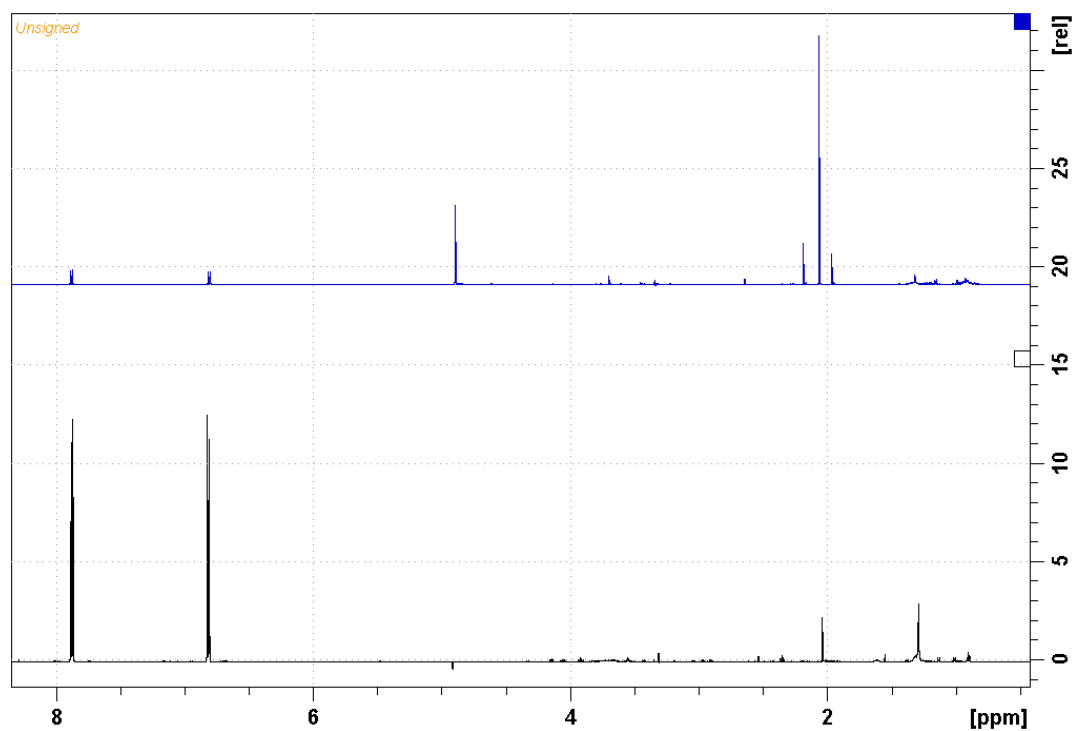


FIGURA 4.70 – Espectro de ^1H do pico B3SH. Linha azul – sem adição de ácido. Linha preta – com adição de ácido. ns = 32.

Conforme pode ser observado nas FIGURAS 4.68, 4.69 e 4.70 a diferença mais significativa em termos de retenção foi observada na fração B3SH. Houve um considerável aumento dos sinais na região de hidrogênios aromáticos. Nas outras frações, o aumento na relação sinal-ruído foi mais modesto, sendo um pouco mais perceptível na fração B2SH.

4.3.1 - Fração B1SH

A fração identificada com B1SH foi eluída do cartucho e analisada por RMN. Primeiramente foi obtido um espectro de RMN de ^1H , utilizando a sequência de pulso *lc1pnf2* (dupla pré-saturação). Na FIGURA 4.71 é possível visualizar o espectro obtido. Os resultados mostram dois dupletos na região de aromáticos e olefínicos, sendo um em δ_{H} 7,66 (1H, H4, d) e outro em δ_{H} 6,77 (1H, H5, d). As constantes de acoplamento de 2,15 Hz bem como os deslocamentos químicos desses hidrogênios apontam para anéis heterocíclicos aromáticos. Um duplete em δ_{H} 5,57 (1H, H1', d) de hidrogênio de carbono anomérico, com constante de acoplamento de 3,64 Hz já sugere que o metabólito esteja conectado a um resíduo de α -D-glicose. Vários multipletos entre δ_{H} 3,46 e 3,84 também corroboram com essa proposta. Na região alifática, um simpleto em δ_{H} 2,49 (3H, H7, s). Isso indica a presença de um grupamento metila próximo à carbonila ou sistema aromático. A análise por espectrometria de massa foi feita utilizando probe de *electrospray*, no modo positivo de ionização e apresentou o pico $[\text{M}+\text{H}-\text{CH}_3]^+$ m/z 274,3, equivalente à molécula protonada.

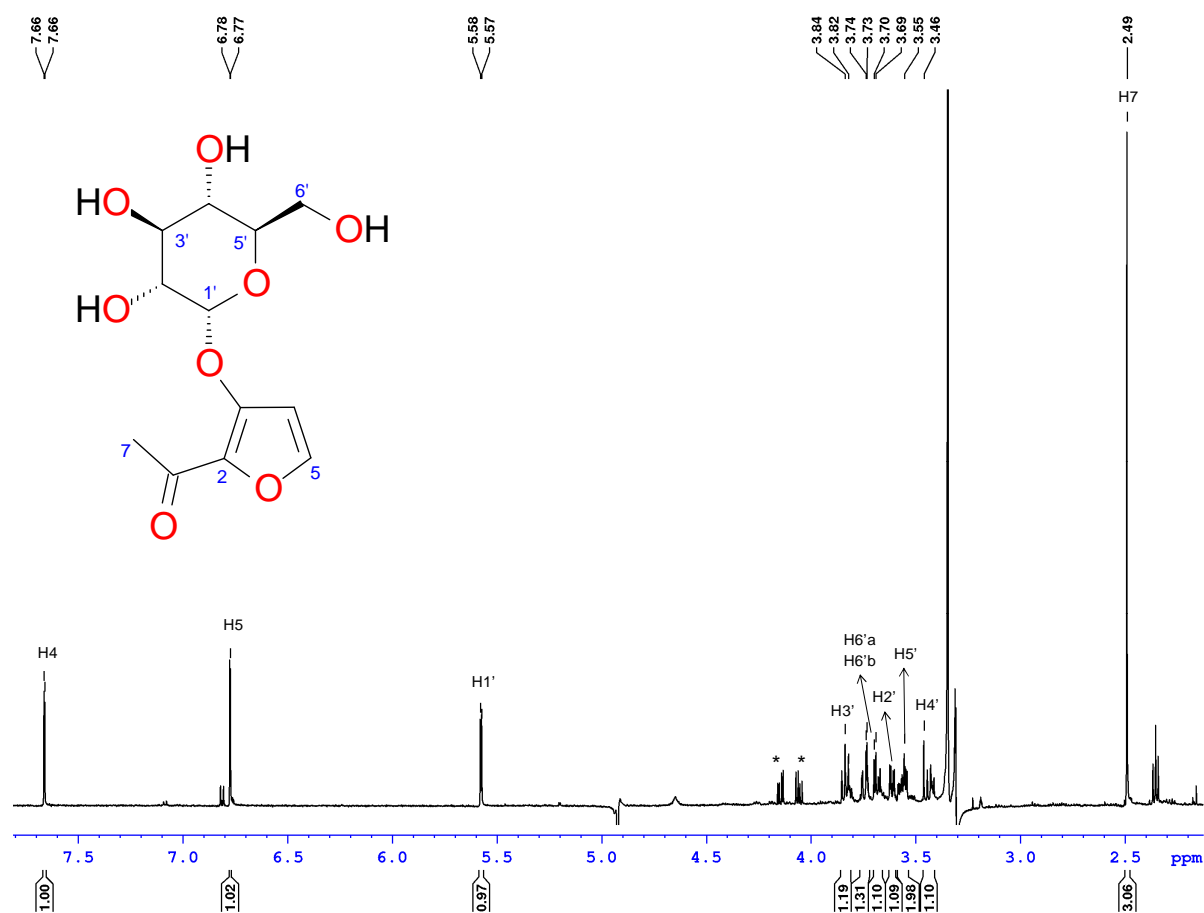


FIGURA 4.71 – Espectro de RMN de ^1H da fração B1SH, 100 μg em 250 μL de $\text{MeOH-}d_4$. * - Impurezas.

O experimento $g\text{COSY}$ (FIGURA 4.72 - A) foi realizado utilizando a sequência de pulso cosygpgrgf e mostra a correlação entre os hidrogênios em δ_{H} 7,66 (1H, H4, d) e em δ 6,77 (1H, H5, d), o que já era esperado, e as correlações entre os hidrogênios do resíduo de $\alpha\text{-D-glicose}$ presente na estrutura.

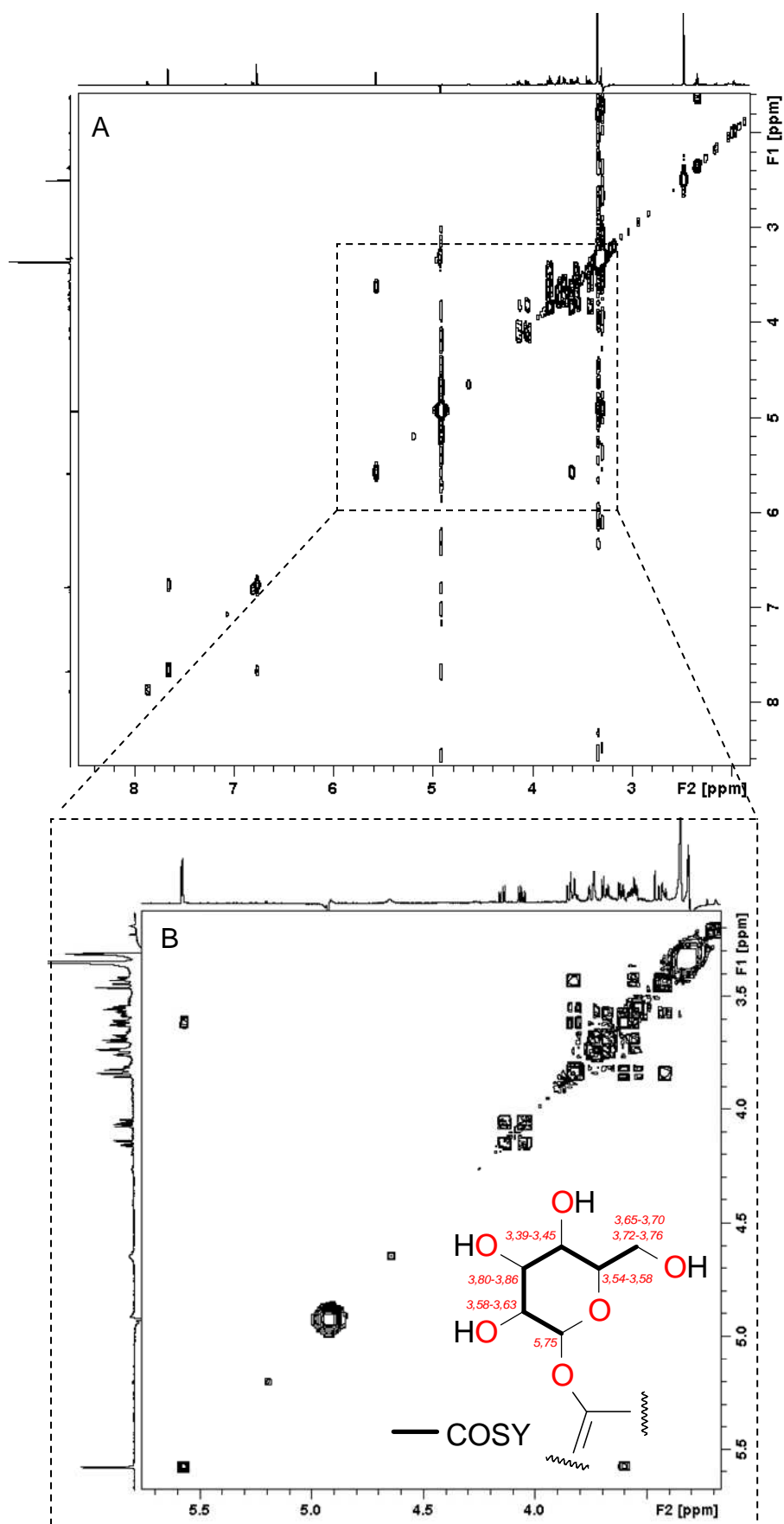


FIGURA 4.72 – A - Mapa de contorno gCOSY da fração B1SH. B – Ampliação da região entre δ_H 3,00 e 6,00, com aplicação de simetrização (*sym*) no espectro.

Os valores dos deslocamentos dos carbonos ligados diretamente a hidrogênios, foram atribuídos de acordo com o experimento de gHSQC – sequência de pulso *hsqcetgp* (FIGURA 4.73), sendo eles em: δ_C 150,0 (C4), ligado ao hidrogênio em δ_H 7,66 (1H, H4, d); δ_C 106,8 (C5) ligado ao hidrogênio em δ_H 6,77 (1H, H5, d); δ_C 102,5,0 (C1'), ligado ao hidrogênio em δ_H 5,57 (1H, H1', d); δ_C 74,0 (C2'), ligado ao hidrogênio em δ_H 3,58-3,63 (1H, H2', m); δ_C 75,9 (C3'), ligado ao hidrogênio em δ_H 3,80-3,86 (1H, H3', m); δ_C 72,3 (C4'), ligado ao hidrogênio em δ_H 3,39-3,45 (1H, H4', m); δ_C 76,8 (C5'), ligado ao hidrogênio em δ_H 3,54-3,58 (1H, H5', m); δ_C 63,1 (C6'), ligado aos hidrogênios em δ_H 3,65-3,70 (1H, H6'a, m) e 3,72-3,76 (1H, H6'b, m) e δ_C 28,7 (C7), ligado aos hidrogênios em δ_H 2,49 (3H, H7, s).

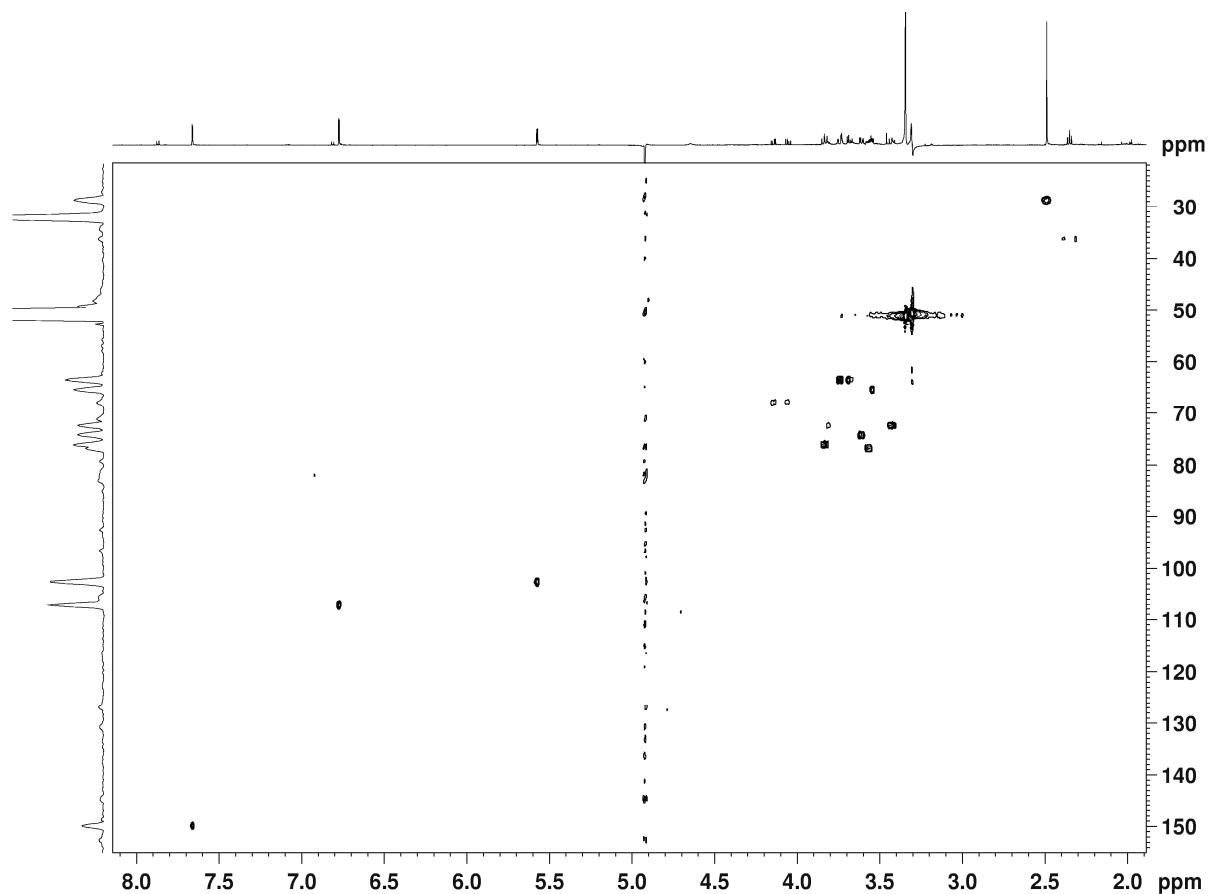


FIGURA 4.73 – Mapa de contorno de gHSQC da fração B1SH.

No experimento de gHMBC – sequência de pulso *hmbcgp1pndqf* (Figura 4.74) os hidrogênios em δ_H 2,49 (H7) apresentaram correlação com os carbonos em δ_C 140,5 (C2) e δ_C 189,7 (C6). O hidrogênio em δ_H 5,57 (H1') apresentou correlação apenas com o carbono em δ_C 74,0 (C2'). O hidrogênio em δ_H 6,78 (H4) apresentou correlações com os carbonos em δ_C 140,5 (C2) e δ_C 150,0

(C5). Por fim, o hidrogênio em δ_H 7,66 (H5) apresentou correlação com os carbonos em δ_C 107,0 (C4), δ_C 140,5 (C2) e δ_C 156,2 (C3).

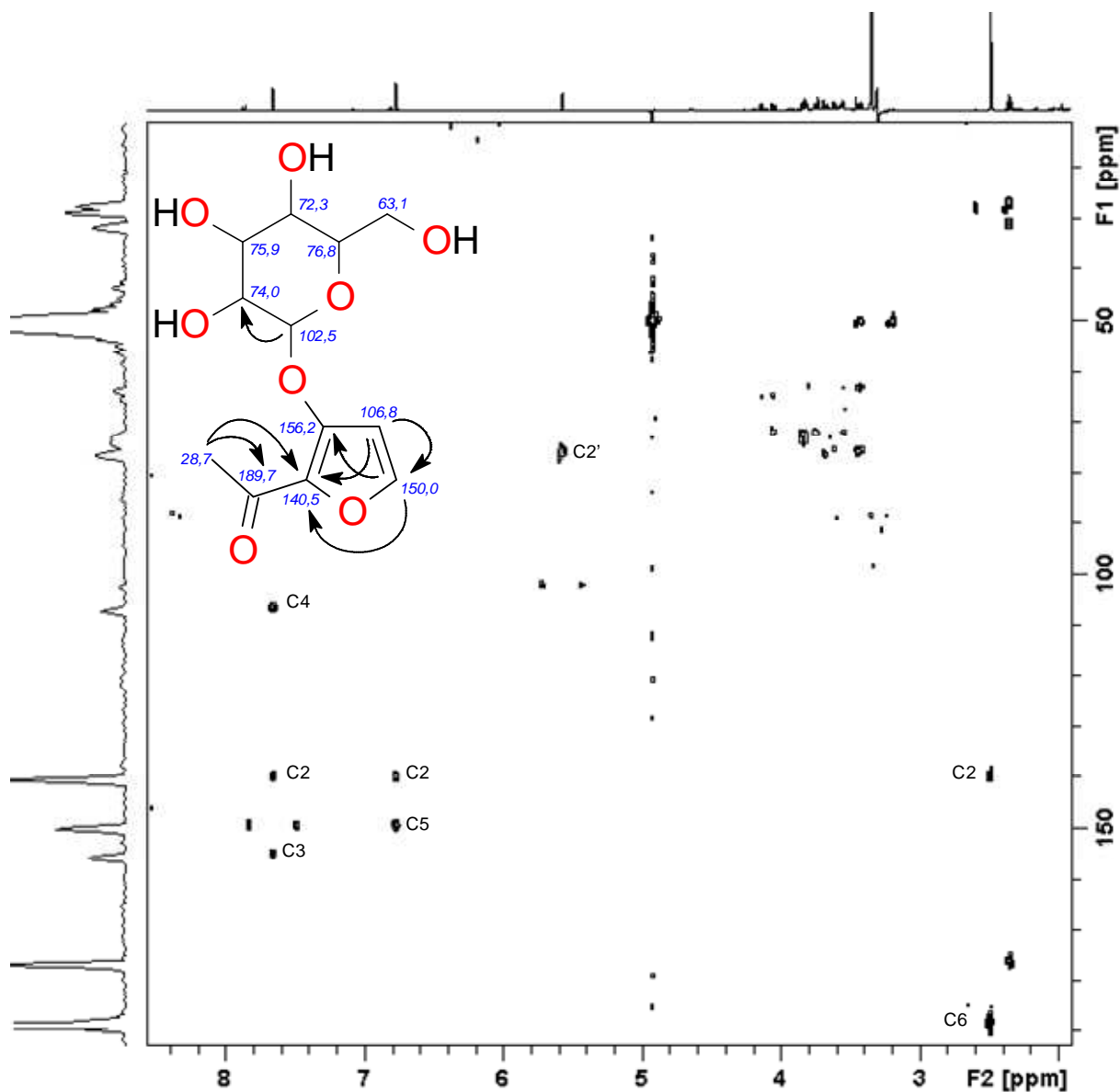
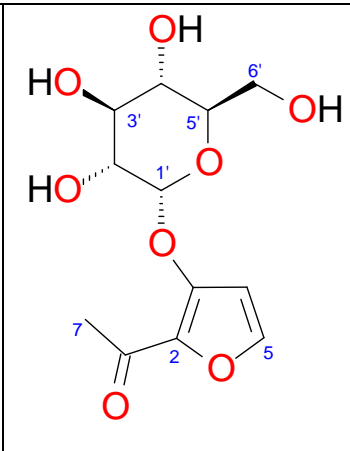


FIGURA 4.74 – Mapa de contorno de gHMBC da fração B1SH.

Os dados espectroscópicos coletados sugerem que o composto presente em maior quantidade na fração B1SH é o 2-acetil-3-hidróxifuran-3-O- α -D-glicopiranosídeo, conforme representado na TABELA 4.16. Isomaltol (3-hidróxi-2-furanil metil cetona), sua forma não glicosilada, é um composto enólico volátil e cristalino, detectado primeiramente em quantidades muito pequenas em pães e cereais torrados (GOODWIN et al., 1986). Hoje, já se sabe que esse composto furânico é formado a partir da degradação enzimática do amido, pela reação de

Maillard que ocorre na presença de açúcar e compostos nitrogenados. Sua forma glicosilada já foi obtida em cultivos de diversos tipos de fungos, como por exemplo, *Grifola frondosa* e *Volvariella volvaceae* (AMINO UP CHEMICAL CO., LTD., 2007). Os autores testaram diversos meios de cultura, e parece haver uma relação direta entre a produção desse composto e a presença de extratos de malte e de levedura no caldo fermentativo. Essa patente ainda apontou a substância com atividades fisiológicas relativas à imunoativação, ativação de macrófagos e propriedades de melhoria da habilidade de indução de citocina pelas células humanas. Na TABELA 4.12 é possível visualizar todos os dados espectroscópicos coletados, que apresentam boa concordância com valores encontrados na literatura (GOODWIN et al., 1986).

TABELA 4.12 – Dados espectroscópicos para o composto majoritário da fração B1SH, 2-acetil-3-hidróxifuran-3-O- α -D-glicopiranosídeo (^{13}C , 150 MHz; ^1H , 600 MHz, 100 μg em 250 μL de $\text{MeOH-}d_4$).

Fração	Estrutura	Dados de RMN			
		no.	δ_{C}^*	δ_{H} , <i>mult.</i> (J em Hz)	HMBC
B1SH	 <p>2-acetil-3-hidróxifuran-3-O-α-D-glicopiranosídeo – 100 μg em 250 μL de $\text{MeOH-}d_4$</p>	2	140,5		
		3	156,2		
		4	106,8	6,78, <i>d</i> (2,15)	2, 5
		5	150,0	7,66, <i>d</i> (2,15)	2, 3, 4
		6	189,7		
		7	28,7	2,49, <i>s</i>	2, 6
		1'	102,5	5,57, <i>d</i> (3,64)	2'
		2'	74,0	3,58-3,63, <i>m</i>	n.o.
		3'	75,9	3,80-3,86, <i>m</i>	n.o.
		4'	72,3	3,39-3,45, <i>m</i>	n.o.
		5'	76,8	3,54-3,58, <i>m</i>	n.o.
		6'a	63,1	3,65-3,70, <i>m</i>	n.o.
6'b	63,1	3,72-3,76, <i>m</i>	n.o.		

* dados obtidos através de *g*HSQC e *g*HMBC. n.o. – Não observado.

4.3.2 - Fração B2SH

A fração identificada como B2SH foi eluída do cartucho e analisada por RMN. Foi obtido um espectro de ^1H , utilizando a sequência de pulso lc1pnf2 (dupla pré-saturação). Na FIGURA 4.75 é possível visualizar o espectro obtido. Os resultados mostram dois dupletos na região de aromáticos e olefínicos, sendo um em δ_{H} 7,93 e outro em δ_{H} 6,38, com constante de acoplamento de 5,54 Hz. Na região de alifático, verifica-se um simpleto em δ_{H} 2,35. De posse dessas informações, existe agora uma boa margem de segurança para concluir que o composto presente em maior quantidade nessa fração seja o maltol, já identificado também no extrato de acetato de etila (Fração AE1SH).

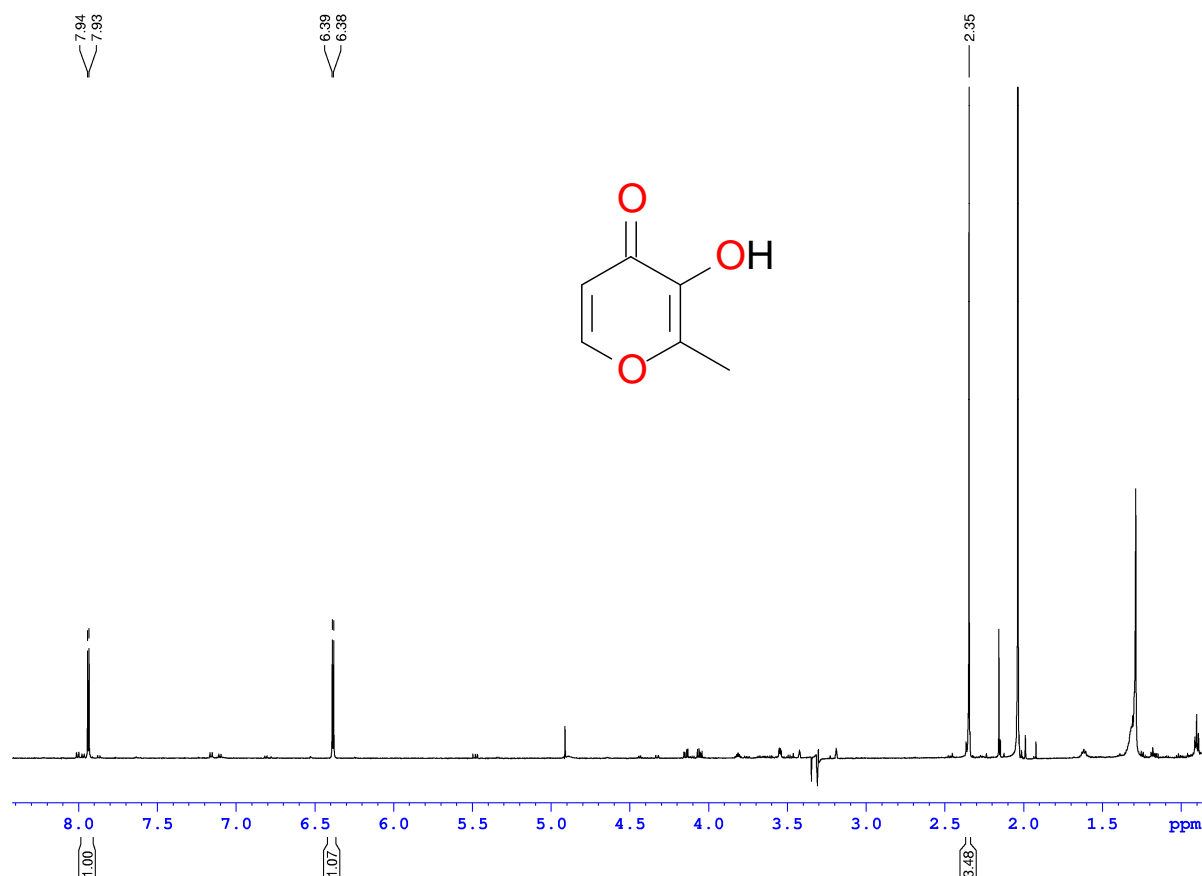


FIGURA 4.75 – Espectro de RMN de ^1H da fração B2SH. Maltol.

4.3.3 - Fração B3SH

A fração identificada como B3SH foi eluída do cartucho e analisada por RMN. Foi obtido um espectro de RMN de ^1H , utilizando a sequência de pulso lc1pnf2 (dupla pré-saturação). Na FIGURA 4.76 é possível visualizar o espectro obtido. Os resultados mostram dois multipletos na região de aromáticos e olefínicos, sendo um em δ 7,87 e outro em δ 6,81. O padrão dos sinais e a proporção 1:1 dos sinais sugerem que o composto presente em maior quantidade na fração B3SH seja o ácido 4-hidróxi-benzóico, já detectado no extrato acetato de etila (Fração AE3SH) em maior quantidade.

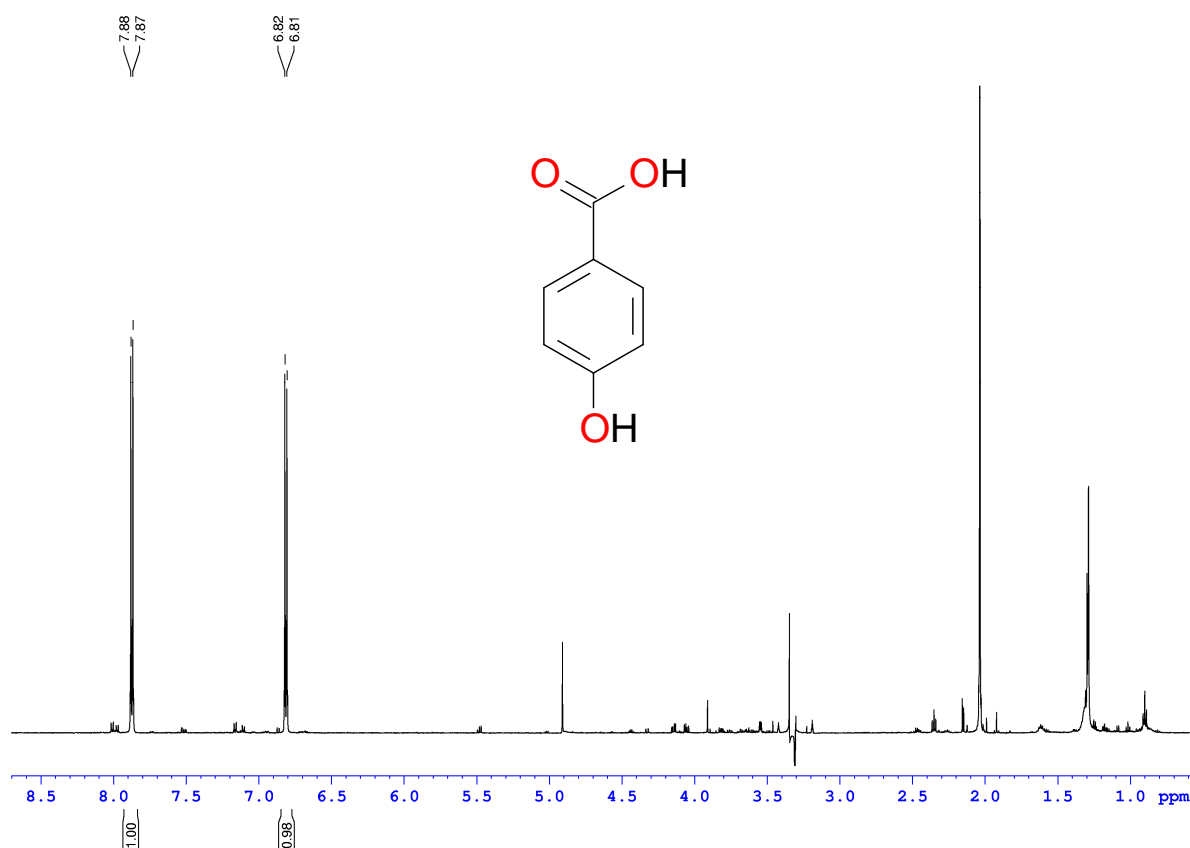


FIGURA 4.76 – Espectro de RMN de ^1H da fração B3SH. Ácido *p*-hidróxibenzoico.

Em seguida foi otimizado um método cromatográfico para os compostos com fatores de retenção (k) maiores. O método foi realizado conforme o descrito: volume de injeção 20 μL , fluxo de 1,0 mL/min, monitorando o comprimento de onda de 210 nm (maior absorção por análise de DAD-2D), eluente A (H_2O mili Q, 0,05% de TFA), eluente B (Metanol, 0,05% de TFA). Após a eluição cromatográfica

foi realizada a limpeza da coluna com 100 % de B por 5 minutos acompanhados por retorno do gradiente em 5 minutos (100-35% de B). A coluna foi condicionada por 5 minutos, totalizando 40 minutos por análise. O resultado pode ser visto na FIGURA 4.77, que mostra o cromatograma resultante contendo as bandas cromatográficas identificadas como B4 (tr = 10,72 min), B5 (tr = 12,94 min), B6 (tr = 14,14 min) e B7 (tr = 22,75 min).

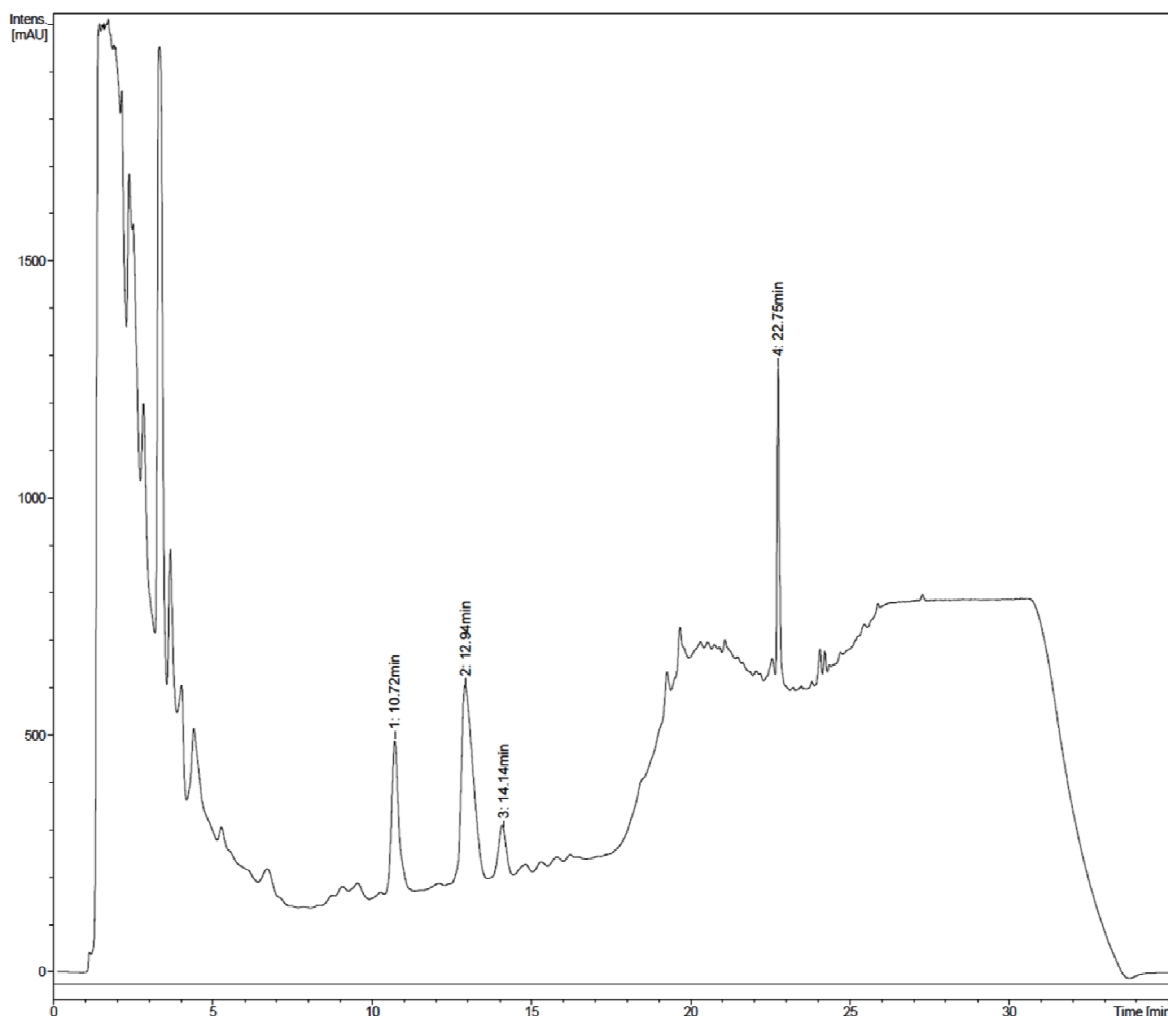


FIGURA 4.77 - Cromatograma otimizado ($\lambda 210$) do extrato butanólico (EB) do caldo de fermentação da bactéria *S. cebimarensis* SS99BA-2, compostos com maiores fatores de retenção (k). Eluente A (H_2O mili Q, 0,05% de TFA), eluente B (Metanol, 0,05% de TFA). Eluição isocrática nos 5 minutos iniciais (35% de B / 65% de A), eluição gradiente 35-53 % de B durante 10 minutos, eluição gradiente 53-100 % de B durante 10 minutos.

As frações foram adsorvidas em cartuchos de fase estacionária *General Phase* (HysphereTM-resin) durante 30 corridas cromatográficas consecutivas gerando as amostras B4GP, B5GP, B6GP e B7GP.

4.3.4 - Fração B4GP

A fração identificada como B4GP foi eluída do cartucho e analisada por RMN. Foi obtido um espectro de RMN de ¹H, utilizando a sequência de pulso lc1pnf2 (dupla pré-saturação). Na FIGURA 4.78 é possível visualizar o espectro obtido. Os resultados mostram dois dupletos na região de aromáticos e olefínicos, sendo um em δ_H 7,67 e outro em δ_H 6,72 com uma constante de acoplamento de 15,80 Hz. Essa constante de acoplamento indica a presença de um sistema de ligação dupla *trans*. É possível visualizar também um simpleto em δ_H 4,64. Na região alifática, um hepteto em δ_H 3,39 e em δ_H 1,24, um duplete, ambos com uma constante de acoplamento de 7,0 Hz. Esses dados são o suficiente para concluir que se trata do composto inédito nomeado de giovaninona A (Fração AE10GP) isolado em maior quantidade no extrato de acetato de etila (AE).

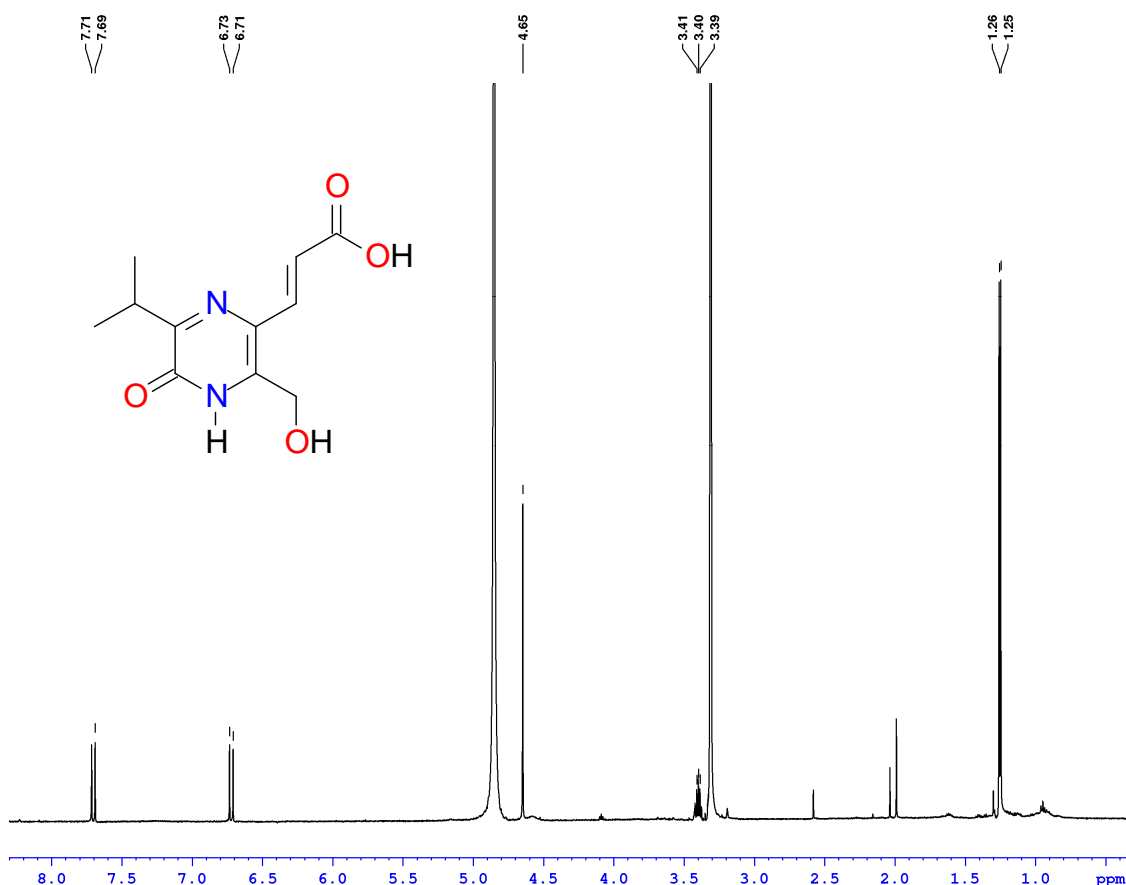


FIGURA 4.78 – Espectro de RMN de ^1H da fração B4GP. Giovaninona A.

4.3.5 - Fração B5GP

O composto presente na fração B5GP apresentou uma retenção pequena, gerando espectros com relação sinal-ruído adequadas apenas nos mapas de contorno bidimensionais $g\text{COSY}$ e $g\text{HSQC}$. Algumas correlações $g\text{HMBC}$ não foram observadas e não puderam gerar dados conclusivos. Outros experimentos de RMN não puderam ser realizados devido à baixa quantidade de material obtida através da técnica (200 μg). Paralelamente, outras fases estacionárias foram avaliadas na tentativa de aumentar a retenção, sendo elas: HysphereTM-resin C18 HD, HysphereTM-resin *Strong Hydrophobic* (SH) e HysphereTM-resin C8 EC-SE, entretanto a retenção obtida não foi melhor do que a alcançada com a fase estacionária HysphereTM-resin *General Phase* (GP). As análises começaram através da espectrometria de massa de alta resolução (HRMS). A FIGURA 4.79 mostra o espectro, com o pico $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 750,4117, equivalente à molécula protonada. Essa massa molecular indica a fórmula mais provável $\text{C}_{34}\text{H}_{56}\text{O}_{10}\text{N}_9$.

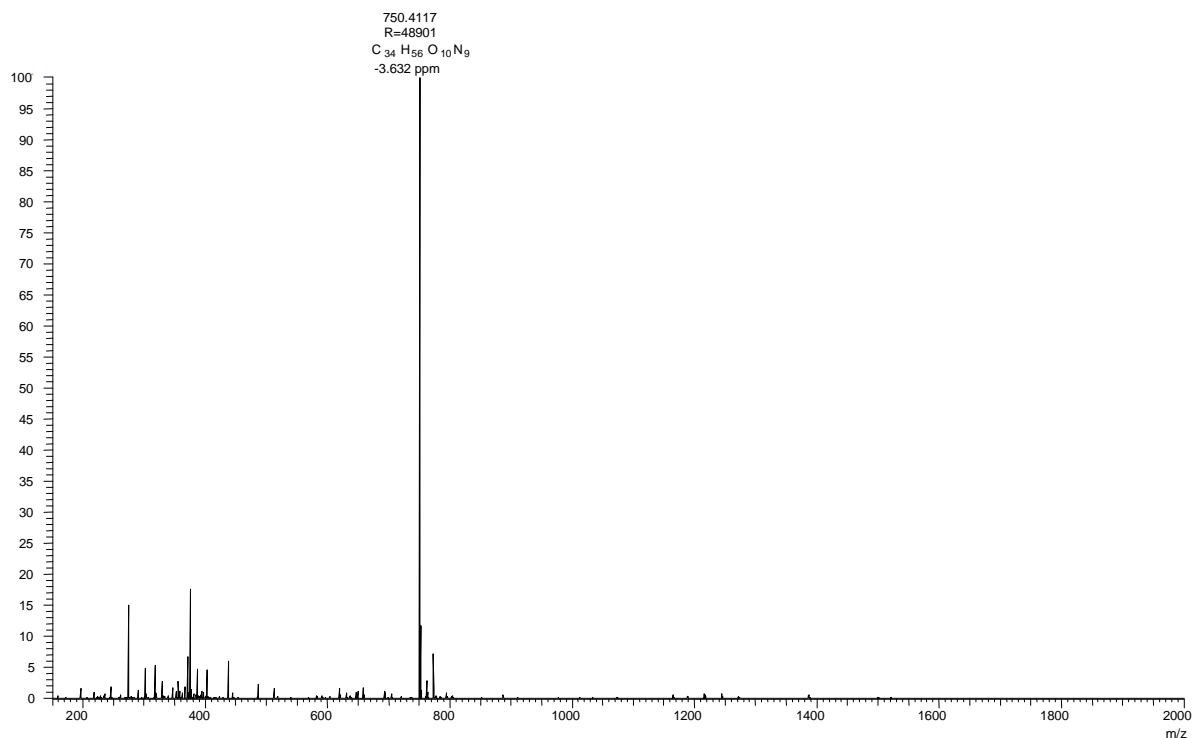


FIGURA 4.79 – HRMS, modo positivo – Fração B5GP.

Após as análise dos espectros de RMN foi possível identificar a classe da substância presente em maior quantidade na fração B5GP. Trata-se de um hexapeptídeo modificado, uma classe de metabólitos secundários comumente encontrados em caldos de fermentação de estreptomicetos. O composto é um representante inédito desta classe. Os aminoácidos presentes na estrutura também foram atribuídos, entretanto a sequência em que esses aminoácidos estão conectados ainda não foi elucidada. As FIGURA 4.80 e 4.81 mostram, respectivamente o espectro de RMN de ¹H e os mapa de contorno gCOSY da fração EB5GP.

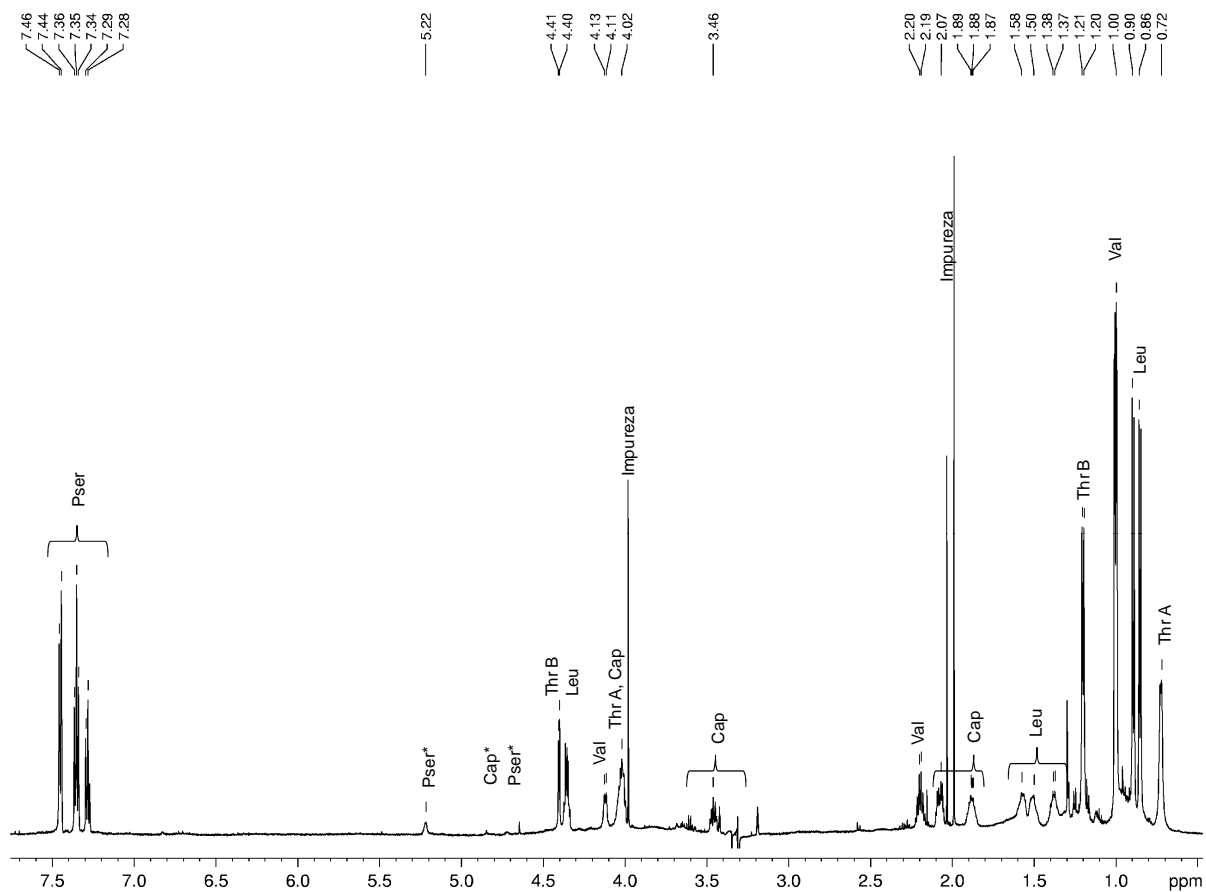


FIGURA 4.80 – Espectro de RMN de ^1H da fração B5GP.* - Sinais suprimidos pela sequência de dupla pré-saturação lc1pnf2. (Pser) – fenil-serina. (Cap) – capreomicidina. (Thr A) – treonina A. (Thr B) – treonina B. (Val) – Valina. (Leu) – leucina.

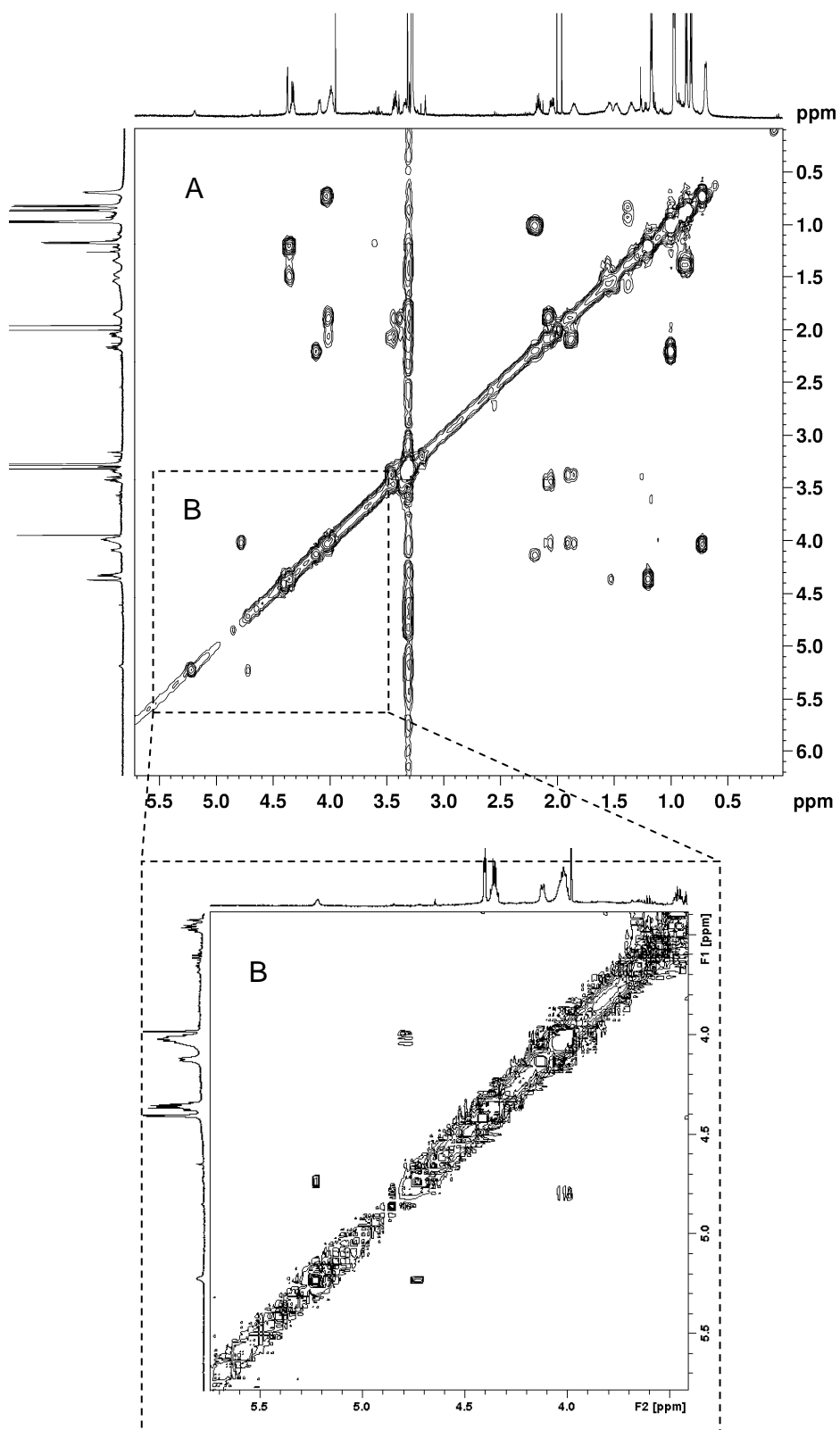


FIGURA 4.81 – A - Espectro de gCOSY da fração B5GP. B – Ampliação da região próxima à supressão do sinal (δ_H 4,98), nível de corte baixo e aplicação de simetrização (*sym*) no espectro.

Através da análise do espectro de RMN de ^1H foi possível verificar a presença de dois dupletos em δ_{H} 0,89 (3H, d) e em δ_{H} 0,85 (3H, d), ambos de grupamentos metilas (δ_{C} 23,3 ppm e δ_{C} 21,9 ppm, respectivamente por *g*HSQC, FIGURA 4.82) que apresentaram correlação *g*COSY com o hidrogênio de grupo metínico δ_{H} 1,35-1,40 (1H, m) e δ_{C} 25,4. O hidrogênio do grupo metínico apresentou correlação *g*COSY com dois hidrogênios diastereotópicos de um grupo metileno: δ_{H} 1,50-1,55 (1H, m) e δ_{H} 1,56-1,60 (1H, m) conectados ao carbono δ_{C} 41,1. Os dois hidrogênios magneticamente não equivalentes apresentaram correlação *g*COSY com o hidrogênio em δ_{H} 4,32-4,37 (1H, m) de grupamento metínico em δ_{C} 53,1. Esse deslocamento químico de carbono é compatível à vizinhança com átomo de nitrogênio e carbonila. O sistema de spin identificado é um forte indicativo de um resíduo de leucina (Leu) na estrutura molecular dessa substância (FIGURA 4.83).

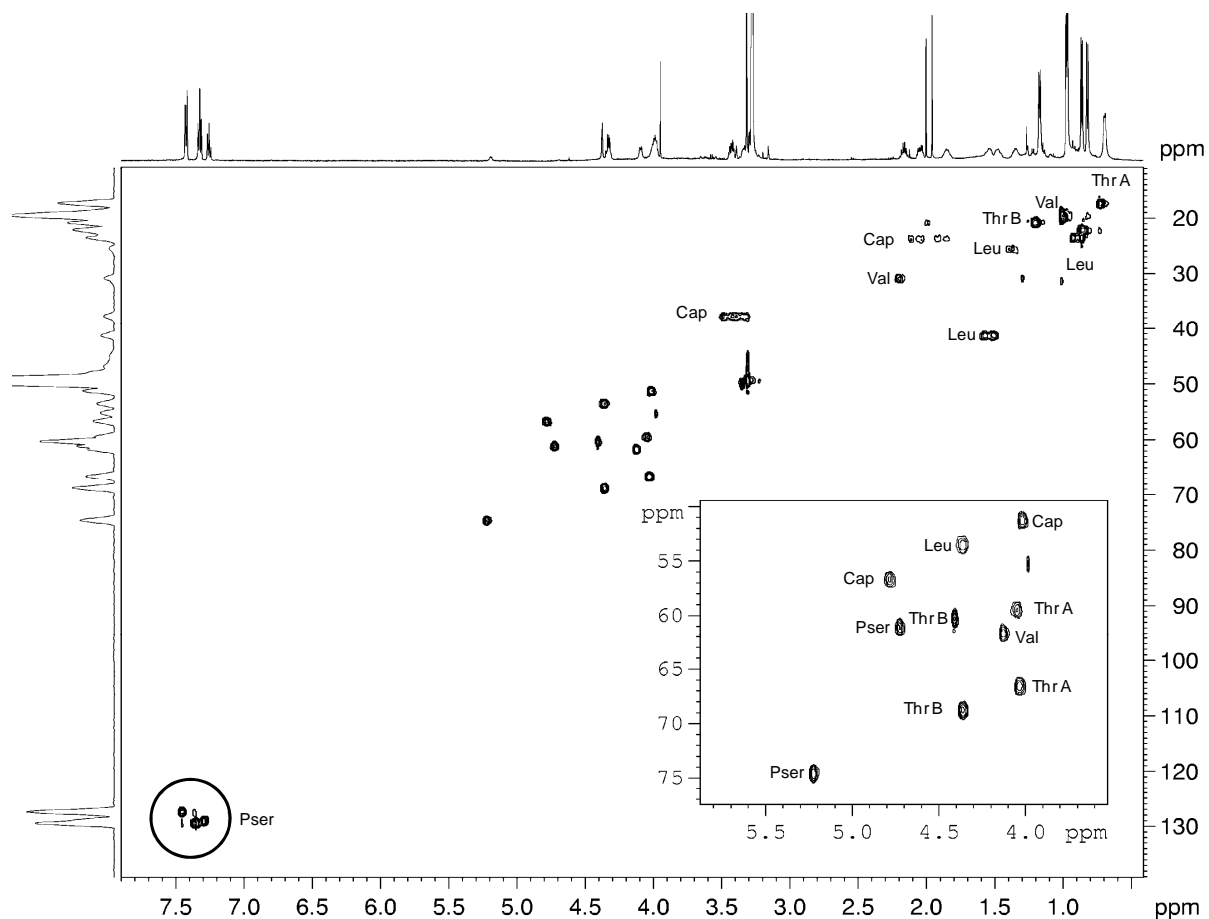


FIGURA 4.82 – Espectro de *g*HSQC da fração B5GP, 200 μg em 250 μL de $\text{MeOH-}d_4$. (Pser) – fenil-serina. (Cap) – capreomicidina. (Thr A)– treonina A. (Thr B) – treonina B. (Val) – Valina. (Leu) – leucina.

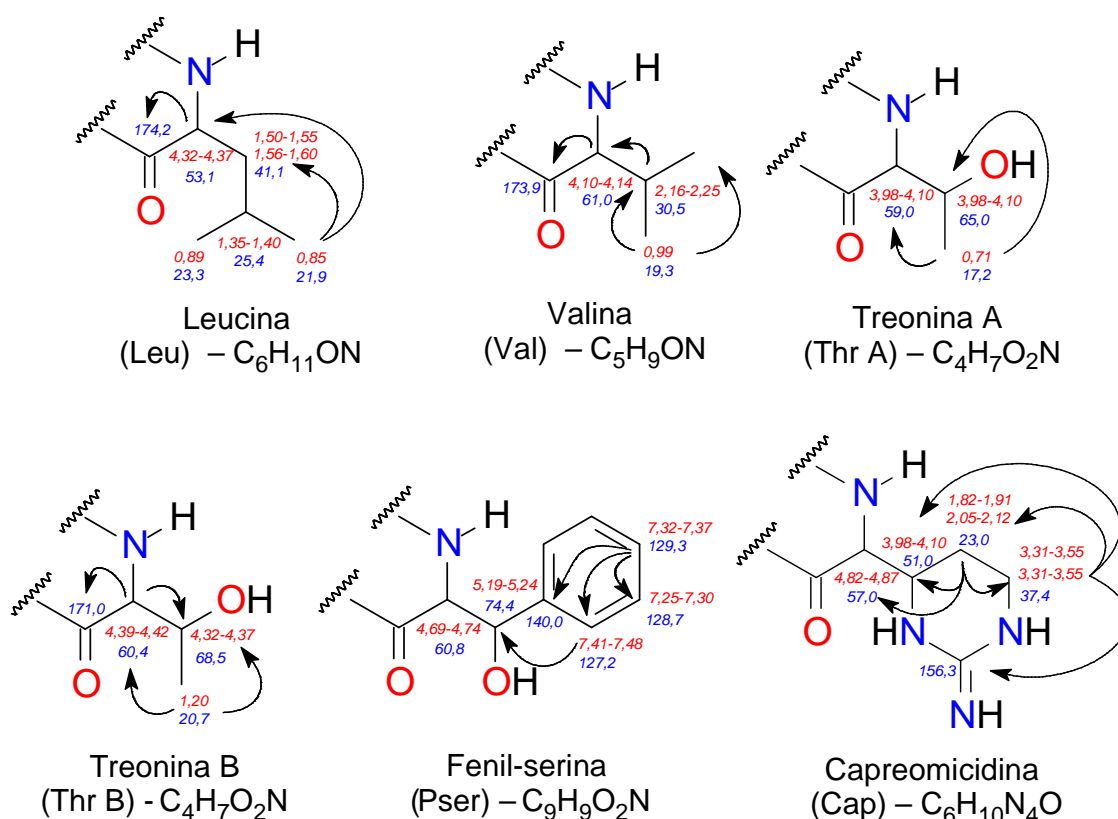


FIGURA 4.83 – Fragmentos de peptídeos identificados a partir da análise principalmente dos espectros de RMN de ¹H, gCOSY e gHSQC. As setas representam as correlações gHMBC observadas de alguns hidrogênios. Os valores em vermelho são os deslocamentos químicos (em ppm) de RMN de ¹H e em azul, RMN de ¹³C.

Na região de hidrogênios alifáticos, foi verificada a presença de um duplete em δ_H 0,99 (6H, d) que apresentou correlação homonuclear ¹H-¹H com o hidrogênio em δ_H 2,16-2,25 (1H, m), indicando um grupamento isopropila. Os deslocamentos de carbonos, determinados por gHSQC foram respectivamente: em δ_C 19,3 para as metilas e δ_C 30,5 para o grupo metínico. O grupo metínico ainda mostrou correlação por gCOSY com o hidrogênio em δ_H 4,10-4,14 (1H, m), também de carbono metínico (δ_C 61,0). Por gHMBC foi possível observar a correlação dos dois hidrogênios metínicos com o carbono em δ_C 173,9 de amida, da ligação peptídica (FIGURA 4.84). O sistema de spin identificado é um forte indicativo de um resíduo de valina (Val) na estrutura molecular dessa substância (FIGURA 4.115).

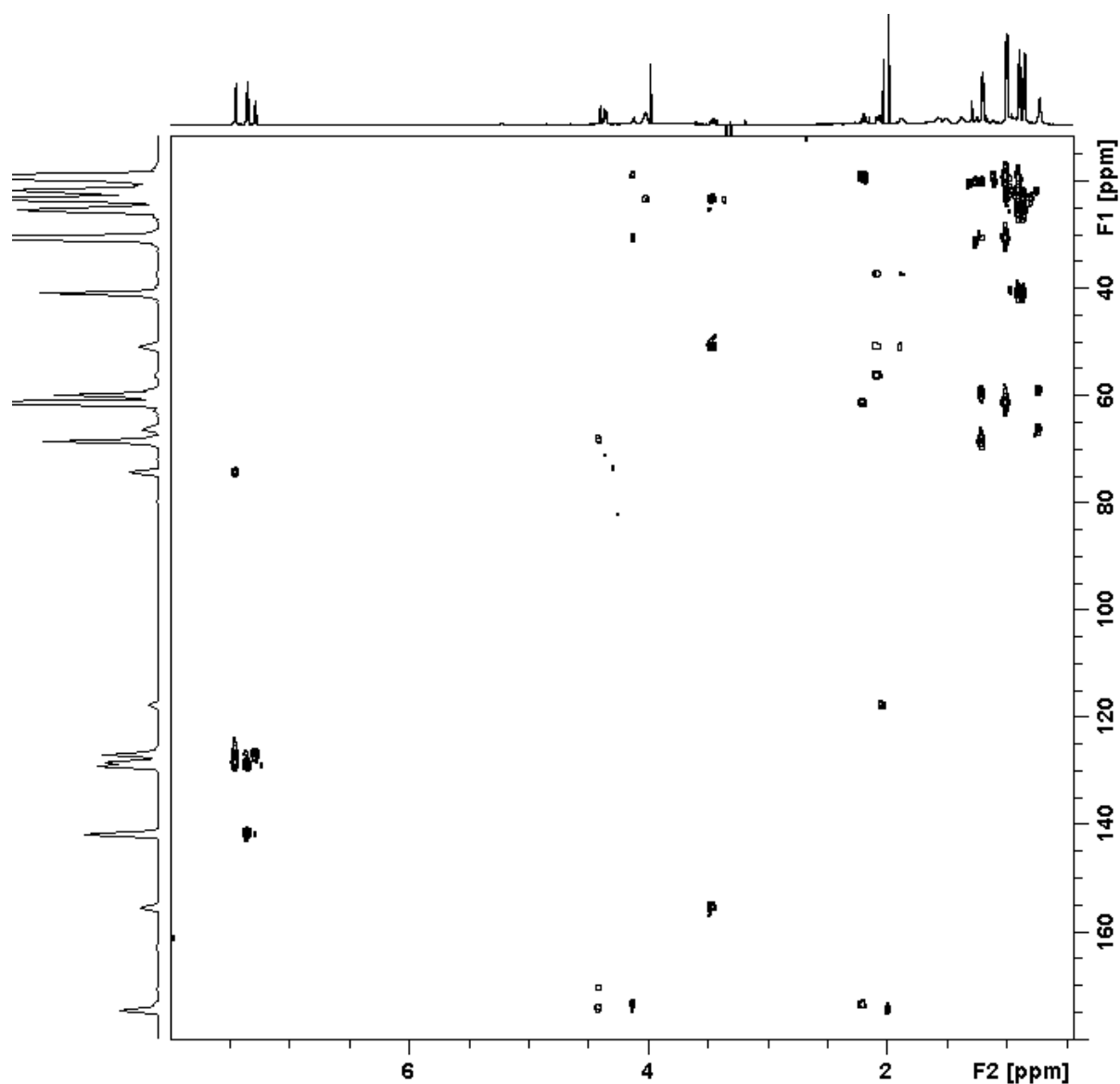


FIGURA 4.84 – Mapa de contorno gHMBC da fração B5GP.

Novamente na região de hidrogênios alifáticos, um duplete em δ_H 0,71 (3H, d), apresentou correlação com um hidrogênio de carbono metínico em δ_H 3,98-4,10 ppm (1H, m). O deslocamento químicos desses carbonos, determinados por gHSQC são: em δ_C 17,9 (CH₃) e δ_C 65,0 (CH). Esses deslocamentos químicos sugerem que o grupo metínico (CH) esta ligado a uma hidroxila. Ainda, o hidrogênio em δ_H 0,71 apresentou correlação gHMBC (FIGURA 4.84) com os carbonos em δ_C 65,0 (CH) e em δ_C 59,0 (CH), que por gHSQC também mostrou ser um carbono metínico de hidrogênio com deslocamento químico também em δ_H 3,98-4,10 (1H, m). Esses dados levam à proposta de um fragmento de treonina (Thr). Mas, em outra região da molécula parece existir outro fragmento de treonina magneticamente

não equivalente, dessa forma este resíduo de aminoácido foi identificado com Treonina A (Thr A).

Um dubleto em δ_H 1,20 (3H, d), relacionado a um carbono metílico (δ_C 20,7 atribuído por *gHSQC*) apresentou correlação *gCOSY* com um hidrogênio com deslocamento químico em δ_H 4,32-4,37 (1H, m), atribuído a um grupo metínico (δ_C 68,5). Esses deslocamentos químicos, novamente, sugerem a vizinhança de um grupo hidroxila. Esse hidrogênio metínico ainda apresentou correlação *gCOSY* com outro hidrogênio de grupo metínico, δ_H 4,39-4,42 (1H, m), δ_C 60,4. As correlações *gHMBC* confirmaram a subestrutura e indicam a existência de um segundo fragmento de Treonina (Thr B) na substância em análise (FIGURA 4.83). Na região de olefínicos e aromáticos, três sinais indicaram a presença de um anel aromático monossustituído: δ_H 7,32-7,37 (1H, m), (δ_C 129,3 atribuído por *gHSQC*), δ_H 7,25-7,30 (1H, m), (δ_C 128,7 atribuído por *gHSQC*) e δ_H 7,41-7,48 (1H, m), (δ_C 127,2 atribuído por *gHSQC*). Por *gHMBC*, o carbono em δ_C 140,0 pode ser identificado, relativo ao carbono do anel aromático contendo a cadeia lateral. O hidrogênio em δ_H 7,41-7,48 (1H, m) ainda apresentou correlação *gHMBC* com o carbono em δ_C 74,4, equivalente a um grupo metino contendo uma hidroxila, cujo deslocamento químico de hidrogênio foi identificado em δ_H 5,19-5,24 (1H, m). Esse hidrogênio apresentou correlação *gCOSY* com o hidrogênio em δ_H 4,69-4,74 (1H, m), também de grupamento metínico (δ_C 60,8 atribuído por *gHSQC*). Esses dados estão compatíveis com uma unidade de Fenil-serina (Pser) presente na estrutura molecular (FIGURA 4.83).

Finalmente, a análise na região de hidrogênios metilênicos, mostrou a presença de dois hidrogênios magneticamente não equivalentes, em δ_H 1,82-1,91 (1H, m) e em δ_H 2,05-2,12 (1H, m), conectados ao mesmo carbono, com deslocamento químico em δ_C 23,0. Essa suposição foi confirmada por *gCOSY*. Esses hidrogênios apresentaram também correlações *gCOSY* com outros dois hidrogênios magneticamente não equivalentes com deslocamento químico em δ_H 3,31-3,55 (2H, m), conectados ao mesmo carbono, em δ_C 37,4, e ainda com um hidrogênio de grupamento metínico, em δ_H 3,98-4,10 (1H, m) (δ_C 51,0). Este, por sua vez, apresentou correlação homonuclear 1H - 1H com outro hidrogênio de carbono metínico (CH) em δ_H 4,82-4,87 (1H, m) (δ_C 57,0). Por fim, o hidrogênio em δ_H 3,33 ppm (1H, m) ainda apresentou correlação *gHMBC* com um carbono com deslocamento químico em δ_C 156,3. Esse deslocamento químico não é compatível

com carbonila de amida. Esse valor é coerente com um grupamento guanidínico conectado à estrutura e leva a um resíduo de aminoácido muito raro: capreomicidina (Cap). Essa unidade de aminoácido foi relatada pela primeira vez por HERR et al (1960) em quatro antibióticos peptídicos cíclicos, as capreomicinas, isolados de cultivos da bactéria *Streptomyces capreolus*. Mais recentemente, a biossíntese desse aminoácido foi estudada e trata-se de uma simples ciclização da *L*-arginina (YIN e ZABRISKIE, 2004).

Com os fragmentos parcialmente elucidados, chega-se à fórmula molecular $C_{34}H_{53}O_9N_9$. A fórmula molecular determinada por espectrometria de massa de alta resolução foi $C_{34}H_{56}O_{10}N_9$, exatamente 18 unidades de massa a mais que a determinada por RMN. Isso sugere que esse hexapeptídeo seja uma estrutura linear, e não cíclica. Uma das possíveis estruturas para a substância presente em maior quantidade na fração B5GP está apresentada na FIGURA 4.85.

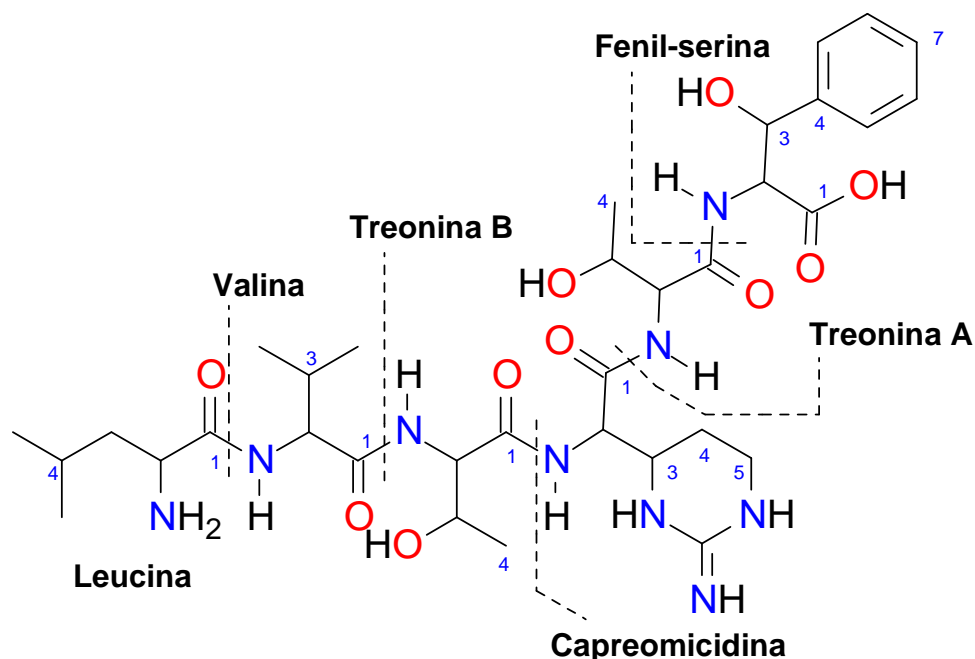


FIGURA 4.85 – Uma das propostas possíveis para a estrutura do composto presente em maior quantidade na fração B5GP.

Todos os dados experimentais obtidos por espectrometria de RMN foram dispostos na TABELA 4.13. A numeração de cada resíduo de aminoácido foi feita considerando a carbonila da ligação peptídica como posição 1.

TABELA 4.13 – Dados espectroscópicos para o composto majoritário da fração B5GP (^{13}C , 150MHz; ^1H , 600 MHz, 200 μg em 250 μL de $\text{MeOH-}d_4$).

no.	δ_{C}	δ_{H} , <i>mult.</i> (J em Hz)	COSY	HMBC
Leucina (Leu)				
1	174,2			
2	53,1	4,32-4,37, <i>m</i>	3a, 3b	1
3a	41,1	1,50-1,55, <i>m</i>	2, 4	n.o.
3b	41,1	1,56-1,60, <i>m</i>	2, 4	n.o.
4	25,4	1,35-1,40, <i>m</i>	3a, 3b, 5, 6	n.o.
5	23,3	0,89, <i>d</i> (6,61)	4	3, 4, 6
6	21,9	0,85, <i>d</i> (6,61)	4	3, 4, 5
Valina (Val)				
1	173,9.			
2	61,0	4,10-4,14, <i>m</i>	3	1
3	30,5	2,16-2,25, <i>m</i>	2, 4, 5	1, 2, 4, 5
4, 5	19,3	0,99, <i>d</i> (6,72)	3	2, 3
Treonina A (Thr A)				
1	n.o.			
2	59,0	3,98-4,10, <i>m</i>		n.o.
3	65,0	3,98-4,10, <i>m</i>		n.o.
4	17,2	0,72, <i>d</i> (5,12)	3	2, 3
Treonina B (Thr B)				
1	171,0			
2	60,4	4,39-4,42, <i>m</i>	n.o.	1, 3
3	68,5	4,32-4,37, <i>m</i>	4	n.o.
4	20,7	1,20, <i>d</i> (6,36)	3	2, 3
Fenil-serina (Pser)				
1	n.o.			
2	60,8	4,69-4,74, <i>m</i>	3	n.o.
3	74,4	5,19-5,24, <i>m</i>	2	n.o.
4	140,0			
5	127,2	7,41-7,48, <i>m</i>	6	5, 7
6	128,7	7,25-7,30, <i>m</i>	5,7	7
7	129,3	7,32-7,37, <i>m</i>	6	4, 5, 6
Capreomicidina (Cap)				
1	n.o.			
2	57,0	4,82-4,87, <i>m</i>	3	n.o.
3	51,0	3,98-4,10, <i>m</i>	2, 4a, 4b	n.o.
4a	23,0	1,82-1,91, <i>m</i>	2, 3, 5a, 5b	2, 3, 5
4b	23,0	2,06-2,12, <i>m</i>	2, 3, 5a, 5b	2, 3, 5
5a	37,4	3,31-3,55, <i>m</i>	4a, 4b	3, 4, 7
5b	37,4	3,31-3,55, <i>m</i>	4a, 4b	3, 4, 7
7	156,3			

n.o. – não observado.

Uma substância isolada a partir de um cultivo de uma hidra marinha (*Gymnangium regae*) que apresentou citotoxicidade moderada contra diversos tipos de linhagens tumorais foi relatada por MILANOWSKI et al. (2003). A análise por HRMS apresentou o pico do íon molecular de $[M+H]^+$ m/z 750,5, com a fórmula molecular $C_{36}H_{59}O_{10}N_7$. A substância, nomeada de Gymnangiamide, é o composto estruturalmente mais próximo do hexapeptídeo em análise na presente fração que foi encontrado na literatura. A fórmula estrutural da Gymnangiamide está representada na FIGURA 4.86.

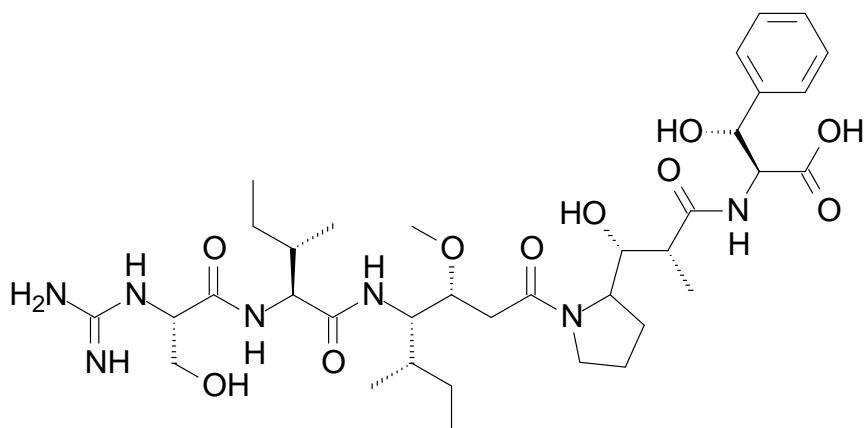


FIGURA 4.86 – Fórmula estrutural da Gymnangiamide (MILANOWSKI et al., 2003.).

4.3.6 - Fração B6GP

A fração identificada como B6GP foi eluída do cartucho e analisada por RMN. Foi obtido um espectro de RMN de 1H , utilizando a sequência de pulso lc1pnf2 (dupla pré-saturação). Na FIGURA 4.87 é possível visualizar o espectro obtido. Os resultados mostram dois dupletos na região de hidrogênios aromáticos e olefínicos, sendo um em δ_H 7,65 e outro em δ_H 6,68, com constante de acoplamento de 15,03 Hz. Na região de hidrogênios alifáticos, um hepteto em δ_H 3,34 e um duplete em δ_H 1,23, ambos com constante de acoplamento de 6,78 Hz. Também nessa região, um simpleto em δ_H 2,36. Esses dados são suficientes para concluir que se trata do composto inédito nomeado de giovaninona C (Fração AE12GP) isolado em maior quantidade no extrato de acetato de etila (AE).

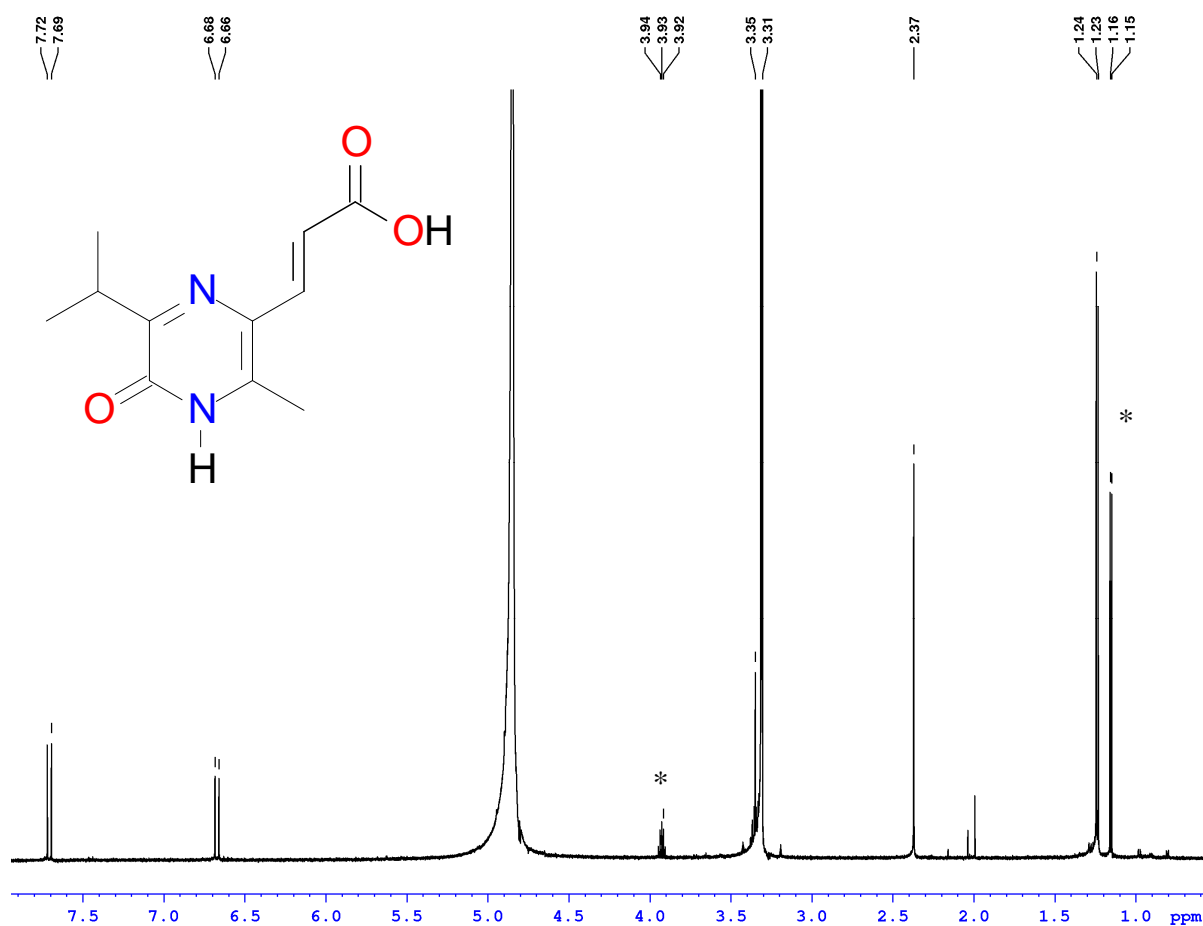


FIGURA 4.87 – Espectro de RMN de ^1H da fração B6GP. Giovaninona C. * - Impureza (etanol) no solvente deuteurado – $\text{MeOD-}d_4$.

4.3.7 - Fração B7GP

A fração identificada como B7GP foi eluída do cartucho e analisada por RMN. Foi obtido um espectro de RMN de ^1H , utilizando a sequência de pulso lc1pnf2 (dupla pré-saturação). Na FIGURA 4.88 é possível visualizar o espectro obtido e mostra a presença de diversos sinais espalhados por todo o espectro. Entretanto, uma análise mais minuciosa e por integração dos sinais mostrou que esta fração é representada por uma mistura de dois compostos. Muitos sinais apresentaram um aspecto duplicado, indicando duas substâncias com fórmulas estruturais muito próximas.

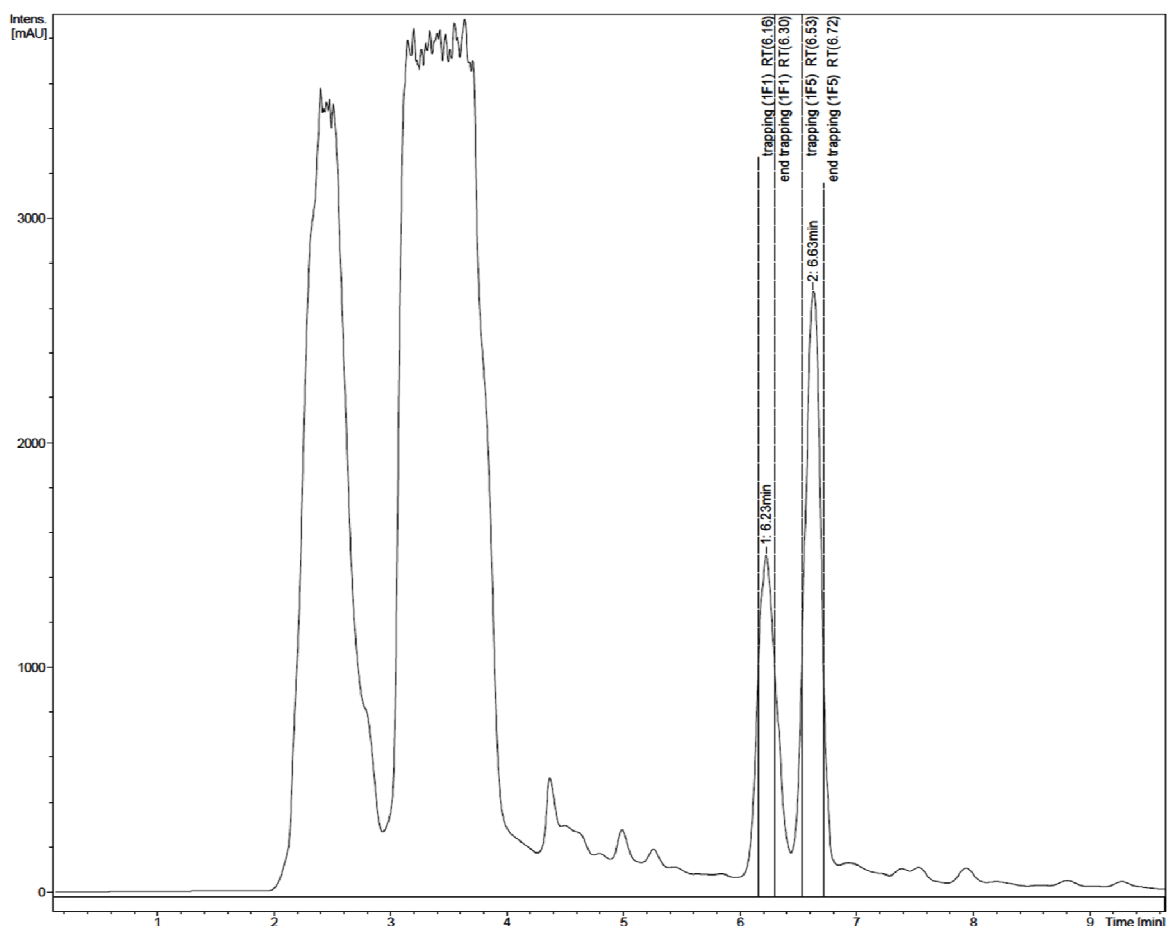


FIGURA 4.89 – Cromatograma ($\lambda 230$) do extrato butanólico (EB) do caldo de fermentação da bactéria *S. cebimarensis* SS99BA-2. Resolução da fração B7GP. Eluente A (H_2O mili Q, 0,05% de TFA), eluente B (Acetonitrila, 0,05% de TFA). Eluição isocrática nos 5 minutos iniciais (50% de B / 50% de A), eluição gradiente 50-60 % de B durante 2 minutos.

As frações foram adsorvidas em cartuchos de fase estacionária *General Phase* (HysphereTM-resin) durante 30 corridas cromatográficas consecutivas gerando as amostras B7aGP (tr = 6,23 min) e B7bGP (tr = 6,63 min). As análises de RMN mostraram que os compostos presentes nas duas frações são estruturalmente muito semelhantes, e que a substância da fração B7bGP estava em maior quantidade no caldo de fermentação ou apresentou melhor retenção por SPE, quando comparada à substância da fração B7aGP. Dessa forma, na sequência será apresentada a elucidação estrutural do composto da fração B7bGP, em seguida da fração B7aGP.

4.3.8 - Fração B7bGP

Através da relação sinal-ruído por RMN, verificou-se que o composto presente na fração B7bGP foi obtido em maior quantidade quando comparado ao composto presente na fração B7aGP. Assim, optou-se por fazer a determinação estrutural primeiramente daquele. A análise por espectrometria de massa apresentou o pico $[M-H]^-$ m/z 443,6, equivalente à molécula desprotonada (FIGURA 4.90). Essa relação massa/carga indicou a fórmula molecular $C_{21}H_{33}O_8P$.

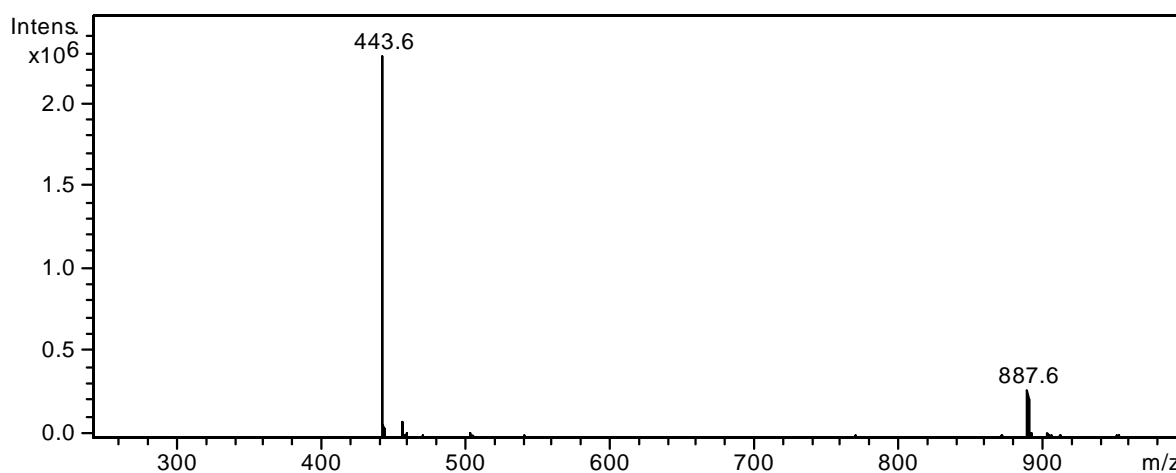


FIGURA 4.90 - Espectro de Massa (*Full scan*) via *Electrospray* modo negativo para fração B7bGP.

Os espectros de RMN apresentaram uma quantidade maior de sinais, quando comparados aos espectros obtidos para os outros compostos isolados neste trabalho. Os espectros serão apresentados após a descrição completa da elucidação estrutural. Na TABELA 4.14 estão todos os dados espectroscópicos de RMN extraídos dos espectros obtidos.

TABELA 4.14 – Dados espectroscópicos para o composto majoritário da fração B7bGP (^{13}C , 150 MHz; ^1H , 600 MHz, 500 μg em 250 μL de $\text{MeOH-}d_4$).

no.	δ_{C}	δ_{H} , <i>mult.</i> (J em Hz)	COSY	HMBC
1	167,1			
2	123,8	6,06, <i>d</i> (9,80)	3	1, 3, 4
3	148,3	7,04, <i>dd</i> (5,49; 9,80)	2, 4	1, 2, 4
4	64,8	4,17, <i>dd</i> (3,00; 5,49)	3, 5	2, 3, 5
5*	84,0	4,88, <i>dd</i> (3,00; 7,00)	4, 6	4, 6, 7
6	129,4	5,84, <i>dd</i> (7,00; 16,00)	5, 7	4, 5, 8
7	133,8	5,84 – 5,91, <i>m</i>	6, 8a, 8b	5, 6, 8, 9
8a	38,9	2,44, <i>ddd</i> (6,72; 6,72; 13,45)	7, 8b, 9	6, 7, 9, 10
8b	38,9	2,65, <i>ddd</i> (6,72; 6,72; 13,45)	7, 8a, 9	6, 7, 9, 10
9	77,7	4,66 – 4,74, <i>m</i>	8, 10	7, 8, 10, 21
10	44,8	1,62, <i>dqdd</i> (2,08; 3,10; 6,98; 9,54)	9, 11, 21	8, 9, 11, 21
11	69,6	4,53, <i>t_{AB}</i> (9,54)	10, 12	10, 12, 21
12	134,1	5,35, <i>t_{AB}</i> (10,15)	11, 13	10, 11, 13
13	127,7	6,43, <i>t_{AB}</i> (11,52)	12, 14	12, 14, 15
14	125,7	6,32, <i>t_{AB}</i> (11,37)	13, 15	12, 13, 15, 16
15	136,0	5,52, <i>dt</i> (7,72; 11,17)	14, 16	14, 16, 17
16	27,4	2,18 – 2,24, <i>m</i>	15, 17	15, 17, 18
17	41,0	1,24 – 1,30, <i>m</i>	16, 18	16, 18
18	29,8	1,57, <i>n</i> (6,67)	17, 19, 20	17, 19, 20
19, 20	23,9	0,90, <i>d</i> (6,67)	18	17, 18
21	10,2	0,82, <i>d</i> (6,98)	10	9, 10, 11

* Multiplicidade determinada em acetonitrila – $\text{ACN-}d_3$.

A elucidação estrutural foi feita através da determinação parcial de duas subestruturas. A análise do espectro de RMN de ^1H mostra a presença de 29 hidrogênios não trocáveis incluindo 9 hidrogênios metílicos, 6 hidrogênios metilênicos, 6 hidrogênios metínicos e 8 hidrogênios olefínicos que foram completamente determinados por gHSQC. Através do espectro de RMN de ^{13}C , 21 sinais de carbonos foram detectados e relacionados a 3 carbonos metílicos, 3 carbonos metilênicos, 6 carbonos metínicos, 8 carbonos olefínicos e 1 carbonila de éster. A análise da subestrutura A (FIGURA 4.123) começou através dos sinais de

RMN de ^1H na região de hidrogênios olefínicos. Foram verificados a presença de um duplete e um duplete duplo, (H2, δ_{H} 6,06, 1H, d) e (H3, δ_{H} 7,04, 1H, dd) respectivamente, que, por *g*COSY verificou-se pertencerem a carbonos olefínicos vicinais. A constante de acoplamento de 9,80 Hz entre H2 e H3 sugere uma ligação dupla de geometria *cis*. Por *g*HSQC, esses hidrogênios foram relacionados aos carbonos olefínicos C2 (δ_{C} 123,8) e C3 (δ_{C} 148,3). O hidrogênio H2 apresentou correlação *g*HMBC com o carbono C1 (δ_{C} 167,1) o que evidencia a presença de uma carbonila de éster α , β insaturada. O hidrogênio H3 ainda apresentou correlação *g*HMBC com os carbonos sp^3 C4 (δ_{C} 64,8) e C5 (δ_{C} 84,0) que, por *g*HSQC estão conectados diretamente aos hidrogênios H4 (δ_{H} 4,17, 1H, dd) e H5 (δ_{H} 4,88, 1H, dd). Esses dados mostram a presença de um sistema 4-hidróxi-4,5-dihidro-piran-2-ona na fórmula estrutural. Na sequência, verificou-se a presença de um carbono olefínico (C6, δ_{C} 129,4) ligado ao hidrogênio H6 (δ_{H} 5,84, 1H, dd) formando uma ligação dupla com o carbono C7 (δ_{C} 133,8). A constante de acoplamento de 16,0 Hz entre H6 e H7 sugere uma ligação dupla de geometria *trans*. Através das análises das constantes de acoplamento e *g*COSY verificou-se que C6 está conectado diretamente à posição 5 da lactona eletrofílica α , β insaturada. Diretamente a C7 está conectado um carbono metilênico (C8, δ_{C} 38,9) seguido de um carbono metínico (C9, δ_{C} 77,7). Um acoplamento fósforo-oxigênio-carbono foi detectado no espectro de RMN de ^{13}C (δ_{C} 77,7 ppm, $^2J_{\text{P-O-C}} = 5,0$ Hz) na posição 9, indicando esta posição para a presença de um grupamento fosfato, que foi proposto através da análise de fragmentação por espectrometria de massa, que mostra a perda de uma unidade de ácido fosfórico. Esses dados levam à subestrutura A, representada na FIGURA 4.91.

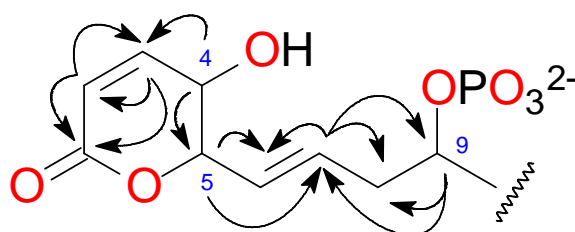


FIGURA 4.91 – Subestrutura A. As setas representam as correlações *g*HMBC principais que levaram à proposta estrutural.

A subestrutura B começou a ser elucidada através da análise da região de alifáticos no espectro de RMN de ^1H . Um grupamento isopentila foi detectado

através da combinação de análise por *g*COSY, *g*HSQC e *g*HMBC que mostrou a conexão direta de dois carbonos metilênicos, C16 (δ_C 27,4) e C17 (δ_C 41,0), um carbono metínico, C18 (δ_C 29,8) e e dois carbonos metílicos, C19 (δ_C 23,9) e C20 (δ_C 23,9). Todos os sinais de RMN de 1H , bem como suas constantes de acoplamento confirmam a unidade estrutural proposta. A análise da região de olefínicos mostrou a presença de um dieno conjugado na estrutura conectado diretamente ao carbono C16. O dieno conjugado é formado pelos carbonos C12 (δ_C 134,1), C13 (δ_C 127,7), C14 (δ_C 125,7) e C15 (δ_C 136,0). Essa sequência foi confirmada pelas constantes de acoplamento no espectro de RMN de 1H e através dos espectros de *g*COSY e *g*HMBC. As constantes de acoplamento de 10,15 Hz entre H12 e H13, e 11,37 Hz entre H14 e H15 suportam a proposta de que se trata de um dieno de geometria *cis*. Um hidrogênio de carbono metínico, C10 (δ_C 44,8), apresentou correlações com os carbonos metílico C21, (δ_C 10,2) e metínico C11 (δ_C 69,6), que por análise de deslocamento de hidrogênio e carbono foi proposto estar conectado a uma hidroxila. Dessa forma, a proposta para a subestrutura B está representada na FIGURA 4.92.

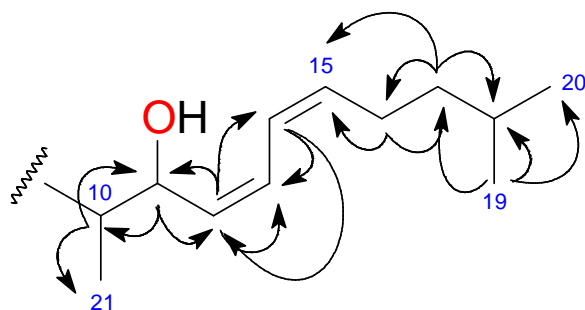


FIGURA 4.92 – Subestrutura B. As setas representam as correlações *g*HMBC principais que levaram à proposta estrutural.

Através da análise por *g*COSY, verificou-se correlação entre os hidrogênios H9 (δ_H 4,66 – 4,74, 1H, m) e H10 (δ_H 1,62, 1H, dqdd) indicando que os carbonos C9 e C10 são vicinais. Essa proposta foi confirmada por *g*HMBC. Finalmente, a estrutura plana proposta para o composto presente em maior quantidade na fração B7bGP está representada na FIGURA 4.93.

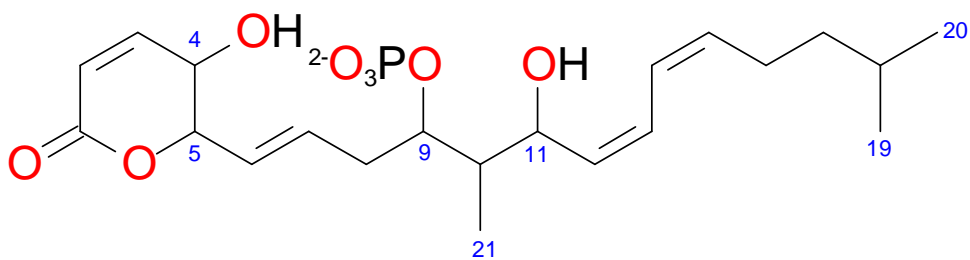


FIGURA 4.93 – Fórmula estrutural do composto presente em maior quantidade na fração B7bGP.

Trata-se de um representante inédito de uma classe de policetídeos fosfatados extremamente citotóxicos produzidos por *Streptomyces* do solo e de origem marinha (OHKUMA et al., 1992; KOHAMA et al., 1993; AMEMIYA et al., 1994). A diferença na nova estrutura é na cadeia carbônica entre C12 e C20. A configuração dos centros estereogênicos já foi determinada em outro estudo: 4S,5S,9S,10S e 11S (BURKE et al., 2010). Baseado nesse estudo foi possível concluir que esta também é a configuração absoluta do composto em questão, através da análise de configuração relativa. A estereoquímica *syn* entre C4 e C5 foi determinada pela constante de acoplamento entre H4 e H5 ($^3J_{H4-H5} = 3,0$ Hz). Esta constante de acoplamento é similar à observada em outros compostos contendo o mesmo sistema cíclico. Piranonas cíclicas 4,5-dissubstituídas com orientação *anti* apresentam uma constante de acoplamento da ordem de 8,7 Hz. A análise de configuração relativa dos hidrogênios H9, H10 e H11 foi feita em acetonitrila deuterada. A constante de acoplamento entre H10-H11 ($^3J_{H10-H11} = 9,54$ Hz) é um forte indicativo de uma relação *anti* entre esses dois núcleos (AMEMIYA et al., 1994; BURKE et al., 2010). E, por fim, a constante de acoplamento entre H10-H9 ($^3J_{H10-H9} = 3,10$ Hz) indica relação *syn* entre esses hidrogênios. Essas informações foram dispostas na FIGURA 4.94, estão em boa concordância com os valores encontrados na literatura e dão suporte para inferir a existência de uma ligação de hidrogênio intramolecular entre C11-OH e C9-O resultando em uma conformação preferencial cíclica barco-torcido (BURKE et al., 2010).

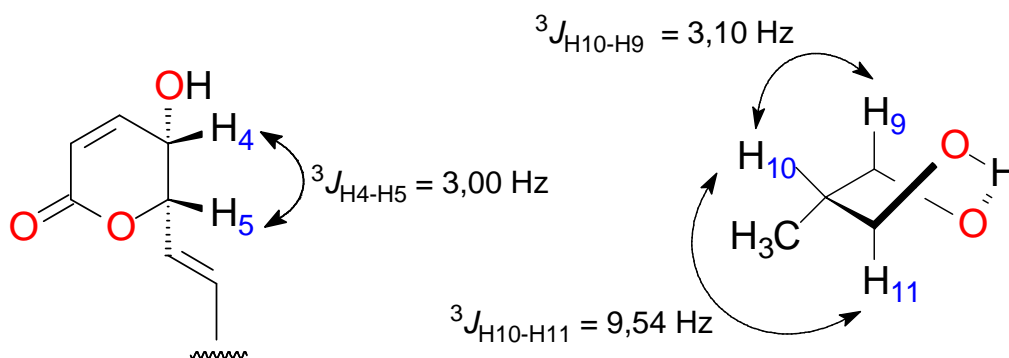


FIGURA 4.94 – Atribuição da configuração relativa e absoluta através das constantes de acoplamento obtidas por espectroscopia de RMN de ${}^1\text{H}$.

A determinação da multiplicidade do sinal de H10 foi feita através de simulação computacional e apodização matemática gaussiana (gb). Esse sinal apresentou uma ressonância complexa, dificultando a obtenção das constantes de acoplamento. Uma vez que a constante de acoplamento entre H9 e H10 era necessária para a determinação da configuração relativa, o sinal de H10 foi analisado e, após aplicação da apodização matemática gaussiana de 0,3, concluiu-se que se trata de um duplo quadruplo duplo duplo (dqdd). H10 acopla com H11 com uma constante de 9,54 Hz, originando um duplete, com H21 com uma constante de 6,98 Hz, originando um quadruplete, com H9 com 3,10 Hz originando um duplete e com o fósforo, do grupo fosfato conectado na posição 9, com 2,08 Hz, originando um duplete. A FIGURA 4.95 mostra esses acoplamentos.

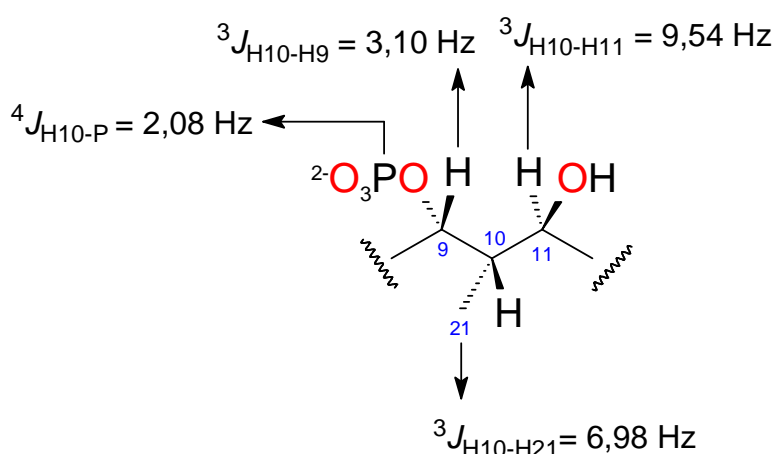


FIGURA 4.95 – Acoplamentos observados de H10 com outros núcleos.

Sendo este um sinal de ressonância incomum, optou-se por simulação computacional para verificar a validade dessa proposta. Utilizou-se o programa *NMR*

Simulator desenvolvido em parceria pelas Universidades de Cali e Bogotá, Colômbia e Escola Politécnica Federal de Lausanne, Suíça (CASTILLO et al., 2010). O programa leva em consideração os acoplamentos mais fortes, o que normalmente não é possível de ser visualizado em outros programas com a mesma finalidade. O sinal foi simulado e comparado com o sinal obtido experimentalmente, apresentando uma adequada similaridade. A comparação pode ser visualizada na FIGURA 4.96.

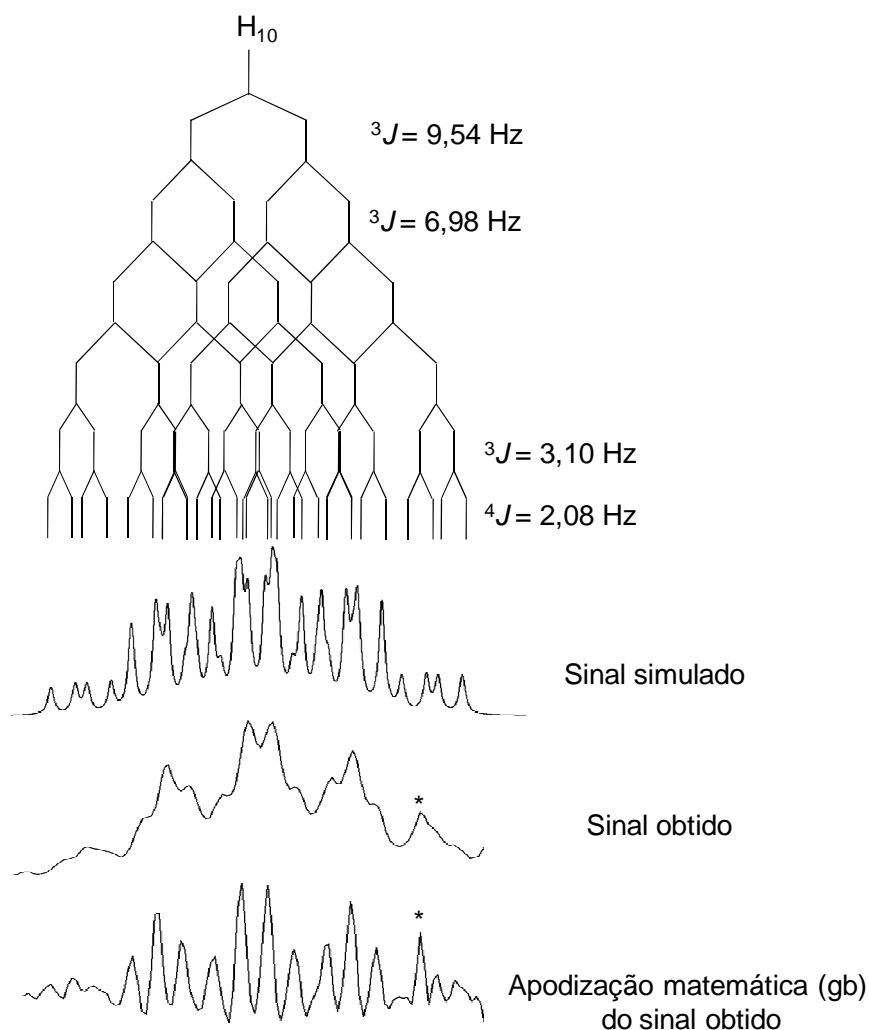


FIGURA 4.96 – Simulação do sinal de H_{10} através do programa computacional *NMR Simulator* – (CASTILLO et al., 2010). * Sobreposição parcial com o sinal de H_{18} .

Dessa forma, a fórmula estrutural do composto determinado na fração BH7bGP, considerando as configurações dos centros estereogênicos está representado na FIGURA 4.97.

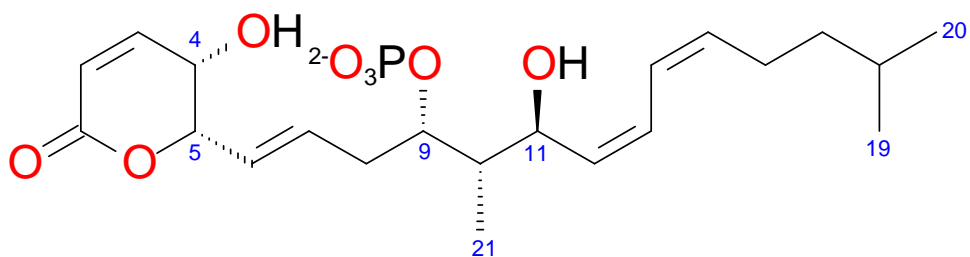


FIGURA 4.97 – Fórmula estrutural do composto presente em maior quantidade na fração B7bGP com a atribuição das configurações relativas dos centros estereogênicos a partir da análise dos valores de constantes de acoplamento.

A análise de fragmentação por espectrometria de massa (MS) em MS^2 apresentou o perfil apresentado na FIGURA 4.98. O pico mais intenso foi o m/z 345,1, atribuído a uma unidade de ácido fosfórico, relativo à perda do grupo fosfato. O pico m/z 301,1 equivale a uma unidade de dióxido de carbono (CO_2). O pico m/z 191,1 equivale à perda de toda a cadeia carbônica de C1 a C8. Os picos m/z 149,0 e 150,0 equivalem a perda da cadeia carbônica de C9 a C21.

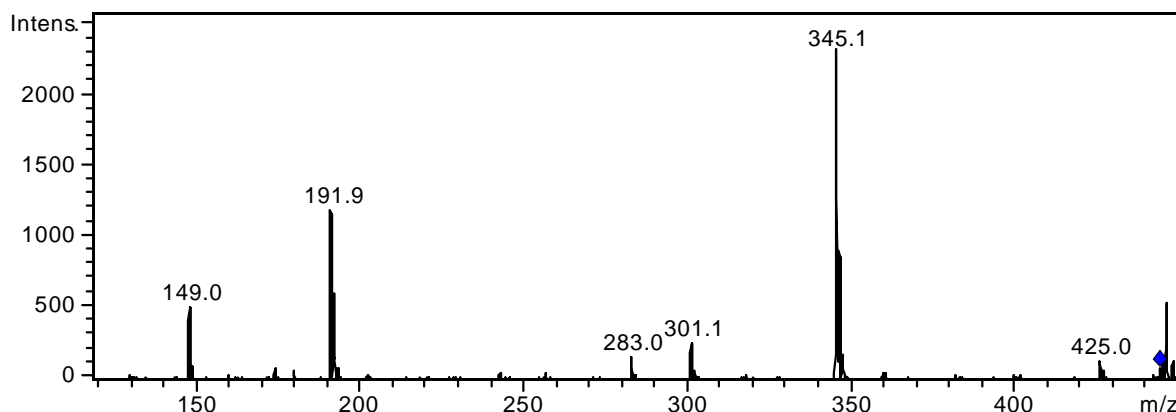


FIGURA 4.98 – Fragmentação em MS^2 do íon- $[\text{M}-\text{H}]^-$ m/z 443,6.

Na sequência serão apresentados os espectros de RMN de ^1H (FIGURA 4.99), RMN de ^{13}C (FIGURA 4.100) e os mapas de contorno $g\text{COSY}$ (FIGURA 4.101), $g\text{HSQC}$ (FIGURA 4.102) e $g\text{HMBC}$ (FIGURA 4.103).

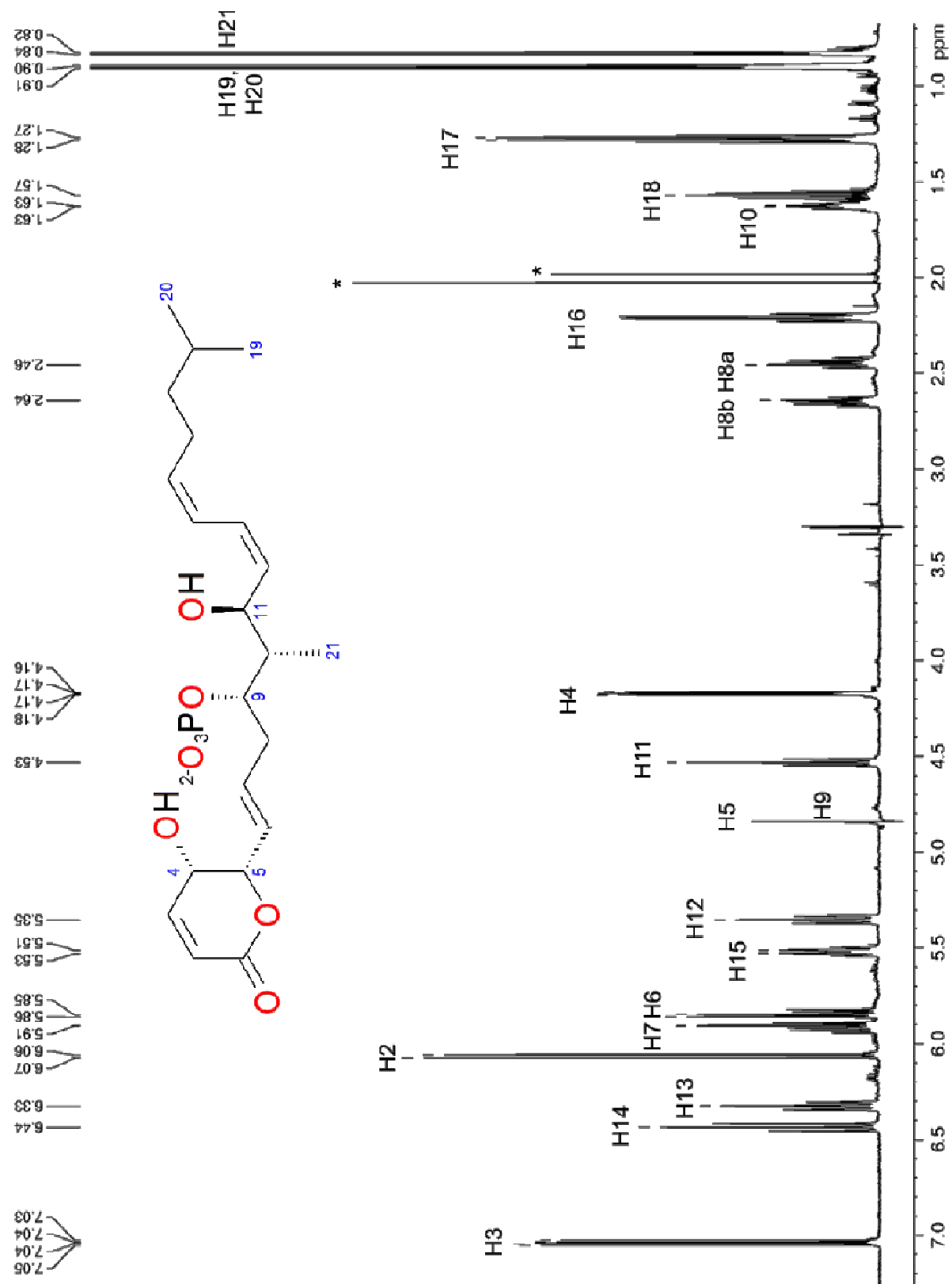


FIGURA 4.99 – Espectro de RMN de ^1H da fração B7bGP, 500 μg em 250 μL de $\text{MeOH-}d_4$. * - Impurezas.

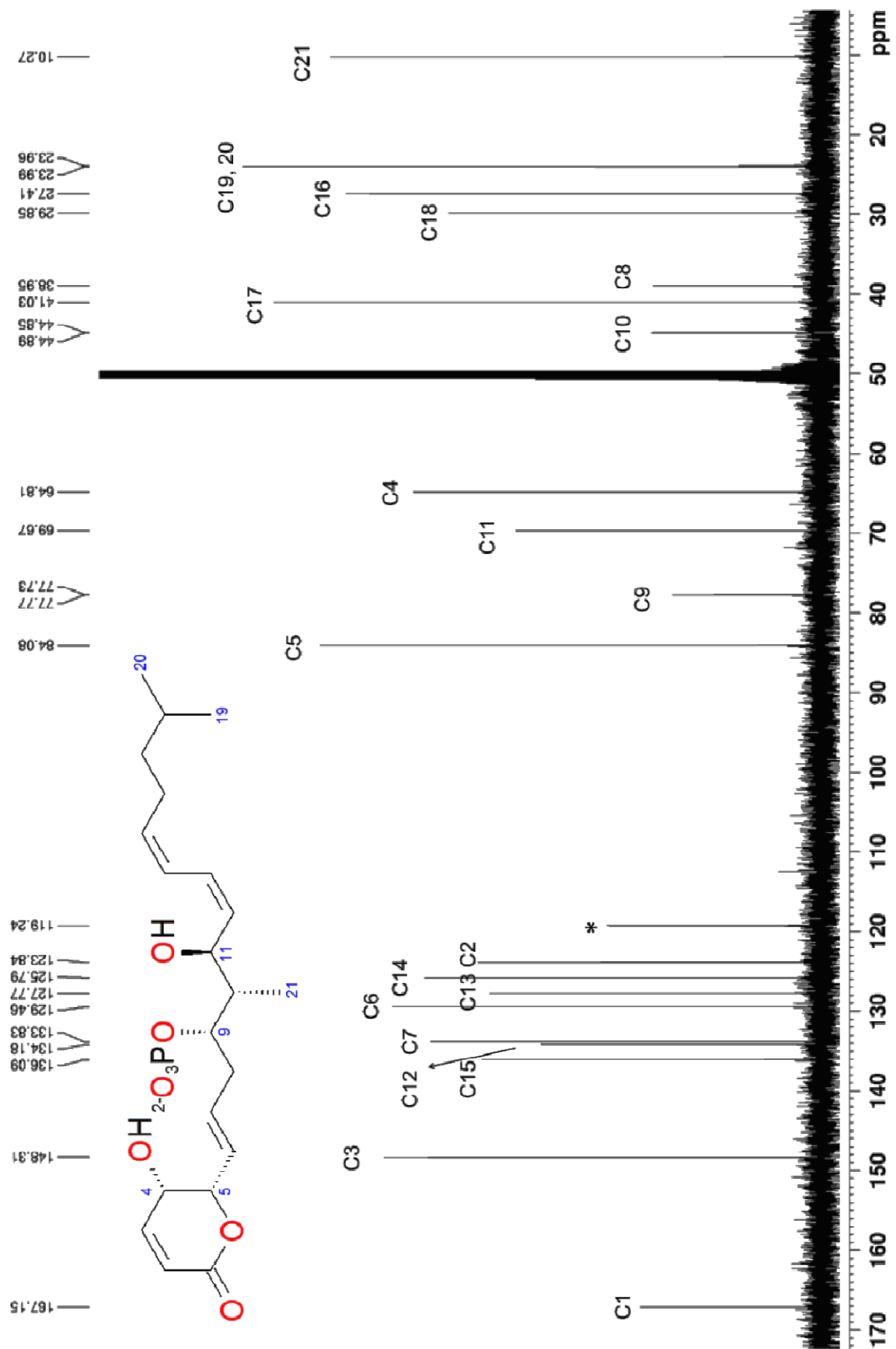


FIGURA 4.100 – Espectro de ^{13}C do pico B7bGP. ns= 92K, td= 32K, sw= 238,8 ppm, aq=0,45 s e d1= 0,20 s. * - Impurezas.

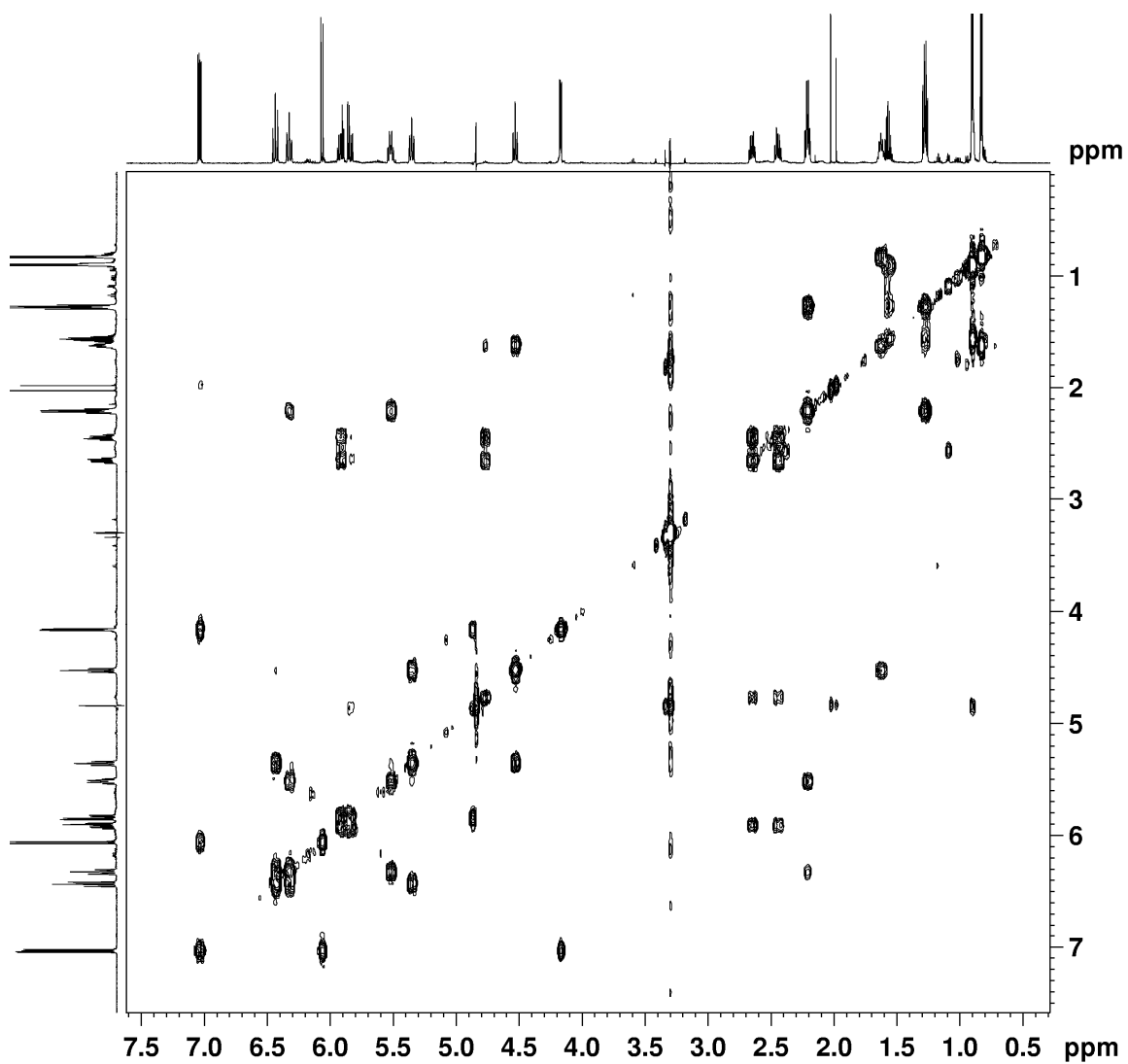


FIGURA 4.101 – Mapa de contorno gCOSY da fração B7bGP.

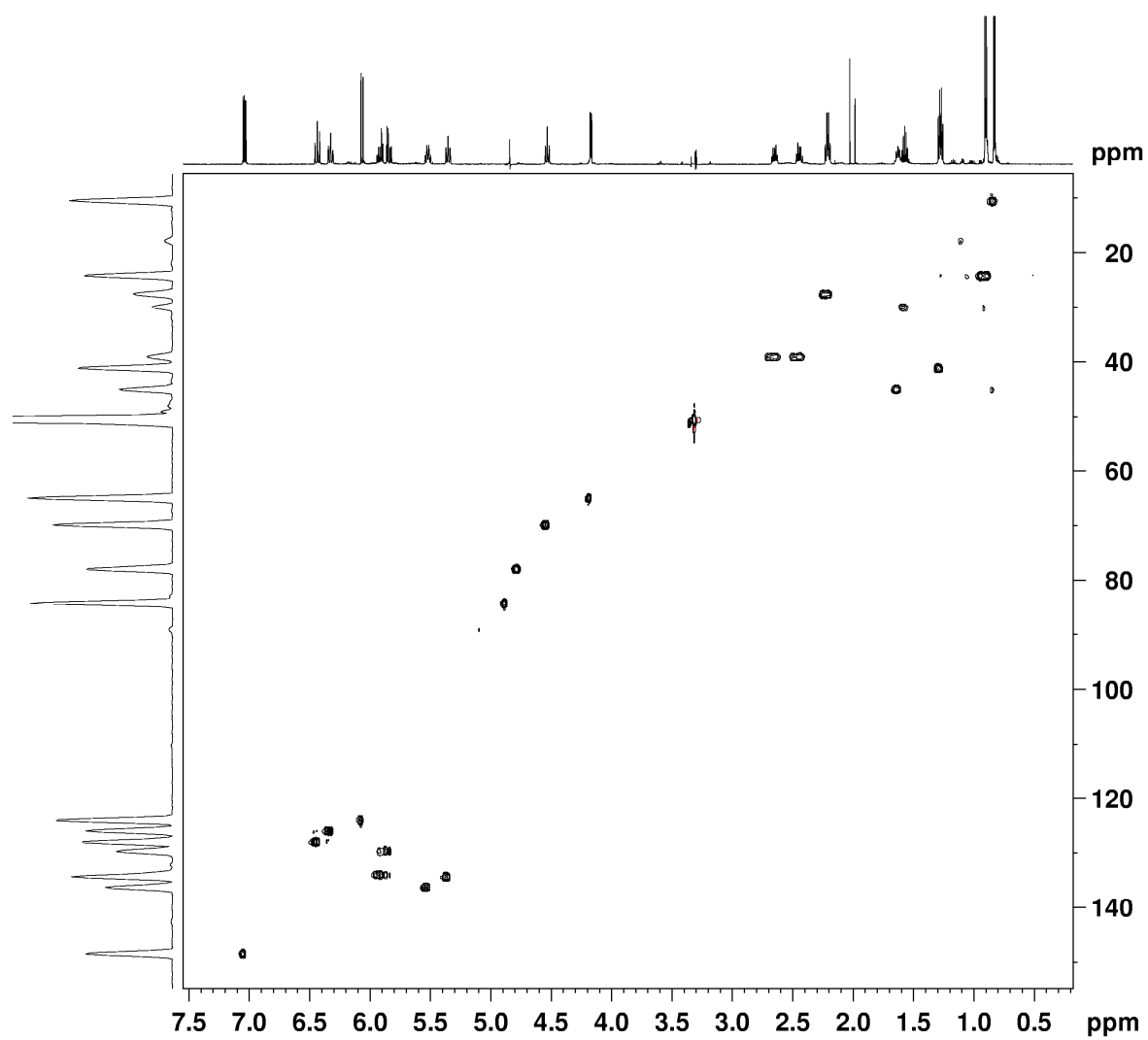


FIGURA 4.102 – Mapa de contorno gHSQC da fração B7bGP.

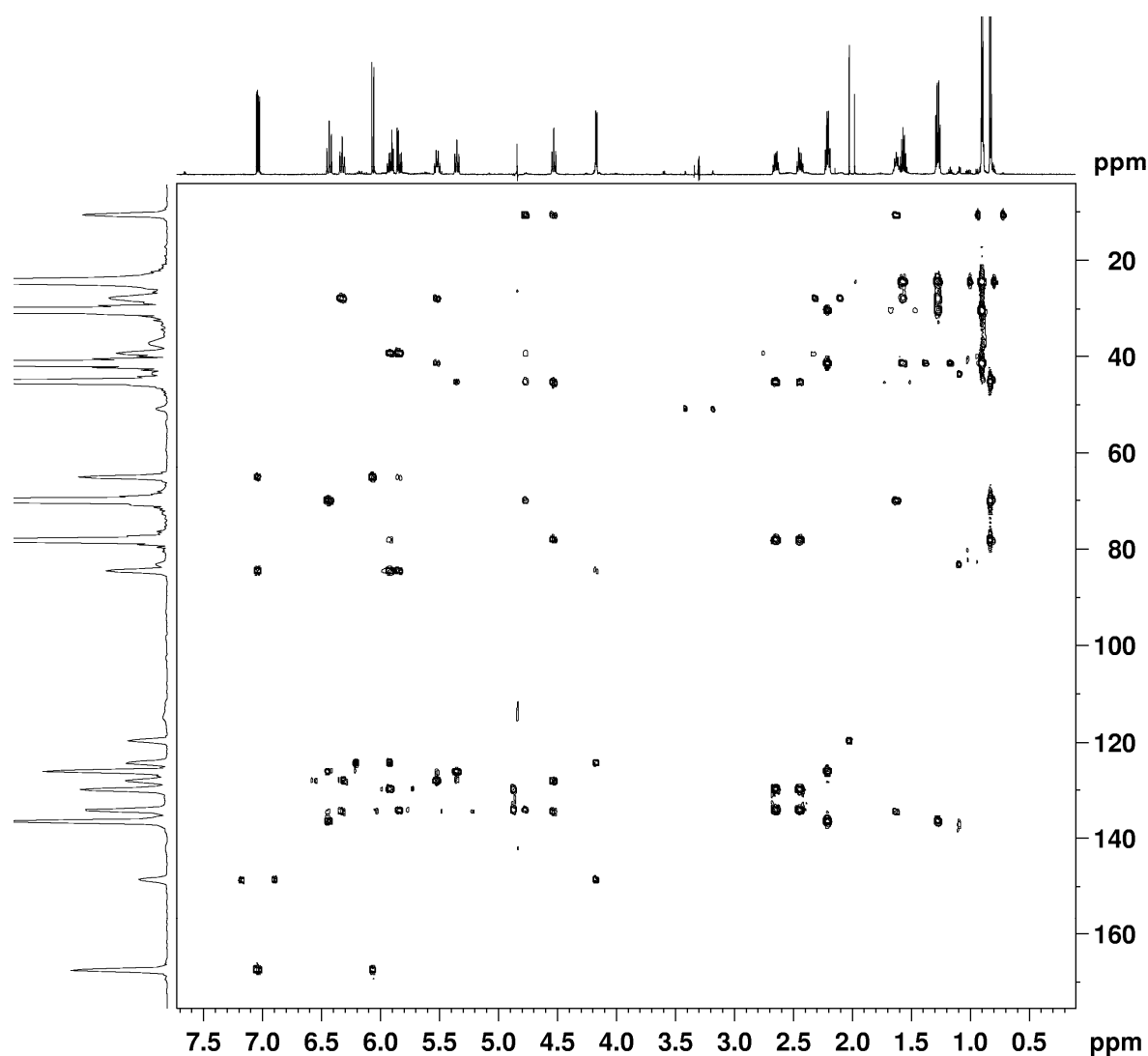


FIGURA 4.103 – Mapa de contorno gHMBC da fração B7bGP.

4.3.9 - Fração B7aGP

Através da relação sinal-ruído por RMN, verificou-se que o composto presente na fração B7bGP foi obtido em menor quantidade quando comparado ao composto presente na fração B7bGP. A análise por MS apresentou o pico $[M-H]^-$ m/z 445,3, equivalente à molécula desprotonada (FIGURA 4.104). Essa relação massa/carga indicou a fórmula molecular $C_{21}H_{35}O_8P$. Essa relação massa/carga é exatamente 2 unidades de massa maior que a relação massa/carga para o pico do íon molecular da fração B7bGP. Baseado no tempo de retenção por cromatografia é possível sugerir que as duas estruturas são muito semelhantes, e os dados obtidos por espectrometria de massa podem levar à conclusão de que a diferença estrutural entre as duas seja a saturação de uma das ligações duplas presentes na estrutura.

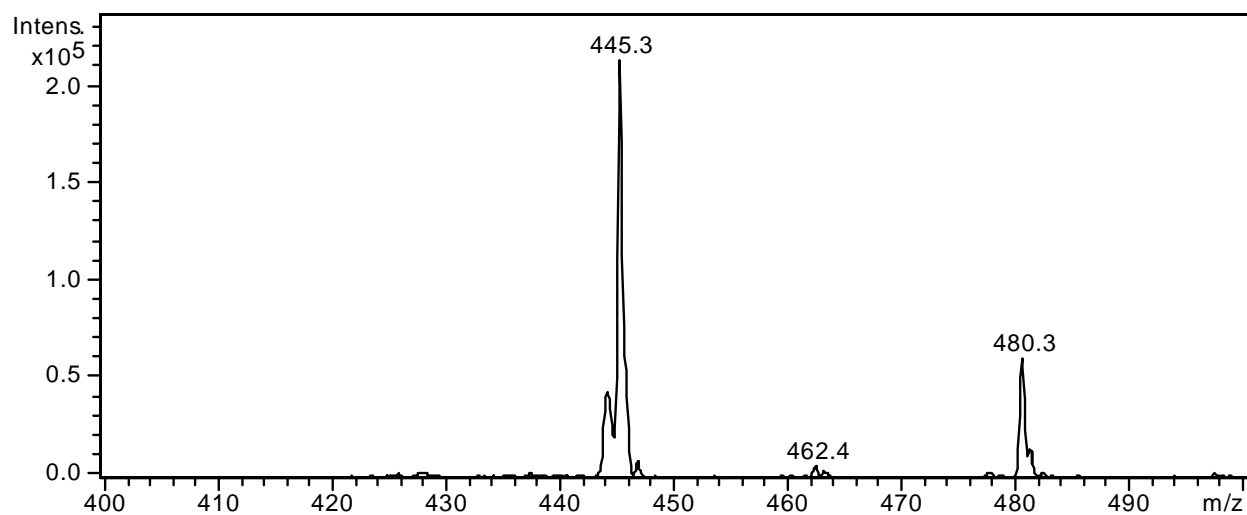


FIGURA 4.104 - Espectro de Massa (*Full scan*) via *Electrospray* modo negativo para fração B7aGP.

Os espectros de RMN também apresentaram uma quantidade maior de sinais, quando comparados aos espectros obtidos para os outros compostos isolados neste trabalho. Na TABELA 4.15 estão todos os dados espectroscópicos de RMN extraídos dos espectros obtidos.

TABELA 4.15 – Dados espectroscópicos para o composto majoritário da fração B7aGP (^{13}C , 150 MHz; ^1H , 600 MHz, 300 μg em 250 μL de $\text{MeOH-}d_4$).

no.	δ_{C}	δ_{H} , <i>mult.</i> (<i>J</i> em Hz)	COSY	HMBC
1	181,6			
2	30,5	2,51 – 2,55, <i>m</i>	3a, 3b	1, 3, 4
3a	25,8	2,0 – 2,13, <i>m</i>	2, 3b, 4	1, 2, 4
3b	25,8	2,20 – 2,27, <i>m</i>	2, 3a, 4	1, 2, 4
4	85,9	4,49, <i>dt</i> (5,00; 6,90)	3, 5	2, 3, 5
5	76,3	4,09, <i>dd</i> (6,45; 6,90)	4, 6	4, 6, 7
6	133,1	5,61, <i>dd</i> (6,45; 15,3)	5, 7	4, 5, 8
7	132,0	5,76 – 5,83, <i>m</i>	6, 8a, 8b	5, 6, 8, 9
8a	38,7	2,32 – 2,41, <i>m</i>	7, 8b, 9	6, 7, 9, 10
8b	38,7	2,56 – 2,63, <i>m</i>	7, 8a, 9	6, 7, 9, 10
9	77,3	4,66 – 4,72, <i>m</i>	8, 10	7, 8, 10, 21
10	44,6	1,53 – 1,64, <i>m</i>	9, 11, 21	8, 9, 11, 21
11	69,8	4,53, <i>t</i> _{AB} (9,07)	10, 12	10, 12, 21
12	134,3	5,34, <i>t</i> _{AB} (9,94)	11, 13	10, 11, 13
13	127,7	6,42, <i>t</i> _{AB} (11,38)	12, 14	12, 14, 15
14	125,9	6,32, <i>t</i> _{AB} (11,08)	13, 15	12, 13, 15, 16
15	135,9	5,50, <i>dt</i> (7,63; 10,8)	14, 16	14, 16, 17
16	27,4	2,18 – 2,24, <i>m</i>	15, 17	15, 17, 18
17	41,06	1,24 – 1,30, <i>m</i>	16, 18	16, 18
18	29,8	1,55, <i>n</i> (6,71)	17, 19, 20	17, 19, 20
19, 20	24,0	0,89, <i>d</i> (6,71)	18	17, 18
21	10,2	0,80, <i>d</i> (6,79)	10	9, 10, 11

Após as análises por RMN, pode-se verificar que a diferença entre as duas estruturas está na ligação dupla entre os carbonos C2 e C3 da estrutura molecular. No espectro de RMN de ^1H foi verificada a presença de um multipeto em δ_{H} 2,51-2,55 integrando para 2 hidrogênios (2H, H2, *m*), que, por gHSQC foi atribuído ao carbono em δ_{C} 30,5, formando um grupo metileno. Esse hidrogênios apresentaram correlação gHMBC com uma carbonila de éster com deslocamento químico de δ_{C} 181,6 (C1). Os hidrogênio H2 também apresentaram correlação gCOSY com os hidrogênio magneticamente não equivalentes H3a (1H, *m*) e H3b

(1H, m), ambos conectados ao carbono δ_C 25,8 (C3). Esses hidrogênios apresentaram correlação gCOSY com um grupo metínico, com deslocamento químico de hidrogênio em δ_H 4,49 (1H, H4, dt) e de carbono (δ_C 85,9, atribuído por gHSQC). Esses valores de deslocamento químico mostram que se trata de um grupo metínico ligado diretamente à hidroxila. Na sequência, verificou-se que esse grupo metino é vizinho a outro hidrogênio de grupo metínico, em δ_H 4,09 (1H, H5, dd), δ_C 76,5, que fecha a estrutura cíclica em uma unidade tetrahidro piran-2-ona, conforme esquematizado na FIGURA 4.105. Todos os outros dados espectroscópicos indicam que não existe outra diferença estrutural entre os policetídeos encontrados nas frações B7aGP e B7bGP.

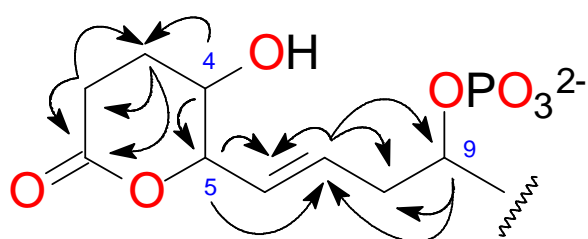


FIGURA 4.105 – Fragmento da estrutura que contém a diferença entre as substâncias identificadas nas frações B7aGP e B7bGP.

Após a análise detalhada dos demais sinais obtidos por espectroscopia de RMN, foi possível concluir que a estrutura da substância presente em maior quantidade na fração EB7aGP apresenta uma saturação da ligação dupla C2-C3 da cadeia carbônica (FIGURA 4.106). Assim como o composto identificado na fração anterior, esta também é uma estrutura inédita na área de produtos naturais.

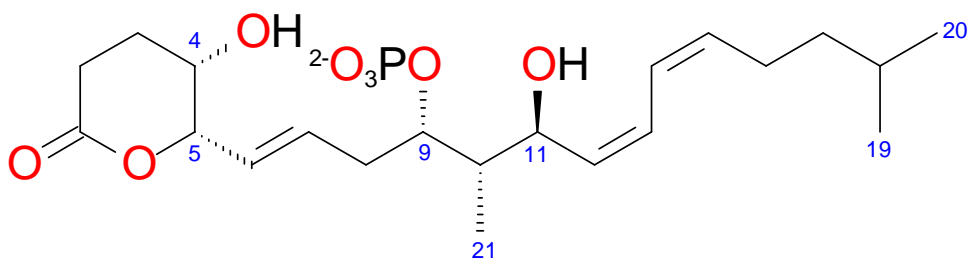


FIGURA 4.106 – Fórmula estrutural do composto presente em maior quantidade na fração B7aGP.

Na sequência serão apresentados os espectros de RMN de ^1H (FIGURA 4.107) e RMN de ^{13}C (FIGURA 4.108) e os mapas de contorno gCOSY (FIGURA 4.109), gHSQC (FIGURA 4.110) e gHMBC (FIGURA 4.111).

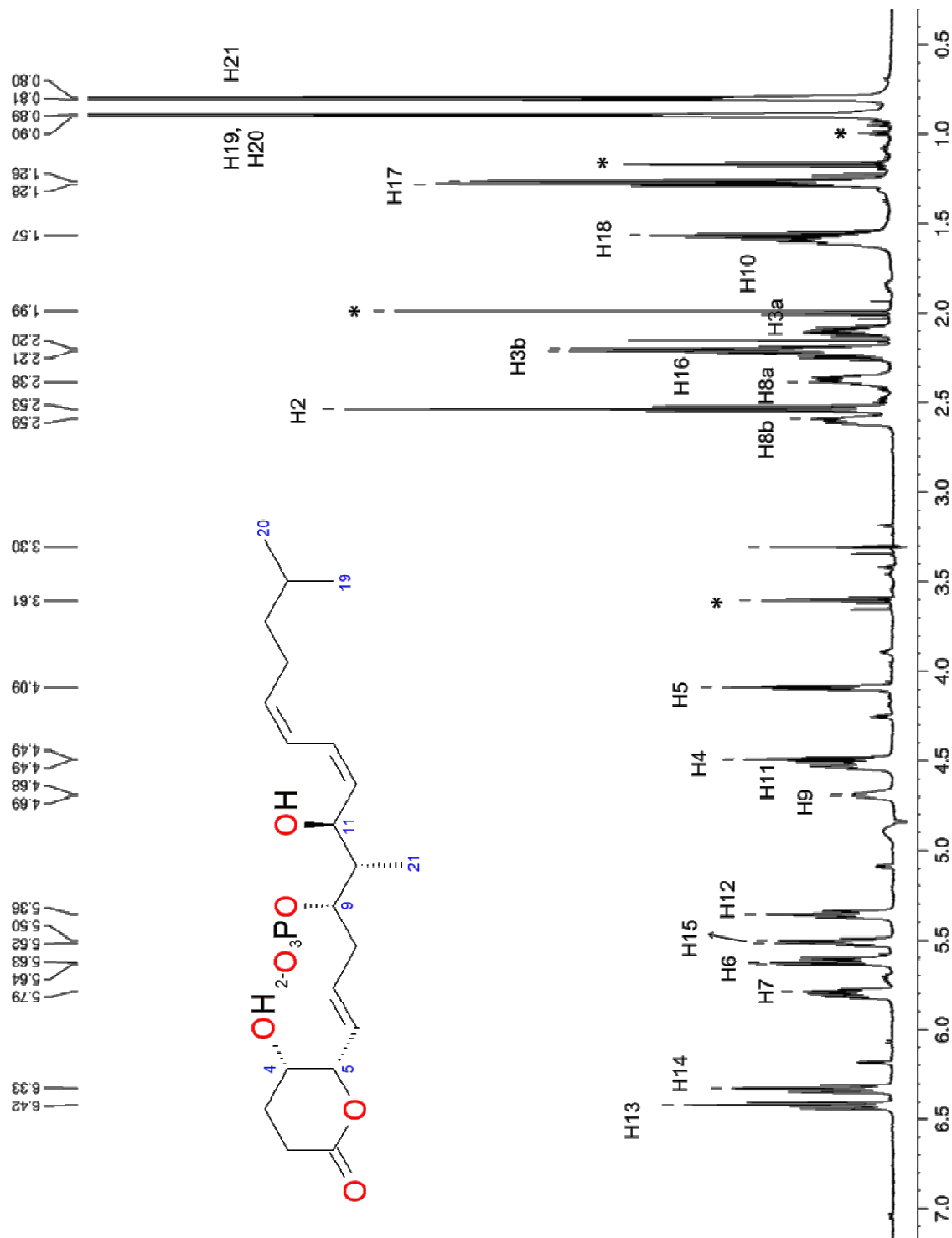


FIGURA 4.107 – Espectro de RMN de ^1H fração B7aGP, 300 μg em 250 μL de $\text{MeOH-}d_4$. * - Impurezas.

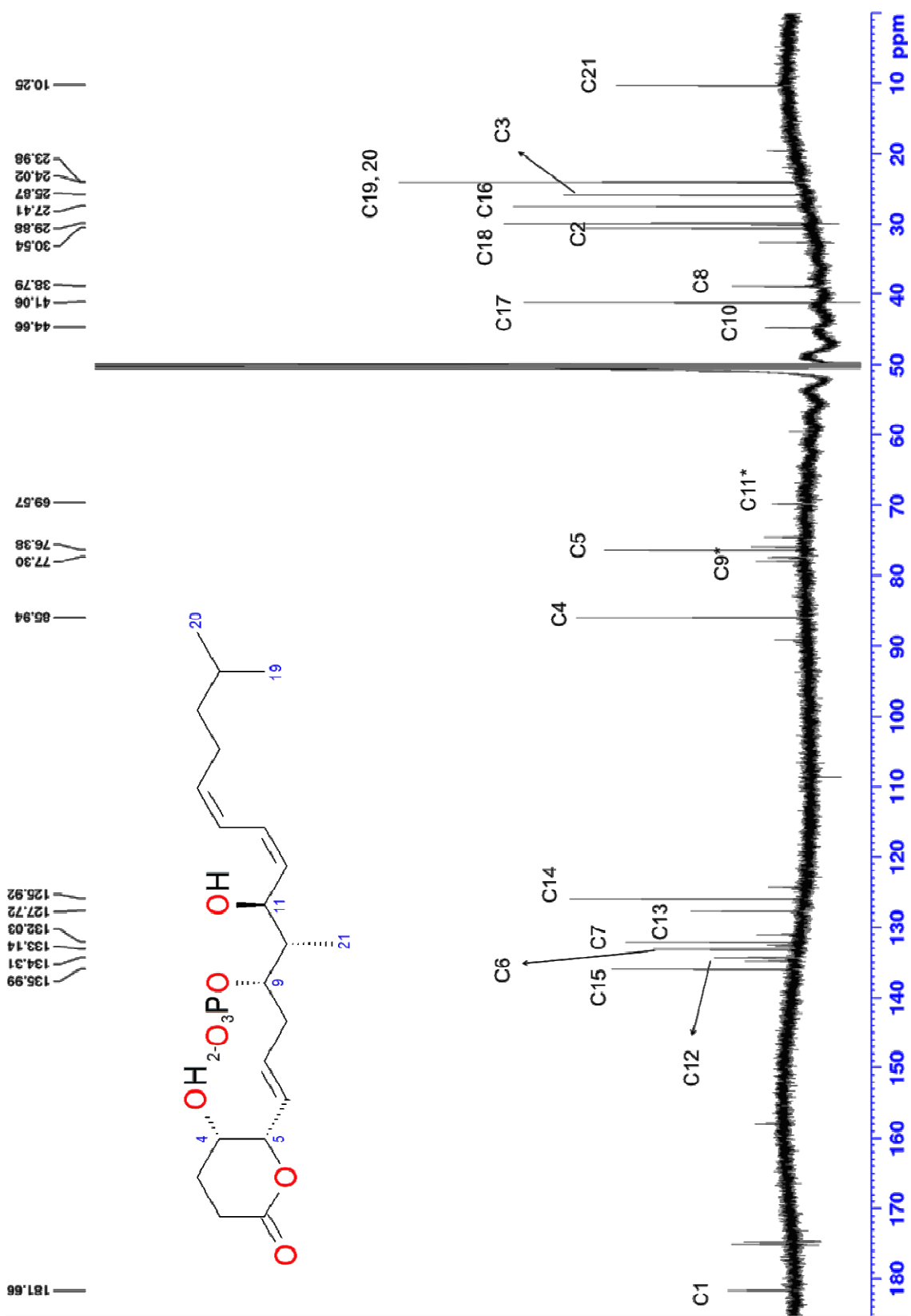


FIGURA 4.108 – Espectro de RMN de ^{13}C da fração B7aGP. ns= 92K, td= 32K, sw= 238,8 ppm, aq=0,45 s e d1= 0,20 s. * - deslocamento determinado por gHSQC e gHMBC.

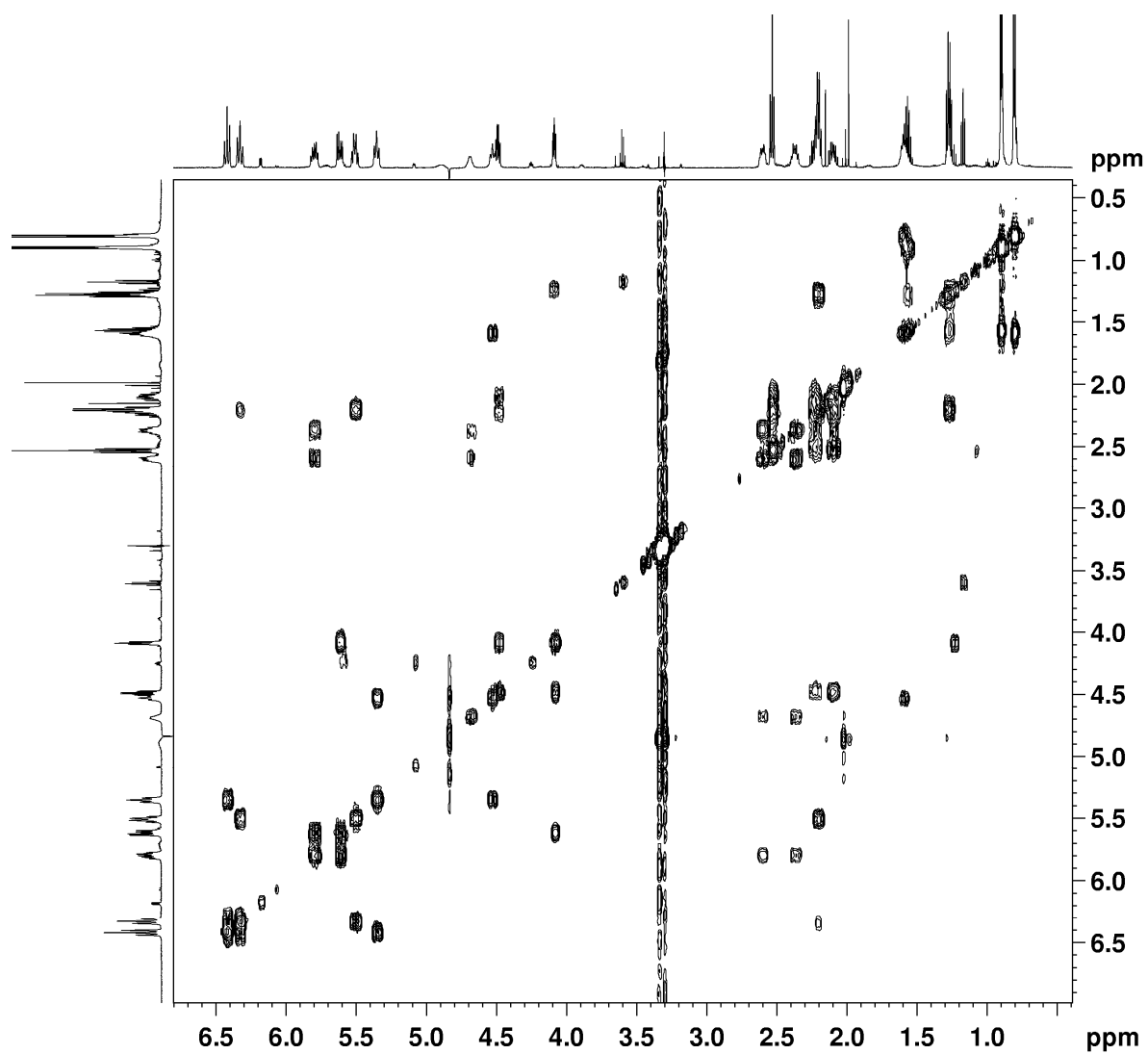


FIGURA 4.109 – Mapa de contorno gCOSY da fração B7aGP.

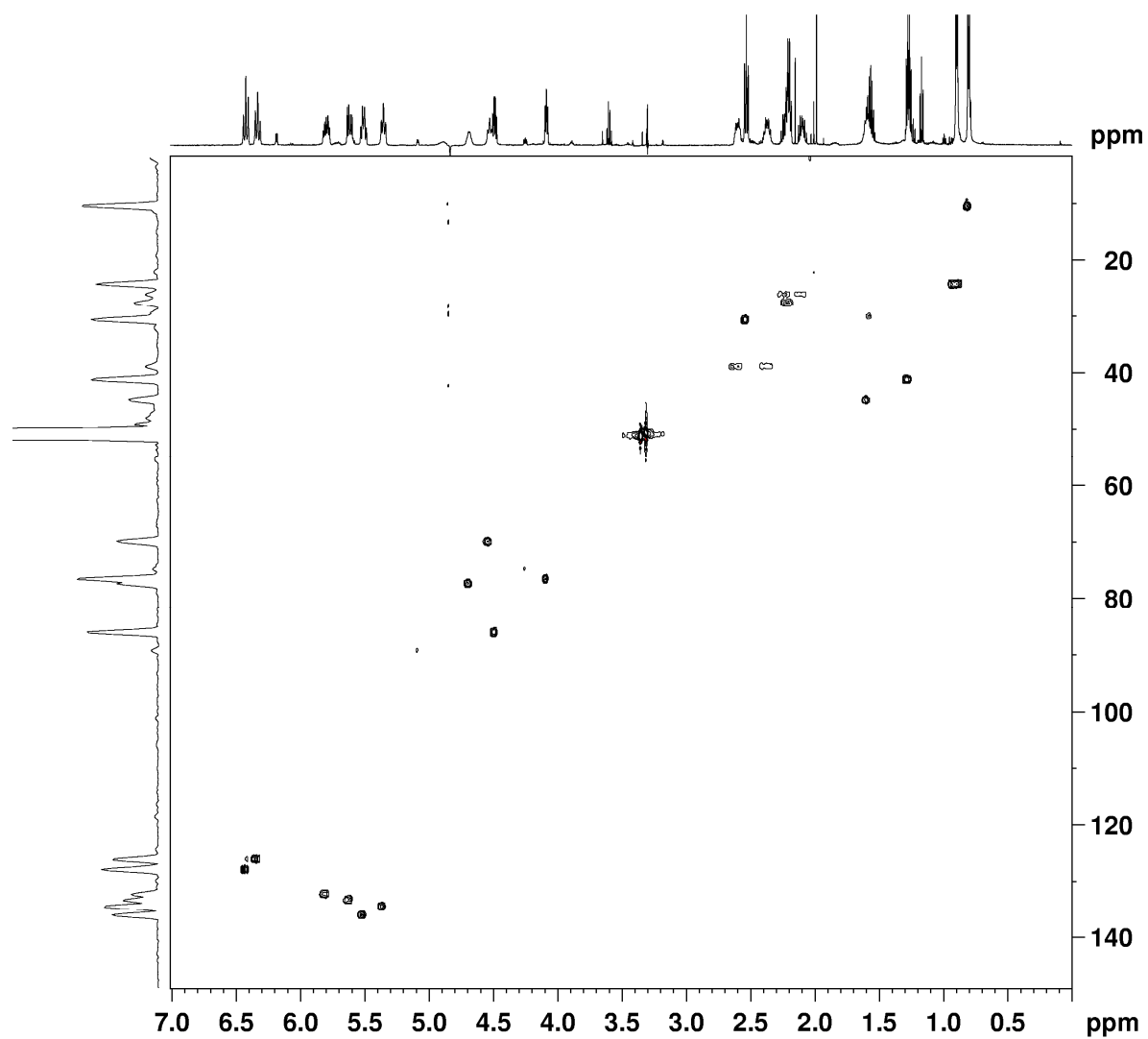


FIGURA 4.110 – Mapa de contorno gHSQC da fração B7aGP.

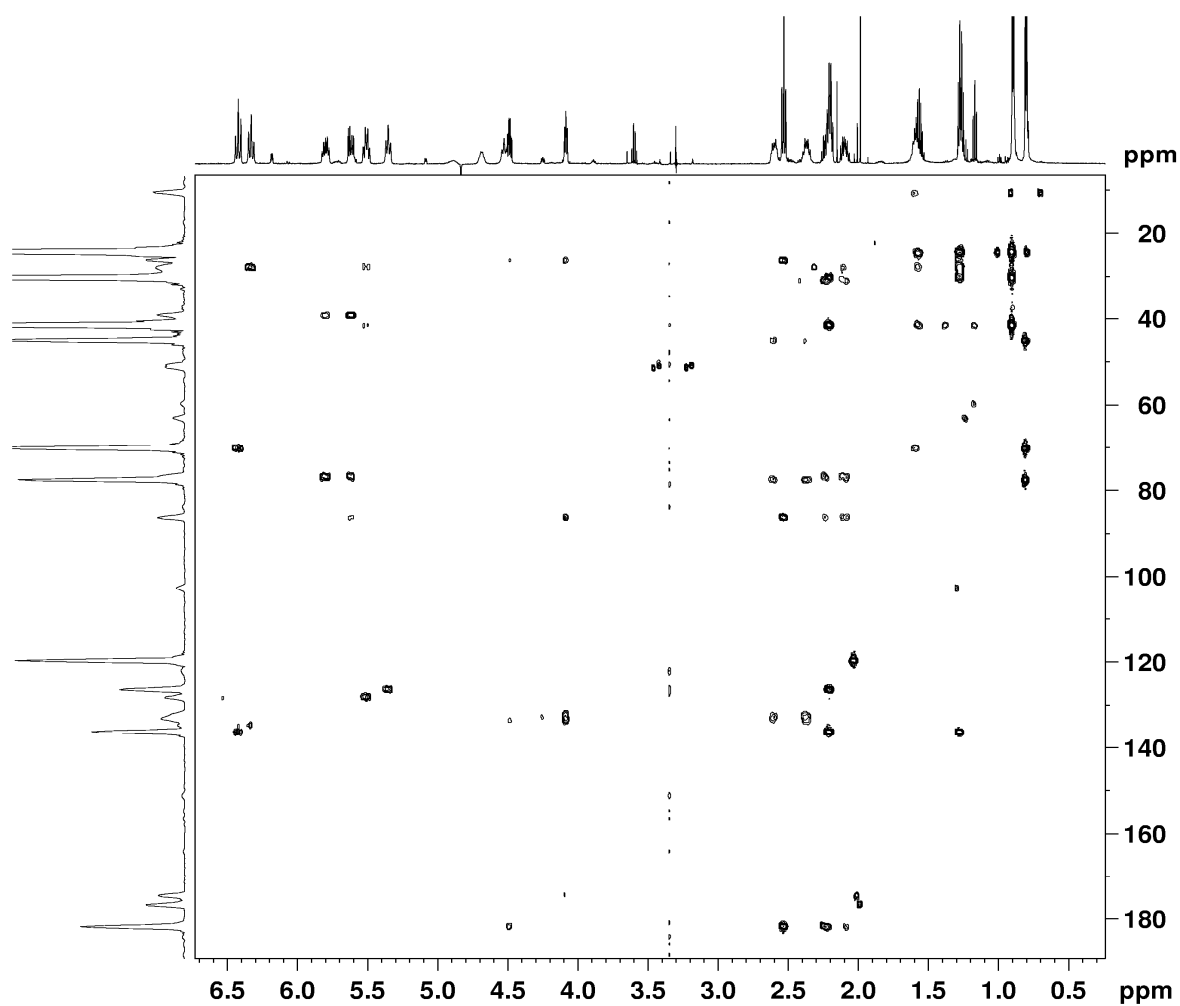
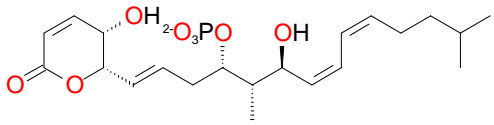
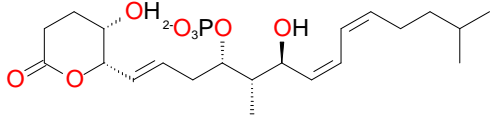


FIGURA 4.111 – Mapa de contorno gHMBC da fração B7aGP.

4.3.10 - Nomenclatura e proposta biogenética para os policetídeos fosfatados inéditos

Os dois policetídeos inéditos receberam nomes baseados no sistema de nomenclatura IUPAC, assim como seus respectivos nomes triviais. Essas informações foram arranjadas na TABELA 4.16.

TABELA 4.16 - Estruturas e nomenclatura dos policetídeos identificados.

Estrutura	Nome IUPAC	Nome trivial
 <p>Fração B7bGP</p>	5-hidróxi-6-(6-hidróxi-5,13-dimetil-4-fosfonóxi-tetradec-1,7,9-trienil)-5,6-dihidro-2H-piran-2-ona	Thomasicina A
 <p>Fração B7aGP</p>	5-hidróxi-6-(6-hidróxi-5,13-dimetil-4-fosfonóxi-tetradec-1,7,9-trienil)-tetrahidro-2H-piran-2-ona	Thomasicina B

Essas novas estruturas pertencem a uma limitada classe de compostos, biossintetizados através da via do acetato, exclusivamente produzidos por estreptomicetos. Os metabólitos pertencentes a esta classe de substâncias apresentam pronunciada atividade de inibição da enzima serina/treonina proteína fosfatase (PP2A) (LEWY et al., 2002). Os compostos, com cadeias carbônicas semelhantes, já relatadas são: sultriecina (**53**) (OHKUMA et al., 1992), fostriecina (**54**) (TUNAC et al., 1983); citostatina (**55**) (AMEMIYA et al., 1994), fosfolina (**56**) (OZASA et al., 1989), leustroducsina (**57**) (KOHAMA et al., 1993) e foslactomicinas (**58**) (FUSHIMI et al., 2009; FOTSO et al., 2013) (FIGURA 4.112).

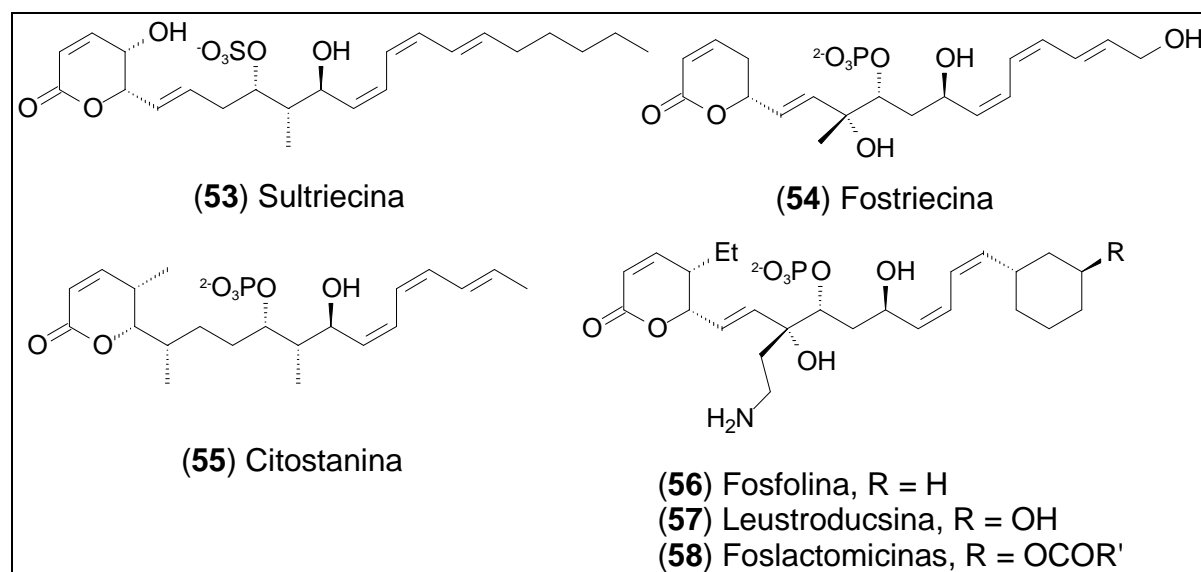


FIGURA 4.112 – Fórmulas estruturais do policetídeos naturais produzidos por *Streptomyces* sp.

A partir da análise por retrobiogênese do composto thomasicina A é possível identificar a cadeia policetílica que deu origem a essa substância, por unidades de acetato. O carbono (C1) é oxidado, e provavelmente estava conectado diretamente à coenzima A (HSCoA) formando um tioéster. A partir daí é possível verificar que os átomos de carbono intercalam entre não-oxidado e oxidado. C17 seria um carbono oxidado, o que leva a conclusão que esta biossíntese tenha começado a partir de uma unidade de isobutiril-CoA, conforme está identificado na FIGURA 4.113. Embora, C4 originalmente não deveria estar ligado a uma hidroxila, esta é uma posição facilmente oxidada por se tratar de um átomo de carbono vizinho a um sistema de carbonila α , β insaturada. O grupo metila no átomo de carbono C10, provavelmente foi inserido por substituição nucleofílica com S-adenosilmetionina (S.A.M.) em uma etapa após a formação da cadeia policetílica (CLAYDEN et al., 2012).

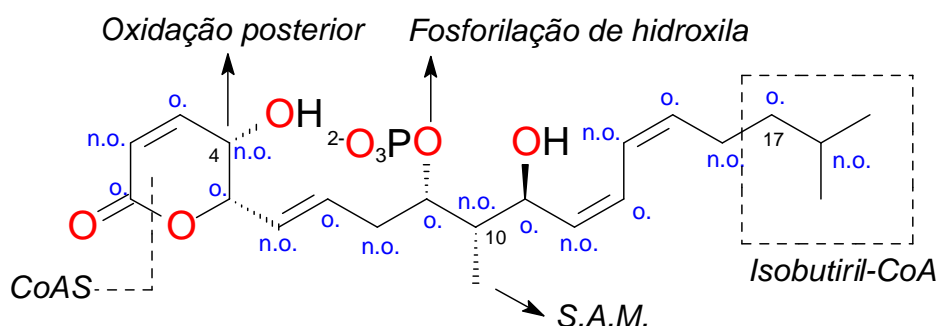


FIGURA 4.113 – Retrobiogênese do composto thomasicina A. o. = carbono oxidado; n.o. = carbono não oxidado.

Dessa forma, uma unidade de isobutiril-CoA condensaria com uma unidade de acetil-CoA. Na sequência a carbonila cetônica seria reduzida a álcool e eliminada na forma de água originando uma ligação dupla que poderia ser reduzida a uma cadeia carbônica originando a cauda hidrofóbica da substância, conforme pode ser visualizado na FIGURA 4.114. Posteriormente, esse intermediário condensaria com mais sete unidades de acetil-CoA, originando assim uma cadeia policetílica. Nesta etapa deve ocorrer a metilação da posição C10. As carbonilas em C13 e C15 sofreriam redução, seguida de eliminação de água originando o dieno conjugado *cis* nessa posição da estrutura. A carbonila na posição C7 também sofreria esse mesmo processo, entretanto, daria origem a uma ligação dupla *trans*. As carbonilas C3, C5, C9 e C12 seriam todas reduzidas à função álcool, entretanto,

a hidroxila da posição C9 seria fosforilada com adenosil trifosfato (ATP). Em seguida, a hidroxila posicionada no carbono C5 promoveria um ataque nucleofílico à carbonila do tioéster na posição C1, que, por substituição acílica, liberaria a coenzima A (HSCoA). Assim, a lactona cíclica seria formada e a eliminação da hidroxila na posição C2 ocorreria facilmente por E1cB. A oxidação do carbono na posição C4 pode ocorrer facilmente originando o composto thomasicina A. Aparentemente a thomasicina B é apenas a forma reduzida na posição C2-C3 da thomasicina A (CLAYDEN et al., 2012).

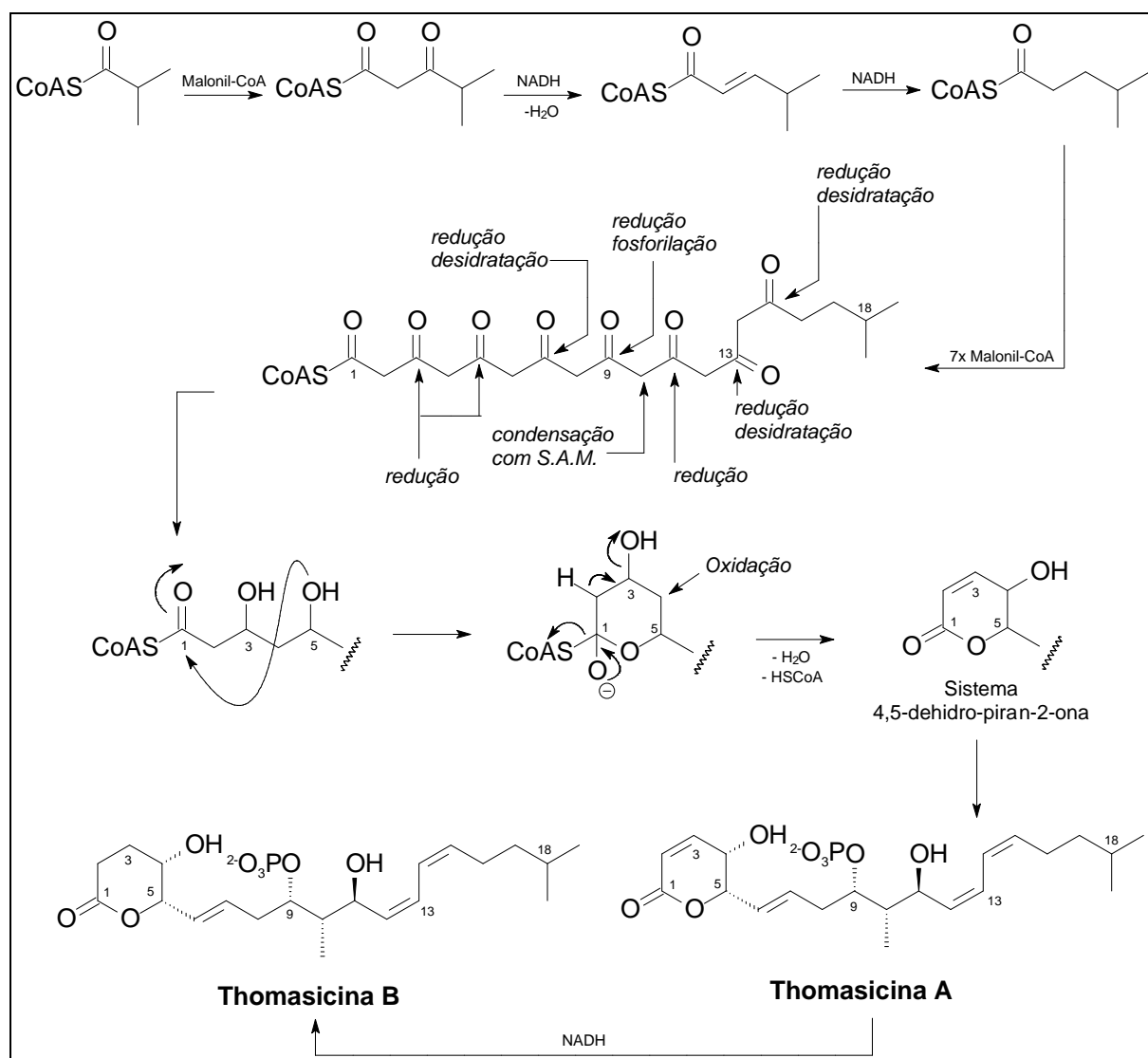


FIGURA 4.114 – Proposta biogenética para formação dos compostos thomasicina A e B.

4.3.11 - “*Time-slice*” do extrato butanólico

Na sequência, foi feita uma tentativa de identificar compostos que não tenham absorção no UV, por “*Time slice*”. Nesse modo de operação, o cromatograma é seccionado em intervalos de 15 segundos e essas secções são enviadas para diferentes cartuchos de SPE, por várias corridas cromatográficas consecutivas. Assim, foi desenvolvido um método específico para trabalhar nessas condições, em que a separação não foi monitorada por UV. Apenas optou-se por começar a corrida cromatográfica com 30% de solvente orgânico (metanol) uma vez que a fase estacionária do cartucho selecionado para esse teste foi a *General Phase* (HysphereTM-resin). O volume de injeção foi de 20 µL, foi usado um fluxo de 1,0 mL/min, monitorando o comprimento de onda de 254 nm com o eluente A (H₂O mili Q) e o eluente B (Metanol). Após a eluição cromatográfica foi realizada a limpeza da coluna com 100 % de B por 5 minutos acompanhados por retorno do gradiente em 5 minutos (100-30% de B). A coluna foi condicionada por 5 minutos, totalizando 41 minutos por análise. O resultado pode ser vista na FIGURA 4.115, que mostra o cromatograma resultante.

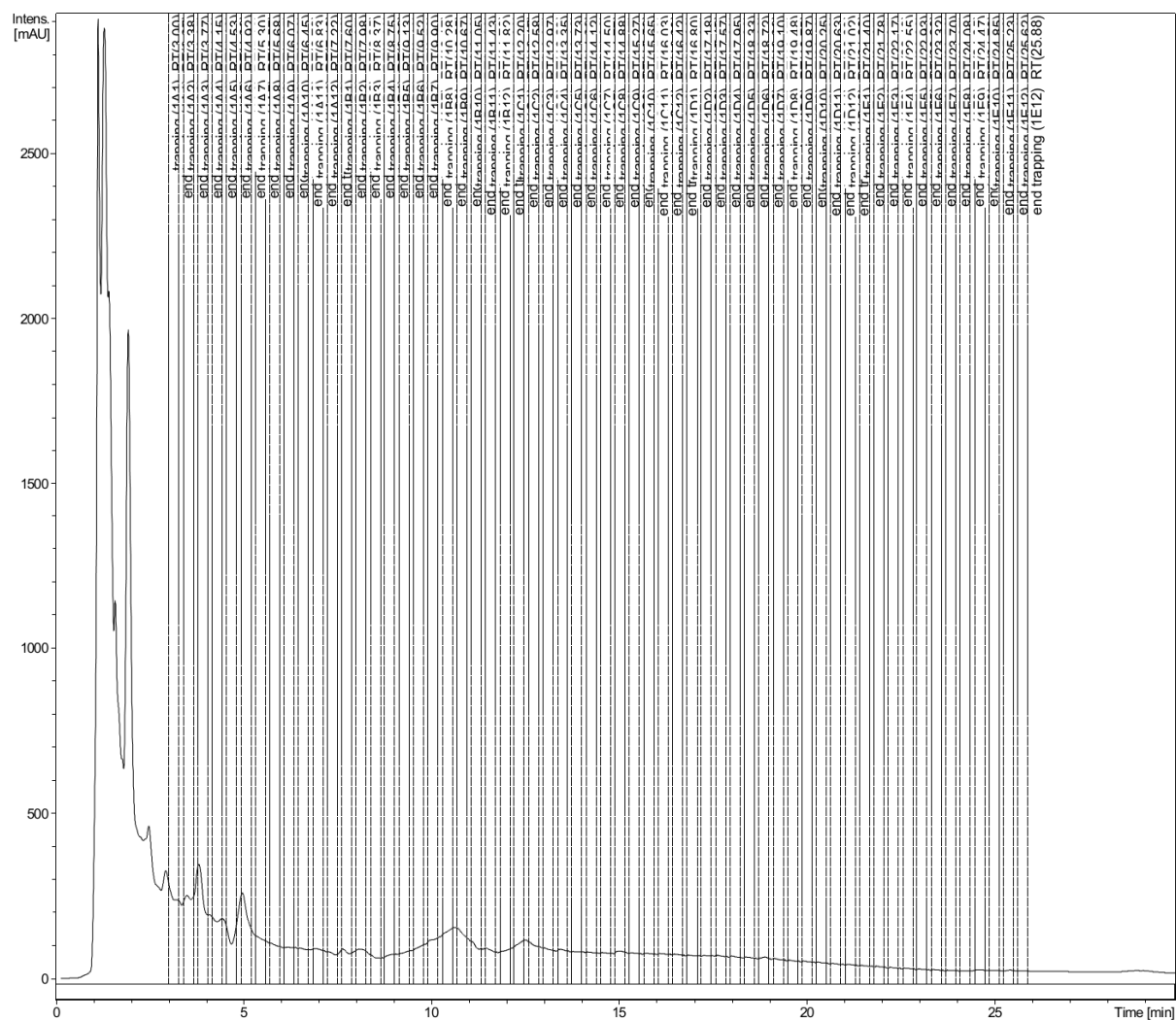


FIGURA 4.115 - Cromatograma ($\lambda 254$) do extrato butanólico (B) do caldo de fermentação da bactéria *S. cebimarensis* SS99BA-2. *Time-slice*. Eluente A (H_2O mili Q) e o eluente B (Metanol). Eluição isocrática nos 3 minutos iniciais (30% de B / 70% de A), eluição gradiente 30-80 % de B durante 23 minutos.

Foram realizadas 30 corridas cromatográficas consecutivas, gerando 60 (sessenta) amostras, que foram analisadas individualmente por espectrometria de RMN de 1H . Os resultados em geral mostraram espectros de baixa relação sinal-ruído e mistura grande de compostos. Os espectros somente apresentaram sinais a partir da 64^a promediação. Provavelmente esses resultados estejam relacionados ao fato de que o HPLC utilizado não possui controle de temperatura, e dessa forma o tempo de retenção (tr) não é reprodutível a ponto de enviar sempre as mesmas frações para os mesmos cartuchos durante trinta corridas sucessivas, o que acabou por gerar dados não conclusivos. E ainda, como não houve compromisso com a

otimização da seletividade na separação cromatográfica, isso também é um agravante para a baixa qualidade dos dados obtidos.

4.4 - Análise do extrato aquoso

Embora o extrato aquoso (A) seja o menos interessante de acordo com testes de atividade biológica e citotóxica realizados, aproximadamente 3 mg desse extrato seco foram dissolvidos em 1,5 mL de uma mistura 1/1 de água mili-Q/metanol. A solução foi submetida à filtração por filtro de membrana (PVDF) e encaminhada à análise por HPLC. Assim, foi desenvolvido um método específico: volume de injeção 20 µL, fluxo de 1,0 mL/min, monitorando o comprimento de onda de 300 nm, eluente A (H₂O mili Q, 0,05% de TFA), eluente B (Metanol, 0,05% de TFA). Após a eluição cromatográfica foi realizada a limpeza da coluna com 100 % de B por 5 minutos acompanhados por retorno do gradiente em 5 minutos (100-20% de B). A coluna foi condicionada por 5 minutos, totalizando 50 minutos por análise. O resultado pode ser vista na FIGURA 4.116, que mostra o cromatograma resultante contendo as bandas cromatográficas identificadas como A1 (tr = 5,82 min), A2 (tr = 16,65 min), A3 (tr = 20,66 min), A4 (tr = 26,33 min), A5 (tr = 27,85), A6 = (tr = 29,23 min) e A7 (tr= 30,85 min).

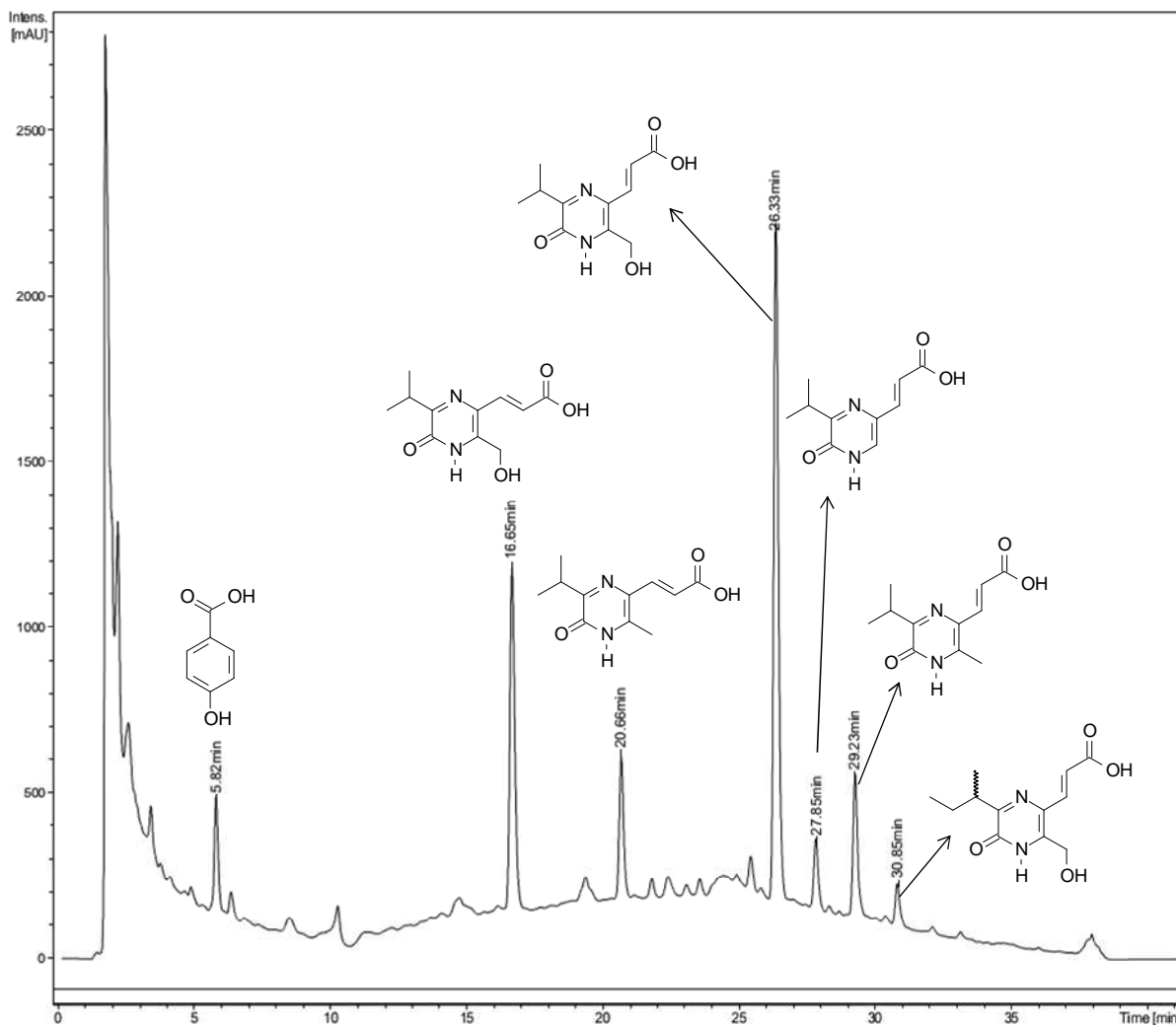


FIGURA 4.116 - Cromatograma ($\lambda 210$) do extrato aquoso (A) do caldo de fermentação da bactéria *S. cebimarensis* SS99BA-2 com as estruturas das substâncias identificadas por espectro de RMN de ^1H . Eluente A (H_2O mili Q, 0,05% de TFA), eluente B (Metanol, 0,05% de TFA). Eluição isocrática nos 7 minutos iniciais (20% de B / 70% de A), eluição gradiente 20-65 % de B durante 28 minutos.

Essas frações foram adsorvidas em cartuchos de fase estacionária *General Phase* (HysphereTM-resin) durante 30 corridas cromatográficas consecutivas. Apenas por espectroscopia de RMN de ^1H foi possível identificar os compostos majoritários dessas frações, pois eles já haviam sido identificados em maior quantidade nos extratos analisados anteriormente: A1 (ácido 4-hidróxibenzóico), A2 (conformação 2 da giovaninona A), A3 (conformação 2 da giovaninona C), A4 (giovaninona A), A5 (giovaninona B), A6 (giovaninona C) e A7 (giovaninona D).

4.5 - Novo cultivo

Uma vez que o composto presente em maior quantidade na fração B5GP não foi completamente elucidado, optou-se por realizar um novo cultivo da bactéria *S. cebimarensis* com o objetivo de adquirir maior quantidade dessa substância e realizar outros experimentos bidimensionais necessários para a determinação final da estrutura. Entretanto, o caldo de fermentação apresentou problemas de contaminação seis vezes consecutivas, sem que a origem dessa contaminação fosse adequadamente rastreada. A contaminação ocorria sempre na etapa de produção, quando o caldo de fermentação se tornava ralo, uma característica não compatível com caldos de fermentação de estreptomicetos.

Por fim, na sétima tentativa, houve crescimento da bactéria e o caldo de fermentação apresentou características compatíveis com caldos de estreptomicetos, ou seja, mais espesso. Esse caldo de fermentação foi submetido ao processo de centrifugação, extração líquido – líquido, com n-butanol, e secagem. O novo extrato butanólico (NB) foi analisado por HPLC através do seguinte método: volume de injeção 20 µL, fluxo de 1,0 mL/min, monitorando o comprimento de onda de 210 nm, eluente A (H₂O mili Q, 0,05% de TFA), eluente B (Metanol, 0,05% de TFA). Após a eluição cromatográfica foi realizada a limpeza da coluna com 100 % de B por 5 minutos acompanhados por retorno do gradiente em 5 minutos (100-35% de B). A coluna foi condicionada por 5 minutos, totalizando 37 minutos por análise. O resultado pode ser visto na FIGURA 4.117, que mostra o cromatograma resultante contendo as bandas cromatográficas identificadas como NB1 (tr = 6,48 min), NB2 (tr = 7,45 min), NB3 (tr = 7,75 min), NB4 (tr = 9,66 min), NB5 (tr = 10,90), NB6 = (tr = 14,81 min), NB7 = 15,91 min), NB8 (tr = 17,70 min), NB9 (tr = 19,03 min) e NB 10 (tr = 20,12 min).

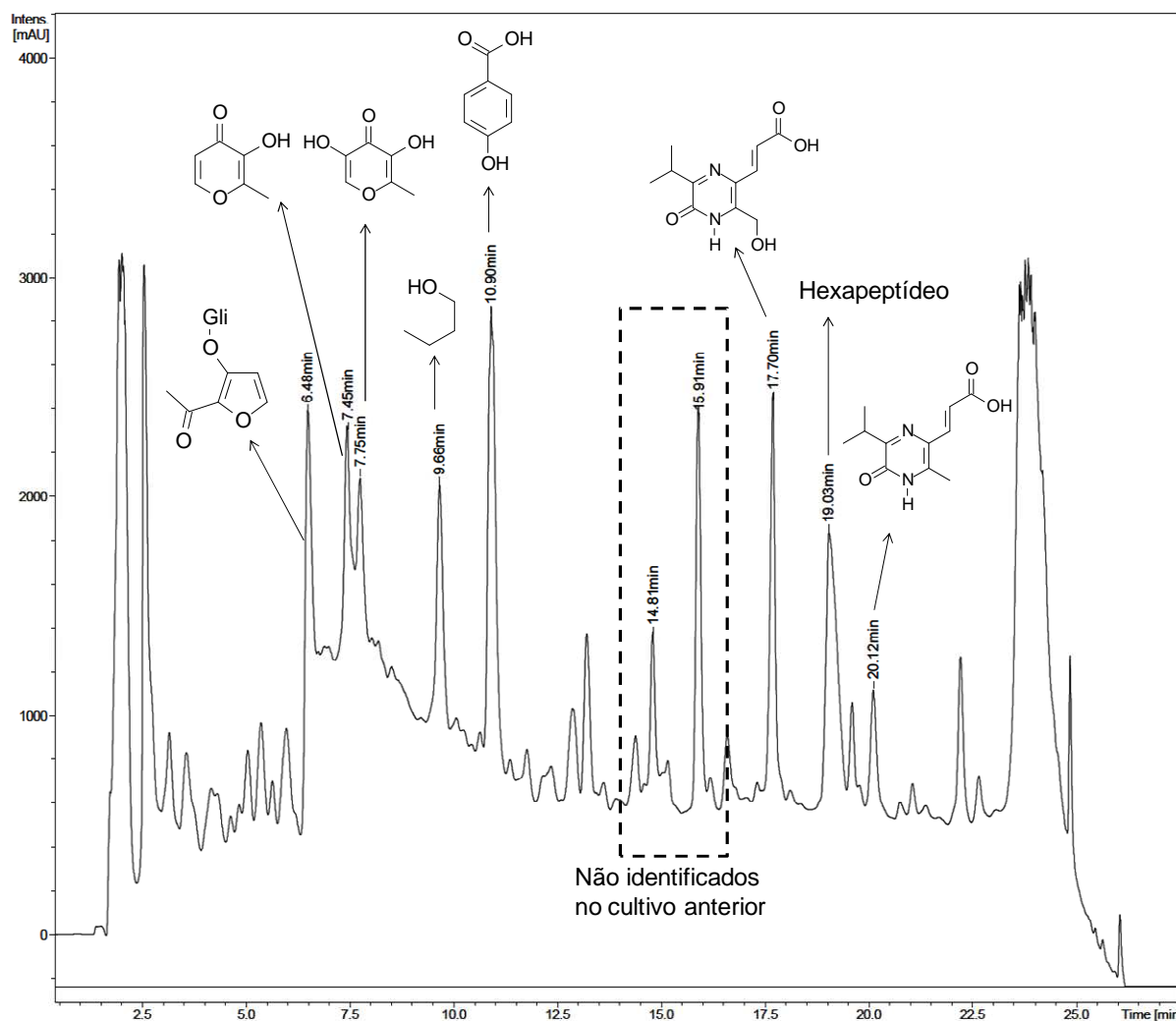


FIGURA 4.117 – Cromatograma ($\lambda 210$) do extrato butanólico do novo caldo de fermentação (NB) da bactéria *S. cebimarensis* SS99BA-2 com as estruturas das substâncias identificadas por espectro de RMN de ^1H . Eluente A (H_2O mili Q, 0,05% de TFA), eluente B (Metanol, 0,05% de TFA). Eluição isocrática nos 5 minutos iniciais (5% de B / 95% de A), eluição gradiente 5-53 % de B durante 17 minutos.

Essas frações foram adsorvidas em cartuchos de fase estacionária *General Phase* (HysphereTM-resin) durante 30 corridas cromatográficas consecutivas. Apenas por espectroscopia de RMN de ^1H foi possível identificar parte dos compostos: NB1 (2-acetil-3-hidróxifuran-3-O- α -D-glicopiranosídeo), NB2 (maltol), NB3 (5-hidróximaltol), NB4 (butanol, identificado também por *g*COSY, *g*HSQC e *g*HMBC), NB5 (ácido *p*-hidróxibenzóico), NB8 (giovaninona A) e NB 10 (giovaninona B), conforme ilustrado na FIGURA 4.117. A fração NB9 é o hexapeptídeo, entretanto, as condições adequadas para a melhor retenção desse composto ainda não foram encontradas, o que ainda não permitiu a completa

elucidação estrutural da substância. Ainda, os compostos presentes nas frações NB6 e NB7 não haviam sido encontrados no primeiro cultivo. Na sequência, será discutida a elucidação estrutural dessas substâncias.

4.5.1 - Fração NB6

A análise da banda cromatográfica NB6, que não existia no cromatograma feito a partir do primeiro cultivo, por espectrometria de massa, mostrou o pico $[M+H]^+$ m/z 585,4, equivalente à molécula protonada, conforme a FIGURA 4.118. Essa relação massa/carga indicou a fórmula molecular $C_{27}H_{48}N_6O_8$.

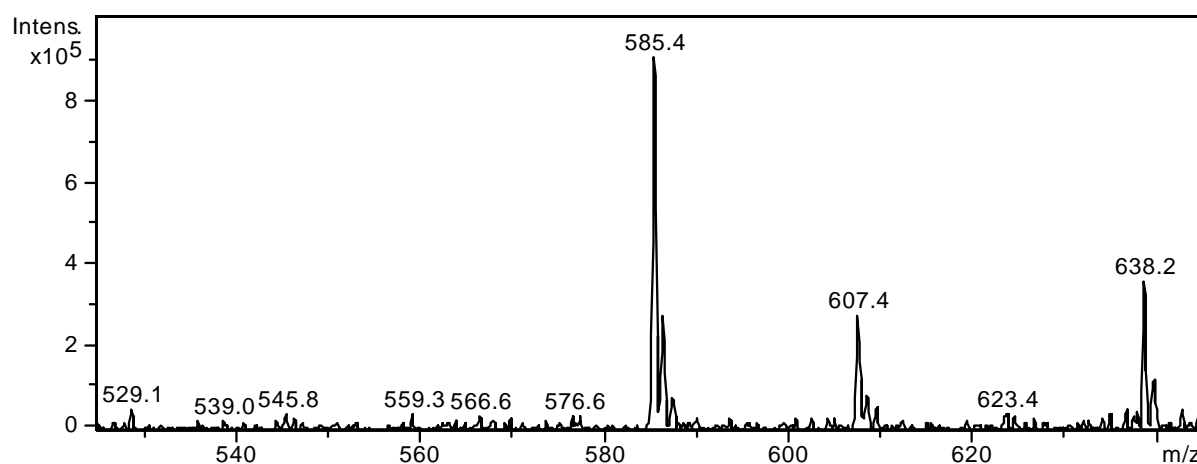


FIGURA 4.118 – Espectro de Massa (*Full scan*) via *Electrospray* modo positivo para fração NB6.

Através da inspeção do espectro de RMN de 1H , verificou-se um tripleto em δ_H 3,61 (4H, H5, H14, t), e mais dois tripletos que se sobrepuseram parcialmente, um em δ_H 3,16 (4H, H23, H27, t) e δ_H 3,15 (4H, H9, H18, t), outro tripleto em δ_H 2,78 (4H, H3, H12, t) e mais um tripleto em δ_H 2,47 (4H, H2, H11, t) que se sobrepôs à um simpleto com o mesmo deslocamento químico de δ_H 2,47 (4H, H20, H21, s). Na região mais blindada do espectro, é possível visualizar um multipletto em δ_H 1,61-1,66 (4H, H6, H15, m), um multipletto em δ_H 1,47-1,55 (8H, H8, H17, H24, H26, m) e um multipletto em δ_H 1,28-1,39 (6H, H7, H16, H25). Esses dados podem ser visualizados na FIGURA 4.119.

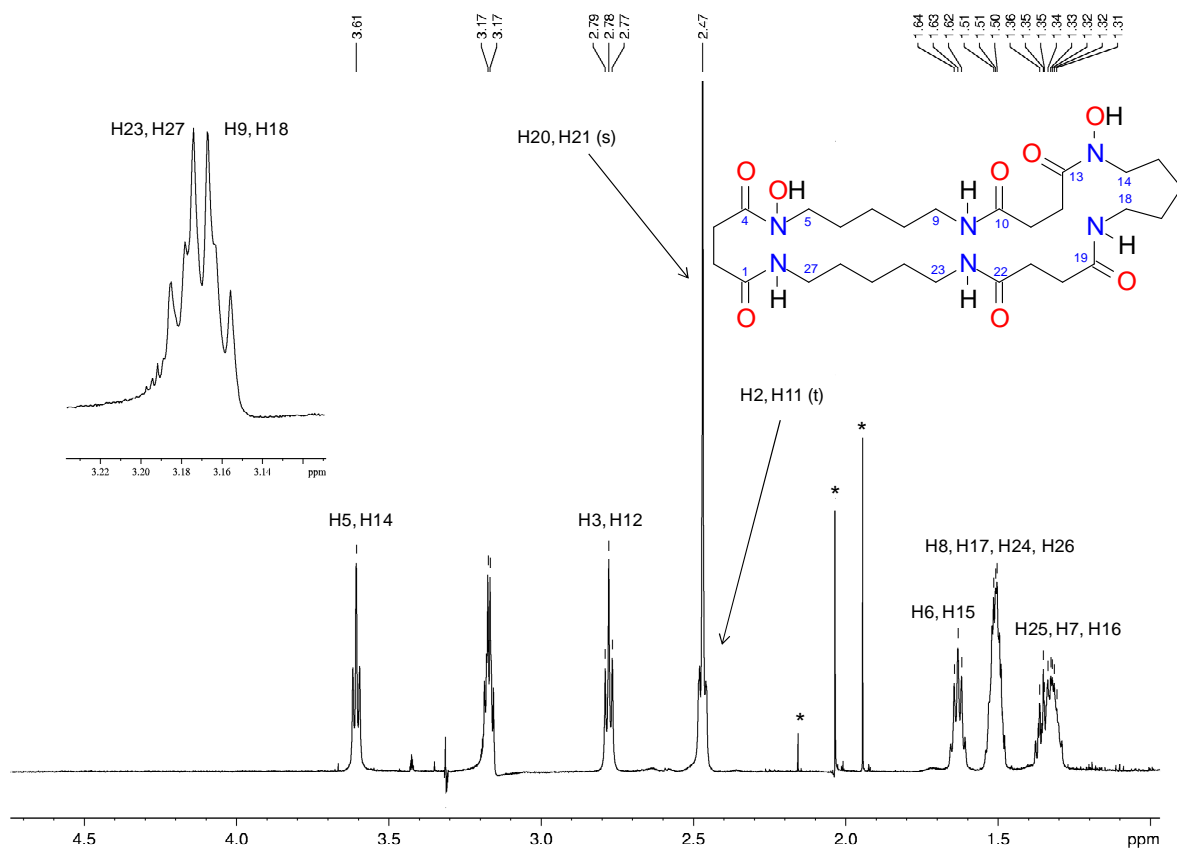


FIGURA 4.119 – Espectro de RMN de ¹H da fração NB6. * - Impurezas.

Uma inspeção detalhada dos mapas de contorno bidimensionais de *g*COSY (FIGURA 4.120) e *g*HSQC (FIGURA 4.121) mostrou que os hidrogênios H3, H12 (δ_C 28,9 atribuído por *g*HSQC) apresentam correlação homonuclear ¹H-¹H com H2, H11 (δ_C 31,6 atribuído por *g*HSQC). Isso revelou a presença de duas unidades de succinil (COCH₂CH₂CO). Já os hidrogênios H7, H16, H25 (δ_C 24,9 e 24,6 atribuídos por *g*HSQC) apresentaram correlação *g*COSY com H8, H17, H24, H26 (δ_C 29,9 atribuído por *g*HSQC) e também com H6, H15 (δ_C 27,2 atribuído por *g*HSQC). Ainda, H8, H17, H24, H26 apresentaram correlação *g*COSY com H23, H27, H9, H18 (δ_C 40,2 atribuído por *g*HSQC) e H6, H15 correlacionaram com H5, H14 (δ_C 48,6 atribuído por *g*HSQC). Isso indica a presença de três unidades de cadaverina (NCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂N) na molécula.

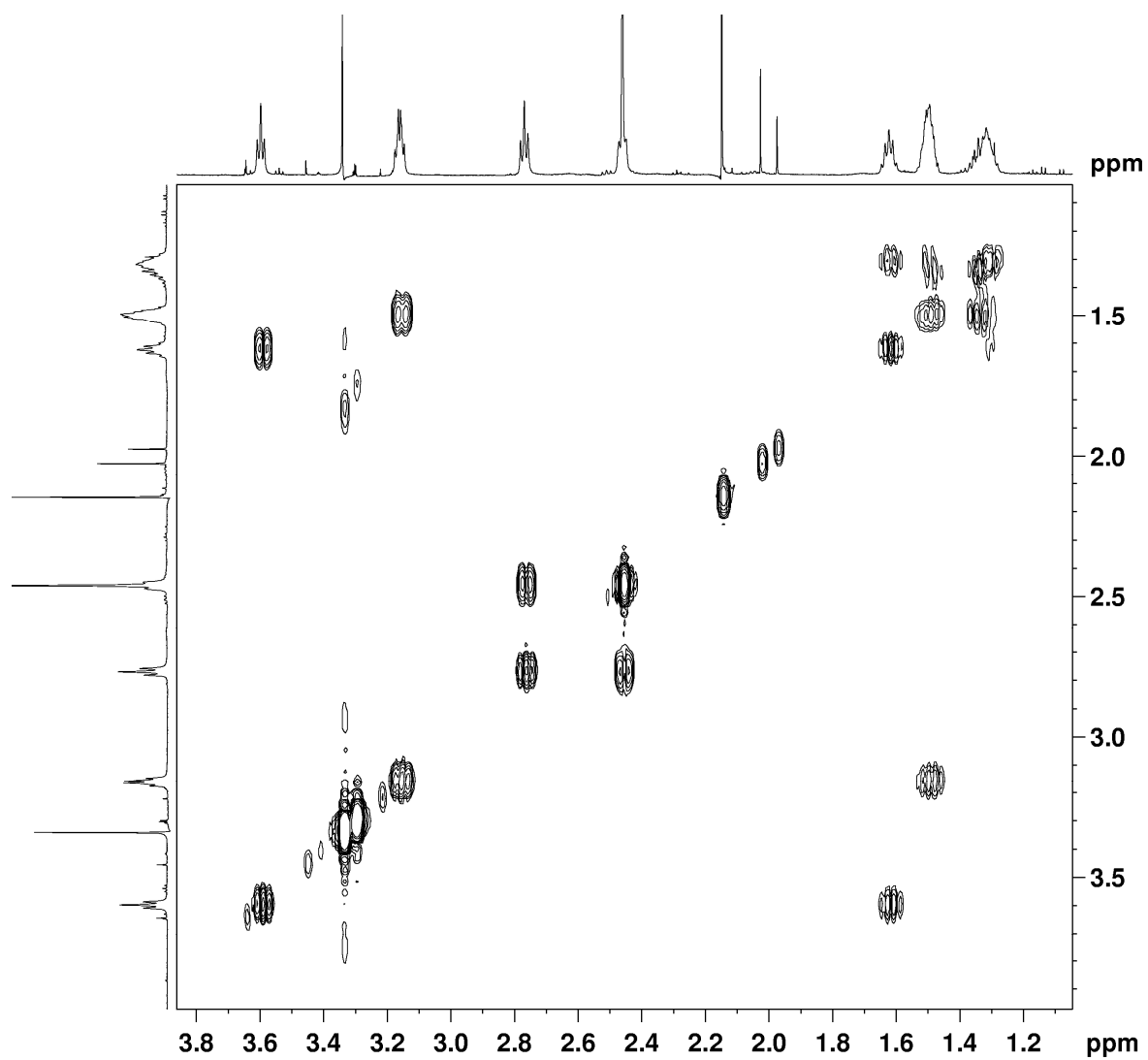


FIGURA 4.120 – Mapa de contorno gCOSY da fração NB6.

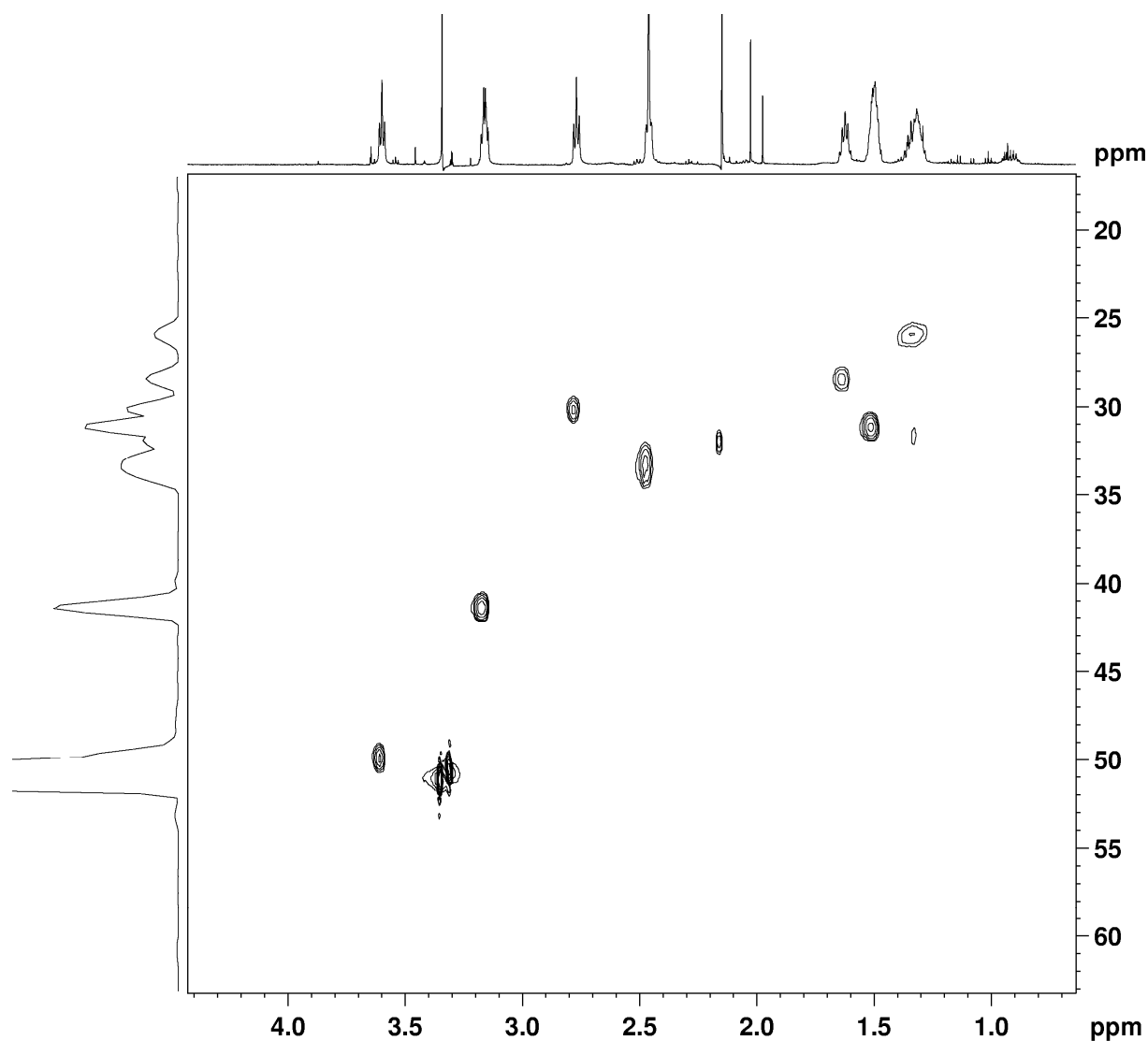


FIGURA 4.121 – Mapa de contorno gHSQC da fração NB 6.

Por inspeção ainda do espectro de RMN de ^1H , verifica-se que os deslocamentos químicos dos metilenos terminais de duas unidades de cadaverina são respectivamente δ_{H} 3,61 e 3,16, indicando que elas possuem $-\text{NOH}$ em uma das terminações e $-\text{NH}$ em outra. Enquanto a unidade de cadaverina restante possui terminação $-\text{NH}$ em ambas extremidades. Finalmente, a análise de gHSQC mostrou o acoplamento direto entre o carbono metilênico δ_{C} 32,6 e os hidrogênios que originaram o simpleto (δ_{H} 2,47) que integra para 4 prótons. A análise combinada com gHMBC (FIGURA 4.122) mostrou que essa era na realidade uma unidade de succinil amida ($\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$). Todas essas unidades descritas foram confirmada por gHMBC também.

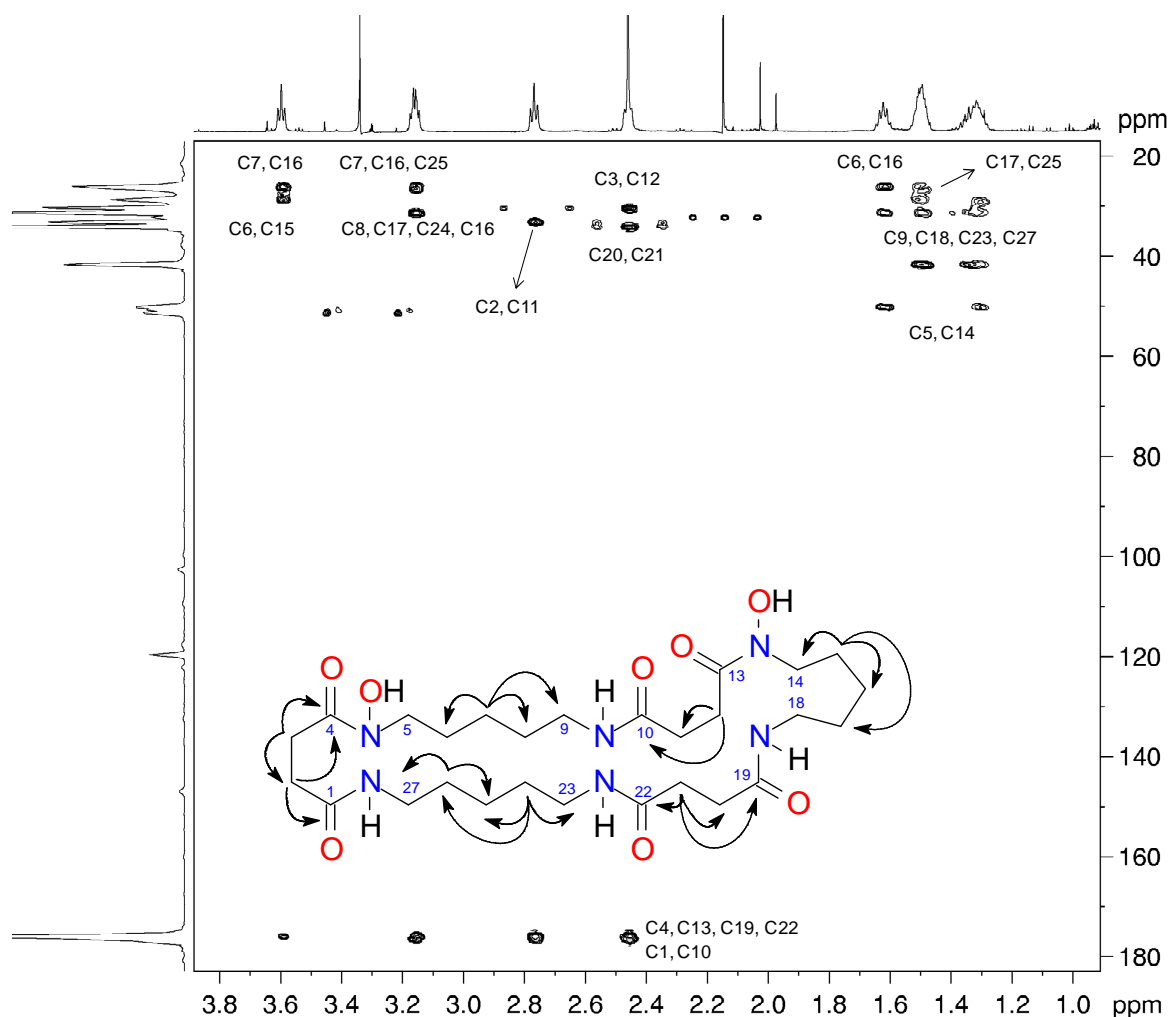


FIGURA 4.122 – Mapa de contorno gHMBC da fração NB6.

Essas informações são suficientes para identificar a substância presente em maior quantidade na fração NB6 como desidróxinocardamina (FIGURA 4.123), isolada e identificada pela primeira vez por LEE et al., 2005. Trata-se de um sideróforo que os micro-organismos produzem para captar íons de ferro (Fe^{3+}), uma vez que eles são utilizados em muitos processos biológicos importantes, e para competir com outros tipos de micro-organismos (MEI-XIAN et al., 2008). Além disso, essa substância possui diversos tipos de atividade biológica (UEKI et al., 2009). Como a bactéria não produziu essa classe de composto no cultivo anterior, mas produziu neste, que só foi bem sucedido após a sétima tentativa, uma das hipóteses que podem ser consideradas, é que este cultivo também estava contaminado, mas de forma que o grau de crescimento do estreptomiceto conseguiu se sobrepôr a qualquer outro micro-organismo existente no meio de cultura. A TABELA 4.17 mostra os dados espectroscópicos coletados para a estrutura da

desidróxinocardamina. Os dados estão compatíveis com valores encontrados na literatura (LEE et al., 2005).

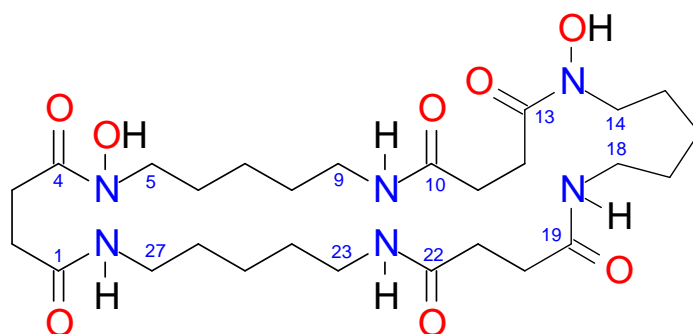


FIGURA 4.123 – Fórmula estrutural da desidróxinocardamina.

TABELA 4.17 – Dados espectroscópicos para o composto majoritário da fração NB6 dehidróxinocardamina (^{13}C , 150MHz; ^1H , 600 MHz, 300 μg em 250 μL de $\text{MeOH-}d_4$).

no.	δ_{C}^*	δ_{H} , <i>mult.</i> (J em Hz)	COSY	HMBC
1	175,0			
2	31,6	2,46, <i>t</i> (6,8)	3	1, 3
3	28,9	2,77, <i>t</i> (6,8)	2	2, 4
4	174,5			
5	48,6	3,60, <i>t</i> (6,3)	6	6, 7
6	27,2	1,61 – 1,66, <i>m</i>	5, 7	5, 7, 8
7	24,6	1,28 – 1,39, <i>m</i>	6, 8	6, 7, 9
8	29,9	1,47 – 1,55, <i>m</i>	7, 9	6, 7, 9
9	40,2	3,15, <i>t</i> (6,3)	8	8, 10
10	175,0			
11	31,6	2,46, <i>t</i> (6,8)	12	10, 12
12	28,9	2,77, <i>t</i> (6,8)	11	11, 13
13	174,5			
14	48,6	3,60, <i>t</i> (6,3)	15	15, 16
15	27,2	1,61 – 1,66, <i>m</i>	14, 16	14, 16, 17
16	24,6	1,28 – 1,39, <i>m</i>	15, 17	15, 16, 18
17	29,9	1,47 – 1,55, <i>m</i>	16, 18	15, 16, 18
18	40,2	3,15, <i>t</i> (6,3)	17	17, 19
19	174,5			
20	32,6	2,46, <i>s</i>	21	19, 21
21	32,6	2,46, <i>s</i>	20	20, 22
22	174,5			
23	48,6	3,60, <i>t</i> (6,3)	24	24, 25
24	27,2	1,61 – 1,66, <i>m</i>	23, 25	23, 25, 26
25	24,6	1,28 – 1,39, <i>m</i>	24, 26	24, 25, 27
26	29,9	1,47 – 1,55, <i>m</i>	25, 27	24, 25, 27
27	40,2	3,15, <i>t</i> (6,3)	26	26, 28

* Dados obtidos por gHSQC e gHMBC.

4.5.2 - Fração NB7

A análise por espectrometria de massa da fração NB7 (FIGURA 4.124), revelou o pico $[M+H]^+$ m/z 601,4, equivalente à molécula protonada. Essa relação massa/carga conduziu à fórmula molecular $C_{27}H_{48}O_9N_6$. Através da inspeção do espectro de RMN de 1H (FIGURA 4.125) verificou-se quatro tripletos referentes à grupos metilênicos em δ_H 3,60 (6H, H5, H14, H23, t), δ_H 3,16 (6H, H9, H18, H27), em δ_H 2,77 (6H, H3, H12, H21) e em δ_H 2,46 (6H, H2, H11, H20). Na região mais blindada do espectro, mais três grupos de hidrogênios metilênicos foram identificados em δ_H 1,54-1,65 (6H, H6, H15, H24, m), em δ_H 1,47-1,54 (6H, H8, H17, H26, m) e em δ_H 1,27-1,35 (6H, H7, H16, H25).

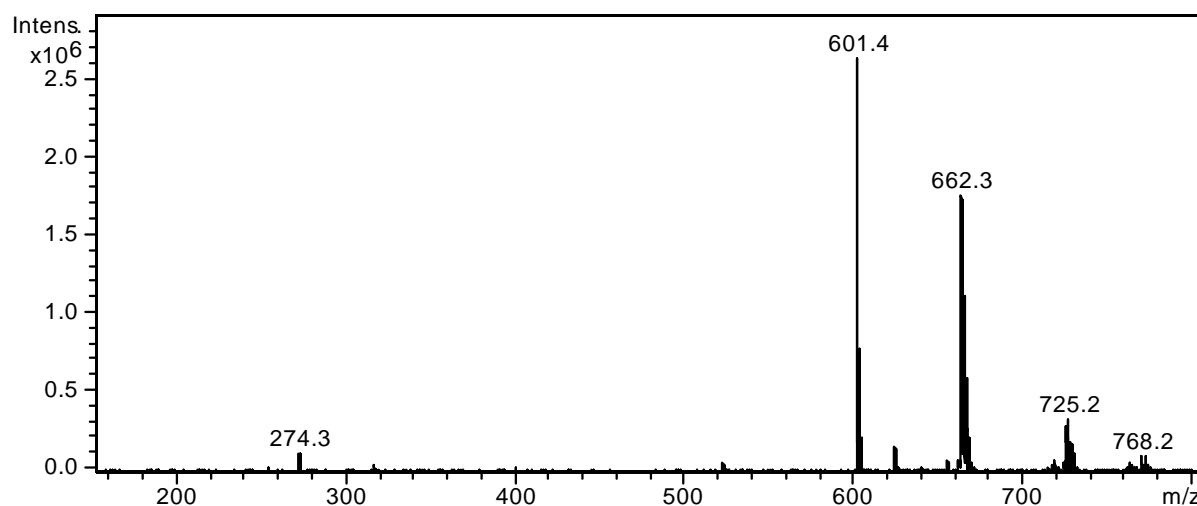


FIGURA 4.124 – Espectro de Massa (*Full scan*) via *Electrospray* modo positivo para fração NB7.

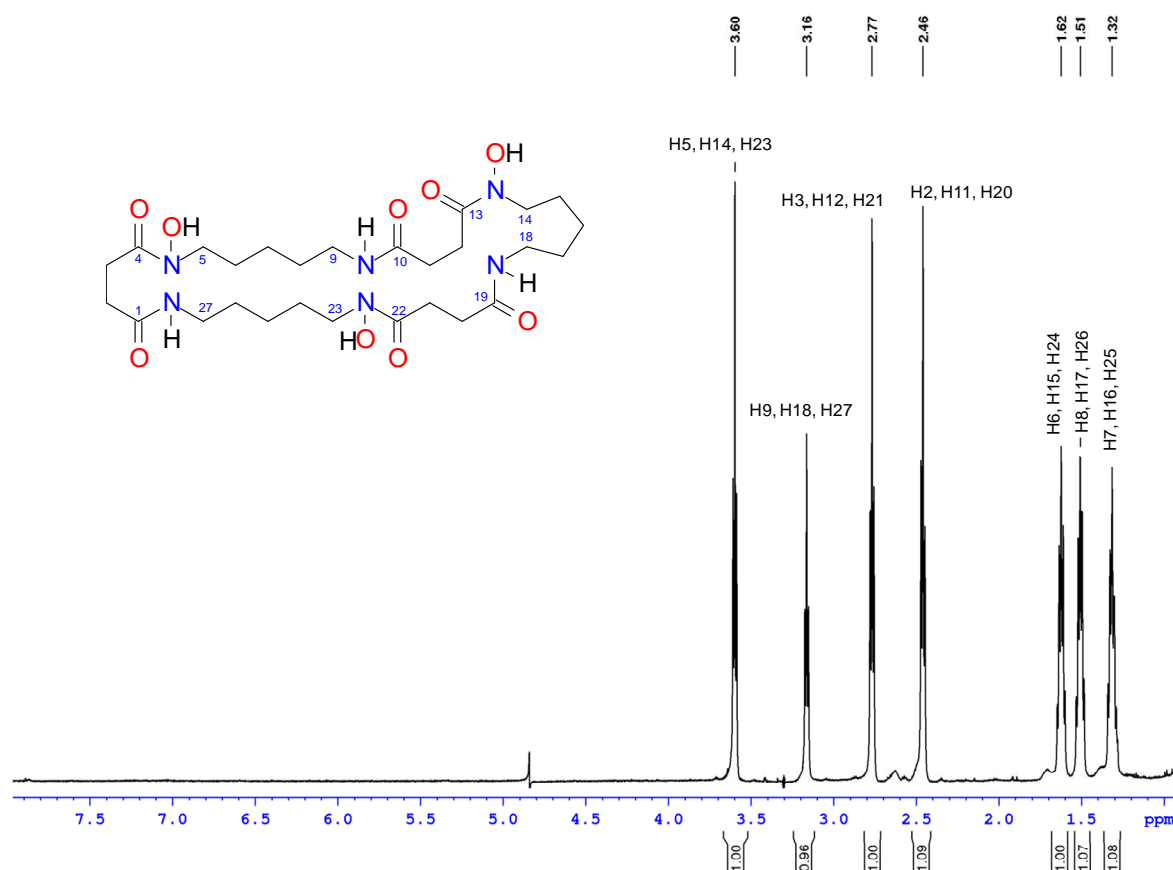


FIGURA 4.125 – Espectro de RMN de ¹H da fração NB7.

A análise dos mapas de contorno bidimensionais *g*COSY (FIGURA 4.126) e *g*HSQC (FIGURA 4.127) mostrou que existe correlação homonuclear ¹H-¹H entre H3, H12, H21 (δ_C 30,0 atribuído por *g*HSQC) e H2, H11, H20 (δ_C 32,7 atribuído por *g*HSQC). A análise por *g*HMBC (FIGURA 4.128) mostrou a correlação desses hidrogênios com os carbonos C1, C10, C19 (δ_C 176,5) e C4, C13, C22 (δ_C 175,9). Esses dados levam a três unidades de succinil (COCH₂CH₂CO). Já os hidrogênios H7, H16, H25 (δ_C 25,7 atribuído por *g*HSQC) apresentaram correlação *g*COSY com H8, H17, H26 (δ_C 31,0 atribuído por *g*HSQC) e também com H6, H15, H24 (δ_C 28,3 atribuído por *g*HSQC). Ainda, H8, H17, H26 apresentaram correlação *g*COSY com H9, H18, H27 (δ_C 41,2 atribuído por *g*HSQC) e H6, H15, H24 correlacionaram com H5, H14, H23 (δ_C 49,7 atribuído por *g*HSQC). Essas correlações, bem como os deslocamentos químicos observados, indicam a presença de três unidades de cadaverina (NCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂N) na molécula. A presença dessas subestruturas foram todas confirmadas por *g*HMBC.

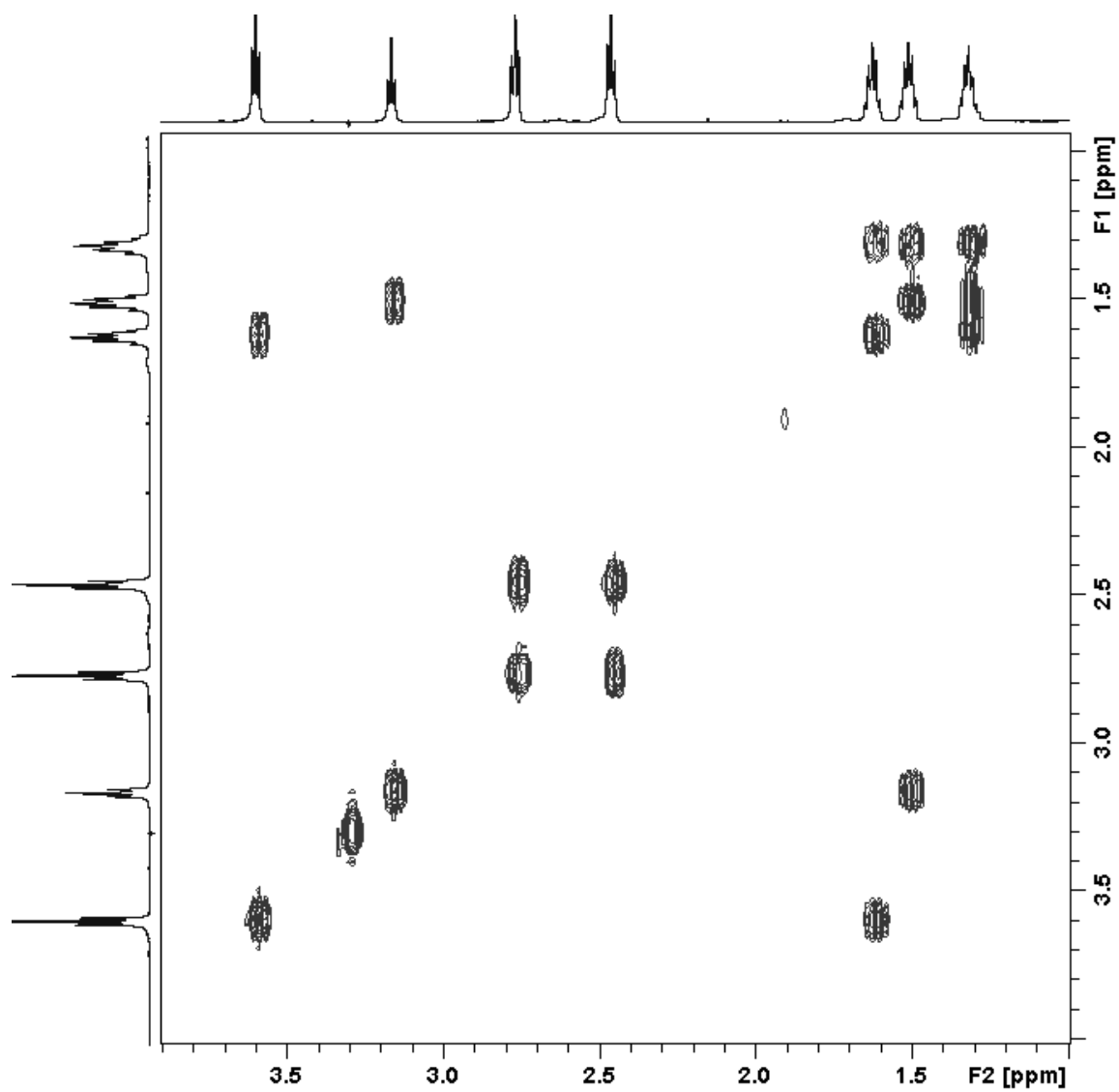


FIGURA 4.126 – Mapa de contorno gCOSY da fração NB7.

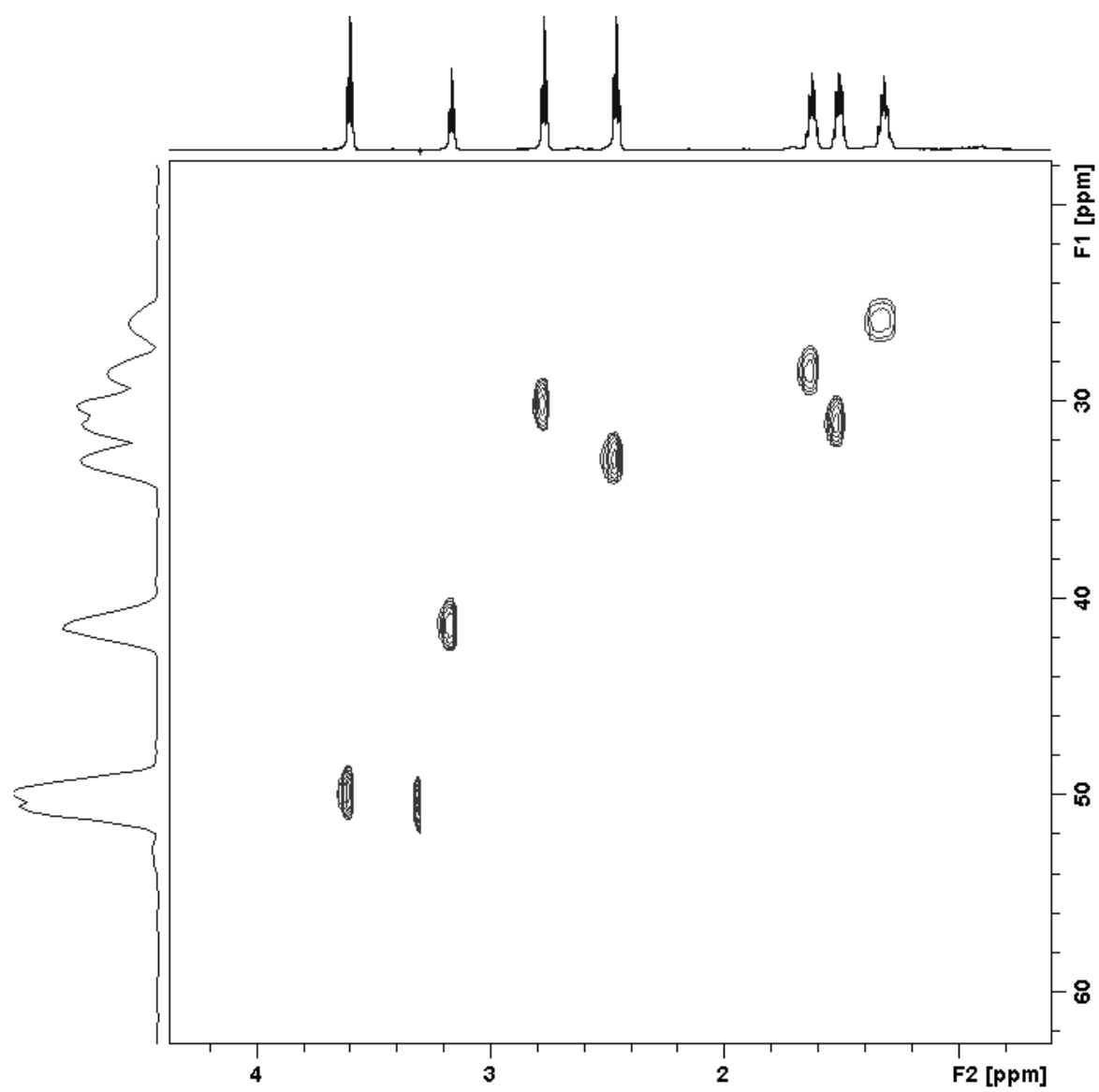


FIGURA 4.127 – Mapa de contorno gHSQC da fração NB7.

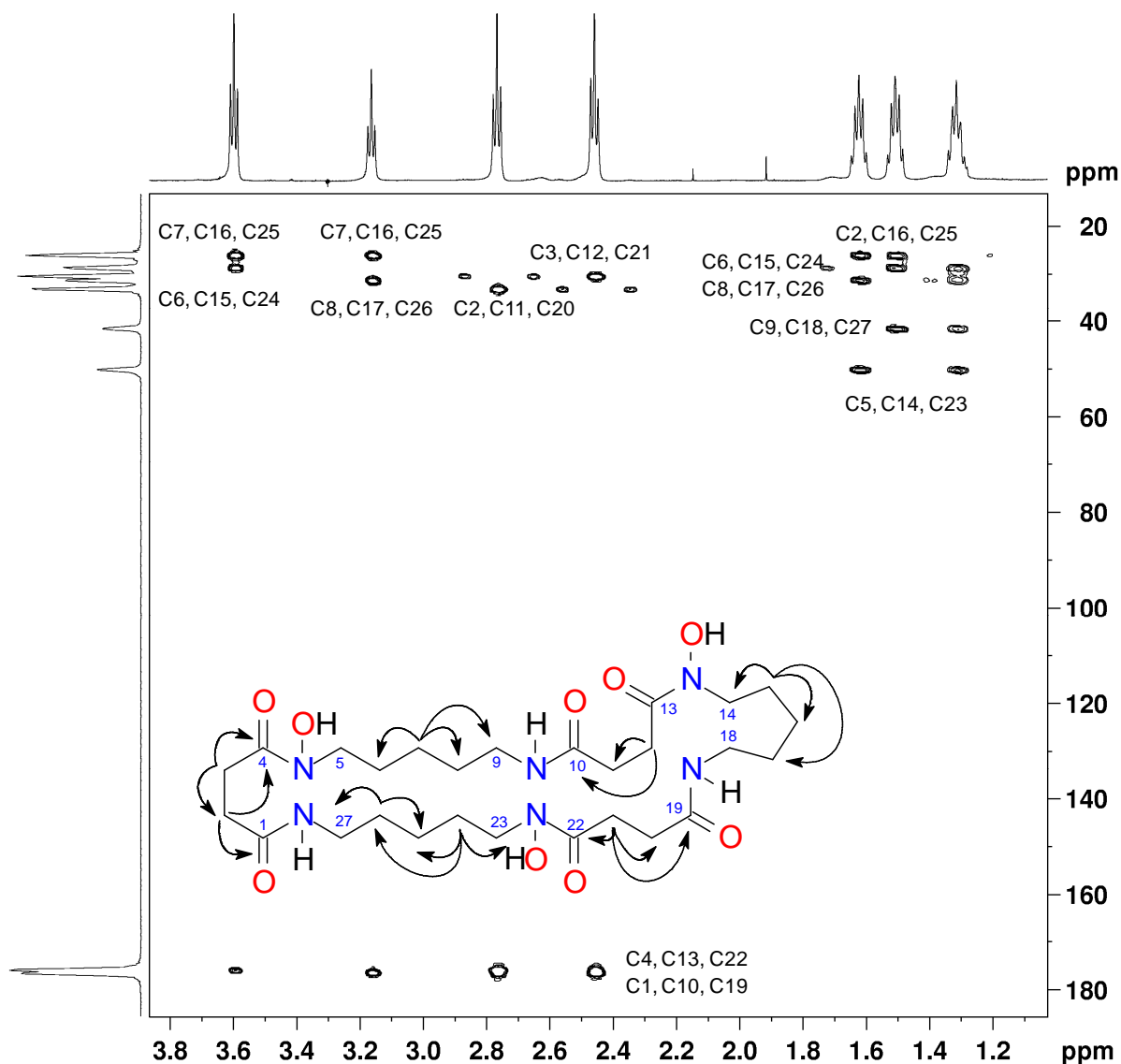


FIGURA 4.128 – Mapa de contorno gHMBC da fração NB7.

Os dados coletados são compatíveis com a estrutura da molécula de nocardamina (FIGURA 4.129). Trata-se de outro sideróforo, produzido por microorganismos, com as mesmas funções biológicas já descritas para desidróxinocardamina, inclusive atividade antibiótica e antitumoral. Entretanto, nocardamina foi produzido em maior quantidade, além de ser um metabólito antibacteriano conhecido há muito tempo, produzido primeiramente por uma linhagem de *Nocardia* (STOLL et al., 1951). Posteriormente foi encontrada em diversos cultivos de estreptomicetos marinhos, terrestres e endofíticos (DEBOER e DIETZ, 1976; KALINOVSKAYA et al., 2011; LU et al., 2013). Recentemente, um grupo de pesquisa estudou a rota biossintética desse composto e os fatores que regulam a produção desse metabólito (UEKI et al., 2009). A análise se mostrou não

tão trivial e, apesar dos autores terem testado diversas condições de cultivo, não foi possível relacionar a produção de nocardamina a um fator específico. Mais estudos nesse campo ainda são necessários. A TABELA 4.18 mostra os dados espectroscópicos coletados para a estrutura da nocardamine. Os dados estão compatíveis com valores encontrados na literatura citada.

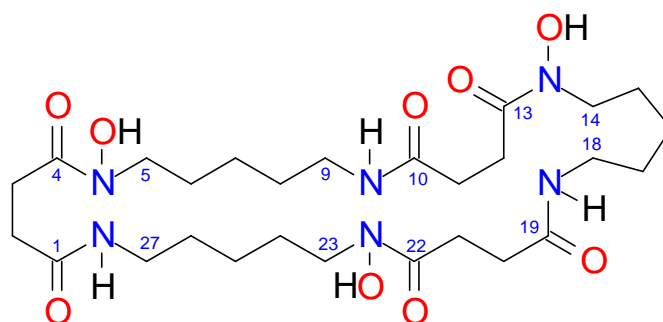


FIGURA 4.129 – Fórmula estrutural da nocardamina.

TABELA 4.18 – Dados espectroscópicos para o composto majoritário da fração NB7, nocardamina (^{13}C , 150MHz; ^1H , 600 MHz, 600 μg em 250 μL de $\text{MeOH-}d_4$).

no.	δ_{C}^*	δ_{H} , <i>mult.</i> (J em Hz)	COSY	HMBC
1, 10, 19	176,5			
2, 11, 20	32,7	2,46, <i>t</i> (7,0)	3	1, 3
3, 12, 21	30,0	2,77, <i>t</i> (7,0)	2	2, 4
4, 13, 22	175,9			
5, 14, 23	49,7	3,60, <i>t</i> (6,66)	6	6, 7
6, 15, 24	28,3	159 – 1,65, <i>m</i>	5, 7	5, 7, 8
7, 16, 25	25,7	1,27 – 1,35, <i>m</i>	6, 8	6, 7, 9
8, 17, 26	31,0	1,47 – 1,54, <i>m</i>	7, 9	6, 7, 9
9, 18, 27	41,2	3,16, <i>t</i> (6,58)	8	8, 10

* Dados obtidos por gHSQC e gHMBC

CONCLUSÃO

5 - Conclusão

A partir dos resultados obtidos é possível verificar que a tecnologia acoplada LC-SPE/NMR é uma ferramenta muito valiosa no estudo de produtos naturais. Pelo menos quatorze substâncias foram identificadas sem a necessidade de isolamento de bancada a partir de quantidades muito pequenas, aproximadamente 3 mg, de extratos brutos: maltol (**59**), 5-hidróximaltol (**60**), ácido *p*-hidróxibenzóico (**61**), 2-acetil-3-hidróxifuran-3-O- α -D-glicopiranosídeo (**62**), *N*-acetiltiramina (**63**), MOPS (**64**), duas diferentes conformações da giovaninona A (**65**), giovaninona B (**66**), duas diferentes conformações da giovaninona C (**67**), giovaninona D (**68**), thomasicina A (**69**), thomasicina B (**70**), desidróxinocardamina (**71**) e nocardamina (**72**), FIGURA 5.1. Todos os compostos identificados foram analisados em quantidades entre 600 e 100 μ g.

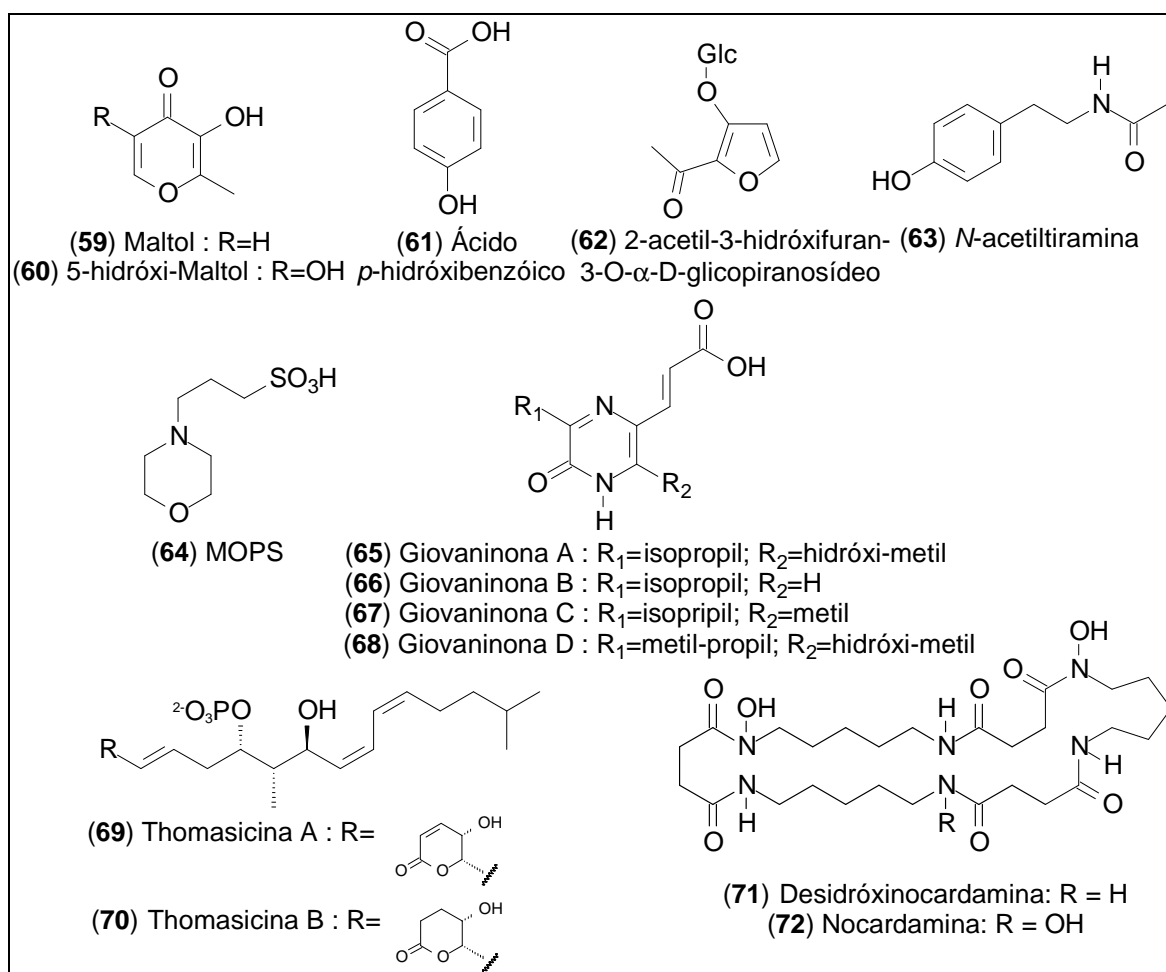


FIGURA 5.1 – Estruturas caracterizadas neste estudo através da técnica hifenada LC-SPE/NMR.

Dentre os compostos caracterizados, os quatro representantes da classe das pirazin-2(1*H*)-onas e os dois representantes da classe dos policetídeos fosfatados não possuem relatos na literatura. E ainda, também um hexapeptídeo modificado de estrutura inédita que foi apenas parcialmente elucidado, pois os parâmetros de retenção por SPE ainda não foram adequadamente ajustados.

As substâncias encontradas ainda mostram que o campo de pesquisa na química de micro-organismos marinhos ainda é muito pouco explorado, pois pelo menos metade das frações analisadas era composta por substâncias desconhecidas. Isso revela uma área promissora e extremamente valiosa, uma vez que compostos importantes podem ser obtidos em larga escala através dos mesmos cultivos em biorreatores. E ainda, os resultados obtidos neste trabalho mostram apenas a avaliação de um meio de cultura específico, mas já se sabe que estreptomicetos respondem à composição e às condições do caldo fermentativo na produção qualitativa e quantitativa de metabólitos (BELLÃO et al., 2009).

A versatilidade, a rapidez, e principalmente a reprodutibilidade mostram que é possível fazer varredura (*screening*) de extratos provenientes de organismos vivos em geral (de micro-organismos ou plantas) de forma eficiente e segura. Os resultados obtidos também indicam que, por meio da completa automação, várias moléculas podem ser analisadas por vários ensaios em um curto período de tempo e usando-se quantidades muito pequenas dos compostos. Mais equipamentos hifenados em outros centros de pesquisa brasileiros tornariam esse tipo de estudo muito mais eficiente e levariam os pesquisadores à bancada somente nos casos em que se justificasse a obtenção de maiores quantidades de amostra. Assim, mais substâncias poderiam ser adicionadas às bibliotecas de produtos naturais brasileiros tornando a desreplicação um processo cada vez mais eficiente.

A utilização de uma sonda criogênica aliada ao uso de supercondutores de campos magnéticos mais elevados e, ainda, a otimização dos parâmetros de retenção por SPE permitiu que obtivéssemos medidas espectroscópicas de excelente qualidade com elevada sensibilidade. A elucidação estrutural foi possível mesmo em compostos isolados em quantidade muito baixa, como por exemplo, o 2-acetil-3-hidróxifuran-3-*O*- α -D-glicopiranosídeo [FIGURA 5.1 (83)], em que foram obtidos apenas 100 μ g de fração isolada.

Embora recentemente fosse muito difícil, demorado e trabalhoso criar uma biblioteca de produtos naturais purificados, o advento de tecnologias novas e

melhores, como é o caso das técnicas hífenadas, tem melhorado consideravelmente essa situação no campo da química orgânica de produtos naturais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6 - Referências bibliográficas

AMINO UP CHEMICAL CO., LTD. Hajime Fujii, Takashi Nakagawa & Buxiang Sun. "Substance having physiological property, method for producing the same and uses thereof". U.S. Pat. No. 6.831.067. 29 out. 2004, 30 jan. 2007.

ALVAREZ, M. E.; WHITE, C. B.; GREGORY, J.; KYDD, G. C.; HARRIS, A.; SUN, H. H.; GILLUM, A. M. & COOPER, R. "Phevalin, a new calpain inhibitor, from a *Streptomyces* sp". J. Antibiot., **48** : 1165, 1995.

ALVAREZ-MICO, X.; JENSEN, P. R.; FENICAL, W. & HUGHES, C. C. "Chorrizidine, a cytotoxic 5H-Pyrrolo[2,1-a]isoindol-5-one-containing alkaloid from a marine *Streptomyces* sp". Org. Lett., **5** : 988, 2013.

AMEMIYA, M.; UENO, M.; OSONO, M.; MASUDA, T.; KINOSHITA, N.; NISHIDA, C.; HAMADA, M.; ISHIZUKA, M. & TAKEUCHI, T. "Cytostatin, a novel inhibitor of cell adhesion to components of extracellular matrix produced by *Streptomyces* sp. MJ654-NF4. II. physico-chemical properties and structure determination". J. Antibiotics, **47** (5) : 541, 1994.

ANDERSON, H. A.; BRACEWELL, J. M.; FRASER, A. R.; JONES, D.; ROBERTSON, G. W. & RUSSEL, J. D. "5-Hydroxymaltol and mycophenolic acid, secondary metabolites from *Penicillium echinulatum*". Trans. Br. Mycol. Soc., **91** : 649, 1988.

ASOLKAR, R. N.; JENSEN, P. R.; KAUFFMAN, C. A. & FENICAL, W. "Daryamides A-C, weakly cytotoxic polyketides from a marine-derived actinomycete of the genus *Streptomyces* strain CNQ-085". J. Nat. Prod., **69** (12) : 1756, 2006.

AKIRA, K.; MITOME, H.; IMACHI, M.; SHIDA, Y.; MIYAOKA, H. & HASHIMOTO T. "LC-NMR identification of a novel taurine-related metabolite observed in ¹H NMR-based metabonomics of genetically hypertensive rats". J. Pharmaceut. Biomed., **51** : 1091, 2010.

BAYER, E.; ALBERT, K.; NIEDER, M.; GROM, E. & KELLER T. "On-line coupling of high-performance liquid chromatography and nuclear magnetic resonance". J. Chromatogr. A, **186** : 497, 1979.

BELLÃO, C.; GONÇAVES, G. & BADINO JÚNIOR, A. C. "Avaliação do tamanho de inóculo na produção de cefamicina C". Anais do III Seminário do Projeto Temático (Proc. 05/55079-4). São Carlos – SP, 2009. p. 124-128.

BERLINCK, R. G. S.; HADJU, E.; ROCHA, R. M.; OLIVEIRA, J. H. H. L.; HERNANDEZ, I. L. C.; SELEGHIM, M. H., GRANATO, A. C.; ALMEIDA, E. V. R.; NUNEZ, C. V.; MURICY, G.; PEIXINHO, S.; PESSOA, C.; MORAES, M. O., CAVALCANTI, B. C.; NASCIMENTO, A. G. F.; THIEMANN, O.; SILVA, M.; SOUZA, A. O.; SILVA, C. L. & MINARINI, P. R. R. "Challenges and rewards of research in marine natural products chemistry in Brazil. J. Nat. Prod., **67** : 510, 2004.

- BOONLARPPRADAB, C.; KAUFFMAN, C. A.; JENSEN, P. R. & FENICAL W. "Marineosins A and B, cytotoxic spiroaminals from a marine-derived actinomycete". *Org. Lett.*, **10** (24) : 5505, 2008.
- BRINGMANN, G. & LANG, G. "Full absolute stereostructures of natural products directly from crude extracts: the HPLC-MS/MS-NMR-CD triad". *Mar. Mol. Biotech.*, **89** : 116, 2003.
- BURKE, C. P.; SWINGLE, M. R.; HONKANEN, R. E. & BOGER, D. L. "Total synthesis and evaluation of phostriecin and key structural analogues". *J. Org. Chem.*, **75** : 7505, 2010.
- CAPON, R. J.; ROONEY, F.; MURRAY, L. M.; COLLINS, E.; SIM, A. T. R.; ROSTAS, J. A. P.; BUTLER, M. S. & CARROLL, A. R. "Dragmacidins: new protein phosphatase inhibitors from a southern australian deep-water marine sponge, *Spongosorites* sp". *J. Nat. Prod.*, **61** (5) : 660, 1998.
- CASTILLO, A. M.; PATINY, L. & WIST, J. "Fast and accurate algorithm for the simulation of NMR spectra of large spin systems". *J. Magn. Reson.*, **209** (2) : 123, 2011.
- CHALLIS, G. L. & HOPWOOD, D. A. "Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species". *PNAS*. **100** : 14555, 2003.
- CHE, Q.; ZHUN, T.; MANDI, X. Q.; KURTAN, T.; MO, X.; MO, X.; LI, J.; GU, Q. & LI, D. "Hybrid isoprenoids from a reeds rhizosphere soil derived actinomycete *Streptomyces* sp. CHQ-64". *Org. Lett.*, **14** : 3438, 2012.
- CHE, Q.; ZHU, T.; KEYSERS, R. A.; LIU, X.; LI, J.; GU, Q. & LI, D. "Polycyclic hybrid isoprenoids from a reed rhizosphere soil derived *Streptomyces* sp. CHQ-64". *J. Nat. Prod.*, **76** (4) : 759, 2013.
- CHO, J.Y.; KWON, H.C.; WILLIAMS, P.G.; KAUFFMAN, C.A.; JENSEN, P.R. & FENICAL, W. "Actinofuranones A and B, polyketides from a marine-derived bacterium related to the genus *Streptomyces* (actinomycetales)". *J. Nat. Prod.*, **69** (3) : 425, 2006.
- CLARKSON, C.; SIBUM, M.; MENSEN, R. & JAROSZEWSKI, J. W. "Evaluation of on-line solid-phase extraction parameters for hyphenated, high-performance liquid chromatography–solid-phase extraction–nuclear magnetic resonance applications". *J. Chromatogr. A*, **21** : 1165, 2007.
- CLAYDEN, J.; GREEVES, N. & WARREN, S.; "Organic Chemistry". 2a ed. Oxford, Oxford University Press, 2012. p. 1234
- CUNNINGHAM, C. & PICKARD, M. A. "Maltol, a metabolite os *Scytalidium uredinicola* wich inhibits spore germination of *Endocronartium harknessii*, the western gall rust". *Can. J. Microbiol.*, **31** (11) : 1051, 1985.

- DEBOER, C. & DIETZ, A. "The description and antibiotic production of *Streptomyces hygrosopicus* var. *geldanus*". J. Antibiotics, **29** (11) : 1182, 1976.
- DING, L.; ROLAND, P.; RÜHL, S.; QIN, S. & LAATSCH, H. "T-Muurolol sesquiterpenes from the marine *Streptomyces* sp. M491 and revision of the configuration of previously reported amorphanes". J. Nat. Prod., **72** : 99, 2009.
- DJINNI, I.; DEFANT, A.; KECHA, M. & MANCINI, I. "Antibacterial polyketides from the marine alga-derived endophytic *Streptomyces sundasbansensis*: a study on hydroxypyrrone tautomerism". Mar. Drugs, **11** : 124, 2013.
- ELIPE, M. V. S. "Advantages and disadvantages of nuclear magnetic resonance spectroscopy as a hyphenated technique". Anal. Chim. Acta., **497** : 1, 2003.
- EPIFANIO, R. A.; MARTINS, D. L.; VILLAÇA, R. & GABRIEL, R. "Chemical defenses against fish predation in three brazilian octocorals: 11 β ,12 β -epoxypukalide as a feeding deterrent in *Phyllogorgia dilatata*". J. Chem. Ecol., **25** : 2255, 1999.
- EXARCHOU, V.; GODEJOHAN, M.; BEEK, T. A.; GEROTHANASSIS, J. P. & VERVOORT, J. "LC-UV-Solid-Phase extraction-NMR-MS combined with a cryogenic flow probe and its application to the identification of compounds present in greek oregano". Anal. Chem., **75** : 6288, 2003.
- EXARCHOU, V.; KRUCKER, M.; BEEK T. A. V.; VERVOORT J.; GEROTHANASSIS, I. P. & ALBERT, K. "LC-NMR coupling technology: recent advancements and applications in natural products analysis". Magn. Reson. Chem., **43** : 681, 2005.
- FENICAL, W. & JENSEN, P. R. "Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria". Nat. Chem. Biol., **2** (12) : 666, 2006.
- FERREIRA, D.; BADINO, A. C.; RODRIGUES-FILHO, E.; PESSOA, C. & MONTENEGRO, R.C.; "Investigação e produção de metabólitos bioativos em culturas de *streptomyces* de origem marinha". Anais do III Seminário do Projeto Temático (Proc. 05/55079-4) – São Carlos – SP, 2009. p. 133-136.
- FOTSO, S.; GRAUPNER, P.; XIONG, Q.; HAHN, D.; AVILA-ADAME, C. & DAVIS, G. "Phoslactomycins from *Streptomyces* sp. MLA1839 and their biological activities". J. Nat. Prod., **76** : 1509, 2013.
- FU, P.; YANG, C.; WANG, Y.; LIU, Y.; MA, Y.; XU, L.; SU, M.; HONG, K. & ZHU, W. "Streptocarbazoles A and B, two novel indocarbazoles from the marine-derived actinomycete strain *Streptomyces* sp. FMA". Org. Lett., **9** : 2422, 2012.
- FUSHIMI, S.; NISHIKAWA, S.; SHIMAZU, A & SETO, H. "Studies on new phosphate ester antifungal antibiotics phoslactomycins. I. Taxonomy, fermentation, purification and biological activities". J. Antibiot., **42** : 1019, 1989.
- GRESSER, U. "Amoxicillin-clavulanic acid therapy may be associated with severe side effects - review of the literature". Eur. J. Med. Res., **6** (4) : 139, 2001.

- GODEJOHANNA, M.; TSENGA, L. H.; BRAUMANNA, U.; FUCHSERB, J. & SPRAULA, M. "Characterization of a paracetamol metabolite using on-line LC-SPE-NMR-MS and a cryogenic NMR probe". J. Chromatogr. A, **1058** : 191, 2004.
- GOODWIN, J. C.; HODGE, J. E. & WEISLEDER, D. "Preparation and structure of an unusual dimeric furan from the acid decomposition of isomaltol". Carbohydr. Res., **146** : 107, 1986.
- GUNASEKERA, S. P.; MCCARTHY, P. J. & KELLY-BORGES, M. "Hamacanthins A and B, new antifungal bis indole alkaloids from the deep-water marine sponge, *Hamacantha* sp". J. Nat. Prod., **57** : 1437, 1994.
- HANSEN, S. H.; JENSEN, A.G.; CORNETT, C.; BJRNSDOTTIR, I.; TAYLOR, S.; WRIGHT, B. & WILSON, I.D. "High performance liquid chromatography on-line coupled to high-field NMR and mass spectrometry for structure elucidation of constituents of *Hypericum perforatum* L.". Anal. Chem., **71** : 5235, 1999.
- HAY, M. & FENICAL, W. "Chemical ecology and marine biodiversity: Insights and products from the sea". Oceanography, **1** : 10, 1996
- HERNADEZ, I. L. C.; GODINHO, M. J. L.; MAGALHÃES, A.; SCHEFER, A. B.; FERREIRA, A. G. & BERLINCK, R. G. S. "N-Acetyl- γ -hydroxyvaline lactone, an unusual amino acid derivative from a marine streptomycete". J. Nat. Prod., **63** : 664, 2000.
- HERNADEZ, I. L. C.; MACEDOA, M. L.; BERLINCK, R. G. S.; FERRERIA, A. G. & GODINHO, M. J. L. "Dipeptide metabolites from the marine derived bacterium *Streptomyces acrimycin*". J. Braz. Chem. Soc., **15** (3) : 441, 2004.
- HERR, E. B.; HANEY, M. E.; PITTENGER, G. E. & HIGGENS, C. E. "Isolation and characterization of a new peptide antibiotic". Pro. Ind. Acad. Sci., **69** : 134, 1960.
- HOLDEN, M. T. G.; CHHABRA, S. R.; NYS, R.; STEAD, P.; BAINTON, N.; HILL, P. J.; MANEFIELD, M.; KUMAR, N.; LABATTE, M.; ENGLAND, M.; JKUMAR, N.; RICE, S.; GIVSKOV, M.; SALMOND, G. P. C.; STEWART, G. S. A. B.; BYCROFT, B. W.; KJELLEBERG, S. & WILLIAMNS, P. "Quorum-sensing cross talk: isolation and chemical characterization of cyclic dipeptides from *Pseudomonas aeruginosa* and other gram-negative bacteria". Mol. Microbiol., **33** : 1254, 1999.
- HOSOYA, T.; HIROKAWA, T.; TAKAGI, M. & SHIN-YA, K. "Trichostatin analogues JBIR-109, JBIR-110 and JBIR-111 from the marine sponge-derived *Streptomyces* sp. RM72". J. Nat. Prod., **75** : 285, 2012.
- HU, Y.; MARTINEZ, E. D. & MACMILLAN, J. B. "Anthraquinones from a marine-derived *Streptomyces spinoverrucosus*". J. Nat. Prod., **75** : 1759, 2012.
- HUGHES, C. C.; PRIETO-DAVO, A.; JENSEN, P. R. & FENICAL, W. "The marinopyrroles, antibiotics of an unprecedented structure class from a marine *Streptomyces* sp". Org. Lett., **10** (4) : 629, 2008.

- HUNG, D. T.; JAMISON, T. F. & SCHRIEBER, S. L. "Understanding and controlling the cell cycle with natural products", *Chem. Biol.* **3** : 623, 1996.
- JAYATILAKE, G. S.; THORNTON, M. P.; LEONARD, A. C.; GRIMWADE, J. E. & BAKER B. J. "Metabolites from an antarctic sponge-associated bacterium, *Pseudomonas aeruginosa*". *J. Nat. Prod.*, **59** : 293, 1996.
- JAYAWICKRAMA, D. A. & SWEEDLER, J. V. "Hyphenation of capillary separations with nuclear magnetic resonance spectroscopy". *J. Chromatogr. A*, **1000** : 819, 2003.
- KALINOVKAYA, N. I.; ROMANENKO, L. A.; IRISAWA, T.; ERMAKOVA, S. P. & KALINOVSY, A. I. "Marine isolate *Citricoccus* sp. KMM 3890 as a source of a cyclic siderophore nocardamine with antitumor activity". *Microb. Res.*, **166** : 654, 2011.
- KANZAKI, H.; IMURA, D.; NITODA, T. & KAWAZU, K. "Enzymatic dehydrogenation of cyclo(L-Phe-L-Leu) to a bioactive derivative, albonoursin". *J. Mol. Catal. B Enzym.*, **6** : 265, 1999.
- KANZAKI, H.; YANAGISAWA, S. & NITODA, T. "Effective production of dehydro cyclic dipeptide albonoursin exhibiting pronuclear fusion inhibitory activity. II. Biosynthetic and bioconversion studies". *J. Antibiotics*, **53** : 1257, 2000.
- KIMURA, Y.; TANI, K.; KOJIMA, A.; SOTOMA, G.; OKADA, K. & SHIMADA, A. "Cyclo-(L-tryptophyl-L-phenylalanyl), a plant growth regulator produced by the fungus *Penicillium* sp". *Phytochemistry*, **41** : 665, 1996.
- KELECOM, A. "Marine natural products in brazil part 1. Isolation and structure determination". *Cien. Cult.*, **49** : 321, 1997.
- KOHAMA, T.; NAKAMURA, T.; KINOSHIT, T.; KANEKO, I. & SHIRAIISHI, A. "Novel microbial metabolites of the phoslactomycins family induce production of colony stimulating factors by bone marrow stromal cells. II. Isolation, physico-chemical properties and structure determination". *J. Antibiotics*, **46** (10) : 1512, 1993.
- KOSUGE, T.; TSUJI, K.; NUKAYA, H.; TERADA, A.; OCHIAIA, M.; WAKABAYASHI, K.; NAGAO, M. & SUGIMURA, T. "Isolation and identification of 5-hydroxymaltol, a mutagenic substance in glucose pyrolysate". *Agric. Biol. Chem.*, **47** : 881, 1983.
- KRUCKER, M.; LIENAU, A.; PUTZBACH, K.; GRYNBAUM, M. D.; SCHULER, P. & ALBERT, K. "Hyphenation of capillary HPLC to microcoil ¹H NMR spectroscopy for the determination of tocopherol homologues". *Anal. Chem.* **76** : 2623, 2004.
- LE GALL, G.; DUPONT, M. S.; MELLON, F. A.; DAVIS, A. L.; COLLINS, G. J.; VERHOEYEN, M. E. & COLQUHOUN, I. J. "Characterization and content of flavonoid glycosides in genetically modified tomato (*Lycopersicon esculentum*) fruits". *J. Agric. Food Chem.*, **51** : 2438, 2003.
- LE GOFF, G.; MARTIN, M.; IORGA, B. I.; ADELIN, E.; SERVY, C.; CORTIAL, S. & OUAZZANI, J. "Isolation and characterization of unusual hydrazides from *Streptomyces* sp. impact of the cultivation support and extraction procedure. *J. Nat. Prod.*, **76** : 142, 2013.

LEE, H.; SHIN, H. J.; JANG, K. H.; KIM, T. S.; OH, K. & SHIN, J. "Cyclic peptides of the nocardamine class from a marine-derived bacterium of the genus *Streptomyces*". J. Nat. Prod., **68** : 623, 2005.

LEVY, G. C. & LICHTER, R.L. "Nitrogen-15 nuclear magnetic resonance spectroscopy". New York, Wiley Interscience, 1979. p. 82.

LEVSEN, K.; PREISS, A. & GODEJOHANN, M. "Application of high-performance liquid chromatography coupled to nuclear magnetic resonance and high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry to complex environmental samples". Trac-Trend. Anal. Chem., **19** (1) : 27, 2000.

LI, F.; MASKEY, R. P.; QIN, S.; SATTLER, I.; FIEBIG, H.H.; MAIER, A.; ZEECK, A. & LAATSCH, H. "Chinikomycins A and B: isolation, structure elucidation, and biological activity of novel antibiotics from a marine *Streptomyces* sp. isolate M045". J. Nat. Prod., **68** (3) : 349, 2005.

LIRAS, P. & MARTÍN, J. F. "Assay for detection and quantification of antimicrobial metabolites produced by *Streptomyces* sp". Method. Biotech., **18** : 149, 2005.

LIU, X.; GAN, M.; DONG, B.; ZHANG, T.; LI, Y.; ZHANG, Y.; FAN, X.; WU, Y.; BAI, S.; CHEN, M., YU, L.; TAO, P.; JIANG, W. & SI, S. "4862F, a new inhibitor of HIV-1 protease, from the culture of *Streptomyces* I03A-04862". Molecules, **18** : 236, 2013.

LU, C.; LI, Y.; WANG, H.; WANG, B. & SHEN, Y. "A new phenoxazine derivative isolated from marine sediment actinomycetes, *Nocardioopsis* sp. 236". Drug. Discov. Ther., **7** : 101, 2013.

MAIA, L. F.; EPIFANIO, R. A.; EVE, T. & FENICAL, W. "New fish feeding deterrents, including a novel sesquiterpenoid heterogorgiolide, from the brazilian *Gorgonian heterogorgia uatumani*". J. Nat. Prod., **62** (9) : 1322, 1999.

MATSUO, Y.; KANO, K.; JANG, J.; ADACHI, K.; MATSUDA, S.; MIKI, O.; KATO, T. & SHIZURI, Y. "Streptobactin, a tricathechol-type siderophore from marine-derived *Streptomyces* sp. YM5-799". J. Nat. Prod., **74** : 2371, 2011.

MACDONALD, J. C. & BISHOP, G. G. "Biosynthesis of arglecin and related compounds". Can. J. Biochem. Cell. B., **55** : 165, 1977.

MEI-XIAN, Y.; HUI-PING, Z. & CHANG-QI, H. "Isolation and characterization of three siderophores from marine bacteria". Chinese J. Chem., **26** : 1332, 2008.

MILANOWSKI, D.; J.; GUSTAFSON, K.; R.; RASHID, M.; A.; PANNELL, J. B. M. & BOYD, M. R.; "Gymnangiamide, a cytotoxic pentapeptide from the marine hydroid *Gymnangium regae*". J. Org. Chem., **69** (9) : 3036, 2004.

MILIAUSKAS, G.; BEKK, T. A. V.; WAARD, P.; VENSKUTONIS, R. P. & SUDHOLTER, E. J. R. "Comparison of analytical and semi-preparative columns for high-performance liquid chromatography–solid-phase extraction–nuclear magnetic resonance". J. Chromatogr. A, **1112** : 276, 2006.

- MILLER, E. D.; KAUFFMAN, C. A.; JENSEN P. R. & FENICAL, W. "Piperazimycins: Cytotoxic hexadepsipeptides from a marine-derived bacterium of the genus *Streptomyces*". J. Org. Chem., **72** : 323, 2007.
- MITCHELL, S. S.; NICHOLSON, B.; TEISAN, S.; LAM, K. S. & POTTS B. C. "Aureoverticillactam, a novel 22-atom macrocyclic lactam from the marine actinomycete *Streptomyces aureoverticillatus*". J. Nat. Prod. **67** (8) : 1400, 2004.
- MCCLINTOCK, J. B. & BAKER, B. "Marine Chemical Ecology". New York, CRC Press, 2001. p. 610.
- MOTOHASHI, K.; INABA, K.; FUSE, S.; DOI, T.; IZUMIKAWA, M.; KHAN, S. T.; TAKAGI, M.; TAKAHASHI, T. & SHIN-YA, K. "JBIR-56 and JBIR-57, 2(1*H*)-Pyrazinones from a marine sponge-derived *Streptomyces* sp. SpD081030SC-03". J. Nat. Prod., **74** : 1630, 2011.
- NOVAK, P.; TEPE, P.; FISTRI, I.; BRATO, I. & GABELICA, V. "The application of LC–NMR and LC–MS for the separation and rapid structure elucidation of an unknown impurity in 5-aminosalicylic acid". J. Pharmaceut. Biomed., **40** : 1268, 2006.
- NOVAK, P.; TEPE, P.; ILIJA, M.; FISTRI, I.; BRATO, I.; AVDAGI, A.; SAK, Z. H.; MARKOVI, V. G. & DUMI M., "LC–NMR and LC–MS identification of an impurity in a novel antifungal drug icofungipen". J. Pharmaceut. Biomed., **50** : 68, 2009.
- OH, D.; POULSEN, M.; CURRIE, C. R. & CLARDY, J. "Sceliphrolactam, a polyene macrocyclic lactam from a wasp-associated *Streptomyces* sp". Org. Lett., **13** : 752, 2011.
- OHKUMA, H.; NARUSE, N.; NISHIYAMA, Y.; TSUNO, T.; HOSHINO, Y.; SAWADA, Y.; KONISHI, M. & OKI, T. "Sultricin, a new antifungal and antitumor antibiotic from *Streptomyces roseiscleroticus*. Production, isolation, structure and biological activity". J. Antibiotics, **45** (8) : 1239, 1992.
- OZASA, T.; TANAKA, K.; SASAMATA, M.; KANIWA, H.; SHIMIZU, M.; MATSUMOTO, H. & IWANAMI, M. "Novel antitumor antibiotic phospholine". J. Antibiot. **42** : 1339, 1989.
- PAN, E.; JAMISON, M.; YOUSUFUDDIN, M. & MACMILLAN, J. B. "Ammosamide D, an oxidatively ring opened ammosamide analog from a marine-derived *Streptomyces variabilis*". Org. Lett., **14** : 2390, 2012.
- PARK, S.; MOON, K.; BANG, H.; KIM, S.; KIM, D.; BONG OH, K.; SHIN, J. & OH, D. "Tripartilactam, a cyclobutane-bearing tricyclic lactam from a *Streptomyces* sp. in a dung beetle's brood ball". Org. Lett., **5** : 1258, 2012.
- PAUL, V. J. "Ecological roles of marine natural products". New York, Comstock Publishing Associates, 1992, p. 264.

PENG, X.; ADACHI, K.; CHEN, C.; KASAI, H.; KANO, K.; SHIZURI, Y. & MISAWA, N. "Discovery of a marine bacterium producing 4-hydroxybenzoate and its alkyl esters, parabens". *Appl. Environ. Microb.*, **20** : 5556, 2006.

PEREIRA R. C., CAVALCANTI D. N. & TEIXEIRA V. L. "Effects of secondary metabolites from the tropical brazilian brown alga *Dictyota menstrualis* on the amphipod *Parhyale hawaiiensis*". *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **205** : 95, 2000.

QU, J.; WANG, Y.; LUO, G. & WU, Z. "Determination of scutellarin in *Erigeron breviscapus* extract by liquid chromatography-tandem mass spectrometry". *J. Chromatogr. A*, **928** : 155, 2001.

QUEIROZ JÚNIOR L. H. K.; QUEIROZ, D. P. K.; DHOOGHE, L.; FERREIRA, A. G. & GIRAudeau, P. "Real-time separation of natural products by ultrafast 2D NMR coupled to on-line HPLC". *Analyst*, **137** : 2357, 2012.

RAJU, R.; PIGGOTT, A. M.; DIAZ, L. X. B.; KHALIL, Z. & CAPON, R. J. "Heronapyrroles A-C: farnesylated 2-Nitropyrroles from an Australian marine-derived *Streptomyces* sp". *Org. Lett.*, **12** (22) : 5158, 2010.

REHBEIN, J.; DIETRICH, B.; GRYNBAUN, M. D.; HENTSCHEL, P.; HOLTIN, K.; KUEHNLE, M.; SCHULER, P.; BAYER, M. & ALBERT, K. "Characterization of bixin by LC-MS and LC-NMR". *J. Sep. Sci.*, **30** : 2382, 2007.

RIJKE E. D.; KANTER, F.; DE ARIESE, F.; GOOIJER, C. & BRINKMAN, U. A. T. "Liquid chromatography coupled to nuclear magnetic resonance spectroscopy for the identification of isoflavone glucoside malonates in *T. pratense* leaves". *J. Sep. Sci.*, **27** : 1061, 2004.

ROMANO, L. H. "Estabelecimento de meios de cultura para o cultivo de *Streptomyces* isolados de sedimento marinho". São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química – UFSCar, 2009. Dissertação de mestrado, 77 p.

ROMERO J.; LIRAS P. & MATIN J.F. "Dissociation of cephamycin and clavulanic acid biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*". *Appl. Microbiol. Biot.*, **20** : 318, 1984.

SAMEJO, M. Q.; NDUKWE, G. I.; BURDI, D. K.; BHANGER, M. I. & KHAN, K. M. "Isolation and crystal structure of maltol from *Abies pindrow*". *J. Med. Plants Res.*, **3** (2) : 55, 2009.

SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A. & McMAHON, J. "New colorimetric cytotoxic assay for anticancer drug discovery screening". *J. Natl. Cancer Inst.*, **82** : 1107, 1990.

SOBOLEVSKAYA, M. P.; DENISENKO, V. A. & KUZNETSOVA, T. A. "Bioactive metabolites of the marine actinobacterium *Streptomyces* sp. KMM 7210". *Russ. Chem. B.*, **56** : 838, 2007.

SORENSEN, D; RADITSIS, A.; TRIMBLE, L. A.; BLACKWELL, B. A.; SUMARAH, M. W. & MILLER, J. D. "Isolation and structural elucidation by LC-MS-SPE/NMR: PR toxin and cuspidatol-related eromophilane sesquiterpens from *Penicillium roquerforti*". J. Nat. Prod., **70** : 121, 2007.

SOUZA, G. D.; MITHOFER, A.; DAOLIO, C.; SCNEIDER, B. & RODRIGUES-FILHO, E. "Identification of *Alternaria alternata* mycotoxins by LC-SPE-NMR and their cytotoxic effects to soybean (*Glycine Max*) cell suspension culture". Molecules, **18** : 2528, 2013.

SPRAUL, M.; FREUND, A. S.; WITHERS, R. S.; MAAS, W. E & CORCORAN, O. "Advancing NMR sensitivity for LC-NMR-MS using a cryoflow probe: application to the analysis of acetaminophen metabolites in urine". Anal. Chem., **75** : 1536, 2003.

STOLL, A.; BRACK, A.; & RENZ, J. "Nocardamin, ein neues antibioticum au seiner *Nocardia*". Art. Schweiz. Z. Pathol. Bacteriol., **14** : 225, 1951.

STÜLTEN, D.; LAMSHÖFT, M.; ZÜHLKE, S. & SPITELER, M. "Isolation and characterization of a new human urinary metabolite of diclofenac applying LC-NMR-MS and high-resolution mass analyses". J Pharmaceut. Biomed., **47** : 371, 2008.

STYLES, P.; SOFFE, C. A.; CRAGG, D. A.; ROW, R.; WHITE, D. J. & WHITE, P. C. "A high-resolution NMR probe in which the coil and preamplifier are cooled with liquid helium". J. Magn. Reson., **60** : 397, 1984.

SUN, F.; CHO, H.; JEONG, D.; LI, C.; HE, C. & BAE, T. "Aureusimines in *Staphylococcus aureus* are not involved in virulence". Plos One, **5** : 11, 2010.

TATSUTA, K.; FUJIMOTO, K.; YAMASHITA, M.; TSUCHIYA, M. & UMEZAWA, S. "Arglecin, a new microbial metabolite: isolation and chemical structure". J. Antibiot., **25** : 674, 1971.

TATSUTA, K., TSUCHIYA, T., SOMENO, T., UMEZAWA, H., NAGANAWA, H. "Argvalin, a new microbial metabolite: isolation and structure". J. Antibiot., **26** : 606, 1973.

TODE, C.; MAOKA, T. & SUGIURA, M. "Application of LC-NMR to analysis of carotenoids in foods". J. Sep. Sci., **32** : 3659, 2009.

TUNAC, J. B.; GRAHAM, B. D. & DOBSON, W. E. "Novel antitumor agents CI-920, PD 113,270 and PD 113,271. I. Taxonomy, fermentation and biological properties". J. Antibiot., **36** : 1595, 1983.

TUNTIWACHWUTTIKUL, P.; TAECHOWISAN, T.; WANBANJOB, A.; THADANITI, S. & TAYLOR, W. C. "Lansai A-D, secondary metabolites from *Streptomyces* sp. SUC1". Tetrahedron, **64** : 7583, 2008.

UEDA, J.; IZUMIKAWA, M.; KOZONE, I.; YAMAMURA, H.; HAYAKAWA, M.; TAKAGI, M. & SHIN-YA, K. "A phenylacetylated peptide, JBIR-96, isolated from *Streptomyces* sp. RI051-SDHV6". J. Nat. Prod., **74** (5) : 1344, 2011.

UEKI, M.; SUZUKI, R.; TAKAMATSU, S.; TAKAGI, H.; URAMOTO, M.; IKEDA, H. & OSADA, H. "Nocardidamin production by *Streptomyces avermitilis*". *Actinomycetologica*, **23** : 34, 2009.

WATANABE, N. & NIKI, E. "Direct coupling of FT-NMR to high performance liquid chromatography". *Proc. Jpn. Acad. Ser. B*, **54** : 194, 1978.

WANG, P.; XI, L.; LIU, P.; WANG, Y.; HUANG, Y. & ZHU, W. "Diketopiperazine derivatives from the marine-derived actinomycete *Streptomyces* sp. FXJ7.328". *Mar. Drugs*, **11** : 1035, 2013.

WILLIAMS, D. E.; DALISAY, D. S.; PATRICK, B. O.; MATAINAHO, T.; ANDRUSIAK, K., DESPANDE, R.; MYERS, C. L.; PIOTROWSKI, J. S.; BOONE, C.; YOSHIDA, M. & ANDERSEN, R. J. "Padanamides A and B, highly modified linear tetrapeptides produced in culture by a *Streptomyces* sp. isolated from a marine sediment". *Org. Lett.*, **13** : 3936, 2011.

WILSON, D. J.; SHI, C.; TEITELBAUM, A. M.; GULICK, A. M. & ALDRICH, C. C. "Characterization of AusA: a dimodular nonribosomal peptide synthetase responsible for the production of aureusimine pyrazinones". *Biochemistry*, **52** (2) : 926, 2013.

WRIGHT, A. E.; POMPONI, S. A.; CROSS, S. S.; MCCARTHY, P. "A new bis(indole) alkaloid from a deep-water marine sponge of the genus *Spongosorites*". *J. Org. Chem.*, **57** : 4772, 1992.

WU, S. J.; FOTSO, S.; LI, F.; QIN, S. & LAATSCH, H. "Amorphane sesquiterpenes from a marine *Streptomyces* sp". *J. Nat. Prod.*, **70** (2) : 304, 2007.

WYATT, M. A.; WANG, W.; ROUX, C. M.; BEASLEY, F. C.; HEINRICHS, D. E.; DUNMAN, P. M. & MAGARVEY, N. A. "*Staphylococcus aureus* nonribosomal peptide secondary metabolites regulate virulence". *Science*, **329** : 294, 2010.

YIN, X. & ZABRISKIE, T. M. "VioC is a non-heme iron, alpha-ketoglutarate-dependent oxygenase that catalyzes the formation of 3S-hydroxy-L-arginine during viomycin biosynthesis". *Chembiochem.*, **5** (9) : 1274, 2004.

ZHANG, H.; CONTE M. M.; HUANG, X.; KHALIL, Z. & CAPON, R. J. "A search for BACE inhibitors reveals new biosynthetically related pyrrolidones, furanones and pyrroles from a southern Australian marine sponge, *lanthella* sp". *Org. Biomol. Chem.*, **10** : 2656, 2012.