

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

**“ESTUDO QUÍMICO DOS FUNGOS STACHYBOTRYS LEVISPORA E  
CURVULARIA INAEQUALIS: USO DA REDE MOLECULAR PARA A  
IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS METABÓLITOS”**

**Alany Ingrid Ribeiro\***

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

**Orientador (a): Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva**

**\* bolsista CNPq**

**São Carlos - SP  
2019**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

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

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Alany Ingrid Ribeiro, realizada em 03/05/2019:



---

Prof. Dra. Maria Fatima das Graças Fernandes da Silva  
UFSCar



---

Prof. Dr. Norberto Popelino Lopes  
FCRP/USP



---

Prof. Dr. Sérgio Florentino Pascholati  
ESALQ/USP



---

Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho  
UFSCar



---

Prof. Dr. Eli Fernando Pimenta  
UFSCar

Dedico este trabalho aos meus pais e grandes amores Romildo e Geanete por não medirem esforços e tornar possível a conclusão de mais um sonho.

Às minhas irmãs, sobrinhos e familiares, por todo amor e compreensão durante todos esses anos ausente.

*“Tudo tem começo e meio. O fim só existe para quem não percebe o recomeço”*

*Luiz Gasparetto*

## **Agradecimentos**

À minha orientadora Maria Fátima pela orientação e por ter acreditado em mim ao longo desses anos,

À rede Sisbiota, em especial ao Prof. Sergio Florentino Pascholati (ESALq) e o Prof. Luis Gusmão (UEFS), por terem nos incluído no projeto e cedido os fungos.

Aos meus familiares pelo incentivo e principalmente força para continuar na carreira acadêmica. Em especial aos meus pais, por todo o suporte financeiro e emocional para a conclusão dessa etapa.

Ao meu namorado Thiago, pela paciência nas horas difíceis e pelo incentivo durante esses anos

Aos meus colegas e amigos que adquiri durante essa trajetória.

Ao aluno (IC) e amigo Ueleton Rocha por ser meu braço direito durante a realização deste trabalho.

A Professores Tiago Venâncio e a Luciana Vizotto, por todos os experimentos no RMN.

À Professora Regina, pelas análises de LC-HRMS

Ao alunos Wilmer Penã (pós doc), Carlos André pela ajuda com os complexos, e ao Hugo César (pós doc) pela ajuda na caracterização dos mesmo.

À técnica e amiga Dorai Periotto, pelos ensaio fúngicos das substâncias isoladas

Ao Professor Edson Rodrigues Filho pela ajuda na conclusão dos resultados.

Ao grupo de PN-UFSCar que se tornou uma segunda família.

Aos órgãos de fomento; Capes, Fapesp e principalmente ao CNPq pela bolsa concedida.

## Abreviações

[M+H]<sup>+</sup> Molécula protonada

5-AZA- modulador epigenético 5-azacitidina

AcOEt - Acetato de etila

BDA – Batata-dextrose-ágar

BDG 1%- Batata-dextrose-ágar suplementados com 1% de glicose

BDG 5% - Batata-dextrose-ágar suplementados com 5 % de glicose

BDL- Batata-dextrose-ágar suplementados com 1% de extrato de levedura

BDM- Batata-dextrose-ágar suplementados com 1% de extrato de malte

COSY - *Correlation spectroscopy*

CUI- *Curvularia Inaequalis*

d- Dubleto

DCM - Diclorometano

dd - Duplo dupleto

Deslocamento químico de <sup>1</sup>H

ESI - Ionização por electrospray

GNPS- Global Natural Product Social Molecular Networking

GRI- Griseofulvina

h - Altura

HMBC - Heteronuclear Multiple Bond Correlation

HPLC- Cromatógrafo líquido de alta eficiência

HSQC - Heteronuclear Single Quantum Correlation

*J*- constante de acoplamento

m - multipleteo

*m/z* - Relação massa/carga

mzXML – formato de arquivo de extensão de linguagem de marcação para dados de espectrometria de massas

CD<sub>3</sub>OD -Metanol Deuterado

MeOH – Metanol

NOE- Nuclear Overhauser effect

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

RMN 1D - Experimento de Ressonância magnética de uma dimensão

RMN 2D - Experimento de Ressonância magnética duas dimensões

RMN de  $^{13}\text{C}$  - Ressonância Magnética Nuclear de carbono 13

RMN de  $^1\text{H}$  - Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio 1

s – singleto

SAHA – moduador epigenético ácido hidroxâmico suberoilânida

STAL- Stachybotrylactama

STA- *Stachybotrys Levispora*

Substância PL– substância isolada da Partição líquida

t.r - Tempo de retenção

UPLC-HRMS- Cromatógrafo líquido de Ultra performance com detector de massas de alta resolução

$\delta_c$ - Deslocamento químico de Carbono 13

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo I

|   |    |
|---|----|
| TABELA 1- Composição das suplementações utilizadas para incorporação no meio de cultivo sólido para o crescimento de <i>Stachybotrys levisporous</i> em batata-dextrose-ágar. ....          | 20 |
| TABELA 2 Condição cromatográfica obtida pelo método de design experimental-Fusion, para as análises dos perfil químico de <i>Stachybotrys levisporous</i> em escala analítica .....         | 22 |
| TABELA 3- Condição cromatográfica obtida para o extrato do fungo <i>Stachybotrys levisporous</i> crescido em de batata-dextrose-ágar e suplementado com 1% de glicose, escala ampliada..... | 24 |
| TABELA 4- Dados de RMN <sup>1</sup> H para substâncias S1-S5 - (J em Hz).....   | 46 |
| TABELA 5- Dados de RMN <sup>13</sup> C para as substâncias S1-S4 (J em Hz).....   | 47 |
| TABELA 6- Dados de RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C para a substância tricothecol T1.....   | 49 |
| Tabela 7- Dados de HRMS para as substâncias S1-S4.....  | 50 |
| TABELA 8- Dados estruturais e analíticos obtidos para as estruturas identificadas da classe dos Stachybotrycromenos-STC.....  | 57 |
| TABELA 9- Dados estruturais e analíticos obtidos para as estruturas identificadas da classe das Fenilspirodrimanes-STB .....  | 61 |
| TABELA 10 Dados estruturais e analíticos obtidos para as estruturas identificadas da classe das Stachybotrylactamas- STA .....  | 64 |
| TABELA 11- Dados estruturais e analíticos obtidos para as estruturas identificadas da classe das 10-benzo- $\gamma$ -lactama-5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ ,9 $\beta$ ,10 $\beta$ -drimanos.....   | 67 |

**Capítulo II**

|   |     |
|---|-----|
| TABELA 1- Condição cromatográfica obtida para análises da fração acetato de etila (FAE) do extrato do fungo <i>Curvularia inaequalis</i> crescido em meio líquido. .... | 153 |
| TABELA 2- Rendimento das subfrações obtidas após o processo de extração em fase sólida (SPE) do extrato de acetato de etila .....                                       | 165 |
| TABELA 3- Dados de RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C obtidos para as substância PL1 e PL2).....  | 170 |
| TABELA 4- Dados de RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C obtidos para a substância PL3 .....   | 172 |



## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo I

|  |    |
|--|----|
| FIGURA 1 - Estrutura química - ácido hidroxinâmico de suberoilânida (SAHA)-modulador epigenético .....   | 5  |
| FIGURA 2-Estruturas químicas das Cladosinas H-K (1-4), obtidas pela incorporação de modulador epigenético SAHA em culturas de <i>Cladosporium sphaerospermum</i> ...   | 5  |
| FIGURA 3- Estruturas químicas dos novos bisabolonas sequiterpenóides obtidos após modificação epigenética. ....  | 6  |
| Figura 4-Fluxo de informações e alinhamentos espectrais ms/ms para a construção da rede molecular.....   | 7  |
| FIGURA 5- Cladograma das espécies <i>Stachybotrys chartarum</i> , <i>S. echinata</i> , <i>S.theobromae</i> , <i>S.microspora</i> e <i>S.reniformis</i> obtida após análises genômicas e sequenciamento da região ITS.....                                      | 11 |
| FIGURA 6- Esquema do caminho biossintética para a produção de griseofulvina (1) e as enzimas envolvidas em cada etapa. ....  | 12 |
| FIGURA 7- Esquema adaptado das reações clássicas de transaminação .....  | 14 |
| FIGURA 8-Exemplos de stachybotrylactamas e stachybotrynas contendo resíduo de aminoácidos isolados de <i>Stachybotrys</i> spp; .....   | 15 |
| FIGURA 9 - Gráfico do crescimento micelial do fungo <i>Stachybotrys levisporous</i> em meio sólido de batata- dextrose-ágar em função da temperatura e dos dias de inóculo .....   | 25 |
| FIGURA 10- Fotos do crescimento do fungo <i>Stachybotrys levisporous</i> em meio sólido suplementado com; A-) 1% de glicose, B-) 5-azacitidina, C-) NH <sub>4</sub> Br, D-)1% L-glutamina, E-) SAHA, F-) NH <sub>4</sub> Cl, (G) L-serina e (H) L-alanina..... | 26 |
| FIGURA 11- Fotos do crescimento do fungo <i>Stachybotrys levisporous</i> em meio sólido suplementados com; A-) 1% e 5% de glicose, B-)1% e 5% de L-glutamina.....  | 27 |
| FIGURA 12- Perfil cromatográfico do extrato do fungo <i>Stachybotrys levisporous</i> crescido em meio sólido de batata-dextrose-ágar e suplementado com 1% de glicose (em preto) e o controle (em azul) sem a presença do fungo ( $\lambda=254$ nm).....       | 28 |
| FIGURA 13-Gráfico do design experimental pelo software Fusion para desenvolvimento do método cromatográfico com as amostras de extratos de <i>Stachybotrys levisporous</i> crescido em meio de batata-dextrose-ágar e suplementado com 1% de glicose .....     | 29 |

|  |    |
|--|----|
| FIGURA 14- Rede molecular calculada para os dados de LC-MS/MS das amostras de extratos de <i>Stachybotrys levisporous</i> crescido em batata-dextrose-ágar e suplementados com L-glutamina, NH <sub>4</sub> Br, NH <sub>4</sub> Cl, 1% de glicose, 5-azacitidina e SAHA. A anotação dos nodos pela plataforma GNPS com anotação “gold” estão representadas em amarelo e os não anotados em vermelho..... | 31 |
| FIGURA 15- Parte da rede molecular calculada para os dados de LC-MS/MS das amostras de extratos de <i>Stachybotrys levisporous</i> crescido de batata-dextrose-ágar e suplementados com L-glutamina (vermelho), NH <sub>4</sub> Br (azul claro), NH <sub>4</sub> Cl (amarelo), 1% de glicose (azul), SAHA (verde) e 5-azacitidina (rosa) correspondentes ao cluster griseofulvina .....                  | 33 |
| FIGURA 16- Espectro de massas MS <sup>2</sup> de GRI7 do íon 347.1880 [M+H] <sup>+</sup> .....   | 34 |
| FIGURA 17- Espectro de massas MS <sup>2</sup> do íon 333.1330 [M+H] <sup>+</sup> .....   | 34 |
| FIGURA 18- Mecanismo de fragmentação proposto para GRI 6 e GRI 7 .....   | 35 |
| FIGURA 19- Representação das estruturas químicas correspondentes aos nodos apontados no cluster GRI .....  | 36 |
| FIGURA 20- Parte da rede molecular calculada para os dados de LC-MS/MS das amostras de extratos de <i>Stachybotrys levisporous</i> crescido de batata-dextrose-ágar e suplementados com L-glutamina (vermelho), NH <sub>4</sub> Br (azul claro), NH <sub>4</sub> Cl (amarelo), 1% de glicose (azul), SAHA (verde) e 5-azacitidina (rosa) correspondentes ao cluster STAL. ....                           | 37 |
| FIGURA 21- Espectro de massas MS/MS do íon <i>m/z</i> 386.2328 referente à molécula protonada [M+H] <sup>+</sup> STAL 1 .....  | 34 |
| FIGURA 22- Mecanismo de fragmentação proposto para stachybotrylactama (STAL1) .....  | 39 |
| FIGURA 23- Esqueleto base das estruturas fenilspirodrimanas anotadas pela rede molecular .....   | 39 |
| FIGURA 24- Perfil cromatográfico do extrato do fungo <i>Stachybotrys levisporous</i> crescido em escala ampliada no meio sólido de batata-dextrose-ágar suplementado com 1% de glicose; .....  | 40 |
| FIGURA 25- Interações de hidrogênios obtidos pelos experimentos de NOE (NOESY 1D) para a substância S1 .....   | 41 |
| FIGURA 26- Interações de hidrogênios obtidos pelos experimentos de NOE para a substância S3 .....  | 42 |
| FIGURA 27- Estruturas químicas das substâncias isoladas S1, S2, S3, S4 e S5....  | 45 |

|   |    |
|---|----|
| FIGURA 28-Mecanismo de fragmentação proposto para o espectro de massas do Tricodemol.....   | 51 |
| FIGURA 29- Cluster das estruturas STAL ampliado .....   | 53 |
| FIGURA 30-Continuação da FIGURA 29 .....  | 54 |
| FIGURA 31-Espectro de massas $[M+H]^+$ 355.2268 e o mecanismo de fragmentação proposto para esse íon.....   | 55 |
| FIGURA 32- Esqueleto base das estruturas Stachybotrycromenos- STC.....  | 57 |
| FIGURA 33-Mecanismo de biossíntese proposto para a formação de Stachybotrycromenos-STC.....   | 58 |
| FIGURA 34-Espectro de massas $[M+H]^+$ 373.2370 e o mecanismo de fragmentação proposto para esse íon.....   | 59 |
| FIGURA 35- Esqueleto base das estruturas fenilspirodrimanes -STB .....  | 61 |
| FIGURA 36-Mecanismo de biossíntese proposto para a formação das Fenilspirodrimanas- STB .....   | 62 |
| FIGURA 37- Esqueleto base das estruturas stachybotrylactamas .....  | 63 |
| FIGURA 38- Mecanismo de biossíntese proposto para a formação das Stachybotrylactamas- STA .....   | 65 |
| FIGURA 39-Esqueleto base das estruturas das 10-benzo- $\gamma$ -lactama-5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ ,9 $\beta$ ,10 $\beta$ -drimanos.....                              | 67 |
| FIGURA 40 - Mecanismo de biossíntese proposto para a formação das 10-benzo- $\gamma$ -lactama-5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ ,9 $\beta$ ,10 $\beta$ -drimanos - STAO..... | 68 |

## Capítulo II

|   |     |
|---|-----|
| FIGURA 1- Imagens dos conídios septados de <i>C.inaequalis</i> .....  | 143 |
| FIGURA 2- Imagens microscópicas dos conídios do fungo <i>Curvularia inaequalis</i> ; ampliações 40, 100 e 400X. ....  | 156 |
| FIGURA 3-Gráfico do crescimento micelial do fungo <i>Curvularia inaequalis</i> cm <sup>2</sup> /dias em diferentes meios de cultivo .....   | 157 |
| FIGURA 4- Fotos do crescimento do fungo <i>Curvularia inaequalis</i> nos meio de cultivo de batata-dextrose-ágar (BDA) + 5% de glicose, BDA +1% de glicose, BDA, Czapeck+ágar, BDA+1% de extrato de levedura, BDA+1% de extrato de malte, e seus respectivos brancos, monitorados em 5 e 7 dias respectivamente. .... | 158 |
| FIGURA 5- Sobreposição do perfil químico do micro-extrato do fundo <i>Curvularia inaequalis</i> crescido em meio de cultivo batata-dextrose-ágar + 5% de glicose (em preto), e o controle (em azul)- 254nm .....  | 159 |
| FIGURA 6 Sobreposição do perfil químico do micro-extrato do fundo <i>Curvularia inaequalis</i> crescido em meio de cultivo batata-dextrose-ágar + 1% de glicose (em preto), e o controle (em azul)- 254nm .....   | 160 |
| FIGURA 7 -Sobreposição do perfil químico do micro-extrato do fundo <i>Curvularia inaequalis</i> crescido em meio de cultivo batata-dextrose-ágar (em preto), e o controle (em azul)- 254nm .....  | 160 |
| FIGURA 8 -Sobreposição do perfil químico do micro-extrato do fundo <i>Curvularia inaequalis</i> crescido em meio de cultivo Czapeck-ágar (em preto), e o controle (em azul)- 254nm.....   | 161 |
| FIGURA 9- Sobreposição do perfil químico do micro-extrato do fundo <i>Curvularia inaequalis</i> crescido em meio de cultivo batata-dextrose-ágar + 1% extrato de levedura (em preto), e o controle (em azul)- 254nm .....   | 161 |
| FIGURA 10- Sobreposição do perfil químico do micro-extrato do fundo <i>Curvularia inaequalis</i> crescido em meio de cultivo batata-dextrose-ágar + 1% extrato de malte (em preto), e o controle (em azul) .....  | 162 |
| FIGURA 11 Espectros de RMN <sup>1</sup> H da fração acetato de etila -FAE, obtida a partir da partição líquido-líquido; A- Controle (meio de cultivo sem o crescimento do fungo), B- ) Crescimento de <i>Curvularia inaequalis</i> ,.....   | 162 |
| FIGURA 12-Sobreposição do perfil químico do extrato do fundo <i>curvularia inaequalis</i> crescido em meio de cultivo líquido batata-dextrose-ágar + 1% extrato de malte (em azul), e o controle (em vermelho). ....  | 163 |

|  |     |
|--|-----|
| FIGURA 13-Frações obtidas após o processo de extração em fase sólida do extrato acetato de etila (FAE).....  | 164 |
| FIGURA 14- Espectro de RMN <sup>1</sup> H de F3 obtida após extração em fase sólida SPE da fração acetato de etila – Eluição com 50% H <sub>2</sub> O/ACN- .....                                 | 165 |
| FIGURA 15- Espectro de RMN <sup>1</sup> H da subfração 2 obtida após extração em fase sólida SPE em pequena escala da fração acetato de etila – Eluição com 50% 50%H <sub>2</sub> O/ACN- .....   | 166 |
| FIGURA 16 Espectro de RMN <sup>1</sup> H da subfração 4 obtida após extração em fase sólida SPE em pequena escala da fração acetato de etila – Eluição com 45% 65%H <sub>2</sub> O/ACN- .....    | 166 |
| FIGURA 17 Espectro de RMN <sup>1</sup> H da subfração 4 obtida após extração em fase sólida SPE em pequena escala da fração acetato de etila – Eluição com 35% 75% H <sub>2</sub> O/ACN- .....   | 167 |
| FIGURA 18- Estrutura química das substâncias PL1 (Ácido Anofínico), PL2 (3,4-trans-dihidroxi-anofínico) .....  | 168 |
| FIGURA 19-Estrutura química da substância PL3- Ácido Abscísico (ABA) .....   | 170 |
| FIGURA 20- Foto da coluna de bancada em fase normal, empacotada com sílica e a aplicação da fração etanólica do micélio. ....  | 172 |
| FIGURA 21- Foto da subfração eluída com 100% e a formação de cristais da substância M1. ....   | 174 |
| FIGURA 22- Estrutura cristalina da substância 5-Oxoprolina (M1) obtida por difração de Raio-X.....   | 173 |
| FIGURA 23- Estruturas químicas dos complexos <i>cis</i> -[Pt(PPh <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (APG)]PF <sub>6</sub> e <i>cis</i> -[Pt(PPh <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (Pro)]PF <sub>6</sub> ..... | 177 |
| FIGURA 24- Estruturas químicas dos complexos [Ag(PPh <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (APG)] e [Ag(PPh <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (Pro)] .....   | 177 |

## RESUMO

### **ESTUDO QUÍMICO DOS FUNGOS STACHYBOTRYS LEVISPIORA E CURVULARIA INAEQUALIS: O USO MODULADORES QUÍMICOS E EPIGENÉTICOS PARA A OBTENÇÃO DE NOVOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS**

Fungos sapróbios estão sendo empregados como estratégia alternativa para a redução do uso de defensivos agrícolas nocivos para ao meio ambiente. Esses micro-organismos produzem substâncias capazes de inibir/combater patógenos que acometem à agricultura. A diversidade estrutural e química dos metabólitos de origem microbiana são fatores que chamam a atenção principalmente pela atividade, complexidade e inúmeros centros estereogênicos. Alterações no meio de cultivo, e/ou o emprego de moduladores químicos e epigenéticos faz com que rotas silenciadas sejam ativadas, dando origem a classes de compostos diferentes das produzidas pelo caminho biossintético principal. Ferramentas analíticas como cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (LC-HRMS-MS) associados à plataformas de dados espectrais específicos para produtos naturais (PN), GNPS (Global Natural Product Social Molecular Networking) faz com que a dereplicação desses PN seja mais rápida, facilitando o rastreamento de análogos de estruturas com atividade descrita na literatura. Neste contexto, os fungos sapróbios *Stachybotrys levisporous* (STA) e *Curvularia inaequalis* (CUI) foram selecionados em estudos prévios pela rede SISBIOTA- Bioprospecção de fungos sapróbios no PPBIO para serem estudados sob o ponto de vista metabolômico. O objetivo principal deste trabalho foi avaliar a mudança do perfil químico desses fungos aplicando a estratégia de alterar o meio de cultivo a fim de identificar e/ou isolar metabólitos produzidos pelas modificações na suplementação, empregando-se ferramentas analíticas de isolamento e identificação e a molecular networking. O estudo da dereplicação metabolômica em STA possibilitou a identificação de stachybotrylactamas, com estereoquímica diferente das presentes na literatura, além de facilitar o isolamento guiado de novas substâncias pertencentes á classe dos 10-benzo- $\gamma$ -lactama-5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ ,9 $\beta$ ,10 $\beta$ -drimanos. Em CUI, foi possível desenvolver um método rápido de isolamento de metabólitos da classe de cromenos (ácidos anofínicos e 3,4-trans- dihidroxi-anofinico), aminoácidos (5-oxoprolina) e fitohormônio (Ácido abscissico), com potencial atividade antifúngica descrita na literarura.

## ABSTRACT

### CHEMICAL STUDY OF FUNGUS STACHYBOTRYS LEVISPOROUS AND CURVULARIA INAEQUALIS: THE USE OF CHEMICAL AND EPIGENETIC MODULATORS FOR THE OBTENTION OF NOVEL SECONDARY METABOLITES

Saprobic fungus are being used as an alternative strategy to reduce the use of pesticides harmful to the environment. These microorganisms produce substances capable of inhibiting pathogens that affect agriculture. The structural and chemical diversity of metabolites from microorganism, are factors that call attention mainly to the activity, complexity and numerous stereogenic centers. Alterations in the culture medium, and / or the use of chemical and epigenetic modulators, can activated the silenced routes, giving rise to classes of different compounds from those produced by the main biosynthetic pathway. Analytical tools such as liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry (LC-HRMS-MS) associated with specific platform for Natural Products, GNPS (Global Natural Product Social Molecular Networking), to facilitate the tracking of analogs of structures with activity described in the literature. In this context, the Saprobic fungi *Stachybotrys levisporous* (STA) and *Curvularia inaequalis* (CUI) were selected in previous studies by the SISBIOTA- Bioprospection of saprobic fungi in the PPBIO to be studied from a metabolic point of view. The main objective of this work was to evaluate changes on the chemical profile of these fungus applying the strategy of modification of culture medium in order to identify and / or isolate metabolites produced by the modifications in the supplementation, using analytical tools of isolation and molecular identification networking. Metabolic dereplication studies in STA allowed the identification of of stachybotrylactamas, with stereochemistry different from those in the literature, and facilitating the bioguided isolation of novel substances pertaining to the class of 10-benzo- $\gamma$ -lactama-5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ ,9 $\beta$ ,10 $\beta$ -drimanes. The studies in CUI, was possible to develop a rapid method of isolating metabolites of the classes of chromenes (anofinic and 3,4-trans dihydroxyanofinic acids), amino acids (5-oxoproline) and phytohormone (abscisic acid), with potential antifungal activity described in literature.

## SUMÁRIO

### Capítulo I

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO .....</b>  | <b>1</b>  |
| 1.1. Novas Ferramentas para a obtenção de metabólitos secundários desconhecidos.....  | 2         |
| 1.2. Manipulações epigenéticas .....  | 3         |
| 1.3. Emprego de pequenas moléculas para manipulação epigenética .....   | 4         |
| 1.4. Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS).....  | 5         |
| 1.5. Gênero <i>Stachybotrys</i> e a espécie <i>S. levisporous</i> .....   | 8         |
| 1.6. Justificativa para o uso de fungos sapróbios.....  | 9         |
| 1.7. Justificativas para a escolha dos sais inorgânicos, aminoácidos e moduladores epigenéticos.....  | 11        |
| <b>2. OBJETIVO GERAL .....</b>  | <b>16</b> |
| <b>3. MATERIAIS .....</b>   | <b>17</b> |
| <b>4. PARTE EXPERIMENTAL.....</b>   | <b>19</b> |
| 4.1. Obtenção do isolados de <i>Stachybotrys levisporous</i> .....  | 19        |
| 4.2. Cultivos dos fungos em meios sólidos de Batata-dextrose-ágar (BDA) ...   | 19        |
| 4.3. Cultivos dos fungos em meios sólidos de Batata-dextrose-ágar (BDA) suplementados com moduladores epigenéticos, aminoácidos e sais inorgânicos..... | 20        |
| 4.4. Preparo dos extratos em escala analítica .....   | 20        |
| 4.5. Perfil químico dos extratos do fungo <i>Stachybotrys levisporous</i> por UPLC-PDA .....  | 20        |
| 4.6. Design experimental- Fusion.....   | 21        |
| 4.7. Perfil químico dos extratos em micro-escala do fungo <i>Stachybotrys levispora</i> - UPLC-ESI-qTOF.....  | 21        |



|  |           |
|--|-----------|
| 4.8. Preparo dos extratos em escala ampliada- Meio de Batata-dextrose-ágar + 1% de glicose.....  | 22        |
| 4.9. Anotação dos compostos através da espectrometria de massas e a anotação da rede molecular GNPS .....  | 23        |
| 4.10. Isolamento e identificação das substâncias- (S1-S5 e T1).....  | 23        |
| <b>5. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>  | <b>25</b> |
| 5.1. Reativação e cultivo dos fungos em meios sólidos de batata-dextrose-ágar.....   | 25        |
| 5.2. Cultivos dos fungos em meios sólidos de Batata-dextrose-ágar (BDA) suplementados com moduladores epigenéticos, aminoácidos e sais inorgânicos. .... | 26        |
| 5.3. Perfil químico dos extratos em escala analítica do fungo <i>Stachybotrys levisporous</i> - UPLC-PDA.....  | 27        |
| 5.4. Design experimental- Fusion.....  | 28        |
| 5.5. Perfil químico dos extratos em micro-escala do fungo <i>Stachybotrys levisporous</i> - UPLC-ESI-qTOF .....  | 29        |
| 5.6. Identificação dos compostos através da espectrometria de massas e a rede molecular GNPS. ....   | 30        |
| 5.6.1 Cluster Griseofulvina – GRI.....   | 32        |
| 5.6.2 Cluster Stachybotrylactama- STAL.....  | 37        |
| 5.7. Isolamento e identificação das substâncias (S1-S5 e T1).....  | 40        |
| 5.7.1 Elucidação estrutural- Substância 1- (S1).....   | 41        |
| 5.7.2 Elucidação estrutural- Substância 2- (S2).....   | 42        |
| 5.7.3 Elucidação estrutural- Substância 3, 4 e 5- (S2, S3 e S5).....   | 43        |
| 5.7.4 Elucidação estrutural- Substância T1.....  | 48        |
| 5.7.5 Reanálise da rede molecular GNPS e a comparação com padrões obtidos.....   | 52        |
| <b>6. CONCLUSÃO .....</b>  | <b>69</b> |
| <b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>  | <b>70</b> |
| <b>8. ANEXOS I.....</b>  | <b>71</b> |

## Capítulo II

|  |            |
|--|------------|
| <b>1. INTRODUÇÃO.....</b>  | <b>142</b> |
| 1.1. Gênero <i>Curvularia</i> .....  | 142        |
| 1.2. Espécie <i>Curvularia inaequalis</i> .....  | 143        |
| 1.3. Complexos metálicos derivados de aminoácidos.....   | 144        |
| <b>2. OBJETIVO GERAL .....</b>   | <b>147</b> |
| <b>3. MATERIAIS .....</b>  | <b>148</b> |
| <b>4. PARTE EXPERIMENTAL.....</b>  | <b>150</b> |
| 4.1. Obtenção do isolados de <i>Curvularia inaequalis</i> .....  | 150        |
| 4.2 Cultivo do fungo <i>Curvularis inaequalis</i> em diferentes meios de cultivo sólido e o preparo de extratos em escala analítica..... | 151        |
| 4.3. Análises do perfil químico do fungo <i>Curvularia inaequalis</i> em diferentes meios de cultivo em escala analítica.....            | 151        |
| 4.4. Crescimento em escala ampliada de <i>Curvularia inaequalis</i> .....  | 151        |
| 4.5. Isolamento e identificação dos metabólitos da parte líquida- Fração Acetato de Etila (FAE).....                                     | 152        |
| 4.6. Isolamento e identificação dos metabólitos do Micélio- Fração EtOH.....   | 154        |
| 4.7 Difração de Raios-X da substância M1.....  | 154        |
| 4.8 Síntese dos complexos metálicos.....   | 154        |
| 4.8.1 Síntese do complexo precursor <i>cis</i> - [Pt(PPh <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ].....                              | 154        |
| 4.8.2 Síntese do complexo precursor [Ag(PPh <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ]BF <sub>4</sub> .....   | 155        |
| 4.8.3 Síntese dos complexos com os aminoácidos L- Ácido Piroglutâmico (M1) e L-Prolina.....  | 155        |
| <b>5. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>  | <b>156</b> |
| 5.1. Reativação do fungo <i>Curvularia inaequalis</i> e o crescimento em diferentes meios de cultivo.....                                | 156        |
| 5.2 Análises do perfil químico do fungo <i>Curvularia inaequalis</i> em diferentes meios de cultivo - Escala analítica.....              | 159        |
| 5.3 Crescimento em escala ampliada de <i>Curvularia inaequalis</i> .....   | 161        |

|  |            |
|--|------------|
| 5.3.1 Isolamento e identificação dos metabólitos da parte líquida-Fração Acetato de Etila (FAE)..... | 163        |
| 5.3.2 Determinação estrutural - Substância PL1 e PL2.....  | 168        |
| 5.3.3 Determinação Estrutural-Substância PL3.....  | 170        |
| 5.3.4 Isolamento e identificação dos metabólitos do extrato etanólico do micélio.....                | 173        |
| 5.4. Síntese dos complexos dos complexos metálicos.....  | 175        |
| <b>6. CONCLUSÃO .....</b>  | <b>179</b> |
| <b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>  | <b>180</b> |
| <b>8. ANEXO II .....</b>   | <b>186</b> |



## CAPÍTULO I

# **ESTUDO METABOLÔMICO DE STACHYBOTRYS LEVISPOROUS E O USO DA REDE MOLECULAR PARA A OBTENÇÃO DE NOVOS METABÓLITOS**

## 1. INTRODUÇÃO

Produtos naturais (PN) produzidos por fungos bactérias e plantas são fontes em potencial para serem usados na indústria farmacêutica e na agricultura. A necessidade de adaptação dos microorganismos à ambientes diversos e a competitividade contra agentes nocivos, fizeram com esses organismos desenvolvessem estratégias e mecanismos de defesa produzindo compostos bioativos com ampla diversidade química (BRAKHAGE, 2013).

Os metabólitos secundários são sintetizados através da atividade catalítica de enzimas e/ou de grandes polipeptídeos multifuncionais. Policetídeos, peptídeos não-ribossomais, terpenóides, alcalóides e derivados do caminho do chiquimato são as principais classes que constituem os produtos naturais (PN), podendo ainda haver a produção de substâncias via combinação dessas rotas. Destaca-se para fungos as vias dos policetídeos (KELLER, 2005).

A diversidade química e estrutural dos PN de origem microbiana são características relevantes que atraem a atenção de pesquisadores de diversas áreas. A presença de centros estereogênicos, anéis fundidos e sistemas spiros despertam interesses que variam desde o desenvolvimento de rotas ou reações de síntese completa à estudos moleculares que auxiliam na compreensão da enzimologia, genética e a regulação biossintética, voltados para potencialização das atividades biológicas (KATZ & BALTZ, 2016).

Dados da Food and Drug Administration (FDA) apontam que cerca de 97% dos fármacos aprovados como agentes antibacterianos são isolados ou derivados de fungos (51%) e bactérias (46%). Os gêneros mais representativos e fontes desses compostos incluem *Streptomyces*, *Penicillium* e *Cephalosporium* (PATRIDGE, 2016)

A quantidade exata desses metabólitos ainda é desconhecida. No entanto, encontra-se na literatura que após a descoberta da penicilina, no século 20, mais de 23.000 moléculas tem sido extensivamente estudadas e caracterizadas (NETZKER, 2015; SEYEDSAYAMDOST, 2014). Porém, apesar do número ser significativo, estudos de biologia molecular apontam que ainda existem muitos a serem descobertos (DU, 2014). Assim, a importância e os benefícios que essas moléculas apresentam, além do potencial inexplorado, atraem investimentos em estudos voltados para emprego de ferramentas que proporcionam a descoberta de novos metabólitos de fontes naturais.

## **1.1. Novas ferramentas para a identificação de metabólitos secundários desconhecidos.**

Durante décadas, a principal fonte de rastreamento de medicamentos antimicrobianos era em culturas de micro-organismos. No entanto, além da possibilidade de se isolar um produto natural já identificado, com o passar do tempo agentes nocivos à saúde criaram resistência aos compostos usados. Assim, a necessidade de desenvolver estratégias mais eficazes emergiram para a descoberta de novas substâncias (ZARINS-TUTT, 2016).

Nos últimos anos, houve um número crescente de revisões publicadas no campo de mecanismos de controle e regulação biossintética de produtos naturais (CHERBLANC, 2013; CRAGG E NEWMAN, 2013; ; CRAGG E NEWMAN, 2013; HILLMAN, READNOUR, E SOLOMON, 2017; SKELLAM, 2018; WIEMANN & KELLER, 2014). O que se observa é que quase todos os autores apontam para o uso de ferramentas que envolvam a exploração genômica, enzimática e o emprego de moduladores epigenéticos (WATANABE, 2014).

O surgimento da era pós-genômica e a aplicação de análises de bioinformática no sequenciamento de genes apresentaram dados interessantes sobre a complexidade e capacidades de genes fúngicos, em ativar as rotas que levam a produção dos metabólitos secundários (SOYER ET AL., 2014). Uma das informações obtidas através de regiões conservadas, os quais codificam as principais enzimas PKS (polyketide synthase) e NRPS (non-ribosomal peptide synthase), é a existência de um número muito maior de genes do que os previstos dentro do genoma (A. A. BRAKHAGE, 2011; SKELLAM, 2018).

Fungos, em geral, possuem um mecanismo regulador na biossíntese de metabólitos que asseguram que a energia para produção dos precursores químicos seja utilizada somente em condições fundamentais para sua sobrevivência. (TAKAHASHI, 2013). A falta da exposição à fatores de estresse faz com que rotas permaneçam silenciadas, dificultando o acesso a novos compostos em condições laboratoriais (ZARINS-TUTT, 2016). Variações na composição do meio, pH, temperatura, luminosidade e adição de moduladores químicos são estratégias empregadas para estimular a produtividade de compostos oriundos das rotas crípticas (TAKAHASHI, 2013), essas últimas serão discutidas a seguir.

## 1.2. Manipulações epigenéticas

O termo epigenética está relacionado às modificações estruturais e conformacionais da cromatina. Estão envolvidas nesse processo alterações em proteínas específicas presentes na remodelagem desse conjunto e que atuam diretamente na expressão gênica (REUTERS, 2011).

As mudanças estruturais pelas quais a cromatina passa são influenciadas pelo substrato das histonas (principais proteínas associadas a ela). Existem dois tipos de histonas, as ligantes e as nucleares. As do tipo ligantes cumprem as funções essenciais em eucariontes que incluem adição/remoção de marcadores epigenéticos na cromatina (ex. Metilação do DNA), enquanto as nucleares são compostas de pares de subunidades que coalecem em octâmeros, e servem como sítios de regulação primária em virtude da sua susceptibilidade a uma ampla variedade de locais de alterações covalentes (ROY-SANYAL, 2011).

As histonas ligantes sofrem modificações de metilações, acetilações, fosforilações, ubiquitilação e sumoilações (SHILATIFARD,2006). No entanto, as modificações mais significativas são as reações do tipo acetilação e metilação. A acetilação, são modificações feitas pela enzima histona acetiltransferase que catalisa a adição do grupo acetil para a histona, aonde é revertido por outra enzima, a histona deacetilase (HDAC). A acetilação de histonas desempenha um papel importante na restrição da abertura da estrutura da cromatina altamente condensada, e resulta na ativação dos genes de transcrição (PFANNENSTIEL-KELLER,2019)

A modificação do tipo metilação é catalisada pela enzima DNA-metiltransferase (DNMT). Os grupos metilas transferidos às histonas são doados pela SAM (S-adenosylmethionine) e se ligam predominantemente às caudas N-terminais dos resíduos de aminoácidos específicos como lisina e arginina, principalmente nas histonas H3 e H4 (SHILATIFARD 2006),e está sobretudo, relacionada ao silenciamento da transcrição(BROSCH, LOIDL, E GRAESSLE 2008).

Os processos de inibição de HDAC ou DNMT estão ligados a ativação do cluster biossintético silenciado. Neste sentido, a adição de emprego de pequenas moléculas químicas têm se mostrado promissoras por alterar a taxa de transcrição de alguns genes e induzir a produção de novos metabólitos secundários. (LIU, 2014)



### 1.3. Emprego de pequenas moléculas para manipulação epigenética

Um conjunto de moléculas de baixo peso molecular emergiu como estratégia para estudos na inibição seletiva ou semi-seletiva da transcrição do DNA ou a modificação postranslacional das histonas. (SELKER, 1998; FISCH et AL. 2009). Essas moléculas se dividem em dois grupos (PFANNENSTIEL E KELLER 2019). O primeiro, inibidores de HDAC, são responsáveis por bloquear e reduzir substancialmente a metilação do DNA dentro do genoma, e como consequência atuar nos mecanismos globais de controle transcricional (FISCH ET AL2009). Um exemplo desse grupo é o ácido hidroxâmico de suberoilânilida (SAHA), que interagem com o sítio catalítico da HDAC. (BRAKHAGE E SCHROECKH, 2011)

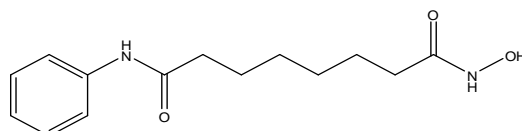


FIGURA 1 - Estrutura química do ácido hidroxâmico de suberoilânilida (SAHA) – Inibidor de HDAC

O emprego de SAHA em culturas de *Beauveria feline* levou a produção de três novos ciclopeptídeos com atividade anti-inflamatória (ZHU, 2018). Em *Aspergillus versicolor*, houve a produção de uma nova bifenila (SHI et al. 2019). Cladosinas H-K FIGURA 2 e outros derivados também foram isolados de *Cladosporium sphaerospermum* pela incorporação desse modulador epigenético ao meio de cultivo (ZHANG, 2018).

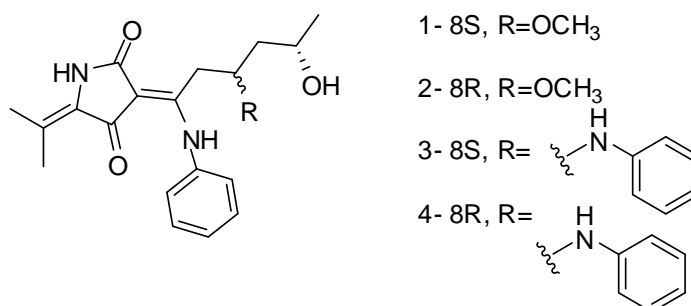


FIGURA 2- Exemplos de estruturas químicas das Cladosinas H-K (1-4), obtidas por incorporação do modulador epigenético SAHA em culturas de *Cladosporium sphaerospermum*.

Classificado como inibidores da DNMT, o segundo grupo envolve a adição de marcadores covalentes ao DNA (por exemplo, a metilação do DNA) (BRAKHAGE E SCHROECKH, 2011). O modulador 5-azacitidina, por exemplo, interage com a metiltransferase, resultando na hipometilação do DNA, e conseqüentemente na reestruturação da cromatina e silenciamento da expressão de gênica em fungos. *Candida albicans*, *Aspergillus spp.*, *Fusarium oxysporum*, e *N. crassa* apresentaram variedade no desenvolvimento dos processos celulares pela adição desse modulador no meio de cultivo (SOYER ET AL., 2014). Outro exemplo que reforça a ação desse modulador foi isolamento de três novas bisabolonas sesquiterpenóides (FIGURA3), e que apresentaram atividades anti-diabética e anti-inflamatória (CHUNG, 2013).

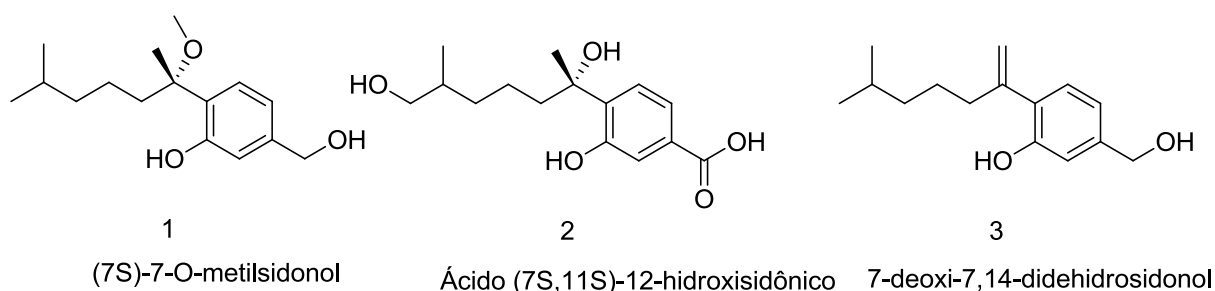


FIGURA 2- Estruturas químicas dos novos bisabolonas sesquiterpenóides obtidos após modificação epigenética.

#### 1.4. Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS)

O surgimento da Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS), em 2012, potencializou a capacidade de dereplicação voltada para a identificação de novas estruturas e análogos (WANG, 2016; GUREVICH, 2018).

Essa rede molecular é composta por nodos, vetores e clusters. O nodo simboliza um espectro de MS/MS, conectados a outros através de vetores (WANG, 2016). Os vetores são gerados a partir da presença de fragmentos homólogos. Assim, os nodos são alinhados através dos escores de cosseno modificado e os vetores agrupam-os em cluster de espectros análogos (FIGURA 3).

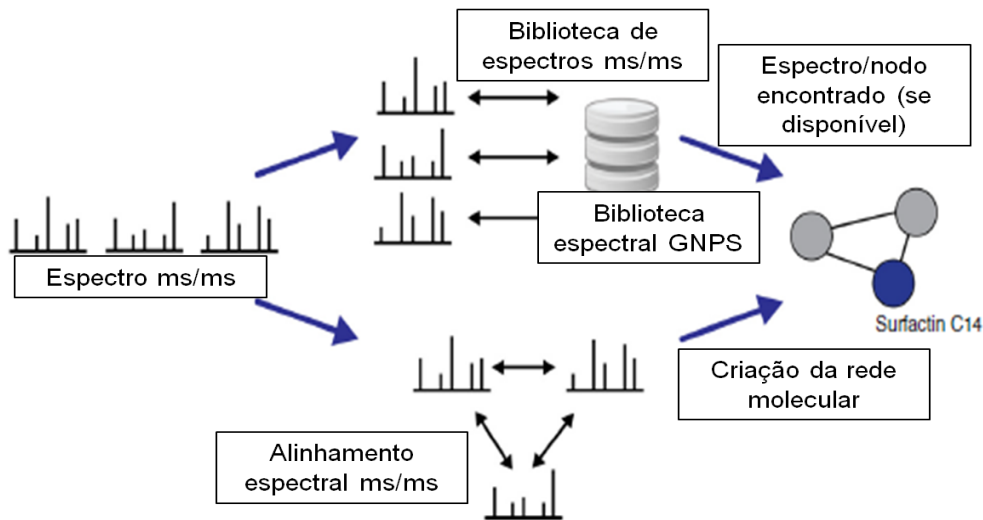


Figura 3- Fluxo de informações e alinhamentos espectrais ms/ms para a construção da rede molecular. Adaptado de WANG (2016).

A rede molecular permite analisar e armazenar dados espectrais, e compartilhá-los com a comunidade científica (SEDIO et. al, 2018). Atualmente a plataforma possui mais de 93 milhões de dados com referências cruzadas de 20 bibliotecas disponíveis on-line, as quais incluem MassBank, ReSpect, mzCloud, Metlin, NIST, ChemBank entre outras. São mais de 22 mil compostos registrados e esse número tende a aumentar à medida que o compartilhamento de informações cresce (JOHNSON e LANGE, 2015).

Os dados dessa plataforma podem ser classificados de acordo com os escores de confiabilidade; Ouro, Prata e Bronze. O escore Ouro é dado quando o espectro de massa foi gerado a partir da caracterização completa da estrutura, obtido via síntese ou isolamento/purificação, e introduzido na plataforma por usuários aprovados. No escore prata, o espectro do metabólito precisa estar associado à alguma publicação, e o Bronze, são escores de espectros de dados de anotações putativa (Wang, 2016).

A ferramenta GNPS desde sua criação foi empregada em diversas finalidades, como por exemplo: o estudo bioguiado e isolamento de novos diterpenos do tipo daphane altamente ativos contra o vírus da chikungunya em espécies de *Novas Caledonias*; a descoberta de novos clusters biossintéticos em espécies de *Salinospora* e o monitoramento e a ativação da produção de compostos oriundos de vias metabólicas silenciados de fungos após modificações epigenéticas, reforçam a versatilidade de sua aplicação. (ALLARD et al., 2016)

A utilidade dessa ferramenta consiste principalmente em evitar o reisolamento de um composto conhecido e aperfeiçoar o processo de identificação, através do rastreamento de análogos de estruturas com atividade descrita na literatura. Desta maneira, é possível relacionar a atividade com estruturas e aumentar as propriedades farmacológicas desse composto.

### 1.5. Gênero *Stachybotrys*

Fungos assexuados do gênero do *Stachybotrys* Corda (1837) foram propostos inicialmente como uma espécie *S. atra* [= *S. chartarum* (Ehrenb.) S. Hughes], do papel de parede de uma casa em Praga. O gênero relacionado *Memnoniella* Von Höhnel (1923) foi descrito quase um século depois. Contudo, uma revisão, Wang (2015) e colaboradores reavaliaram as espécies do gênero *Stachybotrys* e *Memnoniella*, e verificaram que pelo menos sete espécies deveriam constituir um único grupo. De acordo com esses autores, *Memnoniella* é sinônimo de *Stachybotrys*. A classificação de ambas as espécies foi previamente embasada em aspectos morfológicos, levando-se em consideração principalmente as características conidiais. A nova reclassificação feita por esses autores utilizou a correlação entre morfologia e biologia molecular (baseado em cluster de genes), e forneceu uma chave para as espécies *Stachybotrys* e *Memnoniella*, fortalecendo a união deles em um mesmo grupo. No entanto, como a identificação de *Stachybotrys* é mais, adotou-a seguindo o sistema de nomenclatura dual proposto no décimo oitavo Congresso Internacional de Botânica de Melbourne (Austrália), e pelo Código Internacional de Nomenclatura para algas, fungos, e plantas (WANG et al. 2015).

As espécies pertencentes ao gênero *Stachybotrys*, também conhecidos como sapróbios, possuem grande capacidade de degradar material orgânico, e estão amplamente distribuídos, geralmente são encontrados em solo e em extratos ricos em celulose. No Brasil tem-se reportado na literatura oito espécies isoladas do solo, ar e serrapilheira. (LEÃO-FERREIRA, 2013)

Durante expedições realizadas pelo grupo do Prof. Luís Fernando Pascholati Gusmão (UEFS) em novembro/2007 e fevereiro/2008, na Serra do Ramalho - Bahia, na busca por fungos conidiais em amostras de serapilheira (camada formada pela deposição e acúmulo de matéria orgânica morta em diferentes estágios de decomposição), foram encontrados nove espécies; *S. bisbyi* (Sriniv.) G.L. Barron, *S. chartarum* (Ehrenb.) S. Hughes, *S. globosa* P. C. Misra & S. K. Srivast., *S. kampalensis* Hansf., *S. levispora*, *S. longispora* Matsush., *S. nephrospora* Hansf., *S. nilagirica*

*Subram., S. parvispora S. Hughes e S. verrucispora Matsush.* A espécie *S. nilagirica* foi localizada pela primeira vez no Brasil, enquanto *S. levispora* era restrita na Índia, Paquistão e Cuba, foi identificada e citada pela primeira vez para a América do Sul (IZABEL, 2010); (LEÃO-FERREIRA, 2013). As características principais para as espécies de *S. levisporous* (= *M. levispora*), são conídios de parede lisa, no entanto, verificaram-se para as espécies brasileiras, conídios menores do que os esperados e com conidióforos maiores (LEÃO-FERREIRA, 2013).

## 1.6. Justificativa para o uso de fungos sapróbios

A incidência e os níveis de perdas ocasionadas pelo mofo branco da soja causadas pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, tem aumentado em áreas de grande altitude no Cerrado e nas regiões sul do Brasil, causando prejuízos superiores a 60% do total da produção (IZABEL, 2010). Assim, Pascholati e colaboradores, selecionaram fungos sapróbios com potencial para o controle do mofo branco em soja (BARROS, 2015). Os resultados baseados em testes de antagonismos, concluíram que *Myrothecium sp.*, apresentou os melhores efeitos antagonistas em todos os testes e avaliações. Contudo, *S. levispora*, apontou um grande potencial de controle *in vitro* contra *S. sclerotiorum*, inibindo o crescimento deste e de outros patógenos que causam severas doenças em Citrus no Brasil. (BARROS, 2015; RIBEIRO et al. 2018)

Para determinar a base química dessa inibição, uma investigação de *S. levisporous* foi desenvolvida, com o envolvimento de novas ferramentas de análise e modificações no cultivos. Estão descritas na literatura, uma grande quantidade de metabólitos produzidos para os gêneros *Stachybotrys* e *Memnoniella*. Wang e colaboradores em recente revisão reuniram as principais classes desses compostos, apontando como promissores ambos os gêneros. Essa característica foi atribuída por serem fontes em potencial de metabólitos secundários de importância em atividades biológicas (WANG et al. 2015). Até 2014, quase 200 metabólitos secundários pertencentes a diversos tipos estruturais como tricotecenos, triprenil fenóis, diterpenóides, isocromanas, policetídeos, coclioquinonas, peptídeos cíclicos e griseofulvinas foram descobertos para os gêneros *Stachybotrys-Memnoniella* (WANG et al. 2015; JARVIS 2003). Dentre os exemplos das atividades reportadas aos metabólitos supracitados estão:

- Inibição da liberação de TNF- $\alpha$ , ou seja, o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) a qual é considerada uma das principais citosinas relacionadas aos processos

inflamatórios e imunes, agindo em diferentes partes do corpo. Ele é secretado por macrófagos, linfócitos e monócitos, sendo a presença de lipopolissacarídeos bacterianos o principal estímulo para que isto ocorra;

- Antagonistas do receptor de endotelina (ETA), a qual é um peptídeo produzido pelo endotélio (camada de células que recobre a superfície interna dos vasos sanguíneos) em ação vasoconstritora ao se ligar aos seus receptores de endotelina ETA e ETB. ETA é predominantemente encontrado na camada de músculo liso presente nos vasos sanguíneos, e ETB localizado na superfície do endotélio. A endotelina está associada à hipertensão pulmonar e sistêmica, insuficiência cardíaca congestiva, insuficiência renal, remodelagem vascular, câncer e doença cerebrovascular. O bloqueio dos receptores de endotelina constitui atualmente um alvo promissor no tratamento destas patologias;

- Antigripais principalmente frente ao vírus Influenzavírus A;

- Antimalarial;

- Antimieloblastose, Mielocitoma/mielocitomatose ou mieloblastose são sinônimos de Leucose Mielóide, os quais têm sido amplamente utilizados para designar a doença neoplásica causada pelo Vírus da Leucose Aviária subgrupo J (VLA–J). Mieloblastose é uma doença neoplásica das células da medula óssea causada por outras cepas laboratoriais de vírus do grupo leucose/sarcoma aviário (AMV–BAI–A e E26) e que apresentam características anatomopatológicas distintas da Leucose Mielóide;

- Inibição de várias enzimas como a colesterol esterase, tirosina-quinase, farnesil transferase, esqualeno sintase etc. (A. WANG et al. 2015)

A busca por artigos de revisões e informações em plataforma de dados químicos como SciFinder e Web of Science, mostraram que apesar de *S. levisporous* ter sido isolado há mais de uma década (SUBRAMANIAN, 1981), os produtos naturais produzidos por essa espécie são pouco explorados. Assim, iniciamos o estudo químico de *S. levisporous*, a fim de conhecer os metabólitos secundários presentes no extrato do fungo e ainda se eles explicam o potencial *in vitro* encontrado para o controle de *S. sclerotiorum* e outras patógenos que são os principais causadores de prejuízos econômico no Brasil.

## 1.7. Justificativas para a escolha dos sais inorgânicos, aminoácidos e moduladores epigenéticos

Pesquisadores da rede SISBIOTA realizaram o estudo gênomico do *fungo* *S. levisporous*, paralelo ao estudo químico feito pelo nosso grupo (SANTOS, 2015). Os dados moleculares obtidos pelo sequenciamento das regiões ITS foram inseridos no filograma do complexo *Stachybotrys-Memnoniella* e levaram a conclusão de que *S. levisporous* se encontra no clade de *S. echinata*. Para reforçar a informação filogenética, o estudo químico realizado pelo nosso grupo, permitiu o isolamento de substâncias como griseofulvina e análogos (RIBEIRO et al. 2018). Wang e colaboradores apontam que *S. echinata* foi a primeira espécie a produzir griseofulvina fora do gênero *Penicillium* (A. WANG et al. 2015).

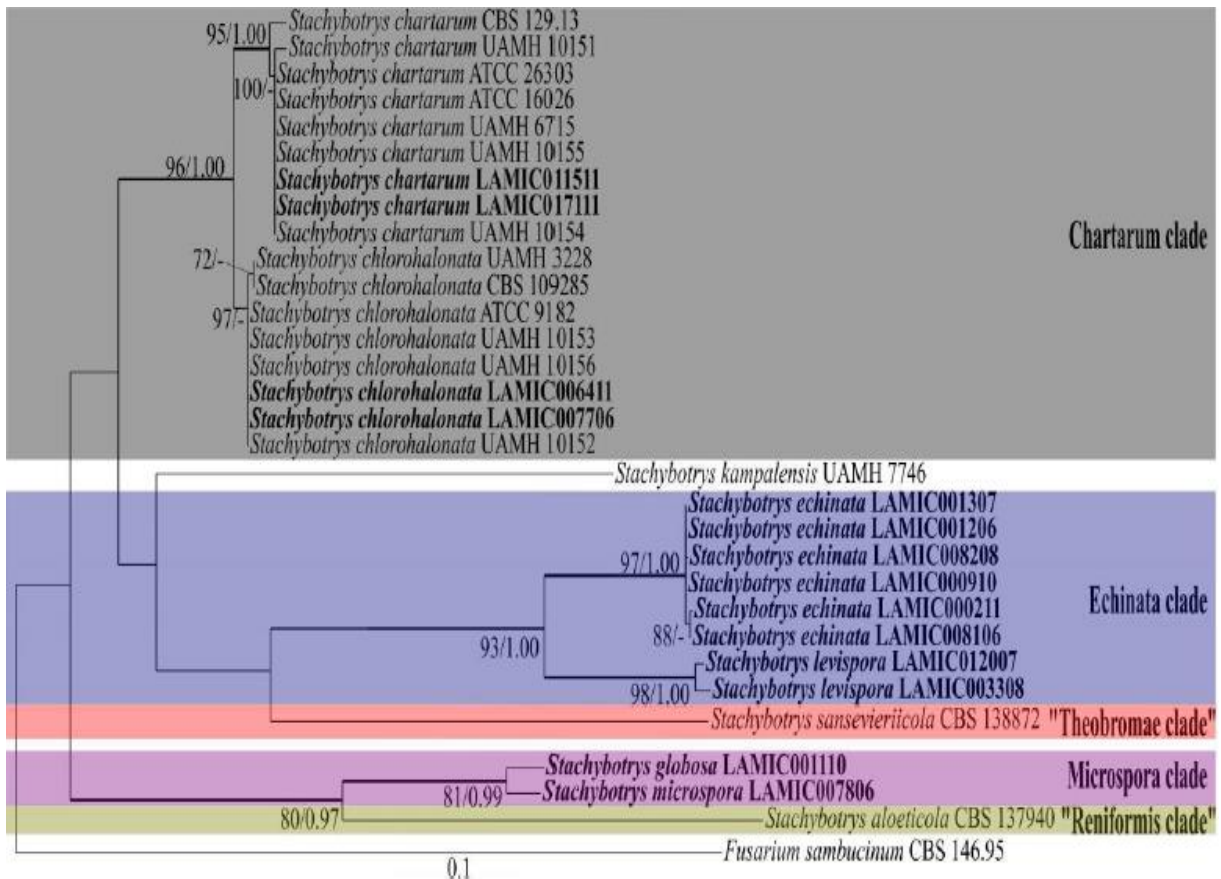


FIGURA 4- Cladograma das espécies *Stachybotrys chartarum*, *S. echinata*, *S.theobromae*, *S.microspora* e *S.reniformis* obtida após análises genômicas e sequenciamento da região ITS

Os dados químicos reforçam os dados genéticos e, portanto, é possível inferir que *S. levisporous* possui enzimas capazes de participar das mesmas rotas biossintéticas que a espécie *S.echinata* utiliza. Yi Tang (2013) e colaboradores

caracterizaram sistematicamente cada enzima da via biossintética da griseofulvina (1), incluindo a caracterização de novas poliketídeo sintase GsfA que sintetiza a benzofenona precursora, a halogenase flavin dependente GsfI e o citocromo P450 GsfF que realiza o acoplamento oxidativo entre o orcinol e o anel clorglucinol para produzir a estrutura do spirociclo e levar ao produto final, conforme esquema da FIGURA 6 abaixo (CACHO et al. 2013). As halogenases flavin dependentes, geralmente catalisam a oxidação de haletos para hipoaaleto e por mecanismos de substituição aromática incorporam os halogênios ao esqueleto (AGARWAL et al. 2017). A tendência de se obter compostos clorados e bromados, através dessas reações, é muito maior do que compostos iodados e fluorados. Geralmente é raro se encontrar compostos naturais fluorados, devido à eletronegatividade do átomo, e o alto custo energético para dissolvatar os fluoretos (AGARWAL et al. 2017. Desta forma, com as informações supracitadas, o emprego dos sais  $\text{NH}_4\text{Cl}$  e  $\text{NH}_4\text{Br}$  seria uma estratégia de fornecer íons para facilitar às halogenases a catalisar a incorporação desses halogênios em posições diferentes no esqueleto encontrado.

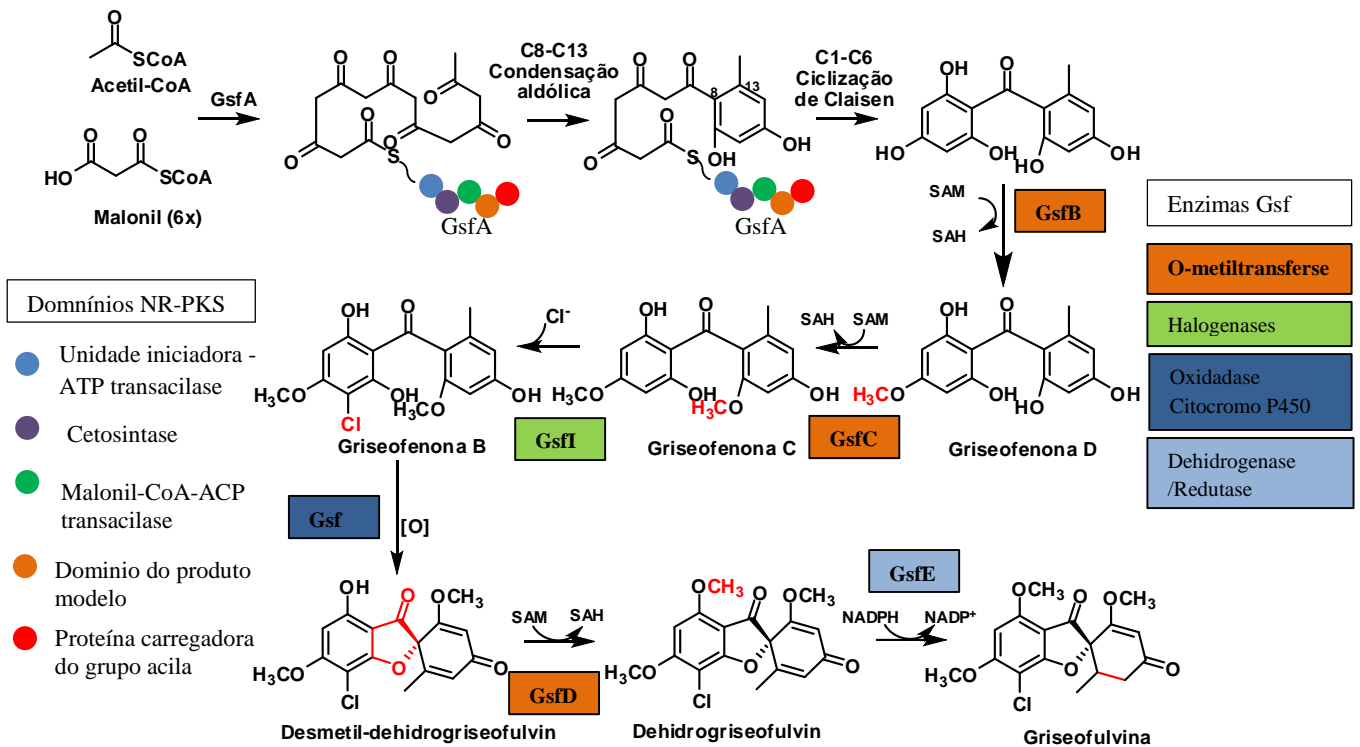


FIGURA 5- Esquema do caminho biossintético para a produção de griseofulvina (1) e as enzimas envolvidas em cada etapa. Adaptado (CACHO et al. 2013).



*Stachybotrys chartarum*, assim como outras espécies do gênero, são caracterizadas por produzir triprenil fenóis (TP), incluindo fenilespirodrimanas e stachybotrinas (JARVIS, 2003) Os fenilespirodrimanas possuem um esqueleto sesquiterpeno contendo um anel benzeno ligado através de um spirodihidrofurano. Este tipo estrutural é marcador quimiotaxonômico para *Stachybotrys* (WANG. et al., 2015). A biossíntese de fenilespirodrimanas é desconhecida. No entanto as propostas biogenéticas sugerem que o ácido orselínico formado por ciclização de um policetídeo se liga a unidade terpênica, pirofosfato de transfarnesila, e este último formando um sesquiterpeno bicíclico, o qual ao se ligar a uma das hidroxilas do ácido orselínico leva ao sistema spirodihidrofuranico (GERIS e SIMPSON, 2009). As stachybotrilactamas provavelmente se formam por ciclização do ácido 3-(2',3'-epoxi)farnesilorsenilico conduzindo a um anel dihidropirano . Contudo ainda não é claro a origem do nitrogênio que forma o anel lactama nessa classe. Em geral essas reações ocorrem por transaminação catalisada por enzimas dependentes do piridoxal-5'-fosfato- PLP (A), ou pela Glutamina-amino-transferases (B) como mostra a FIGURA 7. Glutamato e glutamina são os doadores de nitrogênio em uma ampla variedade de reações biossintéticas.(NELSON e COX, 2011)

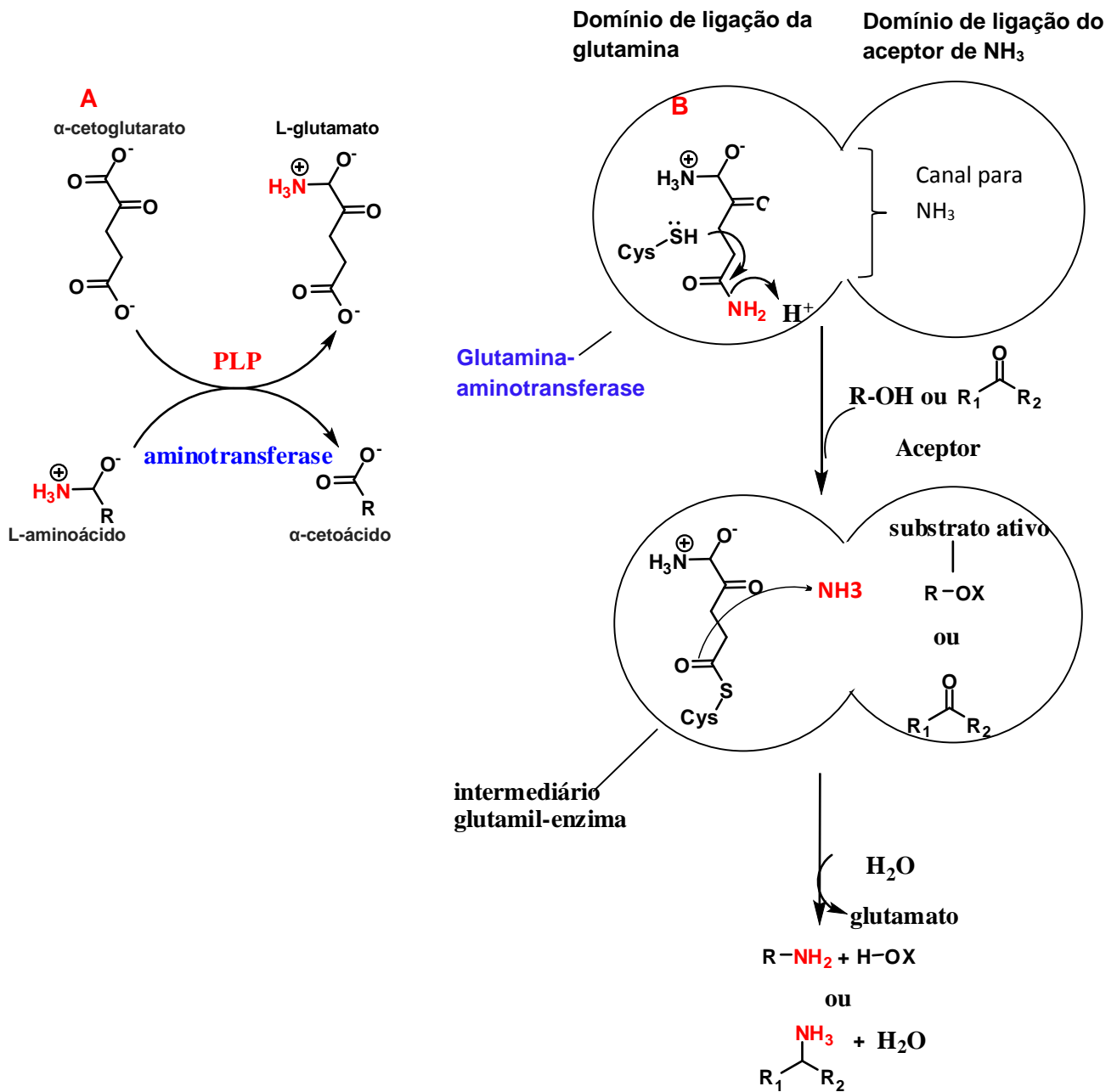


FIGURA 6- Esquema adaptado das reações clássicas de transaminação: Fonte: LERINGHER (2006)

Assim, verificando o papel importante da glutamina, decidiu-se utilizá-la no crescimento de *S. levispora* esperando que esse aminoácido fornecesse aminas necessárias para a produção destes compostos contendo nitrogênio.

O levantamento bibliográfico do perfil químico do gênero *Stachybotrys*, também aponta para produção de stachybotrylactamas e stachybotrynas contendo resíduos de aminoácidos L-fenilalanina, L-tirosina e L-triptofano ligados no nitrogênio da função lactama, como mostram os exemplos A-C FIGURA 8(WANG, 2015)

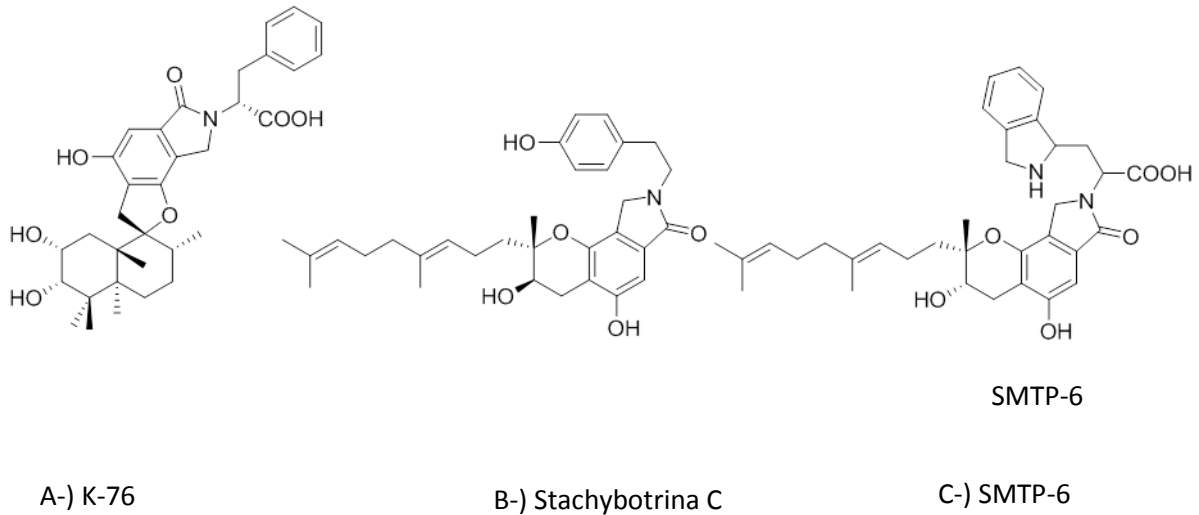


FIGURA 7- Exemplos de stachybotrylactamas e stachybotrynas contendo resíduo de aminoácidos isolados de *Stachybotrys spp*;

Hu e colaboradores aumentaram a taxa de acúmulo e produção de SMTP-6 e outros SMTPs em *S. microspora* suplementando o meio de cultivo com os aminoácidos precursores. Em *Stachybotrys sp. RF-7260*, a suplementação com D-lisina em meio sólido, permitiu o isolamento e identificação de novos fenilspirodrimanas capazes de combater o vírus da gripe (TERUI e KAMIGAUCHI, 2002). Existem outros aminoácidos ligados à lactama, porém, decidimos avaliar *S. levisporous* na presença L-serina e L-alanina para estimular a produção desses compostos.

## 2. OBJETIVO GERAL

O objetivo principal deste capítulo consistiu em estudar a metabolômica do fungo *Stachybotrys levisporous* mediante a alterações nas condições de cultivos com o emprego de aminoácidos, sais inorgânico e realizar o isolamento e identificação dos metabólitos produzidos após essas suplementações, empregando técnicas analíticas e analisando-os pela rede molecular GNPS.

Para isso, alguns objetivos específicos foram propostos;

- Determinar a melhor condição de cultivo para o fungo *S. levisporous* em meio sólido ;
- Realizar o crescimento do fungo crescido em meios de cultivos suplementados com aminoácidos, sais inorgânicos e moduladores epigenéticos e posterior micro-extração;
- Analisar e otimizar o perfil químico de cada extrato suplementados por UPLC-DAD, e UPLC-HRMS;
- Analisar os dados de LC-MS das amostras suplementados pela rede molecular GNPS;
- Realizar experimentos em escala ampliada em meio sólido, para o isolamento e identificação de padrões e substâncias majoritárias por técnicas cromatográficas e espectroscópicas;
- Realizar ensaios de atividade antifúngica com os compostos isolados.

### 3. MATERIAIS

#### 3.1. Solventes

Solvente Grau HPLC: (Merck, Tedia, HoneyWell, J. T. Baker, Panreac)

Solventes Deuterados para RMN: CD<sub>4</sub>OD, CDCl<sub>3</sub> (Merck e Aldrich),

Água ultrapura - Ultra purificador de Água Master System MS2000 (Gehaka)

Solventes P.A, Panreac, Synth

#### 3.2. Meios de cultivo

Batata dextrose ágar - Himedia®,

Aminoácidos; L-serina (>99%, HPLC), L-glutmanina (>99%, HPLC), L-alanina (>99%, HPLC), todos obtidos da Sigma Aldrich®.

Moduladores epigenéticos: 5- Azacitidina (>98%, HPLC) e Ácido hidroxâmico suberoilânida- SAHA (>98%, HPLC) Sigma Aldrich® .

Sais: D-Glicose, NH<sub>4</sub>Cl e NH<sub>4</sub>Br – Synth

##### 3.3.1 Equipamentos

##### 3.3.2 Evaporadores rotativos

BUCHI, rota evaporador R-200 equipado com banho BUCHI B-490 e recirculador refrigerado NESLAB, modelo CFT-25.

##### 3.3.3 Centrifuga

Eppendorf, Centrifuga Modelo 5810 R.

##### 3.3.4

##### HPLC -UV

Agilent Technologies modelo 1200, equipado com bomba quaternária G1311A, degaseificador G1322A, amostrador automático G1329A, e detector de ultravioleta de comprimento de onda variável (VWD) G1314B, forno de coluna G1316A.

Software: Openlab chemstation.

Coluna: C18- Zorbax eclipse e XDB- (4.6 X 150 mm X 5 µm).

### UPLC- PDA-QDA

Acquity H class equipado com detector de arranjo de fotodiodo (PDA) e um detector de massa quadrupolo (QDA) (Waters Corp., Milford, MA, USA). Software Empower® 3.

Colunas Waters: HSS C18 SB (1.8 µm; 2.1X100mm), CSH C18 (1.7 µm; 2.1X100mm), BEH C8 (1.7 µm; 2.1X100mm), CSH fenil-hexil (1.7 µm; 2.1X100mm).

### UHPLC-ESI-qTOF

UHPLC (Shimadzu, Kyoto-Japão) acoplado a um detector de ultravioleta (UV) e ao de espectrometria de massas de alta resolução do tipo quadrupolo por tempo de voo – qTOF (Bruker Daltonics, ) e fonte de ionização electrospray (ESI). Software: Hystar

#### 3.3.5 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Brucker DRX - 9,8 T (400 MHz para RMN 1H), equipado com trocador automático de amostra, sonda de 5 mm BFO (smart probe com ATMA®)

Brucker Avance III - 14,1 T (600 MHz para RMN 1H), equipado com trocador automático de amostra, cryo-sonda TCI (<sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C/<sup>15</sup>N) de 5 mm com ATMA® (Automatic Tuning Matching) sonda BBI de 5 mm com ATMA®

#### 3.3.6 Balanças

Balança Analítica - Sartorius modelo BP 210S

#### 3.3.7 Câmaras de Fluxo Laminar

Veco VL FS-12M

#### 3.3.8 Autoclaves Verticais

Phoenix AV 75

#### 3.3.9 Estufa Incubadora (BOD)

Fanem – 347 CD

#### 3.3.10 Banho Ultrassônico

Branson 1510, Danburcy, CT

## **4. PARTE EXPERIMENTAL**

### **4.1. Obtenção do isolados de *Stachybotrys levisporous***

Os fungos *Stachybotrys levisporous* (STA) foram isolados de regiões do semiárido nordestino pelo professor Luis Fernando Paschoalati Gusmão (UEFS- Universidade Estadual de Feira de Santana) e estão depositados na CCMB (Coleção de Microrganismos da Bahia) na UEFS – BA. Número do depósito 0033/08.

### **4.2. Cultivos dos fungos em meio sólido de Batata-Dextrose-Ágar (BDA)**

Os fungos preservados em método Castellani foram ativados em placas de petri (90X15mm) contendo 20 mL de meio sólido de batata- dextrose- ágar (BDA) 39gL<sup>-1</sup>, previamente esterilizados em autoclaves - 121°C, 1 atm, 20 min. A curva de crescimento no meio de BDA foi construída utilizando como parâmetros as temperatura 20°C, 25°C e 30°C em dias de crescimento 7, 14 e 21, em triplicatas para cada variável. O critério de avaliação da melhor condição de crescimento foi determinado através da área do círculo ( $A = \pi r^2$ ) do micélio em cm<sup>2</sup>. Após 21 dias de crescimento, plugs da região mais extrema do micélio da placa foram transferido assepticamente para outras placas contendo meios sólidos BDA suplementados.

### **4.3. Cultivos dos fungos em meio sólido de Batata-Dextrose-Ágar (BDA) suplementado com moduladores epigenéticos, aminoácidos e sais inorgânicos.**

Foram testados 10 suplementações diferentes no meio sólido BDA. A composição de cada meio está descrita na TABELA 1 abaixo. Os experimentos para o crescimento do fungo foram realizados em triplicatas de cada meio, assim como o preparo do branco (meio sólido sem o inóculo do fungo), utilizando mesma metodologia descrita na secção 4.2.

TABELA 1- Composição das suplementações utilizadas para incorporação no meio de cultivo sólido para o crescimento de *Stachybotrys levisporous* em batata-dextrose-ágar.

| <b>Código</b>      | <b>Composição + BDA</b>          | <b>Concentração</b> |
|--------------------|----------------------------------|---------------------|
| 1- <b>Glut 1%</b>  | L-glutamina                      | 1% m/m              |
| 2- <b>Glut. 5%</b> | L-glutamina                      | 5% m/m              |
| 3- <b>SAHA</b>     | Ácido hidroxâmico suberoilânida) | 100 µM              |
| 4- <b>AZA</b>      | 5-azacitidina                    | 50 µM               |
| 5- <b>Gli 1%</b>   | Glicose                          | 1% m/m              |
| 6- <b>Gli 5%</b>   | Glicose                          | 5% m/m              |
| 7- <b>Cl</b>       | NH <sub>4</sub> Cl               | 50 µM               |
| 8- <b>Br</b>       | NH <sub>4</sub> Br               | 50 µM               |
| 9- <b>Ser</b>      | L-serina                         | 100 µM              |
| 10- <b>Ala</b>     | L-alanina                        | 100 µM              |

#### 4.4. Preparo dos extratos em escala analítica

Os microextratos foram preparados seguindo a metodologia adaptada de Smedsgaard, 1997. Furadores metálicos (5 mm Ø) foram utilizados para furar a placa e retirar plugs de diferentes regiões da cultura. Esse material foram transferidos assepticamente para tubos Falcon, contendo 5 mL de uma solução de MeOH/DCM/AcEOt (1:2:3 v/v), e 1% de ácido fórmico. A extração dos compostos foi feita em banho ultrassônico, por um período de 120 min, e mantidos a temperatura de 30°C. O material resultante foi transferido para tubos de ensaios (100 mL) e centrifugado a 2000 rpm por aproximadamente 5 minutos. Com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, o sobrenadante foi transferido para frascos de vidro de 50 mL e secos em capelas de exaustão de gás, por 24 horas.

#### 4.5. Perfil químico dos extratos em escala analítica do fungo

##### *Stachybotrys levisporous*- UPLC-PDA

Os extratos do fungo foram analisados em um cromatógrafo de ultraeficiência – UPLC Acquity H class equipado com detector de arranjo de fotodiodo (PDA) (Waters Corp., Milford, MA, USA). Utilizou-se a coluna Waters CSH C18 (1.7 µm; 2.1X100mm) como suporte cromatográfico e fase móvel composta por uma mistura de H<sub>2</sub>O(A)/ACN(B) acidificadas com 1% de ácido fórmico em gradiente exploratório de



eluição. O sistema de separação iniciava em 95% de A e 5% B, mantido em isocrático por 2 minutos, em seguida, mantido em gradiente linear até 100% B durante 8 minutos, isocrático por 3 minutos nessa proporção e retorno à condição inicial em 2 minutos.

O volume de injeção, fluxo e concentração da amostra foram respectivamente de 10 µl e 0,400 mL/min, e 1mg/mL. O sistema foi mantido a temperatura constante de 40°C. As faixas de comprimento de onda monitoradas foram de 200 a 400 nm.

#### **4.6. Design experimental- Fusion**

O design experimental cromatográfico foi realizado no software FUSION. As análises foram feitas no UPLC-PDA-QDA (Waters), onde testou-se 4 diferentes colunas de UPLC-Waters; HSS C18 SB (1.8 µm; 2.1X100mm), CSH C18 (1.7 µm; 2.1X100mm), BEH C8 (1.7 µm; 2.1X100mm), CSH fenil-hexil (1.7 µm; 2.1X100mm) nos solventes orgânicos ACN e MeOH, gradiente de eluição e fluxo variável entre 2-8min e 0,2- 0.4 mL/min respectivamente. Temperatura e volumes de injeção foram mantidos constantes a 40°C e 3 µL.

#### **4.7. Perfil químico dos extratos em micro-escala do fungo**

##### ***Stachybotrys levisporous*- UPLC-ESI-qTOF**

As amostras analisadas anteriormente foram diluídas e ajustadas para a concentração de 3µg/mL no mesmo sistema de solvente (H<sub>2</sub>O/ACN). A separação foi feita em um sistema de UHPLC (Shimadzu, Kyoto-Japão) acoplado a um detector de ultravioleta (UV) e ao de espectrometria de massas de alta resolução do tipo quadrupolo por tempo de voo – qTOF (Bruker Daltonics, ) com fonte de ionização electrospray (ESI). A separação dos compostos foi feita em uma coluna Waters HSS C18 (1.7 µm; 2.1X100mm). O método cromatográfico gerado no software fusion e empregado nas análises está descrito na TABELA 2 abaixo.

TABELA 2- Condição cromatográfica obtida pelo método de design experimental-Fusion, para as análises dos perfil químico de *Stachybotrys levisporous* em escala analítica

| Tempo (min) | Solvente A (%) | Solvente B(%) |
|-------------|----------------|---------------|
| 0           | 90             | 10            |
| 1           | 80             | 20            |
| 9           | 0              | 100           |
| 11          | 0              | 100           |
| 13          | 90             | 10            |
| 15          | 90             | 10            |

Os parâmetros de fonte ajustados foram: capilar 4500 V, corona 4000 nA, gás nebulizador (N<sub>2</sub>) mantidos à pressão de 4.0 Bar. A vazão e temperatura de nitrogênio foram 8L /min e 200°C respectivamente. As análises foram adquiridas no modo positivo de full scan e auto MS. Monitorou-se o intervalo de íons entre *m/z* 50 e 1100. Selecionou-se cinco íons precursores de maior intensidade para serem fragmentado em ciclo fixo de tempo (3s) e taxa de exclusão (54s) nos experimentos de auto MS/MS. A fragmentação foi feita no modo de dissociação induzida por ativação colisional (CID). A calibração do equipamento foi ajustada utilizando clusters do padrão de formiato de sódio 5mM em H<sub>2</sub>O/2-propanol 1:1 (v/v) no modelo de regressão linear quadrática. Ao final de todas as análises cromatográficas, a solução do calibrante foi infundida para a correção de massas.

O processamento e aquisição foram feitos no software Data Analysis® 4.0 (Bruker Daltonics, Bremen-Alemanha).

#### **4.8. Preparo dos extratos em escala ampliada- Meio de Batata-dextrose-ágar + 1% de glicose**

Os experimentos de escala ampliada para o meio de BDA e glicose 1% foram realizados conforme descritos na seção 4.3 (pág.38), com número de placas aumentado para 100. Após o período de crescimento do fungo (21 dias), toda a região da placa foi cortada com o auxílio de lâminas de bisturis estéril. O material cortado foi transferido para fracos de vidro de 1L e extraídos com 400 mL de uma mistura de MeOH/DCM/AcEOt 1:2:3 em banhos ultrassônicos por 120 min à 30°C. O extrato

orgânico foi concentrado em rotaevaporadores à temperatura de 35°C. O procedimento de extração com solvente foi repetido por três vezes e os extratos resultantes foram agrupados em um béquer 250mL. O material foi solubilizado em 100 ml de MeOH, e centrifugado a 2000 rpm por aproximadamente 10 minutos, em tubos Falcon. Com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, o sobrenadante foi transferido para frascos de vidro de 50 mL e secos em capelas de exaustão de gás, por 24 horas. As amostras foram pesadas e solubilizadas em uma mistura de solvente H<sub>2</sub>O/MeOH 1:2 (v/v).

#### **4.9. Anotação dos compostos através da espectrometria de massas e da rede molecular GNPS**

Os dados espectrais de MS<sup>2</sup> obtidos na secção 4.7 (pág. 40) em extensão RAW foram convertidos para o formato de dados de espectrometria de massas MzXML pelo software Data Analysis ® (WANG ET AL.,2016). O dados foram compactados através do servidor on-line Core FTP LE e carregados no fluxo de trabalho na secção - criação de rede molecular, disponível no site <https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/static/gnps-splash.jsp>.

Os parâmetros usados na construção da rede molecular otimizados foram; tolerância de massa do íon precursor e do íon fragmento, 1 e 2.0 Da respectivamente, mínimos de pares de cosseno 0.65 e 5 para íons fragmentos semelhantes. O tamanho dos clusters foram restringidos para o mínimo de 2 nodos. Os dados gerados pela rede molecular foram importados e visualizados na plataforma Cytoscape Versão 3.6.1.

#### **4.10. Isolamento e identificação das substâncias- (S1-S5 e T1)**

Os extratos obtidos na secção 4.8 (pág. 38) foram separados em um HPLC 1200 series (Agilent, Waldbronn- Alemanha) equipado com sistema quaternário de solvente, detector de UV e coletor de frações automatizado. Para as análises utilizou-se uma coluna C18- Zorbax eclipse e XDB- (4.6 X 150 mmX 5 µm) e como fase móvel uma mistura de H<sub>2</sub>O (A) ACN (B), conforme (TABELA 3), acidificada com 0.1% de ácido fórmico e fluxo de 1 mL/min. O volume de injeção dos extratos e a concentração

foram 30  $\mu\text{L}$  e 50 mg/mL respectivamente, monitorados no comprimento de onda 254 nm.

TABELA 3- Condição cromatográfica obtida para o extrato do fungo *Stachybotrys levisporous* crescido em de batata-dextrose-ágar e suplementado com 1% de glicose, escala ampliada

| <b>Tempo</b> | <b>Solvente A (%)</b> | <b>Solvente B(%)</b> |
|--------------|-----------------------|----------------------|
| <b>0</b>     | 90                    | 10                   |
| <b>11</b>    | 54                    | 46                   |
| <b>40</b>    | 52                    | 48                   |
| <b>50</b>    | 38                    | 62                   |
| <b>53</b>    | 0                     | 100                  |
| <b>55</b>    | 0                     | 100                  |
| <b>56</b>    | 90                    | 10                   |
| <b>58</b>    | 90                    | 10                   |

O cromatograma gerado a partir da otimização cromatográfica foi utilizado como referência para selecionar os intervalos de tempo para o trapeamento das substâncias. Foram repetidas aproximadamente 50 corridas. Os compostos isolados foram secos e pesados para serem identificados por RMN 1D e 2 D ( $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ) e HRMS.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1. Reativação e cultivo dos fungos em meios sólidos de batata-dextrose-ágar.

Os dados de reativação e crescimento do fungo *Stachybotrys levisporous* em meio sólido de batata-dextrose-ágar estão demonstrados no gráfico da FIGURA 8

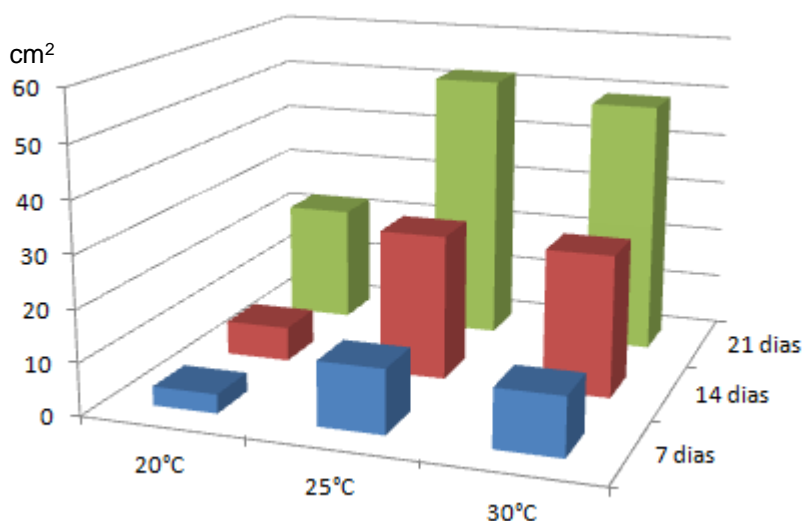


FIGURA 8- Gráfico do crescimento micelial do fungo *Stachybotrys levisporous* em meio sólido de batata- dextrose-ágar em função da temperatura e dos dias de inóculo

Nas temperaturas de 25°C e 30°C o desenvolvimento do fungo é bastante similar, destacando uma variação de 5,87% em 21 dias para a temperatura de 25°C em relação à temperatura de 30°C, aonde a média de crescimento é a maior obtida dentre toda a amostragem (52,03 cm<sup>2</sup>). Em temperaturas menores 20°C, o crescimento de STA é pouco pronunciado, apresentando médias máximas de 25,13 cm<sup>2</sup> no intervalo de 21 dias. Desta maneira, por apresentar melhores condições de desenvolvimento, estabeleceu-se como padrão para os experimentos posteriores com suplementação, 21 dias e 25°C para o meio sólido de BDA.

## 5.2. Cultivos dos fungos em meios sólidos de Batata-dextrose-ágar (BDA) suplementados com moduladores epigenéticos, aminoácidos e sais inorgânicos.

Os fungos foram cultivados em diferentes suplementações e proporções. Abaixo estão as fotos do crescimento de STA em cada meio modificado (FIGURA 9).

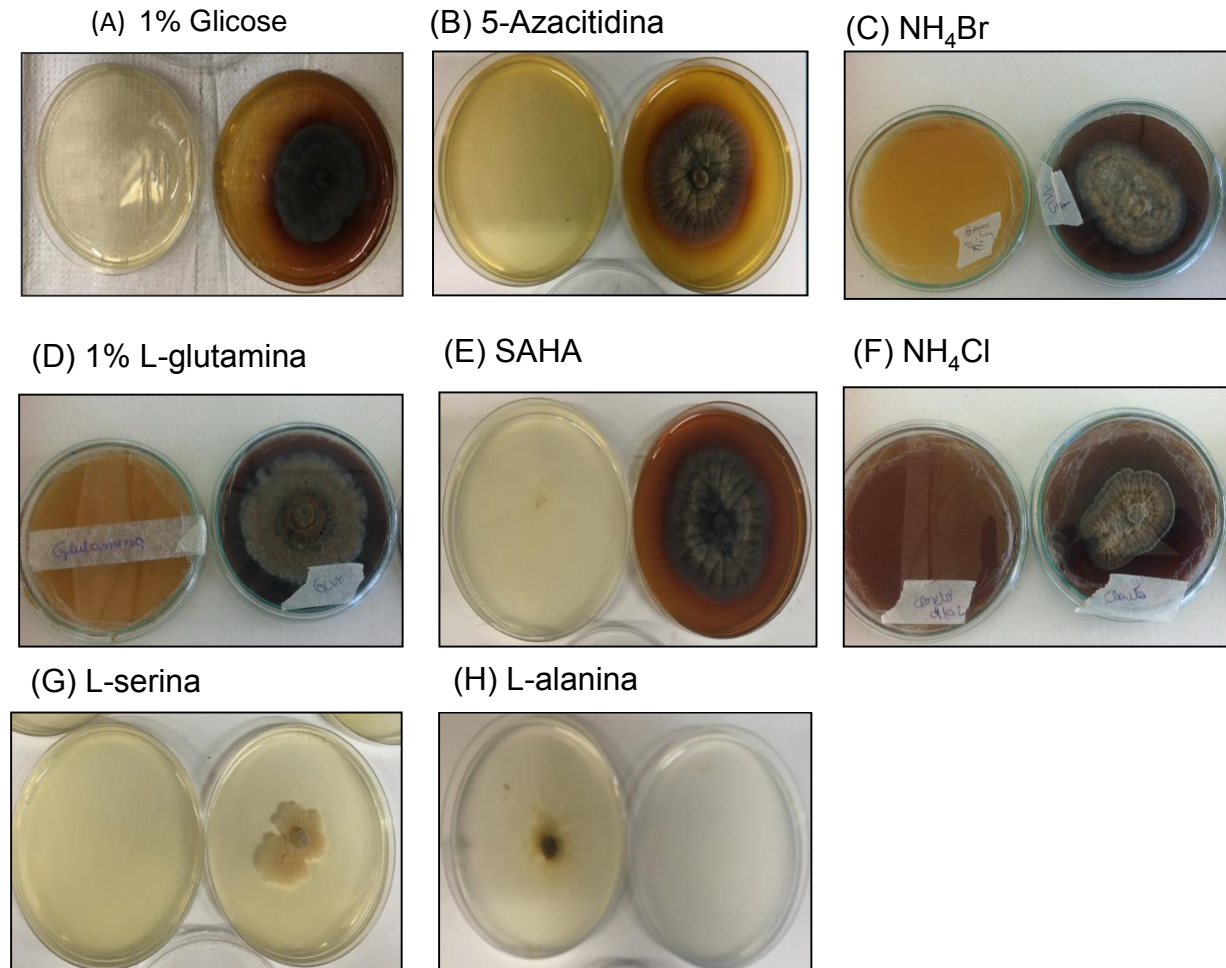


FIGURA 9- Fotos do crescimento do fungo *Stachybotrys levisporous* em meio sólido suplementado com; A-) 1% de glicose, B-) 5-azacitidina, C-)  $\text{NH}_4\text{Br}$ , D-) 1% L-glutamina, E-) SAHA, F-)  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , (G) L-serina e (H) L-alanina

Analisando as figuras acima podemos notar que o fungo apresenta um bom desenvolvimento micelial em quase todas as suplementações, com exceção para os aminoácidos L-serina e L-alanina, aonde o fungo não cresceu. Ao comparar a coloração, nota-se grande similaridade em relação ao escurecimento do meio sólido, com um coloração mais clara na parte superficial do micélio nas suplementações com:

L-glutamina,  $\text{NH}_4\text{Br}$ , e o  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Nas suplementações com 1% de glicose, 5-azacitidina e SAHA, verifica-se que a coloração do meio sólido é um pouco mais clara, com a formação de um halo avermelhado ao redor do micélio mais escura. Testamos um representante de cada grupo contendo halo avermelhado com glicose e L-glutamina nas proporções de 1 e 5% respectivamente (FIGURA 10) e notou-se que em 5% de glicose o fungo se desenvolveu menos do que em 1% de glicose, enquanto que para glutamina apresentou praticamente o mesmo perfil entre as proporções.

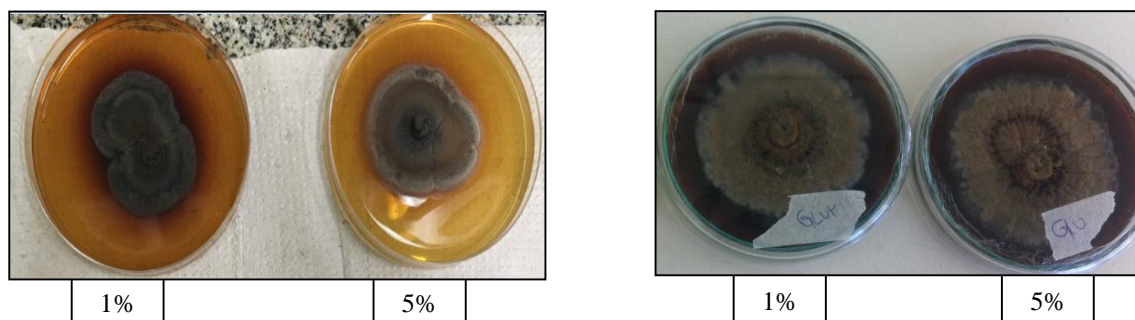


FIGURA 10- Fotos do crescimento do fungo *Stachybotrys levisporous* em meio sólido suplementados com; A-) 1% e 5% de glicose, B-)1% e 5% de L-glutamina

### 5.3. Perfil químico dos extratos por UPLC-PDA do fungo *Stachybotrys levisporous*

As placas com os fungos crescido nos diferentes meios sólidos foram extraídos com a finalidade de se verificar a influência de cada suplementação na produção de metabólitos. Os cromatogramas desses extratos sobrepostos aos cromatogramas dos seus respectivos brancos foram analisados e estão apresentados no APÊNDICE 1 - FIGURA A1.1-A1-8);

A observação feita anteriormente do aspecto físico se repete sob o ponto de vista químico, para L-serina e L-alanina não houve a produção de metabólitos. Em relação ao crescimento com 1% de glicose, podemos notar várias bandas de absorção ao longo de todo o cromatograma, sugerindo a produção de moléculas de diferentes polaridades. Na presença de 5-azacitidina e SAHA, os fungos, apresentaram perfil similar com bandas bem definidas na região com tempo de retenção (t.r) entre 4,0 e 8,0 min. Na presença de L-glutamina, em ambas as proporções, apresentou pouca modificação em relação ao seu branco, com destaque para a suplementação com 5% onde houve o aparecimento de uma banda bem definida no t.r 8.30 min. Analisando a suplementação com os sais, podemos notar que em ambos há o surgimento de

bandas, entretanto, no tratamento com  $\text{NH}_4\text{Br}$  o fungo apresentou perfil de moléculas de polaridade similar, com t.r próximos, enquanto que com  $\text{NH}_4\text{Cl}$  nota-se a produção de moléculas com diferentes t.r, sugerindo polaridades diferentes. Ao fazer a comparação entre todas as análises podemos notar através da quantidade de bandas e em diferentes t.r, que a suplementação com 1% glicose apresenta a maior representatividade em relação à todos os experimentos, ou seja, é a suplementação que produz uma maior quantidade de metabólitos, e portanto, a escolhida para ser utilizada no desenvolvimento de método.

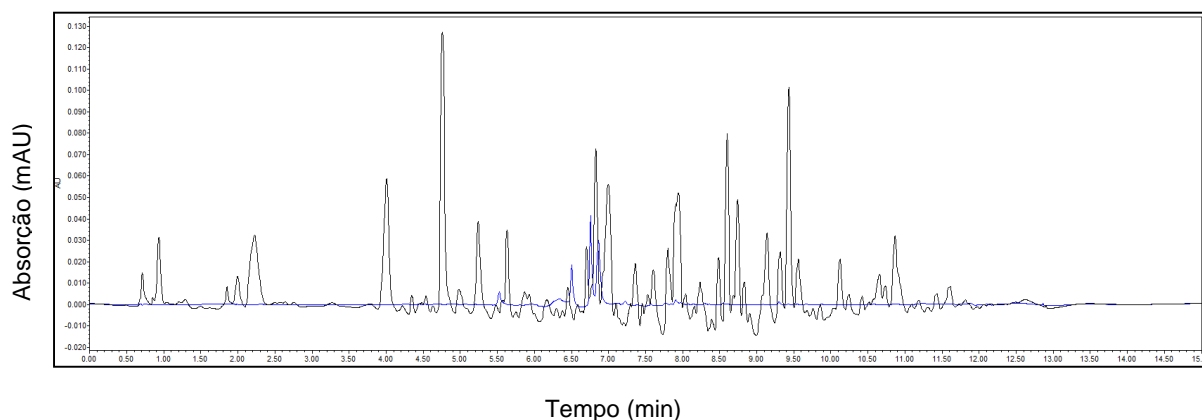


FIGURA 11- Perfil cromatográfico do extrato do fungo *Stachybotrys levisporous* crescido em meio sólido de batata-dextrose-ágar e suplementado com 1% de glicose (em preto) e o controle (em azul) sem a presença do fungo,  $\lambda = 254\text{nm}$ .

#### 5.4. Design experimental- Fusion

Para otimizar o tempo das análises de HRMS e facilitar a identificação dos compostos por espectrométrica de massas, utilizou-se o software de design experimental Fusion. Esse software permite o desenvolvimento de métodos rápidos que combinam o tipo de cromatografia (fase normal, reversa, HILIC- interação cromatográfica hidrofílica, troca iônica e exclusão), além de fazer escolhas de misturas de solventes, pH, mudança de temperatura, fluxo gradiente e volume de injeção.

Para os experimentos realizados utilizaram-se as variáveis, colunas (no modo reverso), fases orgânicas (MeOH, ACN), fluxo (0,2-0,4mL/min) e tempo de gradiente de solvente (2-8 min), gerando um total de 52 análises. Ao final dos experimentos o gráfico de cores foi gerado (FIGURA 12). As cores mais quentes representam as maiores quantidades de bandas encontradas para cada conjunto de experimentos, conforme mostrado na legenda abaixo. A coluna 3 [HSS C18 (1.7  $\mu\text{m}$ ; 2.1X100mm)] e



a fase orgânica ACN exibiram as melhores respostas pelo software. Observa-se no gráfico da FIGURA 12, que a partir de 8 min de gradiente o número de bandas cresce conforme aumenta-se o fluxo de solvente. Desta maneira, por apresentar um número de bandas >50 optou-se por realizar as análises com a seguinte condição; coluna 3 , solvente ACN, utilizando 8 minutos de gradiente linear e fluxo de 0,4 ml/min.

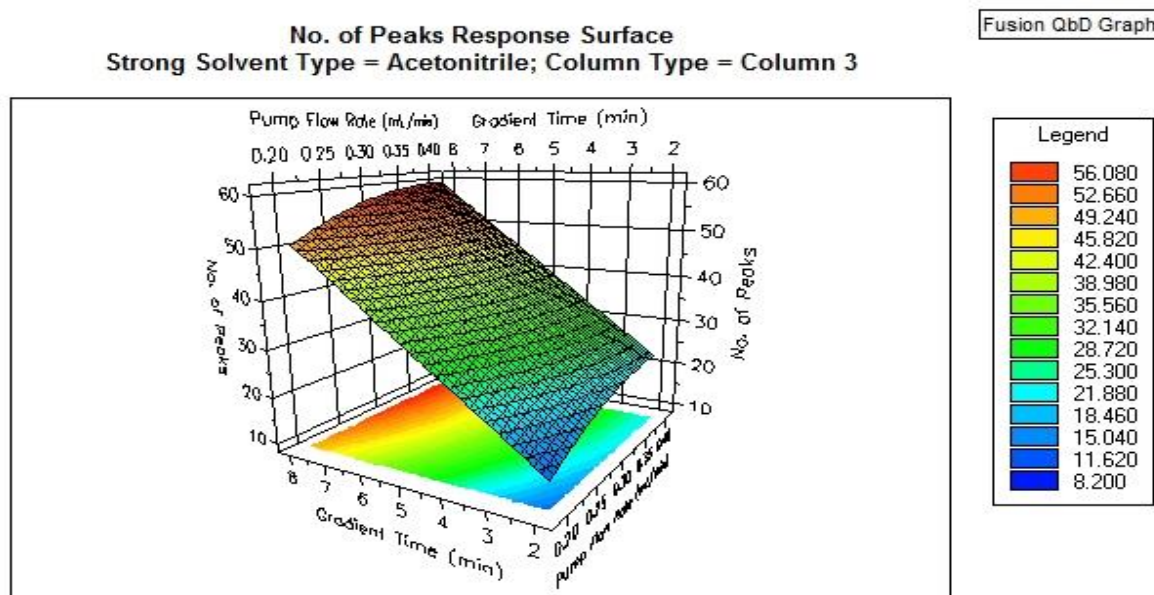


FIGURA 12- Gráfico do design experimental pelo software Fusion para desenvolvimento do método cromatográfico com as amostras de extratos de *Stachybotrys levisporous* crescido em meio de batata-dextrose-água e suplementado com 1% de glicose

## 5.5. Perfil químico dos extratos do fungo *Stachybotrys levisporous* por UPLC-ESI-qTOF

As amostras dos extratos foram analisadas em um UPLC-ESI-qTOF, com exceção dos extratos de L-serina e L-alanina, por não apresentarem produção de metabólitos expressivas nas condições testadas; e 5% de glicose e 1% de glutamina, por serem bastante similares à suas proporções dos meios correspondentes. Os cromatogramas de íons totais foram gerados por experimentos de Auto MS e MS/MS. Os dados foram convertidos para MzXML e inseridos na plataforma GNPS.

A tolerância de íons, um dos parâmetros selecionados nas análises pela plataforma GNPS, é o valor mensurado para a diferença entre dois íons precursores. A faixa de 0,002 e 2 Da varia de acordo com a sensibilidade de cada equipamento. O recomendado são faixas com valores menores que 0,02 Da para as massas de alta resolução, que representariam uma diferença máxima 40 ppm para moléculas

pequenas. O mesmo conceito aplica-se para a variável íon fragmento. Assim, tratando-se de um HRMS-QTOF, onde foram realizadas as análises, o valor escolhido foi 0,02 Da para ambos os parâmetros.

O parâmetro de escore de cosseno é uma medida utilizada para mensurar a similaridade entre dois vetores. Essa medida deriva (no âmbito da matemática) da análise do cosseno do ângulo entre dois vetores, aonde o cosseno de um ângulo sempre varia entre 0 e 1, e como consequência ângulos mais próximos a zero graus tendem a 1 e a apresenta grande similaridade entre si. Em outras palavras, os pares de vetores avaliados no parâmetro da plataforma GNPS, se agrupam com uma similaridade muito maior quando o valor do cosseno for próximo de 1. Valores ao redor deste número restringem muito o agrupamento, apontando apenas para aqueles “idênticos”, enquanto que valores muito baixos exibirão muitas combinações, porém com pouca similaridade entre eles. Assim se tratando de busca na identificação de análogos, valores acima de 0.7 estariam dentro do recomendado, e portanto, o utilizado nas análises. Ainda se tratando de similaridade, o parâmetro número mínimos de íon fragmentos similares, é o que restringe o quão similar um composto pode ser agrupado a outro de acordo com a análise de seus fragmentos. O número fixado em 1 poderia atrapalhar na identificação de análogos, pois apresentaria apenas um único fragmento de similaridade. Por outro lado, valores acima de 10 prejudicam se a molécula não apresentar muita fragmentação. O valor sugerido pelo software é 6 e dentre as tentativas que fizemos este foi o que mais de adequou ao objetivo do trabalho.

Os dados gerados a partir da plataforma GNPS foram inseridos no software Cystoscape para facilitar a visualização das redes moleculares.

## **5.6. Anotação dos compostos através da espectrometria de massas e da rede molecular GNPS.**

Para elucidar a diversidade química de *S. levisporous* sob a influência da variação do meio de cultivo, as seis amostras preparadas em escala analítica com as suplementações de 5% de L-glutamina, NH<sub>4</sub>Br, NH<sub>4</sub>Cl, 1% de glicose, SAHA e 5-azacitidina foram perfiladas pela técnica de LC-HRMS e os dados de MS<sup>2</sup> foram organizados como rede moleculares para mapear o espaço espectral da amostragem. A rede molecular resultante (FIGURA 13) é composta por 913 nodos, 513 destes estão conectados e distribuídos em 68 clusters. Cada nodo é representado com um

gráfico de pizza em 6 cores, que corresponde à contribuição de cada meio de cultivo para a produção do íon. Os clusters estão divididos em três tipos diferentes: os que contêm um grande número de aglomerados com correlações entre os espectros MS/MS, seguido dos clusters com números menores de nodos ligados, e clusters com nenhuma correspondência espectral. O terceiro tipo de cluster (sem componente de correlação) foi descartado da nossa análise.

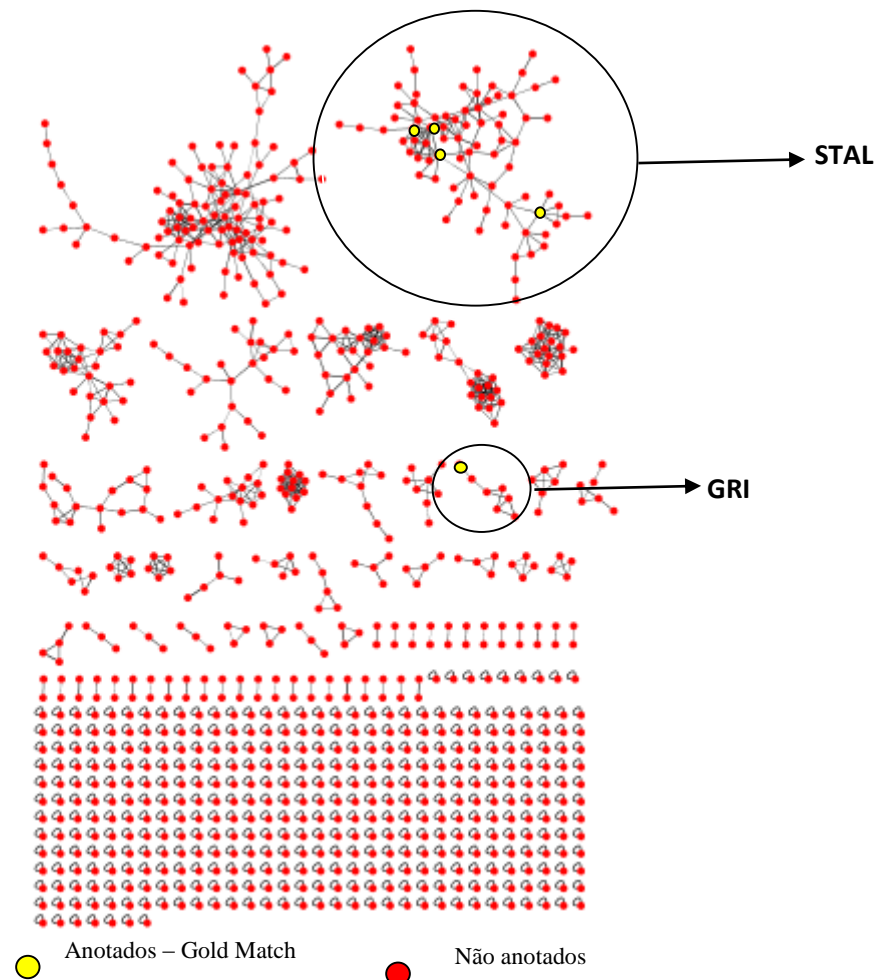


FIGURA 13- Rede molecular calculada para os dados de LC-MS/MS das amostras de extratos de *Stachybotrys levisporous* crescido em batata-dextrose-ágar e suplementados com L-glutamina,  $\text{NH}_4\text{Br}$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 1% de glicose, 5-azacitidina e SAHA. A anotação dos nodos pela plataforma GNPS com anotação “gold” estão representadas em amarelo e os não anotados em vermelho

Os resultados encontrados, apontaram 14 nodos anotados, e destes apenas cinco relacionados ao escore de ouro. Para facilitar a discussão dos dados, os clusters contendo nodos anotados com escores máximos foram divididos em 2 grupos, atribuindo-se o nome do cluster aos metabólitos mais representativos; Griseofulvina (GRI) e Stachybotrylactama (STAL), conforme demonstrado na FIGURA 13, e que serão discutidos a seguir.

### 5.6.1 Cluster Griseofulvina – GRI

O cluster GRI composto por 7 nodos (GR1-GR7) (FIGURA 14) possui apenas a griseofulvina anotada pela plataforma, GR1 (m/z 353.061). Analisando os íons fragmentos (ANEXO 1, FIGURA A 10) e comparando-os com dados da literatura, podemos afirmar que a atribuição é correta. Cinco outros nodos foram investigados e através dos espectros de massas MS/MS (ANEXO 1 A.1 11 – 16) identificados como sendo 7-declorogriseofulvina (GRI 2), 7-declorodehigriseofulvina (GRI 3), dehidrogriseofulvina (GRI 4), 12-cloro-13-hidroxi-3,5,9,11-tetrametoxi-1-metilbenzofenona (GRI 5), 13-hidroxi-3,5,9,11-tetrametoxi-1-metilbenzofenona (GRI 6) (Ribeiro et al., 2018) (ver estruturas pág. 55). A rápida atribuição das estruturas aos nodos foi possível, pois esses metabólitos já haviam sido isolados de *S. levisporous* e bem caracterizados em estudos prévios feitos pelo nosso grupo (RIBEIRO et al. 2018). Para a determinação da estrutura desconhecida GR7, a comparação dos íons fragmentos poderia ser feita tanto com GRI 5 quanto com GRI 6, no entanto, o valor do vetor de similaridade de GRI6 (0.904) > GRI5 (0.833), sugere que a primeira possua estrutura mais próxima à GR7 e portanto o escolhido para ser trabalhado.

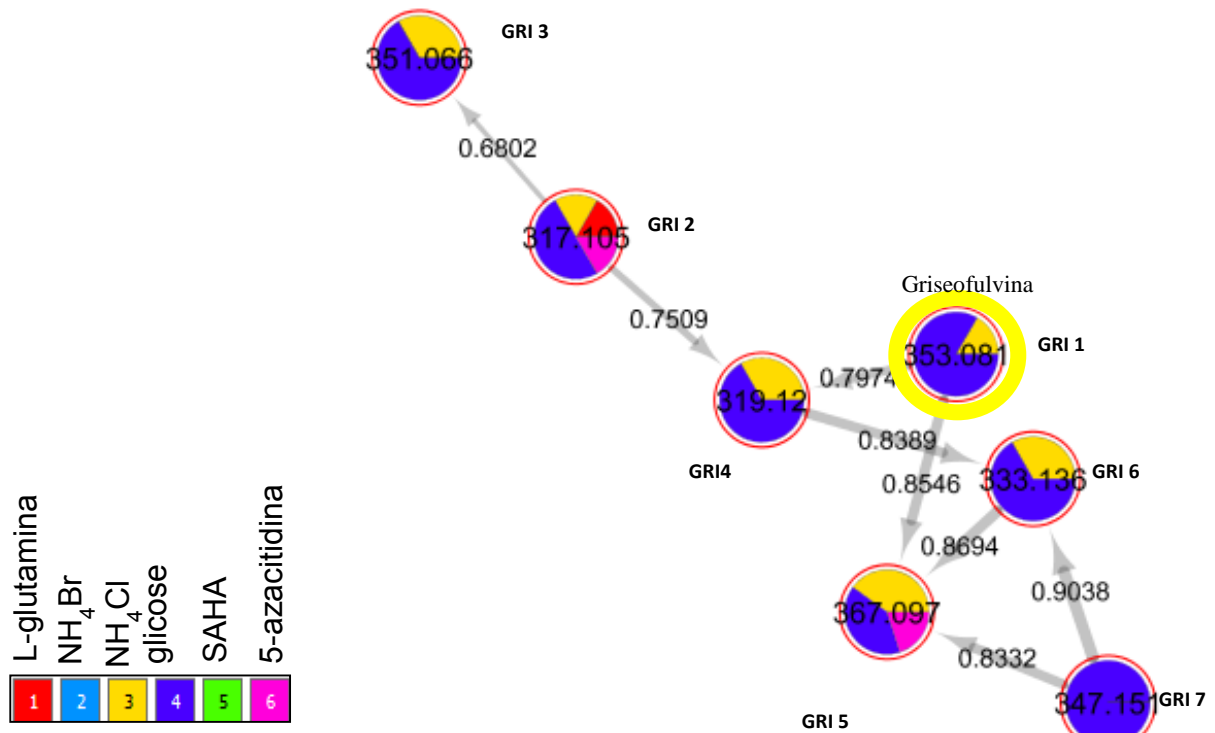


FIGURA 14- Parte da rede molecular calculada para os dados de LC-MS/MS das amostras de extratos de *Stachybotrys levisporous* crescido de batata-dextrose-ágar e suplementados com L-glutamina (vermelho),  $\text{NH}_4\text{Br}$  (azul claro),  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (amarelo), 1% de glicose (azul), SAHA (verde) e 5-azacitidina (rosa) correspondentes ao cluster griseofulvina

Comparando os espectros de massas (MS/MS) de GRI6 e GRI7 da FIGURA 15 e 17, ambos apresentam o mesmo íon base ( $m/z$  179.069) e fragmentos de  $m/z$  136.051, diferindo fundamentalmente nos íon  $m/z$  195.064 e 181.050 respectivamente.

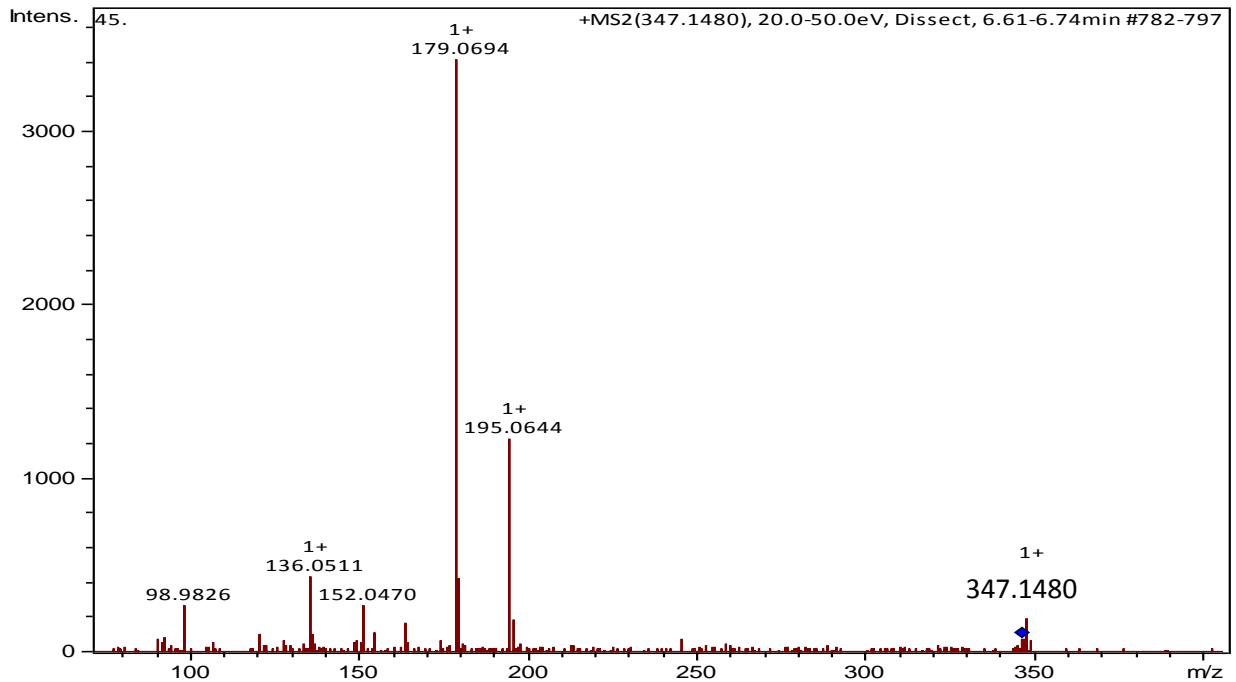


FIGURA 15- Espectro de massas MS/MS de GRI7 do íon 347.1880 [M+H]<sup>+</sup>, 20-50eV.

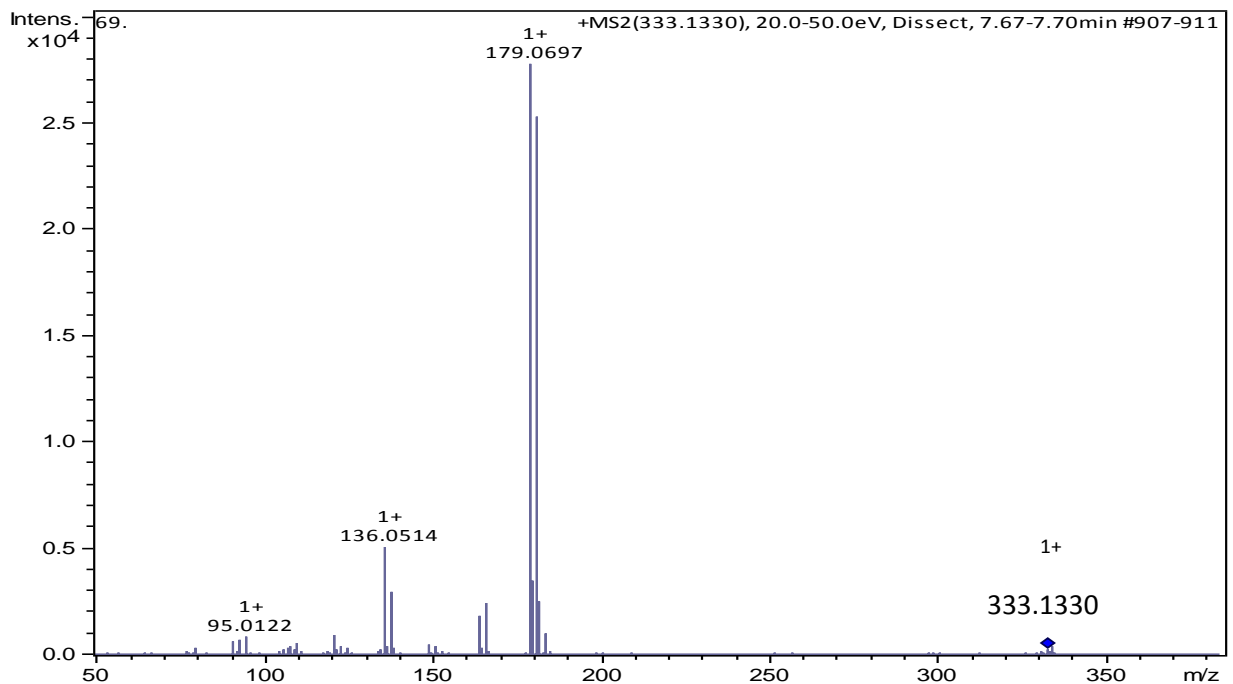


FIGURA 16- Espectro de massas MS/MS do íon 333.1330 [M+H]<sup>+</sup>, 20-50eV.

Os mecanismos de fragmentação propostos para GRI 6 estão representados na FIGUR 18. Ao comparar o mecanismo e os íons gerados, podemos inferir que a molécula GR7 possui parte da estrutura igual à GRI 6, representado pelo caminho (a) e confirmado pelo presença do íon base. A diferença de uma unidade -CH<sub>2</sub> pôde ser localizada pelo mecanismo (b), aonde os íons mais intensos citados anteriormente

explicariam a diferença na estrutura proposta. A fórmula molecular gerada  $C_{19}H_{23}O_6$  corresponde à  $[M+H]^+$  346.1489 obtido experimentalmente (Erro 1,15 ppm) foi atribuída à estrutura Metanona (2,4-dimetoxi-6-metilfenil)(2,4,6-trimetoxifenil). Esse é o primeiro relato de GRI6 associado a uma fonte natural.

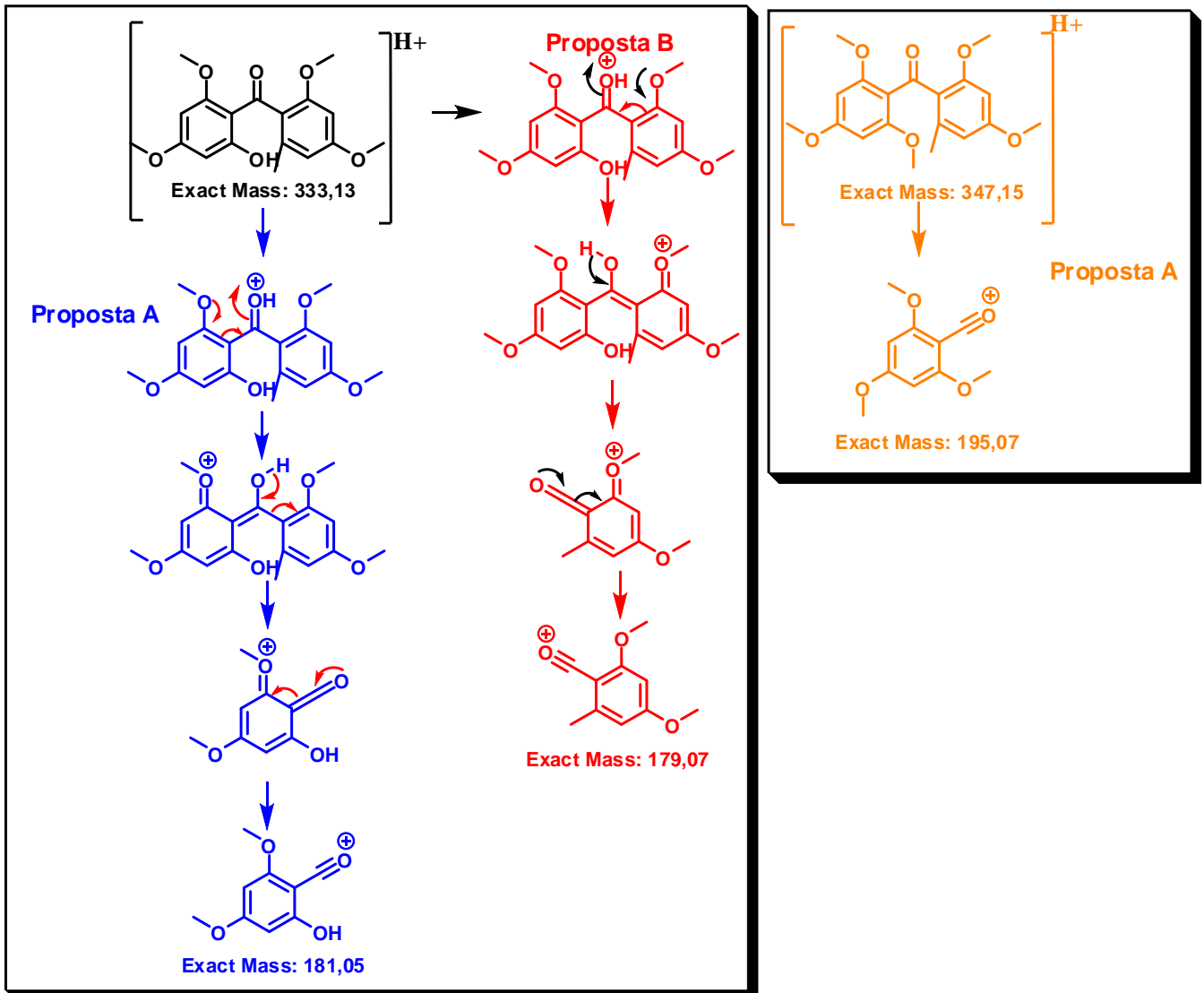


FIGURA 17- Mecanismo de fragmentação proposto para GRI 6 e GRI 7.

A representação do cluster de Gri com as estruturas associadas estão demonstradas na FIGURA 19 abaixo.

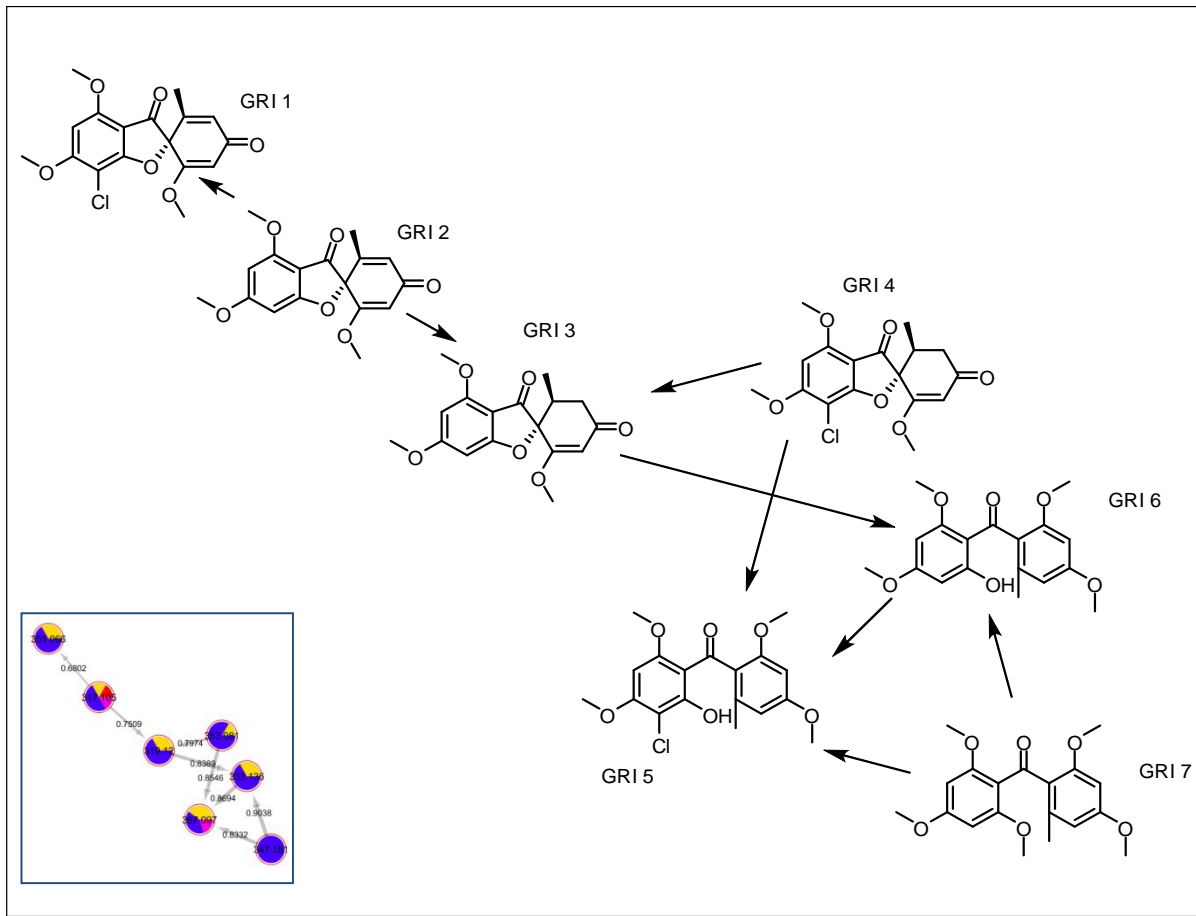


FIGURA 18- Representação das estruturas químicas correspondentes aos nodos apontados no cluster GRI.

A coloração azul predominante no cluster, seguida da amarela representa a influência do meio de cultivo glicose e  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , respectivamente, na produção de griseofulvina e análogos. A glicose é o precursor universal das principais vias biossintéticas de metabólitos secundários, tais como policetídeo, mevalonato, chiquimato e a dos alcalóides. A biossíntese da griseofulvina, demonstrada anteriormente, ocorre pelo caminho dos policetídeos. O mecanismo de reações dessa via inicia-se pela conversão da unidade D-glicose para Acetil-Coa piruvato (DEWICK, 2009.). Assim o resultado obtido, condiz com o esperado, de modo que aumentar a disponibilidade de glicose poderia proporcionar maior produção de todas as vias, incluindo a dos policetídeos.

As substâncias cloradas presente no cluster GRI foram influenciadas pelo enriquecimento de íon  $\text{Cl}^-$ . Atribuí-se a esse resultado ao fato de *S. levisporous* possuir



halogenases flavin dependentes que catalisam a incorporação desse íon ao substrato, conforme discutido na seção 1.7 (pág. 30).

### 5.6.2 Cluster Stachybotrylactam- STAL

O cluster STAL pertence à divisão do grupo 1, devido à grande quantidade de nodos, no total são 78 ligados uns aos outros (FIGURA 19). Os metabólitos anotados (destacados em amarelo no cluster) foram stachybotrylactama (STAL 1), fenilspirodiidrobenzopirrolidin-2-imina-drimano (STAL 2) chartarlactam E (STAL 3) e stachybotramida (STAL 4). A metabolômica de *S. chartarum* é conhecida pela produção de triprenilfenóis, que incluem stachybotrinas, kampanols, stachyflinas, SMTPs e fenilspirodrimanos. No entanto, em estudos feitos com espécies de *S. chartarum* isolados de várias partes do mundo, os metabólitos do tipo spirociclodrimanas são predominantes produzidos por essa espécie (MILLER e MCMULLIN, 2014).

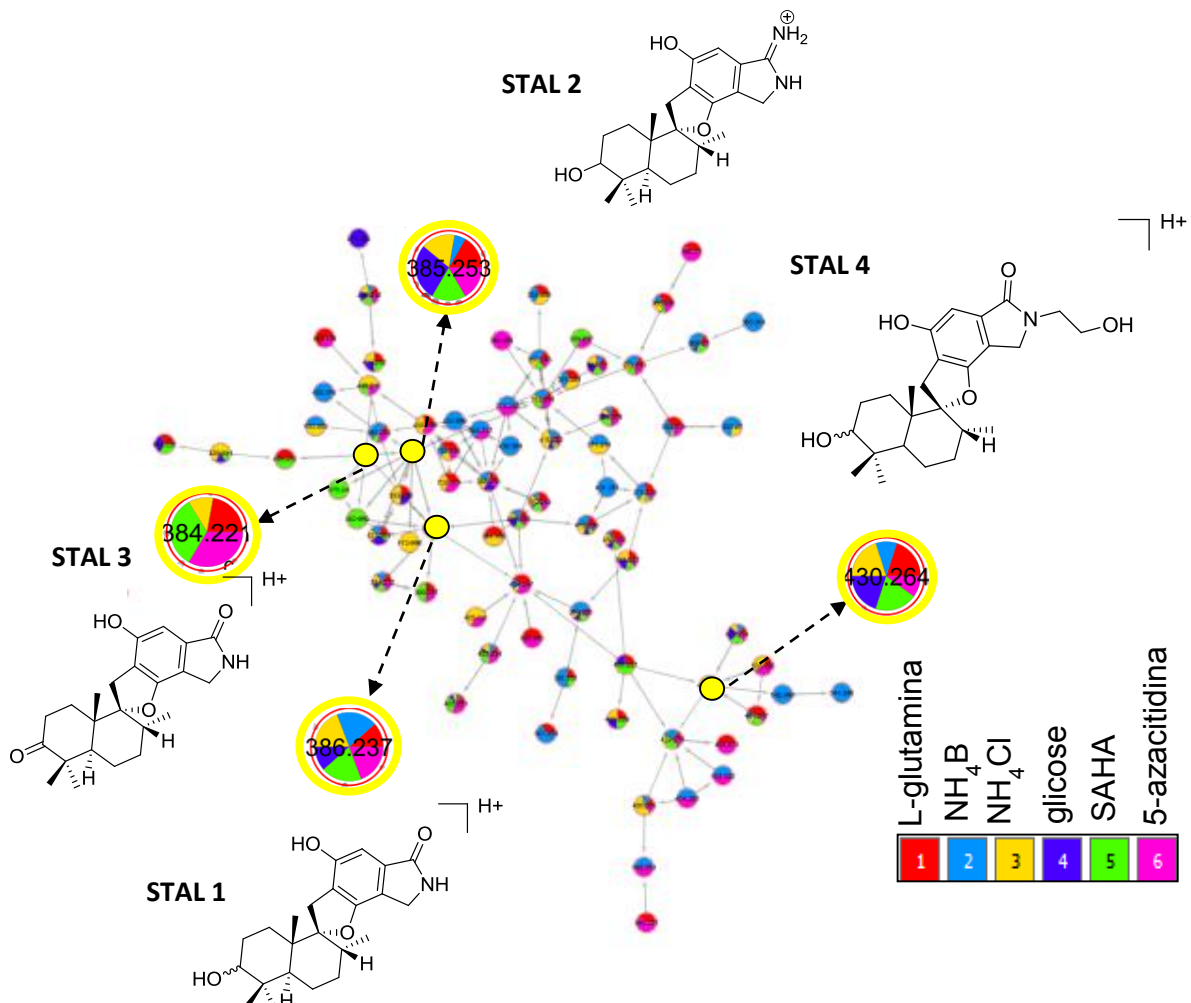


FIGURA 19- Rede molecular calculados para os extratos de *Stachybotrys levisporous* crescido de batata-dextrose-ágar e suplementados com: L-glutamina (vermelho), NH<sub>4</sub>Br (azul claro), NH<sub>4</sub>Cl (amarelo), 1% de glicose (azul), SAHA (verde) e 5-azacitidina (rosa).

O resultado apontado pela rede molecular condiz com o esperado, pois *S. chartarum* é filogeneticamente próximo à *S. Levisporous*. Desta maneira, há uma tendência a produzir compostos com esqueleto similar. Estudos de fragmentação desses metabólitos são escassos na literatura. Assim, para verificar a veracidade dos resultados obtidos, propostas de mecanismos de fragmentação foram feitas com base no estudo de cada espectro de MS<sup>2</sup>. O espectro MS<sup>2</sup> da substância stachybotrylactama (STAL1) apresenta  $m/z$  386.2327 [M+H]<sup>+</sup> (Erro= 0.3 ppm) para a fórmula C<sub>23</sub>H<sub>31</sub>NO<sub>4</sub>, correspondente à 9 graus de insaturação (FIGURA 20). O mecanismo proposto para a fragmentação de STAL 1 está demonstrado na FIGURA 22. a seguir.

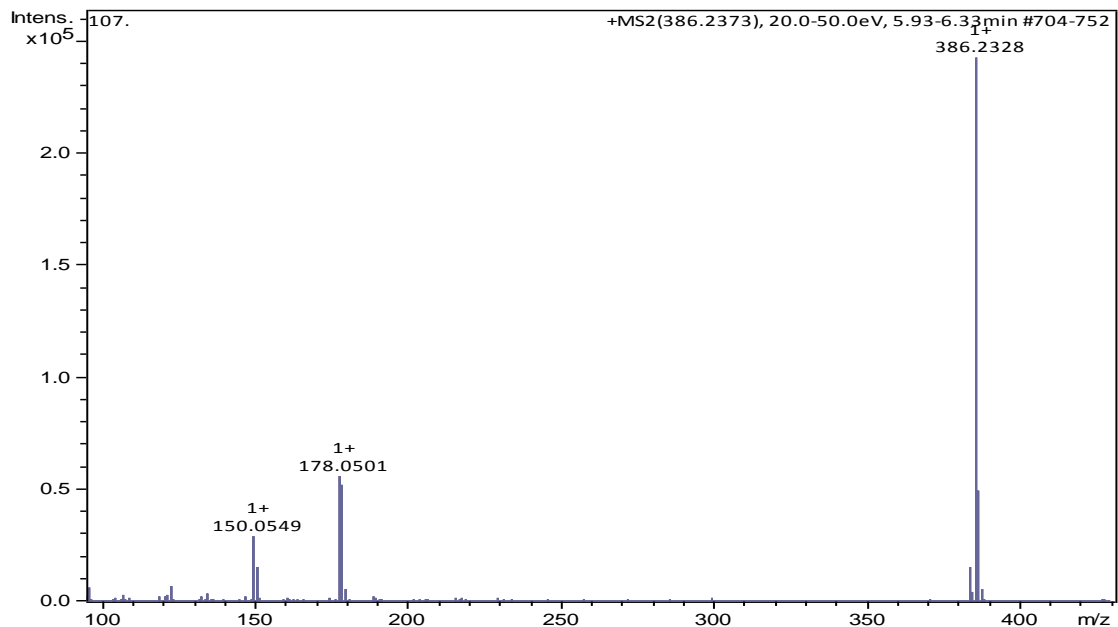


FIGURA 20- Espectro de massas MS/MS do íon  $m/z$  386.2328 referente à molécula protonada [M+H]<sup>+</sup> STAL 1- 20-50eV.

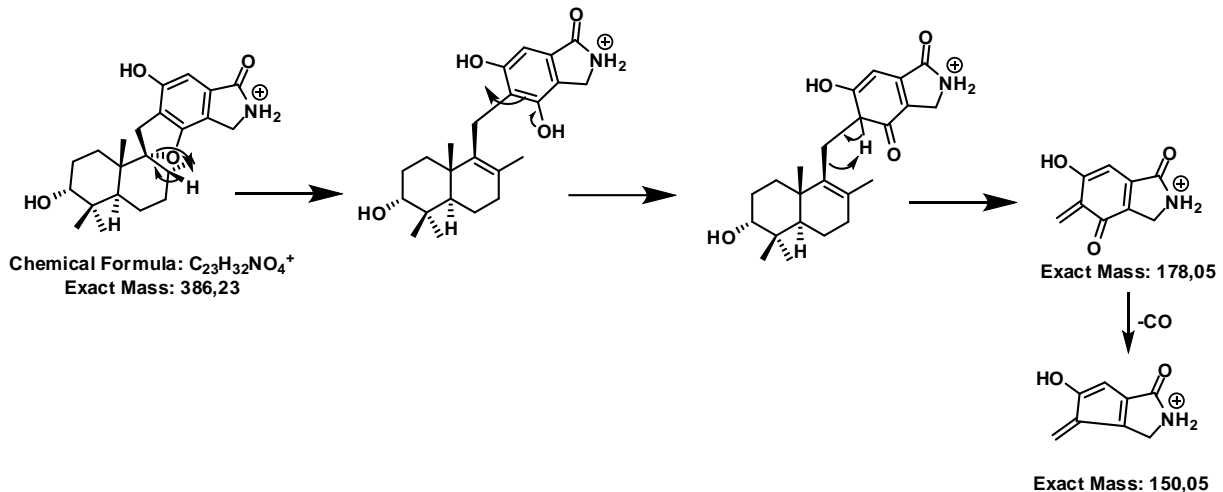


FIGURA 21- Mecanismo de fragmentação proposto para stachybotrylactama (STAL1).

À medida que o esqueleto base dos metabólitos **STAL 2 - 4** é o mesmo, diferindo apenas nos substituintes conforme FIGURA 22 , utilizamos o mecanismo acima para propor as demais fragmentações e estruturas. Os espectros de  $MS^2$  e as proposta de fragmentação para cada estrutura estão demonstradas em APÊNDICE 1

**STAL 2**  $R_1=H, R_2=OH, R_3=O$

**STAL 3**  $R_1=H, R_2=O, R_3=N$

**STAL 4**  $R_1=CH_2CH_2OH, R_2=OH, R_3=O$

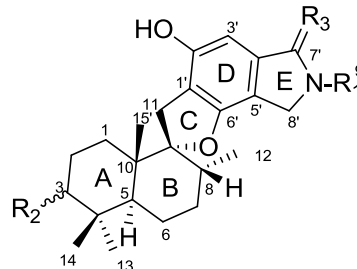


FIGURA 22- Esqueleto base das estruturas fenilspirodrimanas anotadas pela rede molecular

As análises dos resultados sugeridos pela plataforma combinados com os dados da literatura e os fragmentos de massas obtidos, convergem para a produção dessas substâncias por *S. levisporous*. Contudo, as reações de ciclização envolvidas no caminho biossintético das fenilspirodrimanas e que conferem a estereoquímica à classe ainda não estão estabelecidos. Desta maneira, para sanar esse problema e facilitar na dereplicação correta desses e dos outros nodos do cluster STAL, realizou-se o isolamento guiado de STAL 1 e das substâncias majoritárias para serem utilizados como padrões nas análises de identificação por  $MS^2$ .

## 5.7. Isolamento e identificação das substâncias (S1-S5 e T1)

O isolamento das substâncias majoritárias e do padrão de STAL1 foi feita através da separação cromatográfica em HPLC-UV do extrato de *S. levisporous* preparado com no meio sólido suplementado com 1% glicose, e escala ampliada. O cromatograma abaixo, (FIGURA 23) mostra as 6 substâncias que foram coletadas em função da intensidade de absorção ( $\lambda = 254$  nm) e tempo de retenção.

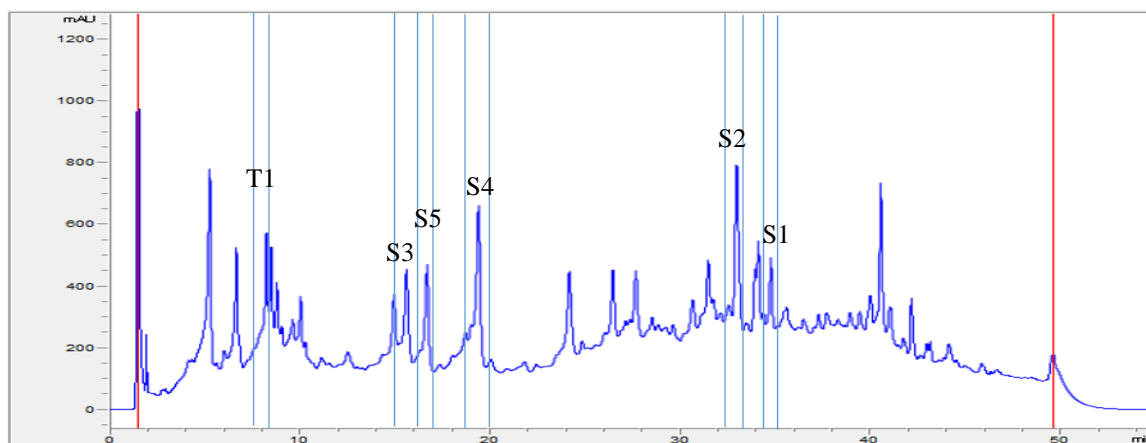
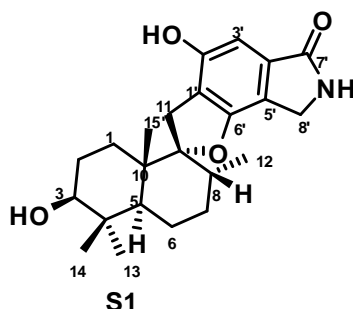


FIGURA 23- Perfil cromatográfico do extrato do fungo *Stachybotrys levisporous* crescido em escala ampliada no meio sólido de batata-dextrose-ágar suplementado com 1% de glicose.

A determinação estrutural das substâncias foram feitas comparando os dados obtidos experimentalmente por RMN (1 e 2D) com os da literatura (AYER e MIAO, 2006; JARVIS, 1995; LI et al, 2015;)

### 5.7.1 Identificação estrutural- Substância 1- S1



O espectro de RMN de  $H^1$  da substância 3-epimero-stachybotrylactama **S1**, trapeada no tempo de retenção t.r 34.74 min, exibe um sinal de singleto na região de deslocamento químico  $\delta$  6.62 referente a um hidrogênio de anel aromático pentassubstituído (TABELA 4). O sinal de singleto largo, na região desblindada  $\delta$  *si* 4.25 (2H) foi atribuído a dois hidrogênios metilenos (H-8), próximos ao carbono carboxílico da lactama ( $\delta_c$  174.3, C-7'), conectados pelos carbonos C-4' e C-5' do anel aromático e confirmados pelo espectro de RMN  $^{13}C$  e HMBC (FIGURA A 20). A presença de um sistema spiro ligado ao anel D, foi confirmado pela presença de metilenos geminais H-11 ( $\delta_H$  2.84, d e 3.20, d,  $J = 16.8$  Hz), que se correlacionam no HMBC com os sinais de C-1', C-2' C-6' do anel aromático, e principalmente com os sinais de C-9 do anel B. O carbono C-9 apresenta deslocamento químico ( $\delta_c$  98.3), devido à combinação de efeitos, anisotropia da ligação C-C do sistema rígido  $C_5$ , além de estar ligado ao heteroátomo eletronegativo. Sinais característicos do sistema drimane, foram atribuídos ao anel B para os seguintes deslocamentos químicos:  $\delta_H$  0.81, s,  $\delta_H$  1.01, s e  $\delta_H$  1.03, s referentes às metilas Me-14, Me-13 e Me-15 respectivamente, e  $\delta_H$  0.72, d,  $J = 1.9$  Hz correspondente à metila ligada ao carbono C-12 e vicinal a H-8 ( $\delta_H$  1.86, m  $J = 1.9$  Hz). Ao hidrogênio metínico *trans* da junção do anel biciclo (H-5) atribuiu-se o sinal  $\delta_H$  1.62, m. O espectro de RMN  $^{13}C$  apresentou sinais de carbono fenólico ( $\delta_c$  165.0, C-2') e oximetínico secundário ( $\delta_c$  79.4, C-9'), atribuídos através dos experimentos de HSQC e HMBC (ANEXO).

Análises de RMN 2D apontaram que a estrutura isolada seria semelhante a de stachybotrylactama. No entanto, através de experimentos de NOESY 1D (APÊNDICE, FIGURA A 21), os núcleos dos hidrogênio das metilas foram desacoplados e a estereoquímica encontrada para H-3 foi diferente da proposta na literatura. Conforme demonstrada na FIGURA 24, as interações NOE de Me-14, Me-

15 e H-2<sub>eq</sub>, indica que o H-3 exibe orientação axial, e a descrita na literatura H-3 encontra-se em equatorial. As constantes de acoplamento vicinal do H-3,  $\delta_H$  3.13, dd (1H), com os hidrogênios H-2<sub>ax</sub> e H-2<sub>eq</sub>, sugerem um sistema do tipo ABX, axial-equatorial ( $J_{H-3/H-2ax}=2.8$ ) e axial-axial ( $J_{H-3/H-2eq}=16.0$ ), que reforçam a estereoquímica de H-3 e confere a estrutura S1 configuração S da posição C-3 em relação à stachybotrylactama (JARVIS, 1995; Li et al. 2014).

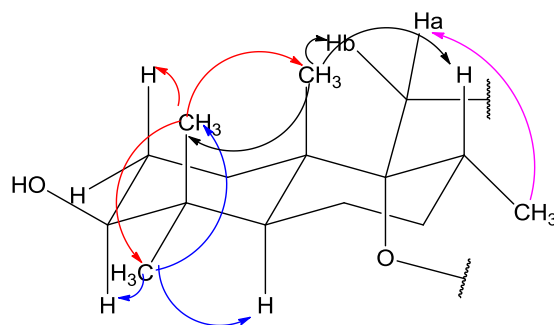
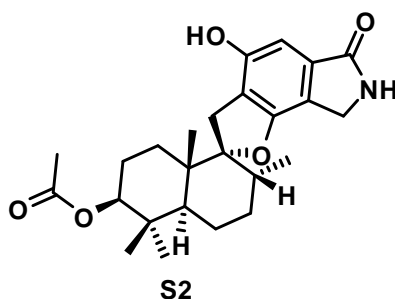


FIGURA 24- Interações de hidrogênios obtidos pelos experimentos de NOE (NOESY 1D) para a substância S1

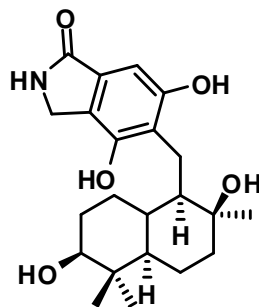
### 5.7.2 Identificação estrutural- Substância 2- S2



A substância 3-acetil-epimero-stachybotrylactama **S2**, trapeada no TR= 32.94 min, foi determinada como análogo de S1, com base na estreita similaridade dos dados RMN (TABELA 4, TABELA 5), exceto pela presença adicional de ressonâncias para um grupo acetila em  $\delta_H$  2.0, s (3H),  $\delta_C$  17.2, 170.6, e a desblindagem dos sinais de H-3,  $\delta_H$  4.43, dd ( $J_{Hax-Heq} = 2.8$  e  $J_{Hax-Hax} = 16.0$ ) e C-3 ( $\delta_C$  81.3), devido ao efeito retirador de elétron por ressonância desse substituinte. Essa estrutura apresenta o mesmo esqueleto que substância stachybotrylactama acetato, no entanto, assim como comentado para a estrutura anterior, a estereoquímica em relação à posição de 3 encontra-se equatorial, tratando-se de um epímero da estrutura conhecida pela literatura.

### 5.7.3 Elucidação estrutural- Substância S3 , S4, e S5.

#### Estrutura S3



S3

A estrutura S3 apresentou-se como análogo da estrutura S1. O espectro de  $^1\text{H}$  da 10-(2',6'-diidroxi-benzo-3'( $\beta$ ),4'( $\alpha$ )- $\gamma$ -lactama)-3 $\beta$ -hidroxi-8 $\beta$ -hidroxi-5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ ,9 $\beta$ ,10 $\beta$ -drimano S3, trapeada no t.r = 15.57 min, exibiu sinais semelhantes ao S1 na região desblindada do espectro,  $\delta_{\text{H}}$  6.62, s, e dois dubletos  $\delta_{\text{H}}$  4.23 e 4.18 ( $J = 17,50$ ), referentes respectivamente ao hidrogênio aromático e aos hidrogênios metilenos da amida cíclica, indicando que os anéis D e E são iguais aos de S1 (TABELA 4). Atribuímos ao sistema *trans*-decalina, quatro sinais singletos metilas  $\delta_{\text{H}}$  0.68, 0.77, 1.01, 1.18 (3H cada), para Me-15, Me-14, Me-13 e Me-12 respectivamente, singlete do hidrogênio metínico *trans*  $\delta_{\text{H}}$  0.89, e o multiplete  $\delta_{\text{H}}$  3.18 referente ao hidrogênio H-3 ligado ao carbono oximético C-3 ( $\delta_{\text{C}}$  78.4). A multiplicidade singlete atribuída à Me-12, indica a presença de um substituinte -OH na posição C-8, confirmados por HMBC e pelo valor de deslocamento químico  $\delta_{\text{C}}$  76.0 (TABELA 5). A ausência do sistema spiro foi suportada pela diminuição no valor de deslocamento químico de C-9  $\delta_{\text{H}}$  48.7, justificada pelo alívio na tensão causada por esse anel. Outros sinais indicam a abertura do anel C; hidrogênios metilenos H-11,  $\delta_{\text{H}}$  2.89.d,  $J = 18.9$  e 2.71, dd,  $J = 18.9$  e 8.1Hz, aonde H-11 acopla com H-9 ( $\delta_{\text{H}}$  1,48, d,  $J = 8.11$  Hz). Outros sinais de carbonos fenólicos adicionais no espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN ( FIGURA A 25) sugerem a estrutura. Os dados foram confirmados através dos experimentos de HSQC, HMBC e COSY. A estereoquímica obtida por NOESY 1D aponta para a mesma de S1, exibindo interações axiais entre Me-14 e Me-15, entre H-11<sub>b</sub> e a Me-15 H-2<sub>a</sub>, Me-14 e H-2<sub>a</sub>, assim como Me-13 e H-3

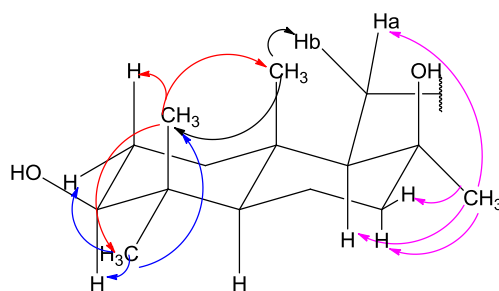
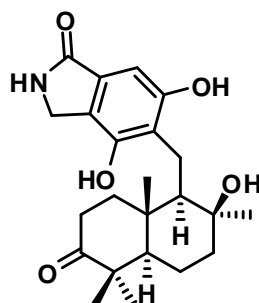


FIGURA 25- Interações de hidrogênios obtidos pelos experimentos de NOE para a substância S3.

## Estrutura S4

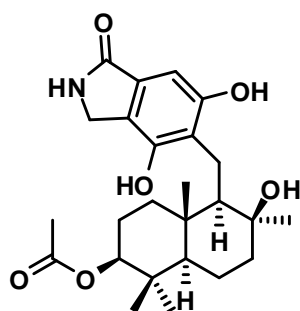


S4

Os dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (TABELA 4 e 5) da substância 10-(2',6'-diidroxibenzo-3'( $\beta$ ),4'( $\alpha$ )- $\gamma$ -lactama)-3-oxi-8 $\beta$ -hidroxi-5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ ,9 $\beta$ ,10 $\beta$ -drimano S4, TR foram similares aos obtidos para S3 exceto pela presença de um sinal para uma carbonila e a ausência do sinal de hidrogênio característico de hidroxila em C-3, permitindo atribuir esse substituinte ao C-3. A atribuição da carbonila foi apoiada pelas correlações de HMBC de C-3 com as metilas do Me-13 e Me-14, além do alto valor de deslocamento característico para esse grupo.



## Estrutura S5



A similaridade de sinais com os da estrutura S3 foram encontradas para os dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da substância 10-(2',6'-diidroxibenzo-3'( $\beta$ ),4'( $\alpha$ )- $\gamma$ -lactama)-3 $\beta$ -acetoxil-8 $\beta$ -hidroxil-5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ ,9 $\beta$ ,10 $\beta$ -drimano **S5**, coletada no TR 16.03, TABELA 4 E 5, com exceção dos sinais  $\delta_c$  171.8 e 17.9 referentes respectivamente à carbonila e metila do grupo acetato, substituindo o grupo hidroxila do C-13 e reforçada pelos sinais dos experimentos de HSQC e HMBC.

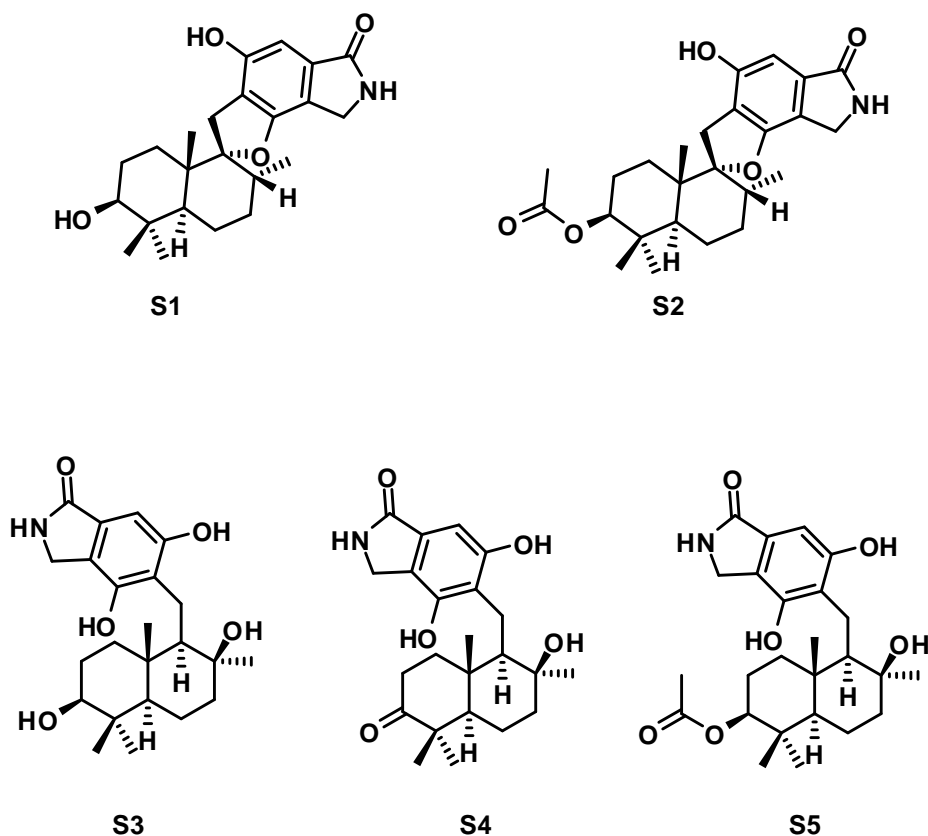


FIGURA 26- Estruturas químicas das substâncias isoladas S1, S2, S3, S4 e S5

TABELA 4- Dados de RMN <sup>1</sup>H para substâncias S1-S5

| N° | S1   | S2   | S3   | S4   | S5   |
|----|--|--|--|--|--|
| 1  | 1.51, m  | N.A  | 1.88, m ; 1.13, m  | 1.61, m; 2.13, m   | 1.12 m   |
| 2  | 1.51, m; 1.63, m                                       | N.A  | 1.62, m 1.58, m  | N.A  | N.A  |
| 3  | 3.13, dd<br>( <i>J</i> =2.8,16.0)                      | 4.43, dd<br>( <i>J</i> = 2.8, 16.0)                    | 3.18, dd ( <i>J</i> =2.8,<br>16.0)                               | N.A  | 4.49, dd<br>( <i>J</i> =2.8, 16.0)                                 |
| 5  | 1.62, m  | 1.58, m  | 0.9, m   | 1.63, m  | 1.12, m  |
| 6  | 1.42, m  | 1.30-1.50 m  | 1.58, m  | 1.58, m  | 1.58, m  |
| 7  | 1.61, m  |  | 1.68, m  | 1.64, m  | 1.64, m  |
| 7  | 1.59, m  | 1.48, m  | 1.65, m  | 1.75, m  | 1.75, m  |
|    | 2.22,  | 1.50 m   | 2.16,  | 2.22,m   | 2.22,m   |
| 8  | 1.81, m  | 1.81, m  | N.A  | N.A  | N.A  |
| 9  | NA   | NA   | 1.48, d ( <i>J</i> = 8.1)  | 1.65, d ( <i>J</i> =8.2)   | 1.48, d ( <i>J</i> =8.1)   |
| 11 | 2.84, d ( <i>J</i> =16.8)<br>3.20, d ( <i>J</i> =16.8) | 2.88, d ( <i>J</i> =16.8)<br>3.22, d ( <i>J</i> =16.8) | 2.71, dd ( <i>J</i> =18.9 e<br>8.1)<br>2.89, d ( <i>J</i> =18.9) | 2.75, dd ( <i>J</i> =18.8 e<br>8.2)<br>2.88, d ( <i>J</i> =18.8) | 2.75, dd<br>( <i>J</i> =18.8 e 8.2),<br>2.88, d,<br><i>J</i> =18.8 |
| 12 | 0.72, d ( <i>J</i> =1.9)                               | 0.72, d ( <i>J</i> =1.9)                               | 1.18, s  | 1.23, s  | 1.21,s   |
| 13 | 1.01, s  | 0.83, s  | 1.01, s  | 1.11, s  | 0.91,s   |
| 14 | 0.81, s  | 0.81, s  | 0.78, s  | 1.02, s  | 0.89 s   |
| 15 | 1.03, s  | 1.06, s  | 0.68, s  | 0.78, s  | 0.71, 2  |
| 16 |  | δ <sub>H</sub> 2.0                                     |  |  | 2.12, s  |
| 8' | 4.25, <i>sl</i>  | 4.27, <i>sl</i>  | 4.18, d ( <i>J</i> =17,50)<br>4.23, d ( <i>J</i> =17,50)         | 4.18, d ( <i>J</i> =17,50)<br>4.26, d ( <i>J</i> =17,50)         | 4.29 d<br>( <i>J</i> =17,50)<br>4.26, d<br>( <i>J</i> =17,50)      |

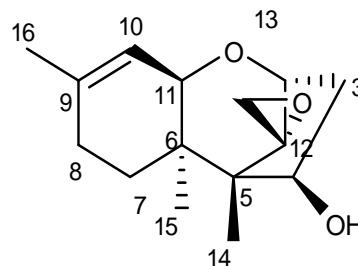
NA=valores não atribuídos, *J* em HZ, 600MHz, CD<sub>3</sub>CD

TABELA 5- Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  para as substâncias S1-S4

| Posição | S1    | S2     | S3    | S4    | S5     |
|---------|-------|--------|-------|-------|--------|
| 1       | 27.3  | N.A    | 38.0  | 38.5  | 37.4   |
| 2       | 30.9  | N.A    | 26.4  | 33.7  | N.A    |
| 3       | 79.4  | 81.2   | 78.1  | 217   | 81.2   |
| 4       | 38.5  | 37.6   | 38.5  | 47.2  | N.A    |
| 5       | 47.1  | 46.15  | 54.0  | 53.9  | 54.2   |
| 6       | 27.3  | N.A    | 17.6  | 18.79 | 17.6   |
| 7       | 32.3  | 30.4   | 40.0  | 39.32 | 39.8   |
| 8       | 38.5  | 37.4   | 75.1  | 75.6  | 76.1   |
| 9       | 98.3  | 97.5   | 48.6  | 47.3  | 48.5   |
| 10      | 43.4  | 41.6   | 37.9  | 53.7  | 37.6   |
| 11      | 32.7  | 31.4   | 17.8  | 18.2  | 17.9   |
| 12      | 15.8  | 14.1   | 25.9  | 25.7  | 25.6   |
| 13      | 16.1  | 15.2   | 15.0  | 20.7  | 16.0   |
| 14      | 26.8  | 27.3   | 27.6  | 25.8  | 27.8   |
| 15      | 16.5  | 15.2   | 13.0  | 13.3  | 13.6   |
| 16      | N.A   | 170.6, | N.A   | N.A   | 171.8, |
| 17      | N.A   | 17.2   | N.A   | N.A   | 17.9   |
| 1'      | 134.5 | 138.7  | 130.4 | 130.6 | N.A    |
| 2'      | 165.0 | 163.0  | 155.7 | 155.5 | 155.0  |
| 3'      | 95.2  | 93.2   | 99.3  | 99.5  | 99.8   |
| 4'      | 124.6 | 122.2  | 122.8 | 122.8 | 123.6  |
| 5'      | 119.7 | 118.1  | 115.7 | 114.8 | 114.9  |
| 6'      | 149.2 | 156.4  | 150.4 | 150.4 | 150.2  |
| 7'      | 174.3 | 173.1  | 173.0 | 172.9 | 172.9  |
| 8'      | 43.6  | 43.1   | 42.7  | 43.2  | 43.1   |

NA=valores não atribuídos, 100 MHz,  $\text{CD}_3\text{CD}$

### 5.7.4 Elucidação estrutural- Substância T1



O espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância Tricodermol- T1, trapeada no t.r= 8.32 min, exibiu sinais diferentes dos obtidos para as estruturas anteriores. O sinal dubleto  $\delta\text{H}$  5.34,  $J = 4.88$  Hz, indica a presença de um hidrogênio olefínico (H-10) de um sistema vinílico trissubstituído. Esse sinal mostra acoplamento vicinal com o hidrogênio cis-metínico H-11  $\delta\text{H}$  3.58, d,  $J = 4.88$  Hz da junção do anel A e B e observados pelo espectro de COSY. O espectro de HSQC para H-11 (Apêndice 1, FIGURA A 39) exibe acoplamento com o C-11 ( $\delta\text{c}$  72.1), sugerindo a presença de um éter alílico e confirmado no espectros de HMBC. A correlação de HMBC de H-11, com o carbono  $\text{sp}^2$  tetrasubstituído C-9 ( $\delta\text{c}$  142.1), presente no RMN $^{13}\text{C}$  e ausente no experimento de DEPT  $135^\circ$ , confirmam a proposta acima. Adicionalmente, H-11 acopla com o carbono metílico Me-16 ( $\delta\text{c}$  16.3) e com o metileno C-7 ( $\delta\text{c}$  25.6). O espectro de HMBC também apresenta correlação entre Me-16 ( $\delta\text{H}$  1.69. s), com o carbono metileno C-8 ( $\delta\text{c}$  29.7) apontando a presença de um ciclohexeno trissubstituído para o anel A. O sinal singlete  $\delta\text{H}$  0.86 (3H), refere a uma metila ligada C-6 ( $\delta\text{c}$  40.9), na junção do anel, pois esta mostra correlação com os sinais de C-5 e C-7. Ao carbono quaternário C-12, pôde ser atribuído à presença de um epóxido devido ao valor de deslocamento químico  $\delta\text{c}$  67.4. A constante geminal de sistemas cíclicos dependem diretamente dos ângulos de ligação H-C-H, e com o decréscimo de tamanho desses anéis há uma tendência no aumento do ângulo dessas ligações devido à tensão causada por essa diminuição, como consequência a interação eletrônica entre os orbitais C-H ficam menores e magnitude de acoplamento decresce. (PAVIA, 2001) Desta maneira, podemos reforçar a presença do epóxido, pois a constante  $J = 3.77$  Hz exibida pelo acoplamento entre os hidrogênios metilenos H-13  $\delta\text{H}$  2.81, e 3.01 sugere que o ângulo de ligação H-C-H de H-13 seja próximo de  $118^\circ$ , característico de anéis ciclopropano tensionado.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  exibe 16 carbonos, sendo três quaternários (um olefínico totalmente substituído, C-9), 1 carbono quaternário oxigenado (C-12,  $\delta\text{c}$

66.9), 1 oximetínico (C-4,  $\delta_c$ 74.0), um metileno oxigenado (C-13,  $\delta$ 65,5), 3 metilenos (C-3, C-7 e C-8) 1 metínico oxigenado (C-2), 2 metínicos (C10-C11) e dois grupos metilas (C-14 e C-16). Todos confirmados pelo experimento do DEPT (exceto os quaternários). Os dados obtidos foram comparados com os da literatura e confirmaram a substância Tricodermol (AYER E MIAO, 2006). Esse metabólito faz parte da classe dos tricotecenos simples, originados do precursor farnesil pirofosfato (FPP). Geralmente tricodermol é encontrado em espécies *S. chartarum* e *S. echinata* (Wang, 2015). Embora já tenha sido reportado na literatura a produção deste metabólito no gênero *Stachybotrys*, esse é o primeiro relato desse tricoteceno para a espécie *levisporous*

TABELA 6- Dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para a substância tricodermol T1,

| Posição | $\delta_{\text{H}}$ (J=Hz)                   | $\delta_{\text{C}}$ |
|---------|--|---------------------|
| 2       | 3.62, d ( $J= 5.40$ )                        | 80.6                |
| 3       | 1.83, m<br>2.49 dd ( $J=7.78$ )              | 40.1                |
| 4       | 4.41, dd ( $J=15, 7.76$ )                    | 74                  |
| 5       | NA   | 41.9                |
| 6       | NA   | 50.8                |
| 7       | 1.44,m<br>1.88                               | 25.6                |
| 8       | 1.98-2.01                                    | 29.7                |
| 9       | Na   | 142.1               |
| 10      | 5.34, ( $J=4.88$ )                           | 119.1               |
| 11      | 3.58, d ( $J=4.88$ )                         | 72.1                |
| 12      | NA   | 67.4                |
| 13      | 2.81, d ( $J=3.77$ )<br>3.01, d ( $J=3.77$ ) | 48.3                |
| 14      | 0.86   | 16.1                |
| 15      | 0.77, s                                      | 6.2                 |
| 16      | 1.69, s                                      | 23.6                |

NA=valores não atribuídos, RMN  $^1\text{H}$  (400MHz) e  $^{13}\text{C}$  (100MHz), CD $_3$ CD.

Após a identificação das estruturas S1-S5 e T1 por experimentos de RMN 2D, as substâncias isoladas foram submetidas à análises por espectrometria de massas para a confirmação do resultados. Os espectros de MS<sup>2</sup> (ANEXO I, FIGURA A 59, 63, FIGURA A 69 e FIGURA A 70) das substâncias S1-S5 apresentaram os mesmos fragmentos para esqueleto das stachybotrylactamas discutido anteriormente no cluster STAL. Assim, o mecanismo proposto para as estruturas isoladas segue o mesmo para as substância STAL 1 demonstrada na pág 61.

TABELA 7- Dados de HRMS para as substâncias S1-S4

| <b>Substância</b> | <b>Fórmula molecular</b>                        | <b><i>m/z</i> precursor [M+H]<sup>+</sup></b> | <b>Erro (ppm)</b> | <b>Fragmentos <i>m/z</i></b> |
|-------------------|---|---|-------------------|------------------------------|
| <b>S1</b>         | C <sub>23</sub> H <sub>32</sub> NO <sub>4</sub> | 386.2323                                      | -0.77             | 178.05/150.05                |
| <b>S2</b>         | C <sub>25</sub> H <sub>34</sub> NO <sub>5</sub> | 428.2431                                      | 0.23              | 368.22/178.05/150.05         |
| <b>S3</b>         | C <sub>23</sub> H <sub>31</sub> NO <sub>5</sub> | 402.2271                                      | -0.99             | 385.20/178.05                |
| <b>S4</b>         | C <sub>23</sub> H <sub>33</sub> NO <sub>5</sub> | 404.2424                                      | -1.73             | 386.23/178.05                |

Para o espectro de massas substância Trichodermol-T1, o seguinte mecanismo foi proposto e os dados foram comparados com os dados da literatura (NIELSEN, 2003)

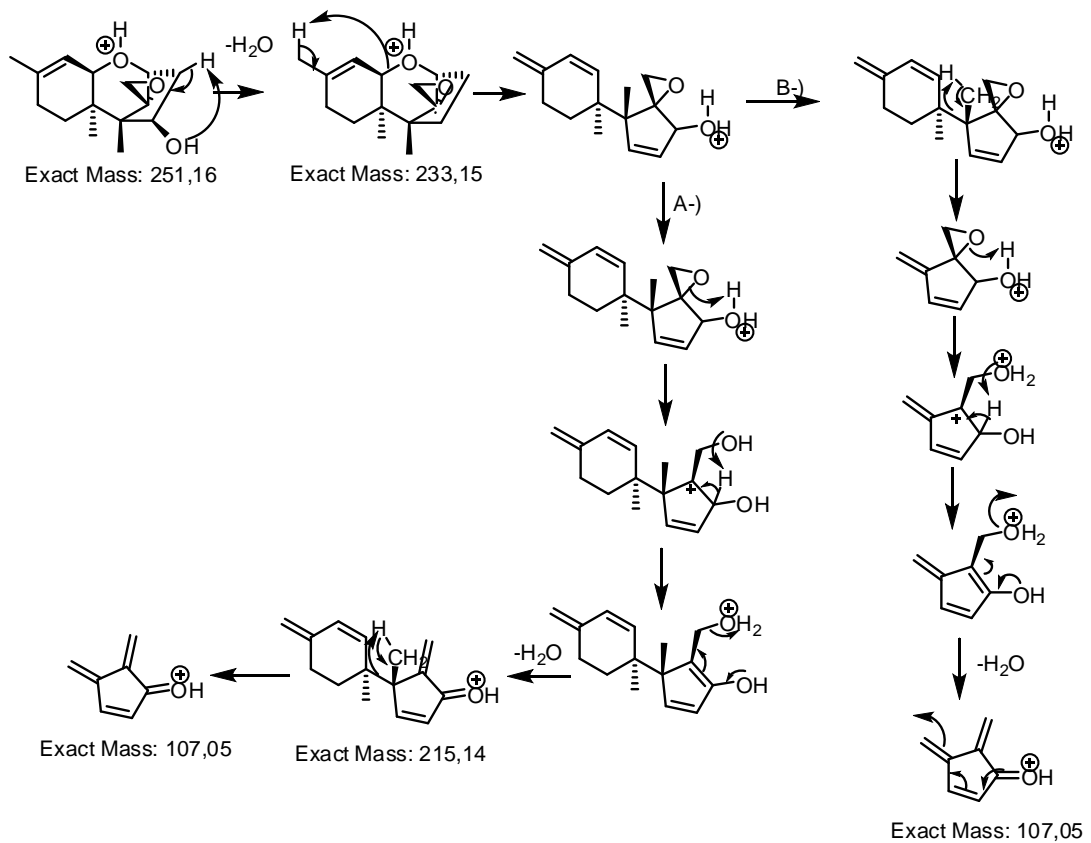
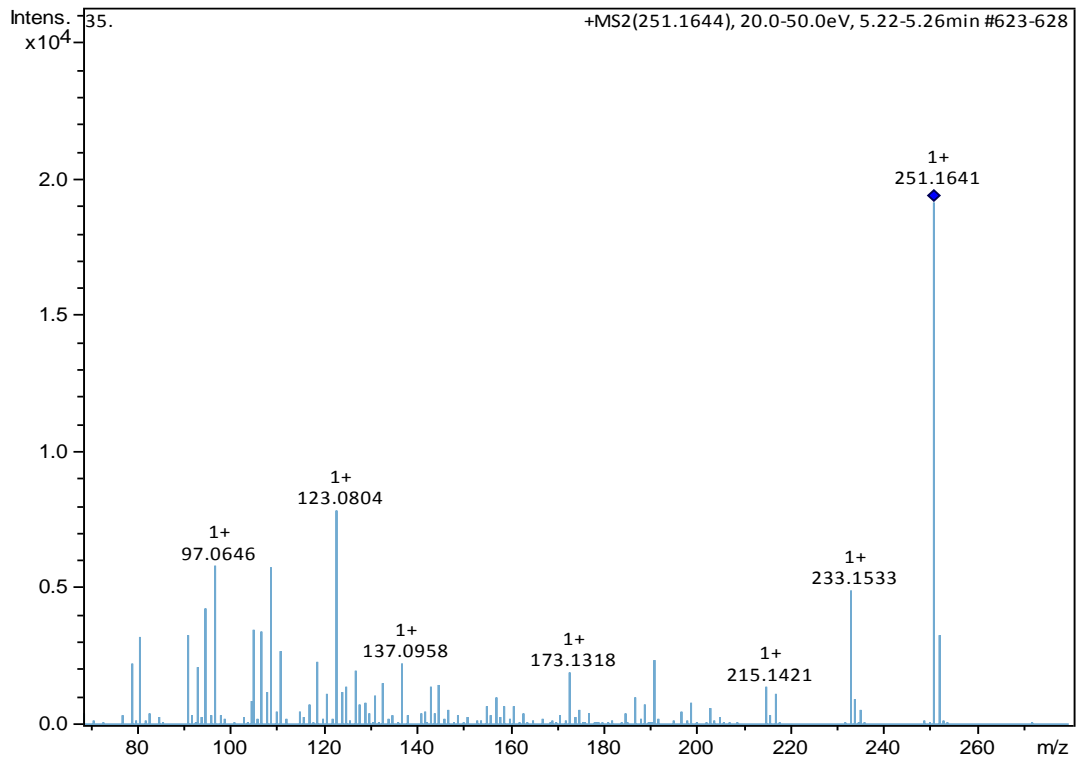


Figura 27 – Espectro de massas MS/MS do íon 251.1641  $[M+H]^+$ , (20-50eV) e mecanismo de fragmentação proposto para o Trichodemol.

### **5.7.5 Reanálise da rede molecular GNPS e a comparação com padrões obtidos.**

O isolamento e identificação das estruturas S1-S4, permitiu que a reanálise da rede molecular fosse mais sólida, principalmente no que concerne a estereoquímica. Conforme discutido na secção anterior de determinação estrutural, as substâncias identificadas apresentaram estereoquímica diferente das anotadas pela rede molecular. Assim, para propor as substâncias identificadas pela análise de fragmentação de massas dos dados da rede molecular, levou-se em consideração a configuração dos metabólitos encontrados.

A localização das substâncias isoladas no cluster STAL estão destacadas em verde na figura abaixo. Em amarelo e preto estão respectivamente, as substâncias anotadas pelo software e as propostas através do estudo de fragmentação.



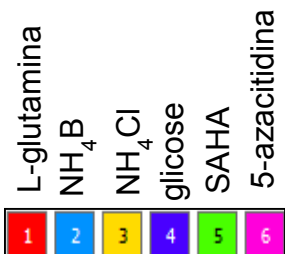
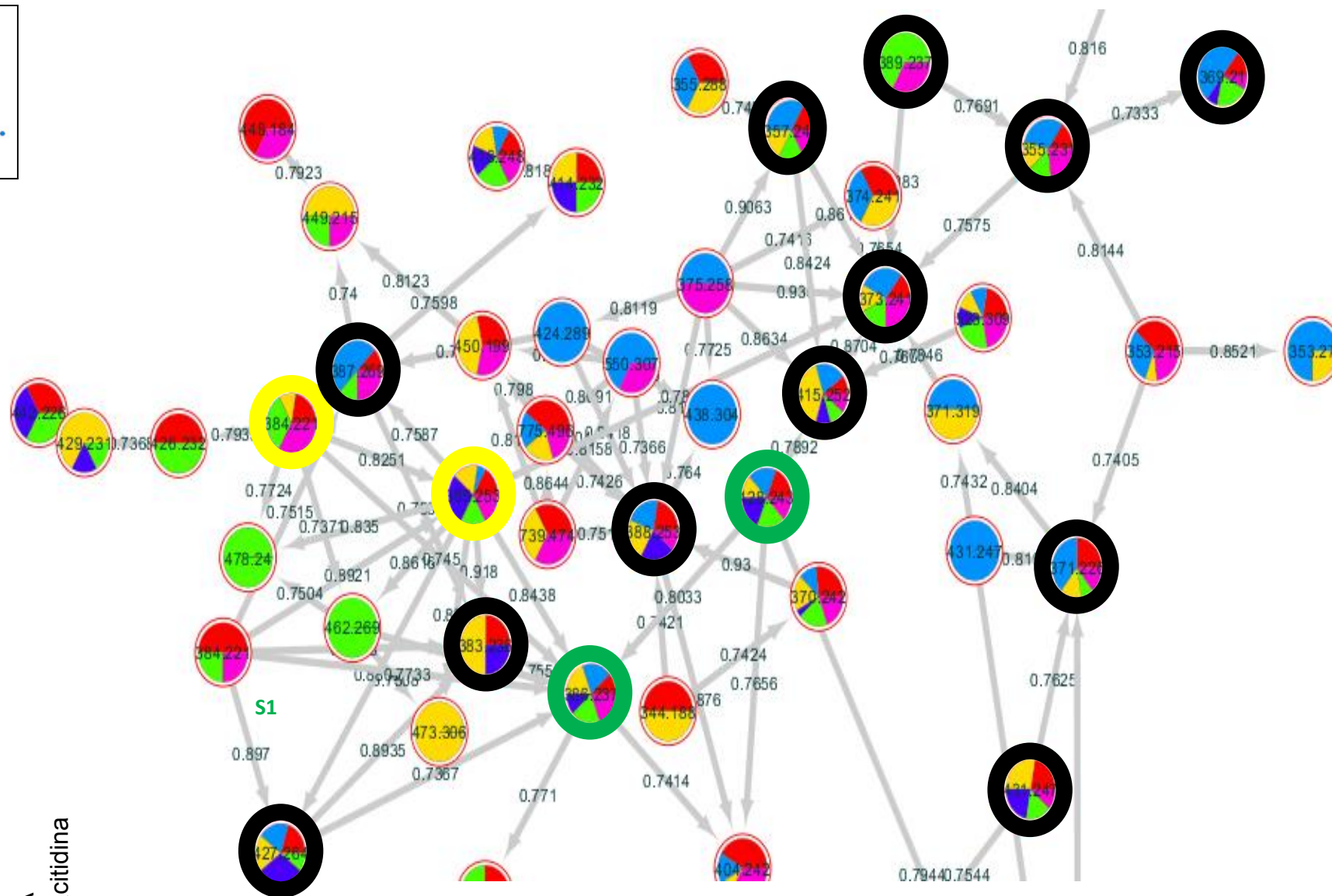
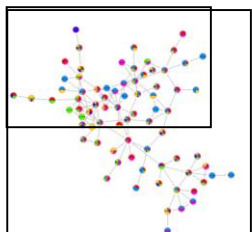


FIGURA 28- Cluster das estruturas STAL ampliado

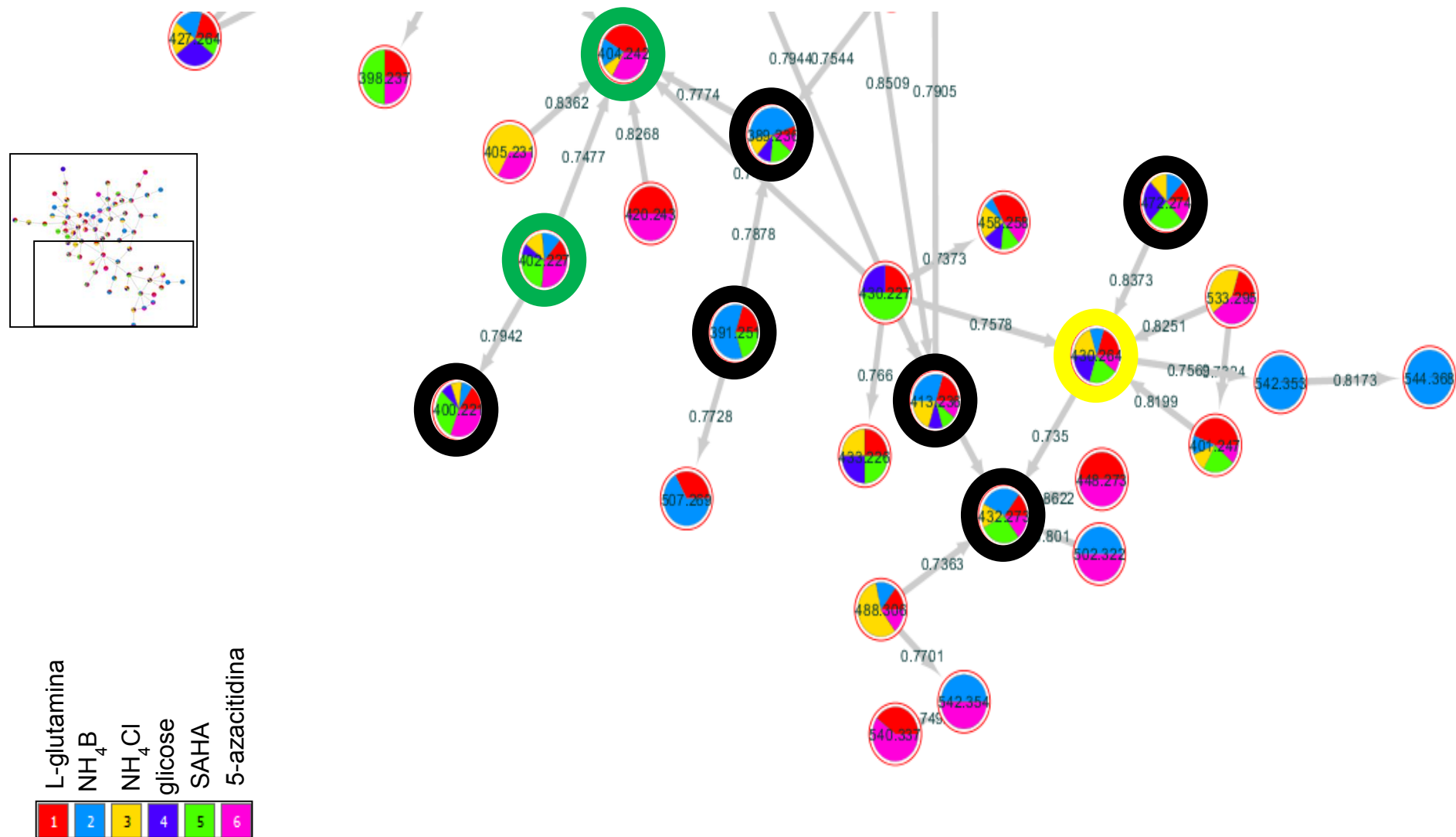


FIGURA 29- Continuação da FIGURA 29 do Cluster das estruturas STAL ampliado

Para as substâncias destacadas em preto, foi proposto 4 diferentes tipos de esqueleto base, as stachybotrycromenos, as fenilspirodrimanas, stachybotrylactamas e as 10-benzo- $\gamma$ -lactama-5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ ,9 $\beta$ ,10 $\beta$ -drimanas. Os metabólitos encontrados são meroterpenóides do tipo triprenil fenóis derivados de caminhos biossintéticos mistos; terpenóides e policetídeos. As propostas das estruturas foram baseadas no mecanismo de fragmentação que cada um exibe.

Os stachybotrycromenos, são substâncias com unidades prenilas lineares ligadas à uma porção do anel cromeno. Utilizando o íon  $[M+H]^+$   $m/z$  355.2256 como exemplo para essa classe, propõe-se o mecanismo que inicia-se com abertura do anel B cromeno, seguida do rearranjo do hidrogênio para a eliminação da unidade terpênica conforme FIGURA 30. Outras substâncias foram encontradas com substituinte R1 variável entre os grupo  $CH_3$ ,  $CH_2OH$ ,  $CH_2OAc$ . Os dados obtidos estão reunidos na TABELA 4.

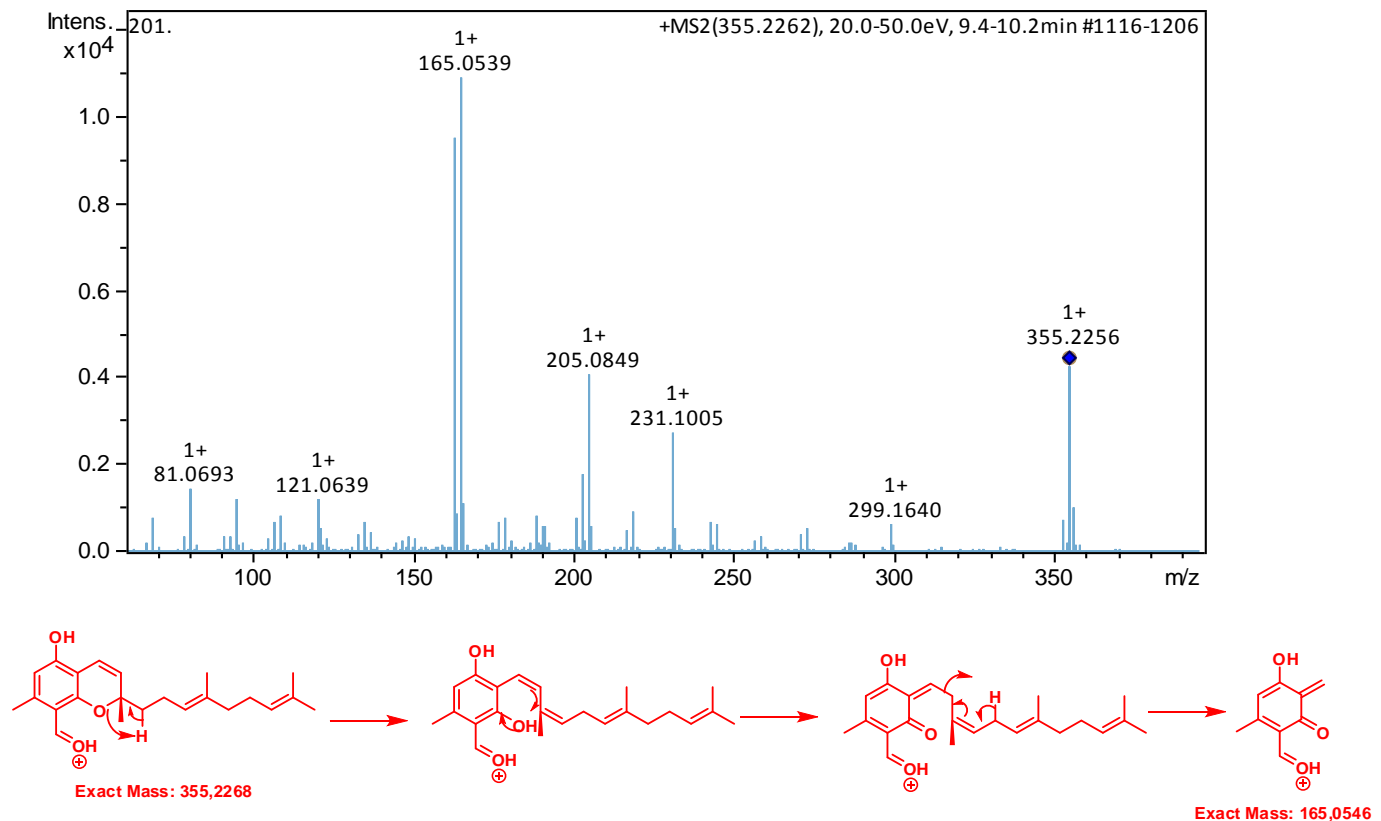


FIGURA 30- Espectro de massas  $[M+H]^+$  355.2268 (20-50eV) e o mecanismo de fragmentação proposto para esse íon.

Esses compostos derivados de tetracetídeo-terpenóides constituem a maior classe de meroterpenóides. O ácido orselínico é o composto original derivado da ciclização do precursor dos policetídeos, que é condensado com um pirofosfato de transfarnesila e ciclizado para formar inicialmente os stachybotrycromenos. Duas propostas estão resumidas na FIGURA 30, uma via a epoxidação da primeira ligação dupla da unidade farnesila e a outra via enzimas do grupo P450.

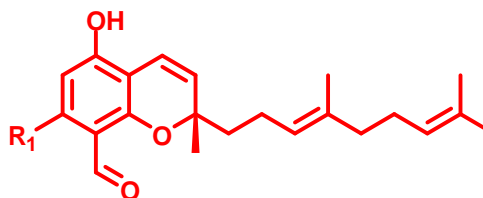


Figura 31- Esqueleto base das estruturas Stachybotrycromenos- STC

TABELA 8- Dados estruturais e analíticos obtidos para as estruturas identificadas da classe dos Stachybotrycromenos-STC

| Cód         | Nome, ref.   | R1                  | Precursor $m/z$ [M+H] <sup>+</sup> | Frag. $m/z$ | Formula molecular                              | Erro (ppm) | Fig (F); pág        |
|-------------|--|---------------------|------------------------------------|-------------|--|------------|---------------------|
| <b>STC2</b> | Stachybotrycromene A,<br>(HÖVELMANN et al.<br>2018)  | CH3                 | 355.2256                           | 165         | C <sub>23</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub> | 3,4        | FIGURA A<br>49;116  |
| <b>STC3</b> | Stachybotrycromene C,<br>( HÖVELMANN et al.<br>2018) | CH <sub>2</sub> OH  | 369.2061                           | 353/179     | C <sub>23</sub> H <sub>28</sub> O <sub>4</sub> | -0,3       | FIGURA A<br>50;117  |
| <b>STC4</b> | ---  | C=O                 | 371.2113                           | 353/163     | C <sub>23</sub> H <sub>30</sub> O <sub>4</sub> | 0,1        | FIGURA A<br>51; 118 |
| <b>STC5</b> | Stachybotrycromene<br>B,Hövelmann et al. (2018)      | CH <sub>2</sub> OAc | 413.2316                           | 353/163     | C <sub>25</sub> H <sub>32</sub> O <sub>5</sub> | 1,7        | FIGURA A<br>52;119  |

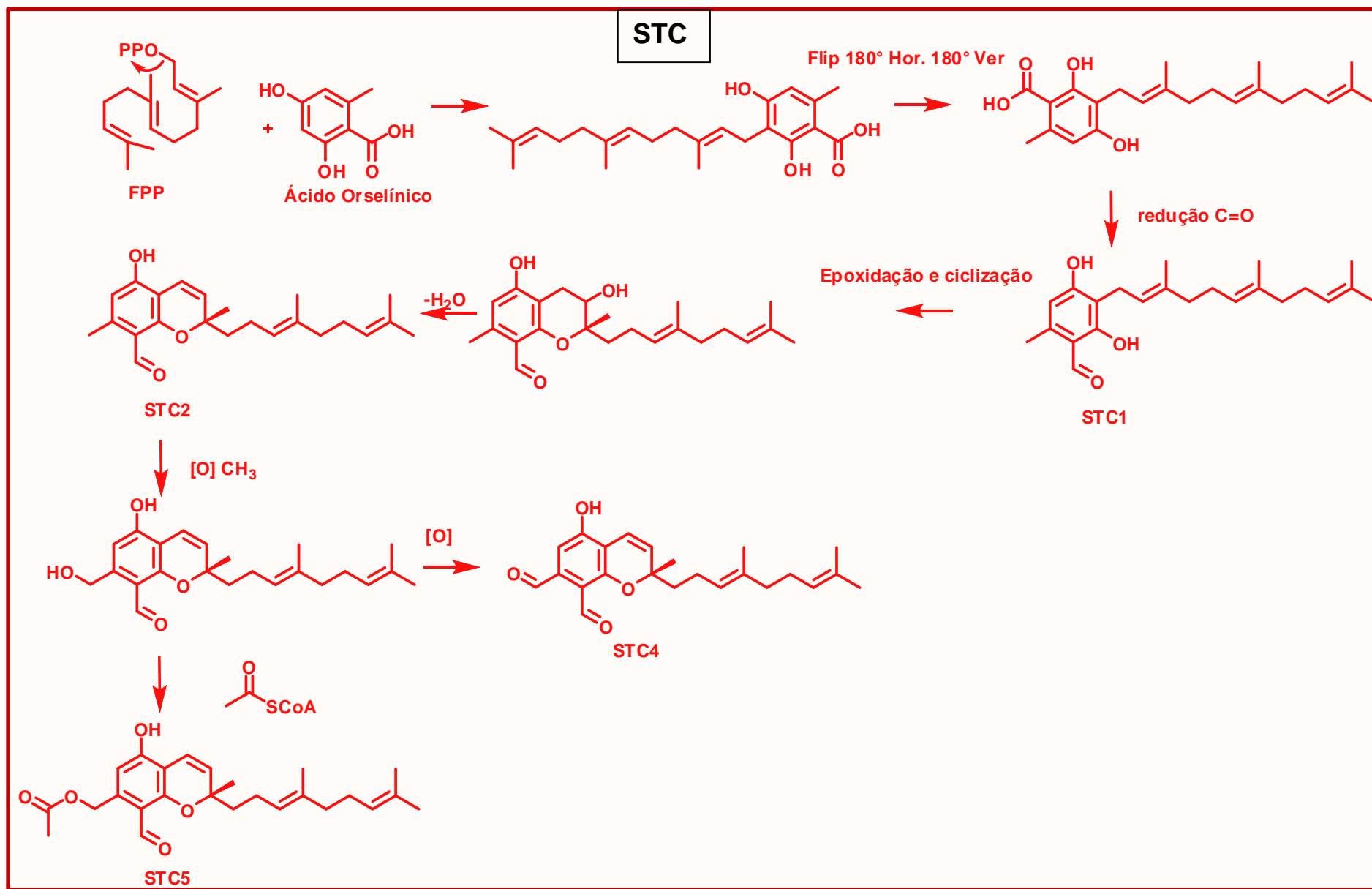


FIGURA 32- Mecanismo de biossíntese proposto para a formação de Stachybotrycromenos-STC

No grupo 2 encontram-se as substâncias com o esqueleto fenilspirodrimanos com grupos C=O, OH, CH<sub>2</sub>OH, CH<sub>3</sub> nos substituintes R1 e R2, e os grupos OCH<sub>3</sub> e OH em R3, conforme descrito na TABELA 9. Para esse grupo propõe-se o mecanismo de fragmentação abaixo utilizando como exemplo a estrutura sugerida para o íon m/z 373. 2373 (Mer-NF5003 E). Por possuir esqueleto semelhante às stachybotrylatamas, o mecanismo análogo inicia-se com a abertura do anel spiro, seguido por dois caminhos de fragmentação conforme demonstrado abaixo (FIGURA 34).

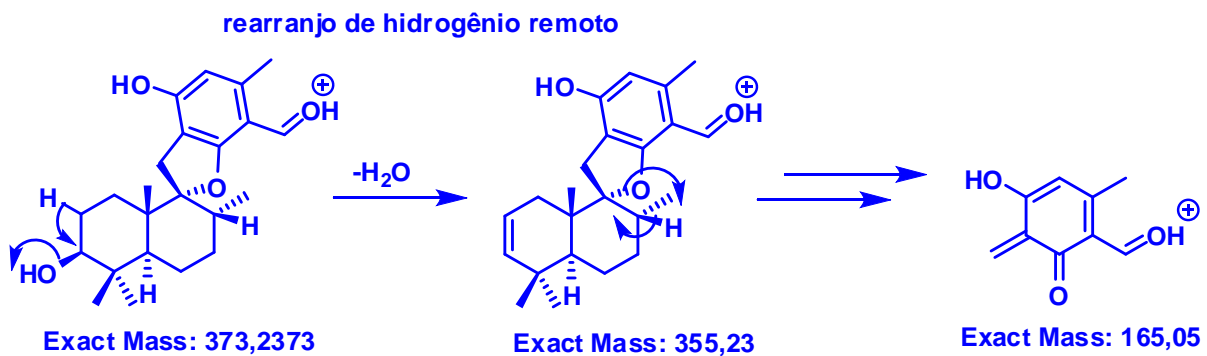
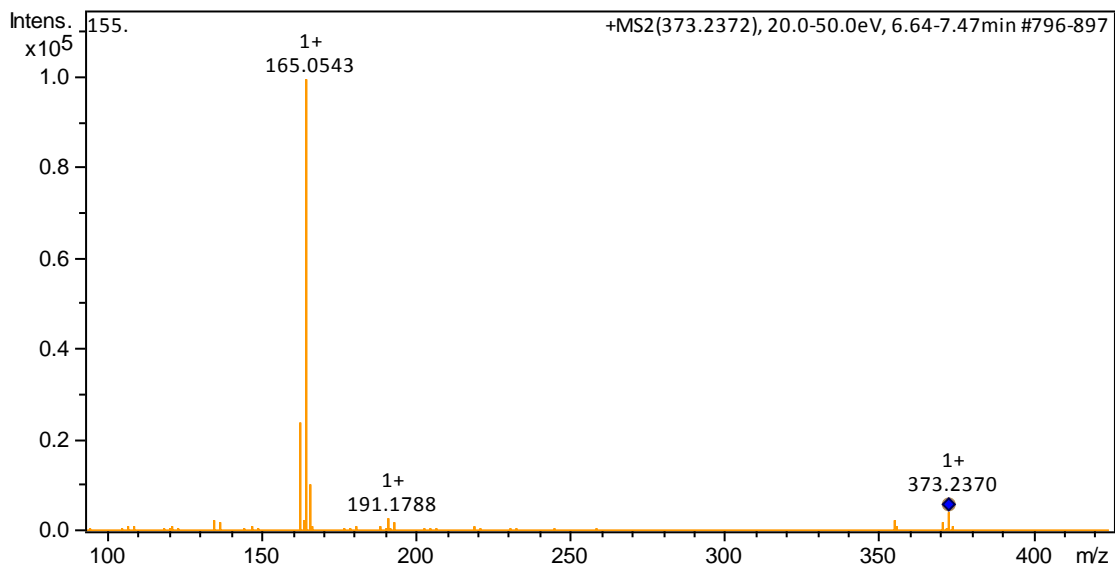


FIGURA 33- Espectro de massas [M+H]<sup>+</sup> 373.2370 (20-50eV) e o mecanismo de fragmentação proposto para esse íon.

Como comentado anteriormente, o ácido orselínico é o composto original derivados da ciclização do precursor de policetídeos, que é condensado com um pirofosfato de farnesila e ciclizado para formar inicialmente os stahybotrycromenos, e destes a ciclização do grupo farnesila deve ocorrer através do intermediário 3,4-oxidofarnesila, levando ao sesquiterpeno com junção dos anéis A e B transdecalina, e denominados fenilspirodrimanes. Detalhes da rota biossintética proposta estão na FIGURA 36.



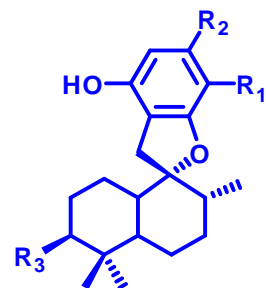


FIGURA 34- Esqueleto base das estruturas fenilspirodrimanes -STB

TABELA 9- Dados estruturais e analíticos obtidos para as estruturas identificadas da classe das Fenilspirodrimanes-STB

| Código       | Epímeros das estruturas, Nome (ref)  | R1                 | R2                 | R3  | Íon precursor $m/z$ $[M+H]^+$ | Fragmentos | Formula molecular                              | Erro (ppm) | Fig (F); pág     |
|--------------|--------------------------------------|--------------------|--------------------|-----|-------------------------------|------------|--|------------|------------------|
| <b>STB 1</b> | Mer-NF5003 E (WANG, 2015)            | C=O                | CH <sub>3</sub>    | OH  | 373.2370                      | 355/ 165   | C <sub>23</sub> H <sub>32</sub> O <sub>4</sub> | 0.8        | FIGURA A 53;120  |
| <b>STB 2</b> | L-671,776 (WANG, 2015)               | C=O                | CH <sub>2</sub> OH | OH  | 389.2316                      | 353/163    | C <sub>23</sub> H <sub>32</sub> O <sub>5</sub> | 1.8        | FIGURA A 54;121  |
| <b>STB3</b>  | Stachybotrysin C (ZHAO et al. 2017)  | C=O                | CH <sub>2</sub> OH | OAc | 431.2421                      | 353/163    | C <sub>25</sub> H <sub>34</sub> O <sub>6</sub> | 1.6        | FIGURA A 55;122  |
| <b>STB4</b>  | Stachybotrydial ( Ayer e Miao, 2006) | C=O                | C=O                | OH  | 387.2162                      | 369/177    | C <sub>23</sub> H <sub>30</sub> O <sub>5</sub> | 1.0        | FIGURA A 56; 123 |
| <b>STB5</b>  | Spirobenzofuran-dialcool,            | CH <sub>2</sub> OH | CH <sub>2</sub> OH | OH  | 391.2468                      | 355/165    | C <sub>23</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub> | 2.6        | FIGURA A 57;124  |
| <b>STB6</b>  | Stachybotrycina B (ZHAO et al. 2017) | C=O                | CH <sub>3</sub>    | OAc | 415.2429                      | 355/165    | C <sub>25</sub> H <sub>35</sub> O <sub>5</sub> | 1.7        | FIGURA A 58; 125 |

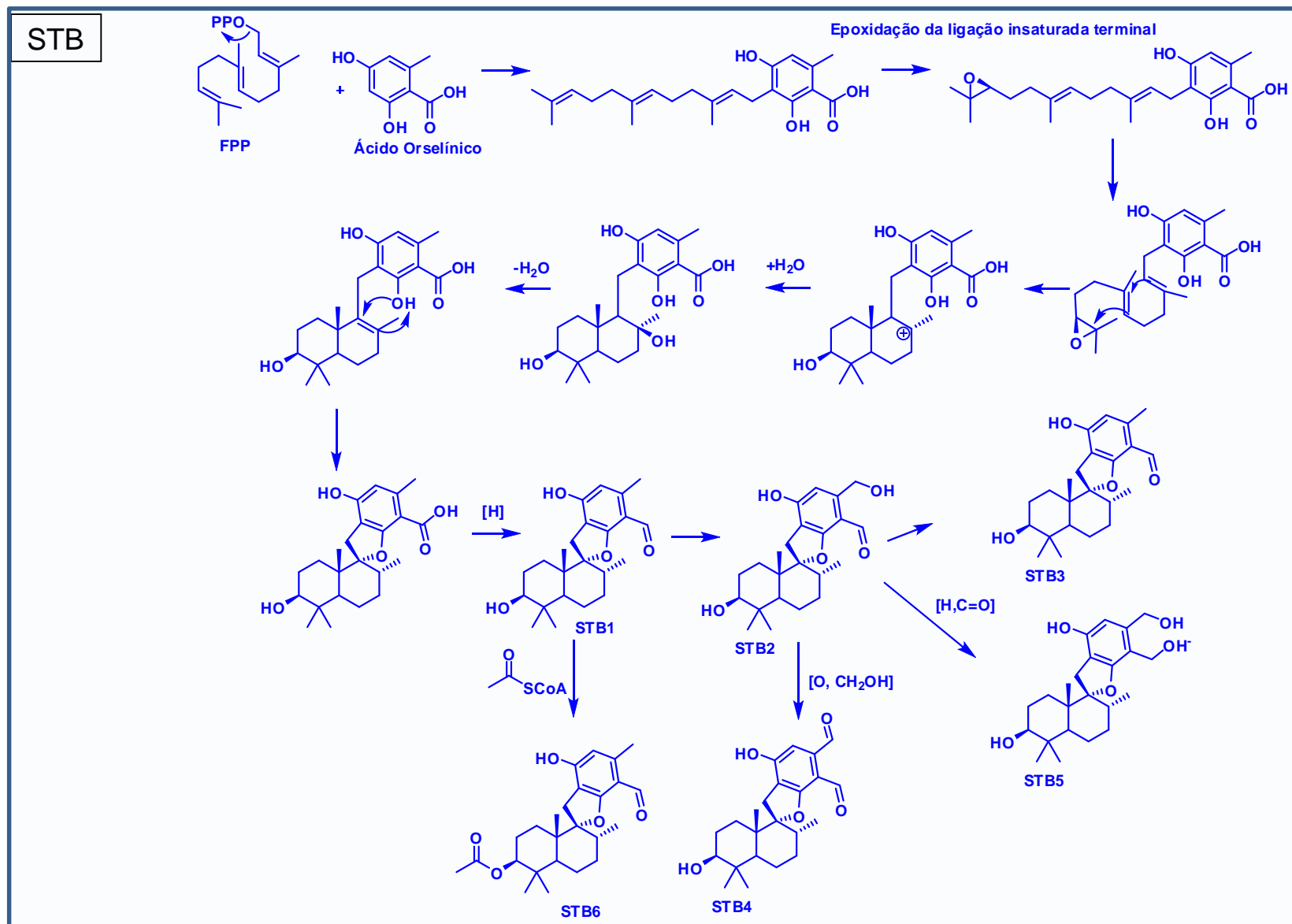


FIGURA 35- Mecanismo de biossíntese proposto para a formação das Fenilspirodrimanas- STB

As estruturas do grupo 3 apresentam esqueleto das stachybotrylactamas, com grupos substituintes nas posições indicadas abaixo FIGURA 36, e reunidas na TABELA 10.

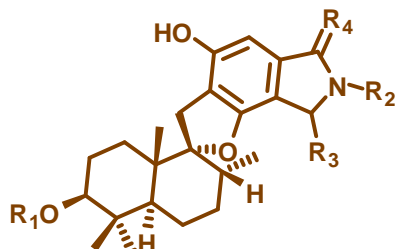


FIGURA 36- Esqueleto base das estruturas stachybotrylactamas

A proposta biossintética para a formação dessas estruturas está demonstrada no esquema da FIGURA 38. Nota-se que o caminho é bastante similar aos do grupo anterior até o intermediário catiônico. A formação do anel lactama ocorre pela transferência do grupo amino por ação do PLP, seguido da ciclização do anel. O sistema spiro é formado e por reações de redução, oxidação e acetilação, os demais intermediários são formados.

TABELA 10 Dados estruturais e analíticos obtidos para as estruturas identificadas da classe das Stachybotrylactamas- STA

| <b>Cód.</b>  | <b>Epímeros das estruturas<br/>Nome; (ref.)</b>                  | <b>R1</b> | <b>R2</b>                          | <b>R3</b> | <b>R4</b> | <b>Íon<br/>precursor<br/><i>m/z</i> [M+H]<sup>+</sup></b> | <b>Fragmentos</b> | <b>Fórmula<br/>molecular</b>                                  | <b>Erro<br/>(ppm)</b> | <b>Fig (F); pág</b> |
|--------------|--|-----------|------------------------------------|-----------|-----------|---|-------------------|---|-----------------------|---------------------|
| <b>STA 1</b> | Chartarlactam M; (LI, 2014),                                     | OH        | H                                  | H         | O         | 386.2326  | 178/150           | C <sub>23</sub> H <sub>32</sub> NO <sub>4</sub>               | 0.7                   | FIGURA A<br>59;126  |
| <b>STA2</b>  | Chartarlactam J; (LI, 2014)                                      | Ac        | H                                  | H         | O         | 428.2432  | 368/178/150       | C <sub>25</sub> H <sub>33</sub> NO <sub>5</sub>               | 0.2                   | FIGURA<br>62;127    |
| <b>STA3</b>  | Chartarlactam E; (LI, 2014)                                      | C=O       | H                                  | H         | O         | 384.2172  | 178/150           | C <sub>23</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>4</sub>               | 0.8                   | FIGURA A<br>61;128  |
| <b>STA4</b>  | Chartarlactam N ;(LI, 2014) ,<br>Stachybotramide;<br>(AYER,1993) | OH        | CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH | H         | O         | 430.2585  | 412/222/204       | C <sub>25</sub> H <sub>35</sub> NO <sub>5</sub>               | 0.7                   | FIGURA A<br>62,129  |
| <b>STA5</b>  | Stachybotramide tri- acetate;<br>( AYER,1993)                    | Ac        | CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH | H         | O         | 472.2688  | 454/222/204       | C <sub>27</sub> H <sub>37</sub> NO <sub>6</sub>               | 1.3                   | FIGURA A<br>63;130  |
| <b>STA6</b>  | Chartarlactam A; (LI, 2014)                                      | OH        | H                                  | C=O       | O         | 400.2116  | 382/192           | C <sub>23</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>5</sub>               | -0.7                  | FIGURA A<br>64;131  |
| <b>STA 7</b> | ---  | OH        | H                                  | H         | NH        | 385.2482  | 367/177           | C <sub>23</sub> H <sub>32</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> | 1.0                   | FIGURA A<br>65;132  |
| <b>STA 8</b> | ---  | Ac        | H                                  | H         | NH        | 427.2591  | 384/367/185       | C <sub>25</sub> H <sub>34</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> | 2.1                   | FIGURA A<br>66;133  |
| <b>STA 9</b> | ---  | C=O       | H                                  | H         | NH        | 383.2324  | 177               | C <sub>23</sub> H <sub>30</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> | 1.3                   | FIGURA A 67;<br>134 |

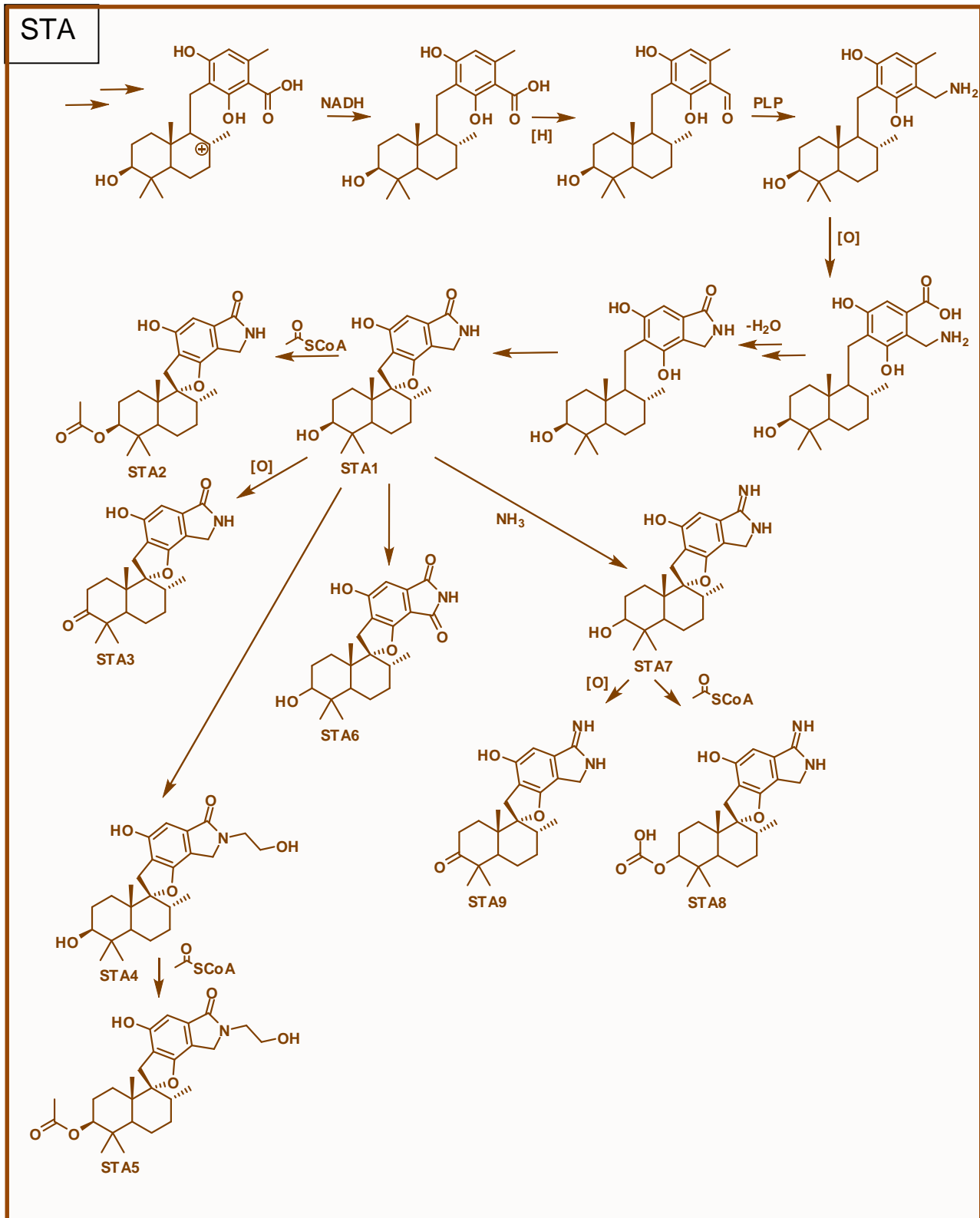


Figura 37- Mecanismo de biossíntese proposto para a formação das stachybotrylactamas- STA

O grupo 4 é composto por estruturas inéditas nomeadas de 10-benzo- $\gamma$ -lactama-5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ ,9 $\beta$ ,10 $\beta$ -drimanos, e estão reunidas na TABELA 11. Apresentam forte semelhança com as stachybotrylactamas, porém, sem o fechamento do sistema spiro e com a presença de um substituinte hidroxila na posição C-8. O caminho biossintético proposto parte do mesmo intermediário catiônico que as do grupo 3, porém com o ataque nucleofílico de uma molécula de H<sub>2</sub>O, conforme descrito na FIGURA 40 e seguido da ciclização do anel do anel lactama.

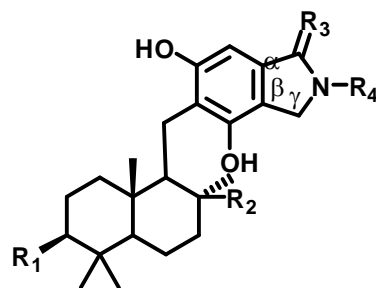


Figura 38- Esqueleto base das estruturas das 10-benzo- $\gamma$ -lactama-5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ ,9 $\beta$ ,10 $\beta$ -drimanos

Tabela 11- Dados estruturais e analíticos obtidos para as estruturas identificadas da classe das 10-benzo- $\gamma$ -lactama-5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ ,9 $\beta$ ,10 $\beta$ -drimanos

| Código | R1  | R2 | R3 | R4                                 | Íon precursor<br><i>m/z</i> [M+H] <sup>+</sup> | Fragmentos  | Fórmula<br>molecular  | Erro<br>(ppm) | Fig.; pág          |
|--------|-----|----|----|------------------------------------|--|-------------|---|---------------|--------------------|
| STAO 1 | OH  | H  | H  | H                                  | 388.2474                                       | 302/178/150 | C <sub>23</sub> H <sub>33</sub> NO <sub>4</sub>               | 2.0           | FIGURA A<br>68;135 |
| STAO 2 | OH  | OH | H  | H                                  | 402.2269                                       | 384/178/150 | C <sub>23</sub> H <sub>31</sub> NO <sub>5</sub>               | 1.5           | FIGURA A<br>70;137 |
| STAO 3 | C=O | OH | H  | H                                  | 404.2429                                       | 386/368/178 | C <sub>23</sub> H <sub>33</sub> NO <sub>5</sub>               | 0.5           | FIGURA A<br>69;136 |
| STAO 4 | OH  | OH | H  | CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH | 432.22.74                                      | 454/222/204 | C <sub>27</sub> H <sub>37</sub> NO <sub>6</sub>               | -0.7          | FIGURA A<br>71;138 |
| STAO 5 | OH  | H  | H  | NH                                 | 387.2641                                       | 369/177     | C <sub>23</sub> H <sub>35</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | 0.3           | FIGURA A<br>72;139 |

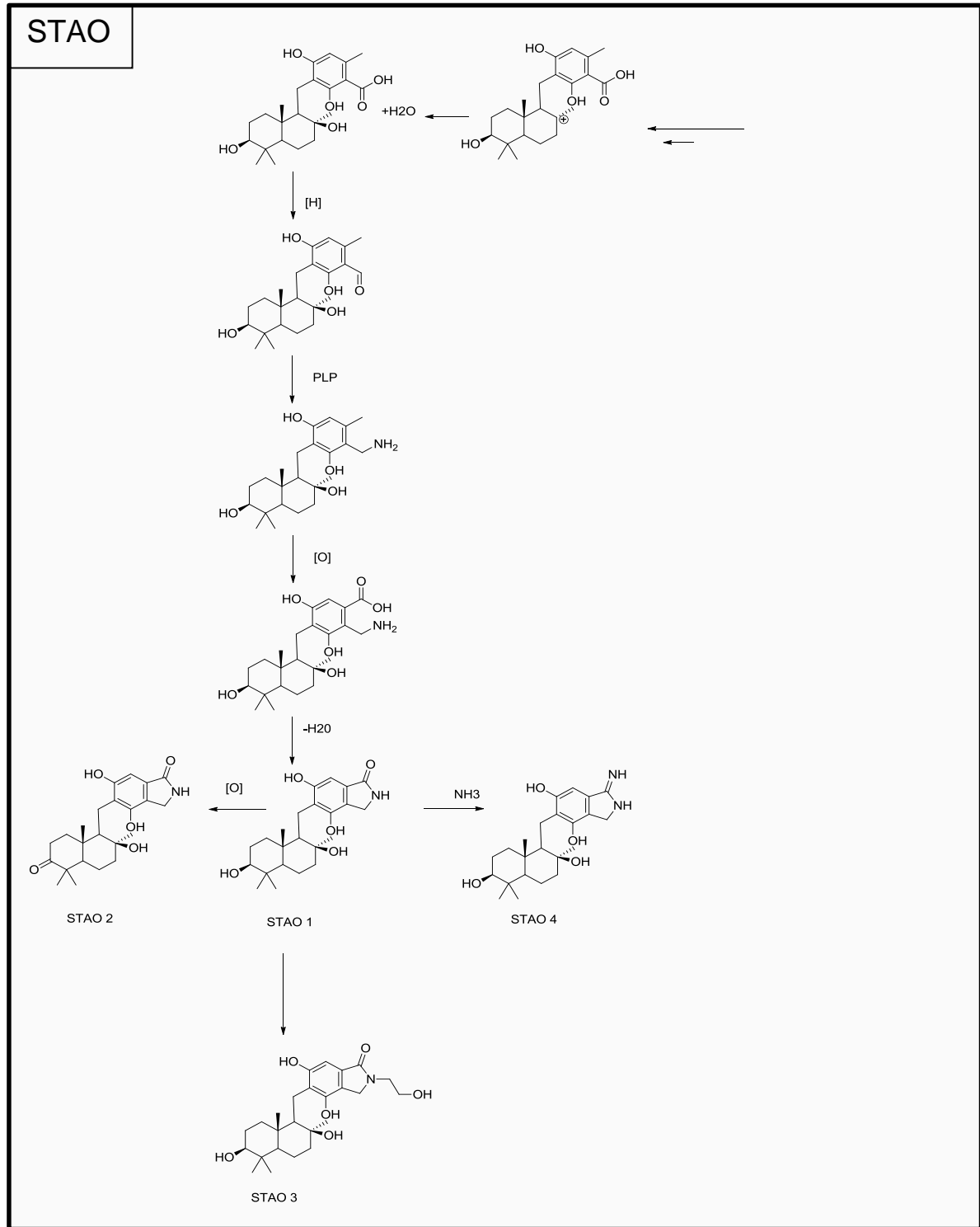


Figura 39 - Mecanismo de biossíntese proposto para a formação das 10-benzo- $\gamma$ -lactama-5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ ,9 $\beta$ ,10 $\beta$ -drimanos - STAO



## 6. CONCLUSÃO

O estudo metabolômico realizado em *Stachybotrys levispora*, possibilitou ampliar o conhecimento do potencial químico que esse fungo possui. Estruturas previstas para o gênero como stachybotrylactomas, stachybotrycromenos, griseofulvinas e análogos, tricotecenos foram apontadas pela dereplicação feita pela plataforma GNPS, aonde algumas destas substâncias apresentaram estereoquímica diferente das reportadas na literatura, sugerindo portanto, que o fungo em questão possui enzimas específicas que catalizam a epoxidação na face  $\beta$  do substrato no processo de biossíntese desses compostos. Essas estruturas foram identificadas mediante ao isolamento e a elucidação completa por RMN. Adicionalmente, estruturas pertencentes a classe das 10-benzo- $\gamma$ -lactama-5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ ,9 $\beta$ ,10 $\beta$ -drimanos foram identificadas e isoladas de forma guiada que reforçam a eficiência da plataforma como ferramenta auxiliar no processo de dereplicação, porém, não excluí a necessidade do isolamento clássico para identificação de novas estruturas, bem como para a comprovação da estereoquímica

Em relação à modificação do meio de cultivo com aminoácidos, sais e moduladores epigenéticos, podemos concluir que não variaram de maneira significativa para a produção de novas substâncias, exceto para griseofulvina e análogos que são favorecidas pelo emprego de sais de cloro e glicose. Além disso, foi possível identificar a produção de substâncias nitrogenadas (anel lactama) em todas as suplementações. Embora o estudo com as suplementações tenha sido feito de forma qualitativa, foi possível verificar que com a adição dos moduladores epigenéticos houve a produção dos metabólitos inéditos, porém para a comprovação dessa observação, estudo quantitativos devem ser feitos. A atividade das substâncias isoladas estão em processo de avaliação. No entanto, os dados da literaturam apontam que as estruturas encontradas apresentam potencial atividade antitumoral, bem como para fontes de novos fungicidas.

Outros cluster com números elevados de nodos foram exibidos para *S.levisporous*, indicando que ainda há muito a ser estudado na busca de novos metabólitos. Relacionado à isso, esse estudo apresentou dados importantes de intermediários de biossíntese, que servirão de base para estudos futuros de marcação isotópica.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL, V.; MILES, Z. D.; WINTER, J. M.; et al. Enzymatic Halogenation and Dehalogenation Reactions: Pervasive and Mechanistically Diverse **Chemical Reviews**, v.117 p. 5619–5674 2017.

ALLARD, P. M.; PÉRESSE, T.; BISSON, J.; et al. Integration of Molecular Networking and In-Silico MS/MS Fragmentation for Natural Products Dereplication. **Analytical Chemistry**, v. 88, n. 6, p. 3317–3323, 2016.

AYER, A. ChemInform Abstract: Secondary Metabolites of the Aspen Fungus *Stachybotrys cylindrospora*. **Canadian Journal of Chemistry** n. 24 1824, p. 2–8, 1993.

BARROS, D. C. M.; FONSECA, I. C. DE B.; BALBI-PEÑA, M. I.; PASCHOLATI, S. F.; PEITL, D. C. Biocontrol of *Sclerotinia sclerotiorum* and white mold of soybean using saprobic fungi from semi-arid areas of Northeastern Brazil. **Summa Phytopathologica**, v. 41, n. 4, p. 251–255, 2015.

BRAKHAGE, A. A.; SCHROECKH, V. Fungal secondary metabolites - Strategies to activate silent gene clusters. **Fungal Genetics and Biology**, v. 48, n. 1, p. 15–22, 2011.

BRAKHAGE, A. A.; SCHROECKH, V. Fungal secondary metabolites – Strategies to activate silent gene clusters. , **Fungal Genet. Biol** v. 48, p. 15–22, 2011.

BRAKHAGE, A. A. Regulation of fungal secondary metabolism. **Nature reviews. Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 21–32, 2013.

BROSCH, G.; LOIDL, P.; GRAESSLE, S. Histone modifications and chromatin dynamics: A focus on filamentous fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 32, n. 3, p. 409–439, 2008.

CACHO, R. A.; CHOOI, Y. H.; ZHOU, H.; TANG, Y. Complexity generation in fungal polyketide biosynthesis: A spirocycle-forming P450 in the concise pathway to the antifungal drug griseofulvin. **ACS Chemical Biology**, v. 8, n. 10, p. 2322–2330, 2013.

CHERBLANC, F. L.; DAVIDSON, R. W. M.; DI FRUSCIA, P.; SRIMONGKOLPITHAK,

N.; FUCHTER, M. J. Perspectives on natural product epigenetic modulators in chemical biology and medicine. **Natural product reports**, v. 30, n. 5, p. 605–24, 2013.

CHUNG, Y. M.; WEI, C. K.; CHUANG, D. W.; et al. An epigenetic modifier enhances the production of anti-diabetic and anti-inflammatory sesquiterpenoids from *Aspergillus sydowii*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 13, p. 3866–3872, 2013.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1830, n. 6, p. 3670–3695, 2013.

DEWICK, P. M. *Medicinal Natural Products: A biosynthetic Approach*, 3<sup>rd</sup> ed, 2009

DU, L.; ROBLES, A. J.; KING, J. B.; et al. Crowdsourcing natural products discovery to access uncharted dimensions of fungal metabolite diversity. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 53, n. 3, p. 804–809, 2014.

FISCH, K. M.; GILLASPY, A. F.; GIPSON, M.; et al. Chemical induction of silent biosynthetic pathway transcription in *aspergillus niger*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 9, p. 1199–1213, 2009.

GERIS, R.; SIMPSON, T. J. Meroterpenoids produced by fungi. **Natural Product Reports**, v. 26, n. 8, p. 1063–1094, 2009.

GUREVICH, A.; MIKHEENKO, A.; SHLEMOV, A.; et al. Increased diversity of peptidic natural products revealed by modification-tolerant database search of mass spectra. **Nature Microbiology**, v. 3, n. 3, p. 319–327, 2018.

HE, C.; COLE, P. Introduction: Epigenetics. **Chemical Reviews**, v. 115, n. 6, p. 2223–2224, 2015.

HILLMAN, E. T.; READNOUR, L. R.; SOLOMON, K. V. Exploiting the natural product potential of fungi with integrated -omics and synthetic biology approaches. **Current Opinion in Systems Biology**, v. 5, n. Figure 1, p. 50–56, 2017.

HÖVELMANN, Y.; HUMPF, H.-U.; JAGELS, A.; et al. Stachybotrychromenes A–C: novel cytotoxic meroterpenoids from *Stachybotrys* sp. **Mycotoxin Research**, v. 34, n. 3, p. 179–185, 2018.

HIRATSUKA, Y., CHAKRAVARTY, P., MIAO, S., AND AYER, W. A.. Potential for

biological protection against blue stain in *Populus tremuloides* with a hyphomycetous fungus, *Stachybotrys cylindrospora*. **Can. J. For. Res.** v. 24, p.174–179, 1994

IZABEL, T. DOS S. S.; CRUZ, A. C. R. DA; BARBOSA, F. R.; et al. The genus *Stachybotrys* (anamorphic fungi) in the semi-arid region of Brazil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 33, n. 3, p. 479–487, 2010.

JARVIS, B. B. *Stachybotrys chartarum*: A fungus for our time. **Phytochemistry**, v. 64, n. 1, p. 53–60, 2003.

JARVIS, B. B.; SALEMME, J.; MORALS, A. *Stachybotrys* Toxins. 1. **Natural Toxins**, v. 3, n. 1, p. 10–16, 1995.

JOHNSON, S. R.; LANGE, B. M. Open-Access Metabolomics Databases for Natural Product Research: Present Capabilities and Future Potential. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 3, p. 1–10, 2015.

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

KELLER, N. P.; TURNER, G.; BENNETT, J. W. Fungal secondary metabolism - From biochemistry to genomics. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 12, p. 937–947, 2005.

LEÃO-FERREIRA, S. M.; GUSMÃO, L. F. P.; CASTAÑEDA RUIZ, R. F. Conidial fungi from the semi-arid Caatinga biome of Brazil. Three new species and new records. **Nova Hedwigia**, v. 96, n. 3–4, p. 479–494, 2013.

LI, Y.; WU, C.; LIU, D.; et al. Chartarolactams A-P, phenylspirodrimanes from the sponge-associated fungus *stachybotrys chartarum* with antihyperlipidemic activities. **Journal of Natural Products**, v. 77, n. 1, p. 138–147, 2014.

LIU, D.-Z.; LIANG, B.-W.; LI, X.-F.; YU, Z.-Y. Epigenetic modifier-induced biosynthesis of novel acetylenic sterols from *Cladosporium colocasiae*. **Steroids**, v. 87, p. 35–38, 2014.

PAVIA, D.L, LAMPMAN, G.M; KRIZ, G.S.Introduction of Spectroscopy: A guide for Organic Students **Brookes/cole**, 3<sup>rd</sup> ed. 2001

MILLER, J. D.; MCMULLIN, D. R. Fungal secondary metabolites as harmful indoor air

contaminants: 10 years on. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 24, p. 9953–9966, 2014.

MOHIMANI, H.; GUREVICH, A.; MIKHEENKO, A.; et al. Dereplication of peptidic natural products through database search of mass spectra. **Nature Chemical Biology**, v. 13, n. 1, p. 30–37, 2017.

NELSON; COX. Leringher Principles of Biochemistry, 4<sup>th</sup> ed. 2011.

NETZKER, T.; FISCHER, J.; WEBER, J.; et al. Microbial communication leading to the activation of silent fungal secondary metabolite gene clusters. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. April, p. 1–13, 2015.

NIELSEN, K.F.; SMEDSGAARD, J. Fungal metabolite screening: database of 474 mycotoxins and fungal metabolites for dereplication by standardised liquid. **Journal of Chromatography A**, v.102, p-111-136, 2003

PATRIDGE, E.; GAREISS, P.; KINCH, M. S.; HOYER, D. An analysis of FDA-approved drugs: Natural products and their derivatives. **Drug Discovery Today**, v. 21, n. 2, p. 204–207, 2016.

PFANNENSTIEL, B. T.; KELLER, N. P. On top of biosynthetic gene clusters: How epigenetic machinery influences secondary metabolism in fungi. **Biotechnology Advances**, p, 2019.

Reuter S, Gupta SC, Park B, Goel A, Aggarwal BB. Epigenetic changes induced by curcumin and other natural compounds. **Genes Nutr**. v.6, n. 2, p.93-108, 2011

RIBEIRO, A. I.; COSTA, E. S.; THOMASI, S. S.; et al. Biological and Chemical Control of *Sclerotinia sclerotiorum* using *Stachybotrys levispora* and Its Secondary Metabolite Griseofulvin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 29, p. 7627–7632, 2018.

ROY, B.; SANYAL, K. Diversity in requirement of genetic and epigenetic factors for centromere function in fungi. **Eukaryotic Cell**, v. 10, n. 11, p. 1384–1395, 2011.

SANTOS, T. A. B. **RELAÇÕES FILOGENÉTICAS DOS COMPLEXOS STACHYBOTRYSMEMNONIELLA E PHALANGISPORASPEIROPSIS-WIESNERIOMYCES**, 2015. Disponível em: <[https://repositorio.ufpe.br/bitstream/123456789/17845/1/Dissertação\\_Tiago\\_AB](https://repositorio.ufpe.br/bitstream/123456789/17845/1/Dissertação_Tiago_AB)

Santos PPGBF-CB-UFPE.pdf>. .

SEDIO, B. E.; BOYA P., C. A.; ROJAS ECHEVERRI, J. C. A protocol for high-throughput, untargeted forest community metabolomics using mass spectrometry molecular networks. **Applications in Plant Sciences**, v. 6, n. 3, p. 1–13, 2018.

SELKER, E. U. Trichostatin A causes selective loss of DNA methylation in *Neurospora*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 16, p. 9430–9435, 1998.

SEYEDSAYAMDOST, M. R.; CLARDY, J. Natural Products and Synthetic Biology. **ACS Synthetic Biology**, v.3, n.10 p. 745-747, 2014.

SHI, Y.; PAN, C.; CEN, S.; et al. Comparative metabolomics reveals defence-related modification of citrinin by *Penicillium citrinum* within a synthetic *Penicillium*–*Pseudomonas* community. **Environmental Microbiology**, v. 21, n. 1, p. 496–510, 2019.

SHILATIFARD, A. Chromatin modifications by methylation and ubiquitination: implications in the regulation of gene expression. **Annual review of biochemistry**, v. 75, p. 243–269, 2006.

SKELLAM, E. Strategies for Engineering Natural Product Biosynthesis in Fungi. **Trends in Biotechnology**, p. 1–12, 2018.

SMEDSGAARD, J. Micro-scale extraction procedure for standardization screening of fungal metabolite production in cultures. **Journal of Chromatography A**, v. 760, n. 2, p. 264–270, 1997.

SOYER, J. L.; EL GHALID, M.; GLASER, N.; et al. Epigenetic Control of Effector Gene Expression in the Plant Pathogenic Fungus *Leptosphaeria maculans*. **PLoS Genetics**, v. 10, n. 3, 2014.

SUBRAMANIAN, B. Y. C. V. Fungi imperfecti. **Iconographia mycologica**, v. 48, n. 1, 1981.

TAKAHASHI, J. A.; TELES, A. P. C.; DE ALMEIDA PINTO BRACARENSE, A.; GOMES, D. C. Classical and epigenetic approaches to metabolite diversification in filamentous fungi. **Phytochemistry Reviews**, v. 12, n. 4, p. 773–789, 2013.

TERUI, Y.; KAMIGAUCHI, T. Novel Stachyflin Derivatives from *Stachybotrys* sp. RF-7260. , v. 55, n. 3, 2002.

WANG, A.; XU, Y.; GAO, Y.; et al. Chemical and bioactive diversities of the genera *Stachybotrys* and *Memnoniella* secondary metabolites. **Phytochemistry Reviews**, v. 14, n. 4, p. 623–655, 2015.

WANG, M.; CARVER, J. J.; PHELAN, V. V; et al. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. **Nature Biotechnology**, v. 34, n. 8, p. 828–837, 2016.

WANG, Y.; HYDE, K. D.; MCKENZIE, E. H. C.; et al. Overview of *Stachybotrys* (*Memnoniella*) and current species status. **Fungal Diversity**, v. 71, n. 1, p. 17–83, 2015.

WATANABE, K. Effective use of heterologous hosts for characterization of biosynthetic enzymes allows production of natural products and promotes new natural product discovery. **Chemical & pharmaceutical bulletin**, v. 62, n. 12, p. 1153–65, 2014.

WIEMANN, P.; KELLER, N. P. Strategies for mining fungal natural products. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 41, n. 2, p. 301–313, 2014.

ZARINS-TUTT, J. S.; BARBERI, T. T.; GAO, H.; et al. Prospecting for new bacterial metabolites: A glossary of approaches for inducing, activating and upregulating the biosynthesis of bacterial cryptic or silent natural products. **Natural Product Reports**, v. 33, n. 1, p. 54–72, 2016.

ZHANG, Z.; HE, X.; WU, G.; et al. Aniline-Tetramic Acids from the Deep-Sea-Derived Fungus *Cladosporium sphaerospermum* L3P3 Cultured with the HDAC Inhibitor SAHA. **Journal of Natural Products**, v. 81, n. 7, p. 1651–1657, 2018.

ZHAO, J.; FENG, J.; TAN, Z.; et al. Stachybotrynsins A-G, Phenylspirodrimane Derivatives from the Fungus *Stachybotrys chartarum*. **Journal of Natural Products**, v. 80, n. 6, p. 1819–1826, 2017.



## 8. ANEXOS I

- Perfis cromatográficos de *S. levisporous* em escala analítica –UPLC-DAD, com as diferentes suplementações

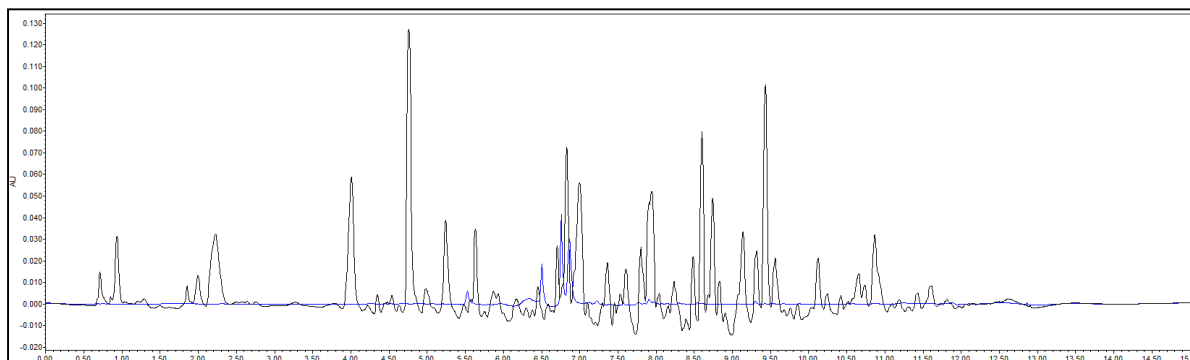


FIGURA A 1 Perfil cromatográfico do extrato do fungo *Stachybotrys levisporous* crescido em meio sólido de batata – dextrose-ágar e 1% de glicose (em preto) e seu respectivo controle (em azul)

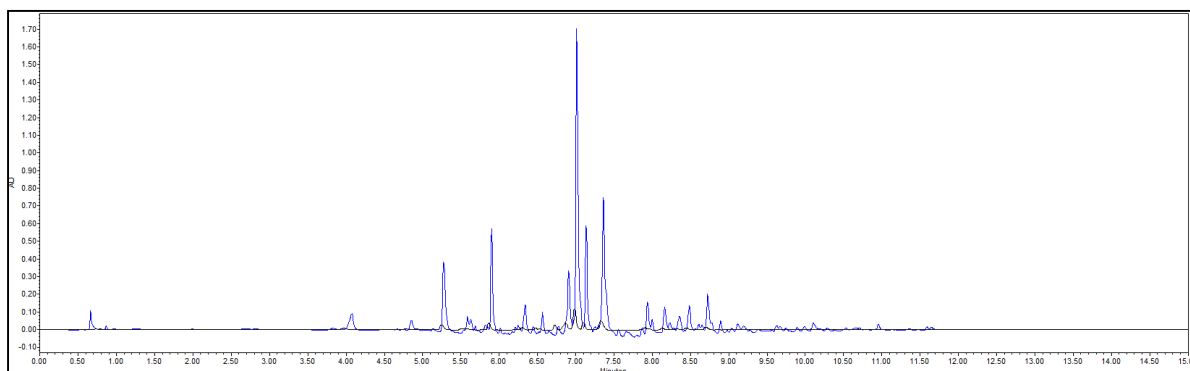


FIGURA A 2 -Perfil cromatográfico do extrato do fungo *Stachybotrys levisporous* crescido em meio sólido de batata – dextrose-ágar e 5-azacitidina (em azul) e seu respectivo controle (em preto)

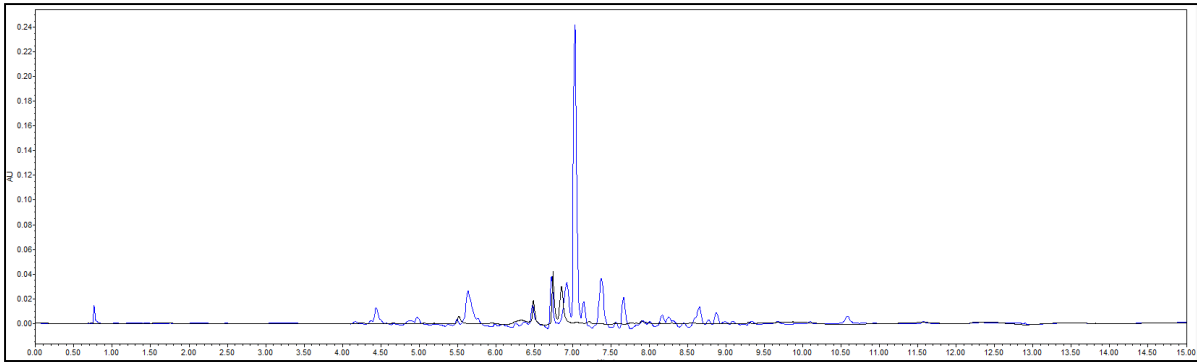


FIGURA A 3-Perfil cromatográfico do extrato do fungo *Stachybotrys levisporous* crescido em meio sólido de batata – dextrose-ágar e Suberoil (em azul) e seu respectivo controle (em preto)

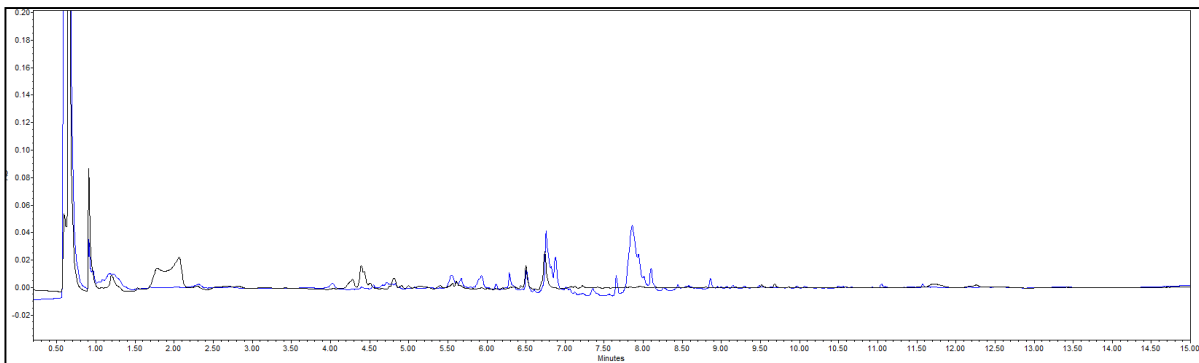


FIGURA A 4 - Perfil cromatográfico do extrato do fungo *Stachybotrys levisporous* crescido em meio sólido de batata – dextrose-ágar e 1% de glutamina (em azul) e seu respectivo controle (em preto)

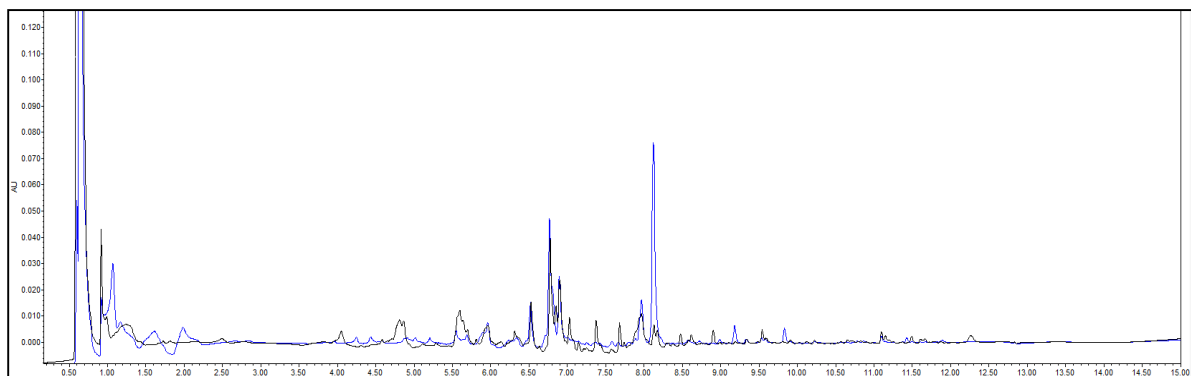


FIGURA A 5 - Perfil cromatográfico do extrato do fungo *Stachybotrys levisporous* crescido em meio sólido de batata – dextrose-ágar e 5% de glutamina(em azul) e seu respectivo controle (em preto)

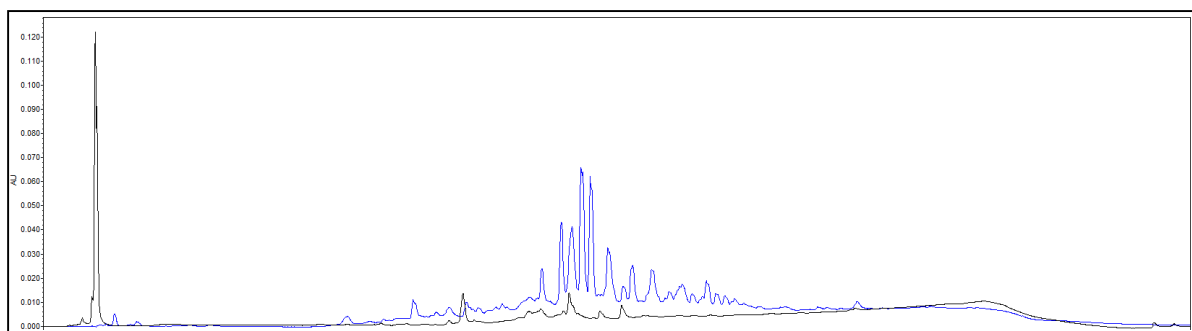


FIGURA A 6 - Perfil cromatográfico do extrato do fungo *Stachybotrys levisporous* crescido em meio sólido de batata – dextrose-ágar e  $\text{NH}_4\text{Br}$  (em azul) e seu respectivo controle (em preto)

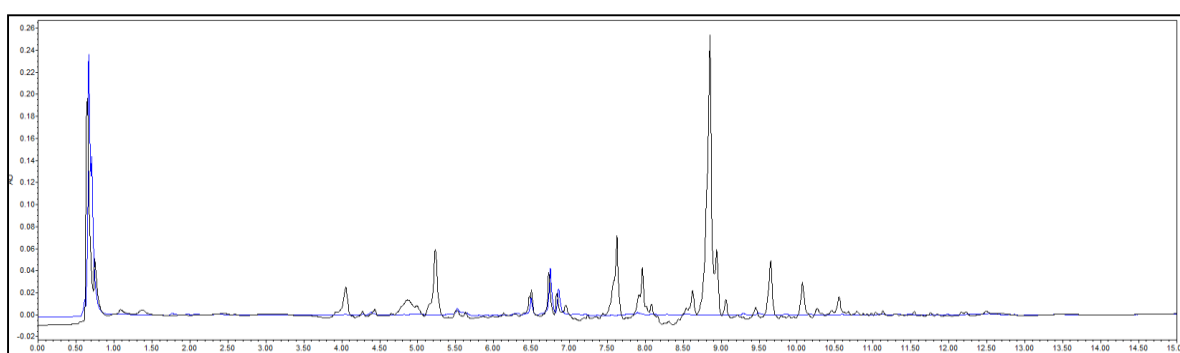


FIGURA A 7 - Perfil cromatográfico do extrato do fungo *Stachybotrys levisporous* crescido em meio sólido de batata – dextrose-ágar e  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (em preto) e seu respectivo controle (em azul)

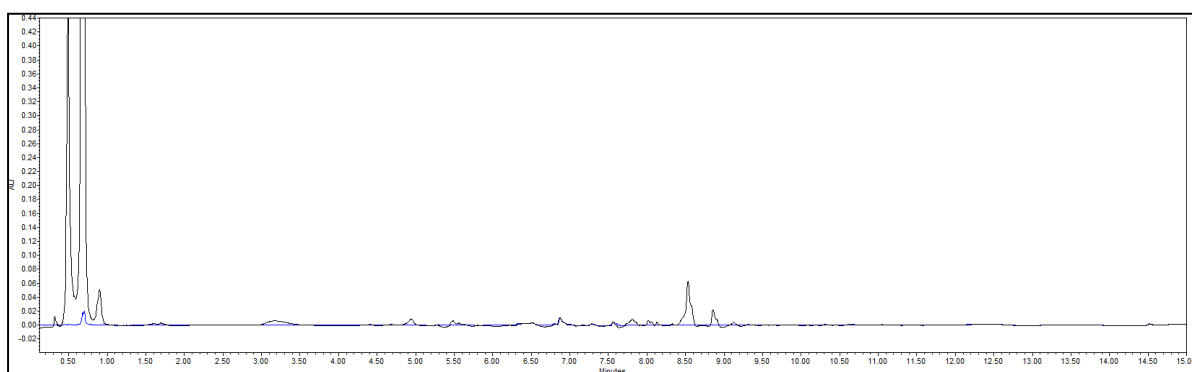


FIGURA A 8 - Perfil cromatográfico do extrato do fungo *Stachybotrys levisporous* crescido em meio sólido de batata – dextrose-ágar e L-alanina (em preto) e seu respectivo controle (em azul)

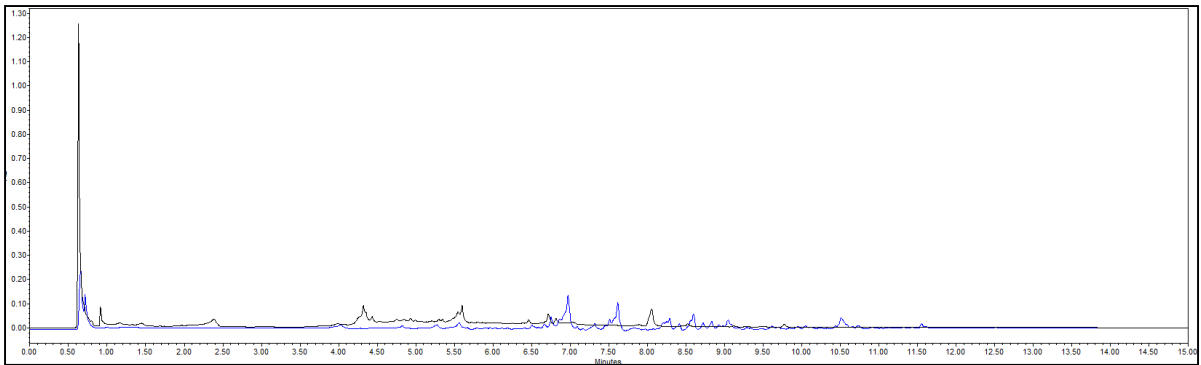


FIGURA A 9 - Perfil cromatográfico do extrato do fungo *Stachybotrys levisporous* crescido em meio sólido de batata – dextrose-ágar e L-serina (em azul) e seu respectivo controle (em preto)

- **Espectros de massas das substâncias identificadas no cluster GRI**

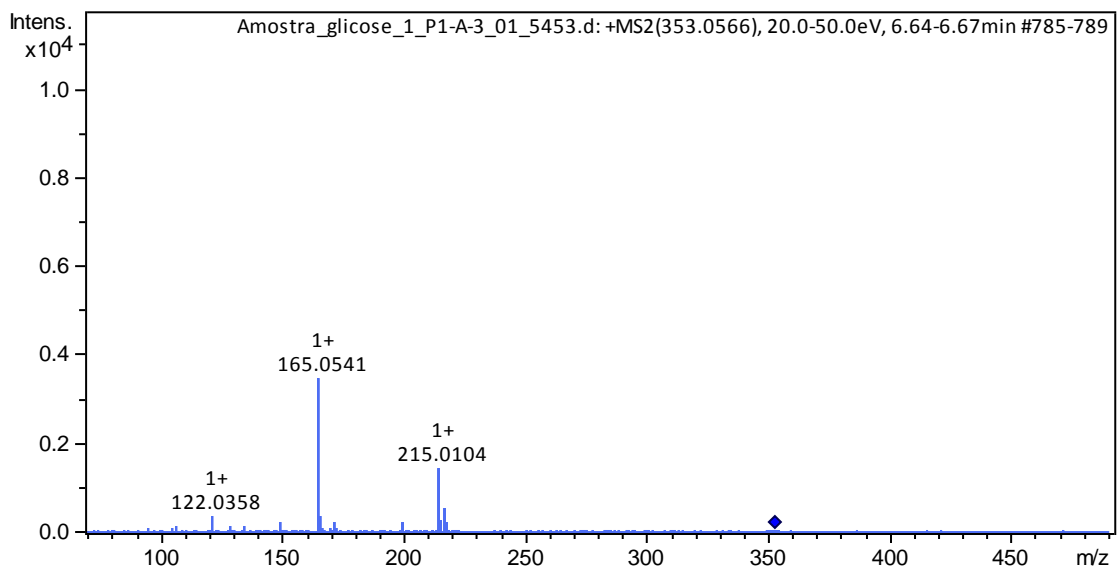


FIGURA A 10 - Espectro de HRMS da substância Griseofulvina (GRI 1), modo positivo de ionização  $[M+H]^+$ , 20-50 eV.

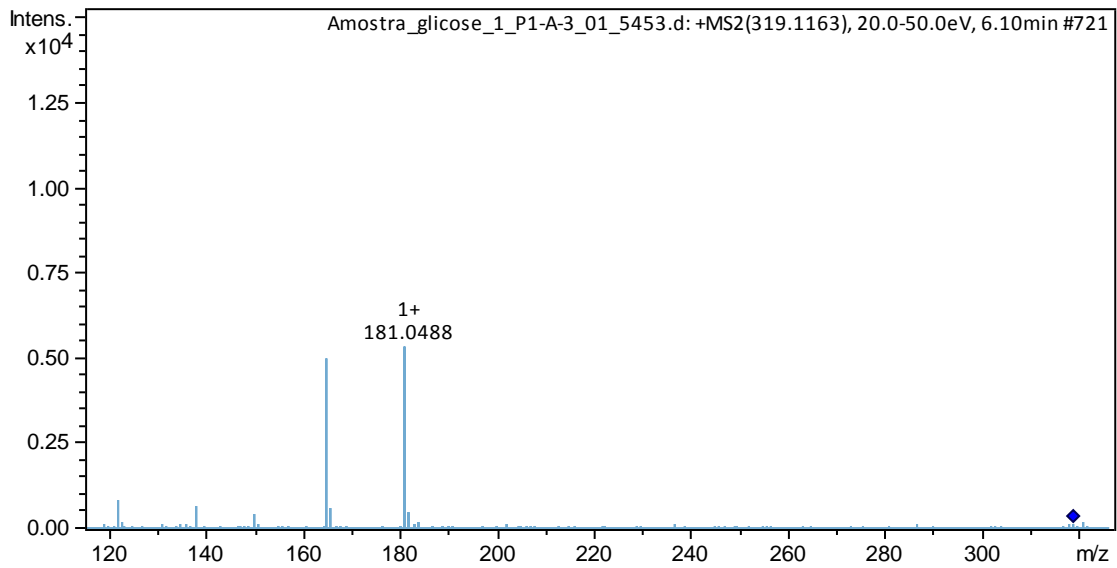


FIGURA A 11 - Espectro de HRMS da substância Dehidrogriseofulvin (GRI 2), modo positivo de íonização  $[M+H]^+$ , 20-50 eV

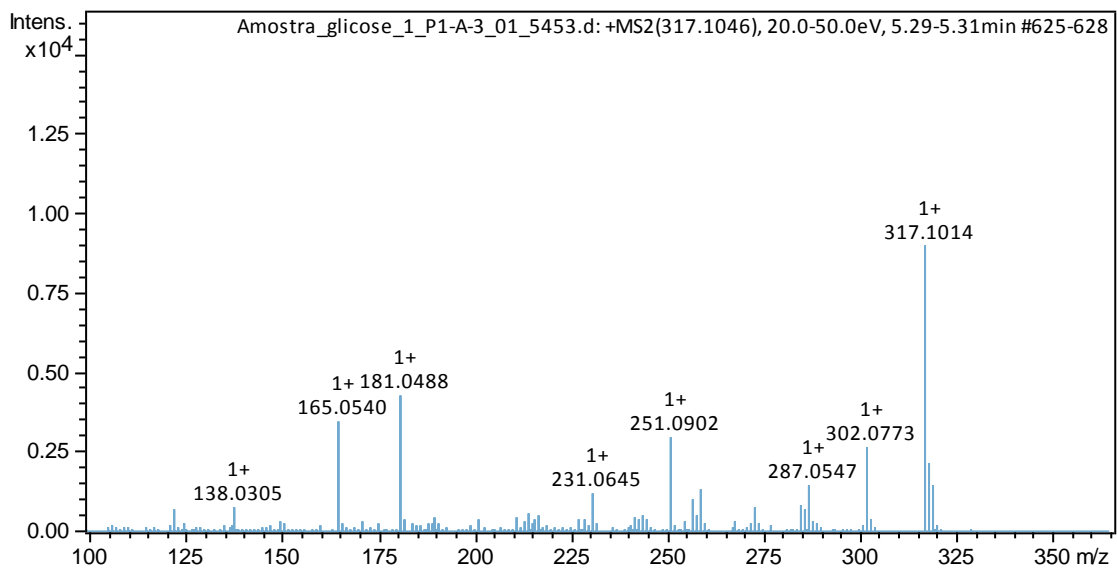


FIGURA A 12 - Espectro de HRMS da substância 7-declorogriseofulvina (GRI 3), modo positivo de íonização  $[M+H]^+$ , 20-50 eV

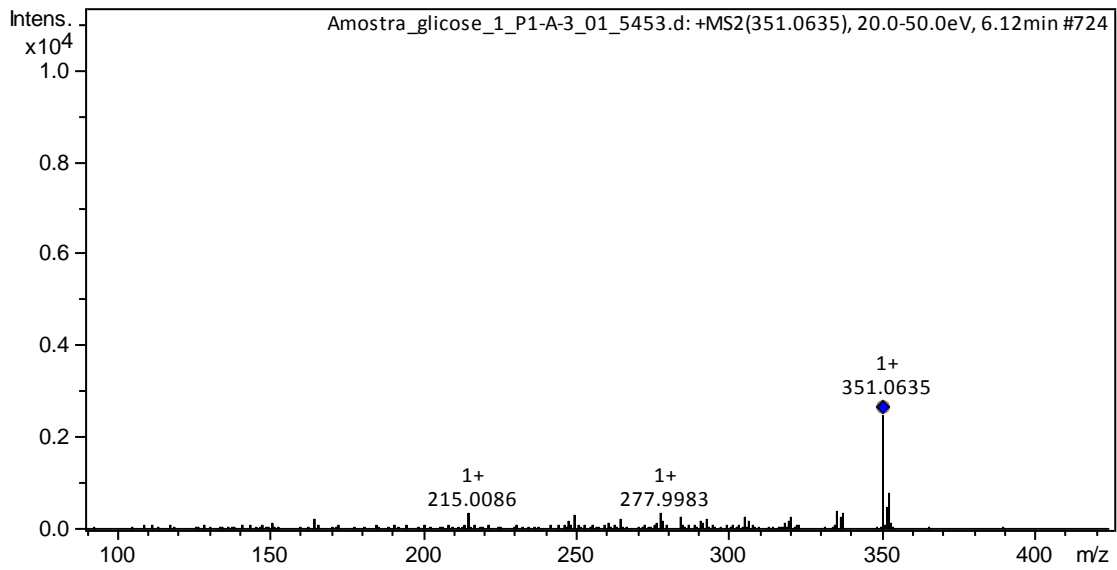


FIGURA A 13 - Espectro de HRMS da substância Griseofulvina (GRI 4), modo positivo de ionização  $[M+H]^+$ , 20-50 eV

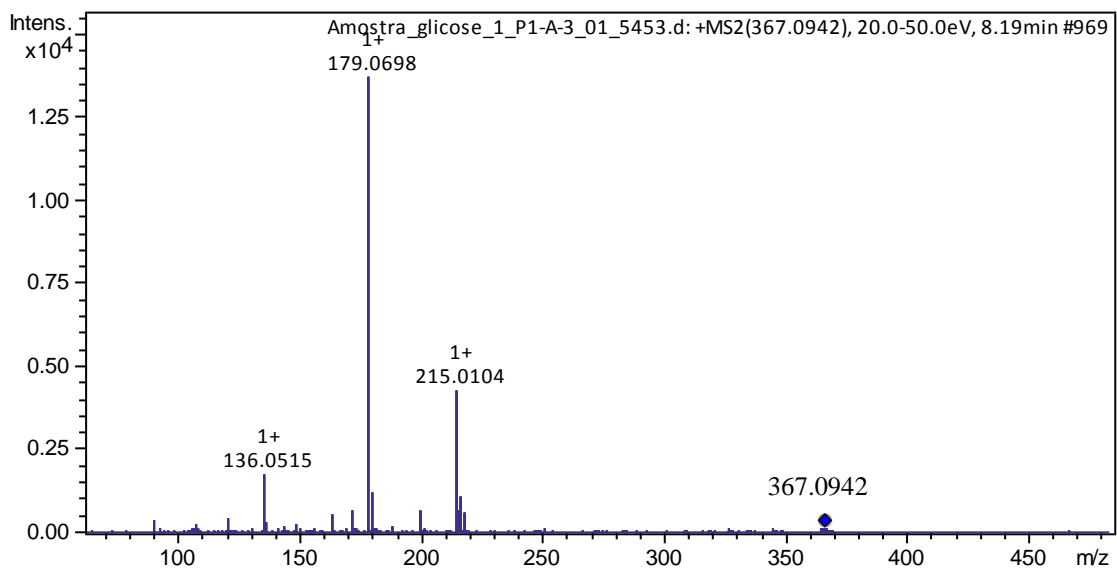


FIGURA A 14 Espectro de HRMS da substância (GRI 5), modo positivo de ionização  $[M+H]^+$ , 20-50 eV

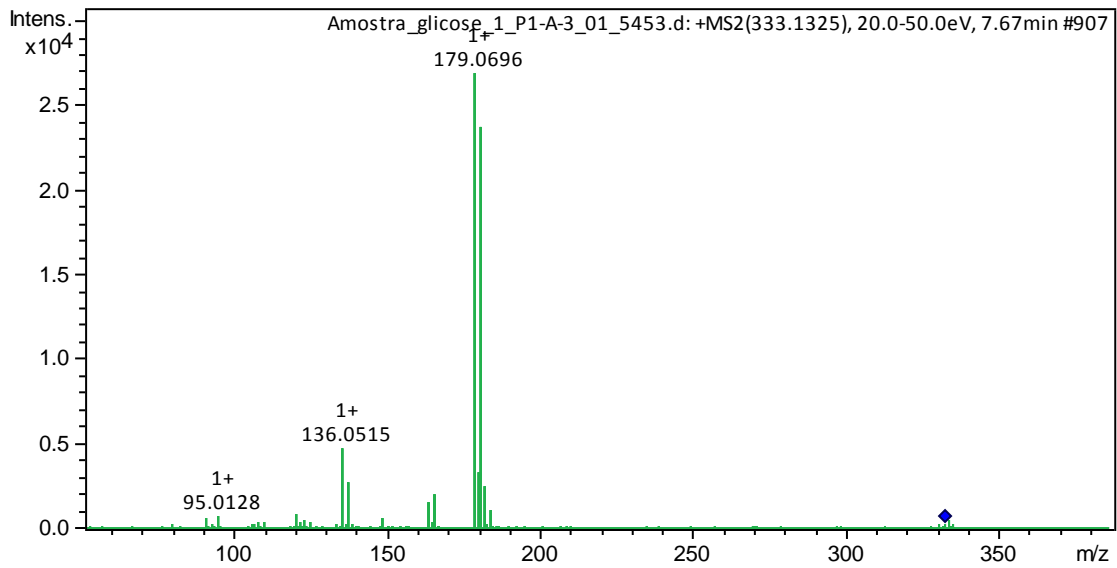


FIGURA A 15-Espectro de HRMS da substância (GRI 5), modo positivo de ionização  $[M+H]^+$ , 20-50 eV

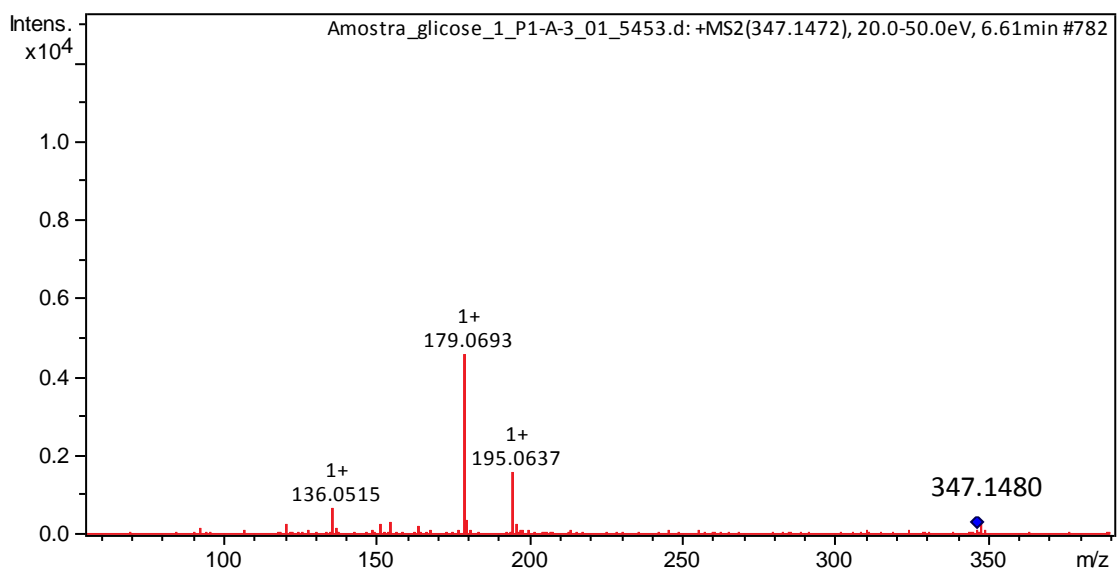


FIGURA A 16 - Espectro de HRMS da substância (GRI 7), modo positivo de ionização  $[M+H]^+$ , 20-50 eV

- Espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, HMBC, HSQC, COSY e NOESY 1D das substâncias isoladas

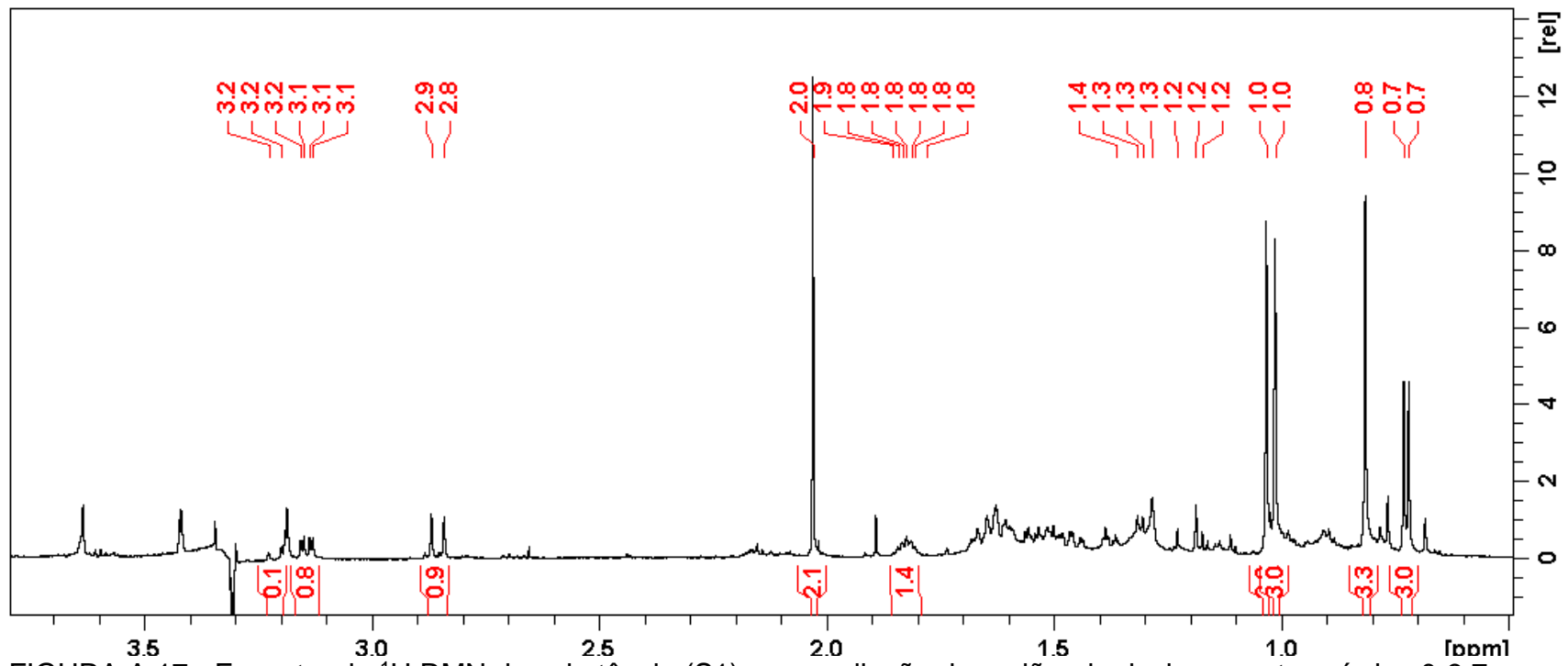
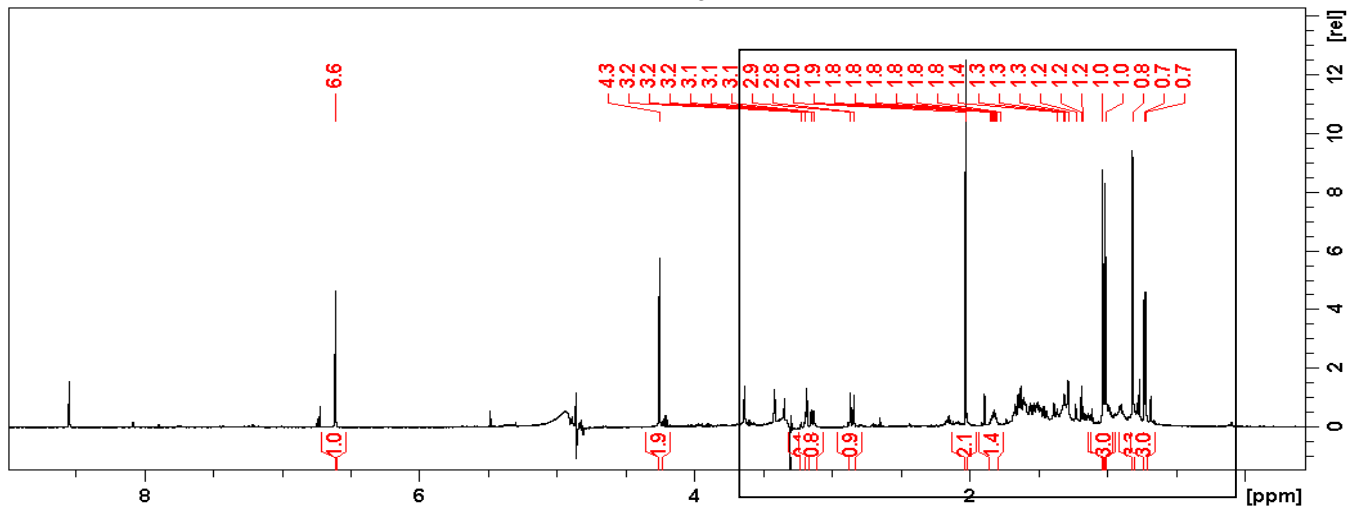
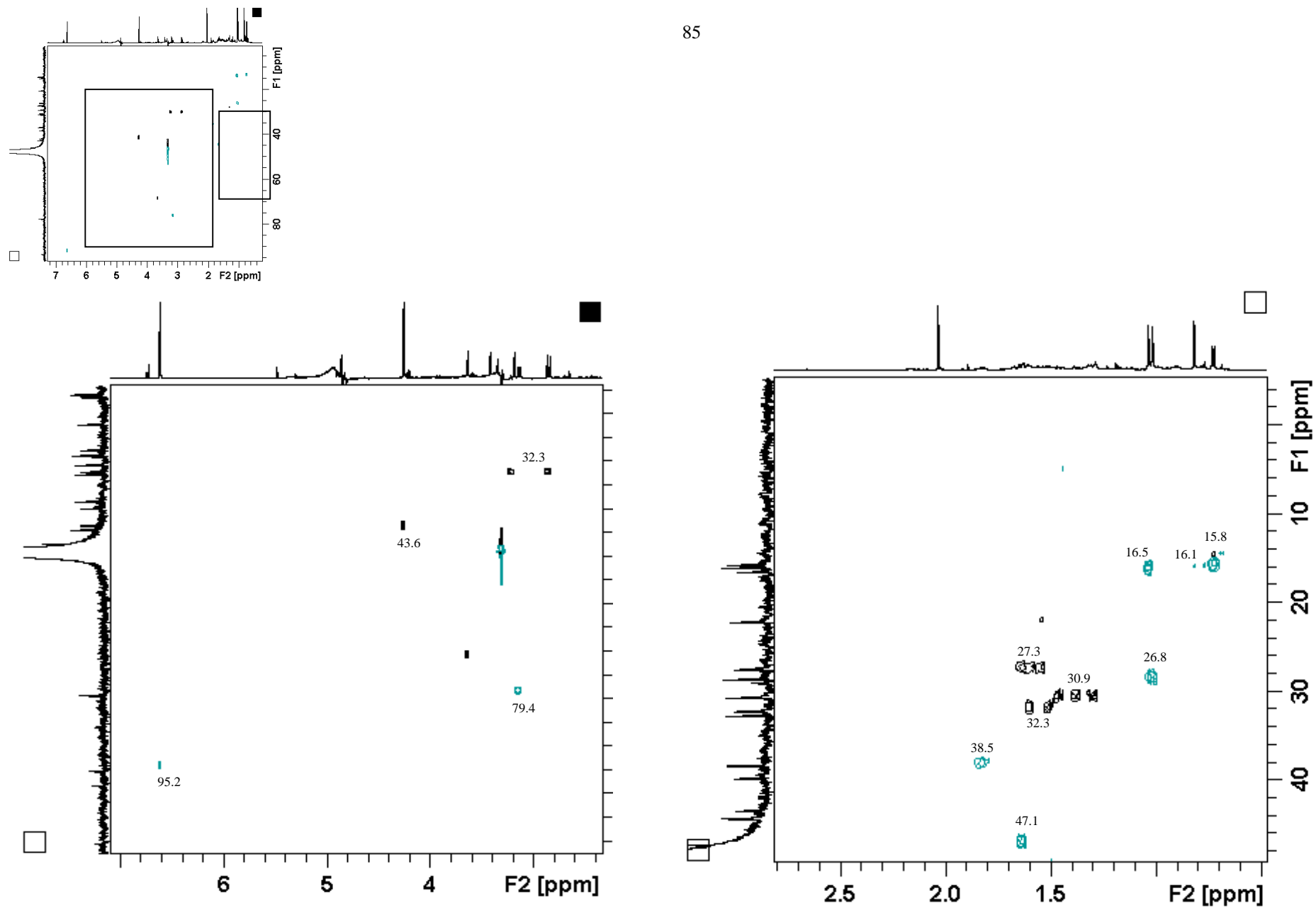


FIGURA A 17 - Espectro de <sup>1</sup>H RMN da substância (S1) e a ampliação da região de deslocamento químico 0-3.7 (ppm)- CD<sub>3</sub>OD 600MHz



FIGURA A 18 - Espectros ampliado do mapa de contorno HSQC da substância isolada (S1)-  $\text{CD}_3\text{OD}$  150 MHz

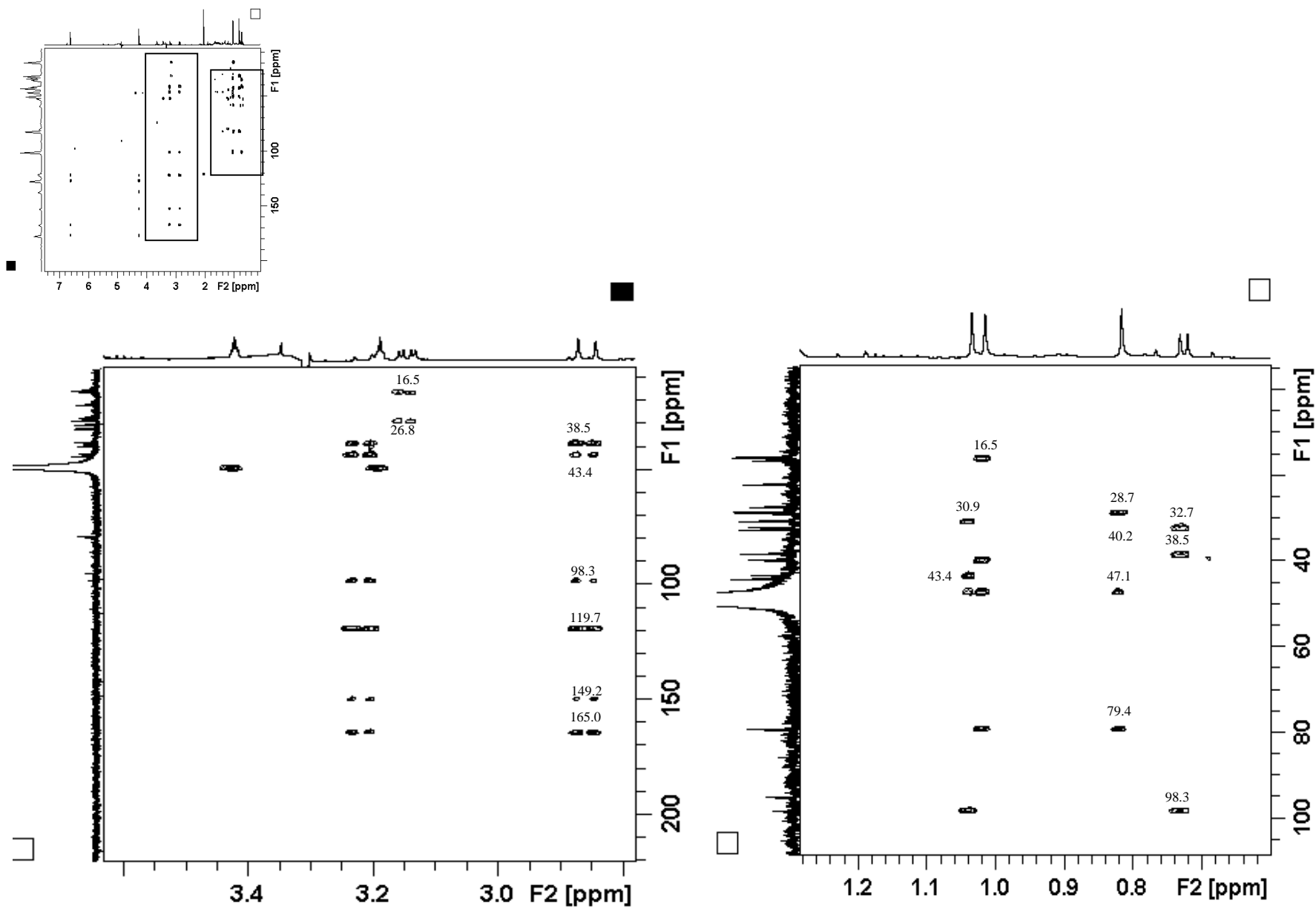


FIGURA A 19 Espectros ampliados do mapa de contorno HMBC da substância isolada (S1)- CD<sub>3</sub>OD 150 MHz

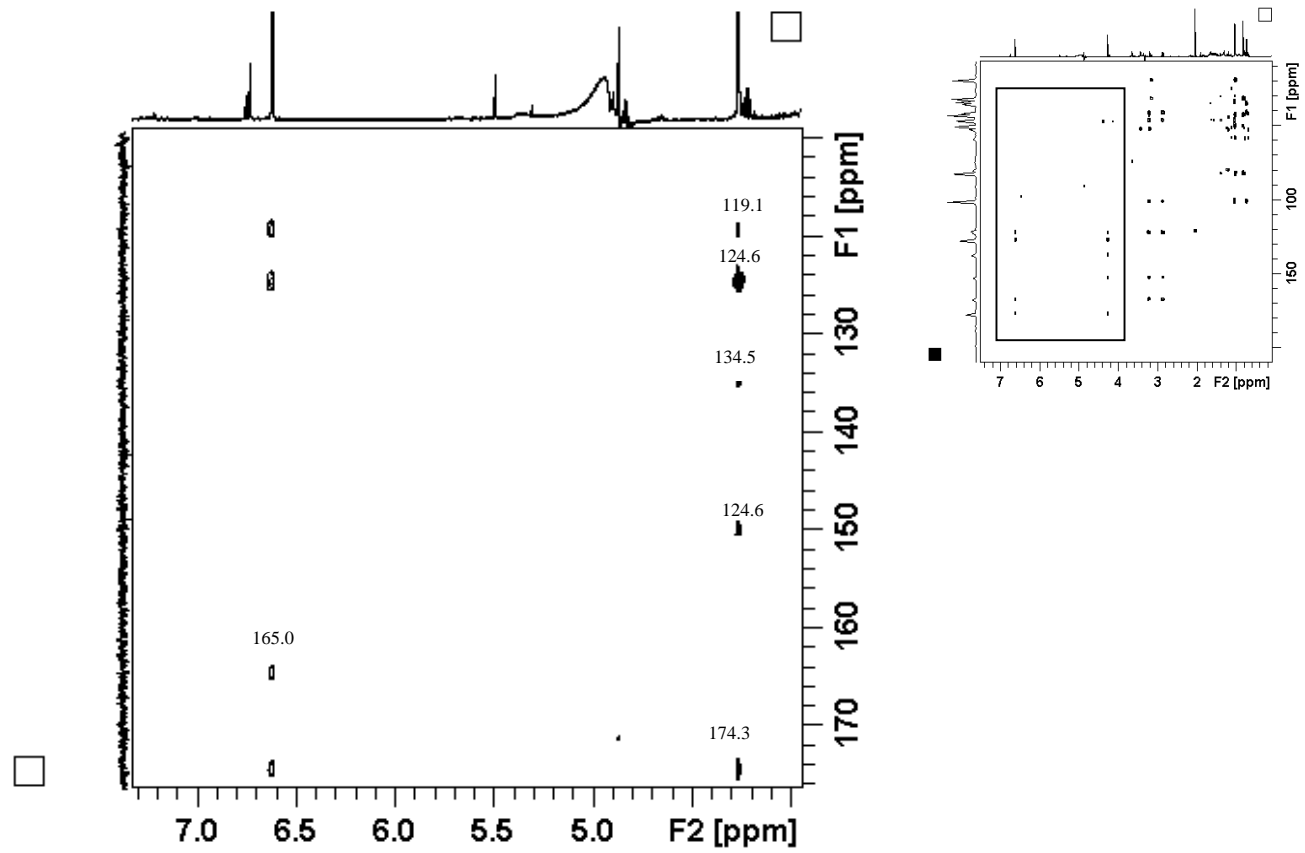


FIGURA A 20 - Espectro ampliados do mapa de contorno HMBC da substância isolada (S1)- CD<sub>3</sub>OD 150 MHz

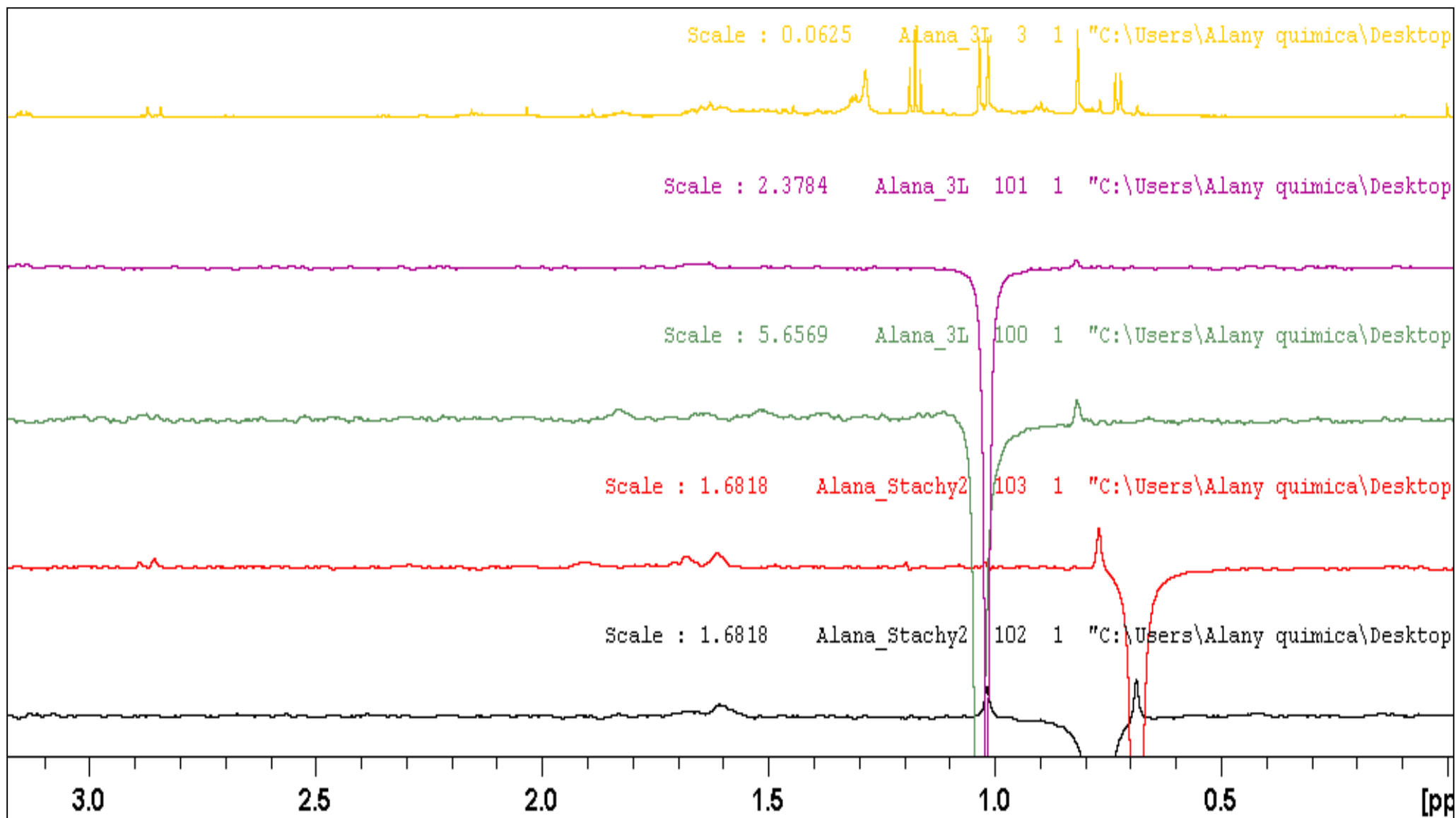


FIGURA A 21 - Espectro de NOESY 1D ampliado da Substância S1

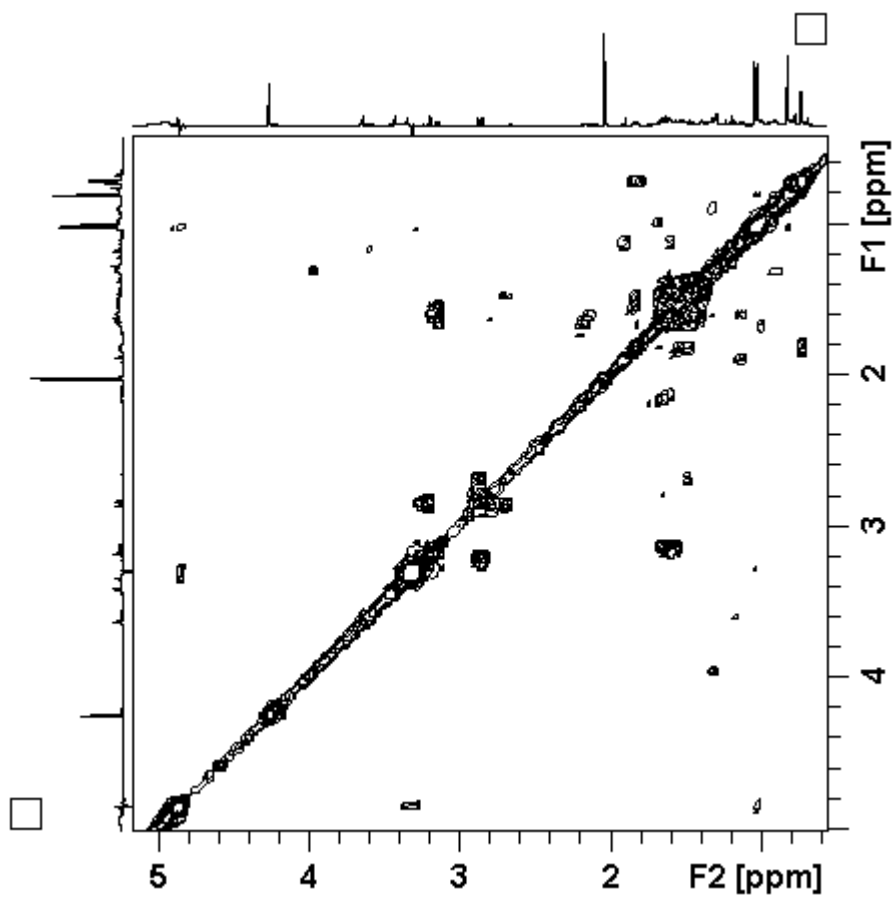


FIGURA A 22 - Espectro de COSY da substância isolada (S1)- CD<sub>3</sub>OD 600 MHz

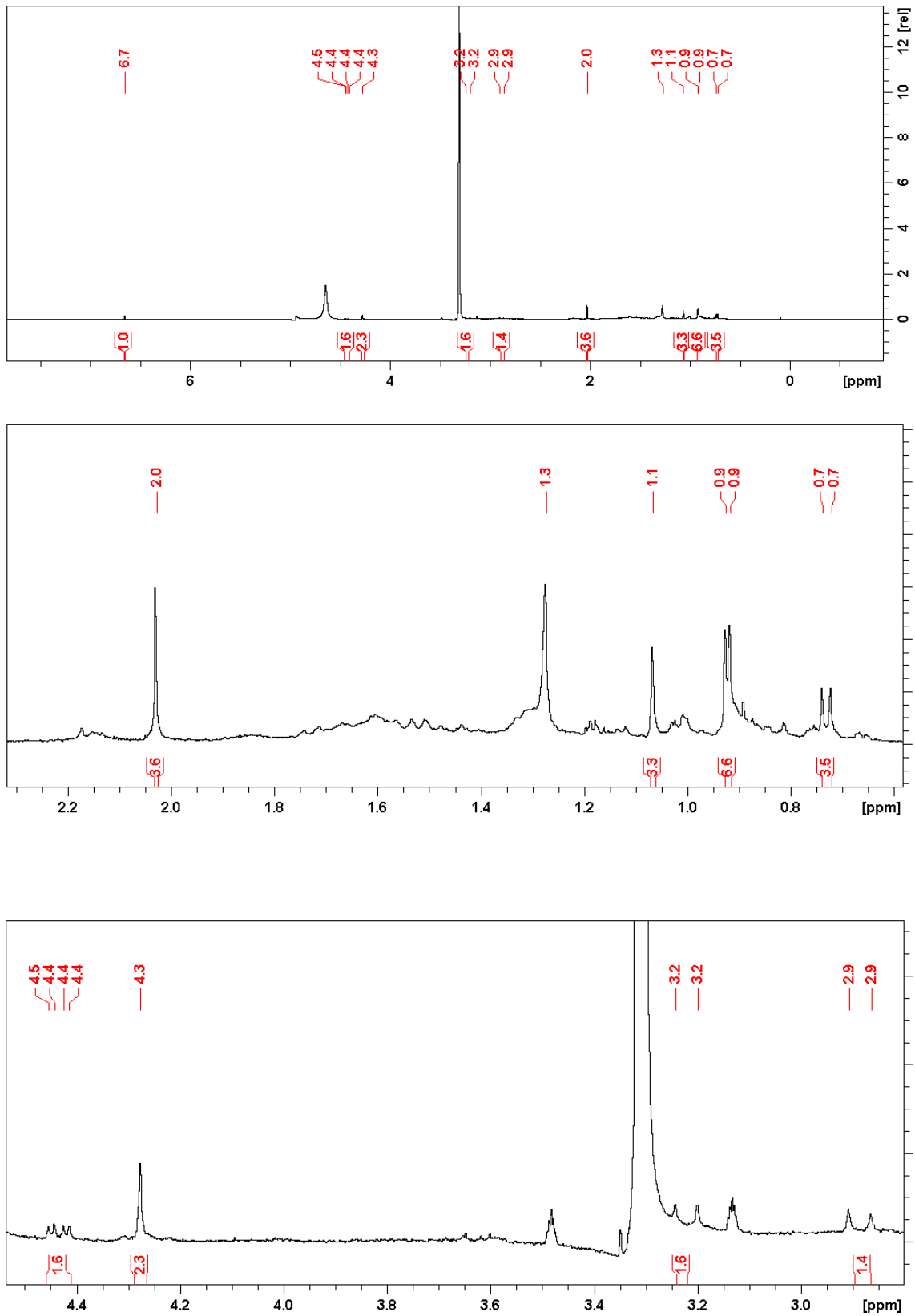


FIGURA A 23 - Espectro de  $^1\text{H}$  RMN da substância isolada (S2) e a ampliação da das regiões de deslocamento químico 0-2.3 e 2.5- 4.5 (ppm) -  $\text{CD}_3\text{OD}$  600MHz

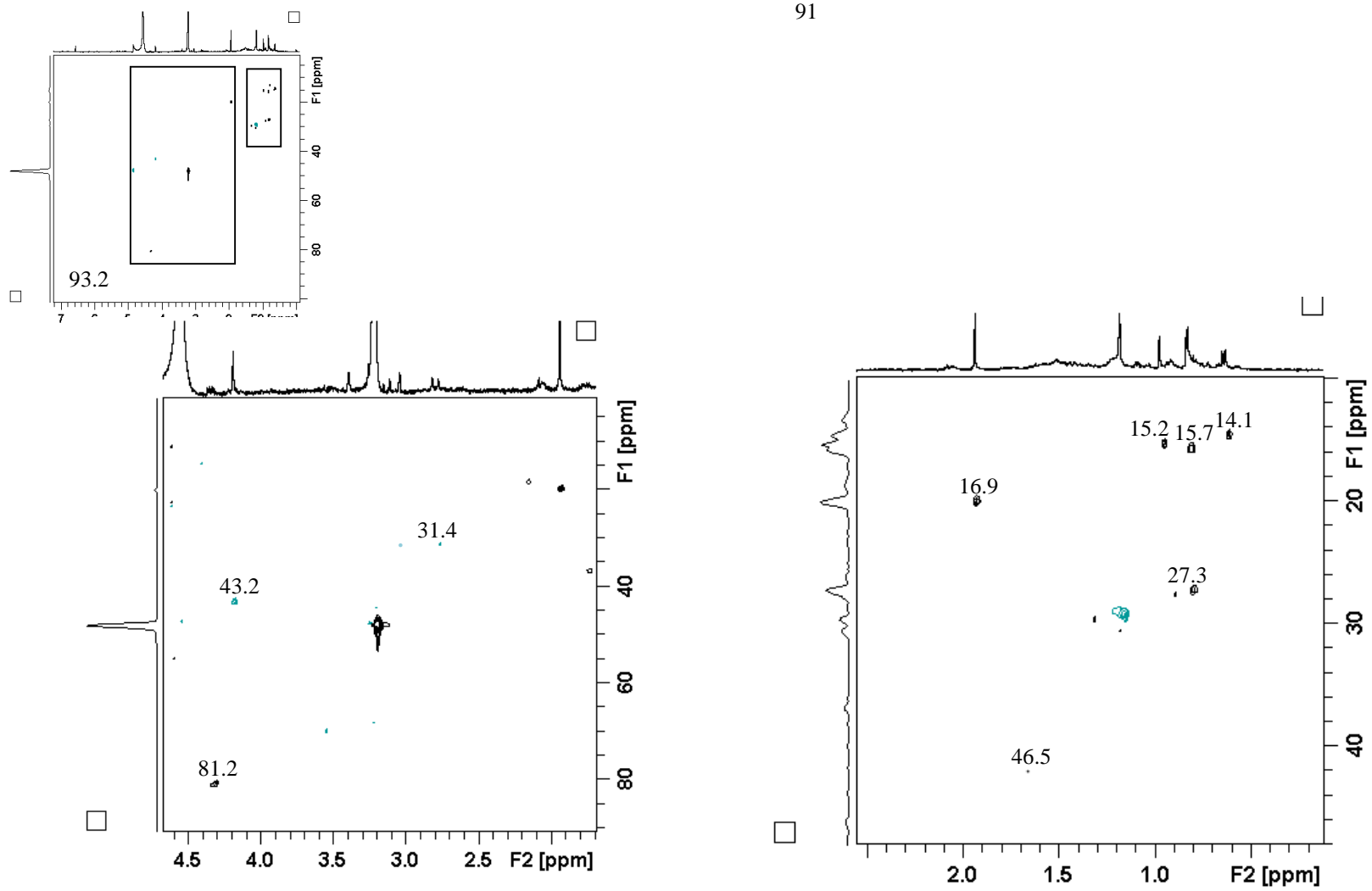


FIGURA A 24 - Espectros ampliados do mapa de contorno HSQC da substância isolada (S2)-  $\text{CD}_3\text{OD}$  150 MHz

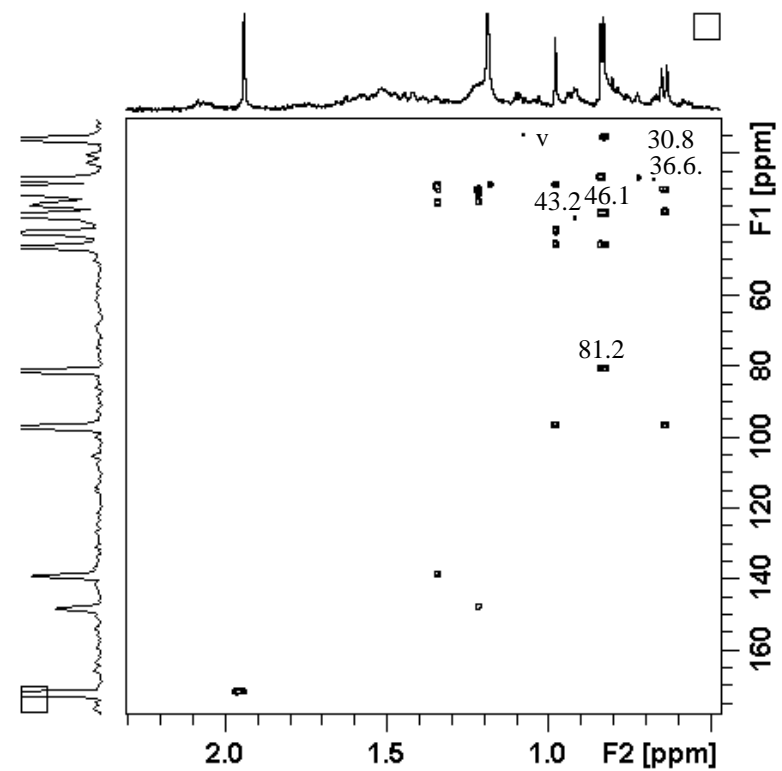
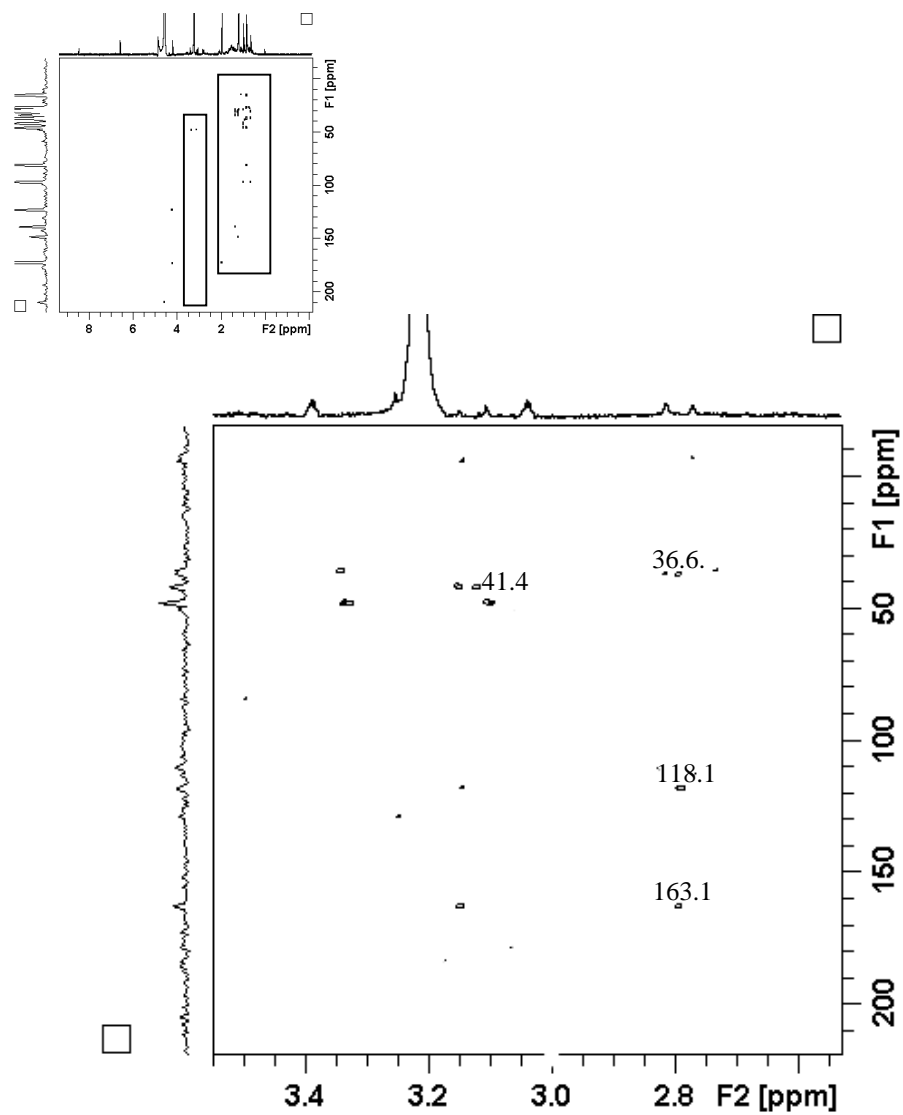


FIGURA A 25 - Espectros ampliados do mapa de contorno HMBC da substância isolada (S2)-  $\text{CD}_3\text{OD}$  150 MHz



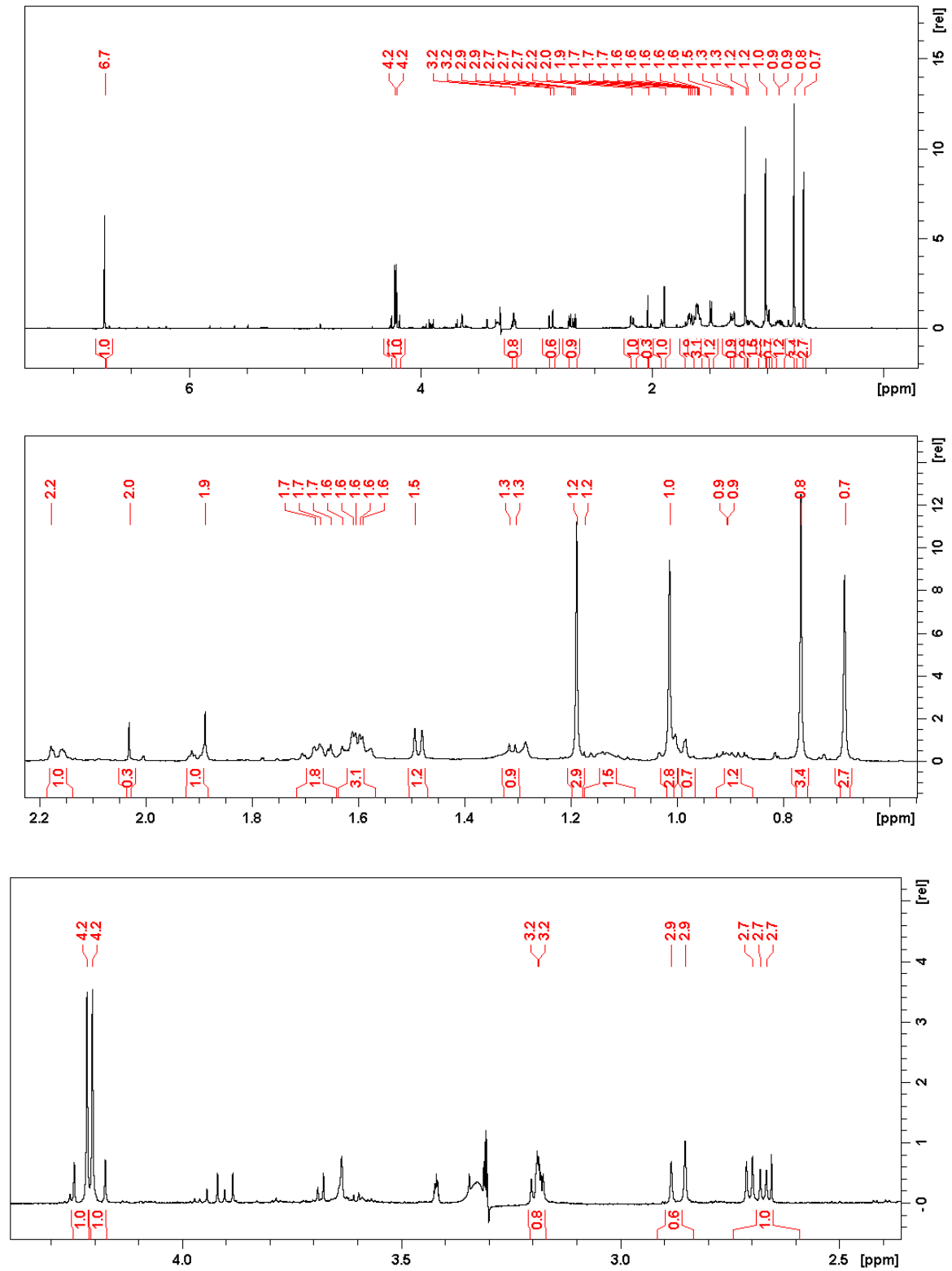


FIGURA A 26 - Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN da substância isolada (S3)-  $\text{CD}_3\text{OD}$  600MHz

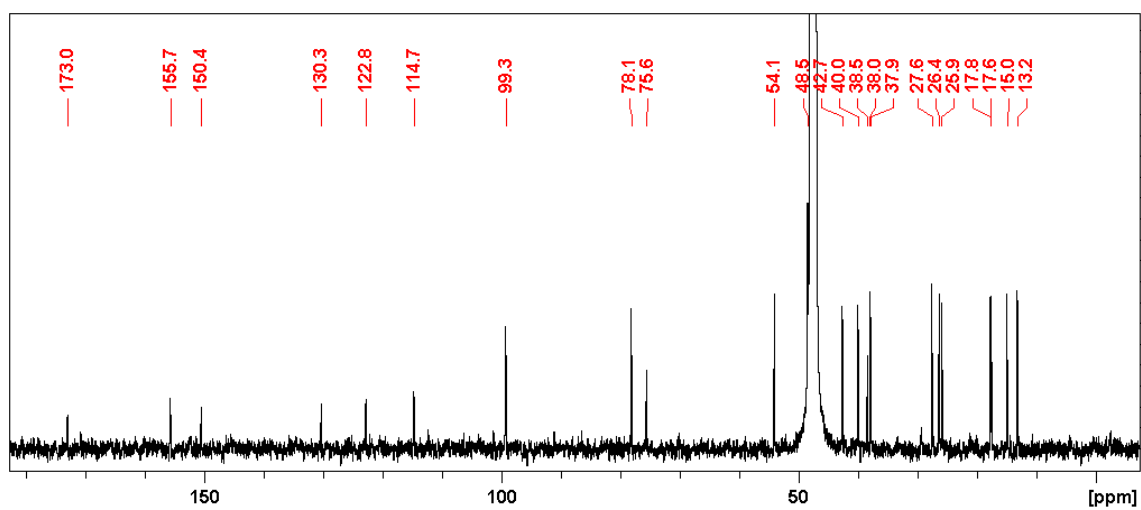


FIGURA A 25 - Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN da substância isolada (S3)-  $\text{CD}_3\text{OD}$  150MHz

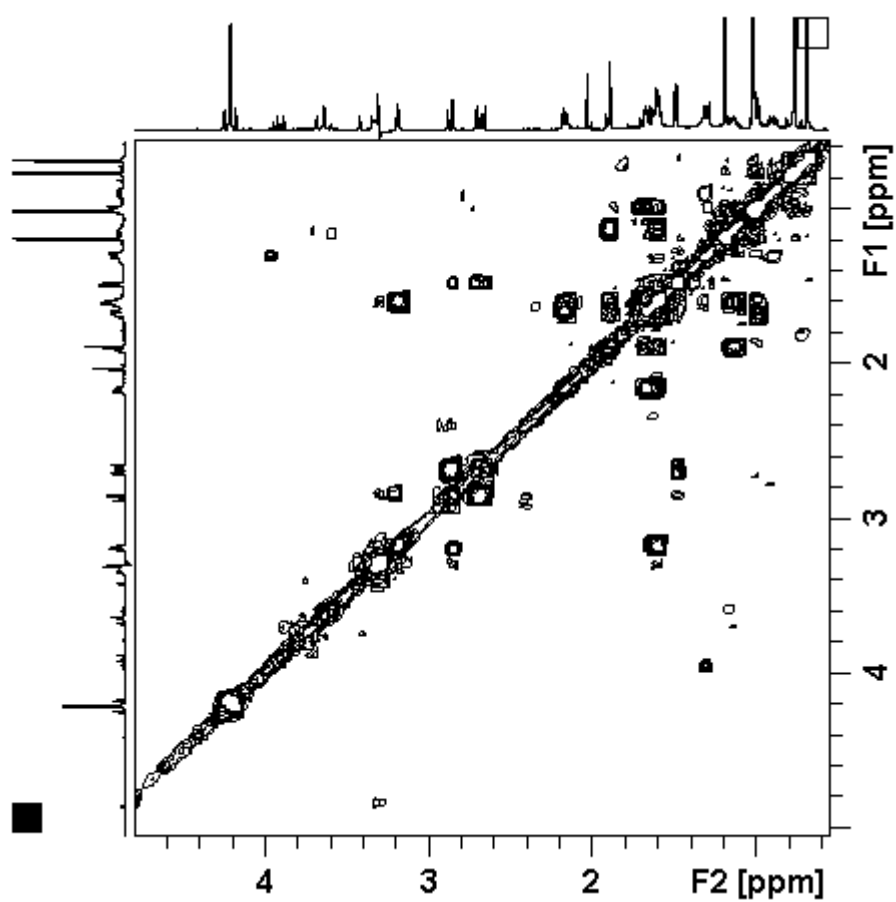


FIGURA A 26 - Espectro de COSY da substância isolada (S3)-  $\text{CD}_3\text{OD}$  600 MHz

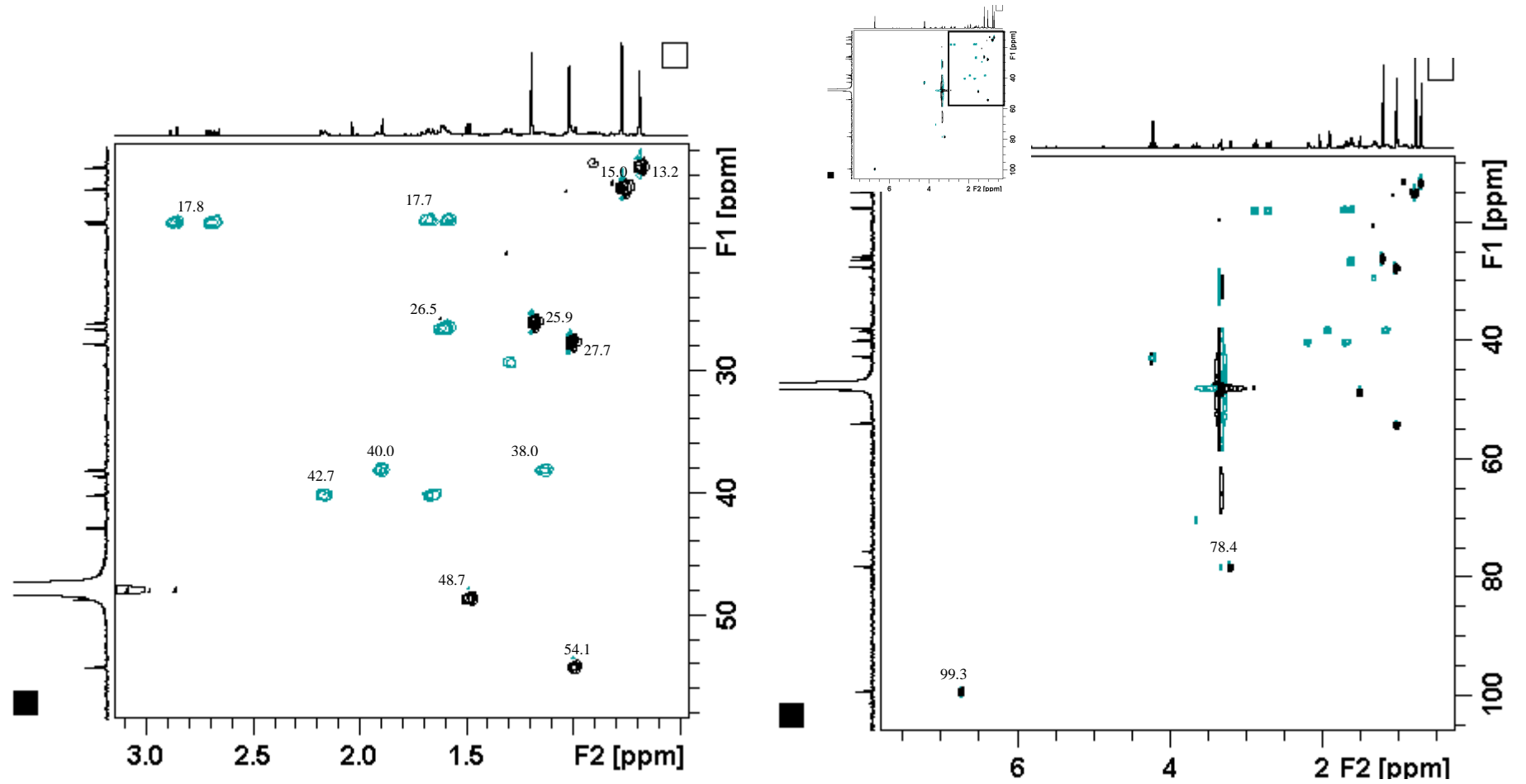


FIGURA A 27 - Espectros ampliados do mapa de contorno HSQC da substância isolada (S3)- CD<sub>3</sub>OD 150 MHz

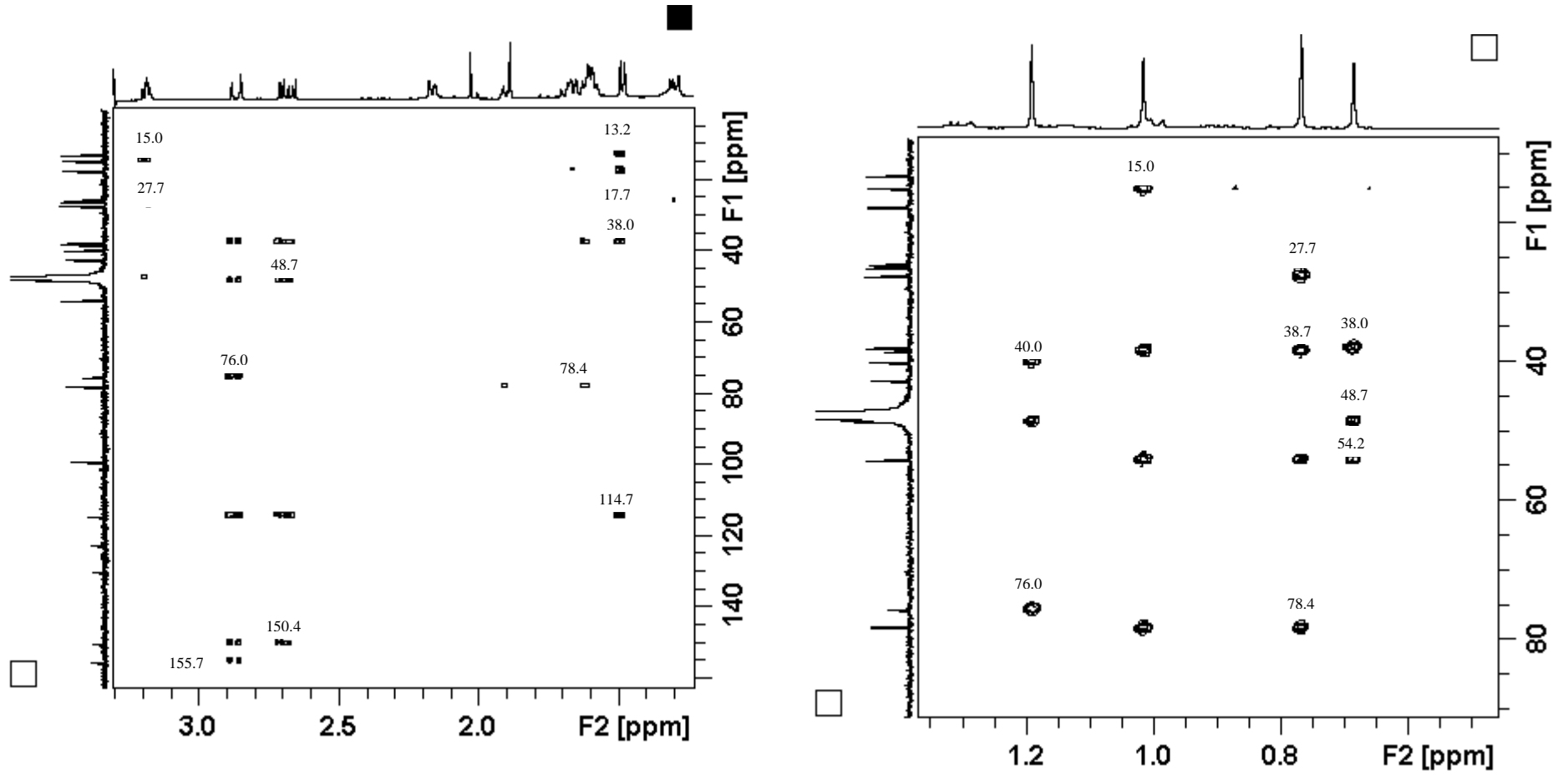


FIGURA A 28 - Espectros ampliados do mapa de contorno HMBC da substância isolada (S3)- CD<sub>3</sub>OD 150 MHz

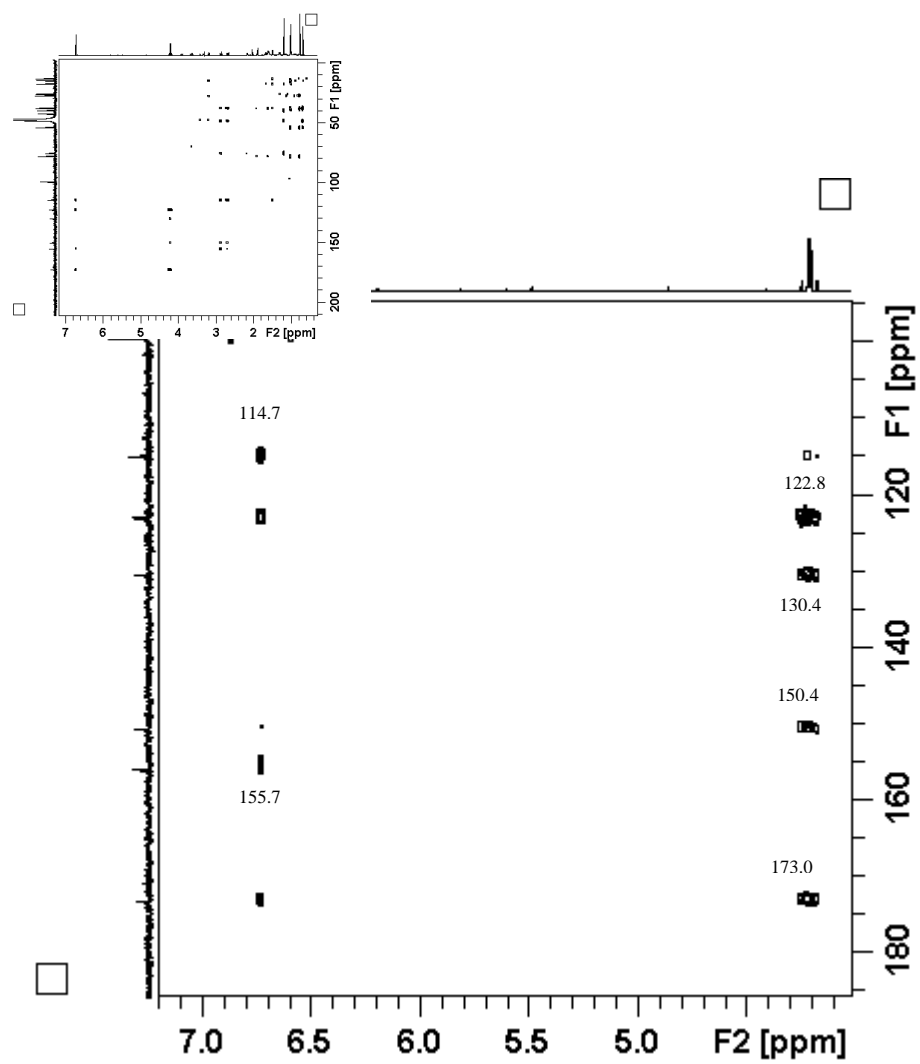


FIGURA A 29 - Espectro ampliado do mapa de contorno HMBC da substância isolada (S3)-  $\text{CD}_3\text{OD}$  150 MHz

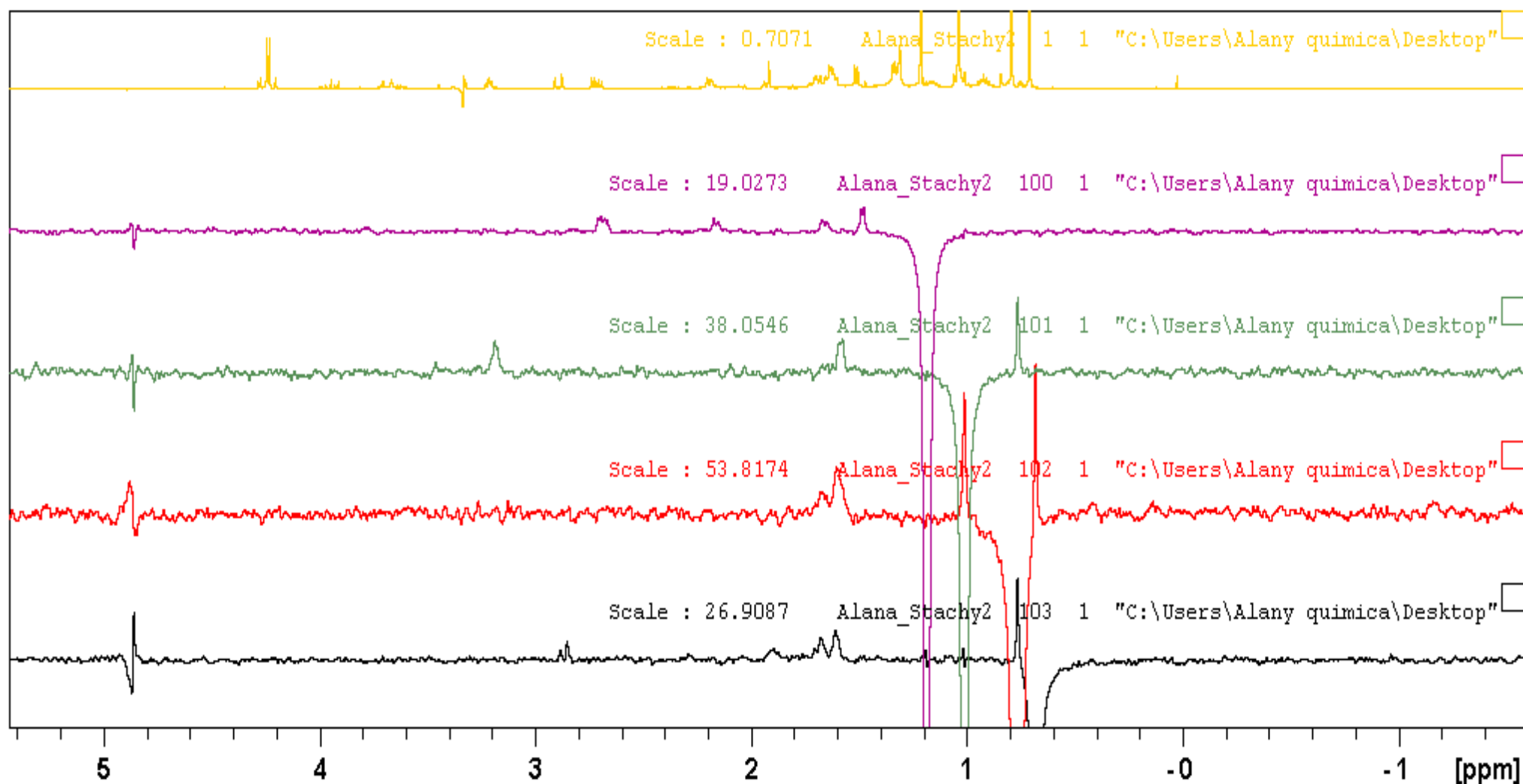


FIGURA A 30 - Espectros ampliado do experimento de NOESY 1D da substância isolada S3- CD<sub>3</sub>OD 600 MHz

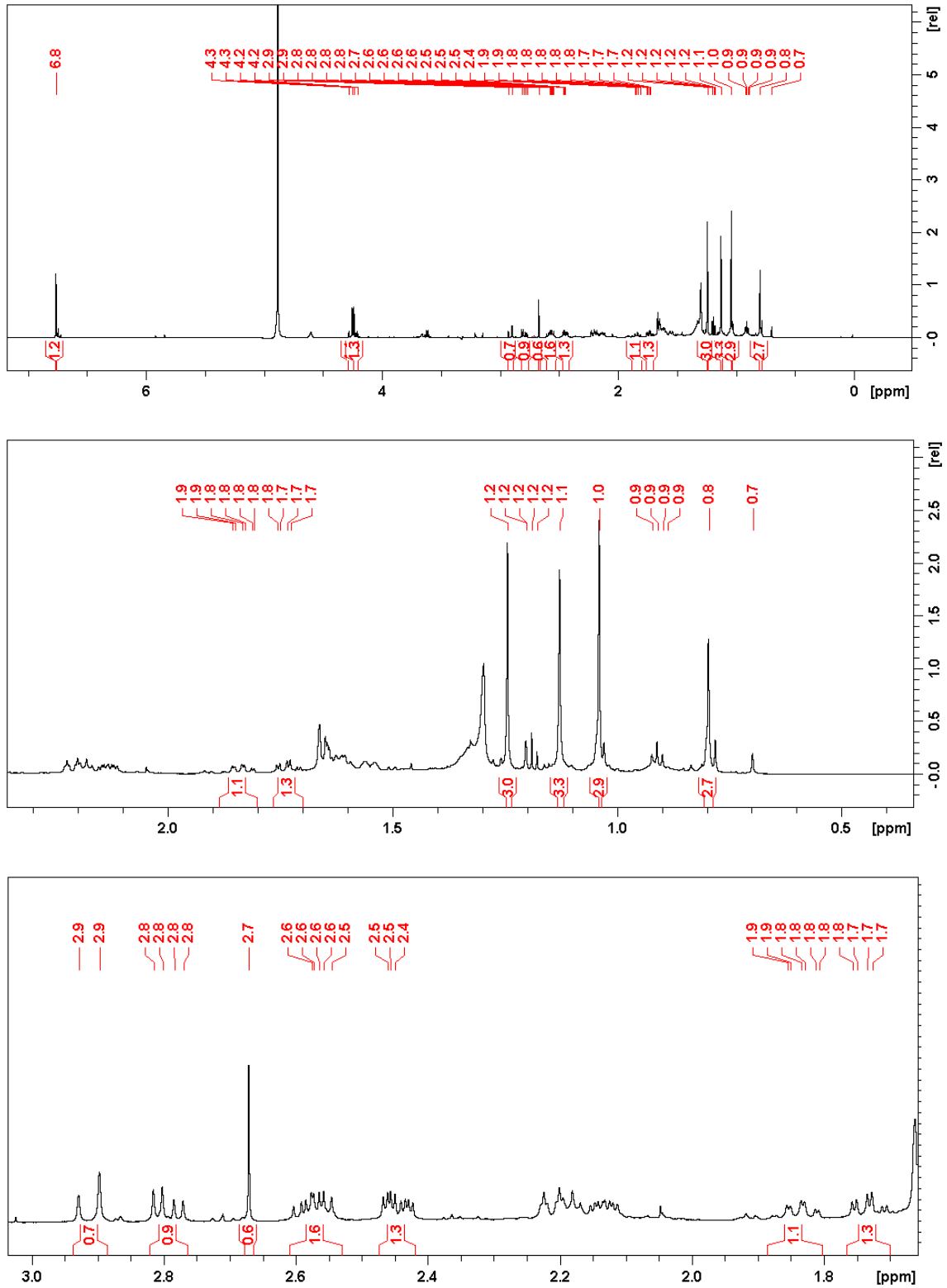


FIGURA A 31 - Espectros de  $^1\text{H}$  RMN da substância isolada (S4) e a ampliação da das regiões de deslocamento químico 0-2.3 e 1.6-3.0 (ppm) -  $\text{CD}_3\text{OD}$  600MHz

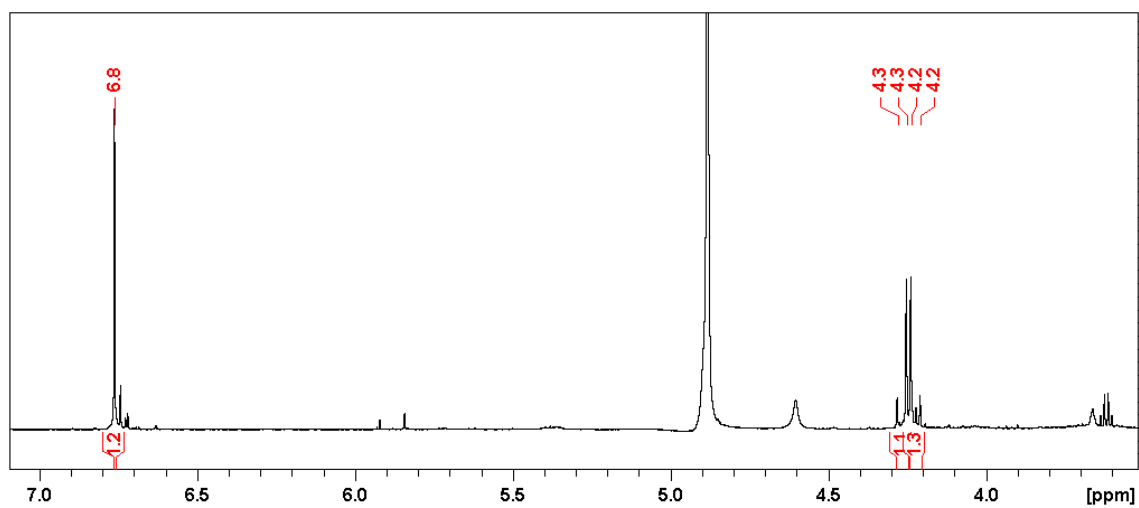


FIGURA A 32 - Espectro de  $^1\text{H}$  RMN da substância isolada (S4) e a ampliação da região das regiões de deslocamento químico 3.0-7.0 (ppm) -  $\text{CD}_3\text{OD}$  600MHz



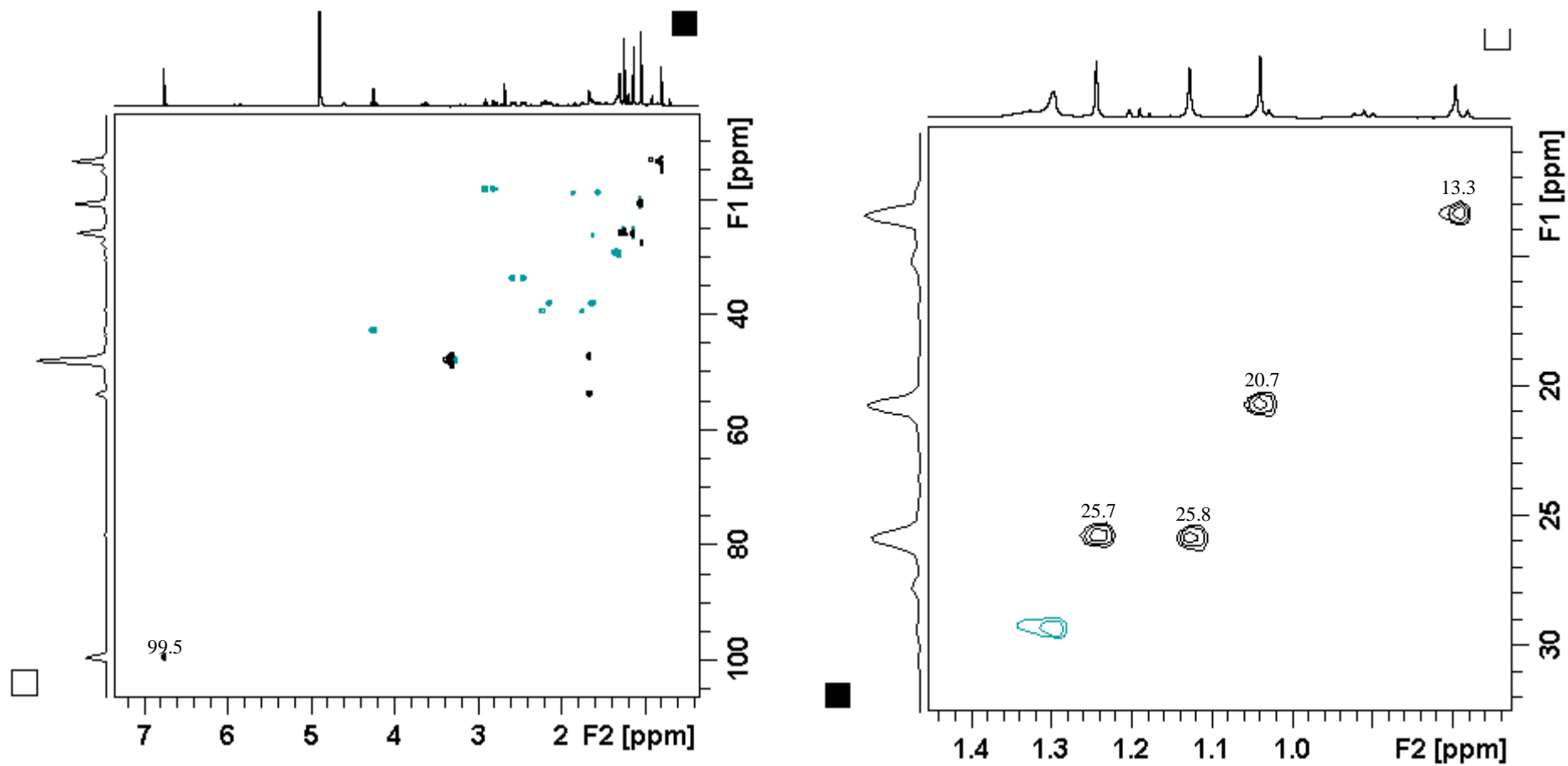


FIGURA A 33 - Espectros do mapa de contorno HMBC e a ampliação na região de 0-1.4 (ppm) da substância isolada (S4)-  $\text{CD}_3\text{OD}$  150 MHz

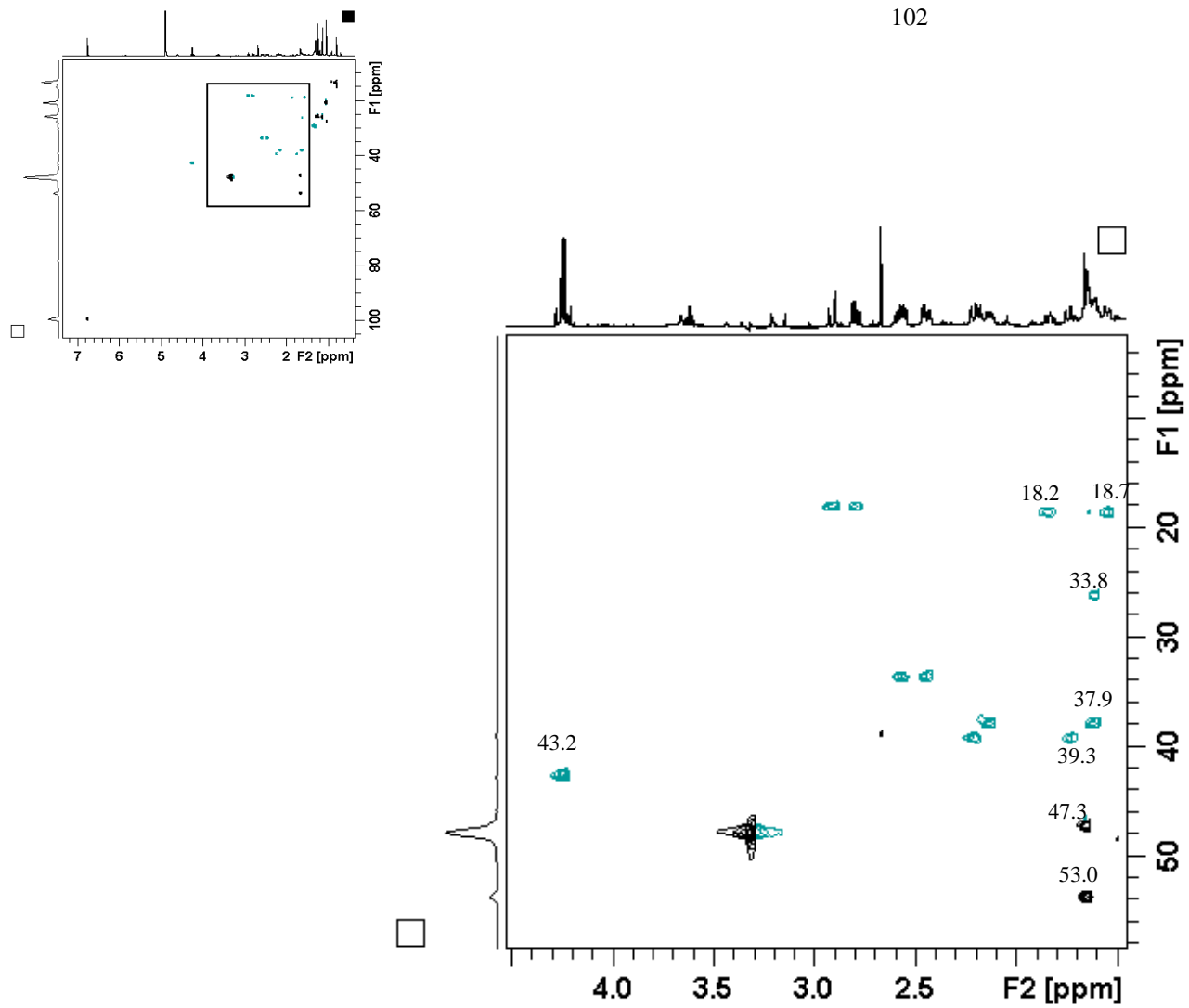


FIGURA A 34 - Espectro ampliado do mapa de contorno HSQC da substância isolada (S4)-  $\text{CD}_3\text{OD}$  150 MHz

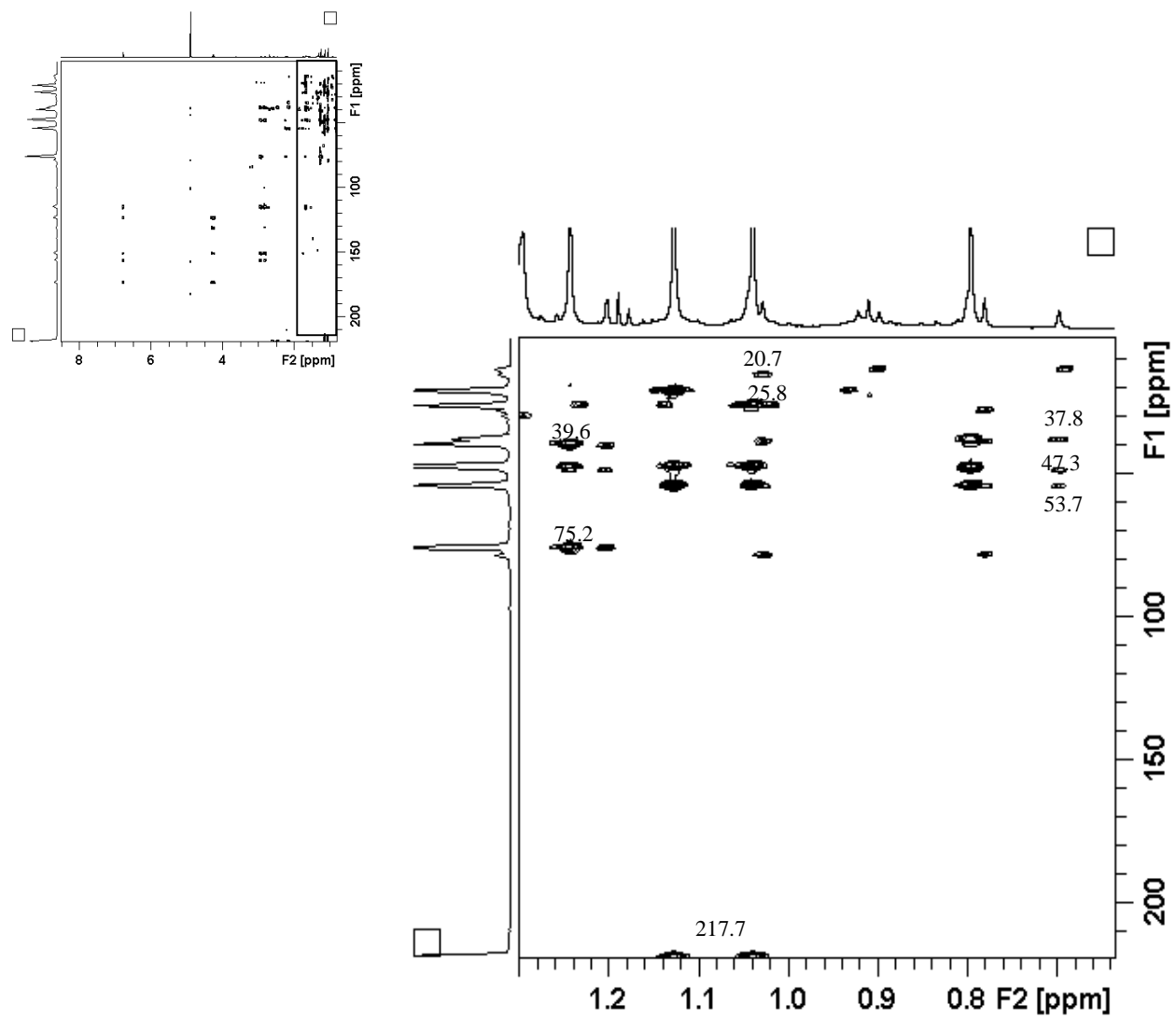
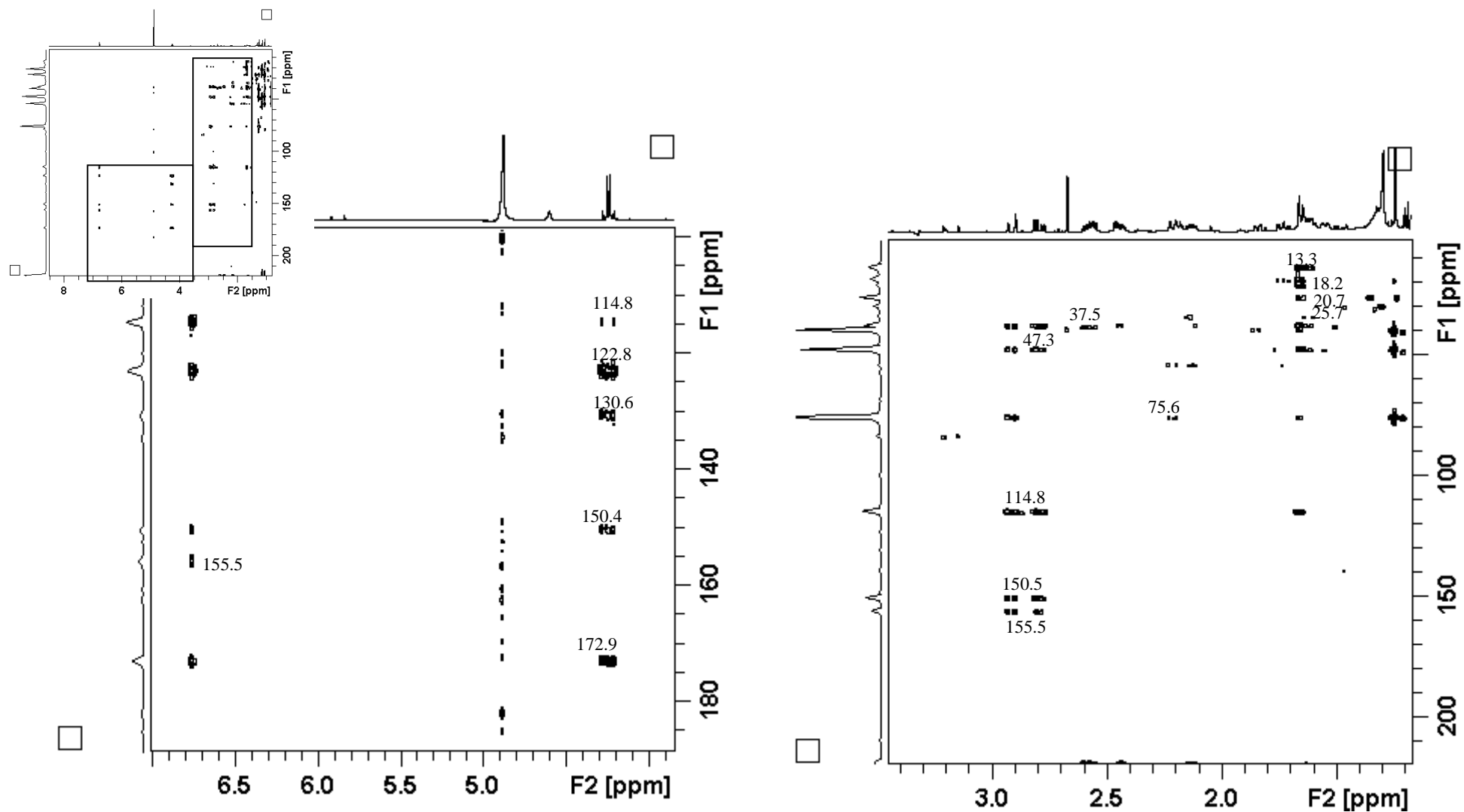


FIGURA A 35 - Espectro ampliado do mapa de contorno HMQC da substância isolada (S4)-  $\text{CD}_3\text{OD}$  150 MHz

FIGURA A 36 - Espectros ampliados do mapa de contorno HMQC da substância isolada (S4)-  $\text{CD}_3\text{OD}$  150 MHz

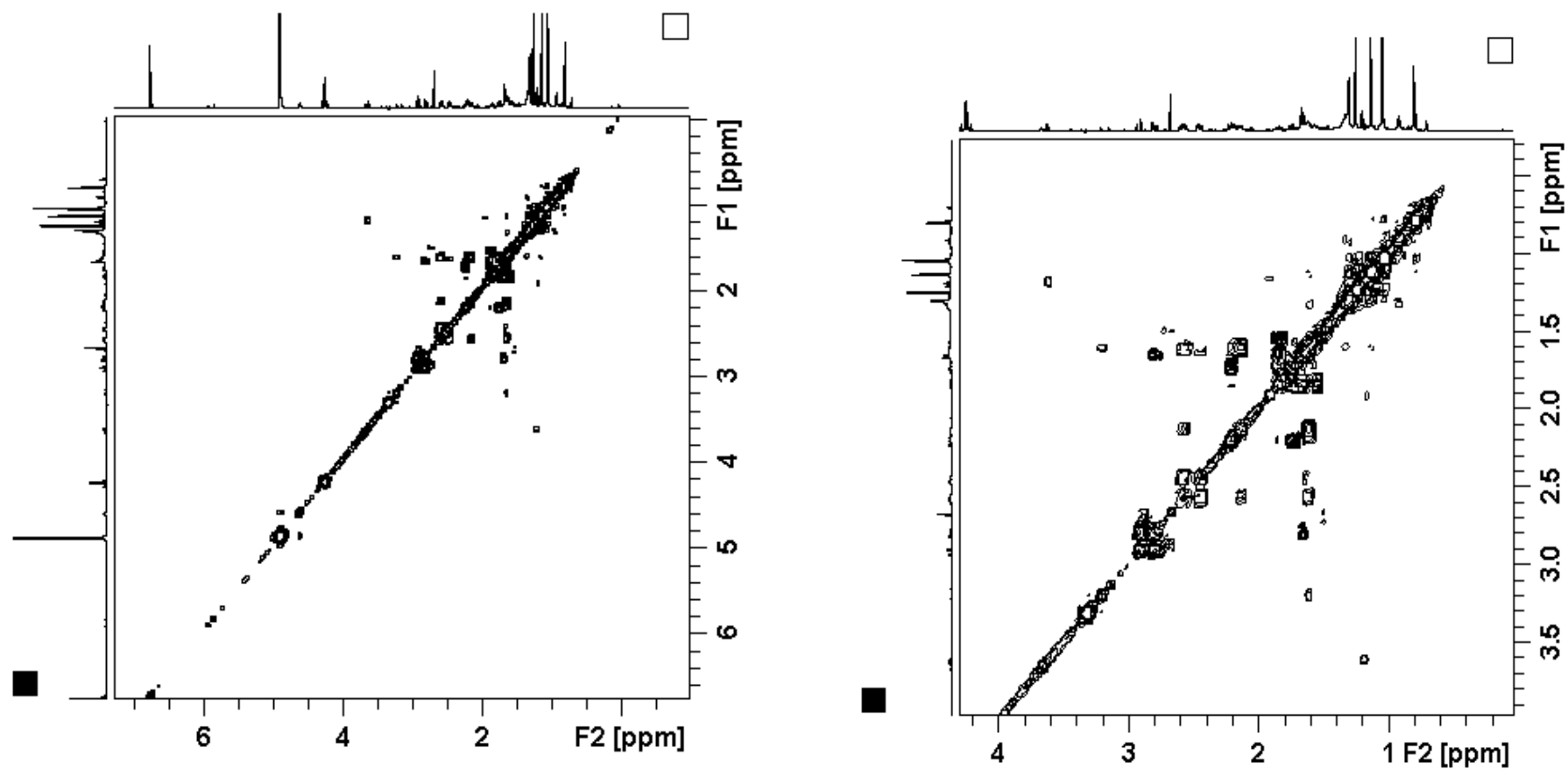


FIGURA A 37 - Espectro de COSY da substância isolada (S4) e a ampliação na região de deslocamento químico 0-4.2 ppm - CD<sub>3</sub>OD 600 MHz

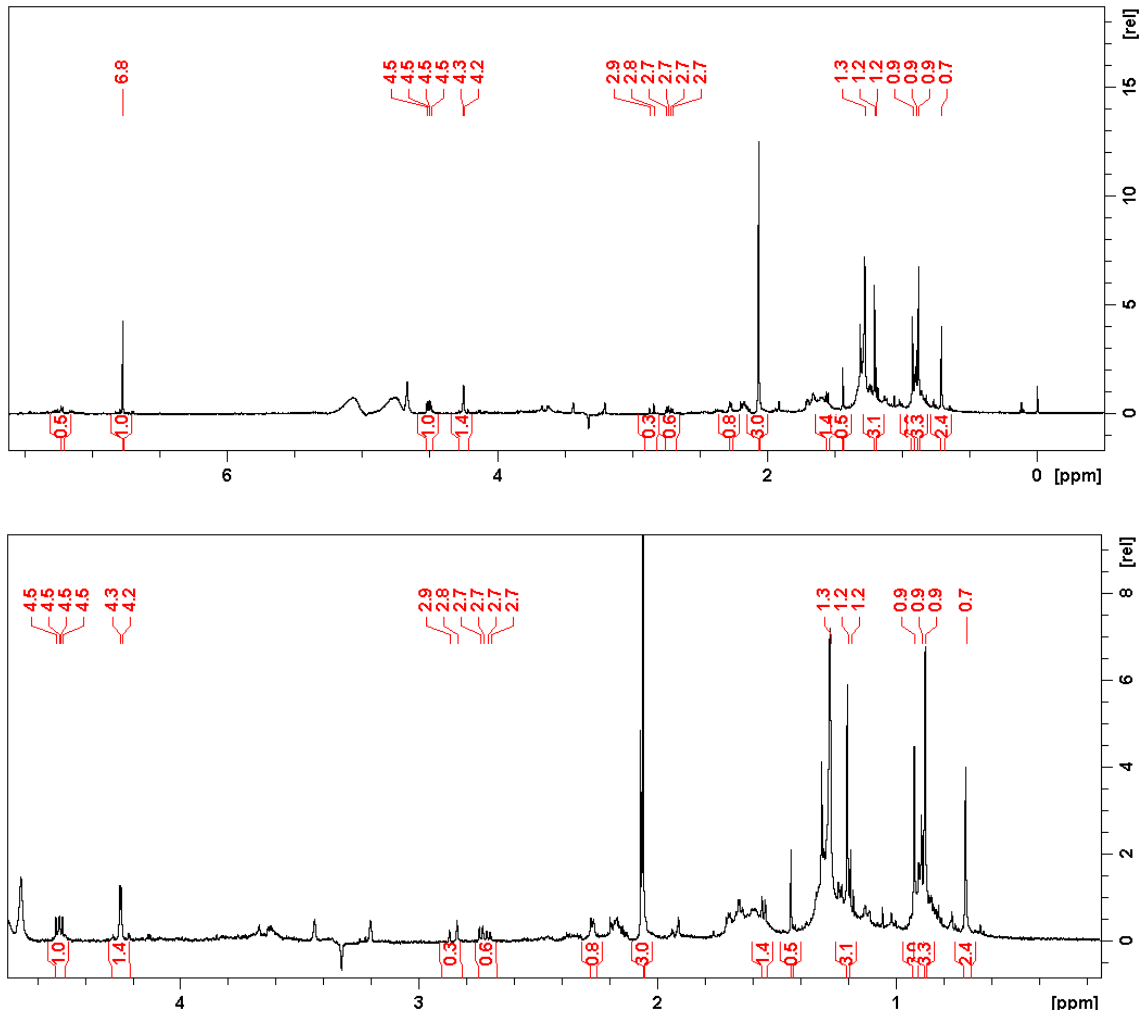


FIGURA A 38 - Espectros de <sup>1</sup>H RMN da substância isolada (S5) e a ampliação das regiões de deslocamento químico 0-2.3 e 1.6-30 (ppm) - CD<sub>3</sub>OD 600MHz

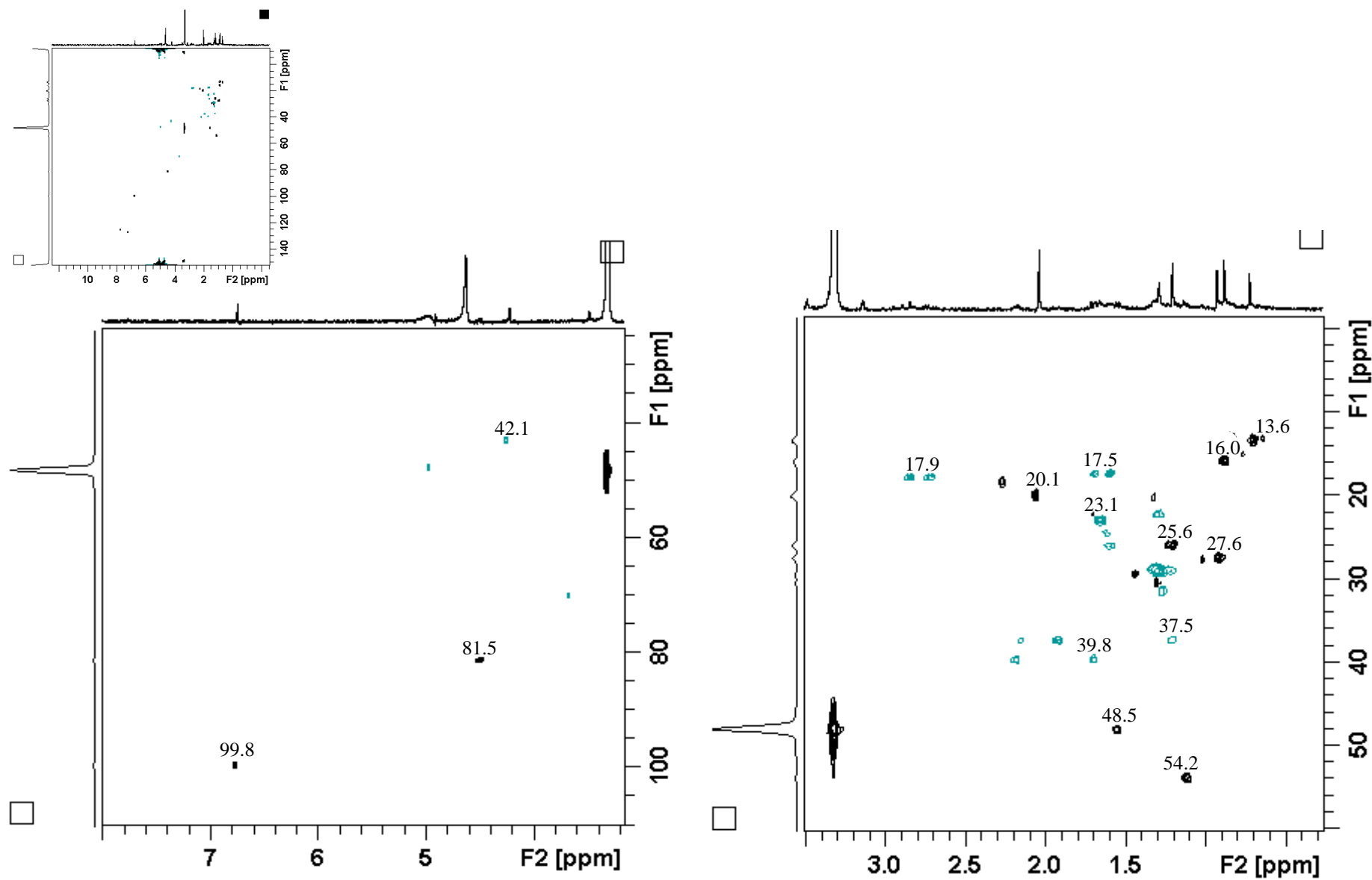
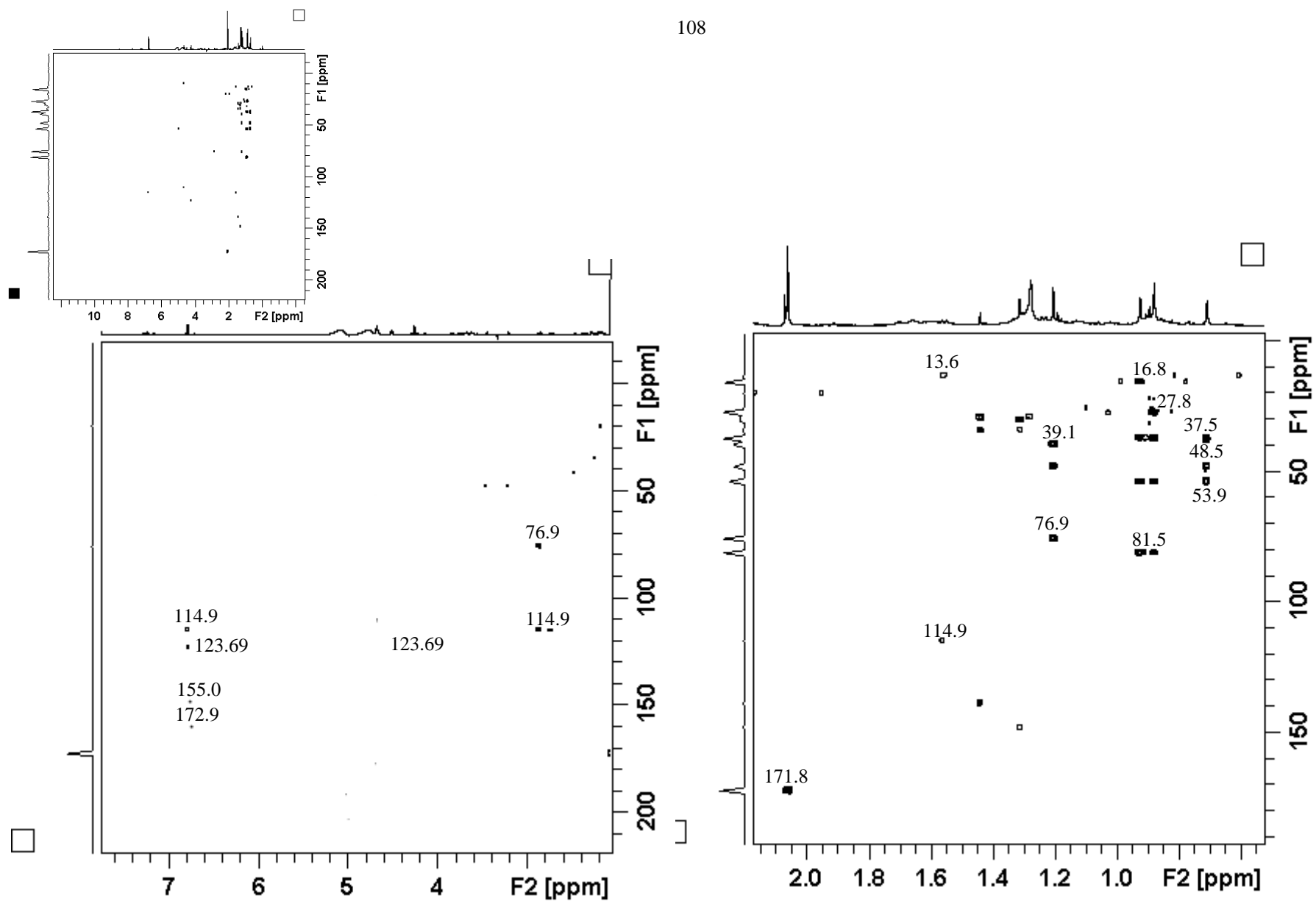


FIGURA A 39 - Espectro ampliado do mapa de contorno HSQC da substância isolada (S5)-  $\text{CD}_3\text{OD}$  150 MHz

FIGURA A 40 - Espectro ampliado do mapa de contorno HMBC da substância isolada (S5)- CD<sub>3</sub>OD 150 MHz



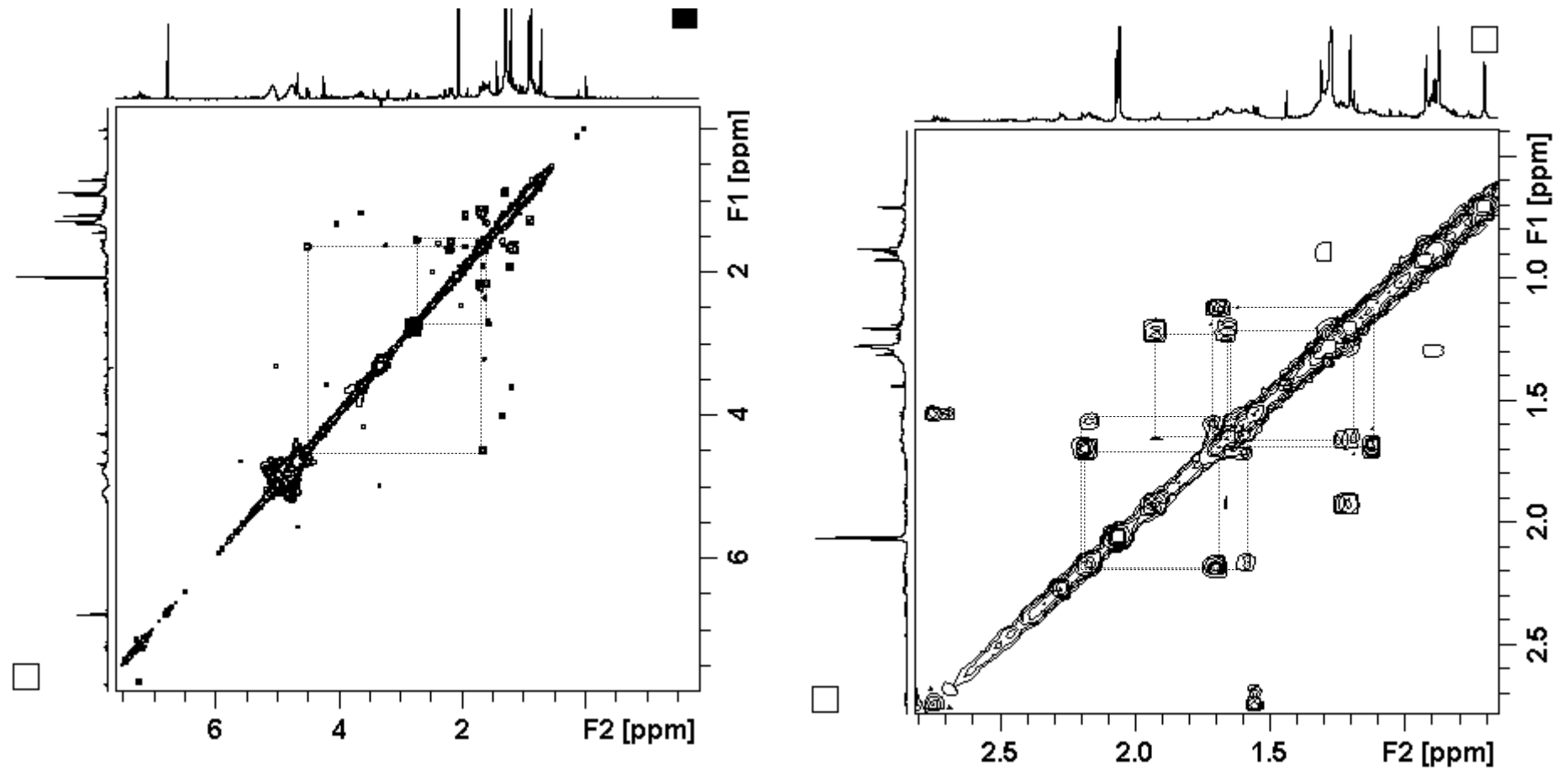


FIGURA A 41 - Espectro ampliado de COSY da substância isolada (S4)-  $\text{CD}_3\text{OD}$  600 MHz

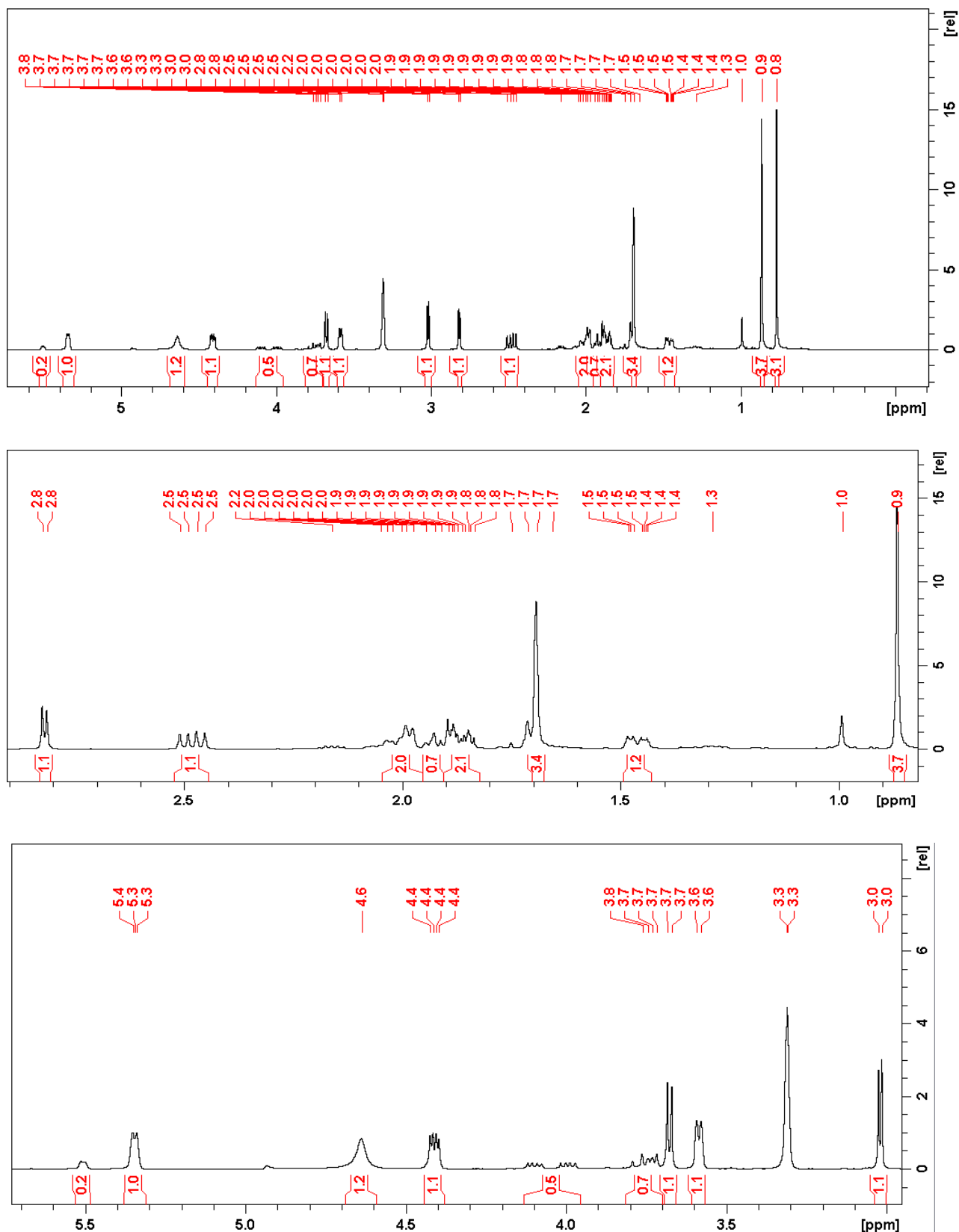
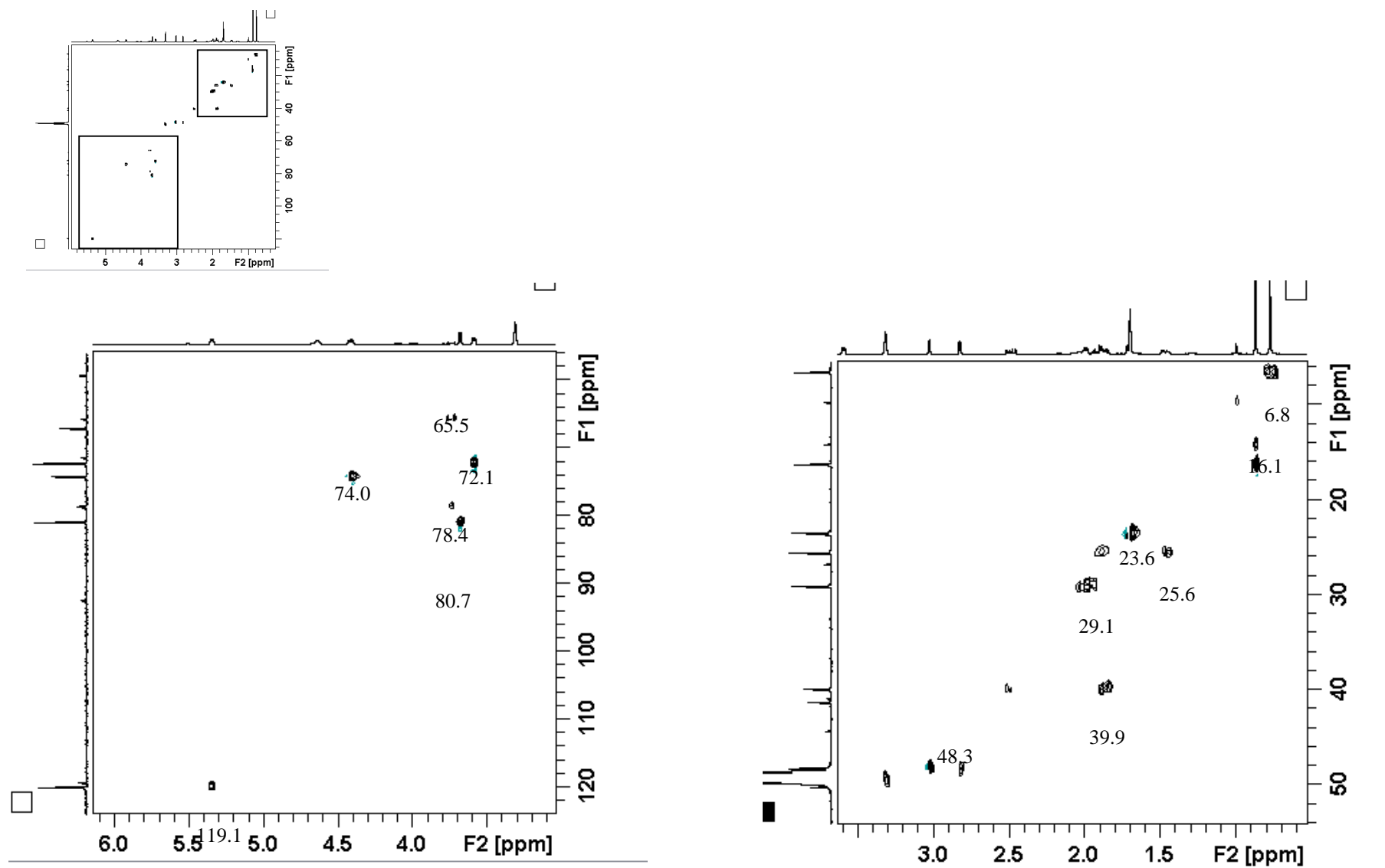


FIGURA A 42 - Espectros de  $^1\text{H}$  RMN da substância isolada Tricodermol (TI) e a ampliação da das regiões de deslocamento químico 0-2.3 e 1.6-3.0 (ppm) -  $\text{CD}_3\text{OD}$  400MHz

FIGURA A 43 - Espectros ampliados do mapa de contorno HSQC da substância isolada Tricodermol (T1)- CD<sub>3</sub>OD 100 MHz

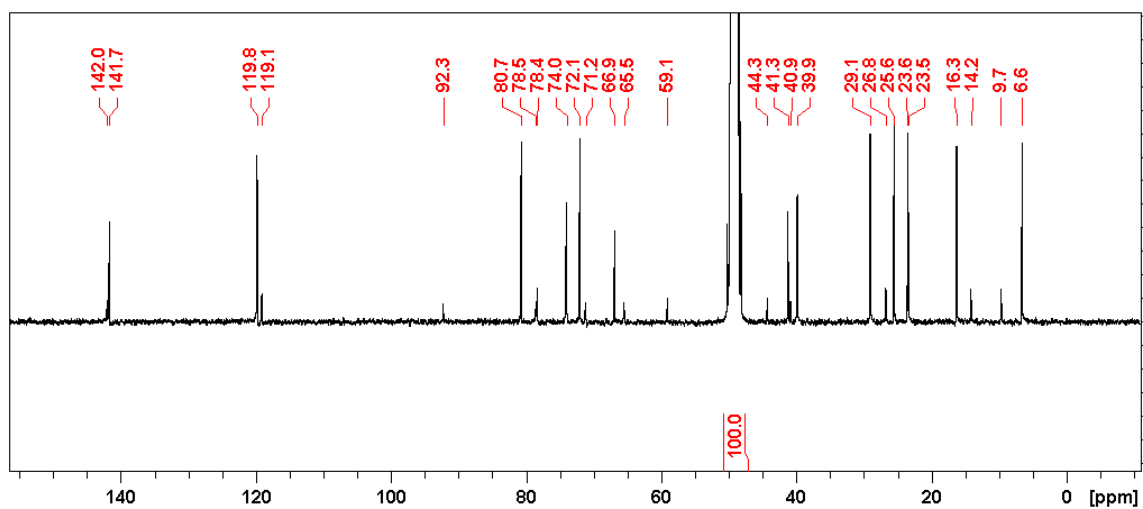


FIGURA A 44 - Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN da substância isolada Tricodermol (S5)-  $\text{CD}_3\text{OD}$  100MHz

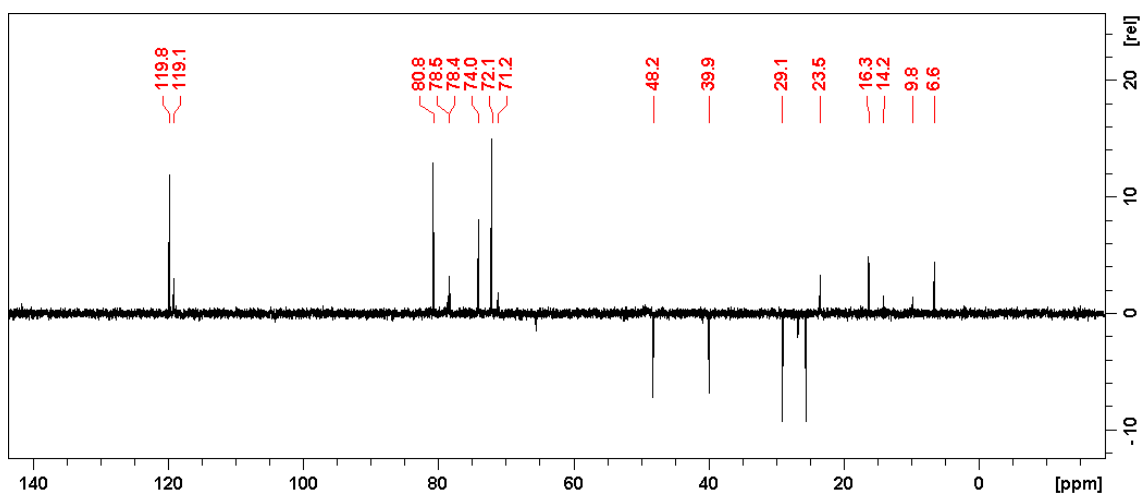


FIGURA A 45 - Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN – Dept 135 da substância isolada Tricodermol (S5)-  $\text{CD}_3\text{OD}$  100MHz

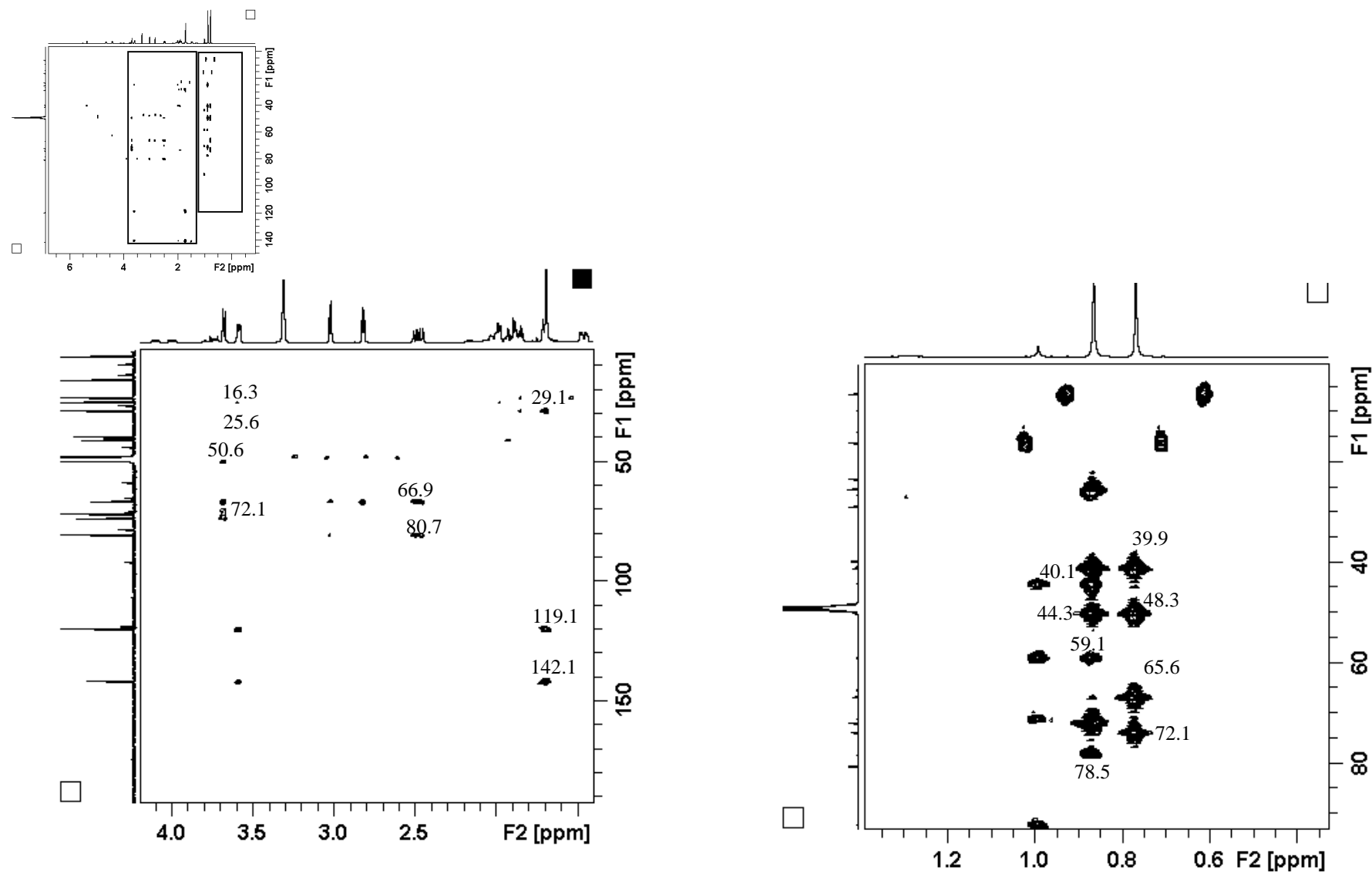


FIGURA A 46 - Espectros ampliados do mapa de contorno HMBC da substância isolada Tricodermol (T1)- CD<sub>3</sub>OD  
100 MHz

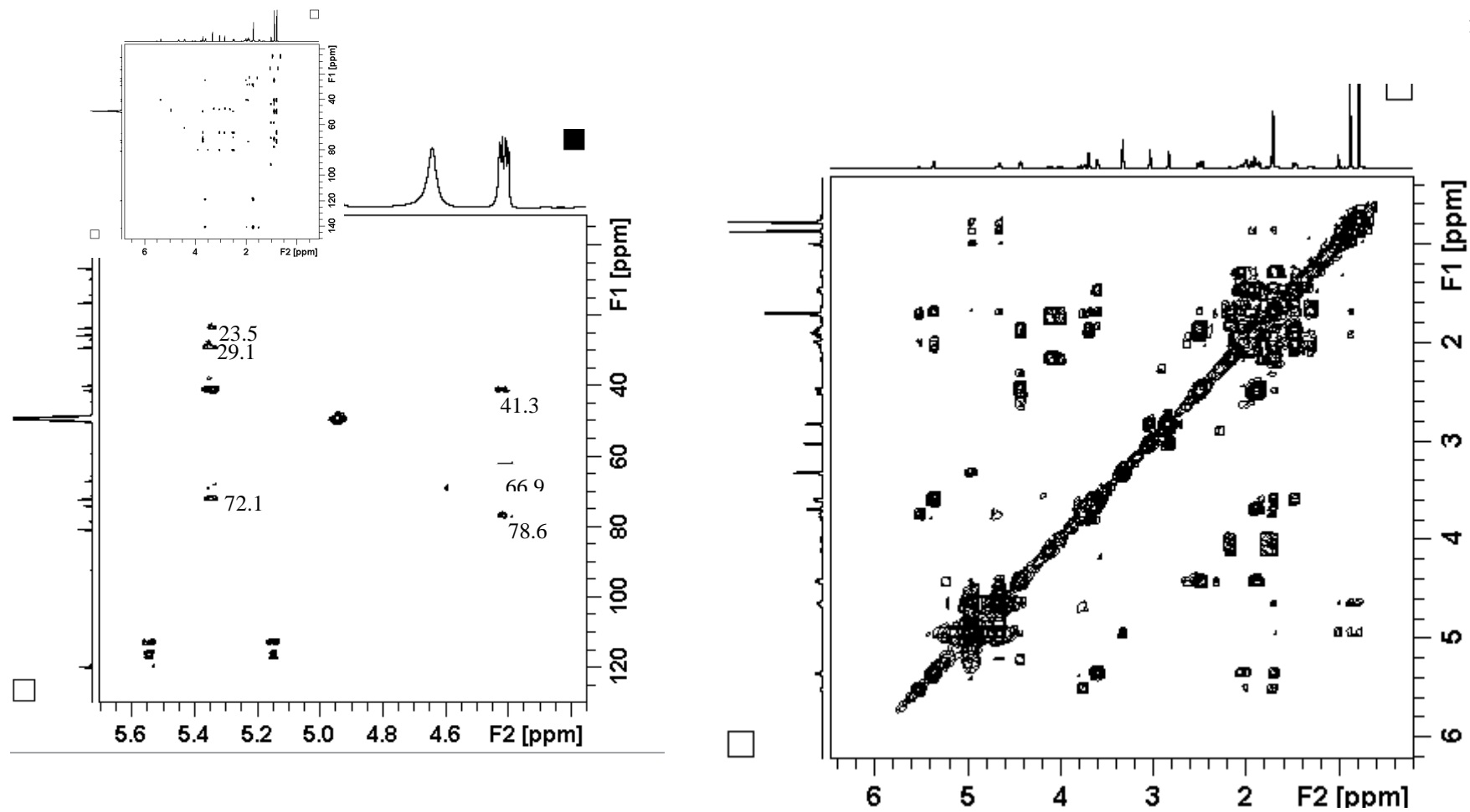


FIGURA A 47 - Espectros ampliados do mapa de contorno HMBC e COSY da substância isolada Tricodermol (T1)- CD<sub>3</sub>OD 100 MHz

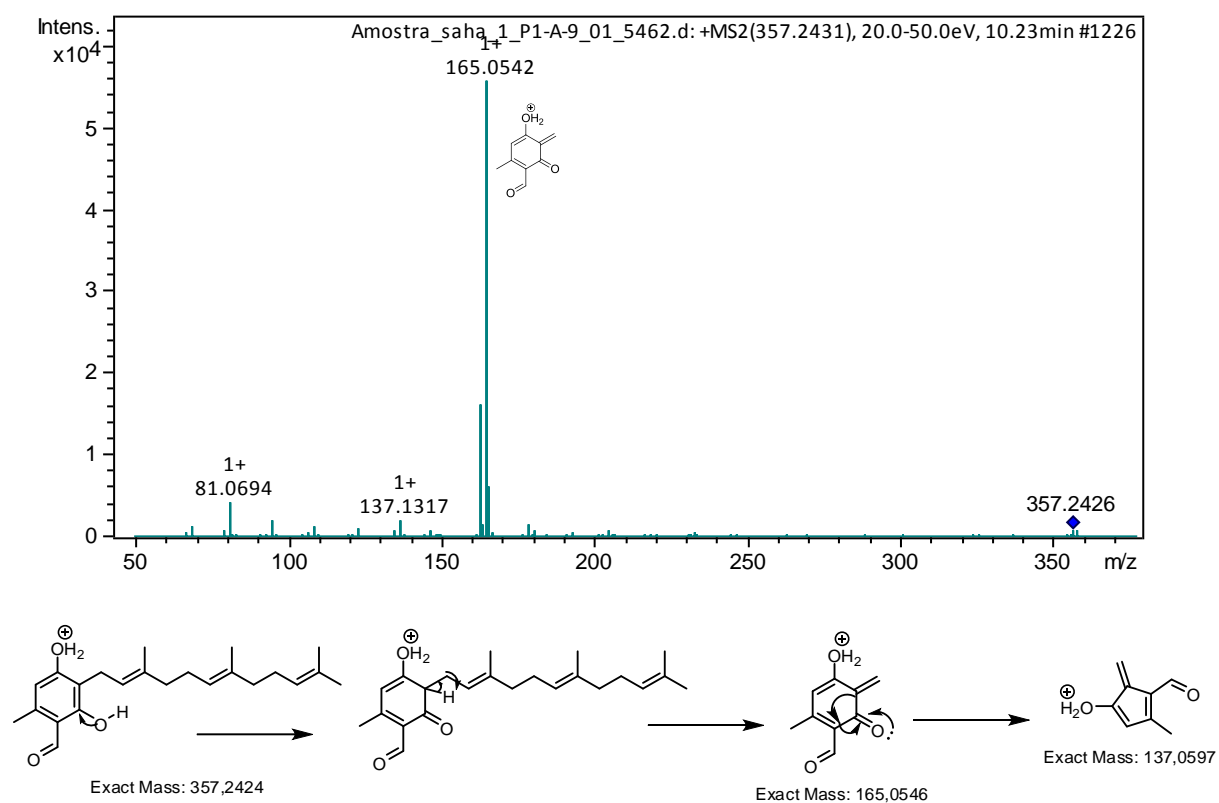


FIGURA A 48 Espectro de massas MS/MS  $[M+H]^+$  357.2426 e o mecanismo de fragmentação proposto para esse íon, 20-50 eV.

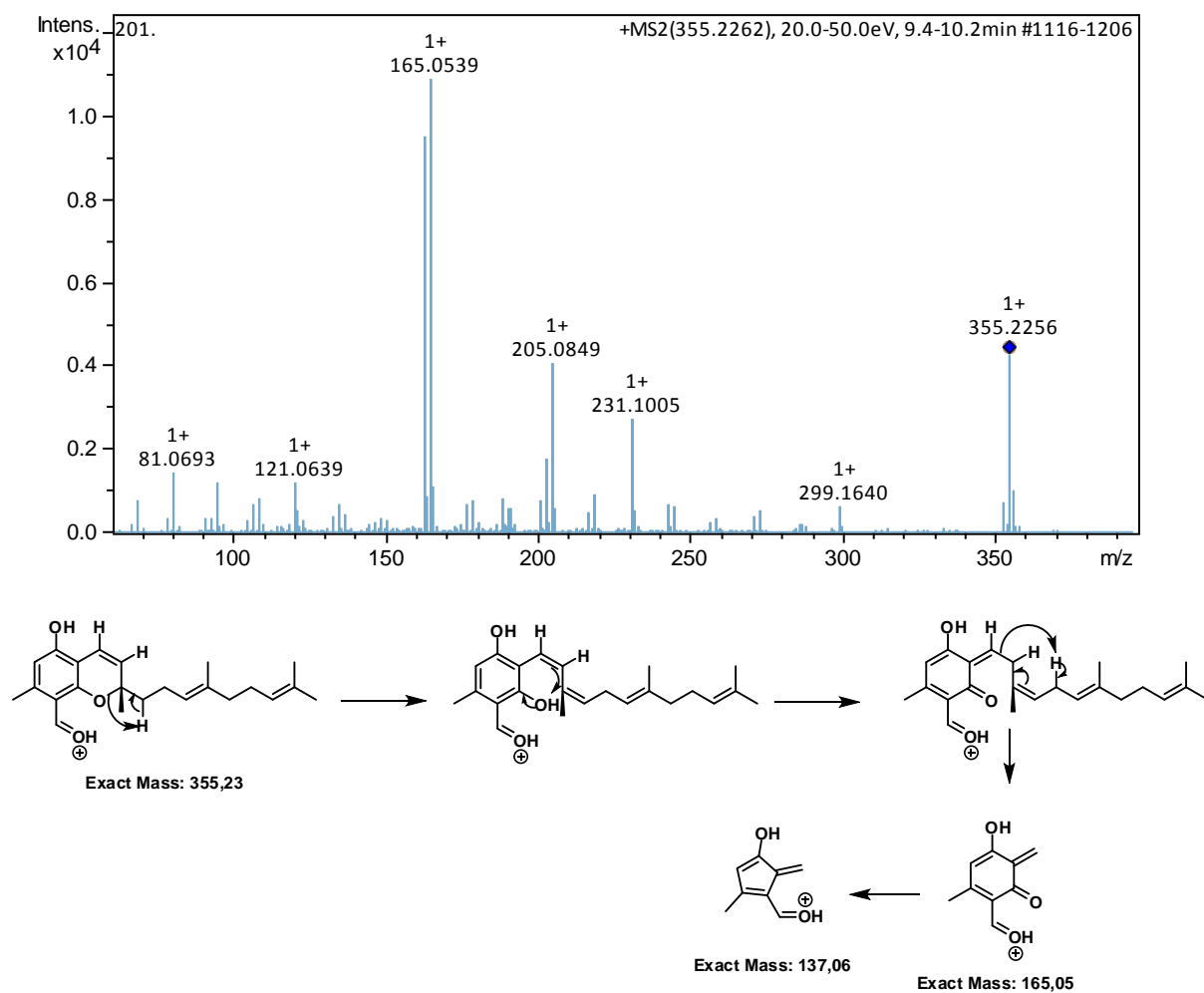


FIGURA A 49 Espectro de massas MS/MS  $[M+H]^+$  355.2256 e o mecanismo de fragmentação proposto para esse íon, 20-50 eV.



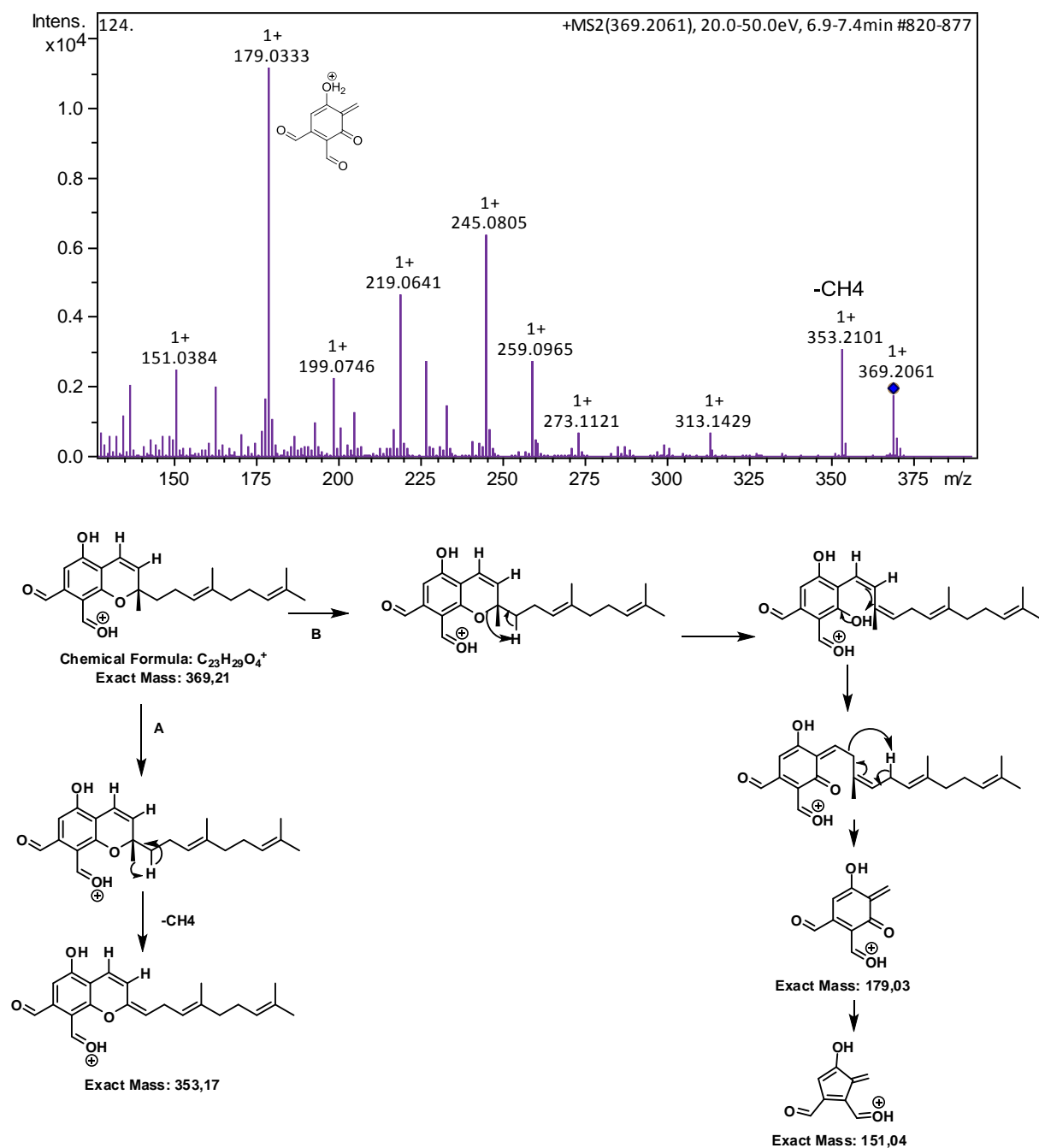


FIGURA A 50 Espectro de massas MS/MS [M+H]<sup>+</sup> 369.2061 e o mecanismo de fragmentação proposto para esse íon, 20-50 eV.

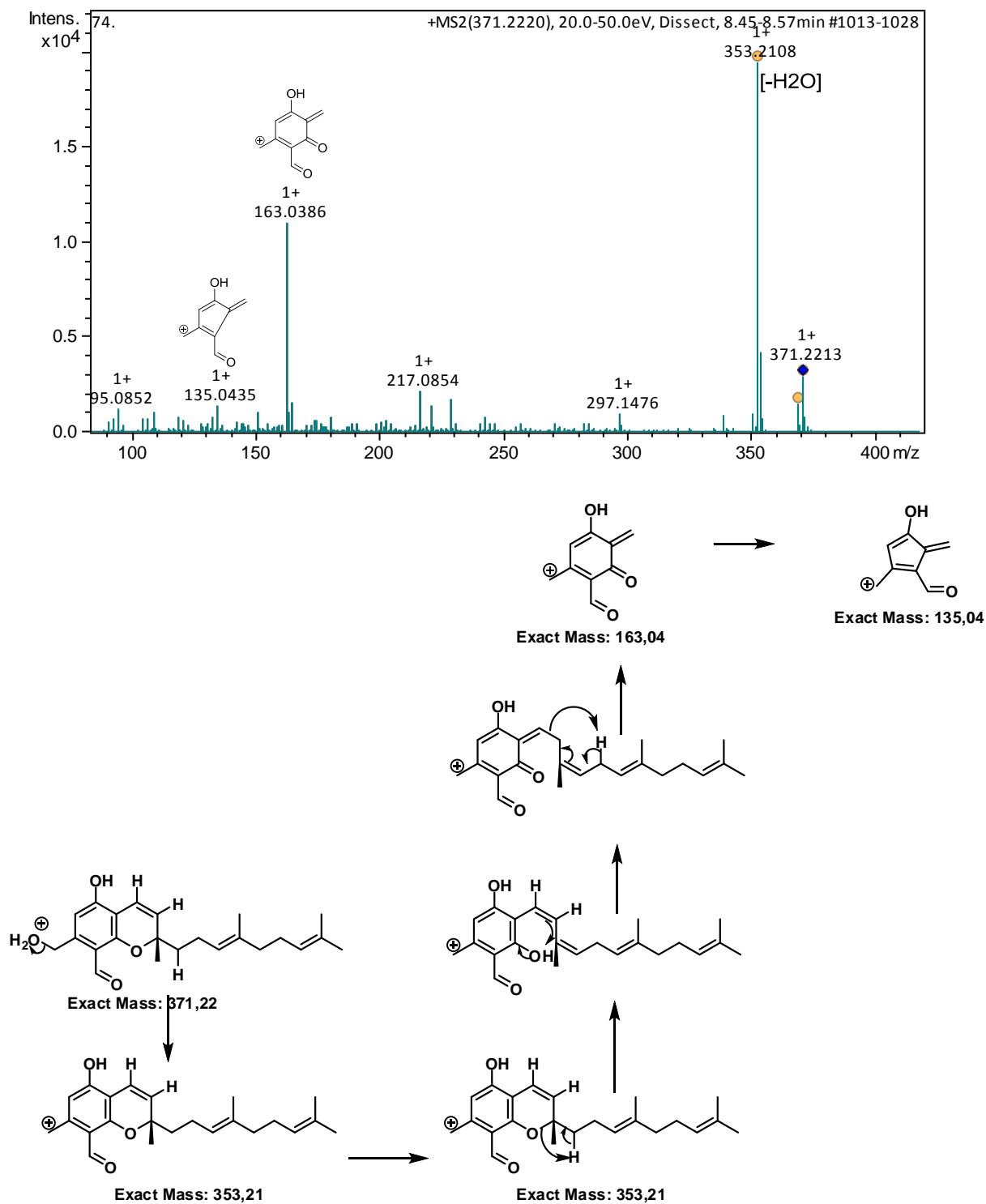


FIGURA A 51 Espectro de massas MS/MS  $[M+H]^+$  371.2213 e o mecanismo de fragmentação proposto para esse íon, 20-50 eV.

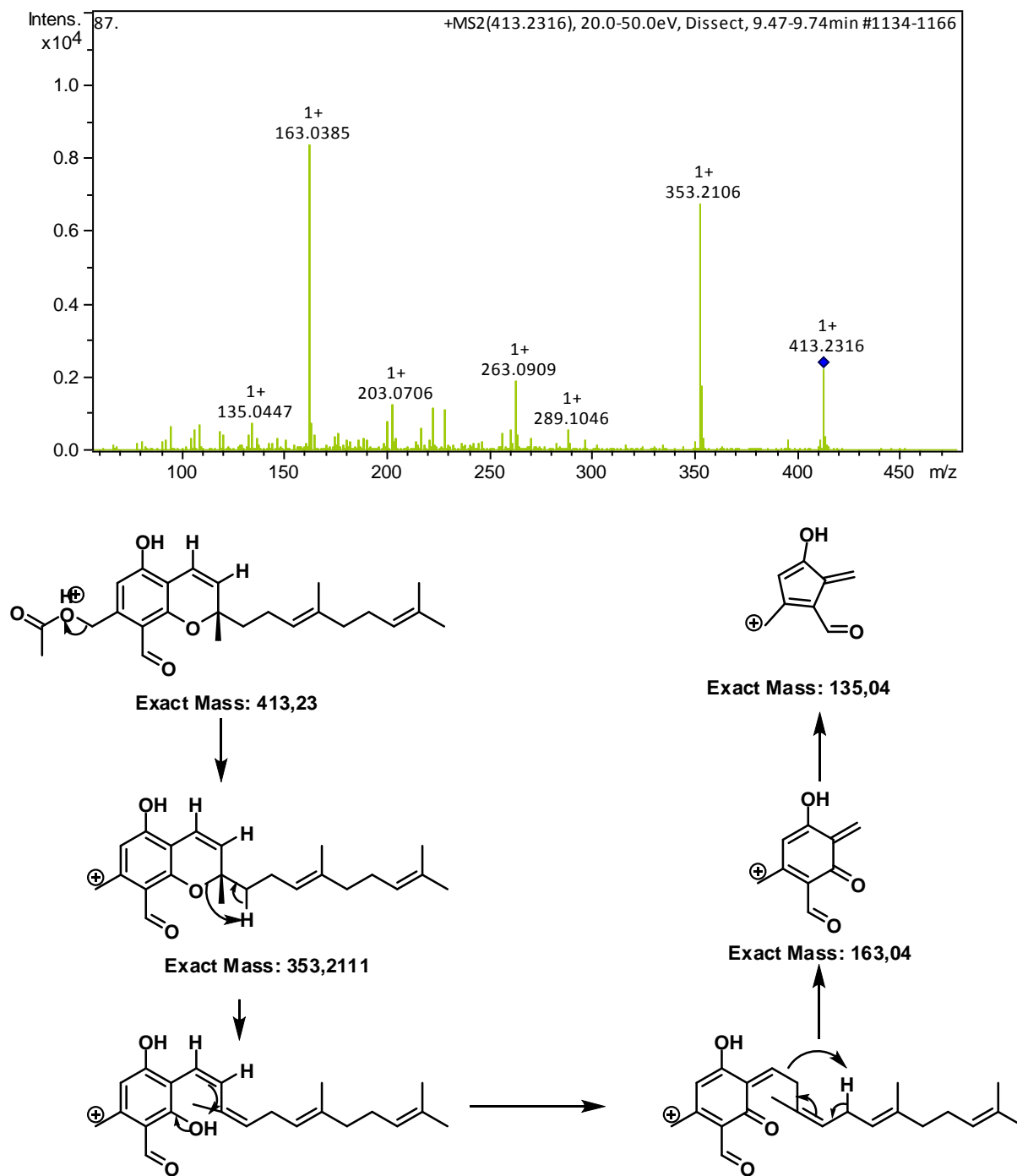


FIGURA A 52- Espectro de massas MS/MS [M+H]<sup>+</sup> 413.2316 e o mecanismo de fragmentação proposto para esse íon, 20-50 eV.

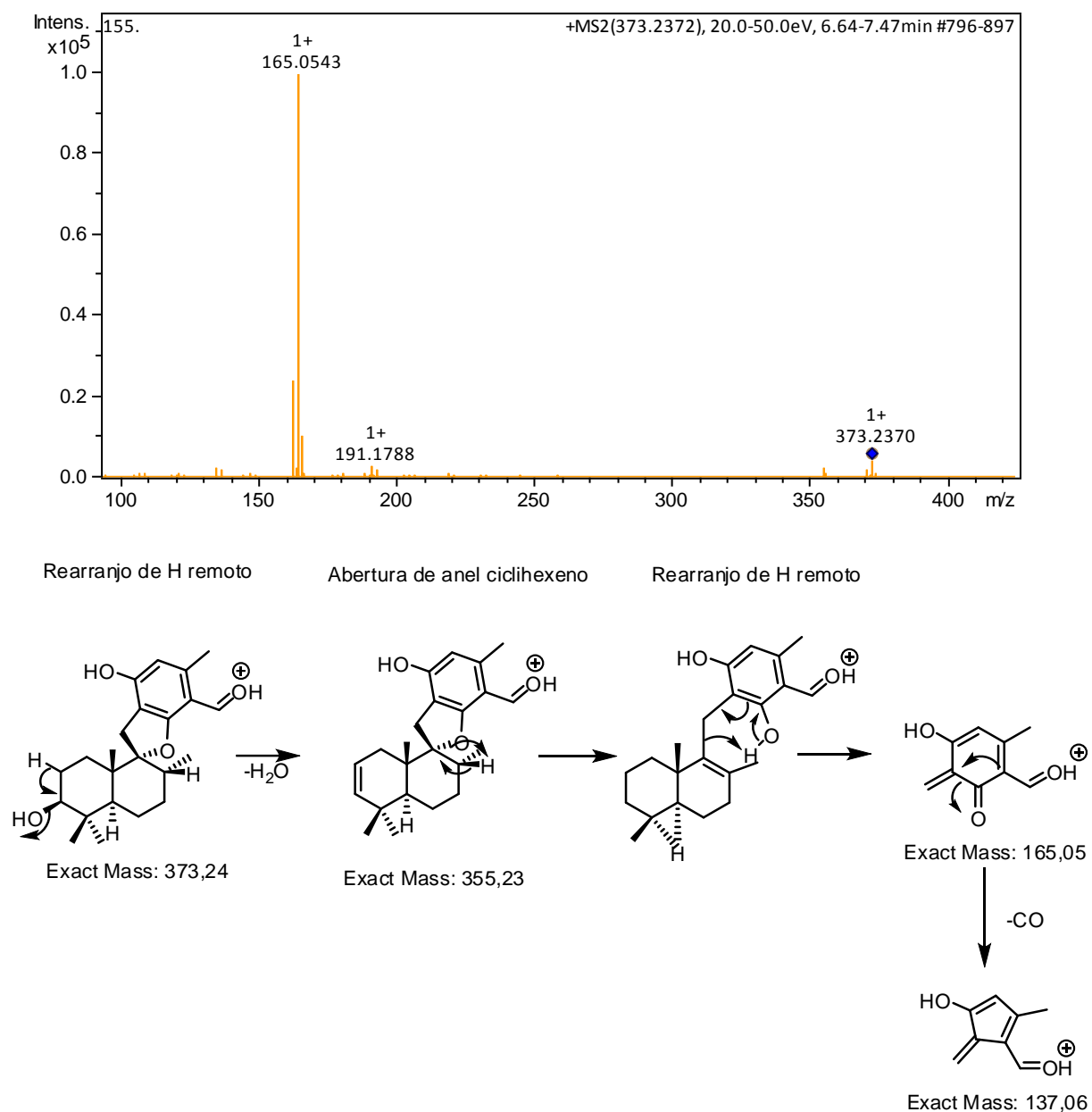


FIGURA A 53 - Espectro de massas MS/MS  $[M+H]^+$  373.2370 e o mecanismo de fragmentação proposto para esse íon, 20-50 eV.

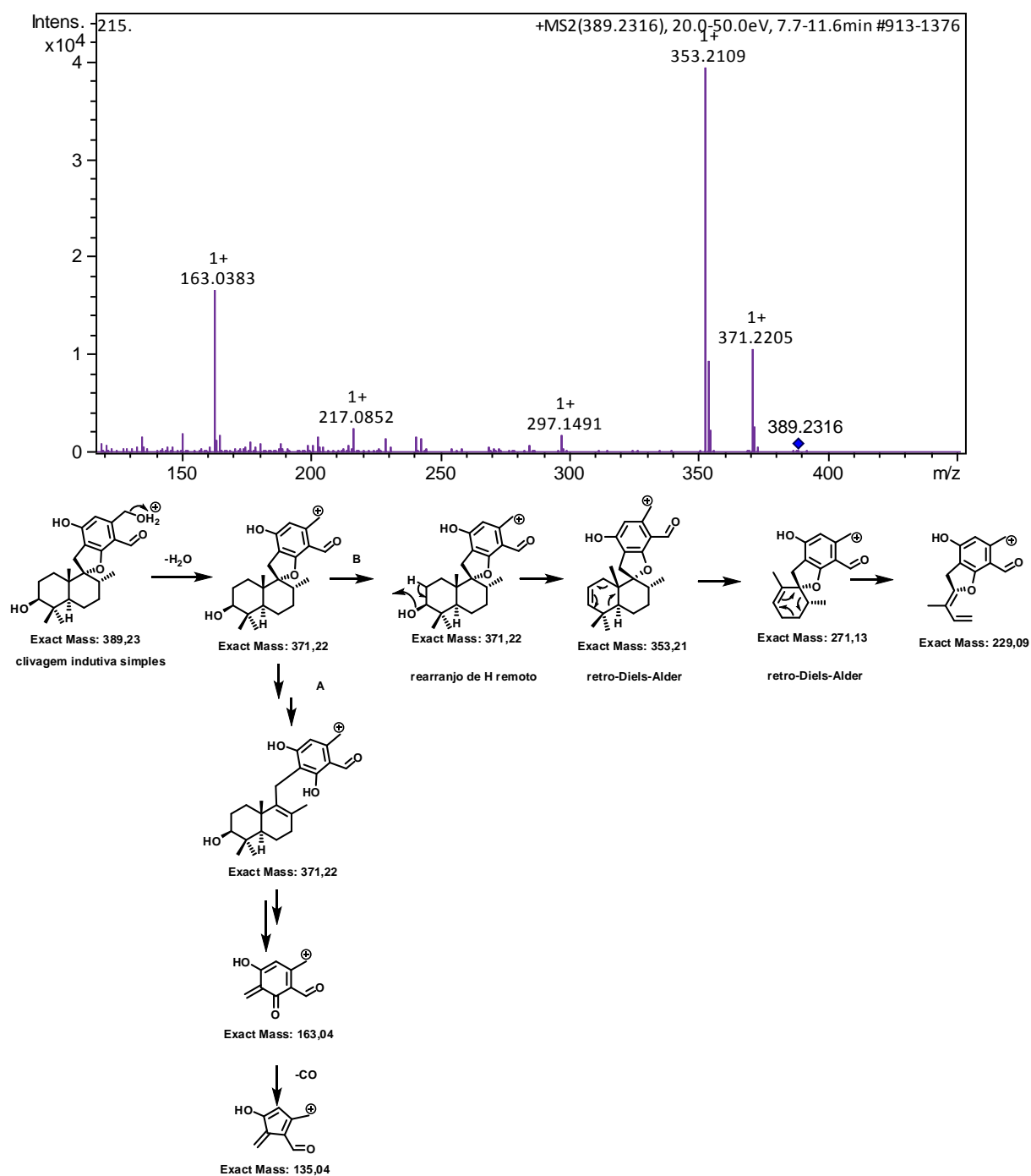


FIGURA A 54 Espectro de massas MS/MS  $[M+H]^+$  389.2316 e o mecanismo de fragmentação proposto para esse íon, 20-50 eV.

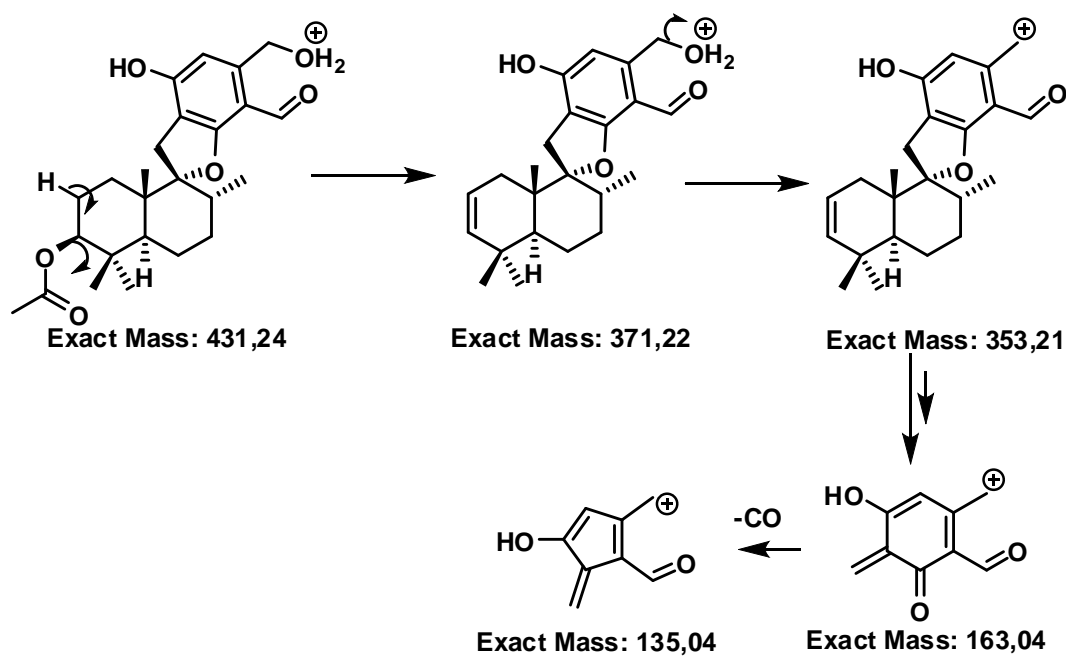
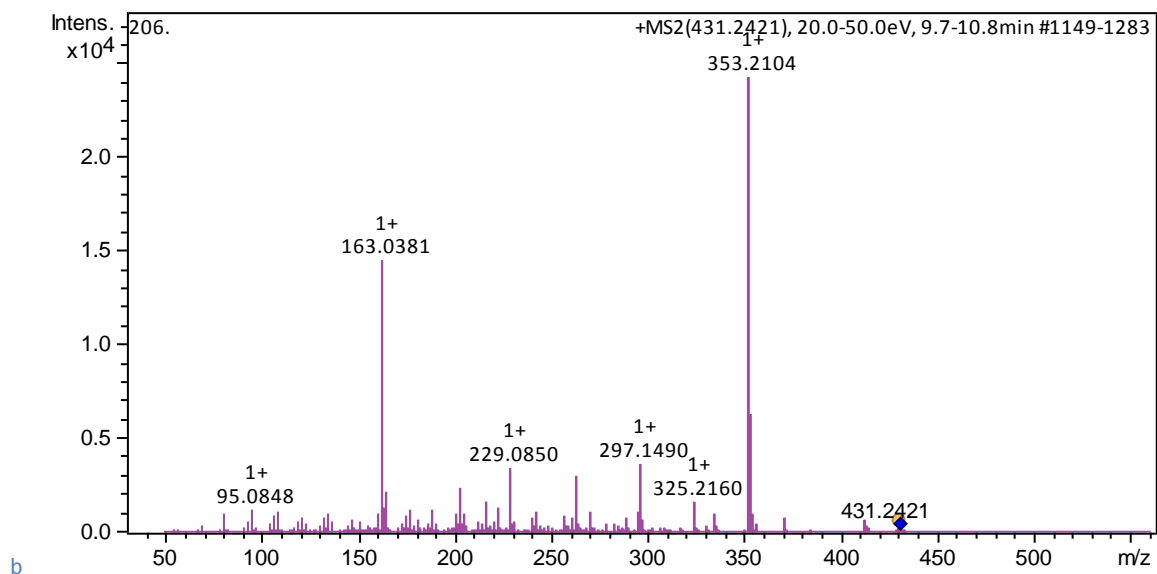


FIGURA A 55 Espectro de massas MS/MS  $[M+H]^+$  431.2421 e o mecanismo de fragmentação proposto para esse íon, 20-50 eV .

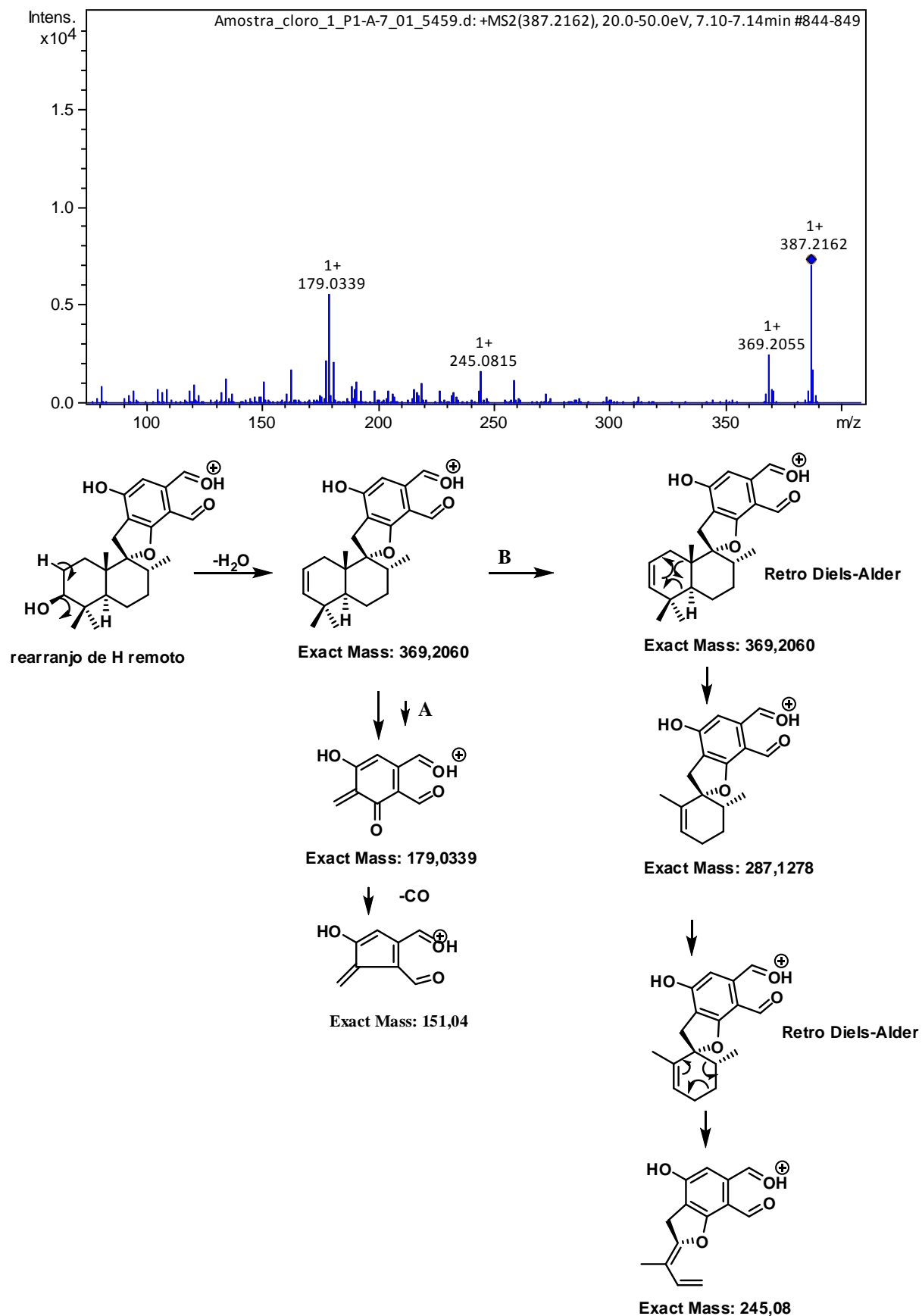


FIGURA A 56- Espectro de massas MS/MS  $[M+H]^+$  387.2162 e o mecanismo de fragmentação proposto para esse íon, 20-50 eV.

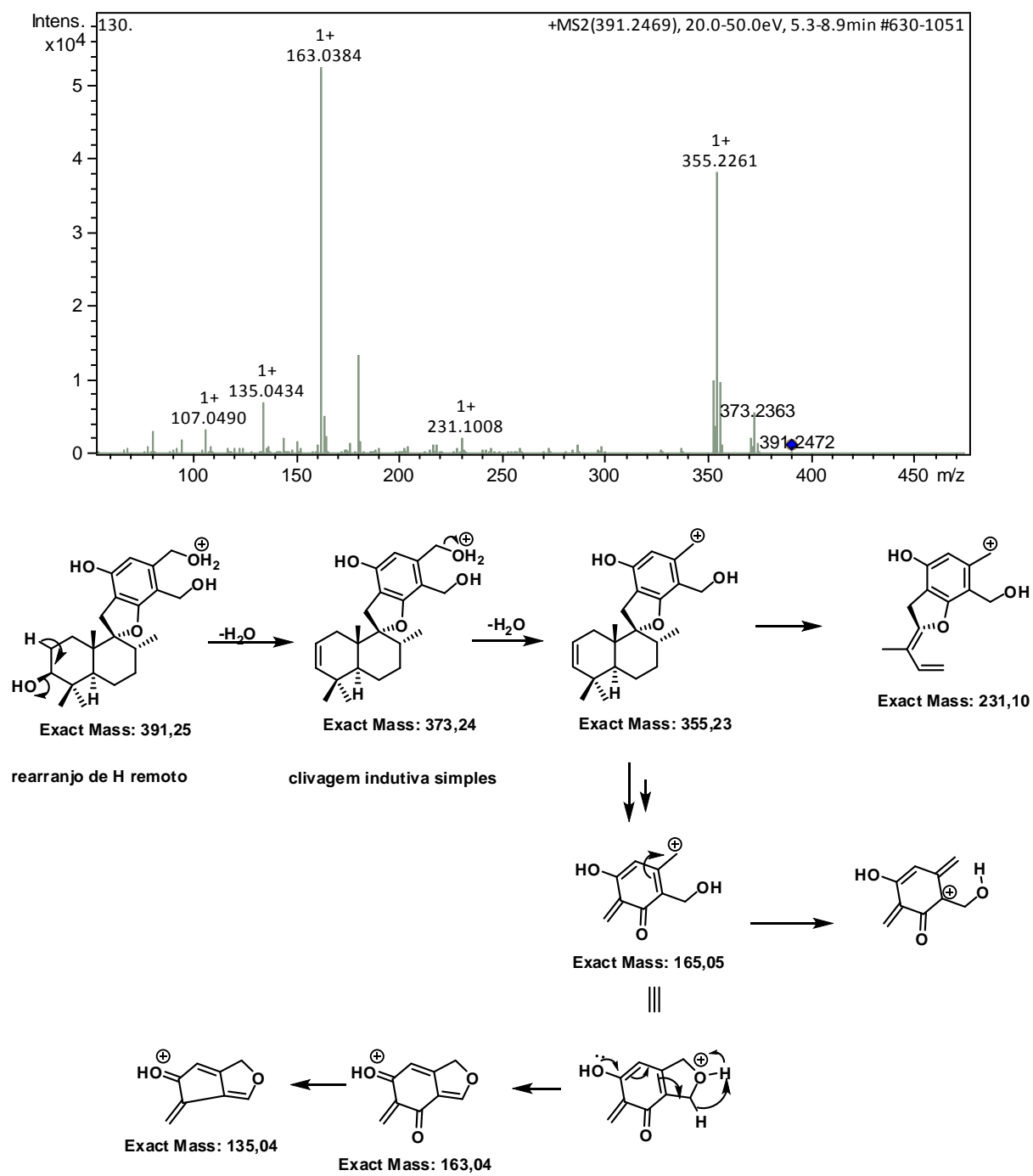


FIGURA A 57 - Espectro de massas MS/MS  $[M+H]^+$  391.2472 e o mecanismo de fragmentação proposto para esse íon, 20-50 eV.



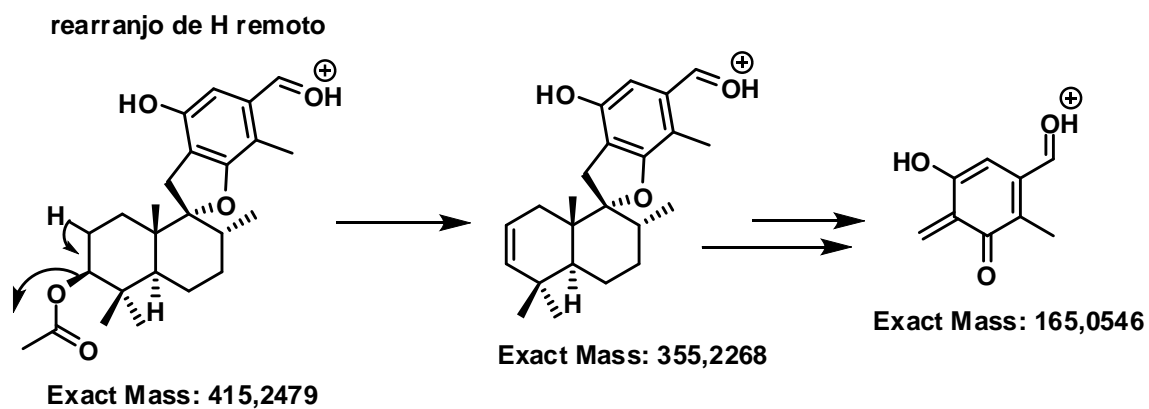
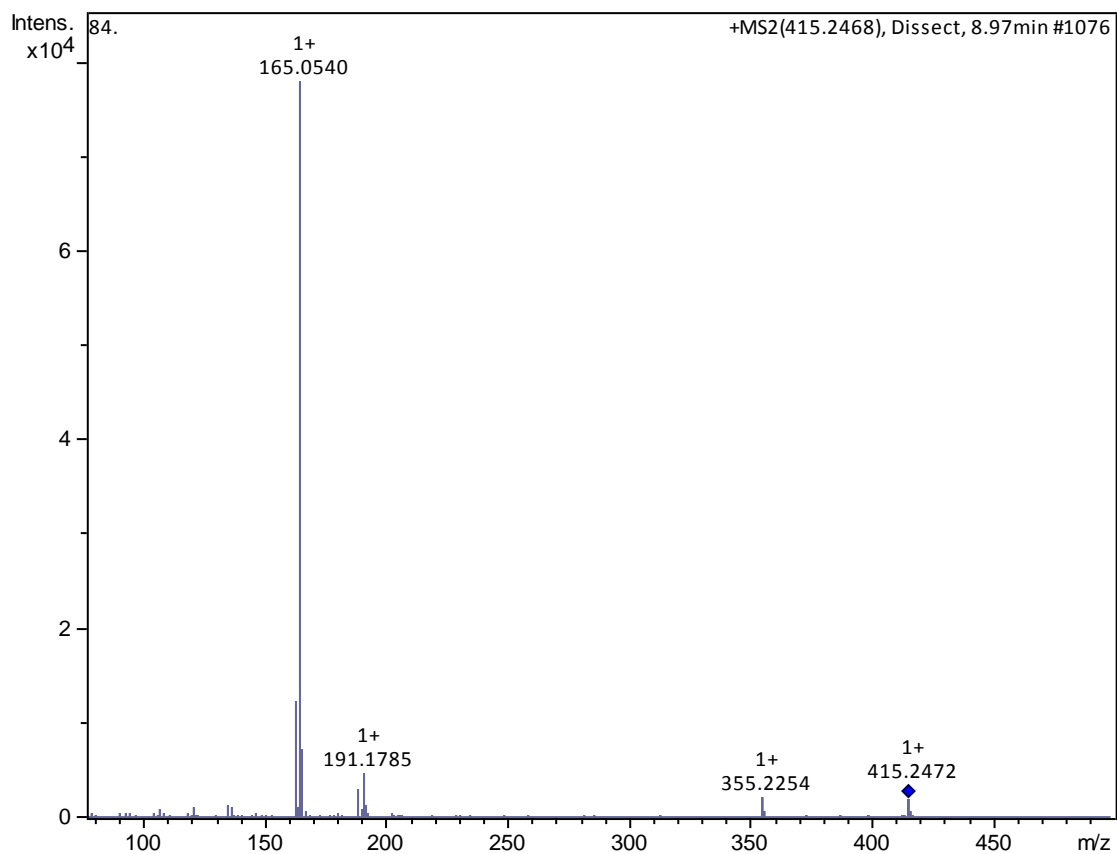


FIGURA A 58 Espectro de massas MS/MS  $[M+H]^+$  415.2472 e o mecanismo de fragmentação proposto para esse íon, 20-50eV.

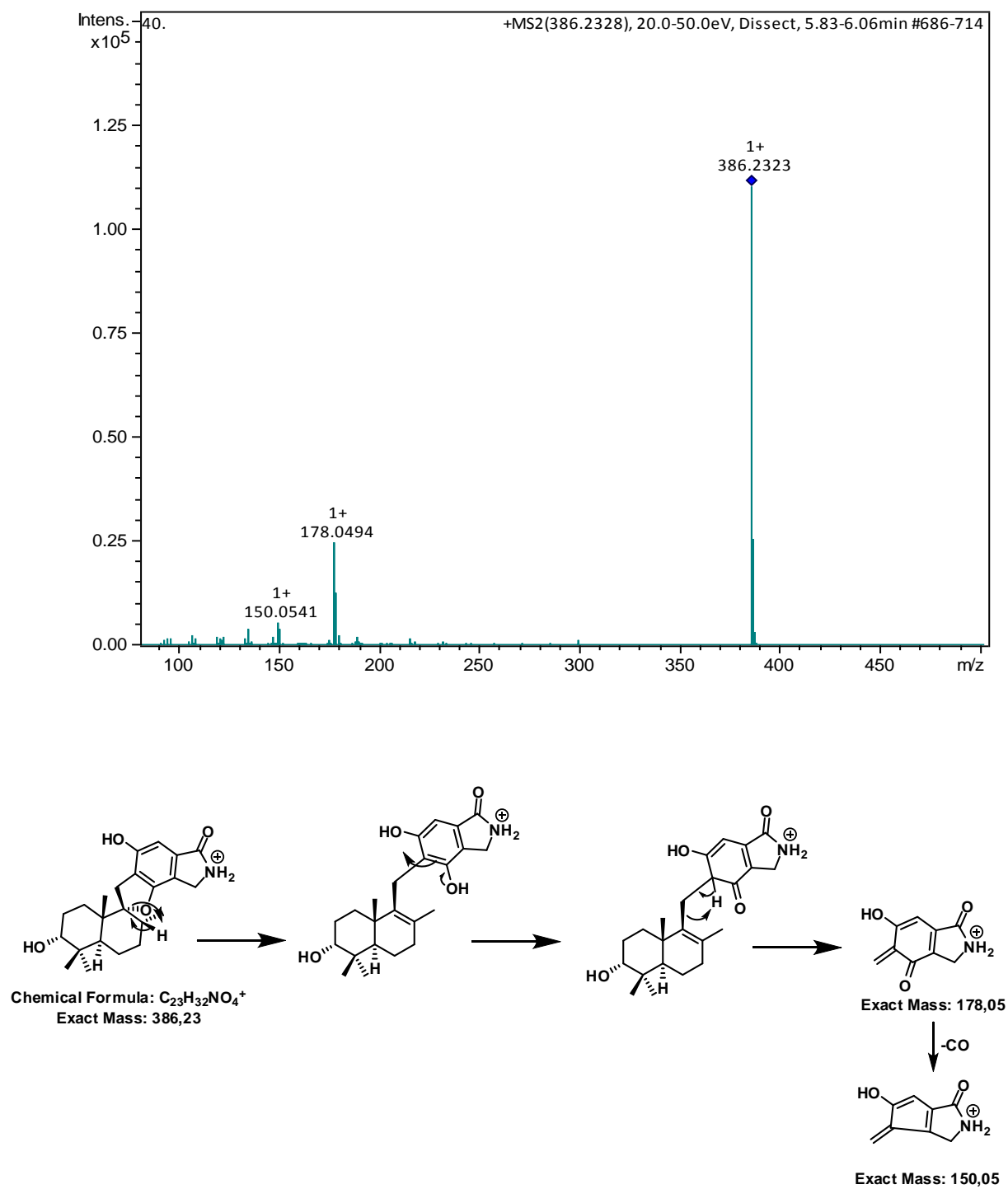


FIGURA A 59 - Espectro de massas MS/MS [M+H]<sup>+</sup> 386.2323 e o mecanismo de fragmentação proposto para esse íon, 20-50eV.

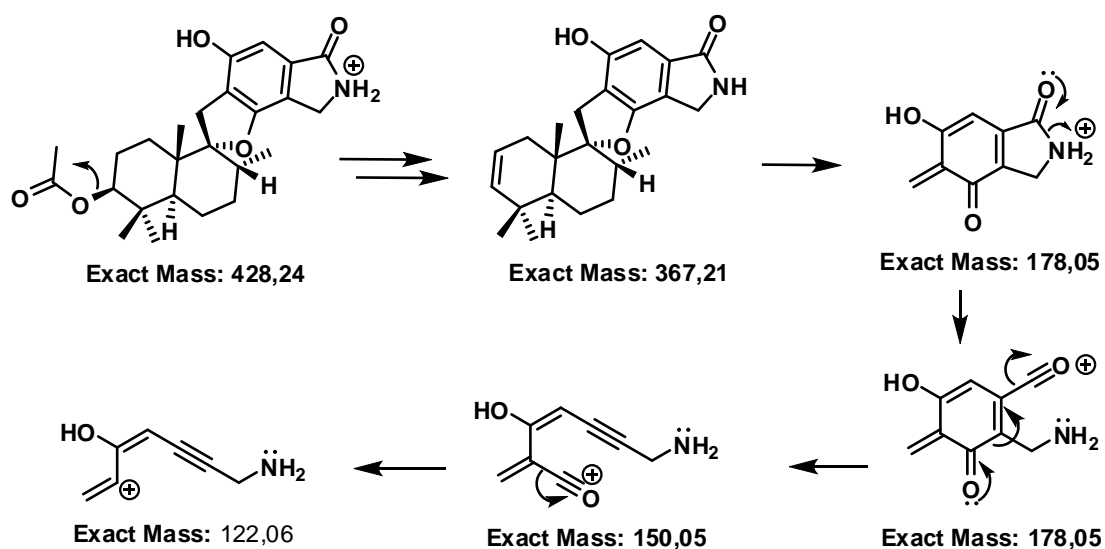
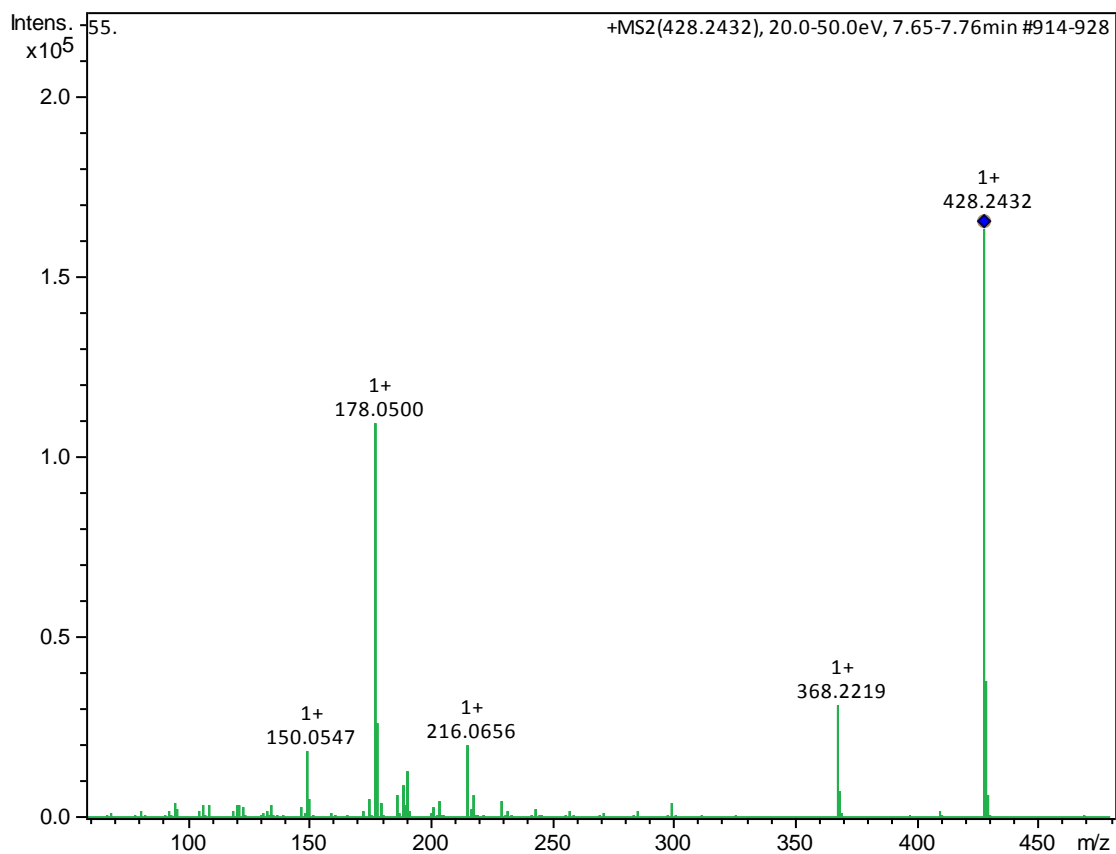


FIGURA A 60 - Espectro de massas MS/MS  $[M+H]^+$  428.2432 e o mecanismo de fragmentação proposto para esse íon, 20-50eV.

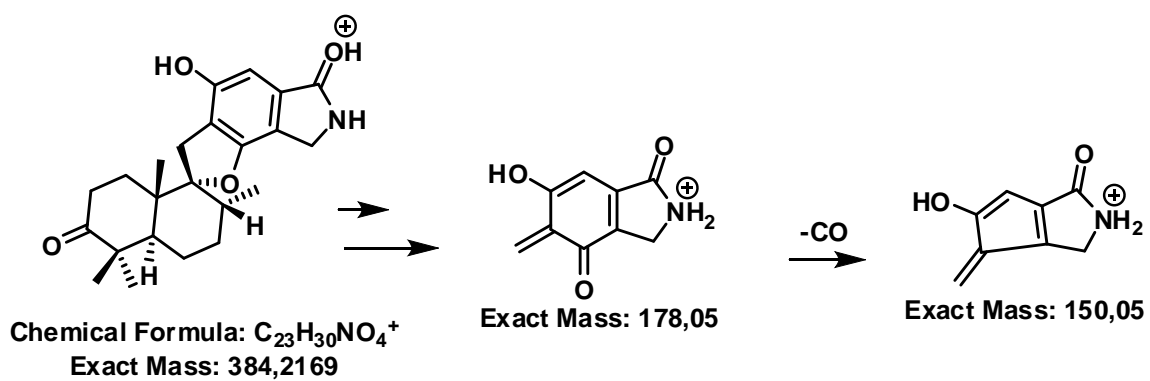
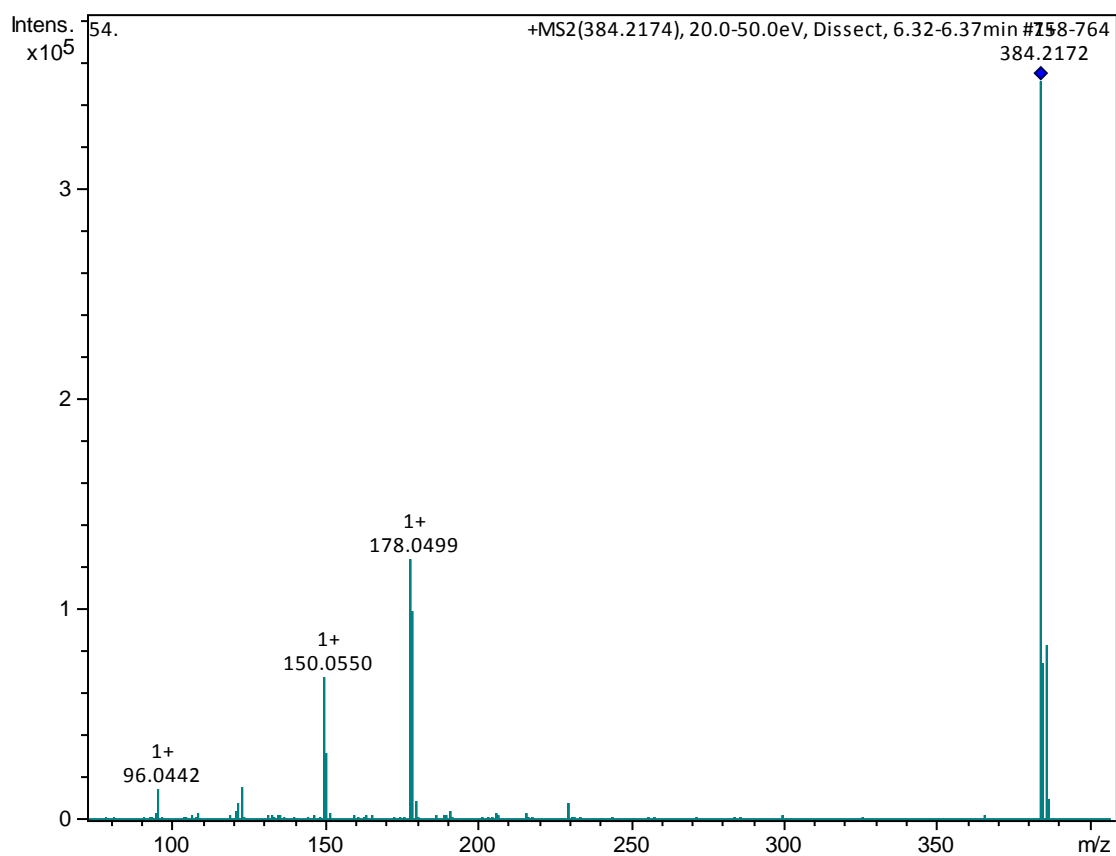


FIGURA A 61 - Espectro de massas MS/MS  $[M+H]^+$  384.2172 e o mecanismo de fragmentação proposto para esse íon, 20-50eV.



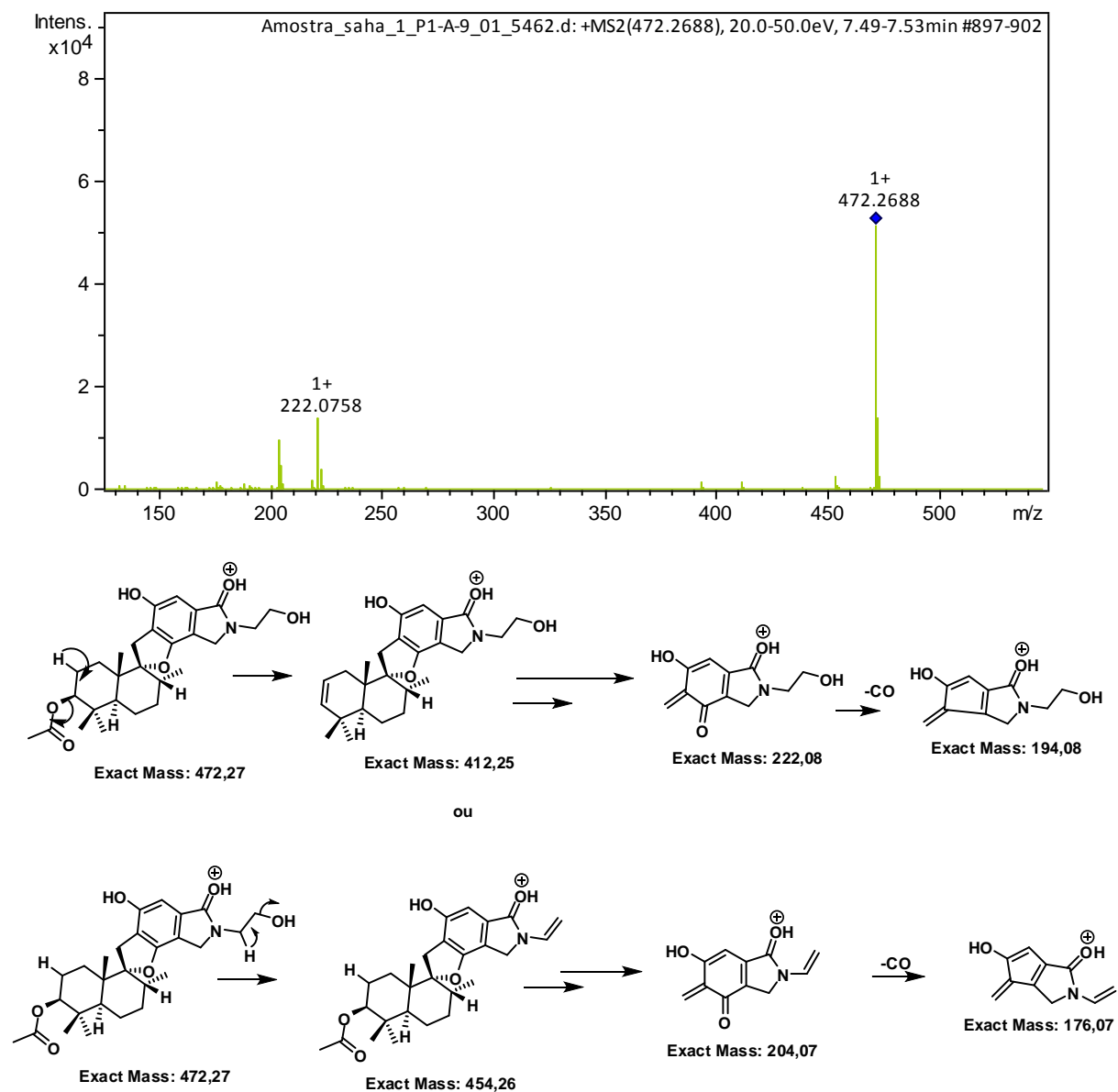


FIGURA A 63 - Espectro de massas MS/MS  $[M+H]^+$  472.2688 e o mecanismo de fragmentação proposto para esse íon, 20-50eV.

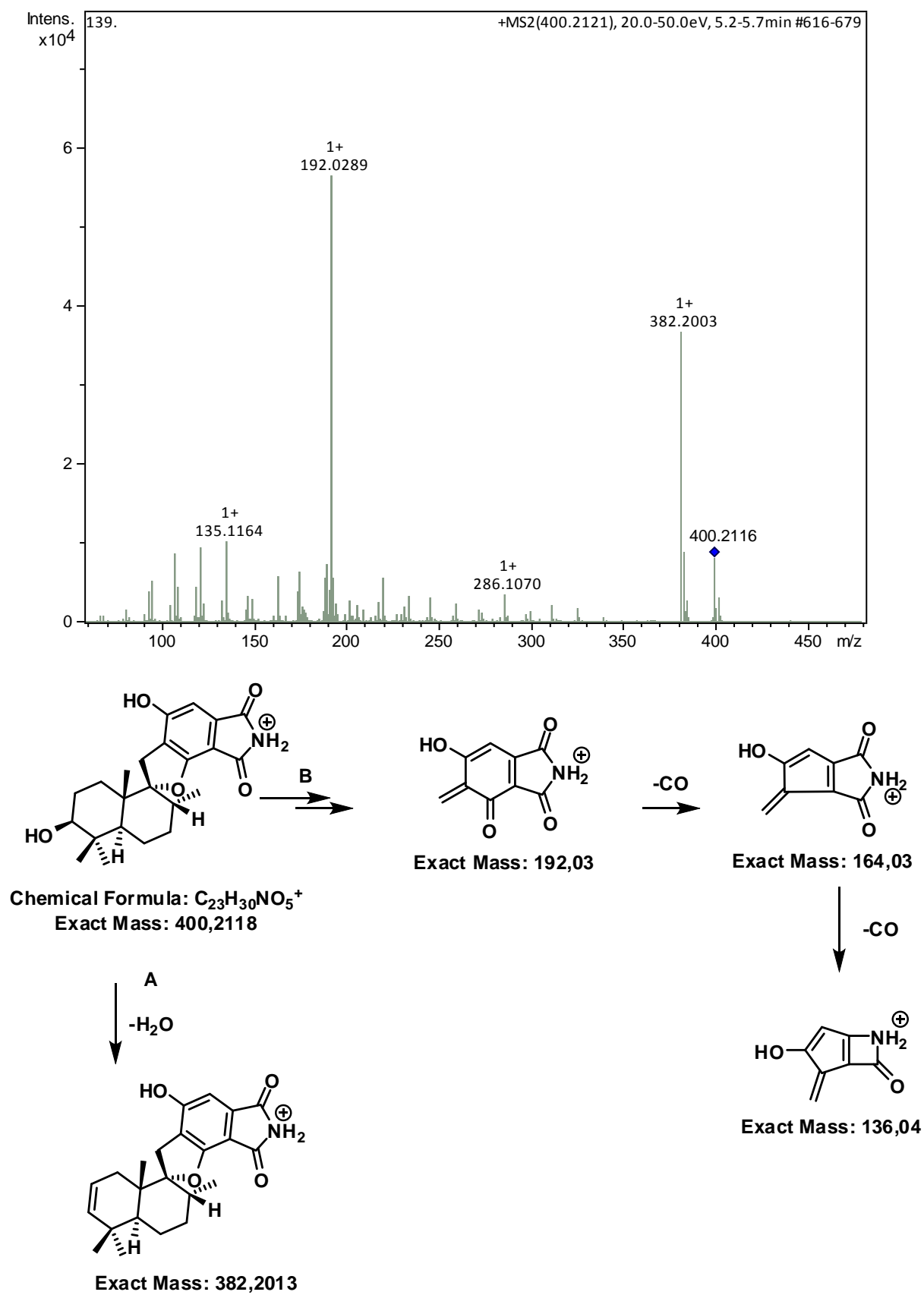


FIGURA A 64- Espectro de massas MS/MS [M+H]<sup>+</sup> 400.2116 e o mecanismo de fragmentação proposto para esse íon, 20-50eV.

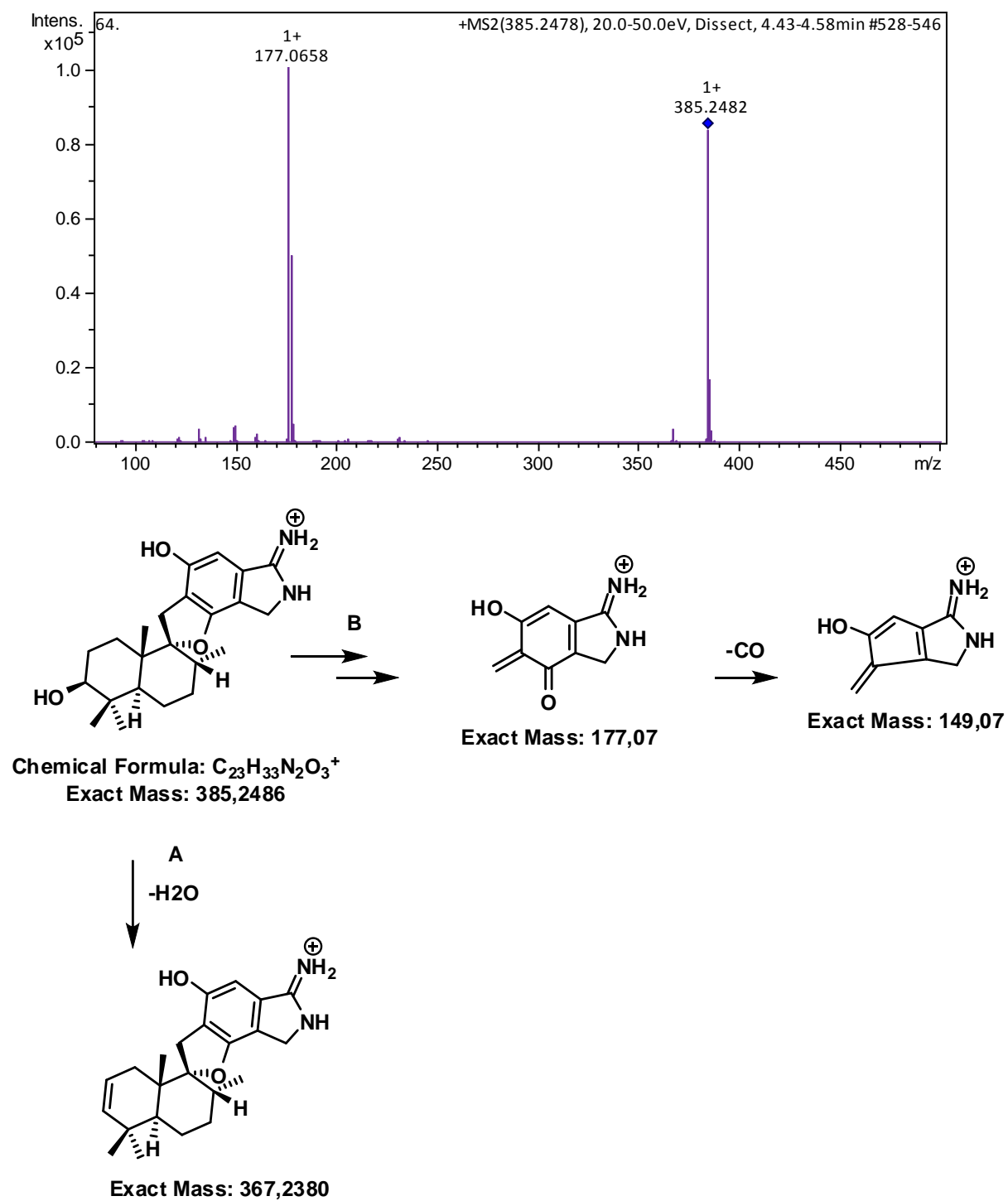


FIGURA A 65 - Espectro de massas MS/MS  $[M+H]^+$  385.2482 e o mecanismo de fragmentação proposto para esse íon, 20-50eV.



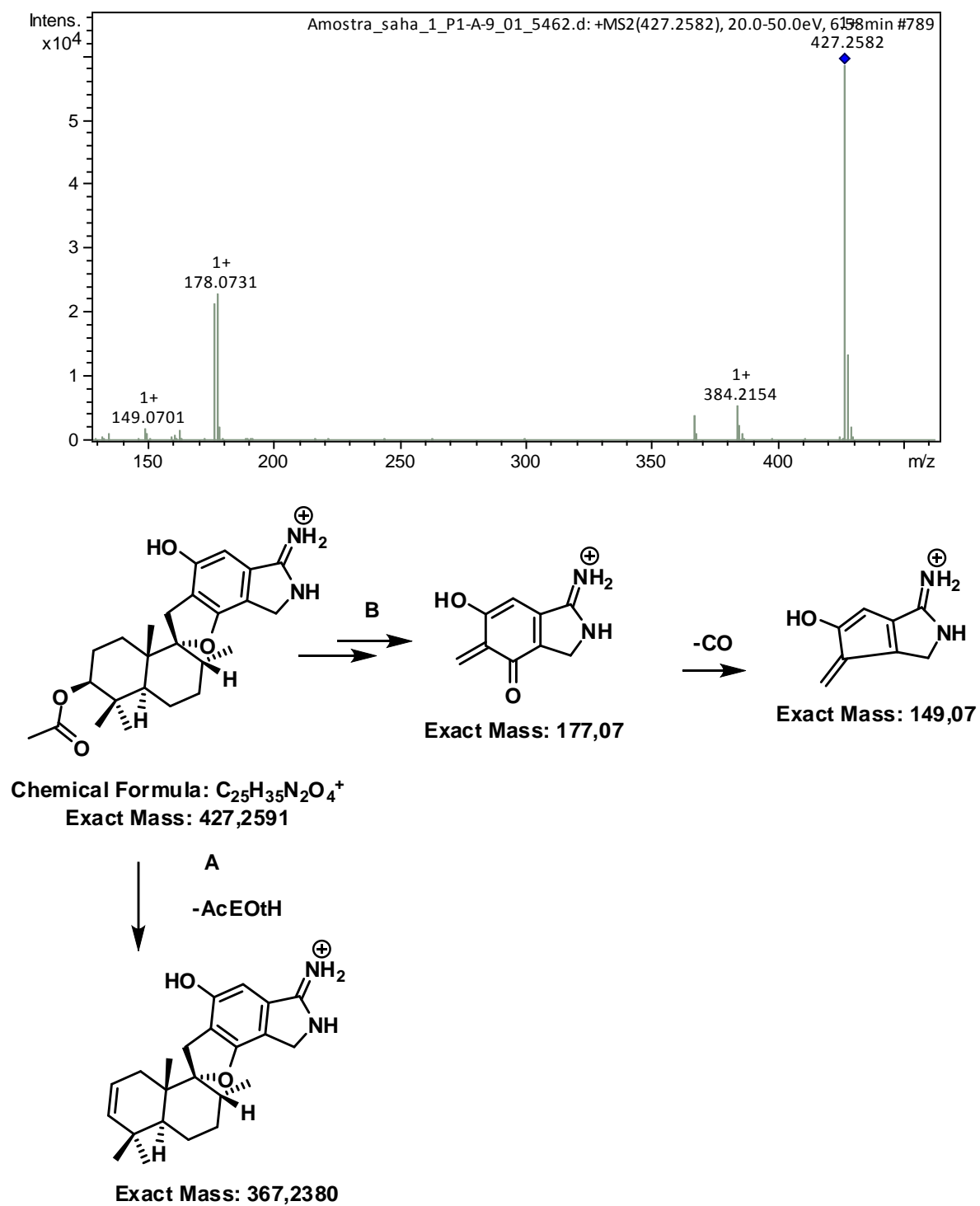


FIGURA A 66- Espectro de massas MS/MS  $[M+H]^+$  427.2582 e o mecanismo de fragmentação proposto para esse íon, 20-50eV.

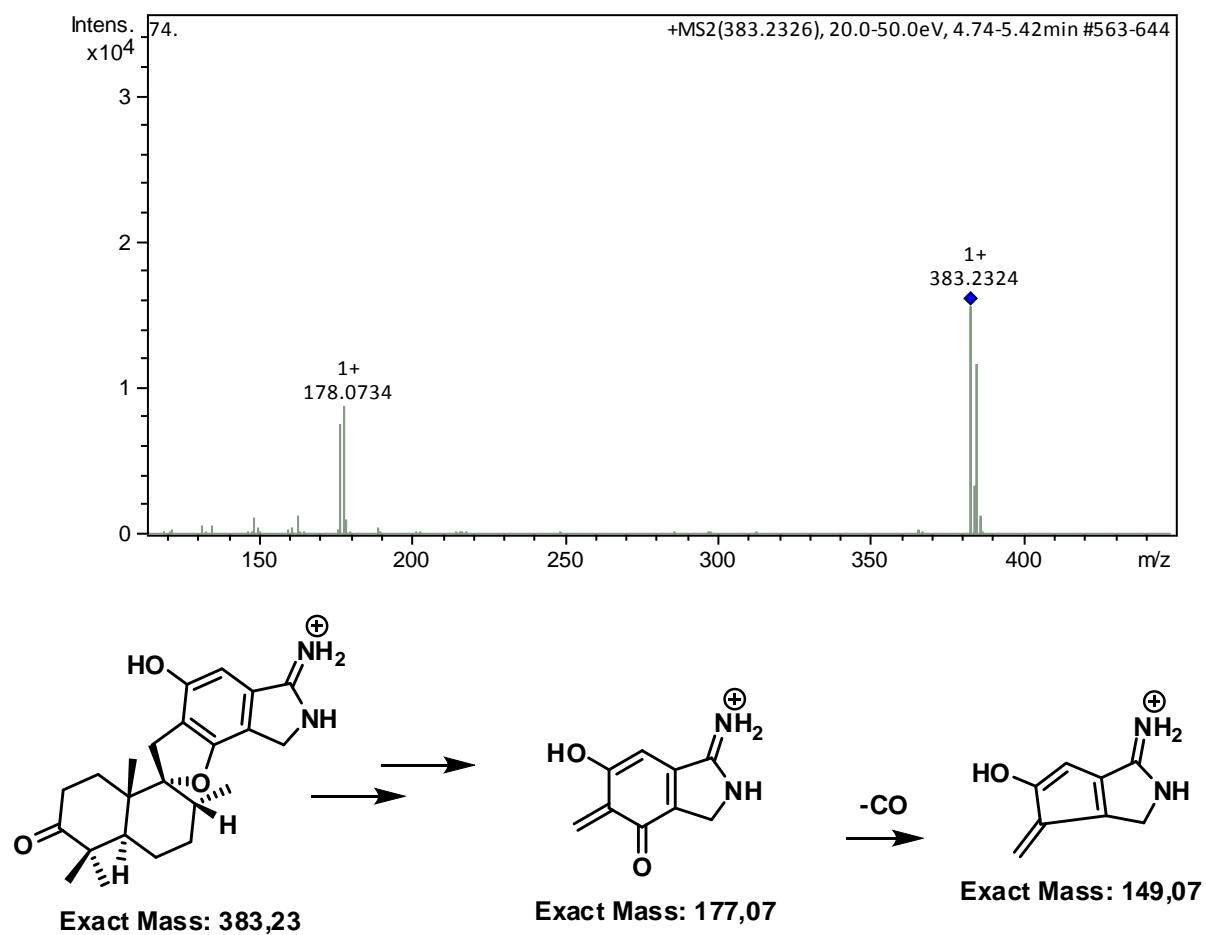


FIGURA A 67 - Espectro de massas MS/MS [M+H]<sup>+</sup> 383.2324 e o mecanismo de fragmentação proposto para esse íon, 20-50eV.

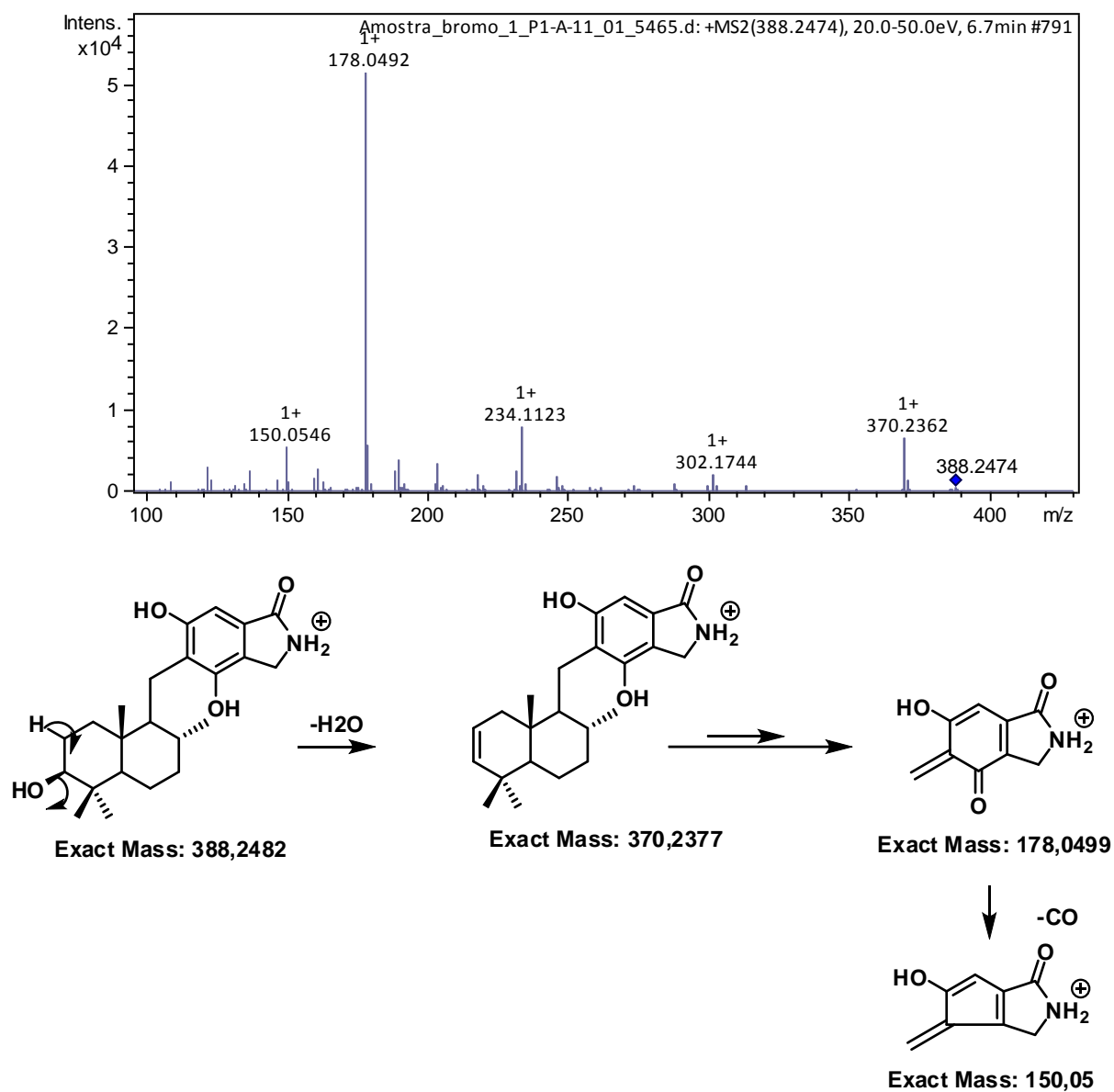


FIGURA A 68 - Espectro de massas MS/MS  $[M+H]^+$  388.2474 e o mecanismo de fragmentação proposto para esse íon, 20-50eV.

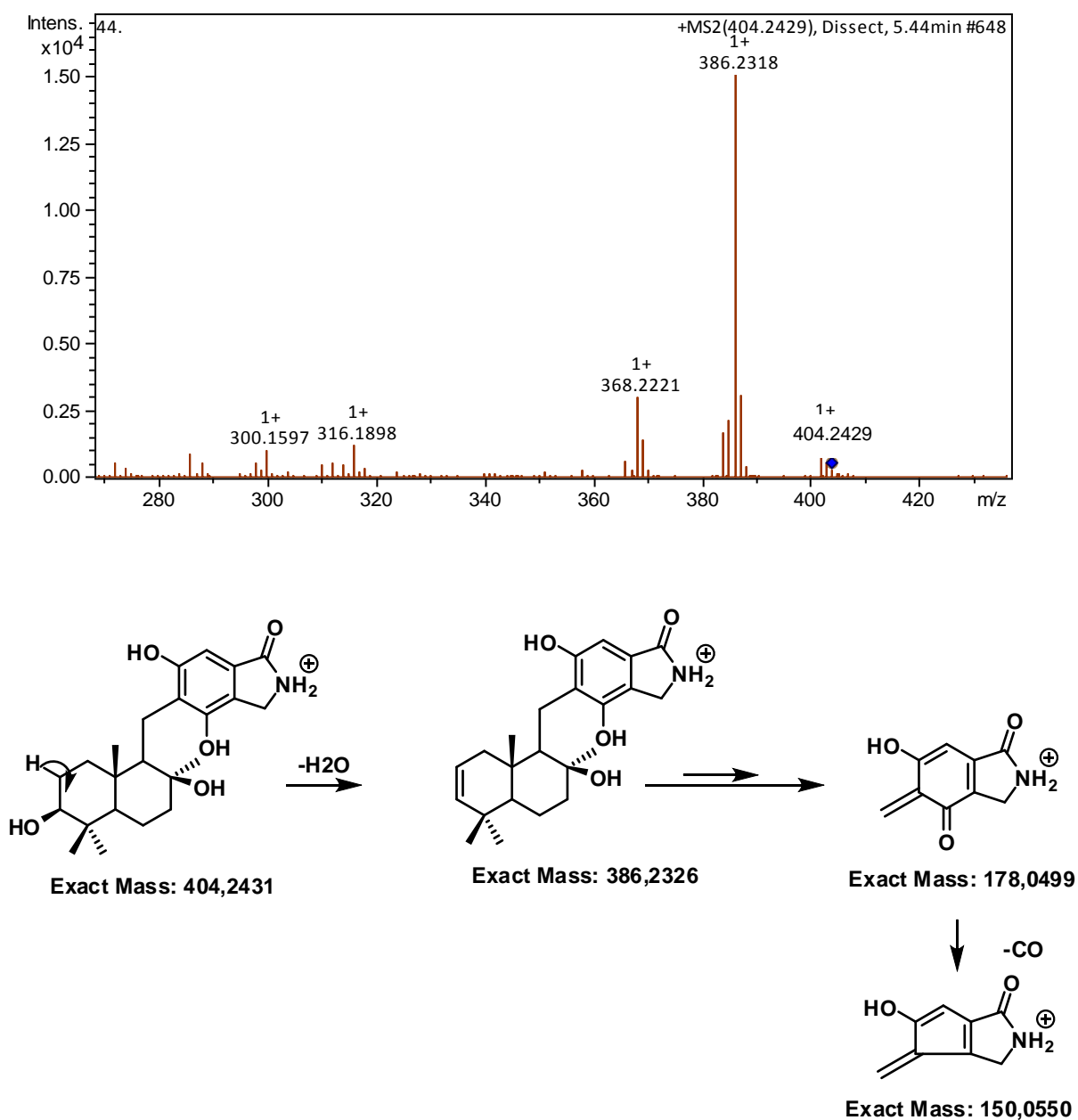


FIGURA A 69 - Espectro de massas MS/MS  $[M+H]^+$  404.2429 e o mecanismo de fragmentação proposto para esse íon, 20-50eV.

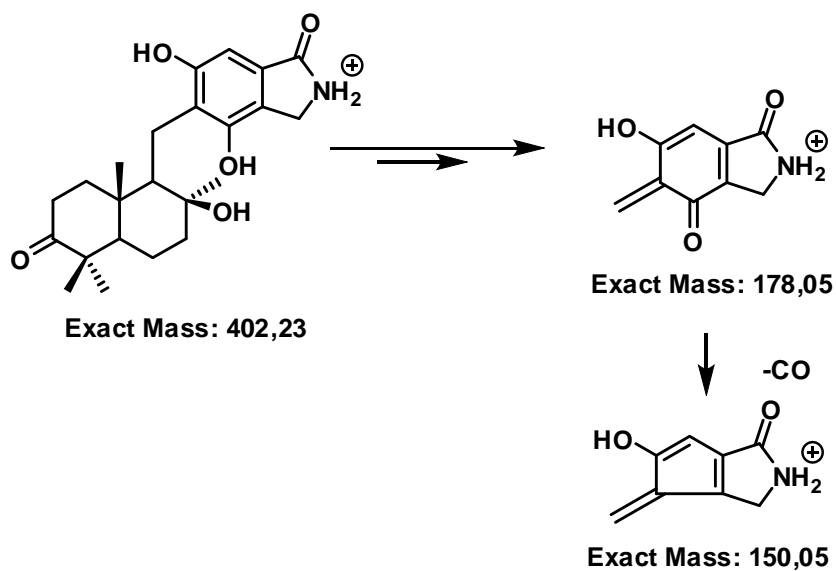
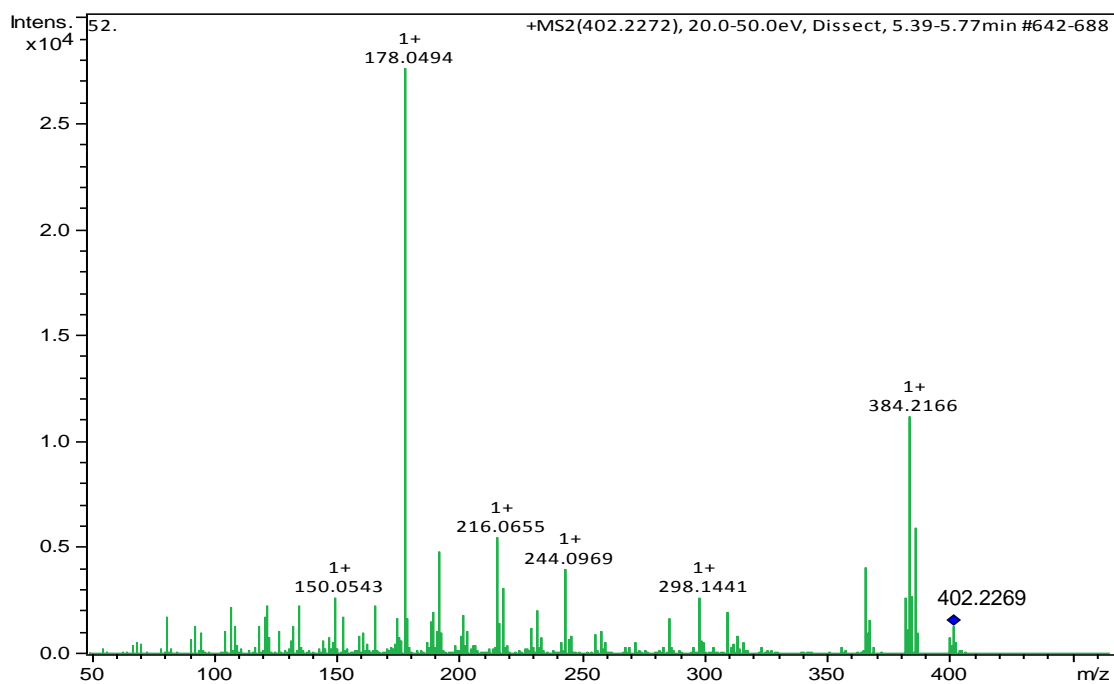


FIGURA A 70 Espectro de massas MS/MS  $[M+H]^+$  402.2269 e o mecanismo de fragmentação proposto para esse íon, 20-50eV.

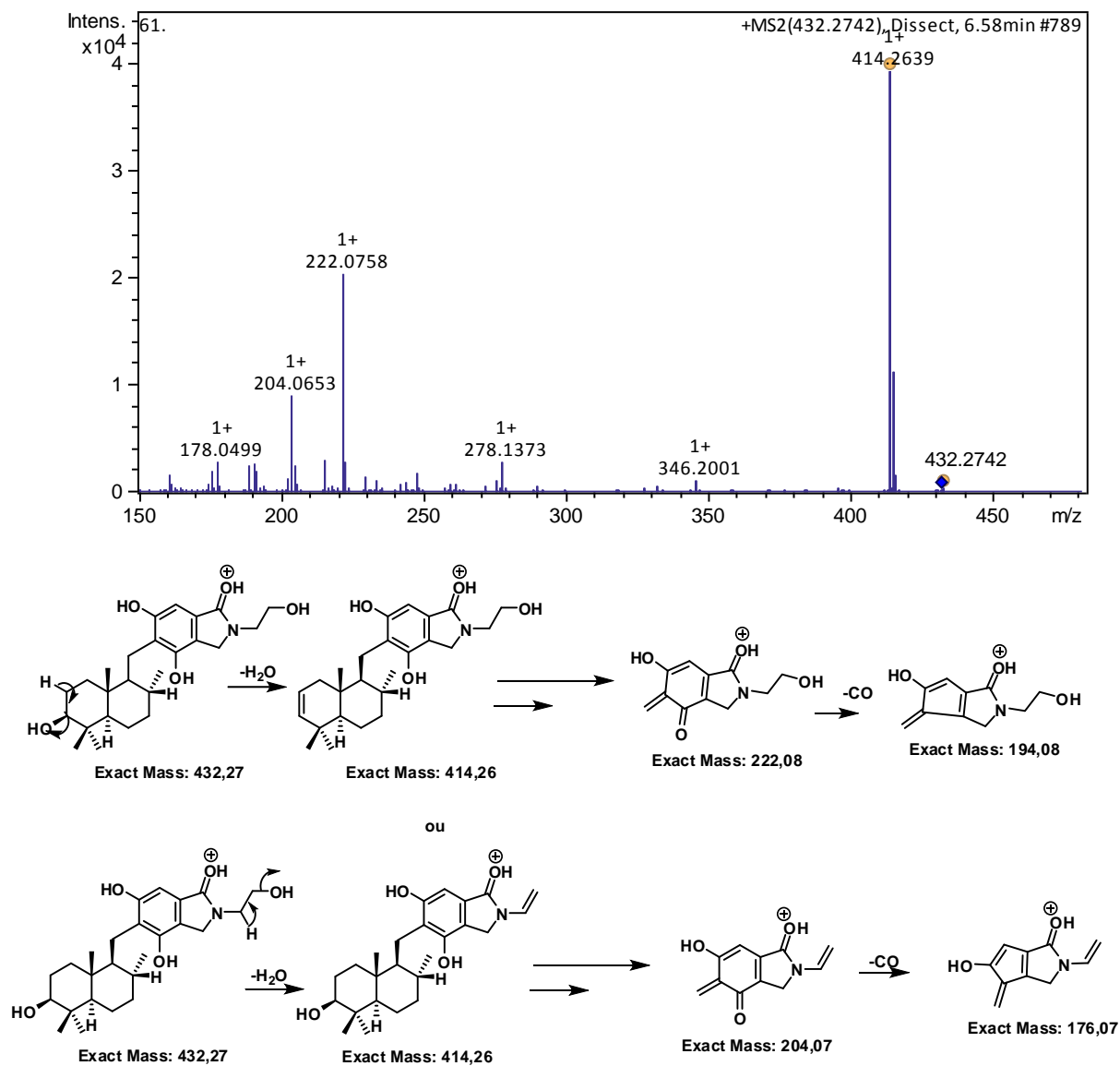


FIGURA A 71 - Espectro de massas MS/MS  $[M+H]^+$  432.2742 e o mecanismo de fragmentação proposto para esse íon, 20-50 eV.

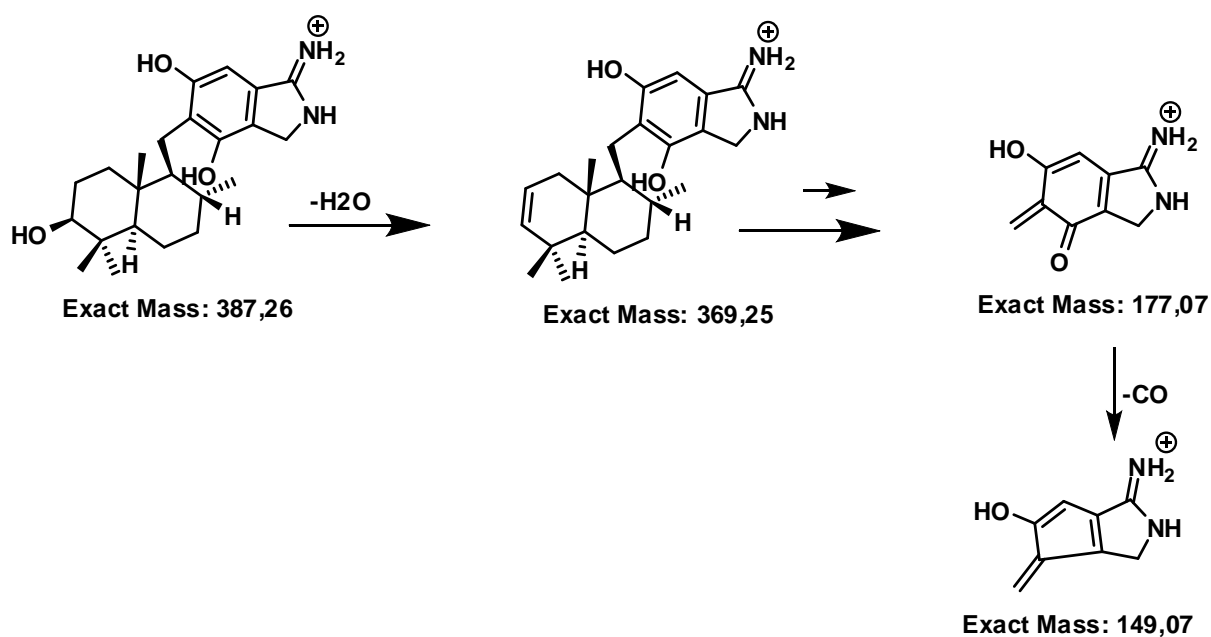
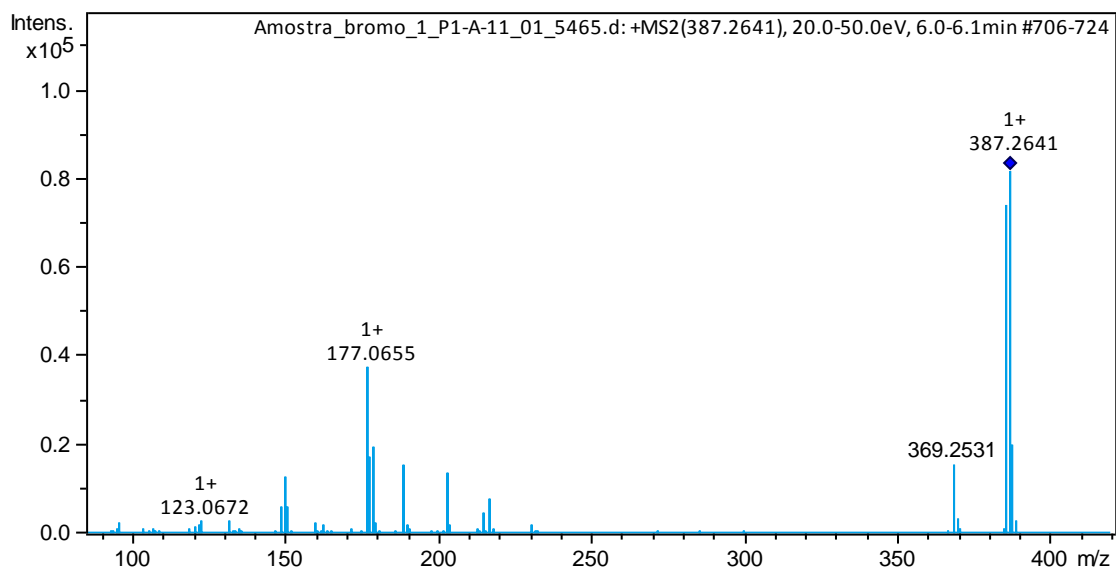


FIGURA A 72 - Espectro de massas MS/MS  $[M+H]^+$  387.2641 e o mecanismo de fragmentação proposto para esse íon, 20-50 eV.

## **CAPÍTULO II**

### **ESTUDO QUÍMICO DO FUNGO CURVULARIA INAEQUALIS E A OBTENÇÃO DE NOVOS COMPLEXOS METÁLICOS COM PRODUTOS NATURAIS**



# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Gênero *Curvularia*

O gênero *Curvularia* pertencente ao Filo Ascomycota é composto por mais de 40 espécies que são frequentemente encontrados em diferentes substratos de animais e vegetais (Santos, 2018; MANAMGODA et al. 2012). Embora algumas espécies sejam fitopatogênicas, em gramíneas e em regiões de clima tropical/subtropical, a maioria dos exemplares do táxon é conhecido como sapróbios de solo e plantas. (GUEDES et al., 2012).

O Ascocarpo superficial com coloração preta/marron; conidóforos curtos, lateiras, ramificados ou não; micélio marrom/acinzentado com aspecto de algodão e/ou aveludado são algumas das características morfológicas e estruturais que as espécies do gênero *Curvularia* apresentam (MANAMGODA et al. 2012), e que sofrem alterações pelas influência das condições cultivo.

A variabilidade estrutural e a mudança sutil de uma espécie para outra, historicamente, gerou confusão para micologistas e fitopatologistas na identificação a nível de espécie, as quais foram amenizadas pelo uso da taxonomia molecular (LIANG et al. 2018) e pela subclassificação em 3 tipos. Essas classificações foram feitas de acordo com a forma e no número de septos do conídios; são elas: geniculata, lunata e maculans. Geniculata e lunata compreendem as espécies com conídios que apresentam números de septos menores ( $> 3$ ), enquanto que maculans com 4-ou mais septos (LIMA e FURTADO, 2007). Lunata e geniculata diferenciam-se pela presença de uma curvatura mais pronunciada, com célula mediana mais volumosa e habitual presença de estroma em cultura (LIMA e FURTADO, 2007)

*Curvularia spp* são fonte rica de metabólitos quimicamente diferentes e com vasta aplicação nas indústrias farmacêuticas e na agricultura. Exemplos de metabólitos bioativos e comuns ao gênero, são as pirenocinas, antraquinonas, apralaconta, benozopiranos, mediólídes e curvularinas, que exibem atividades antibacteriana, antifúngica e de citotoxicidade (KIM et al. 2007; MONDOL et al. 2017; ABU-ELREESH et al. 2013; VARMA et al. 2006; IÓCA, NICACIO, E BERLINCK 2018; KRIZSÁN et al. 2016; GREVE et al. 2008; ABU-ELREESH et al., 2013). Além de biosintetizar compostos interessantes, dados na literatura apontam para a capacidade desses fungos em degradar hidrocarbonetos aromáticos policíclicos

(HAP), que são poluentes nocivos ao meio ambiente (JUCKPECH, PINYAKONG, e RERNGSAMRAN, 2012).

## 1.2. Espécies *Curvularia inaequalis*

As espécies *C. inaequalis* (CUI) estão classificadas como lunata. Assim como as demais espécies do gênero possui ampla distribuição em países como Brasil, Austrália, Índia, Japão, Malásia e Turquia. (LIMA e FURTADO 2007) Geralmente são encontrados como sapróbios, mas podem se apresentar como fitopatogênicos.

Características marcantes envolvendo os conidióforos FIGURA ; macronematosos terminais ou laterais em hifas isoladas e/ou em pequeno grupos, além de curvatura elipsoidal para as extremidades e elevado número de conídios, faz com que a identificação dessa espécie seja facilitada (SIVANESAN, ALCORN, e SHIVAS, 2003; MADRID e CUNHA, 2014).

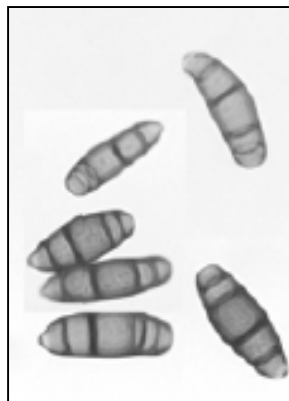


FIGURA 1- Imagens dos conídios septados de *C. inaequalis*. 400x: Fonte (LIMA e FURTADO 2007)

Trabalhos realizados com esse fungo pela rede SISBIOTA exibiram resultados promissores no controle biológico e indução de resistência em plantas. Tratamentos com os filtrados de CUI, levaram à ativação secundária dos mecanismos de defesa induzidos em plantas de feijão, soja e sorgo, com acúmulo e aumento na produção de fitoalexinas como: faseolina e gliceolina respectivamente (SANTOS et al. 2017).

O estudo da resistência induzida contra a ferrugem, em plantas de eucalipto, apontou para a capacidade de CUI em aumentar consideravelmente a produção de FAL (fenilalaninaamonioliase) (PIEROZZI, 2013). FAL são enzimas ligadas ao metabolismo secundário das plantas, de extrema importância no mecanismo de

proteção ao ataque de fitopatógenos, pois geram precursores para a biossíntese de lignina e de outros compostos fenólicos que se acumulam em resposta à infecção REF.

Pesquisas em campo, voltadas para o controle do míldio e da antracnose em videiras, usando extrato de CUI, exibiram diminuição de 92% na severidade no primeiro ano, seguidos de redução de 60% nos anos seguintes. Ainda neste estudo, foi possível verificar a indução de resistência na plantação, através da ativação da FAL (KUHN, 2014). A produção de metabólitos secundários do sapróbio exibiu potencial antagonistas contra *Alternariara solani* (patógeno da pinta-preta) com efeitos fungistáticos frente ao crescimento micelial com redução de 20% comparado ao controle (JUSSIÊ et al. 2017; CRISTIANE, 2014).

A mancha marrom de alternaria, causada pelo fungo *Alternaria alternata*, tem sido considerada uma das mais severas doenças fúngicas em tangerinas e seus híbridos. Sua presença foi confirmada nos estados de Minas Gerais, Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro e São Paulo. O nosso grupo vem trabalhando também com doenças de citrus, e visando entender a interação entre o fungo patogênico e a planta, e posteriormente conhecer o ou os compostos envolvidos, modificá-los para potencializar suas atividades. Assim, esta informação acima sobre *Alternaria alternata* nos estimulou a estudar *Curvularia inaequalis*, conhecer seu perfil químico, e posteriormente realizar ensaios de antagonismo com extratos e substâncias puras frente a *Alternaria alternata*, tema de tese de uma segunda aluna do grupo.

### **1.3. Complexos metálicos derivados de aminoácidos**

Compostos metálicos despertam interesse em pesquisadores de várias áreas, devido a grande diversidade que a química de coordenação pode proporcionar para o desenvolvimento de novos agentes para aplicações na indústria química, agricultura e principalmente para síntese de novos fármacos (KUMAR, DHAR E SAXENA, 2009, RONCONI e SADLER 2007).

A estrutura desses complexos consiste basicamente de um átomo central (ou) de íon (metal) ligado a ânions (ligantes). Íons metálicos e deficientes em elétrons, em seu estado elementar tendem a formar íons com cargas positivas (KUMAR, DHAR E SAXENA 2009). O estado catiônico em que esses íons se encontram em soluções aquosas e sistemas biológicos conferem atividades essenciais para os organismos

vivos em decorrência da alta afinidade com biomoléculas aniônicas, como por exemplo, DNA, proteínas e aminoácidos (BAILE et al. 2015). Propriedades químicas, como: solubilidade, lipofilicidade e ação do fármacos pode ser potencializadas de forma significativa em decorrência da formação de quelatos e da permeabilidade dos medicamento no local de ação.(BAILE et al. 2015)

O descobrimento da Cisplatina (*Cis*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>]) como agente tumoral, representou uma grande revolução na história da química medicinal inorgânica (JOHNSTONE ET AL.,2016). Desde a década de 60, esse composto, assim como seus derivados oxiplatina e carboplatina entre outros, tem sido utilizados como os quimioterápicos mais efetivos no tratamento do câncer, com índices que aproximam-se de 87% de cura para alguns tipos dessa doença. Estima-se que a cada 10 pessoas com câncer, 6 fazem uso de cisplatina para o tratamento (VACCARO et al. 2009).

O sucesso atribuído à esses complexos, dentre vários outros fatores, está no mecanismo de coordenação com o DNA. Sucessivos processos de substituição dos ligantes ocorrem dentro do sistema biológico através de reações de hidrólises, em seguida, a forma catiônica do complexo de platina atraem os sítios nucleofílicos do DNA, que interagem fortemente(AMABLE 2016). Além disso, ao tamanho pequeno e a geometria planar quadrática facilita o transporte passivo ao núcleo das células através da membrana plasmática e o transporte ativo mediado por proteínas de membrana (JOHNSTONE, SUNTHARALINGAM, E LIPPARD 2016).

Apesar de eficiente no tratamento da doença, a cisplatina é altamente tóxico, e apresenta efeitos colaterais severos, como ototoxicidade, neurotoxicidade, nefrotoxicidade e principalmente a resistência adquirida à droga em decorrência do uso prolongado do medicamento (VACCARO et al. 2009; AMABLE 2016). Estudos voltados para síntese de novos complexos, que sejam mais ativos e menos nocivos à saúde, se tornaram uma alternativa promissora, como por exemplo complexos orgânicos que utilizam aminoácidos como bioligantes coordenados aos metais.

Aminoácidos são moléculas pequenas, estáveis e favoráveis para o estudo de sistemas envolvendo metal-proteínas (SANTOS, 2018). Grupos amino e carboxílico presentes na estrutura dessas moléculas fornecem sítios de ligação com os íons metálicos, que podem ser encontrados na forma mono, bi ou tridentado dependendo do estado de oxidação do metal. Complexos com L-fenilalanina, L-tirosina, L-ácido glutâmico , L-cisteína, L-proline entre outros ligados a metais como Pd(II), Ru (II), V(III) Cd(II), Pt(II) e Ag (II) são exemplos de compostos sintetizados recentemente e

exibiram grande atividade contra células cancerígenas e outras doenças de humanos, além de ser potencial contra bactérias e fungos patógenos e nocivos à agricultura (ZHANG, ZHAO, e WANG, 2017; ALMEIDA 2009; BERGAMINI et al., 2016; KUMAR, DHAR, e SAXENA, 2009; ABBEHAUSEN et al. 2011; DEL et al., 2018; SANTOS et al. 2016).

Em estudos químicos de fungos é comum encontrar aminoácidos livres, e em geral, estes aparecem em quantidades relevantes para serem utilizados como precursores em semi-sínteses a fim de potencializar sua atividade.

## 2. OBJETIVO GERAL

O objetivo deste capítulo foi avaliar o perfil químico do fungo *Curvularia Inaequalis* em diferentes meios de cultivo e realizar o isolamento e identificação das substâncias majoritárias. Adicionalmente, realizar a sínteses de complexos metálicos com os metabólitos purificados

Objetivos específicos

- Estabelecer condições de cultivo para o crescimento do fungo em meio sólido de batata-dextrose-ágar;
- Avaliar o perfil químico do fungo em diferentes meios de cultivo sólido e analisar por técnicas analíticas de UPLC-DAD;
- Realizar o crescimento do fungo em escala ampliada, em meio líquido nas condições mais promissoras;
- Isolar e identificar os metabólitos majoritários por técnicas espectroscópicas e espectrométricas (UPLC-DAD, UPLC-UV, UPLC-HRMS e RMN);
- Realizar a complexação dos metabólitos isolados e testar a atividade biológica.

### **3. Materiais**

#### **3.1 Solventes**

Solvente Grau HPLC: (Merck, Tedia, HoneyWell, J. T. Baker, Panreac)

Solventes Deuterados para RMN: MeOD<sub>4</sub>, CDCl<sub>3</sub> (Merck e Aldrich),

Água ultrapura - Ultra purificador de Água Master System MS2000 (Gehaka)

Solventes P.A, Panreac, Synth

#### **3.2 Meios de cultivo**

Batata dextrose ágar, Batata dextrose, Extrato de Malte, Extrato de levedura, Czapeck, Ágar- todos Himedia®

Glicose- Synthec

#### **3.3 Suporte Cromatográfico**

Sílica gel 60 (70-230 mesh e 230-400 mesh) da Merck,

#### **3.4 Aminoácidos- Complexos**

Ácido piroglutâmico e L-prolina – Sigma-Aldrich 99%

### **3.5 Equipamentos**

#### **3.5.1 Microscópio eletrônico**

Leica DM 500, acoplado com câmera EC3

#### **3.3.11 Evaporadores rotativos**

BUCHI, rota evaporador R-200 equipado com banho BUCHI B-490 e recirculador refrigerado NESLAB, modelo CFT-25.

#### **3.3.12 Centrifuga**

Eppendorf, Centrifuga Modelo 5810 R.

#### **3.3.13 Cromatógrafos Líquidos**

##### HPLC -UV

Agilent Technologies modelo 1200, equipado com bomba quaternária G1311A, degaseificador G1322A, Amostrador automático G1329A, e detector de ultravioleta de

comprimento de onda variável (VWD) G1314B, forno de coluna G1316A. Software: Openlab chemstation

Colunas: C18- zorbax eclipse e XDB- (4.6 X 150 mmX 5 µm)

#### UPLC- PDA-QDA

Acquity H class equipado com detector de arranjo de fotodiodo (PDA) e um detector de massa quadrupolo (QDA) (Waters Corp., Milford, MA, USA). Software Empower® 3

Colunas: Waters HSS C18 (1.7 µm; 2.1X100mm)

#### **3.3.14 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)**

Brucker DRX - 9,8 T (400 MHz para RMN 1H), equipado com trocador automático de amostra, sonda de 5 mm BFO (smart probe com ATMA®)

Brucker Avance III - 14,1 T (600 MHz para RMN 1H), equipado com trocador automático de amostra, cryo-sonda TCI (1H/13C/15N) de 5 mm com ATMA® (Automatic Tuning Matching) sonda BBI de 5 mm com ATMA®

#### **3.3.15 Balanças**

Balança Analítica - Sartorius modelo BP 210S

#### **3.3.16 Câmaras de Fluxo Laminar**

Veco VL FS-12M

#### **3.3.17 Autoclaves Verticais**

Phoenix AV 75

#### **3.3.18 Estufa Incubadora (BOD)**

Fanem – 347 CD

#### **3.3.19 Banho Ultrassônico**

Branson 1510, Danburcy, CT

#### **3.3.20 Difração de Raios-X**

-NONIUS KAPPA CCD

- Bruker APEX DUO



## **4. PARTE EXPERIMENTAL**

### **4.1 Obtenção do isolados de *Curvularia inaequalis***

O fungo *Curvularia inaequalis* (CUI) foi isolado de regiões do semiárido nordestino pelo professor Luis Fernando Gusmão Paschoalati e estão depositados na CCMB (Coleção de Microrganismos da Bahia) na Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS) – BA. Número do depósito 0005/06.

### **4.2 Cultivo do fungo *Curvularis inaequalis* em diferentes meios de cultivo sólido e o preparo de extratos em escala analítica.**

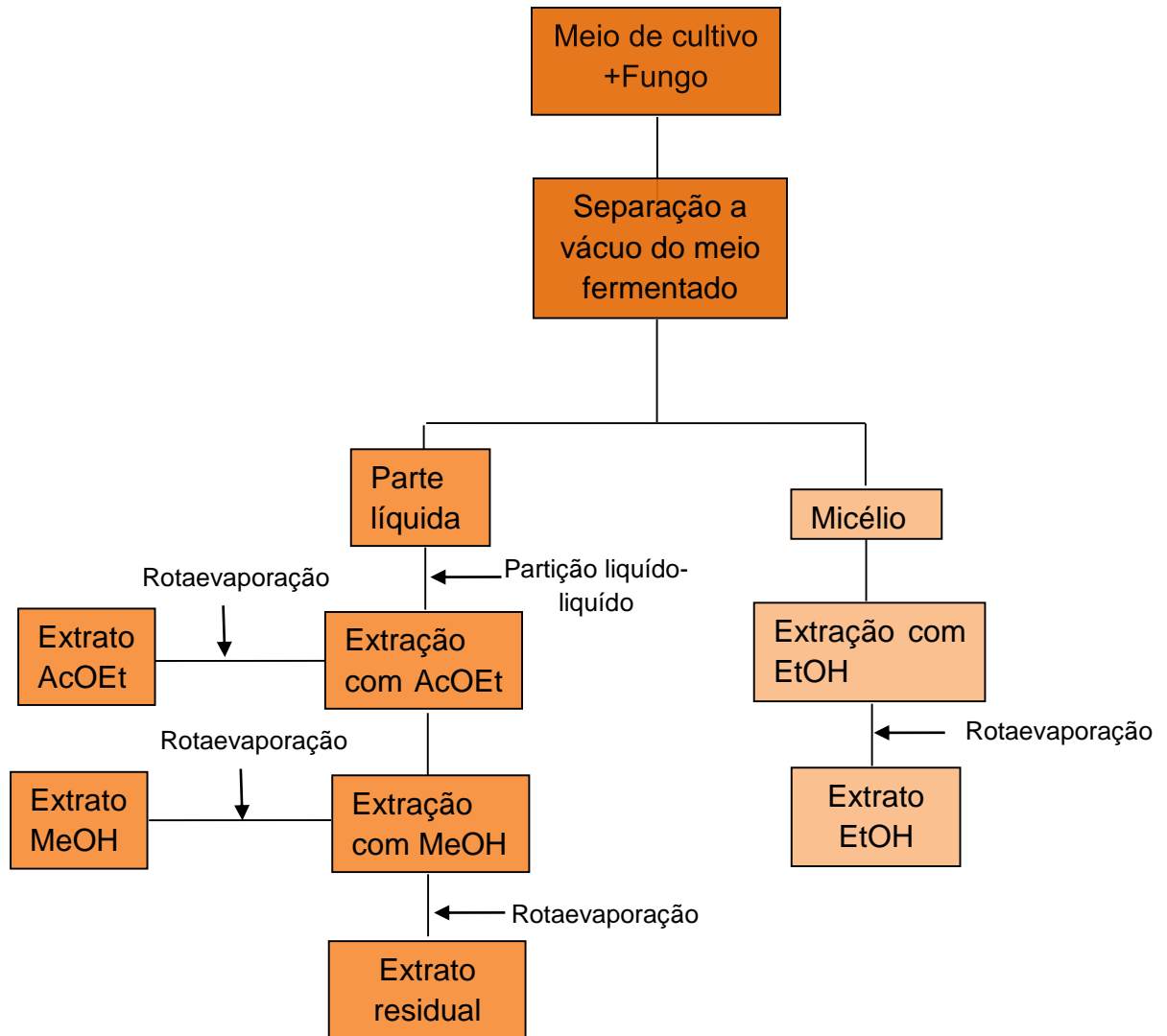
Os fungos que estavam preservados em Castellani foram reativados em placas de petri (80X15cm) contendo o meio de batata-dextrose-ágar (BDA) (esterilizados). Um disco de 5 mm do fungo foi inoculado no centro da placa e após o desenvolvimento, repicado para outras 4 placas contendo o meio BDA. Após 7 dias de inoculação a 25°C, duas dessas placas foram examinadas em microscópio para verificar a morfologia. As placas restantes foram repicadas para outras contendo diferentes meios de cultivo sólido; BDA + 5% de glicose (BDG5), BDA + 1% de glicose (BDG1), BDA + 1% de extrato de malte (BDM), BDA + 1% de extrato de levedura (BDL), Czapeck+ ágar (CZA). Os meios de cultivo pesados e solubilizados em 20mL água, foram previamente autoclavados antes da transferência dos discos do fungo às placas de petri. Para cada meio, foi preparado o controle (meio de cultura sem a inoculação do fungo). Após o período de fermentação, foram retirados 6 discos de 5 mm de cada meio e transferidos separadamente para eppendorfs de 2,0mL. Esse procedimento foi repetido para os controles. Aproximadamente 500 µL de uma mistura de 1:2:3 metanol/diclorometano/acetato de etila foram adicionados aos eppendorfs e extraídos por 60 minutos em ultrassonicador. Com o auxílio de uma pipeta Pasteur, separou-se a parte líquida remanescente e filtrou-se em membrana PVDF (filtro 15 mm e poro de 0,20 µm). As amostras foram secas em capelas de exaustão e ressuspensas em 500 µL de uma mistura 1:9 H<sub>2</sub>O/ACN e analisadas por UPLC-DAD.

### **4.3 Análises do perfil químico do fungo *Curvularia inaequalis* em diferentes meios de cultivo em escala analítica.**

Os extratos preparados anteriormente em escala analítica foram analisados em cromatógrafo de ultraeficiência – UPLC Acquity H class equipado com detector de arranjo de fotodiodo (PDA) (Waters Corp., Milford, MA, USA). Para a parte cromatográfica os solventes da fase móvel consistiram de Água Milli-Q® (A) e ACN (B) ambas acidificadas com 0,01% de ácido fórmico. O modo eluição gradiente iniciou-se com 80% de A e 20% de B e permaneceu em condição isocrática durante 1 min, o gradiente linear atingiu 100% de B em 11 min, e continuou nessa condição por 2 min. O retorno para as condições iniciais ocorreu após 1 min. O volume de 10 µL de cada amostra foi injetado em uma coluna Waters HSS C18 (1.7 µm; 2.1X100mm), em um fluxo de 0,400 mL/min e concentração de 1mg/mL. O sistema foi mantido a temperatura constante de 40°C. As faixas de comprimento de onda monitoradas foram de 200 a 400 nm.

### **4.4 Crescimento em escala ampliada de *Curvularia inaequalis***

O cultivo do fungo em meio líquido de batata dextrose + 1% de extrato de malte foi feito em escala ampliada para a obtenção de uma maior quantidade de extrato bruto. A fermentação foi feita em Erlenmeyers de 1000 mL, os quais foram previamente esterilizados em autoclave a 120 °C, sob pressão de 1 atm por aproximadamente 20 min com o meio de cultura escolhido. Para o preparo do meio seguiu-se a instrução do fornecedor, adicionando cerca de 39g/L de BD em H<sub>2</sub>O e 0,39g de extrato de malte. Em seguida foram adicionados aos frascos 5 discos de 5 mm de diâmetro das extremidades da colônia. O material permaneceu estático, sob temperatura controlada de 25°C. Após o período de fermentação, os metabólitos secundários foram extraídos conforme descrito no FLUXOGRAMA 1 abaixo.



FLUXOGRAMA 1 - Procedimento para a extração dos metabólitos do fungo *C. inaequalis*, crescidos em meio de BD

#### 4.5 Isolamento e identificação dos metabólitos da parte líquida- Fração Acetato de Etila (FAE).

O extrato da fração acetato de etila foi solubilizado em 5 mL de MeOH, e uma alíquota de 500µL foi transferida para Eppendorfs e seca em capela de circulação de ar. Essa alíquota foi analisada por RMN, e em seguida seca e ressuspendida em H<sub>2</sub>O/ACN (9:1). Análises do perfil químico foram feitas em um HPLC-UV, com coletor automático. O suporte cromatográfico para a separação em fase reversa de eluição foi feito coluna C18- zorbax eclipse- XDB- analytical 4.6 X 150 mm 5 microm, com aplicação de 20 µL do extrato em uma concentração de 8mg/mL e a temperatura

controlada a 40°. A condição cromatográfica com as fases H<sub>2</sub>O (A)/ACN(B) acidificadas com 0,1 % de ácido fórmico, obtida após a otimização, está descrita abaixo. O comprimento de onda monitorado no UV foi o 254nm.

TABELA 1- Condição cromatográfica obtida para análises da fração acetato de etila (FAE) do extrato do fungo *Curvularia inaequalis* crescido em meio líquido.

| <b>Tempo (min)</b>          | <b>0</b> | <b>5</b> | <b>17</b> | <b>33</b> | <b>35</b> | <b>38</b> | <b>39</b> | <b>42</b> |
|-----------------------------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| <b>% A (H<sub>2</sub>O)</b> | 80       | 80       | 60        | 30        | 0         | 0         | 80        | 80        |
| <b>% B (ACN)</b>            | 20       | 20       | 40        | 70        | 100       | 100       | 20        | 20        |

A fração obtida foi submetida ao processo de separação em fase sólida SPE em cartuchos C18 (6ml) Octadecil- 500mg, Chromabond®, sob vácuo em Manifold. Os cartuchos de SPE foram condicionado com 12 mL de ACN, em fluxo constante de 1 gota/30seg.

Aproximadamente 50 mg do extrato solubilizados em 6 mL de uma mistura de H<sub>2</sub>O/ACN, na proporção 8:2 foi aplicado ao adsorvente. Após a retenção dos metabólitos na fase estacionária, iniciou-se a eluição em 3 etapas: 95% de H<sub>2</sub>O(A) e 25% MeOH (B) (6ml), seguidos das respectivas proporções em volumes de 6 mL; 50%(A) 50%(B), e 100% de MeOH. As 4 subfrações geradas foram secas em capelas de circulação de ar e ressuspensos em solventes deuterados para serem analisadas por RMN. Esse procedimento foi repetido por duas vezes para a obtenção de uma maior quantidade de massa.

A subfração 3, extraída com 50%(A) 50%(B) foi submetida a uma nova extração em SPE com cartucho de C18 (3mL) Octadecil- 50mg. Aproximadamente 15 mg dessa fração foi aplicada ao cartucho e eluídos com os seguintes sistemas de solventes 55% A e 45%B (1) 50%A e 50B% (2), 45%A e 55%B(3) 35%A e 75%B (4), 100%B (5). As amostras obtidas foram secas, e ressuspensas em solvente deuterado para serem analisadas por RMN.

## 4.6 Isolamento e identificação dos metabólitos do Micélio- Fração EtOH

O extrato do micélio obtido após extração com etanol foi concentrado em rotaevaporadores e os compostos de interesse separados em colunas de fase normal ( $h= 35\text{cm}$ ;  $\varnothing= 2\text{cm}$ ), utilizando como suporte cromatográfico Sílica gel e gradiente de eluição com AcOEt, AcOEt/DCM, MeOH. As frações resultantes dessa separação foram monitoradas em plaquinhas de CCD. Após reunidas, as frações foram secas e ressuspensas em solventes deuterados para serem analisadas e identificadas por RMN.

## 4.7 Difração de Raios-X da substância M1

A substância M1 foi purificada com acetona, em filtros de papel, para a obtenção de cristais de tamanho e qualidade requerida para a análise. Para o experimento de raios-X, utilizaram-se os difratômetros NONIUS KAPPA CCD e o APEX DUO, ambos utilizando radiação da linha K alpha do molibdênio ( $0,71073 \text{ \AA}$ ) monocromada por grafite, seguido das etapas de integração das mesmas, redução dos dados, resolução e refinamento das estruturas. Os dados de difração foram tratados por programas cristalográficos específicos, sendo empregado o pacote de programas do WINGX (45) para a análise dos dados. As estruturas foram resolvidas usando os métodos diretos, com o programa SHELXS-97 (46), os modelos obtidos foram refinados (mínimos quadrados de matriz completo) em F2 usando o programa SHELXL-97. Para a elaboração e análise das representações gráficas das estruturas foram usados os programas ORTEP-3 (47) e Mercury 2.0 (48).

## 4.8 Síntese dos complexos metálicos

### 4.8.1 Síntese do complexo precursor *cis*-[Pt(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>]

O precursor de platina foi sintetizado como descrito na literatura (VILARREAL, 2017) onde 970 mg de PPh<sub>3</sub> (3,70 mmol) foram adicionados em 50 mL de metanol e colocada em refluxo, sob atmosfera inerte até completa solubilização. Posteriormente foi desligado o aquecimento, em seguida, foram adicionados 750 mg de K<sub>2</sub>[PtCl<sub>4</sub>] (1,81 mmol) e 120 mL de diclorometano. A solução foi colocada em agitação por 30 min, posteriormente adicionando-se 20 mL de água destilada. A mistura foi mantida em

refluxo por 24 horas. A mistura foi concentrada e obteve-se um precipitado de cor branca, que foi lavado com hexano e éter dietílico e finalmente secou-se sob vácuo.

#### **4.8.2 Síntese do complexo precursor $[\text{Ag}(\text{PPh}_3)_2]\text{BF}_4$**

O precursor de prata foi sintetizado como descrito na literatura (BACHMAN, 1998), onde 238 mg de  $\text{AgBF}_4$  (1,22 mmol) foram solubilizados em 20 mL de acetonitrila, posteriormente se adicionou uma solução de 664 mg de  $\text{PPh}_3$  (2,45 mmol) em 40 mL de acetonitrila. A mistura se colocou em agitação durante 15 minutos, e em seguida foi deixada em repouso por duas horas, posteriormente o solvente foi eliminado, obtendo um óleo amarelo o qual foi dissolvido em 20 mL de diclorometano, seguidamente foram adicionados 35 mL de hexano e a solução foi armazenada na geladeira por 48 horas. Após este tempo foram obtidos cristais brancos os quais foram lavados com éter dietílico e secou-se sob vácuo.

#### **4.8.3 Síntese dos complexos com os aminoácidos L- Ácido Piroglutâmico (M1) e L-Prolina.**

Foram solubilizados 0,10 mmol da substância L-ácido piroglutâmico (M1) em 15 mL de metanol, posteriormente foi adicionada uma solução de 0,20 mmol de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  em 5 mL de metanol, após 5 minutos de agitação foram acrescentados 0,10 mmol do respectivo precursor metálico, a mistura foi agitada durante 24 horas, finalmente o solvente foi eliminado e o sólido obtido secou-se sob vácuo. No caso dos complexos de platina foi adicionado 0,10 mmol de  $\text{KPF}_6$  previamente á eliminação do solvente. O mesmo procedimento foi realizado para o aminoácido L-prolina.

## 5. Resultados e discussões

### 5.1 Reativação do fungo *Curvularia inaequalis* e o crescimento em diferentes meios de cultivo.

O fungo *Curvularia inaequalis* (CUI) foi reativado em meio de batata-dextrose e ágar e mantido a 30°C e fotoperíodo 12/12 por 7 dias. Apresentou coloração micelial negra-acinzentada e aspecto feltroso conforme o esperado para a espécie. (MANAMGODA ET AL. ,2012) Os conídios demonstrados na FIGURA em formato elipsóide apresentaram coloração marrom com ~4 septos transversais, foram comparados com a literatura e confirmaram a morfologia de CUI (MANAMGODA et al.,2012; AMARADASA E AMUNDSEN 2013; FURTADO, 2007).

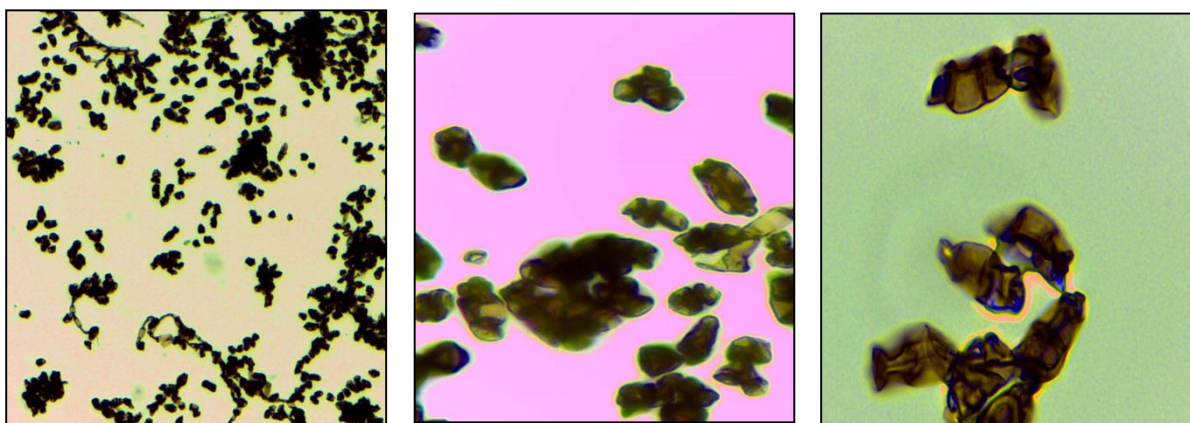


FIGURA 2- Imagens microscópicas dos conídios do fungo *Curvularia inaequalis* ; ampliações 40, 100 e 400x.

Visando obter a produção de metabólitos secundários diversificada, selecionaram-se diferentes meios de cultivo, BDA, BDG5, BDG1, CZA, BDL e BDM para serem testados. O desenvolvimento do fungo nesses meios foi acompanhado e área do micélio foi calculada em diferentes dias conforme demonstrado na FIGURA e 4

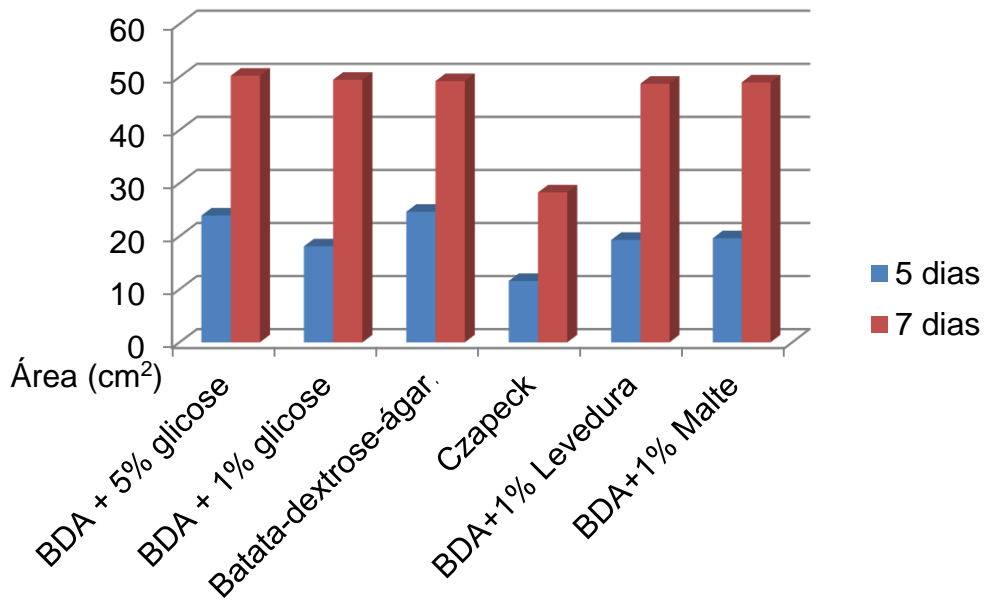
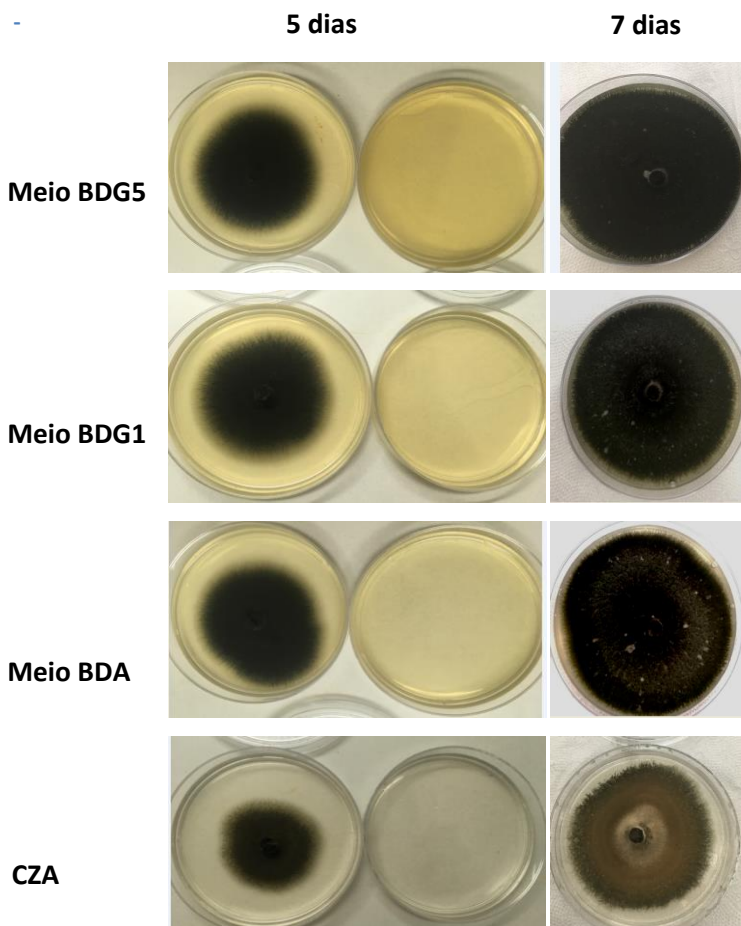


FIGURA 3-Gráfico do crescimento micelial do fungo *Curvularia inaequalis* cm<sup>2</sup>/dias em diferentes meios de cultivo





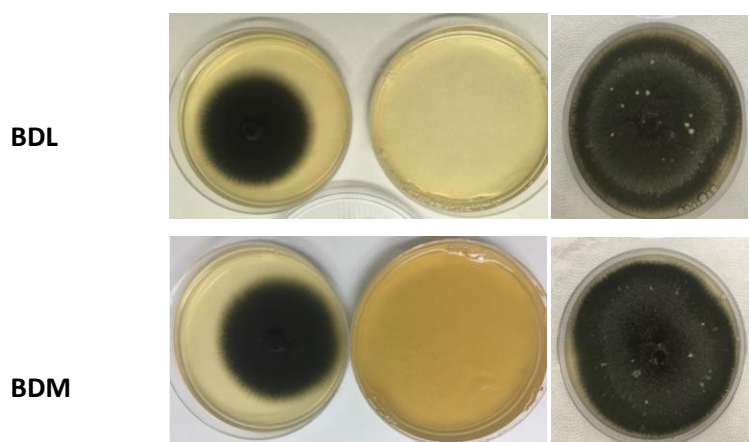


FIGURA 40- Fotos do crescimento do fungo *Curvularia inaequalis* nos meio de cultivo de batata-dextrose-ágar (BDA) + 5% de glicose, BDA +1% de glicose, BDA, Czapeck+ágar, BDA+1% de extrato de levedura, BDA+1% de extrato de malte, e seus respectivos brancos, monitorados em 5 e 7 dias respectivamente.

O crescimento de CUI é bastante acelerado se o compararmos com o fungo sapróbio *Stachybotrys levisporous*. Em cinco dias podemos notar um bom desenvolvimento do fungo em quase todos os meios, com exceção para o meio de Czapeck que apresentou um crescimento de 50% mais lento comparado aos demais, que apresentaram médias de 21,10 cm<sup>2</sup>. O mesmo padrão se repete para o crescimento do fungo em 7 dias. Em praticamente todos os meios de cultivo, o fungo atinge o crescimento máximo, duplicando a área micelial em apenas 2 dias. Para o meio de Czapeck, houve um aumento de mais de 60% em relação ao 5º dia, porém se comparado aos demais foi o meio em que o fungo menos se desenvolveu. A coloração negra com aspecto aveludado é mais pronunciada para os meios de BDG5, BDG1 e BDA. Os meios de BDL e BDM apresentam coloração mais cinzenta com pontos brancos, enquanto CZA apresentou tons terrosos mais claros. Em relação ao aspecto físico, todos os meios, com exceção de CZA, apresentaram desenvolvimento satisfatório em 5 e máximo em 7 dias. No entanto, para avaliar o meio em que há a maior produção de metabólitos secundários, foram feitas as análises do perfil químico de cada suplementação no período em que o fungo atinge crescimento máximo (7 dias). Os metabólitos de interesse foram extraídos conforme apresentado na seção 4.2 com uma mistura de solventes AcOEt/DCM/MeOH, com a finalidade de se obter uma maior variabilidade de compostos e verificar qual o meio mais promissor para os experimentos posteriores em escala ampliada.

## 5.2 Análises do perfil químico do fungo *Curvularia inaequalis* em diferentes meios de cultivo - Escala analítica.

Os extratos preparados em escala analítica foram analisados em UPLC-DAD e para certificar que os metabólitos encontrados em cada meio eram produzidos pelo fungo e não provenientes do meio de cultivo, foi feito um comparativo entre os extratos e seus respectivos brancos, conforme demonstrados nos cromatogramas das FIGURAS 4- 9 abaixo,

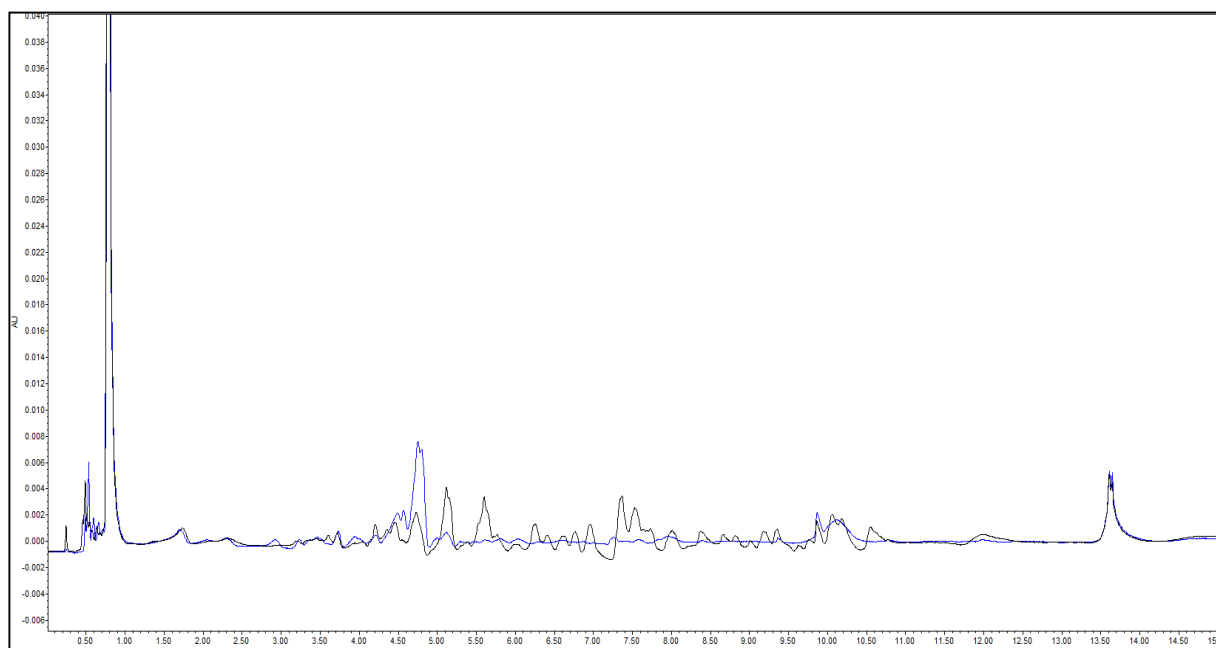


FIGURA 41- Sobreposição do perfil químico do micro-extrato do fungo *Curvularia inaequalis* crescido em meio de cultivo batata-dextrose-ágar + 5% de glicose (em preto), e o controle (em azul)- 254nm

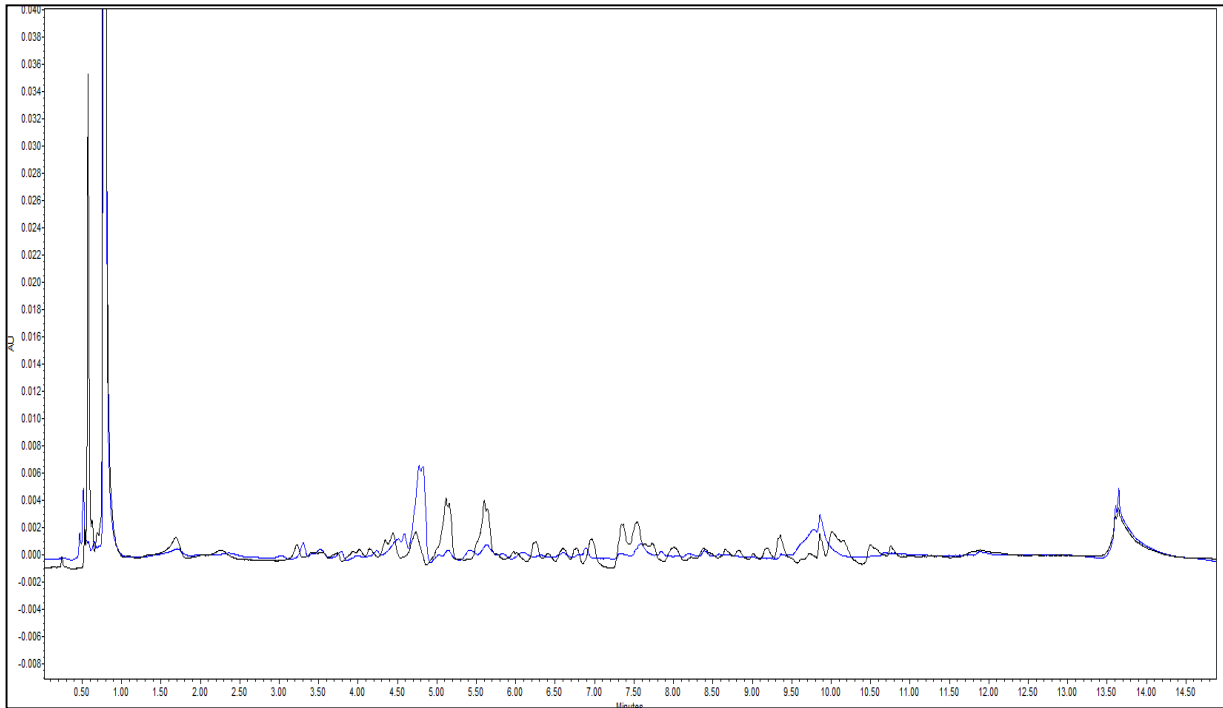


FIGURA 42 Sobreposição do perfil químico do micro-extrato do fungo *Curvularia inaequalis* crescido em meio de cultivo batata-dextrose-ágar + 1% de glicose (em preto), e o controle (em azul)- 254nm

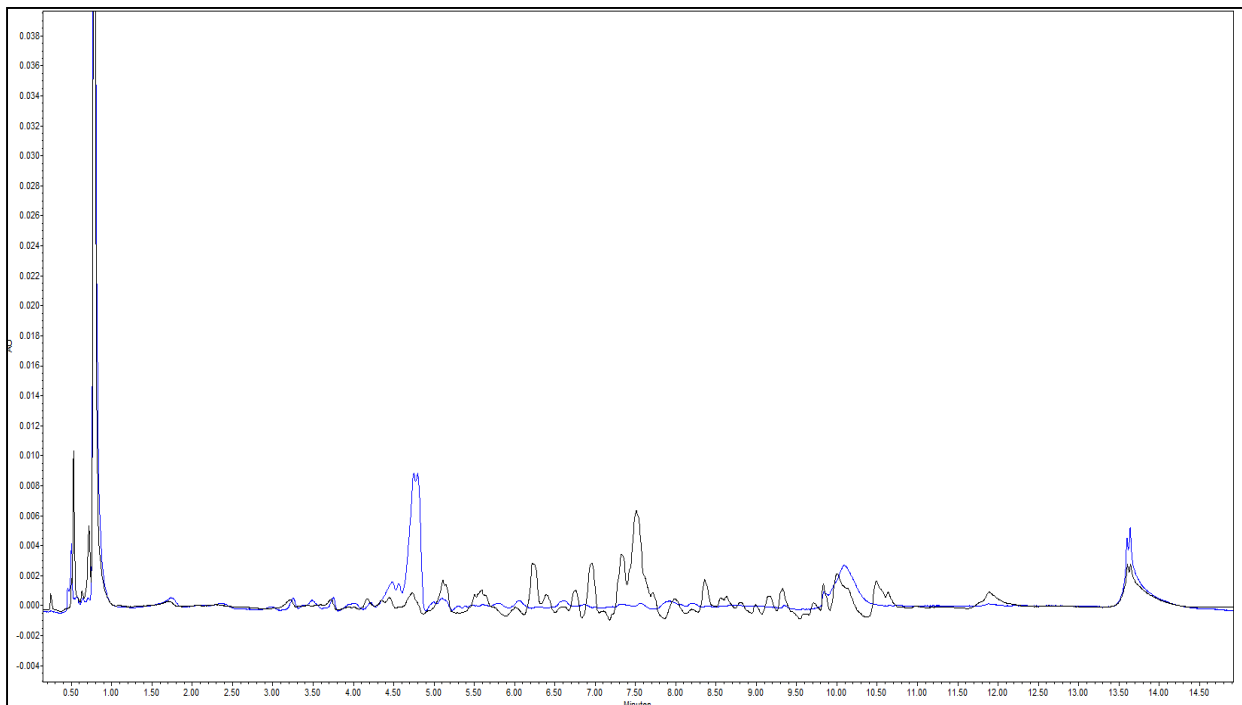


FIGURA 43 - Sobreposição do perfil químico do micro-extrato do fungo *Curvularia inaequalis* crescido em meio de cultivo batata-dextrose-ágar (em preto), e o controle (em azul)- 254nm

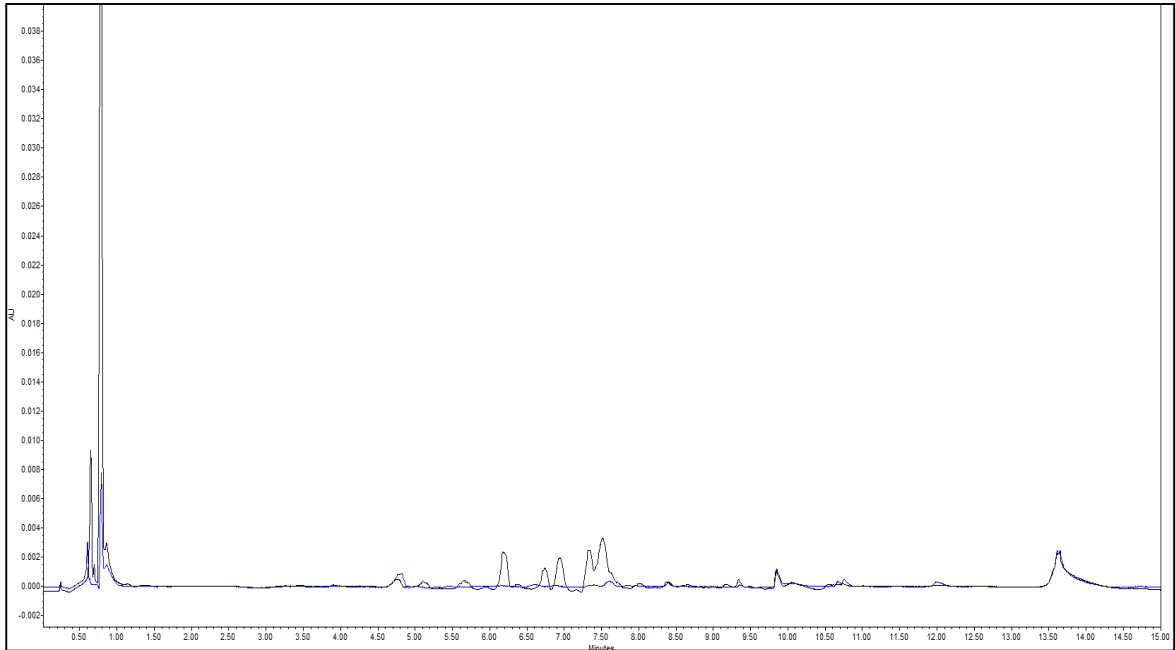


FIGURA 44 - Sobreposição do perfil químico do micro-extrato do fundo *Curvularia inaequalis* crescido em meio de cultivo Czapeck-ágar (em preto), e o controle (em azul)- 254nm

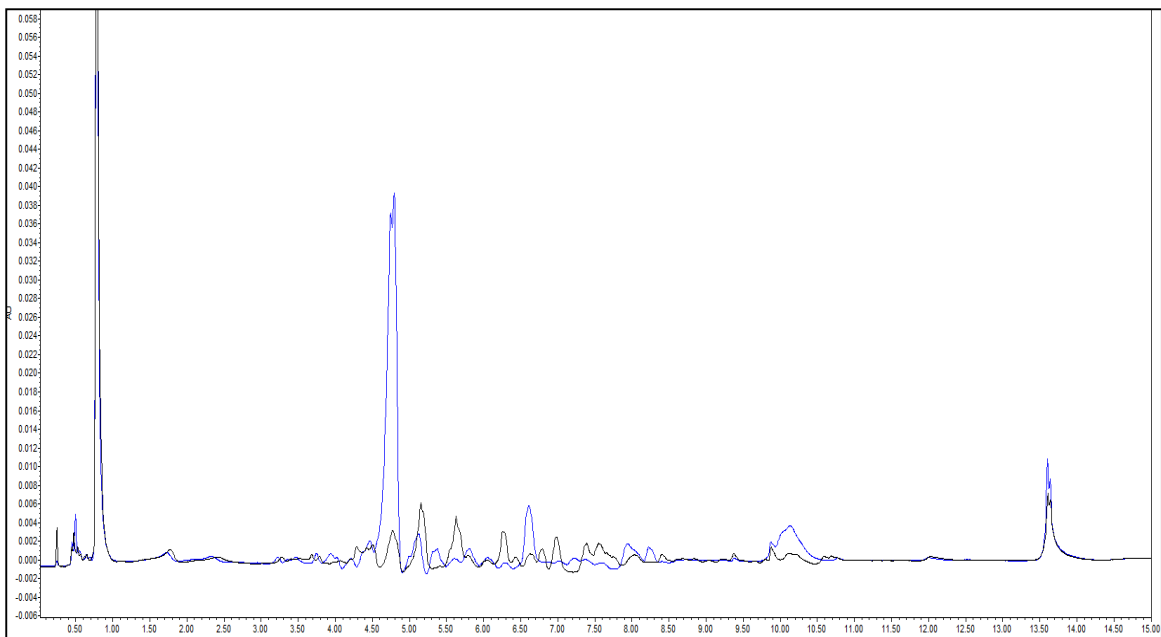


FIGURA 45- Sobreposição do perfil químico do micro-extrato do fundo *Curvularia inaequalis* crescido em meio de cultivo batata-dextrose-ágar + 1% extrato de levedura (em preto), e o controle (em azul)- 254nm

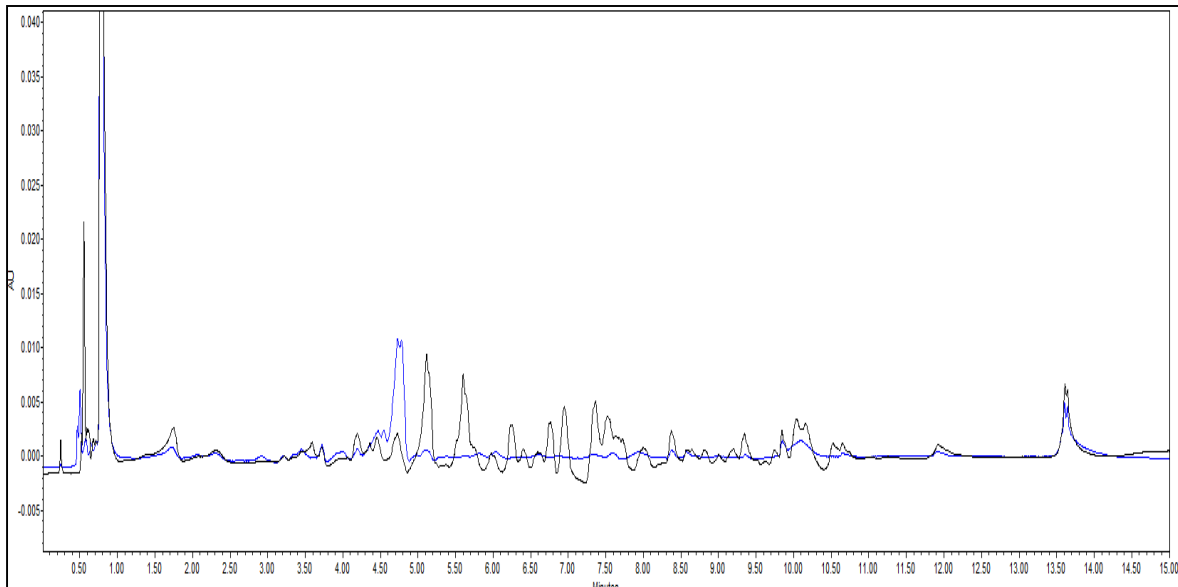


FIGURA 46- Sobreposição do perfil químico do micro-extrato do fundo *Curvularia inaequalis* crescido em meio de cultivo batata-dextrose-ágar + 1% extrato de malte (em preto), e o controle (em azul)

O perfil químico de CUI demonstrou ser bastante similar em todas as variações feitas no meio de cultivo. Nota-se pouca diferença entre os meios com fungo e seus respectivos controles. As bandas de absorção mais relevantes encontram-se no intervalo de t.r de 5,0-8,0 min, com destaque para duas de maior absorção no t.r 5,0 e 5,5 min presentes apenas nas amostras de BDG5, BDG1, BDL e BDM. O perfil químico de Czapeck, apesar de apresentar algumas bandas similares aos demais, foi o que apresentou as intensidades de absorção mais baixas. BDG5 e BDG1 apresentaram perfil idêntico, apesar de serem suplementados em proporções diferentes. O meio que mais apresentou o maior número de bandas que poderia representar toda a amostragem foi o suplementado com malte, e o escolhido para experimento em escala ampliada.

### 5.3 Crescimento em escala ampliada de *Curvularia inaequalis*

O experimento em escala ampliada do fungo em meio de BDM foi feito em meio líquido por apresentar melhores condições de se obter uma quantidade maior de substâncias. No total foram produzidos 20L de meio de cultivo (40 Erlenmeyer), com a obtenção de ~ 200 mg de extrato oriundos da parte líquida e ~120mg da extração do micélio que foram separados e analisados de formas diferentes.

### 5.3.1 Isolamento e identificação dos metabólitos da parte líquida- Fração Acetato de Etila (FAE).

A fração acetato de etila- FAE, apresentou sinais intensos e bem definidos na região aromática  $\delta_H$  6.0-8.0 no espectro de RMN  $^1H$ . Sinais mais conturbados na região de deslocamento químico  $\delta_H$  3.0-4.0, característicos de açúcares provenientes do meio, se repetem para o controle. Assim, dentre os espectros das frações obtidas após a partição líquido-líquido, foi o que exibiu melhores condições de trabalho, por não ser apresentar um espectro tão complexo e portanto, a fração escolhida para ser estudada.

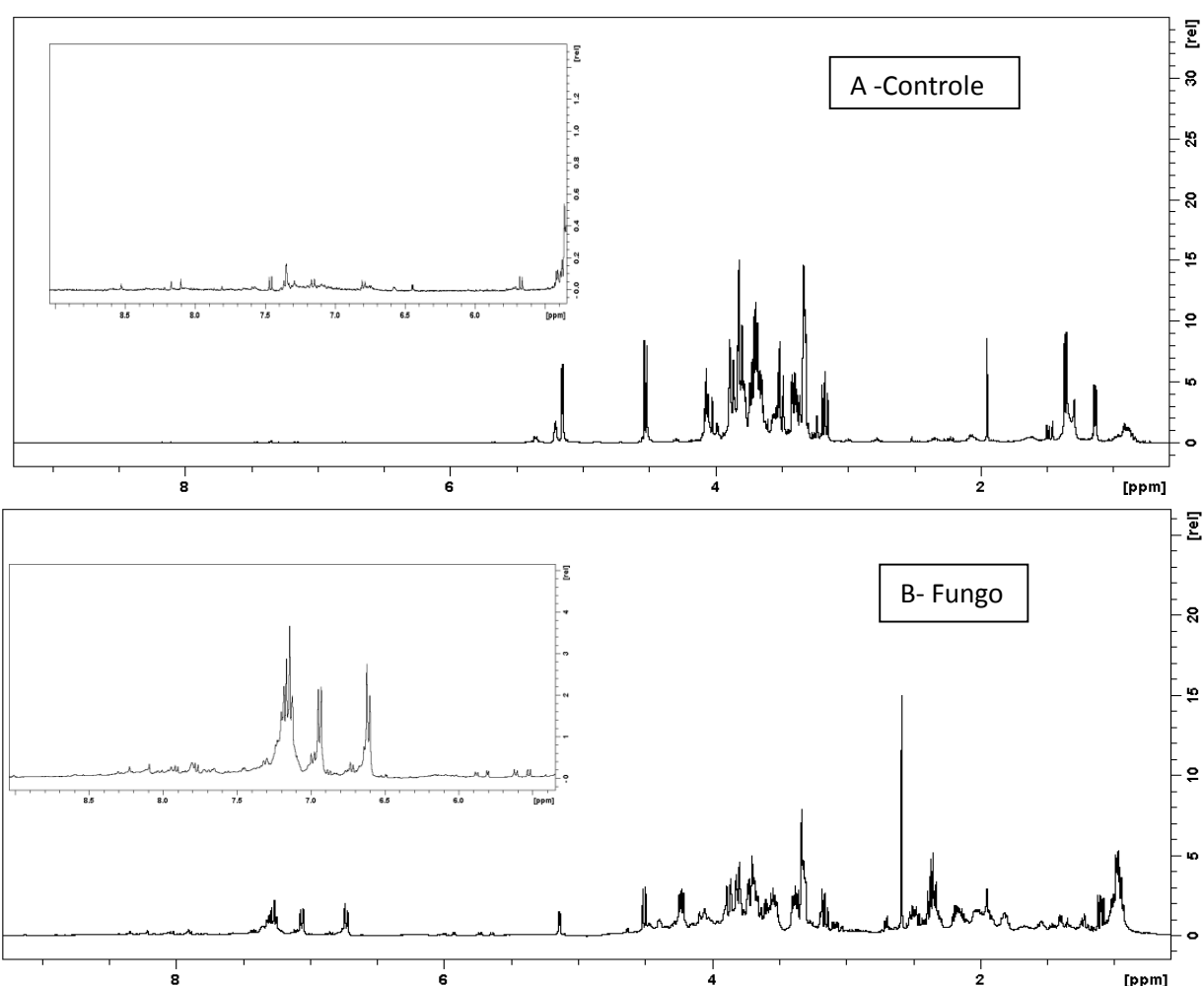


FIGURA 47 Espectros de RMN  $^1H$  da fração acetato de etila -FAE, obtida a partir da partição líquido-líquido; A- Controle (meio de cultivo sem o crescimento do fungo), B-) Crescimento de *Curvularia inaequalis*, CDCl<sub>3</sub> -400MHz

FAE também foi analisado por HPLC-UV, e o cromatograma obtido apresentam bandas ao longo de toda a corrida cromatográfica. No entanto, nota-se forte similaridade com o controle, porém 3 bandas interessantes no intervalo de t.r 22.0-26.0 min foram encontradas para o meio com o crescimento do fungo ausente no meio controle.

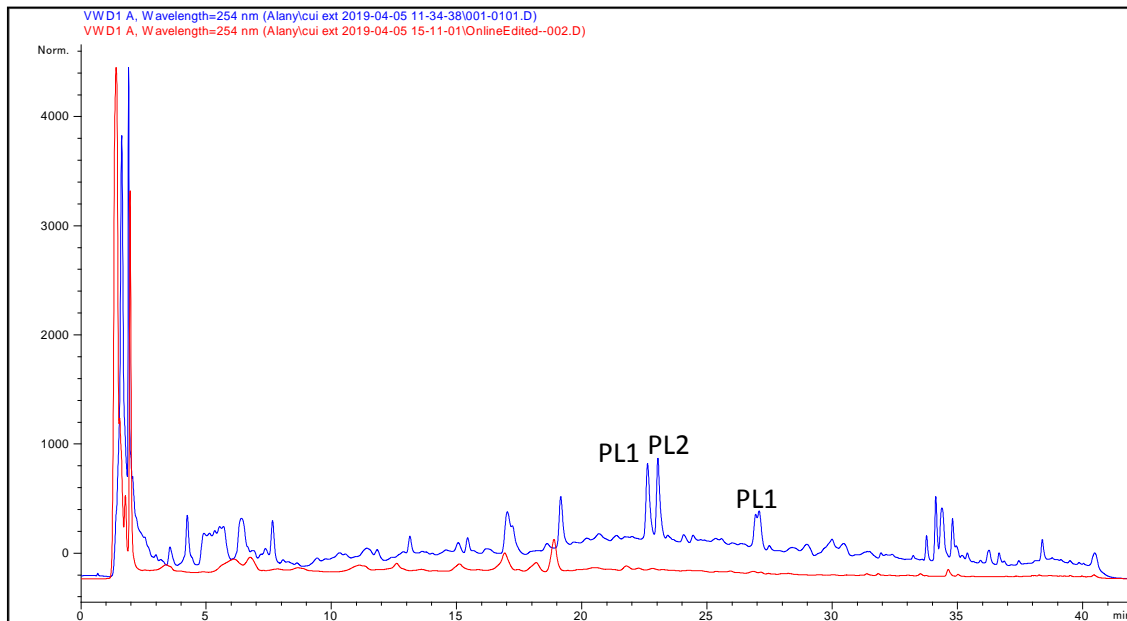


FIGURA 48- Sobreposição do perfil químico do extrato do fungo *Curvularia inaequalis* crescido em meio de cultivo líquido batata-dextrose-ágar + 1% extrato de malte (em azul), e o controle (em vermelho).

Para o isolamento das substâncias de interesse, o procedimento de extração em fase sólida com cartuchos de SPE foi proposto com 3 diferentes misturas de solvente. Para a primeira eluição com solvente (95:5 A:B) era esperado que houvesse a retirada dos compostos mais polares que ainda ficaram retidos após a aplicação da amostra, como por exemplo os açúcares citados anteriormente e que não interagem com o suporte C-18. A segunda, eluição e a de maior interesse (1:1 A:B), seria a mesma proporção encontradas pelo HPLC-UV para a eluição das 3 bandas. A retirada dos compostos retidos no suporte e com maior afinidade em solvente orgânico seriam eluídos com 100% MeOH. As 4 subfrações obtidas e nomeadas F1-F4

respectivamente (FIGURA 13), por esse processo apresentam coloração diferentes, o que indica que houve uma separação dos compostos.

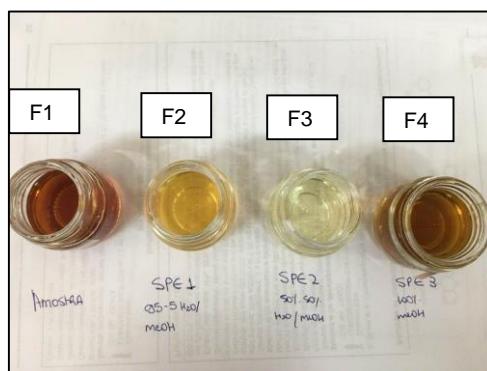


FIGURA 49- Frações obtidas após o processo de extração em fase sólida do extrato acetato de etila (FAE)

O rendimento de cada subfração obtida a partir de 50mg de extrato seco está demonstrado na TABELA abaixo.

TABELA 2- Rendimento das subfrações obtidas após o processo de extração em fase sólida (SPE) do extrato de acetato de etila

| <b>Subfração</b> | <b>Peso da fração seca (mg)</b> | <b>Rendimento (%)</b> |
|------------------|---------------------------------|-----------------------|
| <b>F1</b>        | 17,8 mg                         | 35,6                  |
| <b>F2</b>        | 9,3 mg                          | 18,6                  |
| <b>F3</b>        | 6,2 mg                          | 12,4                  |
| <b>F4</b>        | 13,1 mg                         | 26,2                  |

Podemos notar que F3 (FIGURA 50), apesar de apresentar rendimento baixo (~12%) em relação às outras exibe sinais bem definidos no espectro de RMN FIGURA 50. Os valores das integrais, apontam para presença de pelo menos 3 substâncias.



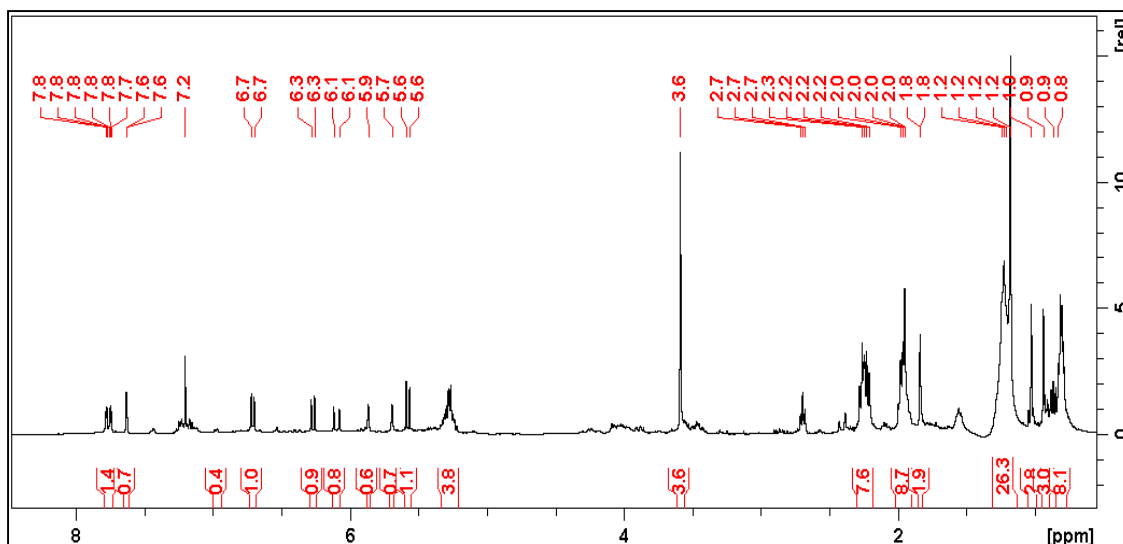


FIGURA 50- Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de F3 obtida após extração em fase sólida SPE da fração acetato de etila – Eluição com 50%  $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ -  $\text{CDCl}_3$  (400MHz)

O procedimento foi repetido para o extrato remanescente, com a finalidade de se obter maior massa dessas 3 substâncias. Aproximadamente 15mg da mistura desses compostos foi obtida. Para facilitar a discussão dos resultados, nomeou-se as bandas cromatográficas do extrato acetato de etila da partição líquido-líquido de PL1, PL2 e PL3 em ordem crescente de eluição respectivamente.

À medida que as substâncias apresentam t.r diferentes, ou seja, PL1 apresenta diferença de 0.5 min. para o t.r de PL2 e 4 min. para PL3, optou-se por realizar uma nova extração em SPE, porém em escala menor (Cartuchos C18 50mg) vide seção 4.5; as amostras foram secas e analisadas por RMN.

Analisando os espectros de RMN obtidos da fração 50% 50%A/B- 2 (FIGURA 51) 45%65 A/B -3 (FIGURA 52) 35% 75%A/B -4 (FIGURA 53), podemos notar que obtivemos sucesso na separação de PL1 e PL3 através da mistura de solventes 2 e 4 respectivamente, porém em 3 nota-se a presença de PL1 e PL2 em mistura. A determinação estrutural das substâncias em questão estão discutidas a seguir.

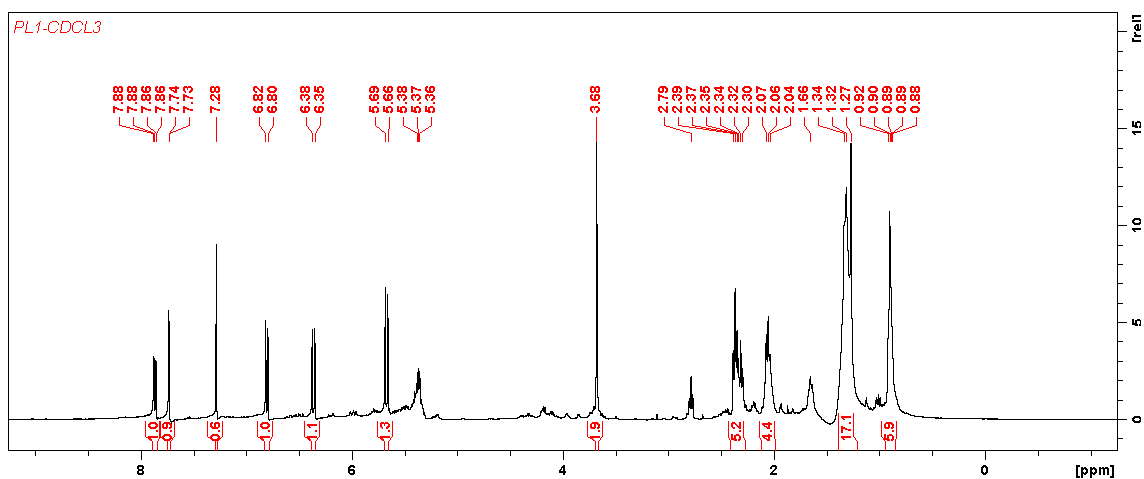


FIGURA 51- Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da subfração 2 obtida após extração em fase sólida SPE em pequena escala da fração acetato de etila – Eluição com 50% 50% $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}-\text{CDCl}_3$  (400MHz)

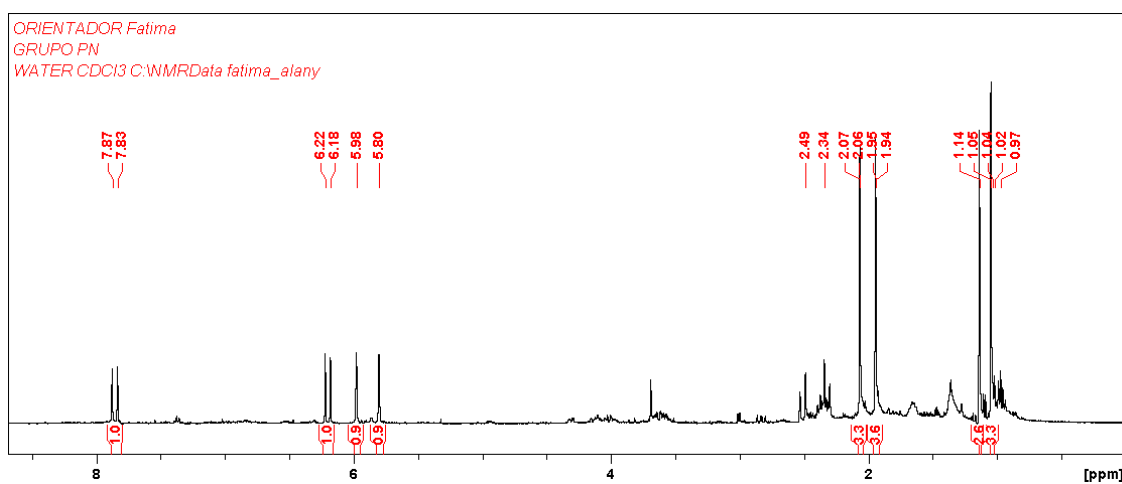


FIGURA 52 Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da subfração 4 obtida após extração em fase sólida SPE em pequena escala da fração acetato de etila – Eluição com 45% 65% $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}-\text{CDCl}_3$  (400MHz)



hidrogênios vinílicos H-1' e H-2' do anel pirano exibem sinais com deslocamento químico em  $\delta_H$  5.69, d,  $J=6.88$  Hz e 6.28 d  $J=6.88$ Hz, ambos confirmado pelo acoplamento no COSY . Os dados obtidos foram comparados com os da literatura (ABRAHAM, 1990), onde foi possível identificar a substância PL1 como sendo o ácido anofínico.

Ao analisarmos o conjunto de sinais minoritários, nota-se forte semelhança entre a estrutura PL1 e PL2. No entanto, observa-se valores de carbonos diferentes para C1'-C2', com deslocamentos de  $\delta_c$  57.3 e 65.6 respectivamente, sugerindo o desaparecimento da insaturação e a substituição por dois grupos *trans*-hidroxilas. A junção dos sinais obtidos pelo espectro de RMN  $H^1$ , HSQC HSQC (ANEXO I, FIGURAS 5.1.1-5.15) reunidos na TABELA foram comparados com os dados disponíveis na literatura (ABRAHAM, 1990), e atribuído ao ácido 3,4-*trans*- di-hidroxi-anofínico

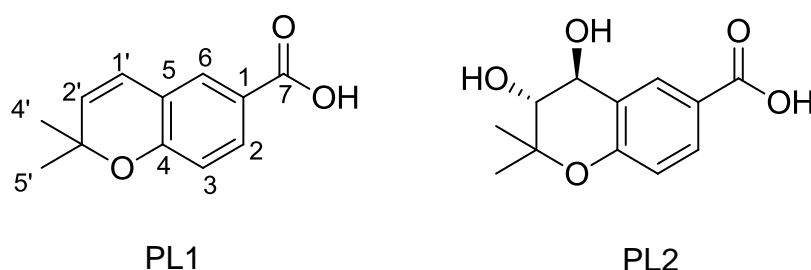


FIGURA 54- Estrutura química das substâncias PL1 (Ácido Anofínico), PL2 (3,4-*trans*- dihidroxi-anofínico)

Os ácidos anofínico (PL1) e o 3,4-*trans*-di-hidroxi-anofínico (PL2) são cromenos derivados da rota biossintética de policetídeos. PL1 foi isolado pela primeira vez de galhos de *Anodendron affine* (*Apocynaceae*) (Abraham et al. 1990), porém é possível ser encontrado em outras espécies de plantas (Amakura et al. 2016; Lago et al. 2007) e gêneros de fungos (Ióca et al. 2018; Rukachaisirikul et al. 2014; Qin et al. 2011). A atividade biológica reportada para esse composto varia desde antifúngica (Lago et al. 2007; Algida, 1996; Siless et al. 2018; Baldoqui et al. 1999), antibacteriana (Qin et al. 2011), antialgal (Qin et al. 2011) como agente neuroprotetivo contra agregação de peptídeos beta-amilóide (A $\beta$ ) à células neurais que levam à doença de Alzheimer (Kwon et al., 2015), tornando um composto em potencial para ser estudado. PL2 foi sintetizado por Kawase e descrito como produto natural produzido

por *C. fallax* (ABRAHAM, 1990; ALGIDA, 1996). Embora já tenham sido reportados para o gênero *Curvularia*, PL1 assim com PL2 são reportadas pela primeira vez para a *C. inaequalis*.

TABELA 3- Dados de RMN  $^1\text{H}$  (400MHz) e  $^{13}\text{C}$  (133MHz) obtidos para as substâncias PL1 e PL2, em  $\text{CDCl}_3$

| N° | PL1                      |                 | PL2                           |                 |
|----|--------------------------|-----------------|-------------------------------|-----------------|
|    | $^1\text{H}$ (J em Hz)   | $^{13}\text{C}$ | $^1\text{H}$ (J em Hz)        | $^{13}\text{C}$ |
| 1  |                          | 120.4           |                               | 122             |
| 2  | 7.80, dd, $J= 8.5$ e 2.0 | 130.8           | 7.89 dd ( $J= 8,5$ e 2,0; 1H) | 131.2           |
| 3  | 6.73 d, $J= 8.5$         | 115.3           | 6.82 d ( $J= 8,5$ ; 1H)       | 116.9           |
| 4  | NA                       | 156.9           | NA                            | 157.0           |
| 5  | NA                       | 120.6           | NA                            | 120.5           |
| 6  | 7.67, d, $J= 2,0$        | 127.6           | 8,22 d ( $J= 2,0$ ; 1H)       | 132.2           |
| 7  | NA                       | 170.5           | NA                            | 170.1           |
| 1' | 6.28, d, $J= 9.88$       | 120.7           | 5,10 d ( $J= 9,88$ ; 1H)      | 57.3            |
| 2' | 5.69, d, $J= 9.88$ ;     | 130.2           | 4,15 d ( $J= 9,88$ ; 1H)      | 65.5            |
| 3' | NA                       | 78.7            | NA                            | 80              |
| 4' | 1,61                     | 27.6            | 1,57 s (3H)                   | 18.4            |
| 5' | 1,61                     | 27.6            | 1,32 s (3H)                   | 28.5            |

NA= valores não atribuídos

### 5.3.3 Determinação Estrutural-Substância PL3

Os sinais de RMN  $^1\text{H}$  da substância PL3, obtida pela eluição 4 no processo de extração em fase sólida em escala analítica (SPE), exibiram sinais em  $\delta_{\text{H}}$  7.85, d, e  $\delta_{\text{H}}$  6.19 d, com acoplamento entre si de  $J=16$  Hz, referentes a H-4 e H-5 respectivamente. O alto valor da constante de acoplamento e o deslocamento químico desblindado desses hidrogênios indicam a presença de uma ligação *trans*-vínica. O experimento de HMBC (APÊNDICE 1- FIGURA S1 9) apresentou acoplamento  $^2\text{J}_{\text{C-H}}$  entre  $\delta_{\text{H}}$  7.85 e  $\delta_{\text{C}}$  79.7 (C-1'). Ao analisarmos o experimento de HSQC (APÊNDICE 1- FIGURA S1 8) nenhum hidrogênio possuiu correlação com o C-1', atribuindo-se a esse sinal, um carbono quaternário ligado um substituinte hidroxila. Ainda pelo

experimento de HMBC, sinais de duas metilas vicinais a C-1' foram atribuídas a  $\delta_H$  1.04 e 1.03. Sinais de hidrogênios diastereotópicos  $\delta_H$  2.49, d,  $J=16$  e 2.34 d,  $J=16$  ligados ao carbono C-5' foram atribuídos à H-5a e H-5b. Vizinho a esse sistema, atribuí-se o carbono carbonílico (C-4') ao sinal  $\delta_C$  197.6. Adicionalmente, o HMBC apresenta o acoplamento do hidrogênio H-3'  $\delta_H$  5.98, à  $^2J_{C-H}$  com C-4'. A multiplicidade singlete e o valor de deslocamento químico que esse sinal exibe, indicam para a presença de um próton em um sistema olefínico trissubstituído. Ao substituinte metila da ligação insaturada atribuí-se o sinal  $\delta_H$  2.03, que se correlaciona com (C-4'), e, portanto atribuí-se a esses sinais um sistema carbonílico  $\alpha$ ,  $\beta$ - insaturado. Os sinais  $\delta_H$  2.35, s e  $\delta_H$  5.80 foram atribuídos a um outro sistema insaturado conjugado a H-5. A presença de um grupo carboxílico vicinal a H-2 foi proposta através do acoplamento  $^2J_{C-H}$  com o C-1 em  $\delta_H$  169.0. Os sinais foram reunidos na TABELA e comparados com a literatur (MILBORROW, 2015) o qual foi possível atribuir à estrutura PL3 o ácido abscísico (ABA)

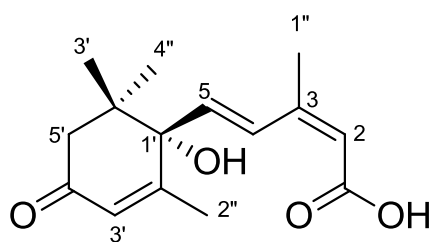


FIGURA 55-Estrutura química da substância PL3- Ácido Abscísico (ABA)

O ácido abscísico (ABA) é um sesquiterpeno biossintetizado diretamente via *trans*-farnesil pirofosfato pelo caminho do mevalonato em fungos, e em plantas é resultado da clivagem de  $\gamma$ -carotenóides em múltiplas etapas (HIRAI ET AL.,2005). ABA é um fitohormônio que desempenha papel regulatório e sinalizar dos processos bioquímicos de desenvolvimento e adaptação do vegetal, os quais incluem o estado de dormência, germinação e respostas contra stress causado por fatores bióticos e abióticos (SPENCE et al. 2015; ALAZEM e LIN 2017). Em estágios iniciais de infecção por patógenos nas plantas, por exemplo, ABA atua de maneira expressiva, levando ao acúmulo a superexpressão e desencadeando um mecanismo de defesa fechando estômatos contra o invasor (ALAZEM e LIN 2015). Embora apresente muitas funções em plantas, o papel dessa substância em fungos não são muito claras, porém ABA “fúngico” exibe importância indireta como indutor de resistência contra patógenos em

plantas infectas pelos micro-organismos produtores dessa substância.(HARTUNG 2010)

TABELA 4- Dados de RMN  $^1\text{H}$  (400MHz) e  $^{13}\text{C}$  (133MHz) obtidos para a substância PL3, em  $\text{CDCl}_3$

| <b>Substância PL3</b> |  |                                   |
|-----------------------|--|-----------------------------------|
| <b>N°</b>             | <b><math>^1\text{H}</math> (J em Hz)</b> | <b><math>^{13}\text{C}</math></b> |
| 1                     | NA                                       | 169.0                             |
| 2                     | 5.80, s                                  | 118.2                             |
| 3                     | NA                                       | NA                                |
| 4                     | 7.85, d, $J=16.0$                        | 127.3                             |
| 5                     | 6.19, d, $J=16.0$                        | 136.6                             |
| 1'                    | NA                                       | 79.7                              |
| 2'                    | NA                                       | NA                                |
| 3'                    | 5.98, s                                  | 126.6                             |
| 4'                    | NA                                       | 197.6                             |
| 5'                    | 2.49, d, $J=16$ e<br>2.34 d, $J=16$      | 49.9                              |
| 6'                    | NA                                       | 41.0                              |
| 1''                   | 2.04                                     | 18.5                              |
| 2''                   | 2.35                                     | 21.2                              |
| 3''                   | 1.04                                     | 22.5                              |
| 4''                   | 1.03                                     | 23.6                              |

NA= valores não atribuídos

### 5.3.4 Isolamento e identificação dos metabólitos do extrato etanólico do micélio.

A fração obtida após a extração etanólica do micélio apresentou coloração avermelhada e com aspecto bem viscoso. A separação dos metabólitos presentes nessa fração foi feita em coluna de fase normal, empacotadas com sílica 4mm Mesh. Aproximadamente 4 g de extrato solubilizado em H<sub>2</sub>O/MeOH (8:2) foi aplicado no topo da coluna, conforme demonstrado na figura abaixo

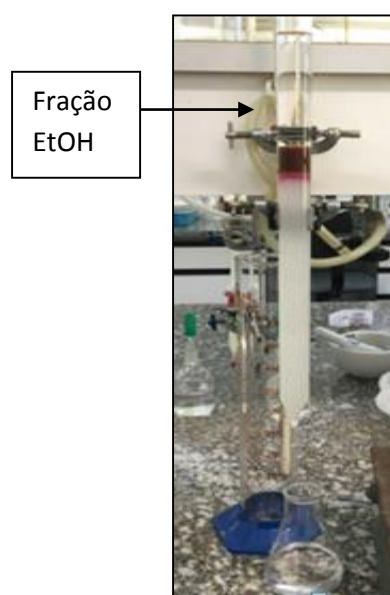


FIGURA 56- Foto da coluna de bancada em fase normal, empacotada com sílica e a aplicação da fração etanólica do micélio.

Iniciou-se a eluição com 100 mL AcOEt, e apenas uma banda de coloração rosa foi observada. A polaridade do solvente foi aumentada para uma mistura de AcOEt/DCM na proporção de 1:1 e não foi observada nenhuma separação. À medida que os solventes foram testados e os compostos não separavam, adicionou-se 100% de MeOH e uma mancha alaranjada bastante intensa e alargada, se destacou e foi coletada. No total foram 7 frações reunidas em frascos de vidro de 50 mL, as quais foram agrupadas através de plaquinhas de CCD por apresentarem apenas 1 mancha.



Essas amostras foram secas e pesadas. Observou-se que nessa fração, com massa ~28mg houve a formação de cristais em formato de agulha FIGURA 57, porém com uma sujeira viscosa.



FIGURA 57- Foto da subfração eluída com 100% e a formação de cristais da substância M1.

Cristais puros foram obtidos lavando a fração com acetona em papel filtro, com massa ~ 23mg. Após a purificação, experimentos de Raios-X foram feitos conforme seção 4.7 e em parceria com os pesquisadores Dr. Javier Ellena- (IFSC-USP) e Dr. Victor Deflon (IFSC-USP), a estrutura de M1 demonstrada na abaixo foi obtida.

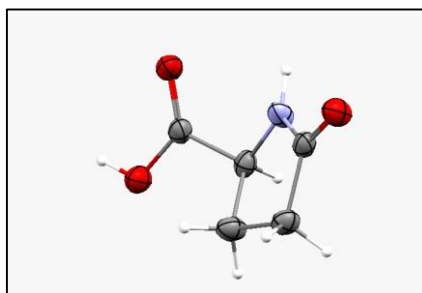


FIGURA 58- Estrutura cristalina da substância 5-Oxoprolina (M1) obtida por difração de Raio-X

A substância M1 obtida da extração do micélio de CUI, e também conhecida com ácido piruglutâmico, é um aminoácido ciclizado e derivado da L-glutamina. Estudos *in vitro*, apontam que esse composto apresenta atividade antifúngica contra *Pseudoperonospora cubensis* e *Phytophthora infestans* com valores  $IC_{50}$  de 9.48 e 10.82  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente, e próximos aos controles com fungicidas comerciais sistêmicos. Além disso, ensaios *in vivo* exibiram efeitos positivos de proteção e tratamento contra *P.cubensis*, com destaque para o efeito de tratamento com variações ~ 6% acima das médias apresentadas para o controle (ZHU et al. 2018). Outros estudos apontaram que o tratamento de fungos patógenos com esse compostos pode chegar a inibição de micotoxinas à níveis transcricionais (BILSKA et al. 2018). Atividade antibacteriana contra *B. subtilis*, *Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Klebsiella*

, *Pseudomonas spp.*, (URBANEK et al., 2012; HUTTUNEN, NORO e YANG 1995) e antioxidante também foram reportadas (BILSKA et al. 2018). A junção dos dados da literatura, os obtidos pelos trabalhos SISBIOTA, e a informação química, podemos inferir que assim com as substâncias anteriores, M1 pode influenciar na atividade do fungo CUI e contribuir positivamente como controle biológico alternativo e indutor de resistência em plantas.

#### 5.4 Síntese dos complexos metálicos

O ácido piroglutâmico (APG) apresenta grande potencial biológica, conforme discutido anteriormente. A atividade associada ao tamanho da molécula, altamente funcionalizada (lactama e ácido carboxílico), o torna um produto natural promissor para ser usado para a síntese de novos compostos que aumentem sua bioatividade.

APG, foi isolado em grande quantidade do micélio de CUI, e possui a estrutura bastante similar a L-prolina, diferindo apenas em uma função carboxila da lactama. Optou-se por sintetizar complexos com ambos os aminoácidos para avaliar de maneira qualitativa, o efeito que um grupo funcional adicional traz em relação às propriedades químicas de coordenação e a atividade biológica.

Os complexos foram feitos em parceria com o Dr. Wilmer José Villarreal Peña-PN-UFSCar. Esses compostos foram sintetizados por reações de substituição de dois ligantes cloretos no precursor, do tipo *cis*-[Pt(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>], assim como a incorporação no precursor [Ag(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]BF<sub>4</sub> dos aminoácidos, em agitação durante 24 horas, com um equivalente de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> para desprotonar os aminoácidos. No caso dos complexos de platina foi adicionado um equivalente de KPF<sub>6</sub>, com a finalidade que a molécula de PF<sub>6</sub><sup>-</sup> fique como contra-íon nos complexos catiônicos.

O modo de coordenação dos centros metálicos aos ligantes aminoácidos foram atribuídos baseados nas mudanças nos deslocamentos químicos dos sinais nos experimentos de ressonância magnética nuclear de hidrogênio. Quando comparados os espectros dos ligantes livres (APÊNDICE 1, FIGURA S1 10 e 14) e dos complexos metálicos pode-se observar mudanças nos sinais do grupo NH e o desaparecimento do sinal correspondente ao OH, devido a sua desprotonação para se ligar ao centro metálico. Nos espectros de RMN de <sup>1</sup>H, também são observados os sinais correspondentes aos ligantes fosfínicos presentes nos complexos.

Nos espectros de RMN <sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H} (APÊNDICE 1- FIGURA S1 12, FIGURA S1 17 dos complexos de platina observam-se dois dubletos correspondentes aos átomos de

fósforo presentes nos ligantes fosfínicos os quais apresentam entorno químico diferente, já que tem um átomo de fósforo (Pa) em posição trans ao átomo de nitrogênio do grupo NH dos aminoácidos, e outro átomo de fósforo (Pb), em posição trans ao átomo de oxigênio do grupo carboxilato. Os sinais estão acompanhados por satélites da respectiva multiplicidade com uma intensidade de ~1:4:1 originado pelo acoplamento do núcleo do átomo de  $^{31}\text{P}$ , com o núcleo da  $^{195}\text{Pt}$ . Também se observa um septupletto em -144,5 ppm, que corresponde ao contraíon  $\text{PF}_6^-$ , necessário para neutralizar a carga dos complexos catiônicos. No caso dos complexos de prata (APÊNDICE 1- FIGURA S1 14 e 18), observa-se um singletto correspondente aos átomos de fósforos presentes na molécula, apesar de apresentar dois átomos de fósforo, a geometria tetraédrica presente nos complexos de prata faz com que estes átomos apresentem entorno químico e magnético idêntico.

Comparando os complexos de *cis*-[Pt(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(aminoácido)]PF<sub>6</sub> com os diferentes aminoácidos nota-se nos espectros de RMN  $^1\text{H}$  que os hidrogênios aromáticos do complexo com L-prolina H-b e H-d tendem a deslocar sutilmente para as regiões mais desblindadas do espectro, enquanto que os hidrogênios metílenos presente na estrutura do aminoácido o efeito é contrario. Em APG os hidrodrogênio  $\alpha$  e  $\beta$  carbonila (H-3 e H-4) invertem deslocamento com L-prolina, indicando que a presença da carbonila adicional, tem um efeito retirador de elétrons para esses hidrogênios. A presença do substituinte adicional em APG é ainda mais pronunciada quando analisamos o espectro de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ . Os sinais dos  $^{31}\text{P}$  presente nas estruturas da fosfinas próximas à carbonila apresentam uma variação de 7.9 ppm entre os dubletos de Pa e Pb, enquanto que na prolina a diferente entre eles é apenas de 2.23ppm.

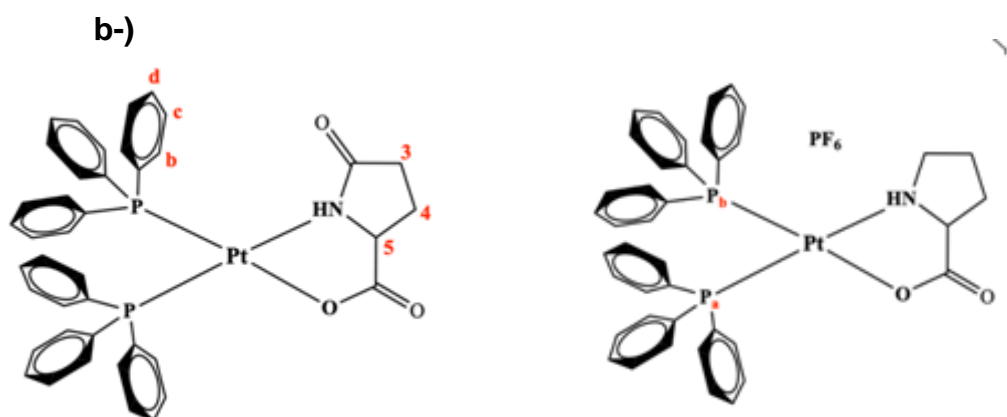


FIGURA 59- Estruturas químicas dos complexos **a-)**  $cis\text{-[Pt(PPh}_3\text{)}_2\text{(APG)]PF}_6$  e **b-)**  $cis\text{-[Pt(PPh}_3\text{)}_2\text{(Pro)]PF}_6$

Comparando os complexos de  $[\text{Ag(PPh}_3\text{)}_2\text{(aminoácido)}]$ , os sinais de RMN  $^1\text{H}$  referentes aos hidrogênios aromáticos e aos metilenos apresentam a mesma característica que o comentado anteriormente, para o aminoácido APG, há uma tendência de retirada de  $e^-$  nos hidrogênios vicinais, enquanto que para os hidrogênios aromáticos o efeito é o contrário. Como comentado anteriormente, a geometria tetraédrica desse complexo faz com que o entorno magnético sejam idênticos, assim comparando os sinais singlete de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ , nota-se que em L-prolina ausência do substituinte faz com que os  $^{31}\text{P}$  fiquem mais desblindados apresentando sinal de  $\delta_{\text{P}}$  8.46 ppm, e para o APG  $\delta_{\text{P}}$  7.37ppm. Esses dados reforçam os previstos pela estrutura química, aonde a presença de um grupo funcional adicional como a carbonila pode afetar todo o entorno magnético, e podem trazer atividades adicionais se comparado com o L-prolina. Para verificar e mensurar a atividade de cada aminoácidos bem como para os seus respectivos complexos, ensaios biológicos contra o células tumorais estão em andamento

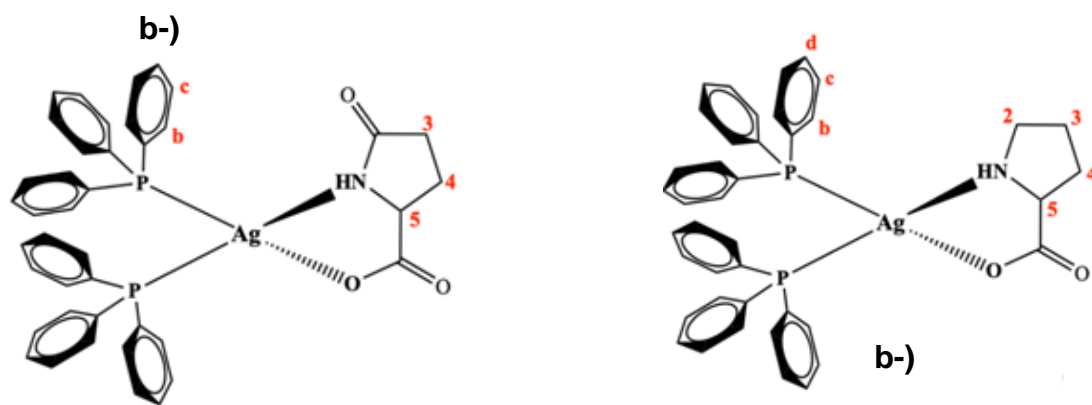


FIGURA 60- Estruturas químicas dos complexos **a-**)  $[Ag(PPh_3)_2(APG)]$  e **b-**)  $[Ag(PPh_3)_2(Pro)]$

## 6. CONCLUSÕES

O estudo químico de *Curvularia inaequalis* demonstrou o potencial que as substâncias produzidas por esse fungo possui no controle biológico e indução de resistência em plantas. Dentre essas substâncias estão dois cromenos, um fitohormônio, um aminoácido.

A avaliação do potencial antifúngico e indutor de resistências em plantas dessas substâncias com enfoque nos trabalhos da rede SISBIOTA está em andamento para verificar se eles possuem especificidade e a influência delas puras e em mistura.

O trabalho desenvolvido com o micélio, permitiu o rápido isolamento do aminoácido 5-oxo-prolina, que apresentam *in sílico* atividade antifúngica. Essa substância foi obtida em grande quantidade e os ensaios contra os fungos patógenos do projeto Sisibiota também estão sendo desenvolvidos.

À medida em que se obteve quantidade considerável desse metabólito, o estudo proporcionou precursores para a sínteses de novos complexos para serem avaliados sob o potencial anticancerígeno, foco de uma segunda linha de pesquisas do grupo.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBEHAUSEN, C.; HEINRICH, T. A.; ABRÃO, E. P.; et al. Chemical, spectroscopic characterization, DFT studies and initial pharmacological assays of a silver(I) complex with N-acetyl-L-cysteine. **Polyhedron**, v. 30, n. 4, p. 579–583, 2011.

ABRAHAM, W.; ARFMANN, H.; WORD, K. HYDROXY- ( METHYLBUTENYNYL ) -BENZOIC FROM CURVULARIA ACID AND DERIVATIVES. **Phytochemistry**, v. 29, n. 8, p. 4–7, 1990.

ABU-ELREESH, G. M.; ABD-EL-HALEEM, D. A; GEETHA, V.; et al. Modiolide and pyrone derivatives from the sea fan-derived fungus *Curvularia* sp. PSU-F22. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 34, n. 5, p. 709–714, 2013.

ALAZEM, M.; LIN, N.-S. Antiviral Roles of Abscisic Acid in Plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 1–10, 2017.

ALAZEM, M.; LIN, N. S. Roles of plant hormones in the regulation of host-virus interactions. **Molecular Plant Pathology**, v. 16, n. 5, p. 529–540, 2015.

ALGIDA, G. Secoiridoids and antifungal aromatic acids from. **Pergamon**, v. 41, n. 1, p. 5–10, 1996.

ALMEIDA, M. A. P. Complexos de rutênio contendo aminoácidos , com propriedades citotóxicas em células tumorais. Dissertação (Mestrado em química)- Universidade Federal de São Carlos, 2009.

AMABLE, L. Cisplatin resistance and opportunities for precision medicine. **Pharmacological Research**, v. 106, p. 27–36, 2016.

AMAKURA, Y.; YOSHIMURA, M.; MORIMOTO, S.; YOSHIDA, T.; TADA, A. Chromatographic Evaluation and Characterization of Components of Gentian Root Extract Used as Food Additives **Chem. Pharm. Bull** , v. 64, n. 1, p. 78–82, 2016.

AMARADASA, B. S.; AMUNDSEN, K. First Report of *Curvularia inaequalis* and *Bipolaris spicifera* Causing Leaf Blight of Buffalograss in Nebraska . **Plant Disease**,

v. 98, n. 2, p. 279–279, 2013.

BACHMAN, R. E.; ANDRETTA, D. F. “Metal–Ligand Bonding in Coinage Metal–Phosphine Complexes: The Synthesis and Structure of Some Low-Coordinate Silver(I)–Phosphine Complexes”. **Inorg. Chem.**, v.37 p.5657-5663, 1998

BAILE. M.; KOLHE N. S.; DEOTARSE, P. P., JAIN A. S.1; KULKARNI A. A. Metal Ion Complex -Potential Anticancer Drug-A Review. **International Journal of Pharma Research & Review IJPRR**, v. 4, n. 48, p. 59–66, 2015.

BALDOQUI, D. C.; KATO, M. J.; CAVALHEIRO, A. J.; et al. A chromene and prenylated benzoic acid from Piper aduncum. **Phytochemistry**, v. 51, n. 7, p. 899–902, 1999.

BERGAMINI, P.; MARVELLI, L.; SPIRANDELLI, G.; GALLERANI, E. Synthesis, characterization and antiproliferative activity of amino- and DMSO complexes of platinum(II) containing l-carnitine. **Inorganica Chimica Acta**, v. 439, n. li, p. 35–42, 2016.

BILSKA, K.; STUPER-SZABLEWSKA, K.; KULIK, T.; et al. Resistance-Related l-Pyroglutamic Acid Affects the Biosynthesis of Trichothecenes and Phenylpropanoids by *F. graminearum* Sensu Stricto. **Toxins**, v. 10, n. 12, p. 492, 2018.

CRISTIANE, M. D. S.; KATIA, R. F. S.-E.; CACILDA, M. F. D. R.; BRUNO, N. B.; SERGIO, F. P. Effect of culture filtrate of *Curvularia inaequalis* on disease control and productivity of grape cv. Isabel. **African Journal of Agricultural Research**, v. 9, n. 40, p. 3001–3010, 2014.

DEL, E.; HERNÁNDEZ, L.; CIANGHEROTTI, C.; et al. Vanadium: History , chemistry , interactions with  $\alpha$ -amino acids and potential therapeutic applications. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 372, p. 117–140, 2018.

SANTOS, E. R.; CORRÊA, R. S.; RIBEIRO, J. U.; et al. Ru ( II )/ bisphosphine / diimine / amino acid complexes : Diastereoisomerism , cytotoxicity and inhibition of tumor cell adhesion to collagen type I. **Journal of Coordination Chemistry**, v. 69, p. 3518-3530, 2016.



GREVE, H.; SCHUPP, P. J.; EGUEREVA, E.; et al. Apralactone A and a new stereochemical class of curvularins from the marine fungus *Curvularia* sp. **European Journal of Organic Chemistry**, , n. 30, p. 5085–5092, 2008.

HARTUNG, W. The evolution of abscisic acid (ABA) and ABA function in lower plants, fungi and lichen Wolfram. **Functional Plant Biology**,. v.71 p. 806–812, 2010.

HIRAI, N.; YOSHIDA, R.; TODOROKI, Y.; OHIGASHI, H. Biosynthesis of Abscisic Acid by the Non-mevalonate Pathway in Plants, and by the Mevalonate Pathway in Fungi. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 64, n. 7, p. 1448–1458, 2005.

HUTTUNEN, E.; NORO, K.; YANG, Z. Purification and identification of antimicrobial substances produced by two *Lactobacillus casei* strains. **International Dairy Journal**, v. 5, n. 5, p. 503–513, 1995.

IÓCA, L. P.; NICACIO, K. J.; BERLINCK, R. G. S. Natural products from marine invertebrates and microorganisms in Brazil between 2004 and 2017: Still the challenges, more rewards. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 29, n. 5, p. 998–1031, 2018.

JOHNSTONE, T. C.; SUNTHARALINGAM, K.; LIPPARD, S. J. The Next Generation of Platinum Drugs: Targeted Pt(II) Agents, Nanoparticle Delivery, and Pt(IV) Prodrugs. **Chemical Reviews**, v. 116, n. 5, p. 3436–3486, 2016.

JUCKPECH, K.; PINYAKONG, O.; RERNGSAMRAN, P. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by newly isolated *curvularia* sp. F18, *lentinus* sp. S5, and *phanerochaete* sp. T20. **ScienceAsia**, v. 38, n. 2, p. 147–156, 2012.

JUSSIÊ, A.; BATISTA, J.; OLIVEIRA, S.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. Potencial antagonista e controle in vitro de *Alternaria solani* por fungos sapróbios. **Summa Phytopathologica** n. 17, p. 199–204, 2017.

KIM, J.-C.; CHOI, G. J.; KIM, H. T.; KIM, H.-J.; CHO, K. Y. Pathogenicity and Pyrenocine Production of *Curvularia inaequalis* Isolated from *Zoysia* Grass . **Plant Disease**, v. 84, n. 6, p. 684–688, 2007.

KRIZSÁN, K.; PAPP, T.; MANIKANDAN, P.; Clinical Importance of the Genus

Curvularia, **Medical Mycology: Current Trends and Future Prospects** p.147-204, 2016.

KUHN, S. B. Filtrados de cultivo dos fungos sapróbios *Curvularia inaequalis* e *Stachybotrys globosa* no controle biológico de doenças e na indução de resistência em videiras cvs. Isabel e Cabernet Sauvignon Dissertação (Mestrado em agronomia) - Universidade estadual de maringá centro de ciências agrárias 2014.

KUMAR, S.; DHAR, D. N.; SAXENA, P. N. Applications of metal complexes of Schiff bases-A review. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 68, n. 3, p. 181–187, 2009.

KWON, J.; SEO, Y. H.; LEE, J.; et al. Spiroindole Alkaloids and Spiroditerpenoids from *Aspergillus duricaulis* and Their Potential Neuroprotective Effects. **Journal of Natural Products** v.78, n11 p. 2572-5, 2015.

LAGO, J. H. G.; CIÊNCIAS, C. DE; MACKENZIE, U. P.; ANTIFUNGAL DERIVATIVES FROM *Piper mollicomum* AND *P. lhotzkyanum* (PIPERACEAE), **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1222–1224, 2007.

LIANG, Y.; RAN, S.-F.; BHAT, J.; et al. *Curvularia microspora* sp. nov. associated with leaf diseases of *Hippeastrum striatum* in China. **MycoKeys**, v. 29, p. 49–61, 2018.

LIMA, A.; FURTADO, M. Espécies do género *Curvularia* (fungos anamóeficos: Hyphomycetes) na Ilha de Santiago, Cabo Verde. **Portugaliae Acta Biol.**, v. 22, p. 145–156, 2007.

MADRID, H.; CUNHA, K. DA. Novel *Curvularia* species from clinical specimens. **Persoonia**, v. 33 p. 48–60, 2014.

MANAMGODA, D. S.; CAI, L.; MCKENZIE, E. H. C.; et al. A phylogenetic and taxonomic re-evaluation of the *Bipolaris* - *Cochliobolus* - *Curvularia* Complex. **Fungal Diversity**, v. 56, n. 1, p. 131–144, 2012.

MONDOL, M. A. M.; FARTHOUSE, J.; ISLAM, M. T.; SCHÜFFLER, A.; LAATSCH, H. Metabolites from the Endophytic Fungus *Curvularia* sp. M12 Act as Motility Inhibitors against *Phytophthora capsici* Zoospores. **Journal of Natural Products**, v. 80, n. 2, p. 347–355, 2017.

OROZCO, J.G; LEITE, L.G; CUSTÓDIO, B.C.; SILVA, R.S.A.; CASTELIANI, A.G.B.; TRAVAGLINI, R.V. Inhibition of symbiote fungus of the leaf cutter ant *Atta sexdens* by secondary metabolites from the bacterium *Xenorhabdus szentirmaii* associated with entomopathogenic nematodes. **Agricultural Microbiology** v.85, p.1-6, 2018

PIEROZZI, C.G. Fungos Sapróbios do Semi-árido Nordeste: Aspectos Fisiológicos, ação no controle da Ferrugem e Indução do Enraizamento em Mudanças de Eucalipto. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrônomicas)- Universidade Estadual de São Paulo- Botucatu, 2013

QIN, S.; KROHN, K.; HUSSAIN, H.; SCHULZ, B.; DRAEGER, S. Pestalothicols E – H : Antimicrobial Metabolites from an Endophytic Fungus Isolated from the Tree *Arbutus unedo*. **Eur. J. Org. Chem.**, p. 5163–5166, 2011.

RONCONI, L.; SADLER, P. J. Using coordination chemistry to design new medicines. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 251, n. 13–14., p. 1633–1648, 2007.

RUKACHAISIRIKUL, V.; RUNGSAIWATTANA, N.; KLAIKLAY, S.; et al.  $\gamma$  - Butyrolactone, Cytochalasin, Cyclic Carbonate, Eutypinic Acid, and Phenalenone Derivatives from the Soil Fungus *Aspergillus* sp. PSU- RSPG185. **Journal of Natural Products**, v.77.n. 11 p. 2375-82, 2014.

DOS SANTOS, E. R.; GRAMINHA, A. E.; SCHULTZ, M. S.; et al. Cytotoxic activity and structural features of Ru(II)/phosphine/amino acid complexes. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 182, n. li, p. 48–60, 2018.

SANTOS, J.; OLIVEIRA, B.; RIBEIRO, L. M.; SAAB, M. F. Accumulation of Phytoalexins in Beans, Soybeans and Sorghum by Fungal Filtrates. **Rev. Caatinga**, v. 2125, p. 1073–1078, 2017.

SANTOS, P. R. R.; LEÃO, E. U.; AGUIAR, R. W. DE S.; DE MELO, M. P.; DOS SANTOS, G. R. Morphological and molecular characterization of *Curvularia lunata* pathogenic to andropogon grass. **Bragantia**, v. 77, n. 2, p. 326–332, 2018.

SILESS, G. E.; GALLARDO, G. L.; RODRIGUEZ, M. A.; et al. Metabolites from the Dark Septate Endophyte *Drechslera* sp. Evaluation by LC/MS and Principal

Component Analysis of Culture Extracts with Histone Deacetylase Inhibitors. **Chemistry and Biodiversity**, v. 15, n. 8, 2018.

SIVANESAN, A.; ALCORN, J. L.; SHIVAS, R. G. Three new gramicolous species of *Curvularia* (anamorphic fungi) from Queensland, Australia. **Australian Systematic Botany**, v. 16, n. 2, p. 275–278, 2003.

SPENCE, C. A.; LAKSHMANAN, V.; DONOFRIO, N.; BAIS, H. P. Crucial Roles of Abscisic Acid Biogenesis in Virulence of Rice Blast Fungus *Magnaporthe oryzae*. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 1–13, 2015.

URBANEK, A.; SZADZIEWSKI, R.; STEPNOWSKI, P.; et al. Composition and antimicrobial activity of fatty acids detected in the hygroscopic secretion collected from the secretory setae of larvae of the biting midge *Forcipomyia nigra* (Diptera: Ceratopogonidae). **Journal of Insect Physiology**, v. 58, n. 9, p. 1265–1276, 2012.

VACCARO, M.; DEL LITTO, R.; MANGIAPIA, G.; et al. Lipid based nanovectors containing ruthenium complexes: A potential route in cancer therapy. **Chemical Communications**, , n. 11, p. 1404–1406, 2009.

VARMA, G. B.; FATOPE, M. O.; MARWAH, R. G.; DEADMAN, M. E.; AL-RAWAHI, F. K. Production of phenylacetic acid derivatives and 4-epiradicinol in culture by *Curvularia lunata*. **Phytochemistry**, v. 67, n. 17, p. 1925–1930, 2006.

VILLARREAL, W.; COLINA-VEGAS, L.; RODRIGUES DE OLIVEIRA, C.; TENORIO, J. C.; ELLENA, J.; GOZZO, F. C.; COMINETTI, M. R.; FERREIRA, A. G.; BARBOSA FERREIRA, M. A.; NAVARRO, M.; BATISTA, A. A. Chiral Platinum(II) Complexes Featuring Phosphine and Chloroquine Ligands as Cytotoxic and Monofunctional DNA-Binding Agents”. **Inorg. Chem.** V.54 N.24, 11709-11720, 2015

ZHANG, H.; ZHAO, Z.; WANG, H. Cytotoxic natural products from marine sponge-derived microorganisms. **Marine Drugs**, v. 15, n. 3, 2017.

ZHU, F.; YUAN, C.; GANG, F.; et al. Bioassay-Guided Isolation of Antifungal Compounds from *Disporopsis aspersa* (Hua) Engl. ex Diels against *Pseudoperonospora cubensis* and *Phytophthora infestans*. **Chemistry and Biodiversity**, v. 15, n. 7, 2018.

## 9. ANEXO I

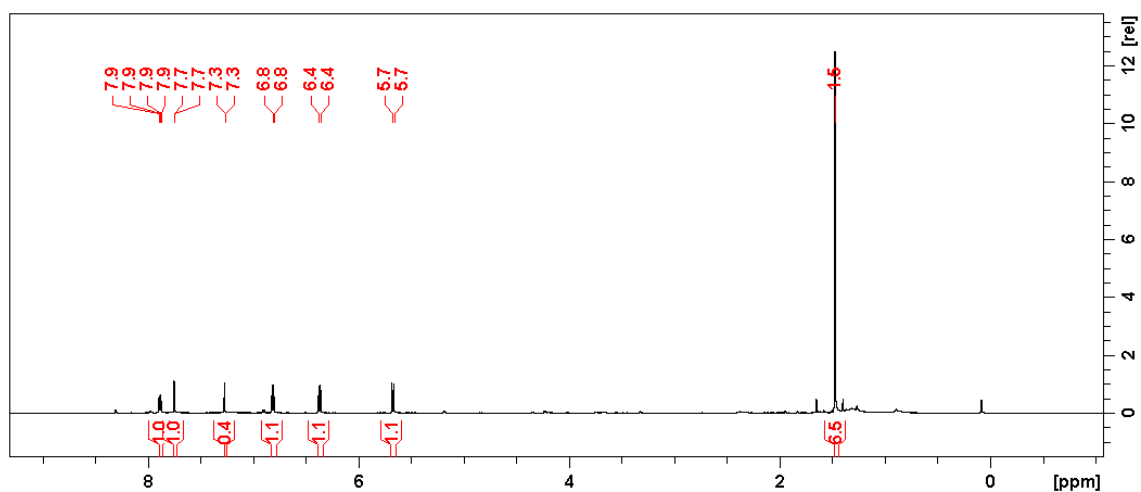


FIGURA S1 2- Espectro de  $^1\text{H}$  RMN das substâncias isoladas ácido anofínico-PL1 (majoritária) e ácido 3,4-trans- dihidroxi-anofínico PL2 (minoritário)-  $\text{CDCl}_3$  400MHz

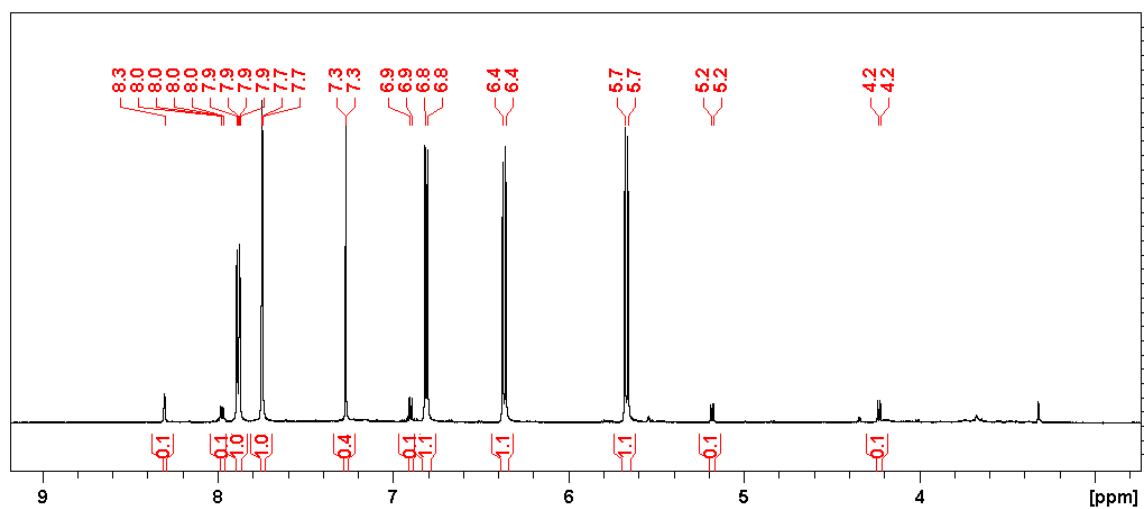


FIGURA S1 3- - Espectro de  $^1\text{H}$  RMN ampliado das substâncias isoladas ácido anofínico-PL1 (majoritária) e ácido 3,4-trans- dihidroxi-anofínico PL2 (minoritário)  $\text{CDCl}_3$  - 400MHz

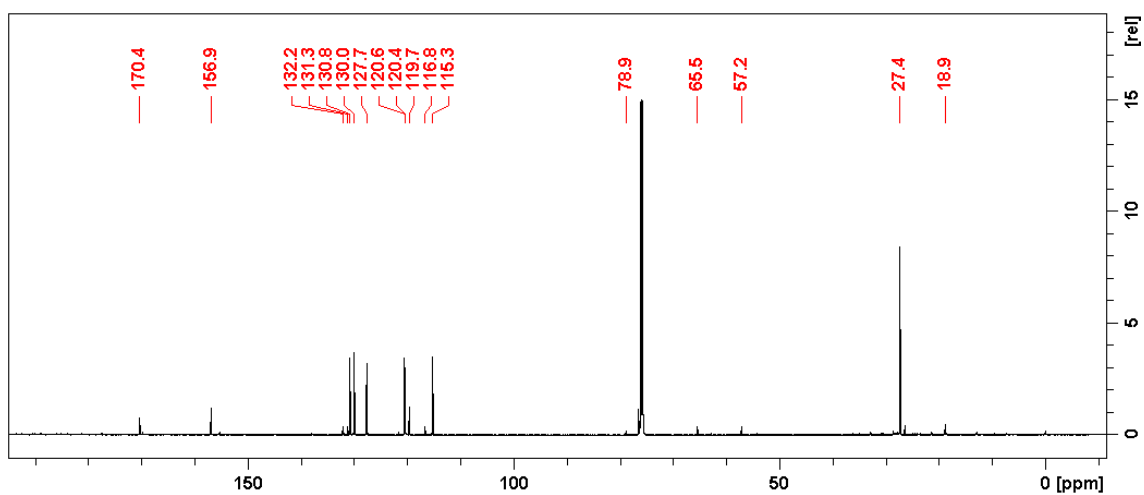


FIGURA S1 4- Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN ampliado das substâncias isoladas ácido anofínico-PL1 (majoritária) e ácido 3,4-trans- dihidroxi-anofínico PL2 (minoritário)  $\text{CDCl}_3$  - 100MHz

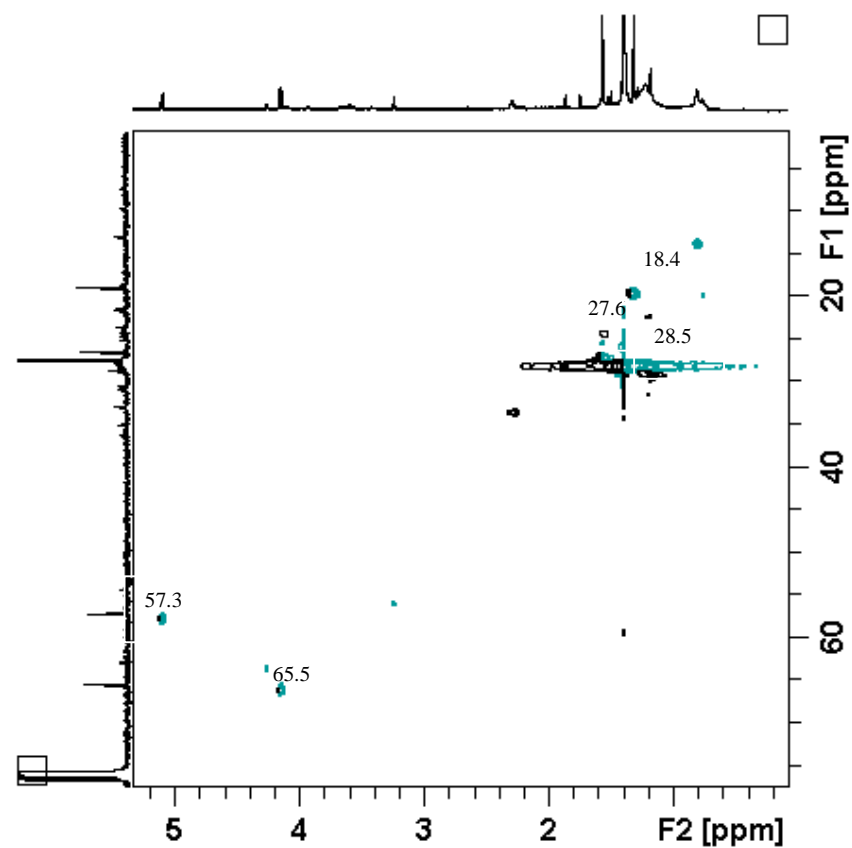
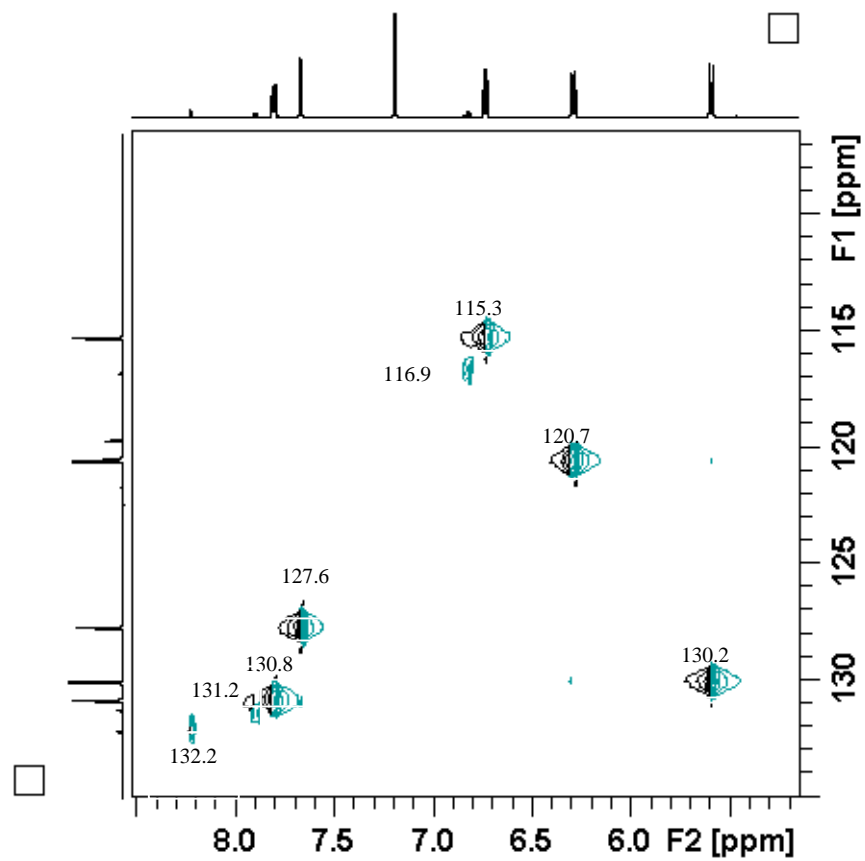
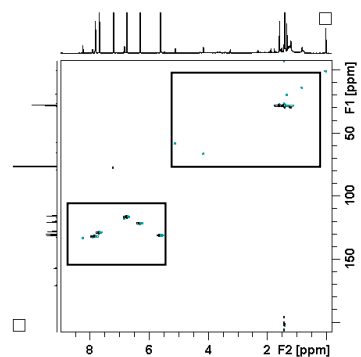


FIGURA S1 5 - Espectros ampliado do mapa de contorno HSQC da substância isoladas PL1 e PL2-  $\text{CDCl}_3$  100 MHz

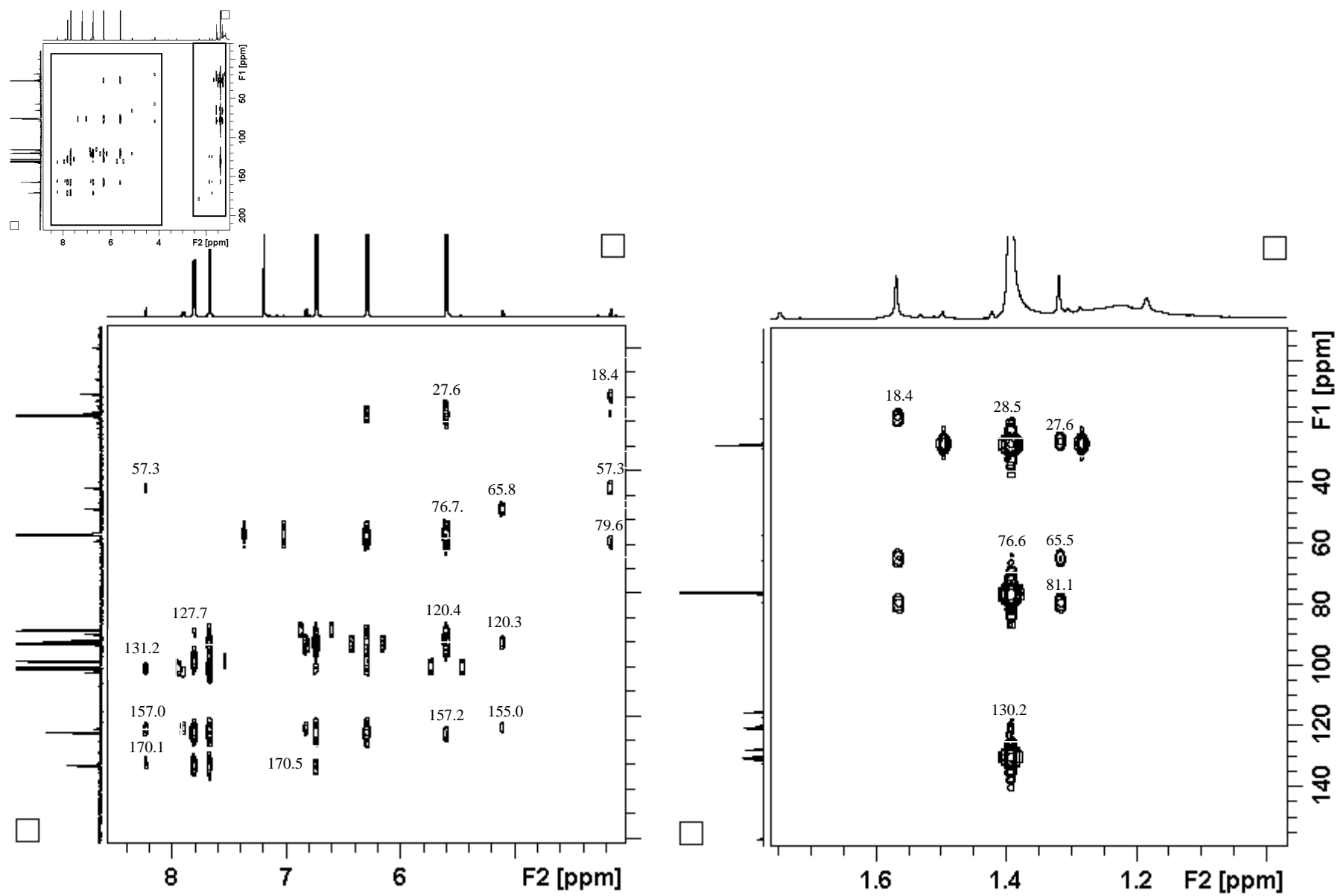


FIGURA S1 6 Espectros ampliado do mapa de contorno HMBC da substância isoladas PL1 e PL2- CDCl<sub>3</sub> 125 MHz



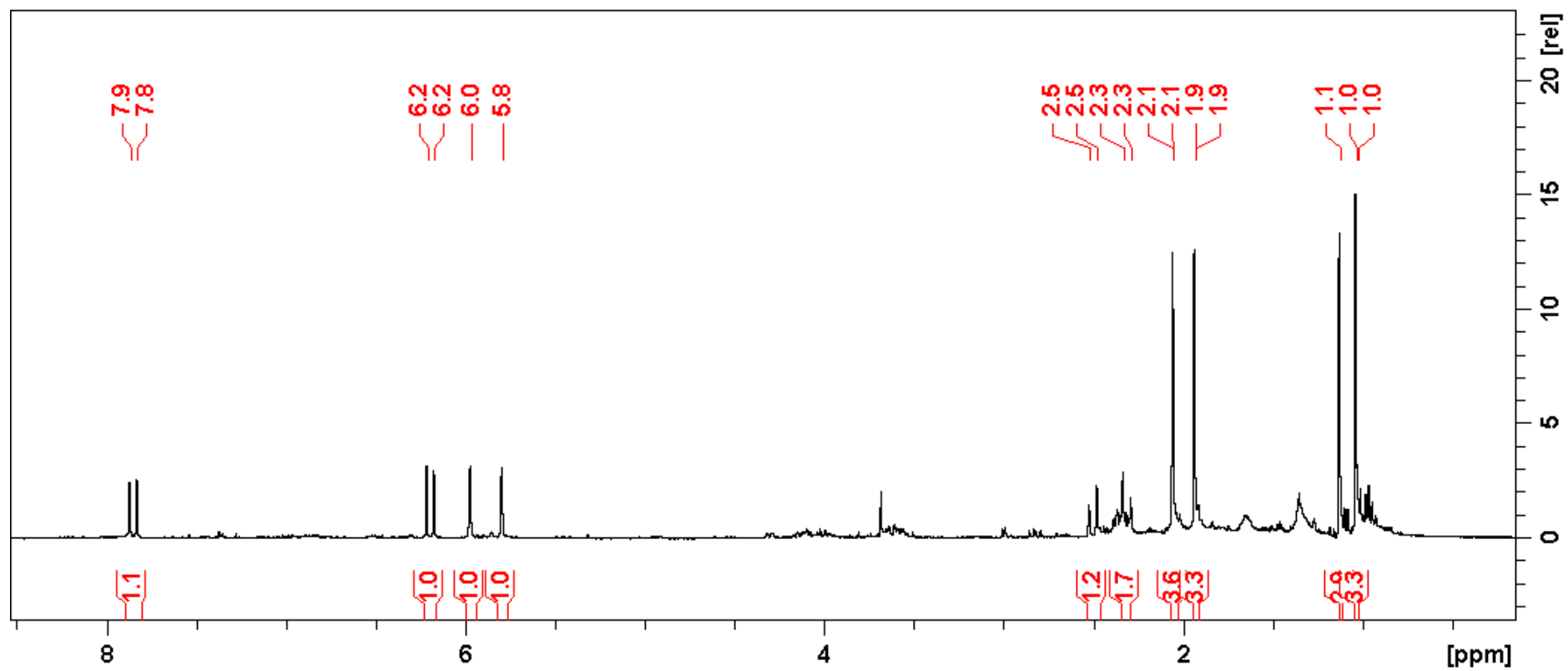
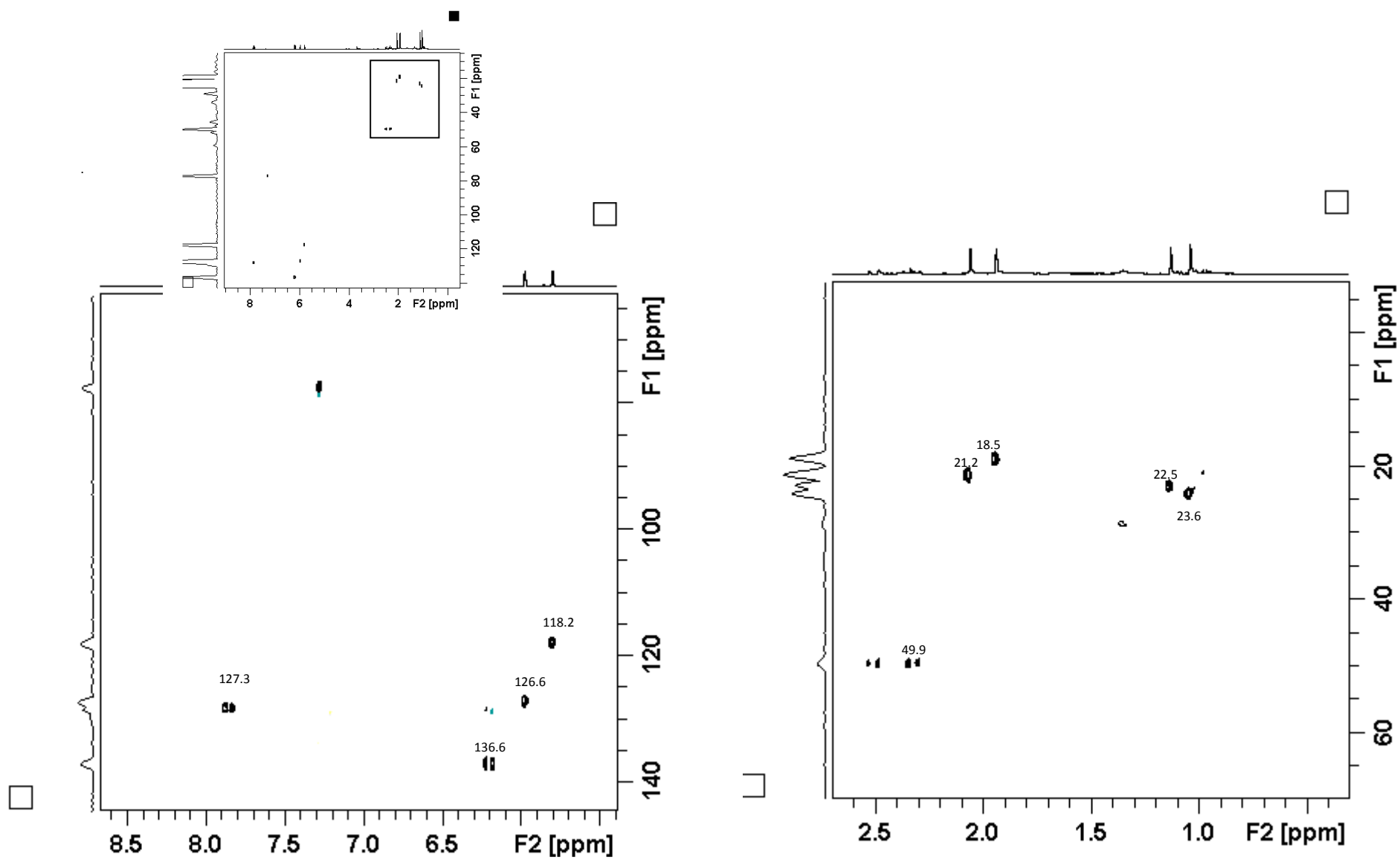
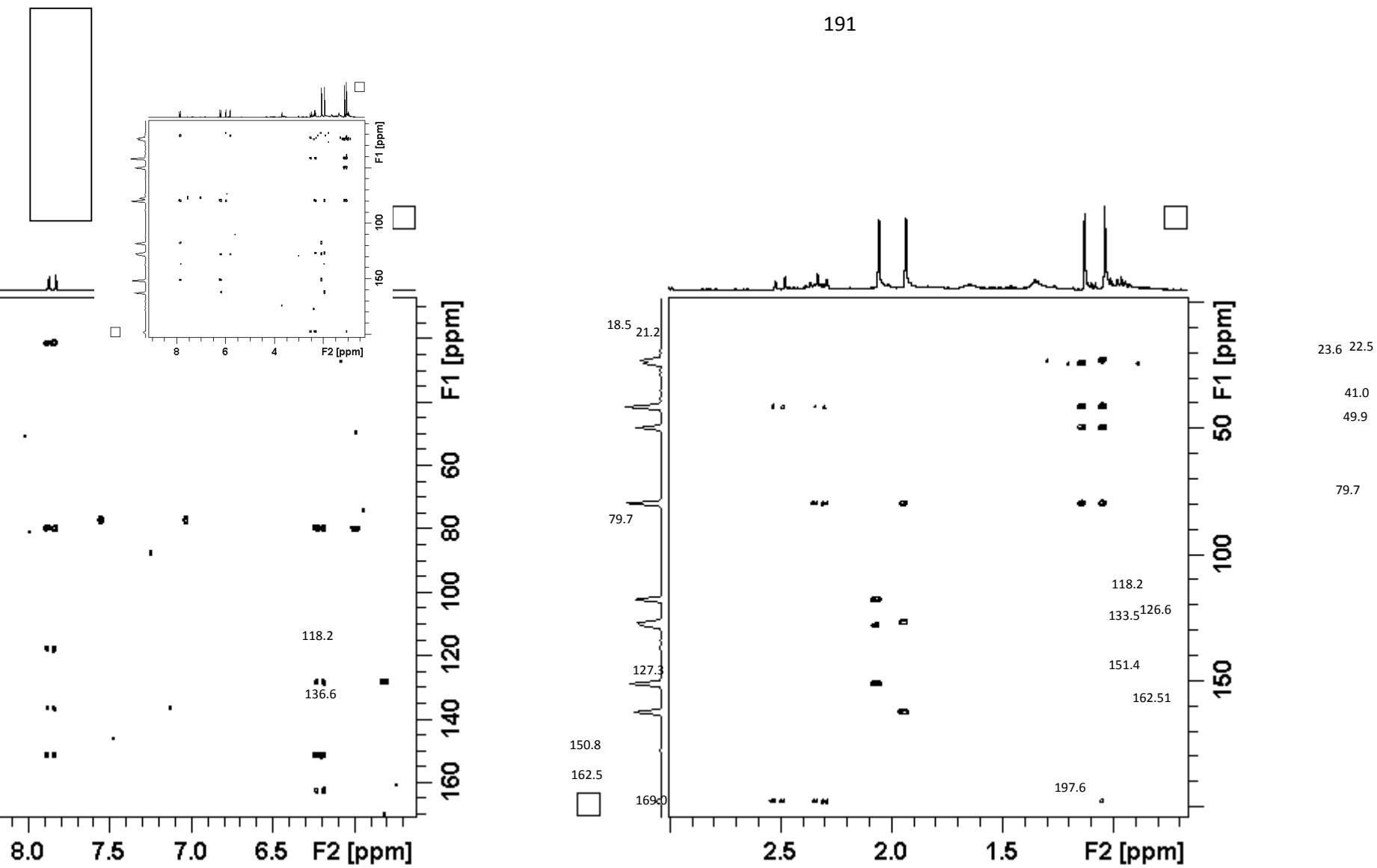


FIGURA S1 7- Espectro de <sup>1</sup>H RMN das substâncias isoladas ácido abscísico PL3, CDCl<sub>3</sub> - 400MHz

FIGURA S1 8 Espectros ampliado do mapa de contorno HSQC da substância isoladas ácido abscísico PL3,  $\text{CDCl}_3$ -100MHz

FIGURA S1 9-Espectros ampliado do mapa de contorno HMBC da substância isoladas ácido abscísico PL3, CDCl<sub>3</sub> -100MHz

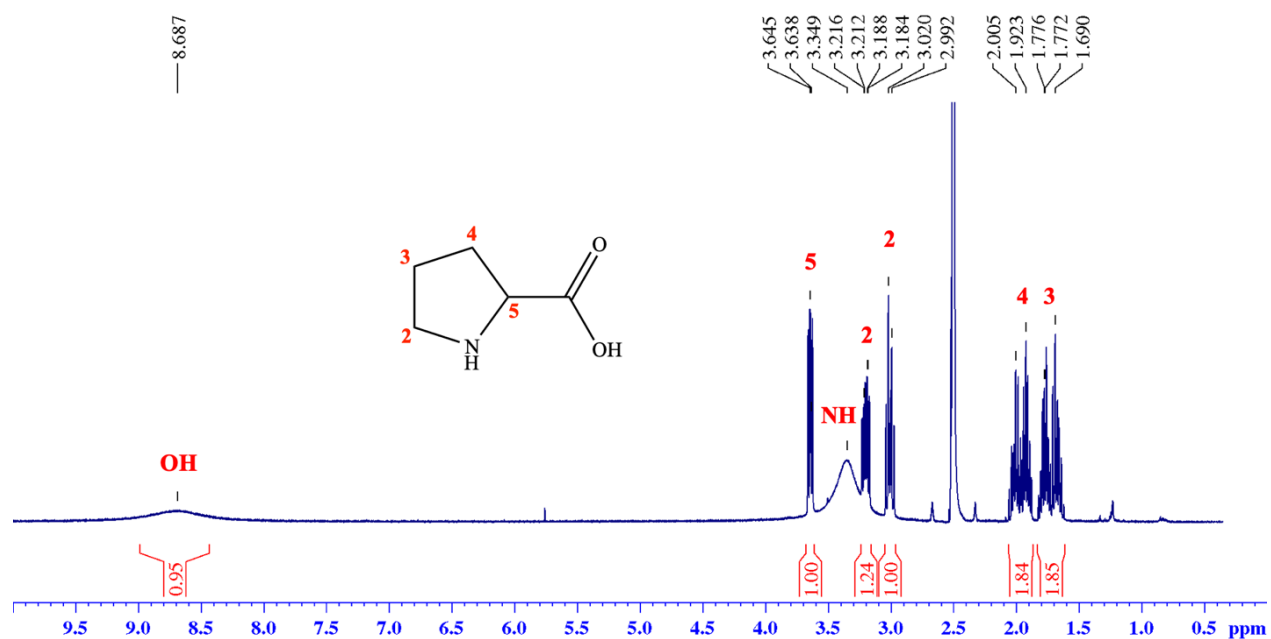


FIGURA S1 10- Espectro de  $^1\text{H}$  RMN do padrão L-prolina,  $\text{DMSO-d}_6$ - 400MHz

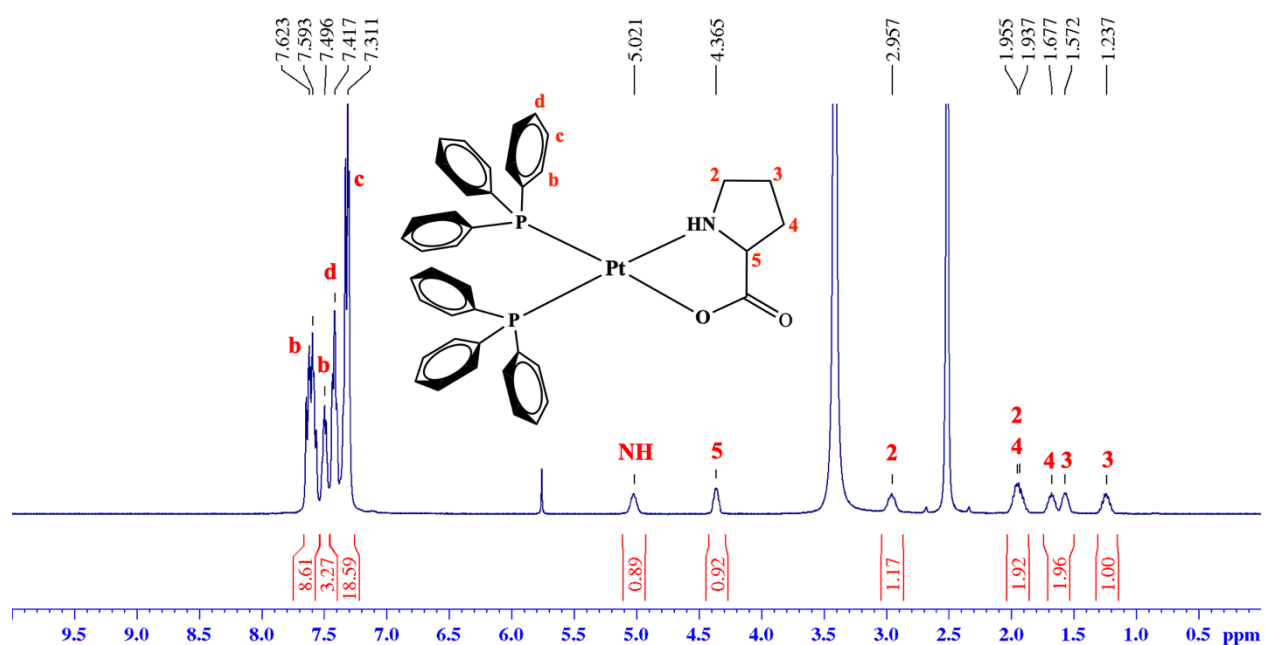


FIGURA S1 11- Espectro de  $^1\text{H}$  RMN do Complexo  $\text{cis-[Pt(PPh}_3)_2(\text{Pro})]\text{PF}_6$   $\text{DMSO-d}_6$ - 400MHz

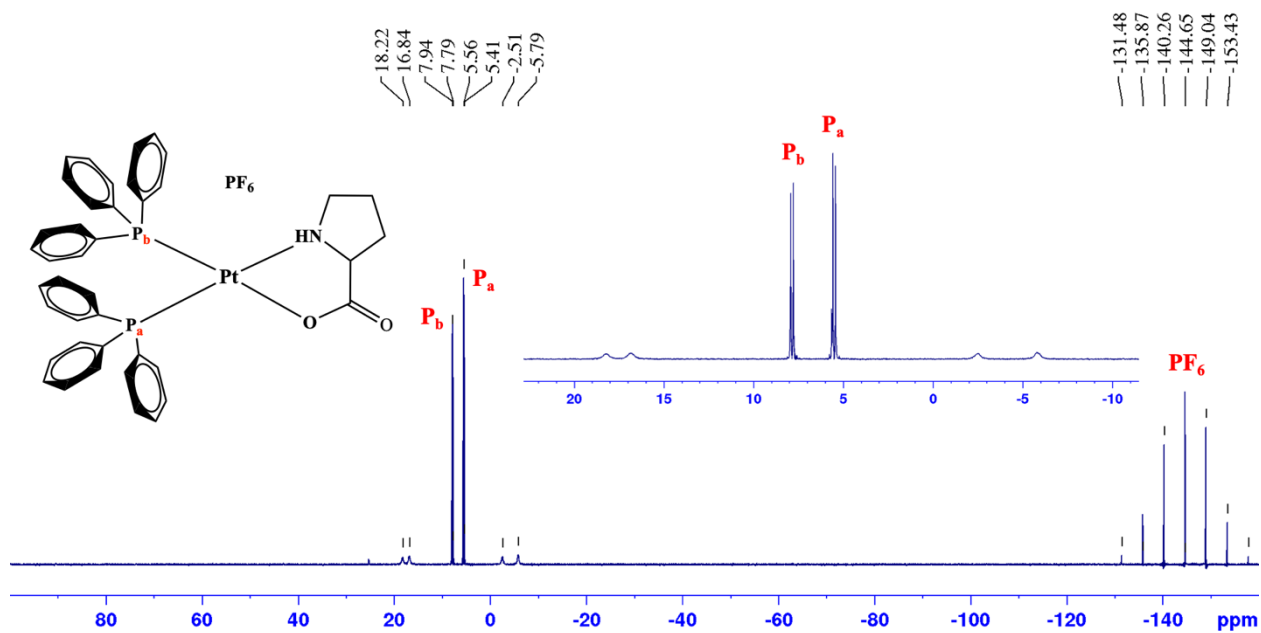


FIGURA S1 12- Espectro de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  RMN do Complexo  $cis\text{-[Pt(PPh}_3)_2(\text{Pro})]\text{PF}_6$ , DMSO- $d_6$ - 400MHz

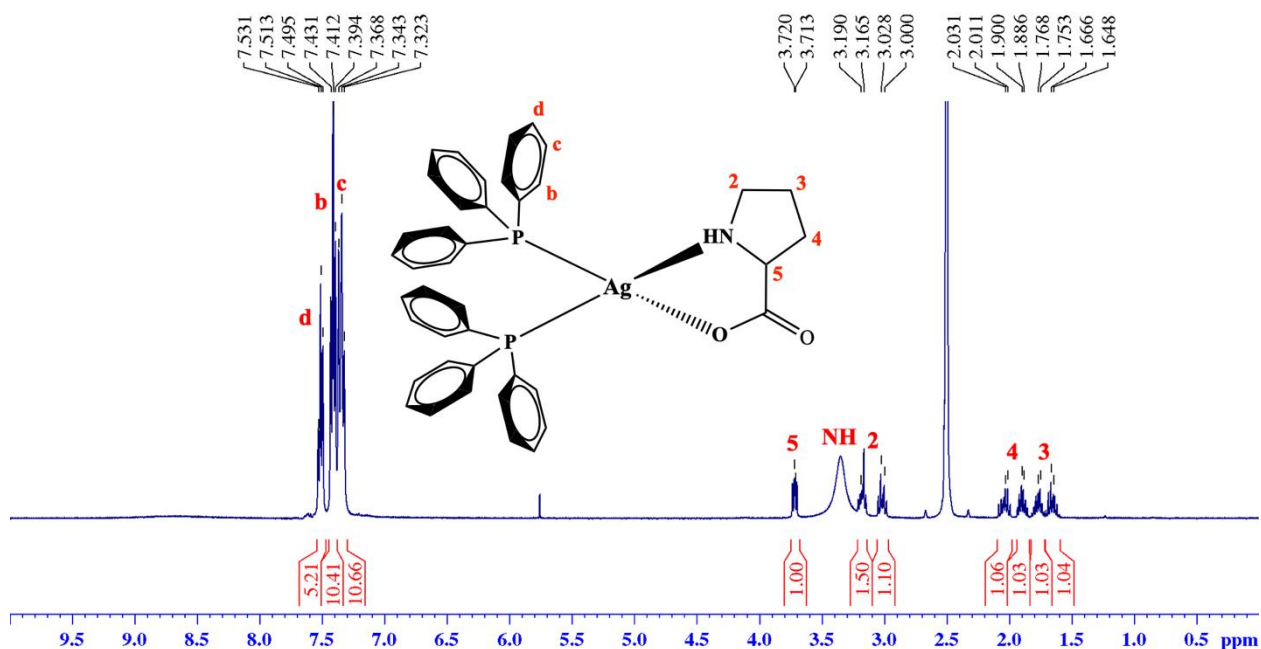


FIGURA S1 13- Espectro de  $^1\text{H}$  RMN do Complexo  $[\text{Ag}(\text{PPh}_3)_2(\text{Pro})]$ , DMSO- $d_6$ - 400MHz

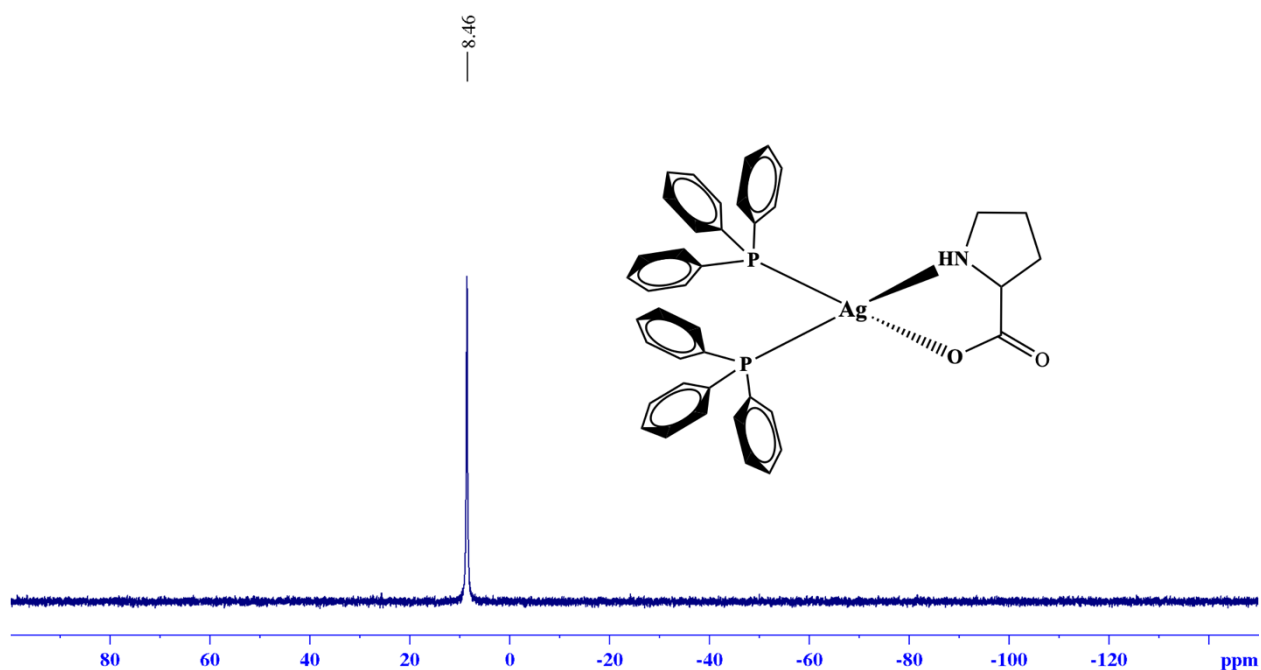


FIGURA S1 14- Espectro de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  RMN Complexo  $[\text{Ag}(\text{PPh}_3)_2(\text{Pro})]$  DMSO- $\text{d}_6$ -400MHz

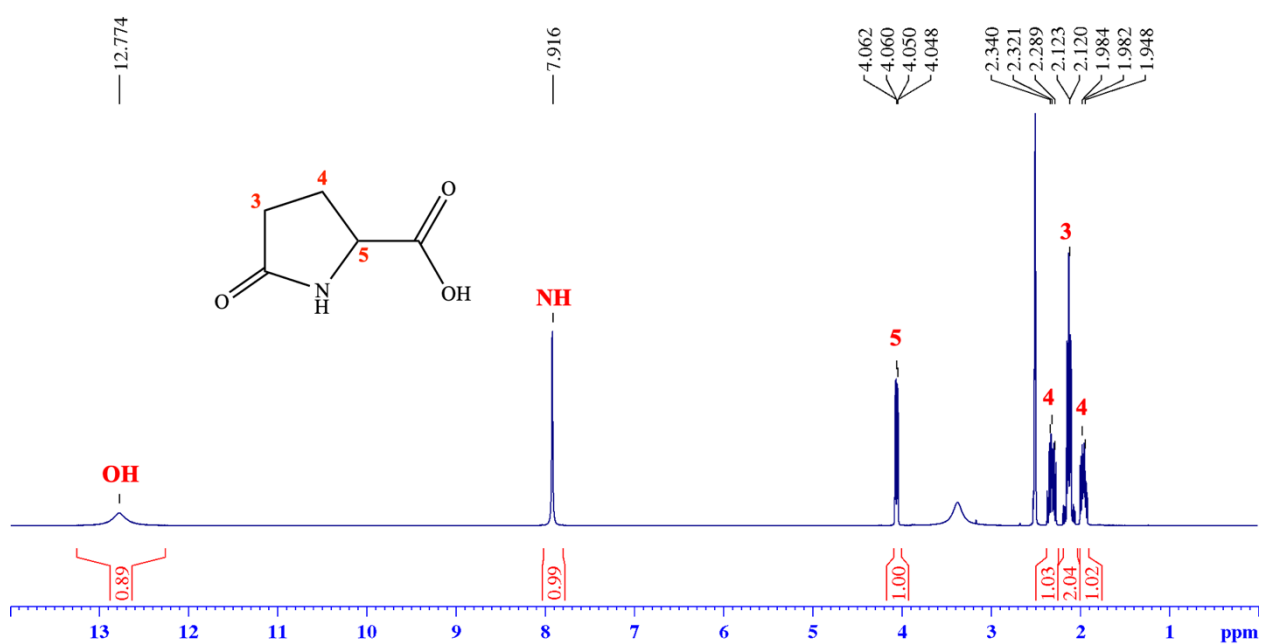


FIGURA S1 15- Espectro de  $^1\text{H}$  RMN do padrão L-ácido glutâmico, DMSO- $\text{d}_6$ - 400MHz

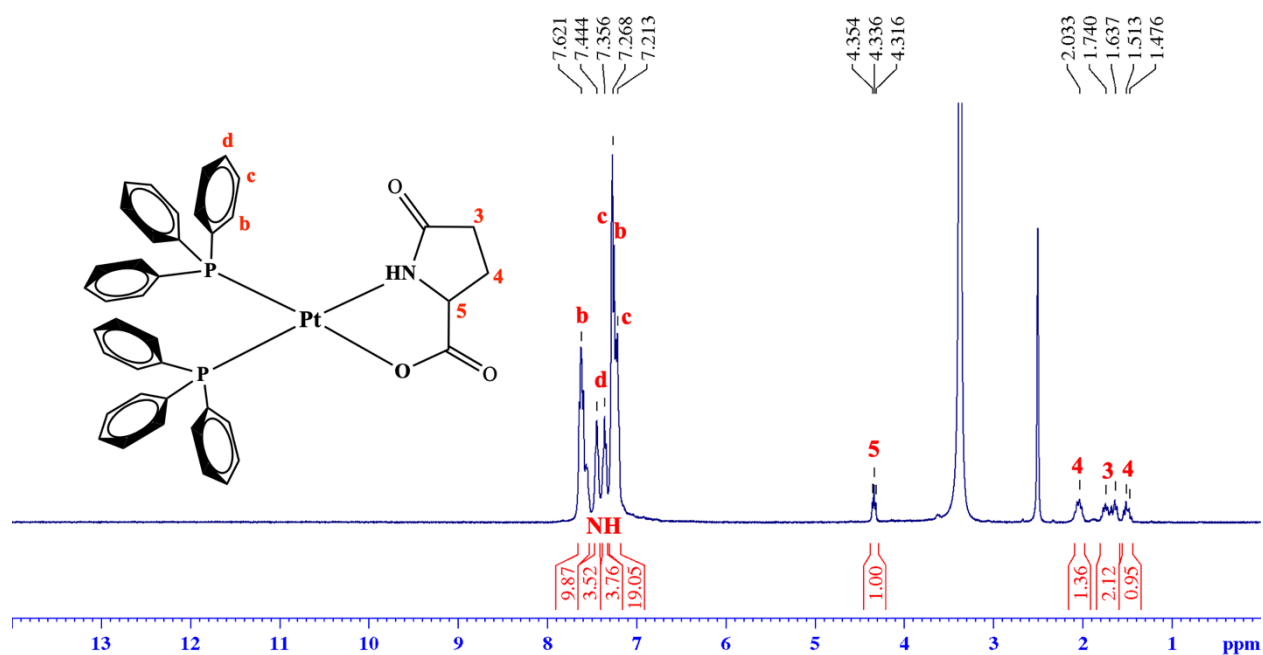


FIGURA S1 16- Espectro de <sup>1</sup>H RMN do Complexo *cis*-[Pt(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(APG)]PF<sub>6</sub> DMSO-d<sub>6</sub>- 400MHz

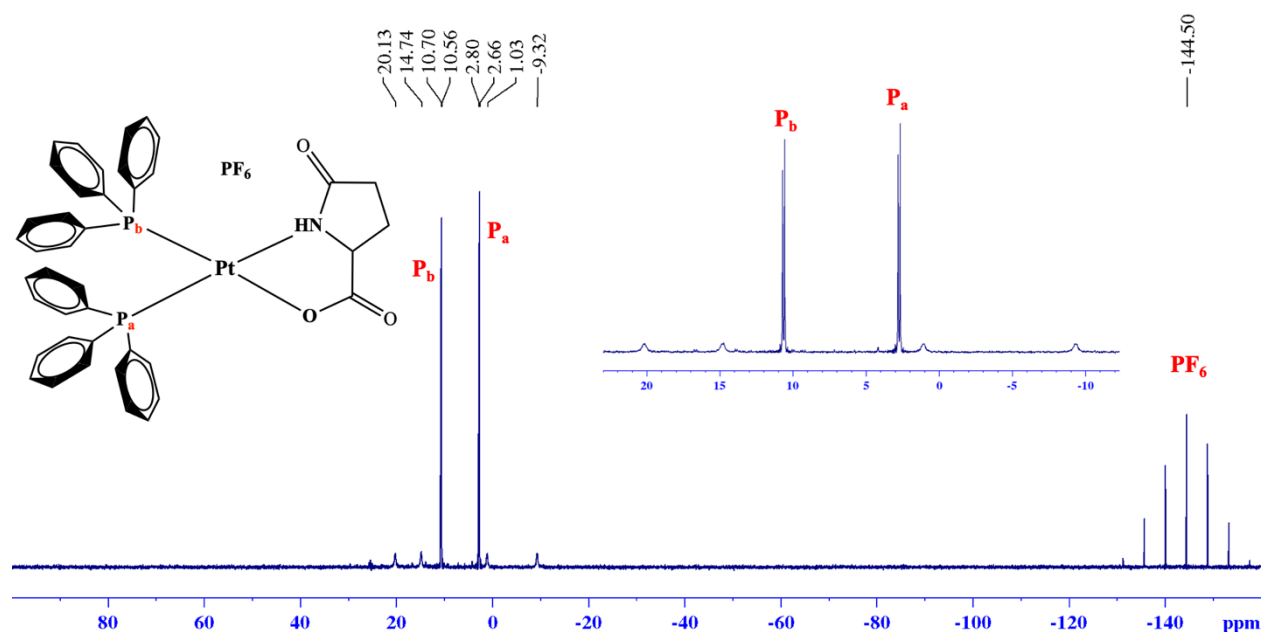


FIGURA S1 17- Espectro de <sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H} RMN do Complexo *cis*-[Pt(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(APG)]PF<sub>6</sub> DMSO-d<sub>6</sub>- 400MHz

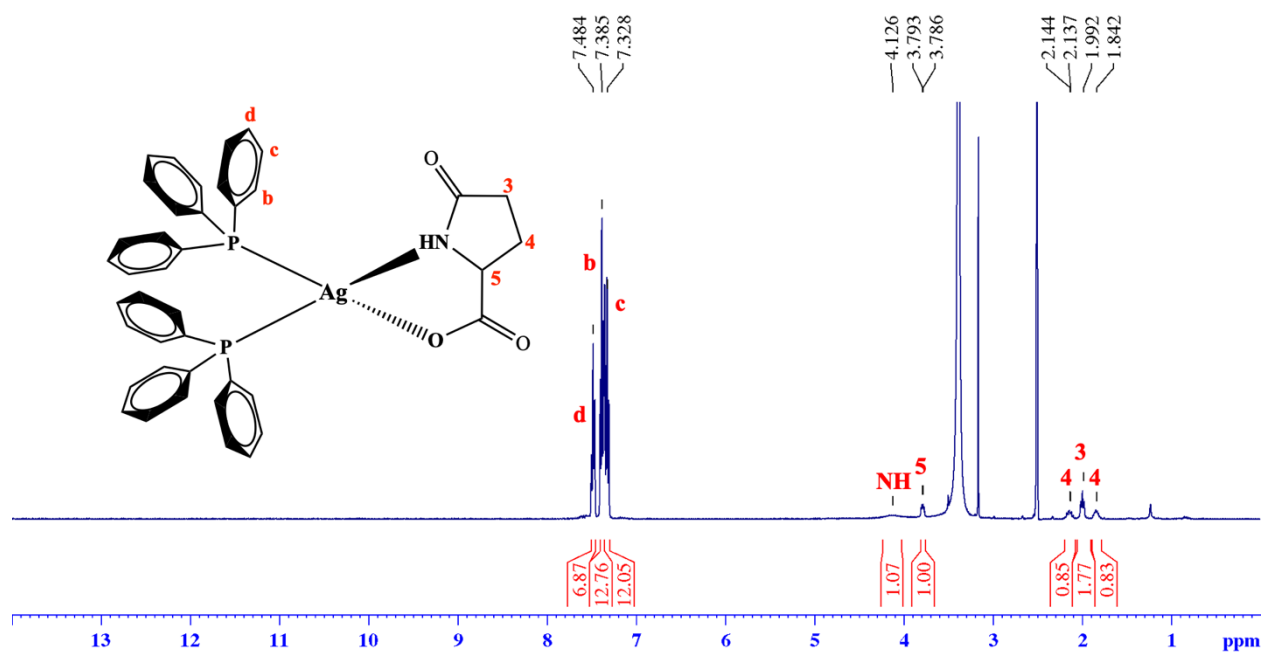


FIGURA S1 18- Espectro de  $^1H$  RMN do Complexo  $[Ag(PPh_3)_2(APG)]$ , DMSO- $d_6$ -400MHz

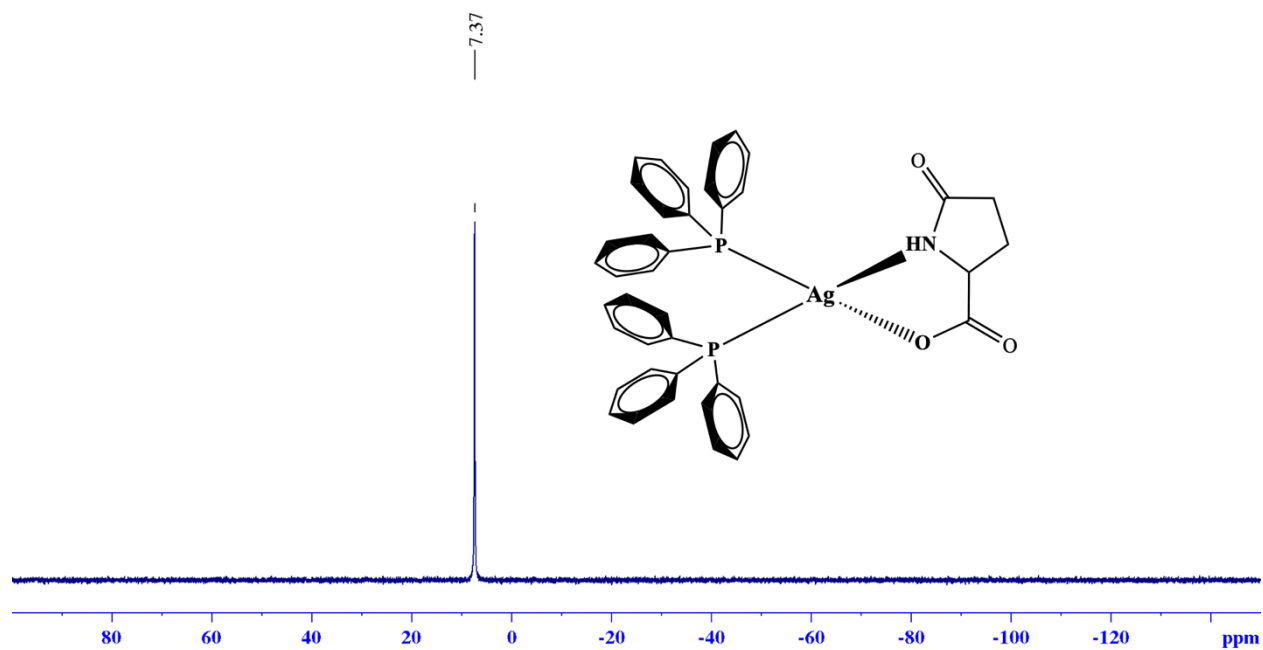


FIGURA S1 19- Espectro de  $^{31}P\{^1H\}$  RMN do Complexo  $[Ag(PPh_3)_2(APG)]$

DMSO- $d_6$ - 400MHz



## Dados experimentais obtidos

### *L*-Prolina

RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ ) [ $\delta$  ppm, (integral, multiplicidade, atribuição,  $J$  Hz)]: 1,67;1,77 (2H, m, H3); 1,92;2,00 (2H, m, H4); 3,00;3,20 (2H, m, H2); 3,35 (1H, bs, NH); 3,64 (1H, dd, H5,  $^3J$  5,68 e 8,63 Hz); 8,69 (1H, bs, OH).

### *L*-Ácido piroglutâmico

RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ ) [ $\delta$  ppm, (integral, multiplicidade, atribuição,  $J$  Hz)]: 1,96;2,31 (2H, m, H4); 2,12 (2H, m, H3); 4,06 (1H, dd, H5,  $^3J$  4,33 e 8,89 Hz); 7,92 (1H, s, NH); 12,77 (1H, bs, OH).

### Complexo *cis*-[Pt(PPh $_3$ ) $_2$ (Pro)]PF $_6$ (1)

Sólido branco com rendimento de 91 % (105 mg). RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ ) [ $\delta$  ppm, (integral, multiplicidade, atribuição,  $J$  Hz)]: 1,24;1,57 (2H, m, H3); 1,68;1,95 (2H, m, H4); 1,95;2,96 (2H, m, H2); 4,37 (1H, m, H5); 5,02 (1H, m, NH); 7,31 (12H, m, Hc); 7,42 (6H, m, Hd); 7,59;7,62 (12H, m, Hb). RMN  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  (DMSO- $d_6$ ) [ $\delta$  ppm, (multiplicidade, atribuição)]: 7,87 (d, PPh $_3^b$ ,  $^1J$  P $_b$ -Pt = 3357,76 Hz); 5,49 (d, PPh $_3^a$ ,  $^1J$  P $_a$ -Pt = 3665,52 Hz);  $^2J$  P $_a$ -P $_b$  = 24,29 Hz; -145,50 (sept, PF $_6$ ,  $^1J$  P-F = 711.24 Hz).

### Complexo [Ag(PPh $_3$ ) $_2$ (Pro)]

Sólido branco com rendimento de 82 % (87 mg). RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ ) [ $\delta$  ppm, (integral, multiplicidade, atribuição,  $J$  Hz)]: 1,66;1,77 (2H, m, H3); 1,90;2,04 (2H, m, H4); 3,02;3,18 (2H, m, H2); 3,35 (1H, m, NH); 3,72 (1H, dd, H5,  $^3J$  5,80 e 8,60 Hz); 7,34 (12H, m, Hc); 7,41 (6H, m, Hd); 7,51 (12H, m, Hb). RMN  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  (DMSO- $d_6$ ) [ $\delta$  ppm, (multiplicidade, atribuição)]: 8,46 (s, PPh $_3$ ).

### Complexo *cis*-[Pt(PPh $_3$ ) $_2$ (APG)]PF $_6$

Sólido branco com rendimento de 89 % (110 mg). RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ ) [ $\delta$  ppm, (integral, multiplicidade, atribuição,  $J$  Hz)]: 1,49;2,03 (2H, m, H4); 1,63;1,74 (2H, m, H3); 4,34 (1H, dd, H5,  $^3J$  7,70 e 8,60 Hz); 7,28 (1H, m, NH); 7,22;7,26 (12H, m, Hc); 7,26;7,62 (12H, m, Hb); 7,36;7,44 (6H, m, Hd). RMN  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  (DMSO- $d_6$ ) [ $\delta$  ppm, (multiplicidade, atribuição)]: 10,64 (d,  $\text{PPh}_3^b$ ,  $^1J_{\text{Pb-Pt}} = 3093,61$  Hz); 2,74 (d,  $\text{PPh}_3^a$ ,  $^1J_{\text{Pa-Pt}} = 3896,21$  Hz);  $^2J_{\text{Pa-Pb}} = 22,90$  Hz; -145,50 (sept,  $\text{PF}_6$ ,  $^1J_{\text{P-F}} = 711,24$  Hz).

### Complexo $[\text{Ag}(\text{PPh}_3)_2(\text{APG})]$

Sólido branco com rendimento de 78 % (92 mg). RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ ) [ $\delta$  ppm, (integral, multiplicidade, atribuição,  $J$  Hz)]: 1,83;2,14 (2H, m, H4); 1,99 (2H, m, H3); 3,35 (1H, m, NH); 3,72 (1H, dd, H5,  $^3J$  5,14 e 8,15 Hz); 4,13 (1H, bs, NH); 7,33 (12H, m, Hc); 7,39 (12H, m, Hb); 7,48 (6H, m, Hd). RMN  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  (DMSO- $d_6$ ) [ $\delta$  ppm, (multiplicidade, atribuição)]: 7,37 (s,  $\text{PPh}_3$ ).