

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

**“METABOLISMO SECUNDÁRIO DE FUNGOS
ENDOFÍTICOS DO GÊNERO *Penicillium* ASSOCIADOS
ÀS PLANTAS *Murraya paniculata* (RUTACEAE) E *Melia
azedarach* (MELIACEAE)”**

ANDREY MOACIR DO ROSARIO MARINHO*

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

**Orientador: Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho
* Bolsista CAPES**

**SÃO CARLOS - SP
2005**

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

M338ms

Marinho, Andrey Moacir do Rosário.

Metabolismo secundário de fungos endofíticos do gênero *Penicillium* associados às plantas *Murraya paniculata* (Rutaceae) e *Melia azedarach* (Meliaceae) / Andrey Moacir do Rosário Marinho. -- São Carlos : UFSCar, 2006.
316 p.

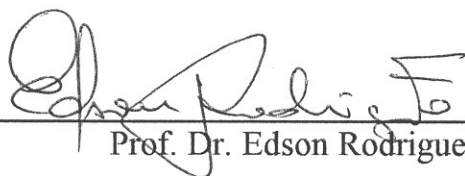
Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2005.

1. Produtos naturais. 2. Fungos endofíticos. 3. Metabólitos secundários de fungos. 4. *Penicillium*. 5. *Murraya paniculata*. 6. *Melia azedarach*. I. Título.

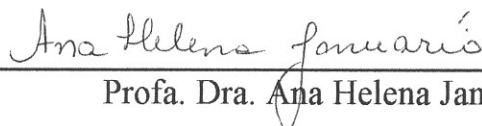
CDD: 547.3 (20^a)

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

*Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou o exame de tese de doutorado do candidato **Andrey Moacir do Rosário Marinho** realizado em 14 de dezembro de 2005:*



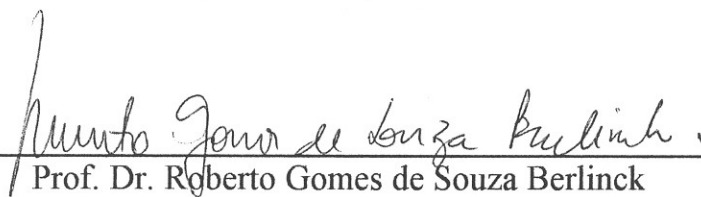
Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho



Profa. Dra. Ana Helena Januário



Profa. Dra. Lucia Maria Xavier Lopes



Prof. Dr. Roberto Gomes de Souza Berlinck



Prof. Dr. Antonio Gilberto Ferreira

Dedico este trabalho a minha esposa Patrícia Marinho, ao meu filho Matteus Marinho, a minha mãe Sonia Marinho e aos meus irmãos André, Anderson e Anderlei. Fontes de inspiração e otimismo para a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as maravilhas que Ele reservou para a minha vida.

Ao Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho, pela orientação.

Aos Professores Dr. Paulo Cezar Vieira, Dr Maria Fátima das G. F. Silva e Dr João Batista Fernandes pelos ensinamentos.

Aos amigos do laboratório de Produtos Naturais, pela convivência agradável, pelas trocas de conhecimento e pelos incentivos e ajudas na execução do trabalho.

Aos amigos do laboratório de Espectrometria de Massas, pela convivência agradável.

Aos amigos da comunidade paraense Sebastião, Thiago, Sheylla e Joana pela amizade, por sempre estarem dispostos a ajudar não só no trabalho, mas também de todas as formas e por serem um pouquinho do Pará em São Carlos.

Ao Corpo Técnico de Departamento de Química.

As secretárias da PPGQ, pelos trabalhos prestados.

A CAPES pelo auxílio financeiro.

SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de Etila
APCI	<i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i>
BDA	Batata- Agar- Dextrose
CC	Cromatografia em Coluna
CCDA	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
CG	Cromatografia Gasosa
d	Dubleto
dd	Duplo dubleto
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
Dicl.	Diclorometano
EM	Espectro de Massas
ESI	<i>Electrospray Ionization</i>
Hex.	Hexano
HMQC	<i>Heteronuclear Multiple Quantum Coherence</i>
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Coherence</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Spectroscopy Quantum Coherence</i>
Hz	Hertz
IV	Espectroscopia na região do infravermelho
m	Multiplete
Me	Metila
MHz	Megahertz
<i>m/z</i>	Relação carga/ massa
p.	Página

ppm	Parte por milhão
q	Quarteto
quint	Quinteto
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
s	singleto
TOCSY	<i>Total Correlation Spectroscopy</i>

LISTA DE TABELAS

TABELA 3.1: Meio cultura Czapeck's enriquecido com 2% de extrato de levedura	33
TABELA 4.1: Dados de RMN ^{13}C de S-1 (50 MHz, CDCl_3)	64
TABELA 4.2: Dados de RMN ^1H e ^{13}C de S-2 (CDCl_3 , 200 MHz)	69
TABELA 4.3: Dados de RMN ^1H e ^{13}C de S-3 (CDCl_3 , 200 MHz)	74
TABELA 4.4: Dados de RMN ^1H e ^{13}C de S-4 (CDCl_3 , 400 MHz)	80
TABELA 4.5: Dados de RMN ^1H e ^{13}C de S-5 (CDCl_3 , 400 MHz)	88
TABELA 4.6: Dados de RMN ^1H e ^{13}C de S-6 (CDCl_3 , 400 MHz)	100
TABELA 4.7: Dados de RMN ^1H e ^{13}C de S-7 (acetona- d_6 , 400 MHz)	110
TABELA 4.8: Dados de RMN ^1H e ^{13}C de S-8 (acetona- d_6 , 400 MHz)	122
TABELA 4.9: Dados de RMN ^1H e ^{13}C de S-9 (CDCl_3 , 400 MHz)	135
TABELA 4.10: Dados de RMN ^1H e ^{13}C de S-10 (CDCl_3 , 400 MHz)	148
TABELA 4.11: Dados de RMN ^1H e ^{13}C de S-11 (CDCl_3 , 400 MHz)	160
TABELA 4.12: Dados de RMN ^1H e ^{13}C de S-12 (CDCl_3 , 400 MHz)	172
TABELA 4.13: Dados de RMN ^1H e ^{13}C de S-13 (acetona- d_6 , 400 MHz)	187
TABELA 4.14: dados de RMN ^1H e ^{13}C de S-14 (CDCl_3 , 400 MHz)	204
TABELA 4.15: dados de RMN ^1H e ^{13}C de S-15 (DMSO-d_6 , 200 MHz)	214
TABELA 4.16: dados de RMN ^1H e ^{13}C de S-16 (DMSO-d_6 , 400 MHz)	221
TABELA 4.17: dados de RMN ^{13}C de S-17 (D_2O , 200 MHz)	228
TABELA 4.18: dados de RMN ^{13}C de S-18 (D_2O , 200 MHz)	232
TABELA 4.19: ácidos graxos que esterificam o glicerol	236
TABELA 4.20: Dados de RMN ^1H e ^{13}C de S-20 (CDCl_3 , 200 e 400 MHz)	244
TABELA 4.21: Dados de RMN ^1H e ^{13}C de S-21 (CDCl_3 , 400 MHz)	254
TABELA 4.22: Dados de RMN ^1H e ^{13}C de S-22 (CD_3OD , 400 MHz)	266

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1: Representação esquemática da invasão de um fungo endofítico a planta hospedeira	03
FIGURA 1.2: Formas do parasita da Leishmania e seu ciclo biológico	22
FIGURA 1.3: Casos de leishmanioses no Brasil no período de 1982 a primeira metade de 2002	23
FIGURA 1.4: Mapa das leishmanioses no mundo	23
FIGURA 3.1: Isolamento dos fungos endofíticos, A) material vegetal, B) Hexano, C) Hipoclotito de Sódio 11%, D) Etanol e E) Meio de cultura BDA	32
FIGURA 3.2: Placa de petri usada no ensaio preliminar	48
FIGURA 3.3: Ensaio para medir o MIC das substâncias testadas realizado em placa de ELISA de 96 furos.	49
FIGURA 3.4: Ensaio realizado em placa de petri para verificar o tipo de atividade em cada concentração inibitória.	50
FIGURA 4.1: Espectro de RMN ^1H de S-1 (CDCl_3 , 200 MHz)	65
FIGURA 4.2: Espectro de RMN ^{13}C de S-1 (CDCl_3 , 200 MHz)	66
FIGURA 4.3: Espectro de DEPT 135 de S-1 (CDCl_3 , 200 MHz)	67
FIGURA 4.4: Espectro de RMN ^1H de S-2 (CDCl_3 , 200 MHz)	70
FIGURA 4.5: Espectro de RMN ^{13}C de S-2 (CDCl_3 , 200 MHz)	71
FIGURA 4.6: Espectro de RMN ^1H de S-3 (CDCl_3 , 200 MHz)	75
FIGURA 4.7: Espectro de RMN ^{13}C de S-3 (CDCl_3 , 200 MHz)	76
FIGURA 4.8: Espectro de RMN ^1H de S-4 (CDCl_3 , 200 MHz)	81
FIGURA 4.9: Espectro de RMN ^{13}C de S-4 (CDCl_3 , 400 MHz)	82
FIGURA 4.10: Experimento de HSQC de S-4	83
FIGURA 4.11: Experimento de HMBC de S-4	84

FIGURA 4.12: Proposta de fragmentação para S-5	89
FIGURA 4.13: Espectro de RMN ^1H obtido para S-5 (CDCl_3 , 400 MHz)	90
FIGURA 4.14: Espectro de massas (full scan) APcI (+) de S-5	91
FIGURA 4.15: Experimento de HSQC de S-5	92
FIGURA 4.16: Experimento de HMBC de S-5	93
FIGURA 4.17: Espectro de massas de íons filhos de m/z 409 (40 eV)	94
FIGURA 4.18: Reprodução da visão espacial de S-6, obtida pela otimização geométrica feita por um programa computacional.	99
FIGURA 4.19: Espectro de RMN ^1H obtido para S-6 (CD_3OD , 400 MHz)	101
FIGURA 4.20: Espectro de RMN ^{13}C para S-6 (CD_3OD , 100 MHz)	102
FIGURA 4.21: Espectro de massas (full scan) APcI (+) de S-6	103
FIGURA 4.22: Experimento de HSQC S-6.	104
FIGURA 4.23: Experimento de HMBC S-6.	105
FIGURA 4.24: Experimento de COSY S-6.	106
FIGURA 4.25: Experimento de TOSY S-6.	107
FIGURA 4.26: Proposta de fragmentação para S-7	111
FIGURA 4.27: Espectro de RMN ^1H obtido para S-7 (400 MHz, acetona-d)	112
FIGURA 4.28: Espectro de RMN ^{13}C obtido para S-7 (100 MHz, acetona-d ₆)	113
FIGURA 4.29: Espectro de massas (full scan) ESI ⁻ de S-7.	114
FIGURA 4.30: Experimento de HMQC S-7	115
FIGURA 4.31: Experimento de COSY S-7	116
FIGURA 4.32: Espectro de absorção no infravermelho para S-7 (KBr)	117
FIGURA 4.33: Experimento de HMBC de S-7.	118
FIGURA 4.34: Espectro de íons filhos de m/z 269 (30 eV)	119
FIGURA 4.35: Proposta de fragmentação para S-8	123
FIGURA 4.36: Espectro de RMN ^1H obtido para S-8 (400 MHz, aceto-d ₆)	124
FIGURA 4.37: Espectro de RMN ^{13}C obtido para S-8 (100 MHz, aceto-d ₆)	125

FIGURA 4.38: Espectro de massas (full scan) ESI ⁻ de S-8.	126
FIGURA 4.39: Experimento de HSQC S-8	127
FIGURA 4.40: Experimento de HMBC de S-8	128
FIGURA 4.41: Espectro de massas de íons filhos de 285 (30 eV)	129
FIGURA 4.42: Estrutura inicialmente sugerida para S-9	131
FIGURA 4.43: Proposta de fragmentação para S-9	136
FIGURA 4.44: Espectro de RMN ¹ H obtido para S-9 (CDCl ₃ , 400 MHz)	137
FIGURA 4.45: Espectro de RMN ¹³ C obtido para S-9 (CDCl ₃ , 50 MHz)	138
FIGURA 4.46: Espectro de massas (full scan) ESI ⁻ de S-9	139
FIGURA 4.47: Espectro de absorção no infravermelho para S-9 (KBr)	140
FIGURA 4.48: Experimento de HSQC S-9	141
FIGURA 4.49: Experimento de COSY S-9	142
FIGURA 4.50: Experimento de HMBC S-9	143
FIGURA 4.51: Espectro de MS de íons filhos de m/z 283 (30 eV) de S-9	144
FIGURA 4.52: Propostas de fragmentação para S-10	149
FIGURA 4.53: Espectro de RMN ¹ H obtido para S-10 (400 MHz, CDCl ₃)	150
FIGURA 4.54: Espectro de RMN ¹³ C para S-10 (100 MHz, CDCl ₃)	151
FIGURA 4.55: Espectro de DEPT S-10	152
FIGURA 4.56: Espectro de absorção no infravermelho para S-10 (KBr)	153
FIGURA 4.57: Espectro de full scan ESI ⁻ de S-10	154
FIGURA 4.58: Íons filhos de m/z 249	154
FIGURA 4.59: Experimento de HSQC de S-10	155
FIGURA 4.60: Experimento de COSY S-10	156
FIGURA 4.61: Experimento de HMBC S-10	157
FIGURA 4.62: Propostas de fragmentação para S-11	161
FIGURA 4.63: Espectro de RMN ¹ H de S-11 (CDCl ₃ , 400 MHz)	162
FIGURA 4.64: Espectro de RMN ¹³ C obtido para S-11 (CDCl ₃ , 50 MHz)	163

FIGURA 4.65: Espectro de massas (ful scan) ESI (-) de S-11	164
FIGURA 4.66: Experimento de HSQC de S-11	165
FIGURA 4.67: Experimento de HMBC de S-11	166
FIGURA 4.68: Espectro de massas de íons filhos de m/z 265	167
FIGURA 4.69: Conformação espacial de S-12	173
FIGURA 4.70: Propostas de fragmentação para S-12	173
FIGURA 4.71: Espectro de RMN ¹ H de S-12 (CDCl ₃ , 400 MHz)	174
FIGURA 4.72: Espectro de RMN ¹³ C obtido para S-12 (CDCl ₃ , 50 MHz)	175
FIGURA 4.73: Espectro de massas (full scan) de S-12	176
FIGURA 4.74: Espectro de absorção no infravermelho de S-12 (KBr)	177
FIGURA 4.75: Experimento de HSQC de S-12	178
FIGURA 4.76: Experimento de HMBC de S-12	179
FIGURA 4.77: Espectro de massas de íons filhos de m/z 423 (20 eV)	180
FIGURA 4.78: Propostas de fragmentação para S-13	188
FIGURA 4.79: Espectro de RMN ¹ H para S-13 (acetona-d ₆ , 400 MHz)	189
FIGURA 4.80: Espectro de RMN ¹³ C de S-13 (acetona-d ₆ , 100 MHz)	190
FIGURA 4.81: Espectro de massas (<i>full scan</i>) ESI (-) de S-13	191
FIGURA 4.82: Espectro de absorção no infravermelho de S-13 (KBr)	192
FIGURA 4.83: Experimento de HSQC de S-13	193
FIGURA 4.84: Experimento de HMBC de S-13	194
FIGURA 4.85: Experimento de COSY de S-13	195
FIGURA 4.86: Espectro de massas de íons filho de m/z 425	196
FIGURA 4.87: Fragmentações proposta para S-14	205
FIGURA 4.88: Espectro de RMN ¹ H de S-14 (CDCl ₃ , 400 MHz)	206
FIGURA 4.89: Espectro de RMN ¹³ C de S-14 (CDCl ₃ , 100 MHz)	207
FIGURA 4.90: Espectro de massas (full scan) ESI (-) de S-14	208
FIGURA 4.91: Experimento de HSQC para S-14	209

FIGURA 4.92: Experimento de HMBC para S-14	210
FIGURA 4.93: Experimento de COSY para S-14	211
FIGURA 4.94: Espectro de MS de íons filhos de m/z 500 (ESI -, 30 eV)	212
FIGURA 4.95: Espectro de RMN ¹ H para S-15 (DMSO-d ₆ , 200 MHz)	215
FIGURA 4.96: Espectro de RMN ¹³ C para S-15 (DMSO-d ₆ , 200 MHz)	216
FIGURA 4.97: Experimento de HSQC de S-15	217
FIGURA 4.98: Experimento de HMBC de S-15	218
FIGURA 4.99: Espectro de RMN ¹ H de S-16 (DMSO-d ₆ , 400 MHz)	222
FIGURA 4.100: Espectro de RMN ¹³ C de S-16 (DMSO-d ₆ , 100 MHz)	223
FIGURA 4.101: Espectro de massas (full scan) ESI (-) de S-16	224
FIGURA 4.102: Experimento de HSQC de S-16	225
FIGURA 4.103: Experimento de HMBC de S-16	226
FIGURA 4.104: Íons filhos de m/z 268 de S-16 (ESI (+), 20 eV)	227
FIGURA 4.105: Espectro de RMN ¹ H de S-17 (D ₂ O, 200 MHz)	229
FIGURA 4.106: Espectro de RMN ¹³ C obtido para S-17 (D ₂ O, 50 MHz)	230
FIGURA 4.107: Espectro de massas (full scan) ESI (-) obtido para S-17	231
FIGURA 4.108: Espectro de RMN ¹ H de S-18 (D ₂ O, 200 MHz)	233
FIGURA 4.109: Espectro de RMN ¹³ C de S-18 (D ₂ O, 50 MHz)	234
FIGURA 4.110: Espectro de RMN ¹ H obtido para S-19 (CDCl ₃ , 200 MHz)	237
FIGURA 4.111: Espectro de RMN ¹³ C para S-19 (CDCl ₃ , 50 MHz)	238
FIGURA 4.112: Espectro de DEPT 135 para S-19 (CDCl ₃ , 50 MHz)	239
FIGURA 4.113: Espectro de RMN ¹ H de S-20 (CDCl ₃ , 400 MHz)	245
FIGURA 4.114: Espectro de RMN ¹³ C para S-20 (CDCl ₃ , 200 MHz)	246
FIGURA 4.115: Espectro de DEPT 135° para S-20 (CDCl ₃ , 200 MHz)	247
FIGURA 4.116: Espectro de massas (full scan) ESI (+) de S-20	248
FIGURA 4.117: Experimento de HSQC de S-20	249
FIGURA 4.118: Experimento de HMBC de S-20	250

FIGURA 4.119: Experimento de COSY de S-20	251
FIGURA 4.120: Proposta de fragmentação de S-21	255
FIGURA 4.121: Espectro de RMN ¹ H de S-21 (400 MHz, CDCl ₃)	256
FIGURA 4.122: Espectro de RMN ¹³ C de S-21 (200 MHz, CDCl ₃)	257
FIGURA 4.123: Experimento de HSQC de S-21	258
FIGURA 4.124: Experimento de HMBC de S-21	259
FIGURA 4.125: Experimento de COSY de S-21	260
FIGURA 4.126: Espectro de massas (full scan) ESI (+) de S-21	261
FIGURA 4.127: Espectro de íons filhos de m/z 131 (ESI (+), 10 eV)	262
FIGURA 4.128: Proposta de fragmentação para S-22	267
FIGURA 4.129: Espectro de RMN ¹ H para S-22 (CD ₃ OD, 400 MHz)	268
FIGURA 4.130: Espectro de RMN ¹³ C de S-22 (CD ₃ OD, 50 MHz)	269
FIGURA 4.131: Espectro de massas (full scan) ESI (-) de S-22	270
FIGURA 4.132: Experimento de HSQC para S-22	271
FIGURA 4.133: Experimento de HMBC para S-23	272
FIGURA 4.134: Espectro de massas de íons filhos de m/z 753 (ESI (-))	273
FIGURA 4.135: Mecanismo de ação hipotético baseado nas observações experimentais.	282

RESUMO

Metabolismo secundário de fungos endofíticos do gênero *Penicillium* associados as plantas *Murraya paniculata* (Rutaceae) e *Melia azedarach* (Meliaceae). Os fungos *Penicillium* sp A, *Penicillium* sp B (*M. paniculata*) e *P. herquei* (*M. azedarach*) foram cultivados em meios de cultura líquido (Czapeck's) e meio sólido (Arroz) para crescimento das colônias. Após o período de cultivo os crescimentos dos fungos foram interrompidos com metanol, posteriormente foram obtidos os extratos das biomassas produzidas utilizando-se técnicas de maceração com solventes orgânicos. Os extratos brutos foram fracionados através de partições líquido-líquido e cromatografia em coluna a vácuo. As frações obtidas foram então refracionadas utilizando-se cromatografia em coluna, cromatografia em camada delgada preparativa e HPLC para isolamento dos constituintes químicos. As substâncias tiveram as suas estruturas elucidadas através da utilização de técnicas espectrométricas de RMN, EM e IV. Onde foram isoladas substâncias das classes dos nucleosídeos, esteróides, carboidratos, policetídeos, entre outras. Foram realizados ensaios antimicrobianos com as substâncias puras, sendo que os policetídeos citrinina, citrinina-D, citrinina H1, emodina, citreoroseina e janthinona apresentaram bons resultados. Realizaram-se, ainda, ensaios leishmanicidas com as substâncias emodina, citreoroseina e janthinona, somente a primeira apresentou atividade considerável. As propostas de fragmentação por massas e de biogênese de alguns constituintes químicos são discutidas no trabalho.

ABSTRACT

Secondary metabolism of endophytic fungus from *Penicillium* genus associated to *Murraya paniculata* (Rutaceae) and *Melia azedarach* (Meliaceae) plants. The *Penicillium* sp. A, *Penicillium* sp. B (*M. paniculata*) and *P. herquei* (*M. azedarach*) fungus were grown in liquid media (Czapeck's) and also in solid media (rice). After the inoculation of the fungus, their growth were interrupted by addition of methanol. The extracts of the biomass were obtained by several maceration techniques using organic solvents. The crude extracts were fractionated by liquid-liquid partition and also several chromatography techniques. The pure compounds were obtained by refractionation of previous fractions by column chromatography, thin layer chromatography and HPLC. The structures of the compounds were elucidated by several spectroscopic techniques as NMR, MS and IR. Several classes of compounds were isolated as nucleosides, esters, carbohydrates, polyketides among many others. Antimicrobial assays were carried out with purified compounds, where the polyketides citrinine, citrinine-D, citrinine H1, emodine, citreoroseine and janthione showed promising results. Leishmanicidal assays were also carried out using emodine, citreoroseine and janthione, where only the former showed a reasonable activity. The fragmentation by MS and also the biogenesis proposal of some isolated compounds are discussed in the present work.

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	01
1.1 - Interação planta-fungo endofítico	03
1.2 - Plantas hospedeiras	04
1.2.1 - Melia azedarach (Meliaceae)	04
1.2.2 - Murraya paniculata (Rutaceae)	07
1.3 - Gênero Penicillium	10
1.4 - Bactérias	19
1.4.1 - Pseudomonas aeruginosa	19
1.4.2 - Escherichia coli	20
1.4.3 - Bacillus subtilis	20
1.5 - Leishmanioses	21
2 - OBJETIVOS	25
3 – PARTE EXPERIMENTAL	27
3.1 - MATERIAL UTILIZADO	28
3.2 - METODOLOGIA	31
3.2.1 - Isolamento dos fungos endofíticos	31
3.2.2 - Reativação dos fungos	32
3.2.3 - Cultivo dos fungos	33
3.2.3.1 - Cultivo em meio líquido	33
3.2.3.2 - Cultivo em meio sólido	33
3.2.4 - Obtenção dos extratos	34

3.2.4.1 - <i>Penicillium</i> sp A (<i>Murraya paniculata</i>)	34
3.2.4.1.1 - Meio líquido	34
3.2.4.1.2 -Meio sólido (Arroz)	36
3.2.4.2 - <i>Penicillium</i> sp B (<i>Murraya paniculata</i>)	37
3.2.4.2.1 - Meio líquido	37
3.2.4.3 - <i>P. herquei</i> (<i>Melia azedarach</i>)	38
3.2.4.3.1 - Meio líquido	38
3.2.4.3.2 -Meio sólido (Arroz)	39
3.2.5 - Fracionamento dos Extratos e Isolamento dos Metabólitos	40
3.2.5.1 - <i>Penicillium</i> sp A (<i>M. paniculata</i>)	40
3.2.5.1.1 -Meio sólido	40
3.2.5.1.2 - Meio líquido	41
3.2.5.2 - <i>Penicillium</i> sp B (<i>M. paniculata</i>)	42
3.2.5.3 - <i>P. herquei</i> (<i>M. azedarach</i>)	42
3.3 - Metodologia usada nos ensaios biológicos	46
3.3.1 - Ensaio antimicrobianos	46
3.3.2 - Ensaio preliminar	48
3.3.3 - Ensaio para medir a concentração mínima inibitória (MIC).	49
3.3.4 -Tipo de atividade	50
3.3.5 -Ensaio leishmanicida	51
4 – RESULTADOS E DISCUSSÕES	53
4.1 – Substâncias Isoladas	54
4.1.1 - Substâncias isoladas de <i>Penicillium</i> sp A (<i>M. paniculata</i>)	54
4.1.2 - Substâncias isoladas de <i>Penicillium</i> sp B (<i>M. paniculata</i>)	57
4.1.3 - Substâncias isoladas de <i>P. herquei</i> (<i>M. azedarach</i>)	58

4.2 - IDENTIFICAÇÃO DAS ESTRUTURAS	62
4.2.1 - ESTERÓIDES	62
4.2.1.1 - S-1 – Ergosterol	62
4.2.1.2 - S-2 – Peróxido de ergosterol	68
4.2.1.3 - S-3 – Cerivisterol	72
4.2.1.4 - S-4 – Esteróide 1A	77
4.2.1.5 - S-5 – Esteróide 2A	85
4.2.1.6 - S-6 – Neociclocitrinol	95
4.2.2 - POLICETIDEOS	108
4.2.2.1 - S-7 – Emodina	108
4.2.2.2 - S-8 – Citreorseina	120
4.2.2.3 - S-9 – Janthinona	130
4.2.2.4 - S-10 – Citrinina	145
4.2.2.5 - S-11 – Dihidrocitrinona	158
4.2.2.6 - S-12 – Citrinina – D	168
4.2.2.7 - S-13 – Citrinina H1	181
4.2.2.8 - S-14 – GKK1032	197
4.2.3 - NUCLEOSÍDEOS	213
4.2.3.1 - S-15 – Uracila	213
4.2.3.2 - S-16 – Adenosina	219
4.2.4 - CARBOIDRATOS	228
4.2.4.1 - S-17 – Ducitol	228
4.2.4.2 - S-18 – Alfa-D-glucopirranose	233
4.2.5 - GLICERÍDEOS	235
4.2.5.1 - S-19 – Triglicerídeos	235
4.2.5.2 - S-20 – Monoglicerídeo	240
4.2.6 - OUTRAS CLASSES	252

4.2.6.1 - S-22: Lactona	252
4.2.6.2 - S-23 – Cerebrosida	263
4.3 - RESULTADO DOS ENSAIOS BIOLÓGICOS	274
4.3.1 - ENSAIOS ANTIMICROBIANOS	274
4.3.2 - ENSAIOS LEISHMANICIDAS	278
5 - CONCLUSÃO	285
6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	287
7 – ANEXOS	299
7.1 – ANEXO 01	299
7.2 – ANEXO 02	307

1 - INTRODUÇÃO

Desde os tempos mais remotos os fungos estão presentes na vida da humanidade seja pela fermentação de bebidas, como no preparo da cerveja, servindo de alimento, como é o caso dos fungos comestíveis, ou pela produção de medicamentos tendo como exemplo mais clássico a obtenção da penicilina de *Penicillium notatum*. Nos últimos anos tem aumentado o interesse no estudo de fungos, principalmente dos chamados fungos endofíticos, que são fungos que colonizam os tecidos internos das plantas [1], na busca de novas substâncias com atividades que possam ser úteis aos homens.

O mecanismo de interação dos fungos endofíticos com as suas hospedeiras ainda não está completamente desvendado principalmente do ponto de vista químico, pois sabe-se que estes vivem de maneira neutra ou até mesmo mutualista com as plantas hospedeiras produzindo substâncias que auxiliam o sistema imunológico desta no combate a infestações por bactérias, vírus e até mesmo outros fungos [2]. Os fungos endofíticos são bons produtores de metabolitos secundários, muitos inéditos e que podem ser utilizados na indústria farmacêutica, biotecnologia e agricultura [1,2,3,4].

Assim, é necessário o estudo químico destes fungos com o intuito de descobrir novas substâncias com alguma eventual atividade biológica que venha ajudar no combate de males a humanidade como, por exemplo, as doenças causadas por bactérias e protozoários, como o caso das leishmanioses que infectam milhões de pessoas no mundo principalmente nos países subdesenvolvidos. Além de também contribuir para o entendimento da interação planta/fungo.

1.1 - Interação planta-fungo endofítico

Os fungos endofíticos podem estar presentes em todos os tecidos das plantas hospedeiras podendo ser isolados centenas de endofíticos de uma mesma planta. No entanto, o número de fungos endofíticos dominantes em uma espécie de planta varia entre 1 a 10 fungos [1]. A localização de um fungo endofítico num dado órgão da planta ocorre de modo específico, onde esta especificidade está relacionada às condições fisiológicas do hospedeiro e aos processos de adaptação [5].

Para penetrar a planta os fungos endofíticos precisam superar as barreiras físicas e por sua vez a planta responde a esta invasão com suas armas de defesa e de reconhecimento impedindo que o fungo se espalhe pelos tecidos tornando as infecções endofíticas localizadas [1, 6] (FIGURA 1.1).

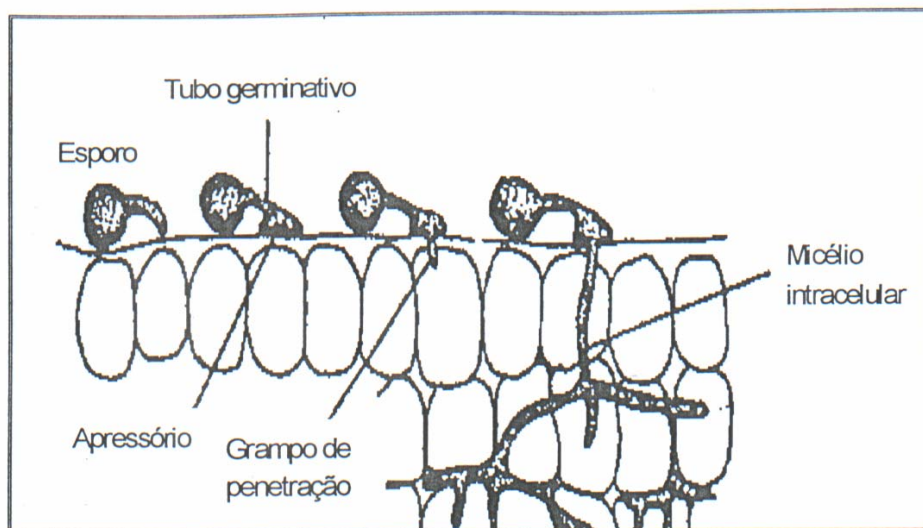


FIGURA 1.1: Representação esquemática da invasão de um fungo endofítico a planta hospedeira [7].

Existem ainda relatos de um possível “aprendizado” conhecido por “transferência genética horizontal” entre fungo e planta, que seria a capacidade dos organismos associados produzirem a mesma classe de substâncias [8]. Como exemplo disto temos o fungo *Gibberella fugikuroi*, associado à planta *Cucurbita maxima*, produz derivados do ácido giberélico [9], um diterpeno com atividade hormonal no crescimento de plantas. A planta *Baccharis megapotonica* (exclusivamente a planta fêmea) associada aos fungos *Fusarium* e *Myrothecium* produz micotoxinas da classe dos tricotecenos macrocíclicos [10]. Várias espécies de fungos endofíticos em *Taxus brevifolia* (*Taxosmyces andenea*, *Alternaria alternata*, *Fusarium graminearum*, etc) produzem taxol [3,4], um diterpeno com potente atividade anticâncer.

Uma possível prova desse “aprendizado” tem sido demonstrada com a transferência de tricodieno sintetase de fungos de gênero *Fusarium* para a planta *Nicotina tabacum*. Essa transferência leva a planta a produzir tricodieno [11].

1.2 - Plantas hospedeiras

1.2.1 - *Melia azedarach* (Meliaceae)

A espécie *Melia azedarach* é conhecida popularmente como “cinamono”, “contas de santa bárbara”, “para-raios” e “cereja da china”. Ela é uma árvore com 10 a 20 metros de altura, de copa arredondada com 30 metros de diâmetro em média.

M. azedarach pertence à família Meliaceae, que é composta de 51 gêneros distribuídos em 1400 espécies nas regiões tropicais e subtropicais do mundo [12]. As espécies dessa família geralmente são árvores de grande porte

conhecidas pela qualidade de suas madeiras como a *Swietenia macrophylla* (mogno brasileiro), *khaya ivorensis* (mogno africano), *Cedrela* sp (cedro-rosa) e *Cabralea cangerana* (cangerana) [13]. Além de fornecer madeira de qualidade as espécies da família Meliaceae também apresentam substâncias com atividade biológicas úteis tais como anticâncer, antimicrobiana, inseticida e antiviral [14].

Em trabalho anterior realizado no Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos foram isolados vários fungos endofíticos dos tecidos sadios de uma espécie de *M. azedarach* coletada no campus da universidade (QUADRO 01), onde uma exsicata foi depositada no herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal de São Carlos. A identificação das espécies de fungos foi realizada pela Profª Dra Maria Francisca Simas Teixeira do Departamento de Parasitologia da Universidade Federal do Amazonas [15].

QUADRO 01: Fungos endofíticos isolados de *Melia azedarach*

Parte da planta	Fungo
Córtex das raízes	<i>Aspergillus ochraceus</i> <i>Fusarium moniliforme</i> <i>Trichoderma koningii</i> Ouderm <i>Trichoderma</i> sp <i>Trichoderma nivale</i> <i>Aspergillus pulvurulentus</i> (Mc Alpine)
Xilema das raízes	<i>Penicillium rugulosum</i> Thom.
Córtex do caule	<i>Balansia</i> sp <i>Gilmaniella</i> sp <i>Penicillium simplicissimum</i> <i>Pestalotiopsis versicolor</i> Fungo escuro-dematiaceo
Folhas	<i>Penicillium rubrum</i> Stoel <i>Aspergillus niger</i> van Tiejhem <i>Aspergillus japonicus</i> Saito <i>Aspergillus aculeatus</i> Lizuca <i>Aspergillus carbonarius</i> (Bain) <i>Nigrospora</i> sp <i>Penicillium citrinum</i> <i>Aspergillus</i> sp Fungo branco <i>Aspergillus flavus</i> <i>Penicillium rubrum</i> Stoll Fungo escuro-dematiaceo
Folhas amarelas	<i>Penicillium</i> sp Fungo escuro-dematiaceo
Frutos comuns	Basidiomiceto <i>Penicillium janthinellum</i> <i>Aspergillus japonicus</i> Saito
Frutos maduros	<i>Gilmaniella</i> sp <i>Aspergillus</i> sp
Frutos secos	<i>Penicillium herque</i> Bainier and Sartory <i>Gilmaniella</i> sp <i>Penicillium implicatum</i> Biorgue <i>Penicillium rubrum</i> Stoll

1.2.2 - *Murraya paniculata* (Rutaceae)

M. paniculata é pertencente a ordem Sapindales, onde esta é constituída pelas famílias Rutaceae, Cneoraceae, Simaroubaceae, Meliaceae e Burseraceae [16]. Originalmente asiática foi introduzida no Brasil por paisagistas, conhecida como “murta” ou “murta do campo” é muito encontrada nas ruas e praças das cidades do Estado de São Paulo.

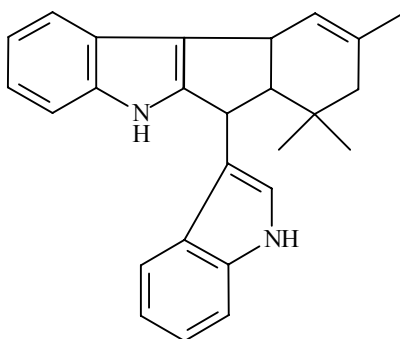
Várias partes da planta são utilizadas na medicina tradicional chinesa devido ser atribuído a esta, atividades analgésica, antifebril, antidesindérica e contraceptiva. A atividade contraceptiva é atribuída a presença do alcalóide *yuehchukeno* (a) nas raízes e caule da planta [17].

No laboratório de Química de Produtos Naturais da Universidade Federal de São Carlos foram feitas tentativas de isolamento desses alcalóides de uma espécie de *M. paniculata* coletada no Estado de São Paulo – BRA. No entanto estas substâncias não foram encontradas, sendo isolado somente cumarinas e flavonóides polimetoxilados [18].

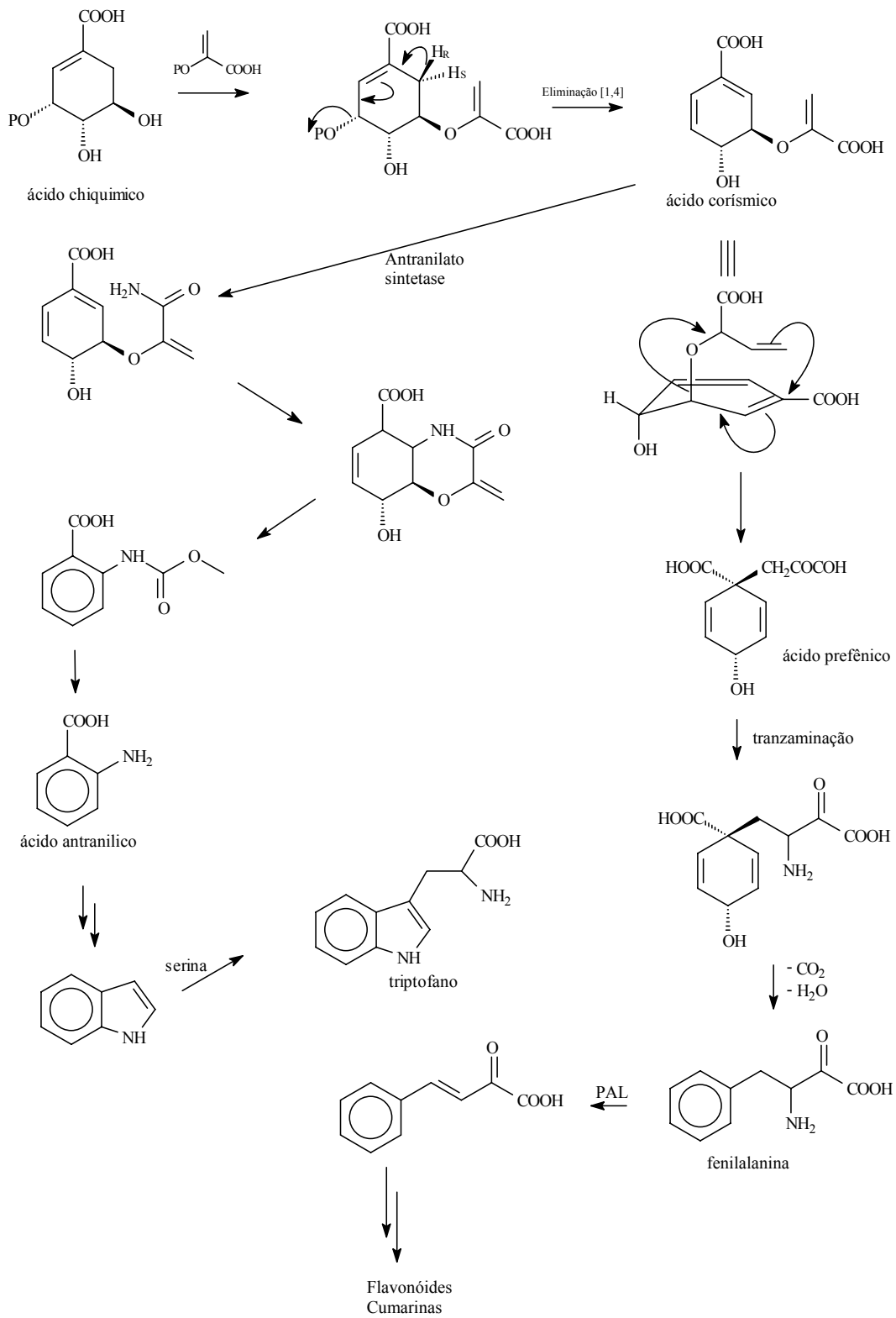
A biogênese de flavonóides e cumarinas (C6-C3) e alcalóides (derivados do triptofano) têm um ponto em comum conforme mostra o ESQUEMA 01. A ação da enzima fenilalanina-amônio-liase (PAL) transforma fenilalanina em derivados do ácido cinâmico que leva à formação de cumarinas, flavonóides e lignanas. Por outro lado, o ácido corísmico pode ser transformado em ácido antranílico que levaria ao triptofano, precursor dos alcalóides [19].

Então surgiu a hipótese de que os fungos endofíticos seriam responsáveis pela não ocorrência dos alcalóides em espécies de *Murraya* coletadas no Brasil. Devido ao alto grau de infestação da planta por fungos esta estaria bloqueando a rota que leva aos alcalóides para potencializar a rota dos flavonóides, que como se sabe, são fitoalexinas e ajudariam a planta no combate as infestações.

Então na tentativa de responder a esse questionamento, o Prof Dr Edson Rodrigues Filho, juntamente com seu grupo de pesquisa resolveu estudar os fungos endofíticos da planta. Vários fungos endofíticos foram isolados dos tecidos de *M. paniculata* confirmando a hipótese que a planta está altamente investada por fungos [20].



a) *yuehchukeno*

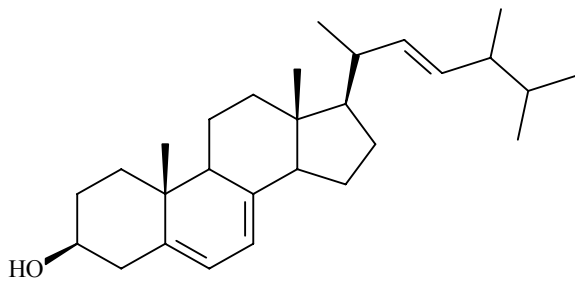


ESQUEMA 01: Precursores biossintéticos de cumarinas, flavonóides e alcalóides.

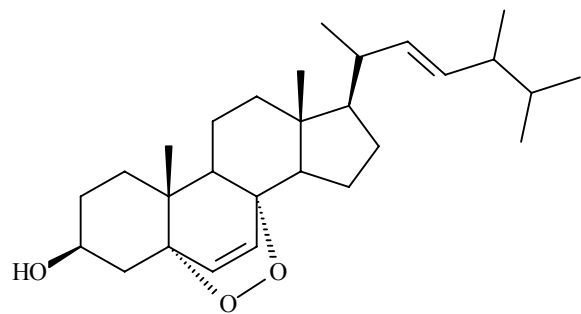
1.3 - Gênero *Penicillium*

Dentre as várias espécies de fungos endofíticos isolados de ambas as plantas, foi escolhido como alvo deste trabalho os fungos do gênero *Penicillium* devido estes possuírem rápido crescimento nos meios de cultura utilizados e por produzirem vários metabólitos secundários como alcalóides, meroterpenos, policetídeos, terpenóides, esteróides, aminoácidos, entre outras, muitos com as mais diversas atividades biológicas. A seguir serão mostradas substâncias isoladas de espécies de *Penicillium*.

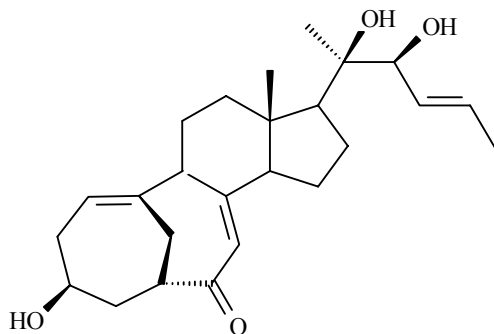
Esteróides



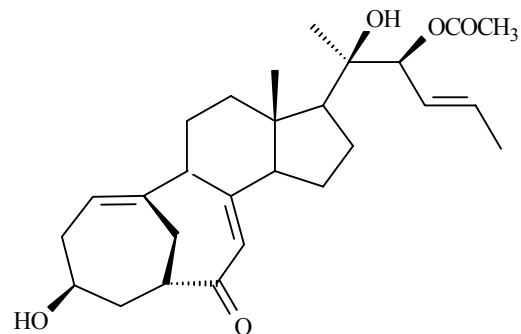
Ergosterol
P. janthinellum [21]



Peróxido de ergosterol
P. janthinellum [21]

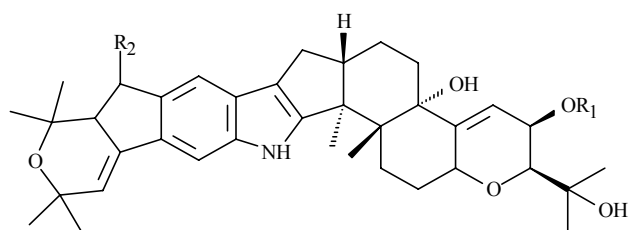


Isociclocitrinol
P. citrinum [22]



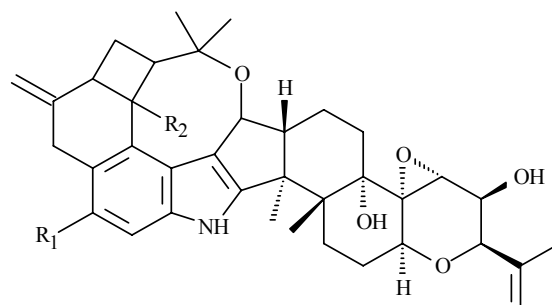
22-acetilisociclocitrinol
P. citrinum [22]

Alcalóides



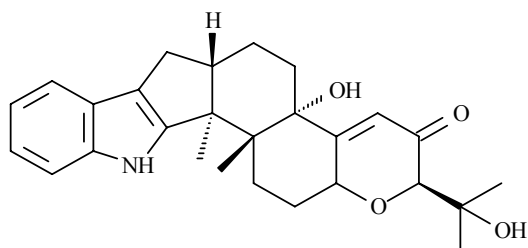
	R ₁	R ₂
Janthitrem B	OH	OH
Janthitrem C	OH	H
Janthitrem E	H	OH
Janthitrem F	Ac	OH
Janthitrem G	Ac	H

P. janthinellum [23]

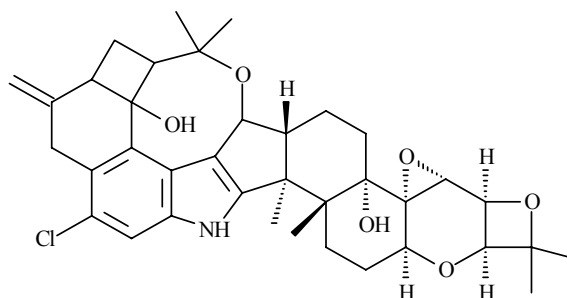


	R ₁	R ₂
Penitrem A	Cl	OH
Penitrem B	H	H
Penitrem C	Cl	H
Penitrem D	H	H
Penitrem E	H	OH
Penitrem F	Cl	H

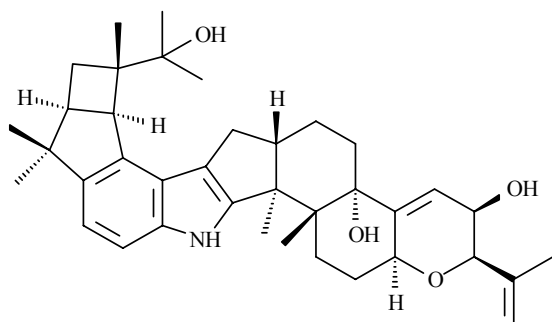
Penicillium sp [24]



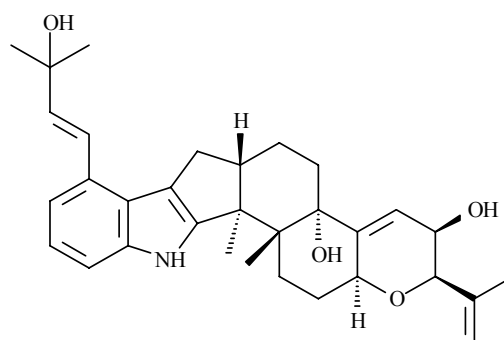
Paxilina
P. paxilli [23]



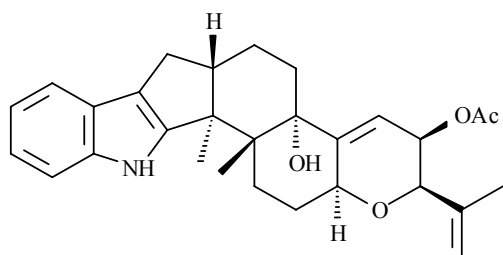
Pennigritrem
Penicillium sp [24]



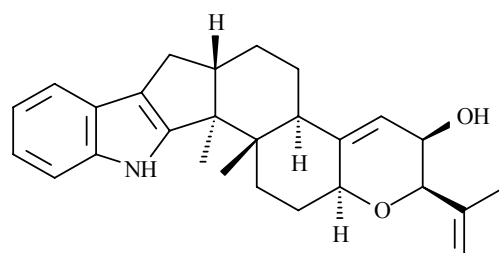
P. crustosum [25]



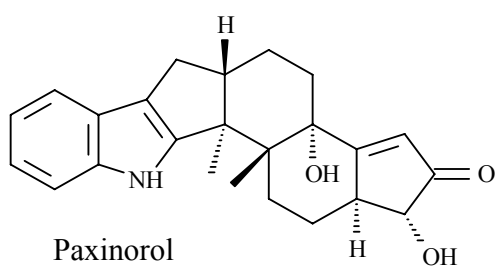
P. crustosum [25]



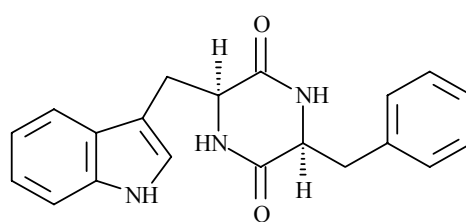
P. crustosum [25]



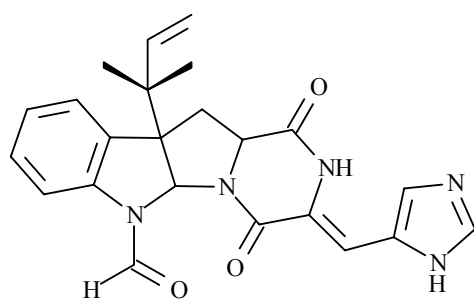
P. crustosum [25]



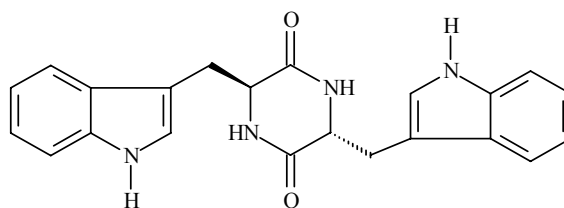
Paxinorol
P. paxilli [26]



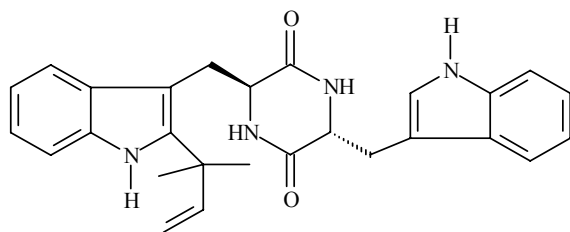
Penicillium sp [27]



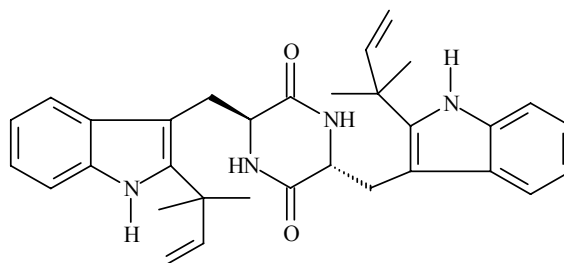
P. verrucosum [28]



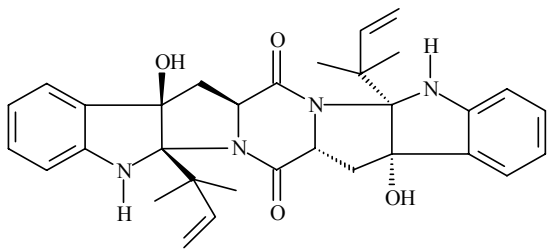
Fellutanina A
P. fellutanum [29]



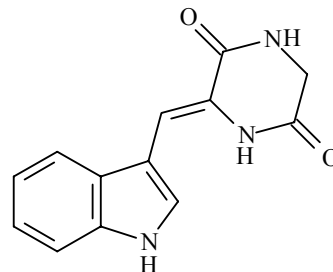
Fellutanina B
P. fellutanum [29]



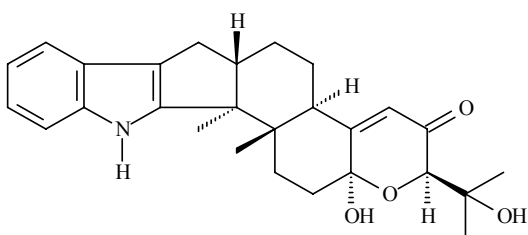
Fellutanina C
P. fellutanum [29]



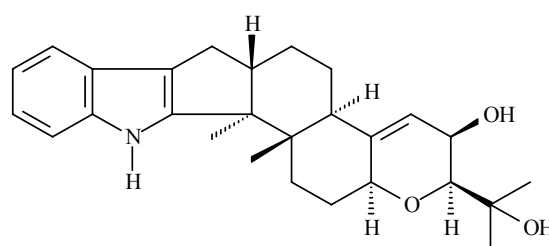
Fellutanina D
P. fellutanum [29]



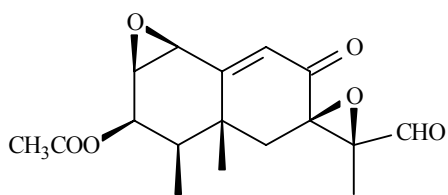
Dipodazina
P. dipodomuis [30]



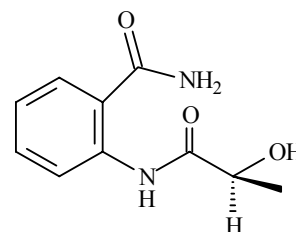
7 α -hidroxi-13-desoxy paxillina
P. paxilli [31]



10 β -hidroxi-13-desoxy paxillina
P. paxilli [31]

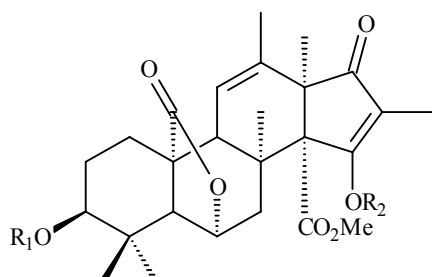


P. chrysogenum Thom [32]

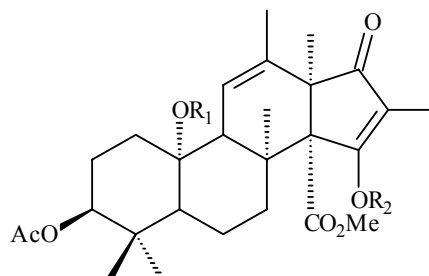


P. chrysogenum Thom [32]

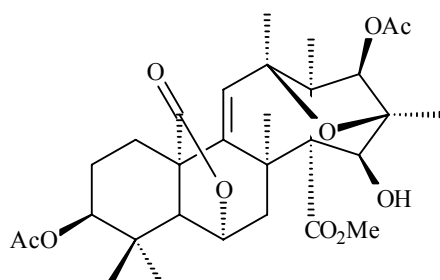
Meroterpenos



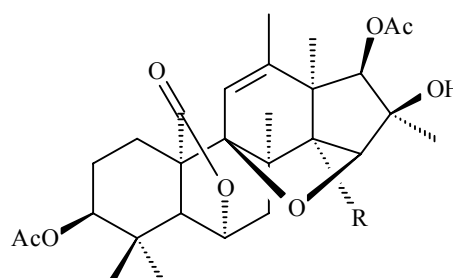
	R ₁	R ₂
Citreohibridona A	Ac	Ac
Citreohibridona B	Ac	Me
Citreohibridona C	H	Me
<i>P. citreo-viride</i> [33]		



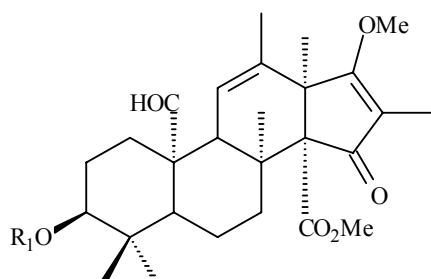
	R ₁	R ₂
Citreohibridona D	CHO	Ac
Citreohibridona E	CO ₂ H	Ac
Citreohibridona F	CO ₂ Me	Ac
Citreohibridona G	CHO	Me
<i>P. citreo-viride</i> [33]		



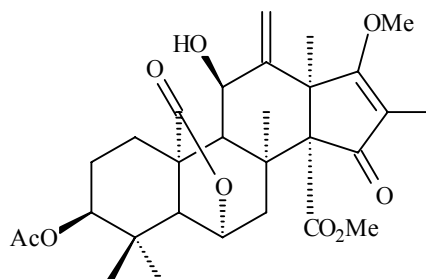
Citreohibridona J
P. citreo-viride [33]



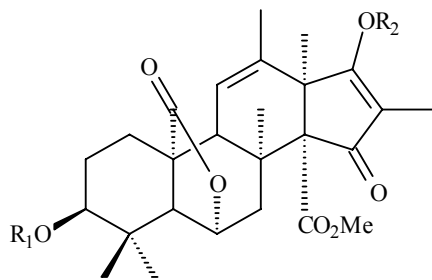
	R
Citreohibridona K	CO ₂ Me
Citreohibridona L	CH ₂ Oac
<i>P. citreo-viride</i> [33]	



Isocitreohibridona G
P. citreo-viride [33]

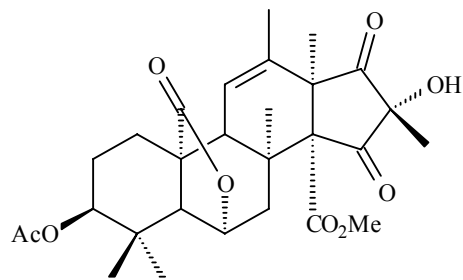


Isocitreohibridona I
P. citreo-viride [33]

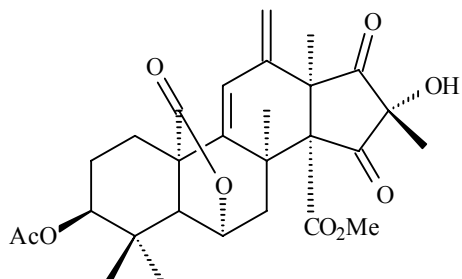


	R ₁	R ₂
Isocitreohybridona A	Ac	Ac
Isocitreohybridona B	Ac	Me
Isocitreohybridona C	H	Me
Isocitreohybridona H	Ac	Et

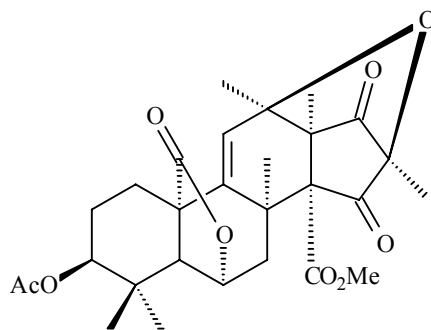
P. citreo-viride [33]



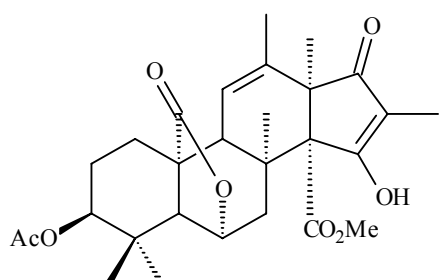
Citreohybridona A
P. citreo-viride [33]



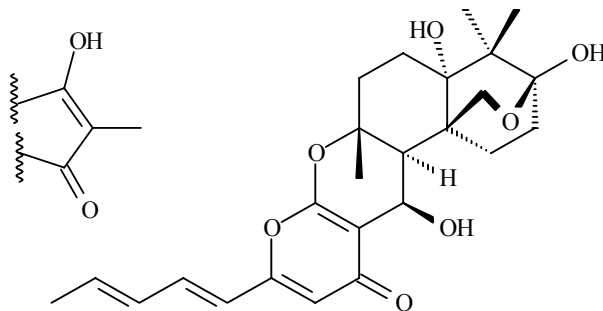
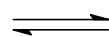
Citreohybridona B
P. citreo-viride [33]



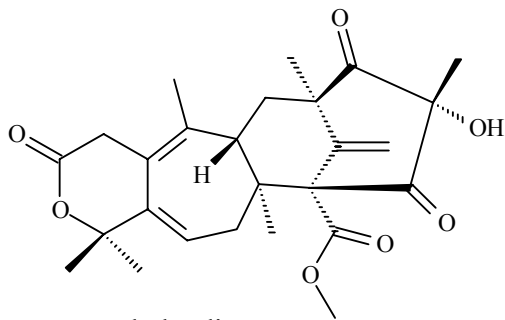
Citreohybridona C
P. citreo-viride [33]



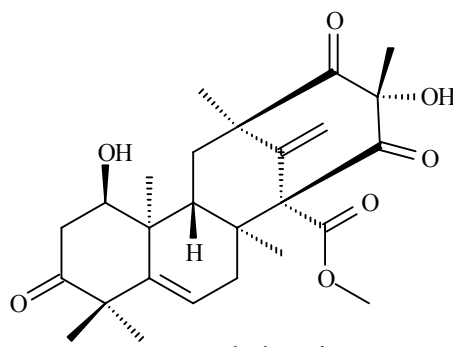
Citreohybridonol
P. citreo-viride [33]



Hesseltina
P. hesseltinei [34]

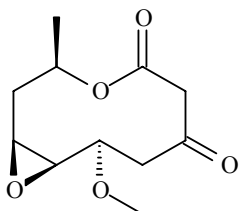


Berkeleydiona
Penicillium sp [35]

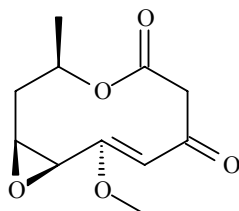


Berkeleytriona
Penicillium sp [35]

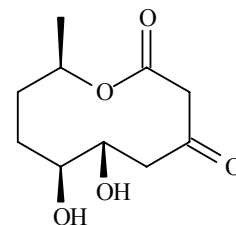
Policetideos



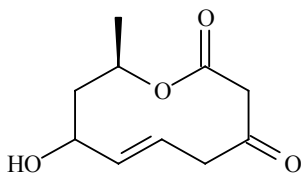
Decarestrictina E
Penicillium sp [36]



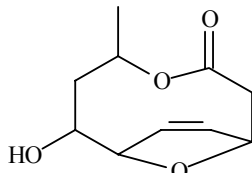
Decarestrictina F
Penicillium sp [36]



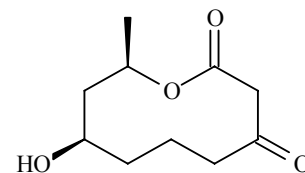
Decarestrictina G
Penicillium sp [36]



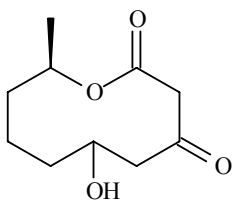
Decarestrictina H
Penicillium sp [36]



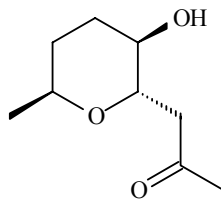
Decarestrictina I
Penicillium sp [36]



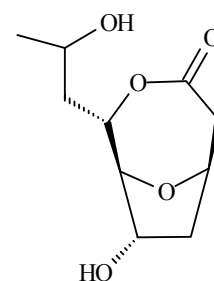
Decarestrictina J
Penicillium sp [36]



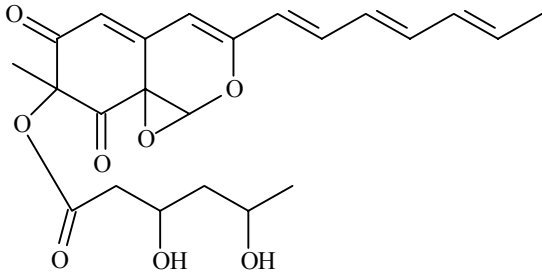
Decarestrictina K
Penicillium sp [36]



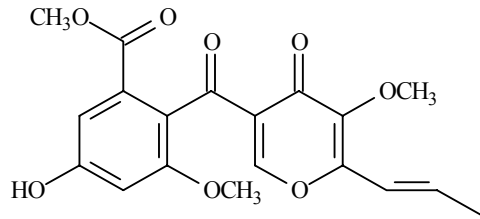
Decarestrictina L
Penicillium sp [36]



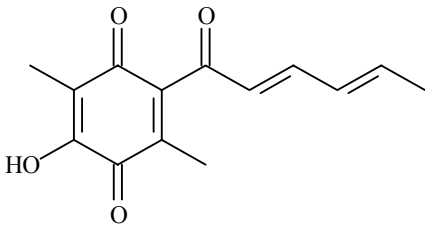
Decarestrictina M
Penicillium sp [36]



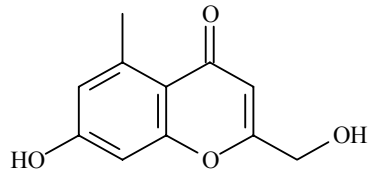
Patulodina
P. urticae [37]



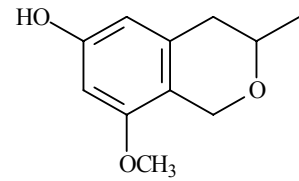
Isofunicon
Penicillium sp [38]



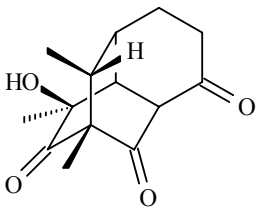
Sorrentanona
P. chrysogenum [39]



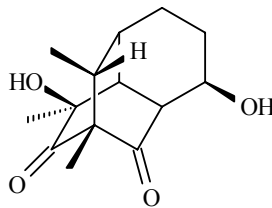
Penicillium sp [40]



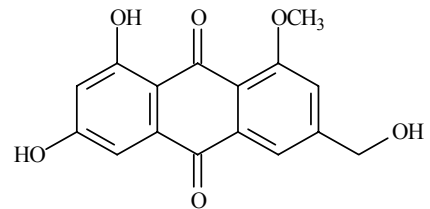
Arohynapene D
Penicillium sp [41]



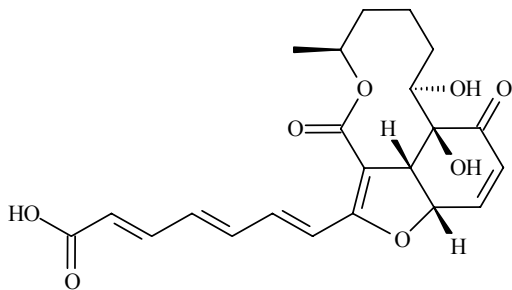
Penicillona A
P. terrestre [42]



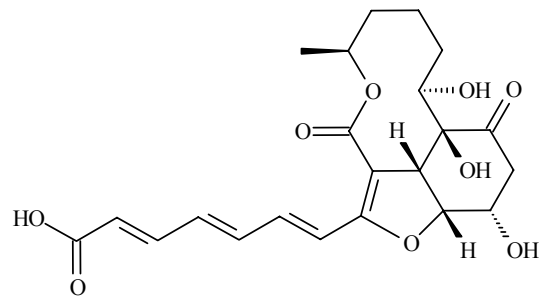
Penicillona B
P. terrestre [42]



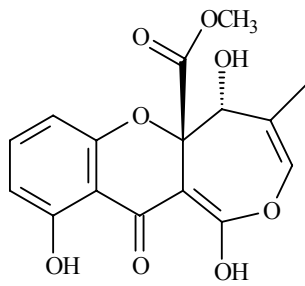
Carviolina
Pinicillium sp [42]



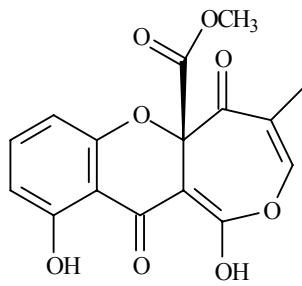
Ac dictiosfaerico A
Pinicillium sp [43]



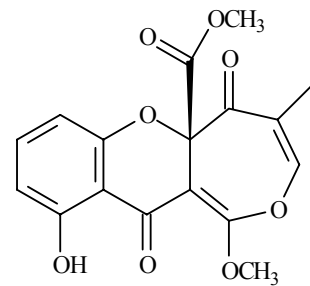
Ac dictiosfaerico B
Pinicillium sp [43]



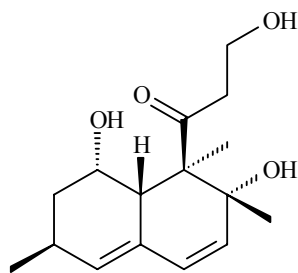
Brocaenol A
P. brocae [44]



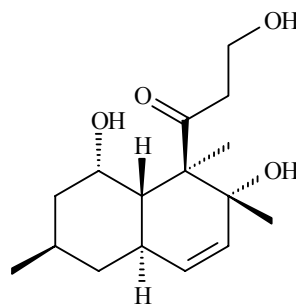
Brocaenol B
P. brocae [44]



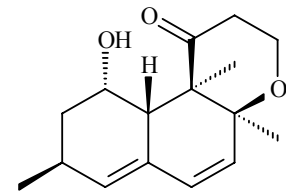
Brocaenol C
P. brocae [44]



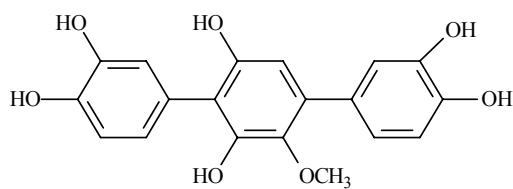
Decumbenona A
P. decumbens [45]



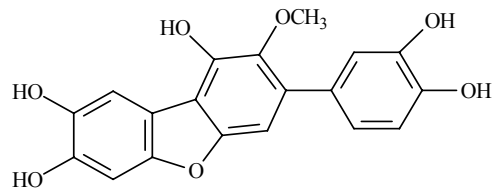
Decumbenona B
P. decumbens [45]



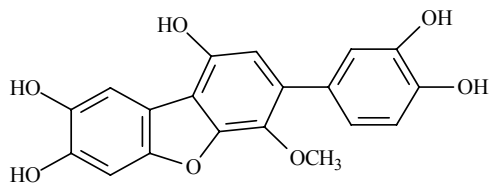
Versiol
P. decumbens [45]



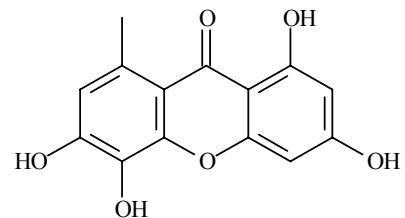
3,3'-dihidroxi-6'-desmetilterphenillina
P. raistrickii [46]



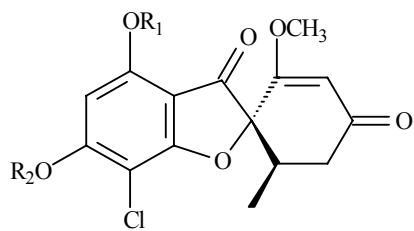
3'-demetoksi-6'-desmetil-5'-metoxididusina
P. raistrickii [46]



6'-desmetilcandidusina B
P. raistrickii [46]

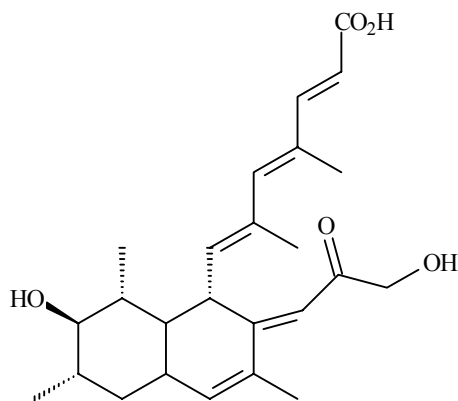


1,3,5,6-tetrahidroxi-8-metilxantona
P. raistrickii [46]

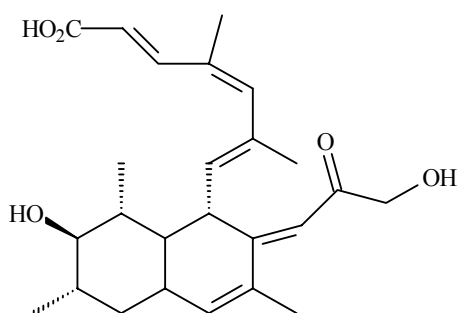


Griseofulvina
6-desmetilgriseofulvina
P. raistrickii [46]

R ₁	R ₂
Me	Me
Me	H



Penicillium sp [47]



Penicillium sp [47]

1.4 - Bactérias

1.4.1 - *Pseudomonas aeruginosa* [48]

P. aeruginosa é o mais importante patógeno humano do gênero *Pseudomonas*. Considerando que a *P. aeruginosa* faz parte da microbiota humana, ela raramente se torna a causa de infecções comunitárias em indivíduos saudáveis. No entanto, em ambientes hospitalares, esta bactéria torna-se um agente infeccioso importante, principalmente em pacientes predispostos.

No Brasil, *P. aeruginosa* foi o patógeno mais frequentemente isolado em pacientes com pneumonia hospitalar, a segunda causa mais frequente em

infecções urinárias e infecções de feridas cirúrgicas. É também muito comum em pacientes queimados e infecções na corrente sanguínea. As conseqüências das infecções hospitalares são graves. O paciente é submetido a um tratamento mais agressivo, sua permanência no hospital é prolongada e a evolução pode ser fatal.

1.4.2 - *Escherichia coli* [49]

É um bacilo gram-negativo componente da flora intestinal humana e de animais saudáveis, impedindo o crescimento de espécies bacterianas nocivas e sintetizando apreciável quantidade de vitaminas (K e complexo B). São vários os tipos de *E. coli* que causam patologias ao homem, o sorotipo O157:H7 é o mais estudado.

A *E. coli* sorotipo O157:H7, causa um quadro agudo de colite hemorrágica, através da produção de grande quantidade de toxina, provocando severo dano a mucosa intestinal. As infecções ocorrem principalmente em crianças menores de 5 anos e idosos. Nos caso mais graves o quadro pode evoluir para a Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU), caracterizada por destruição das células vermelhas e falência renal.

1.4.3 - *Bacillus subtilis* [50]

Bacilos são germes gram-positivos grandes e esporulados, distribuídos em várias espécies, das quais somente duas tem sido encontradas em associação com doenças humanas: *B. anthracis* e *B. cereus*. Uma espécie de *Bacillus* bastante conhecida pela sua elevada freqüência como contaminante é o *B. subtilis*.

1.5 - Leishmanioses

São doenças tropicais causadas por protozoários do gênero *Leishmania*. Estas infectam em torno de 12 milhões de pessoas em 80 países do mundo e é estimado que existam 3 milhões de novos casos por ano. É também considerado que existam 350 milhões de pessoas em risco de contaminação [51]

As várias formas de manifestação da doença têm sido usadas pela Organização Mundial de Saúde como base para classificar as leishmanioses em quatro formas: a) visceral, b) cutânea- mucosa, c) cutânea difusa ou disseminada e d) cutânea [51].

Leishmaniose visceral é a forma mais severa da doença e pode ser fatal quando não tratada. Esta é caracterizada por infecções nos órgãos internos, particularmente o fígado, baço e medula óssea. **Leishmaniose cutânea mucosa** freqüentemente resulta em desfiguração facial devido a erosões das mucosas da boca e nariz. **Leishmaniose cutânea difusa** é caracterizada pela formação de nódulos, placas ou tumores, especialmente em volta da face ou nos braços e pernas. **Leishmaniose cutânea** é a forma menos severa da doença e é geralmente considerada como uma infecção limitada [51].

Durante o seu ciclo biológico os parasitas do gênero *Leishmania* existem em duas formas que desenvolvem em diferentes hospedeiros: uma forma flagelada extracelular conhecida como promastigota e uma intracelular designada como amastigota. A forma que infecta o homem e outros vertebrados é a promastigota, que vive no intestino do inseto transmissor. A forma amastigota é localizada no interior dos macrófagos dos hospedeiros [51].

O hospedeiro é infectado pela forma promastigota do parasita como resultado da picada do inseto vetor. Após isto, os promastigotas mudam para a

forma amastigota. A manifestação da doença é uma consequência da multiplicação dos amastigotas nos macrófagos (FIGURA 1.2) [51].

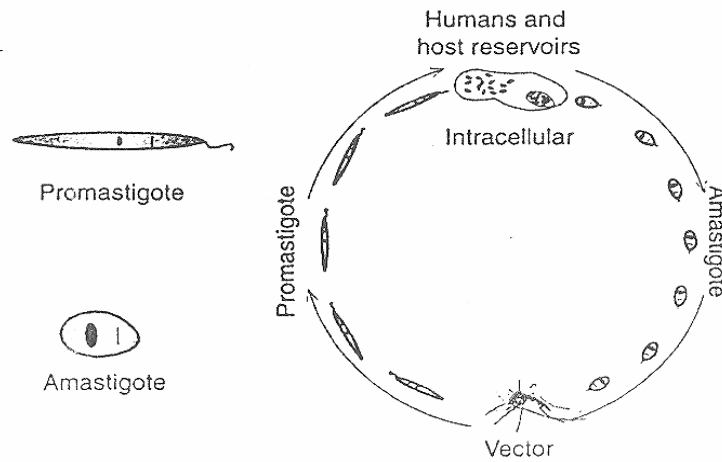


FIGURA 1.2: Formas do parasita da *Leishmania* e seu ciclo biológico

No Brasil as leishmanioses são um sério problema, tendo crescido consideravelmente com o passar dos anos (FIGURA 1.3). Os parasitas que mais ocorrem no país são *L. (Leishmania) chagassi* causador da leishmaniose viseral e *L. (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (L.) amazonensis* causadores da leishmaniose cutânea [52].

Tendo em vista que essa é uma doença típica de países do hemisfério sul, países pobres, (FIGURA 1.4) não há interesse das grandes indústrias farmacêuticas em investir em pesquisas que levem a medicamentos eficazes contra as leishmanioses, pois a população consumidora é de baixa renda e não daria “lucro” para as indústrias. Portanto, cabe aos países em desenvolvimento, como o Brasil, buscar uma solução para esse mal.

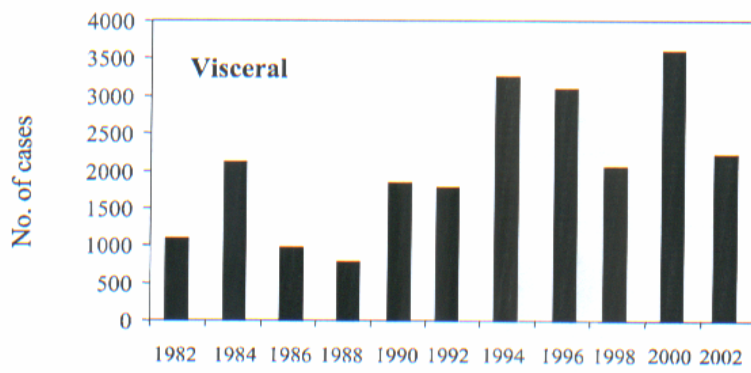
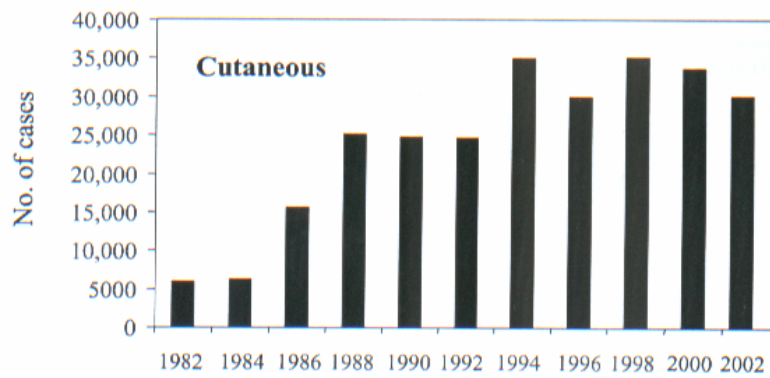


FIGURA 1.3: Casos de leishmanioses no Brasil no período de 1982 a primeira metade de 2002



FIGURA 1.4: Mapa das leishmanioses no mundo

2 - OBJETIVOS

Geral

O estudo químico de fungos ainda é pouco realizado no Brasil quando comparado as áreas tradicionais da Química de Produtos Naturais. A busca de princípios ativos em plantas é uma prática muito comum e que tem dado bons resultados. No entanto, os fungos são grandes produtores de metabólitos secundários com atividade biológica. Assim, este trabalho tem como objetivos gerais contribuir para o conhecimento da química dos fungos, bem como, buscar substâncias com atividade biológica útil. Para isso temos os seguintes objetivos **específicos:**

- Cultivar os fungos em meios de cultura líquido e sólido
- Obter os extratos
- Realizar fracionamento dos extratos brutos
- Isolar e identificar os compostos dos extratos
- Fazer ensaios biológicos (antimicrobiano e leishmanicida) com as substâncias puras

3 - PARTE EXPERIMENTAL

3.1 - MATERIAL UTILIZADO

a) Espectrômetros de RMN

- BRUKER ARX 200
- BRUKER DRX 400

b) Espectrômetros de massas

- CG/EM Shimadzu QP 5000
- MICROMASS Quattro LC

c) Espectrofotômetro no infravermelho

- Bomem FT/IR

d) Cromatógrafo a gás

- 17A Shimadzu, GCMS-QP5000 Shimadzu

e) Cromatógrafo líquido

- Shimadzu LC-10A

f) Colunas para cromatografia líquida

- C-18 10 μ e 5 μ Phenomenex gemine

g) Colunas para CG

- HP-5 0,25 mm

g) Rotaevaporadores

- Evaporador rotativo TECNAL (TE 120)
- Rotavapor Büich 461- Water Bath (EL 131)

i) Balanças

- Tecnalise Mettler AE 240
- Equipalabor Gehaka AG 200

j) Estufas

- FANEM – 315 SE
- FANEM – 347 CD

k) Autoclaves verticais

- PHOENIX AV 75
- Soc. FABBE 103

l) Capela de fluxo laminar

- VECO VL FS – 12M

m) Fases estacionarias para cromatografia

- Sílica gel 230-400 Mesh (sílica flash), para cromatografia em coluna e camada delgada.
- Sílica gel 60 PF₂₅₄, para cromatografia em camada delgada preparativa.

n) Solventes

- Foram utilizados solventes destilados no departamento de química, tais como hexano, acetato de etila, metanol, diclometano e acetona. Para a obtenção dos espectros de RMN foram usados solventes deuterados MERCK e ALDRICH (98,0 – 99,9%)

o) Substrato utilizado para o cultivo em meio sólido

- Arroz “Uncle been`s”

p) Substâncias utilizadas para o cultivo em meio líquido

- NaNO_3
- K_2HPO_4
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- Glucose
- Extrato de levedura
- Dextrose
- Batata inglesa
- Água destilada

3.2 - METODOLOGIA

3.2.1 - Isolamento dos fungos endofíticos

Para o isolamento dos fungos endofíticos das plantas hospedeiras foi utilizada uma seqüência de imersões para a assepsia do material vegetal. Primeiramente o material botânico foi imerso em hexano para a eliminação das ceras na superfície do material, depois o material foi imerso em hipoclorito de sódio 11% durante 90 segundos e seguidamente em álcool 70% para a eliminação dos fungos epifíticos (fungos que vivem na superfície das plantas) e por fim, seco em gaze estéril e inoculado em placa de petri contendo meio BDA (batata, dextrose, agar) utilizando-se a técnica de semeadura em superfície (FIGURA 3.1). Posteriormente as placas foram incubadas durante 7 dias a 25°C.

Nas placas onde houve crescimento de mais de uma colônia de fungo foram utilizadas técnicas de repiques sucessivos para a obtenção das colônias puras. Os fungos isolados foram conservados em frascos de 10mL de capacidade com água destilada [53].



FIGURA 3.1: isolamento dos fungos endofíticos, **A)** material vegetal, **B)** Hexano, **C)** Hipoclorito de Sódio 11%, **D)** Etanol e **E)** Meio de cultura BDA

3.2.2 - Reativação dos fungos

O fungo do gênero *Penicillium* isolados de *Melia azedarach* e *Murraya paniculata* foram inoculados em placa de Petri com 9 cm de diâmetro, contendo meio BDA (batata, dextrose, ágar), utilizando a técnica de semeadura em superfície e incubado a 25 °C por aproximadamente sete dias. Após esse período os fungos foram cultivados em meio líquido (Czapek's) e arroz.

3.2.3 - Cultivo dos fungos

3.2.3.1 - Cultivo em meio líquido

Para cultivo dos fungos em meio líquido foi utilizado o meio de cultura Czapeck's enriquecido com 2% de extrato de leveduras (TABELA 3.1). Foram utilizados 35 frascos de Erlenmeyer's de 1000 mL de capacidade. Em cada frasco foi adicionado 300 mL de meio de cultura, posteriormente estes foram autoclavados a 121 °C por 15 minutos. Após o fungo foi inoculado em cada um dos frascos, que foram deixados por 18 dias em modo estático, a temperatura ambiente e ao abrigo da luz, para crescimento das colônias.

TABELA 3.1: Meio cultura Czapeck's enriquecido com 2% de extrato de levedura

Reagentes	Quantidades
NaNO ₃	3,0g
K ₂ HPO ₄	1,0g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5g
KCl	0,5g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01g
Glicose	30g
Extrato de levedura	20g
H ₂ O	qsp 1L

3.2.3.2 - Cultivo em meio sólido

O cultivo dos fungos em meio sólido foi feito em arroz (Uncle Ben's®). Foram utilizados 45 frascos de Erlenmeyer's de 500 mL de capacidade.

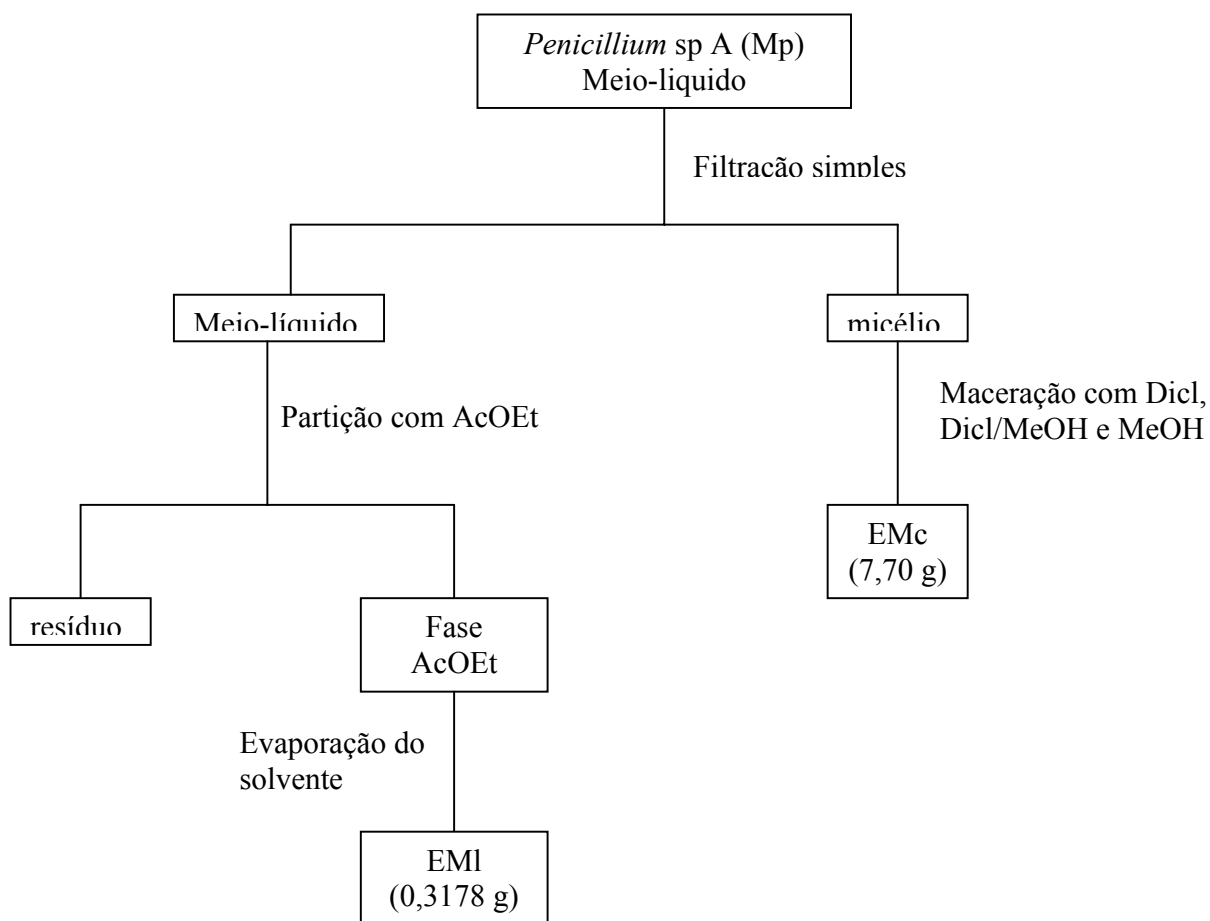
Em cada frasco foi adicionado 90 g de arroz e 70 mL de água destilada, posteriormente esse material foi autoclavado por 45 minutos a 121 °C, em seguida inoculou-se o fungo nos frascos e estes foram deixados em modo estático, a temperatura ambiente e ao abrigo da luz por 22 dias para crescimento das colônias.

3.2.4 - Obtenção dos extratos

3.2.4.1 - *Penicillium* sp A (*Murraya paniculata*)

3.2.4.1.1 - Meio líquido

Após o período de crescimento o meio contendo o fungo foi filtrado para a separação do micélio do meio líquido. Ao micélio foi acrescentado metanol para matar o fungo e garantir a segurança durante a manipulação. Esse metanol após 24 h foi filtrado e evaporado em evaporador rotativo. O micélio foi macerado em solvente orgânico para a obtenção dos extratos (FLUXOGRAMA 01).

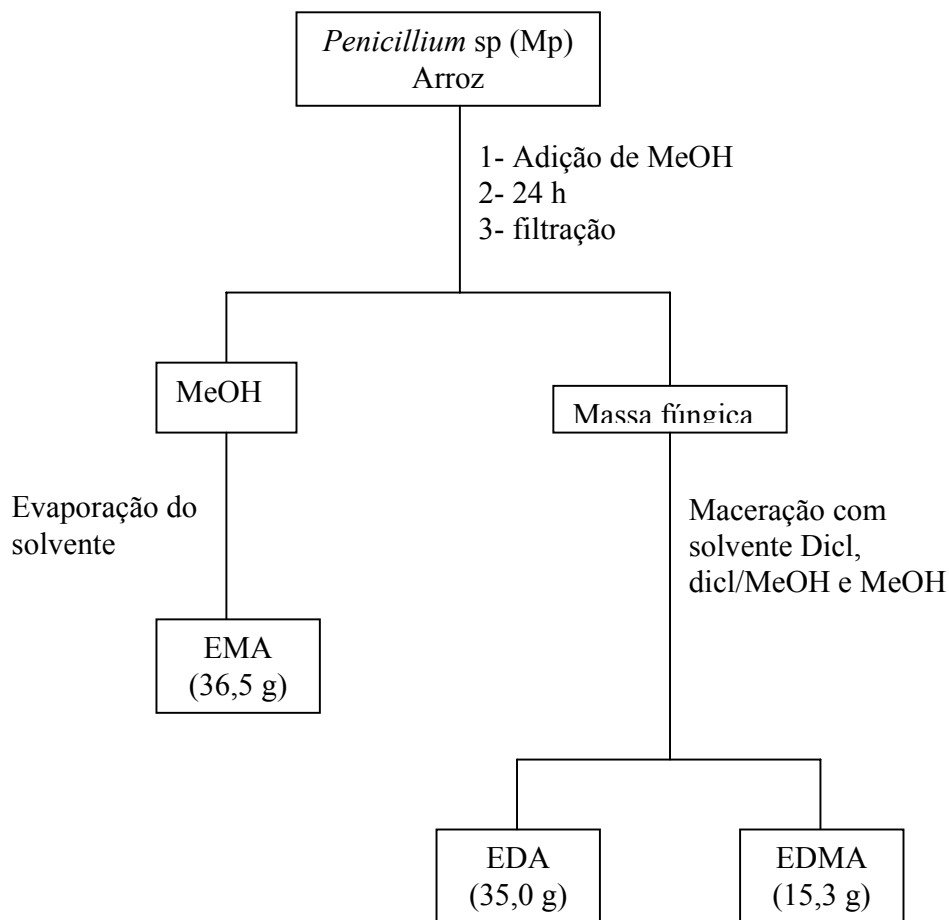


- EMI – Extrato Meio - líquido
- EMc – Extrato Micélio

FLUXOGRAMA 01: Obtenção dos extratos do cultivo em meio líquido de *Penicillium* sp (*M. paniculata*)

3.2.4.1.2 -Meio sólido (Arroz)

Após o período de crescimento foi adicionado metanol aos frascos contendo a massa fúngica com o mesmo objetivo já descrito no item 3.2.4.1.1. Então o material foi filtrado e foram obtidos os extratos conforme o FLUXOGRAMA 02.



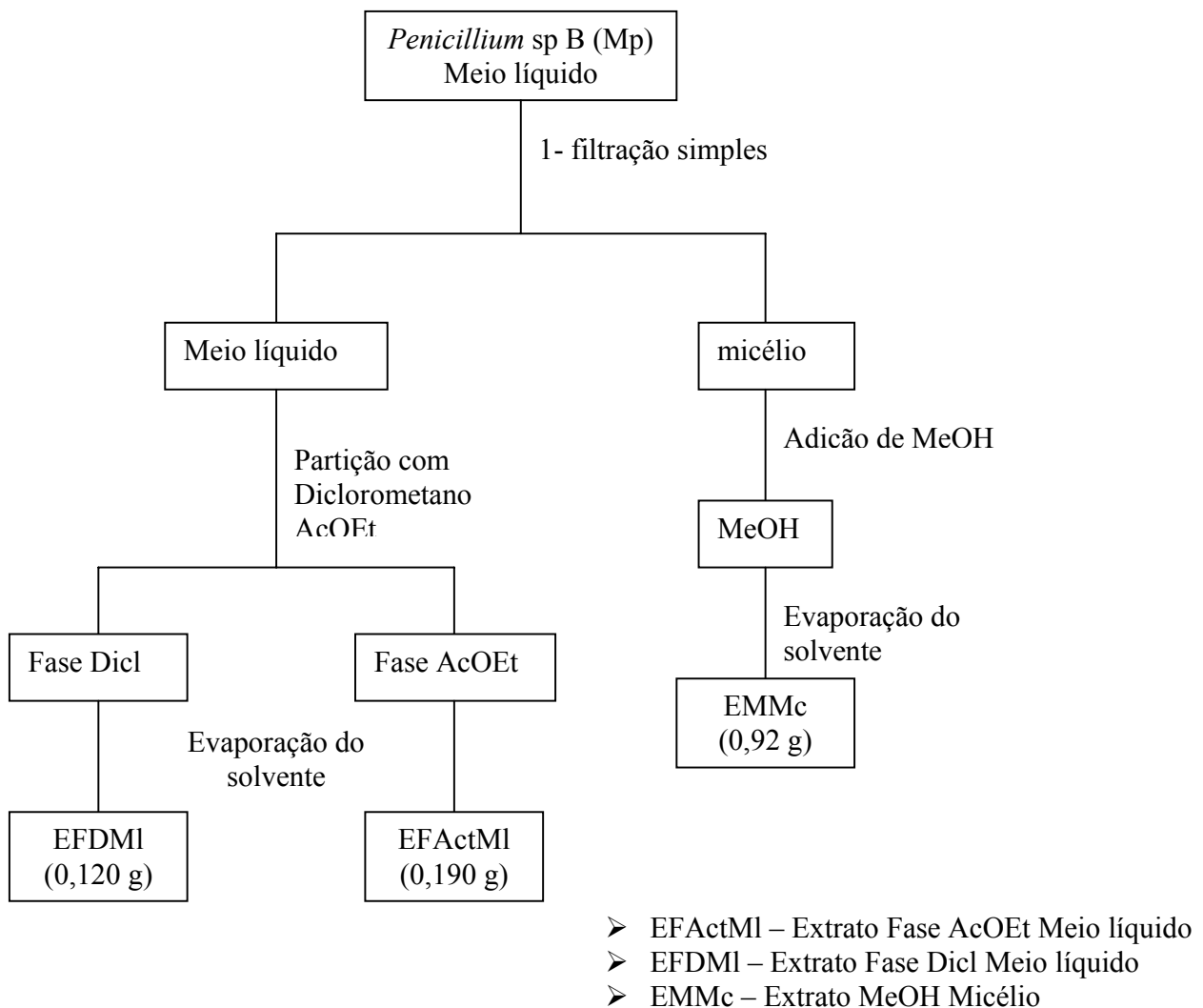
- EMA – Extrato Metanólico do cultivo em Arroz
- EDA – Extrato diclorometânico do cultivo em Arroz
- EDMA – Extrato Dicloro/Metanol 1:1 do cultivo em Arroz

FLUXOGRAMA 02: Obtenção dos extratos do cultivo em arroz de *Penicillium sp A (M. paniculata)*

3.2.4.2 - *Penicillium sp B (Murraya paniculata)*

3.2.4.2.1 - Meio líquido

Foram utilizados 8 frascos de Erlenmeyer's de 250 mL de capacidade contendo 100 mL de meio Czapeck's cada frasco. Esses foram mantidos sob agitação por 8 dias para crescimento das colônias. Após esse período foram obtidos os extratos conforme o FLUXOGRAMA 03.

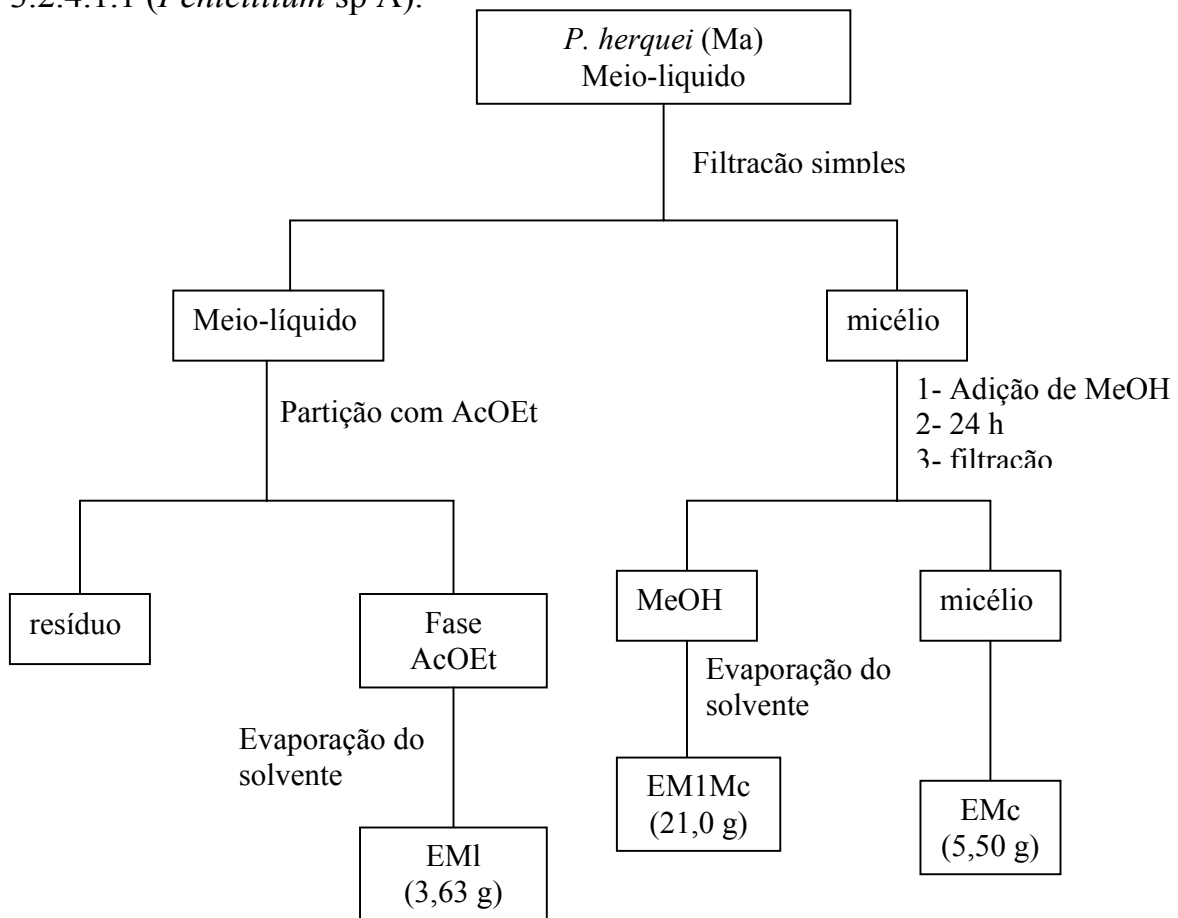


FLUXOGRAMA 03: Obtenção dos extratos de *penicillium sp B (M. paniculata)*

3.2.4.3 - *P. herquei* (*Melia azedarach*)

3.2.4.3.1 - Meio líquido

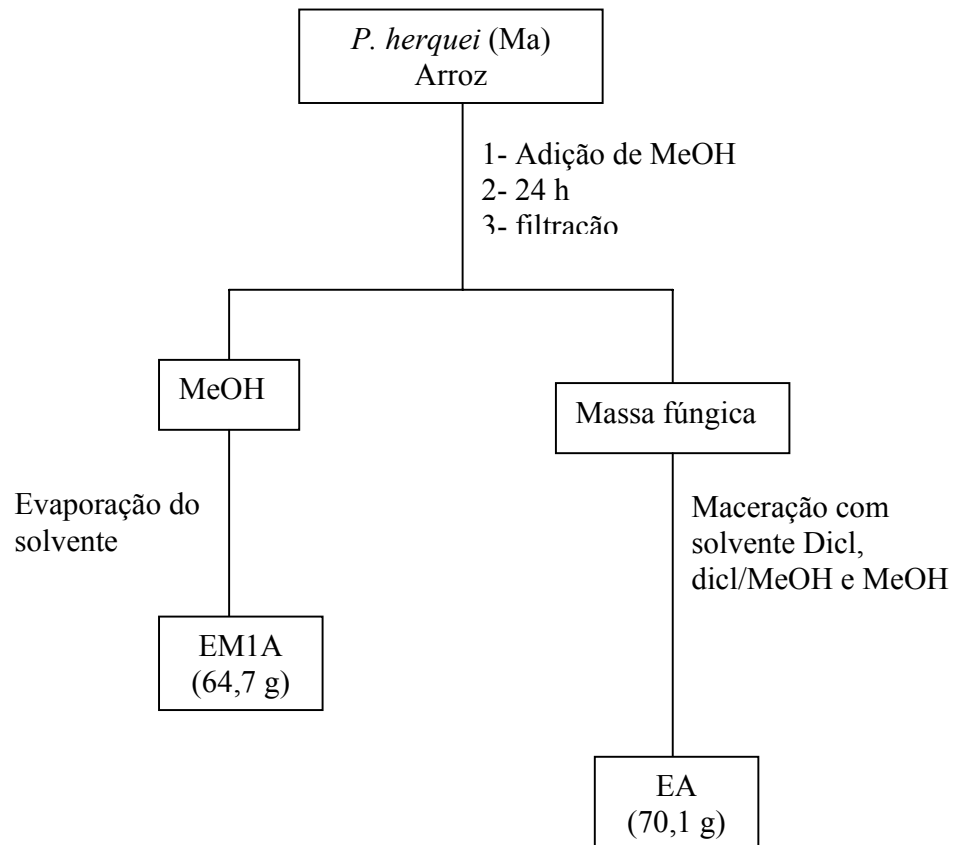
Para a obtenção dos extratos foi utilizada metodologia igual ao do item 3.2.4.1.1 (*Penicillium* sp A).



- EMl – Extrato Meio - líquido
- EM1Mc – Extrato Metanólico 1 Micélio
- EMc – Extrato Micélio

FLUXOGRAMA 04: Obtenção dos extratos do cultivo em meio líquido de *Penicillium herquei* (*M. azedarach*)

3.2.4.3.2 -Meio sólido (Arroz)



- EM1A – Extrato MeOH-1 do cultivo em Arroz
- EA – Extrato do cultivo em Arroz

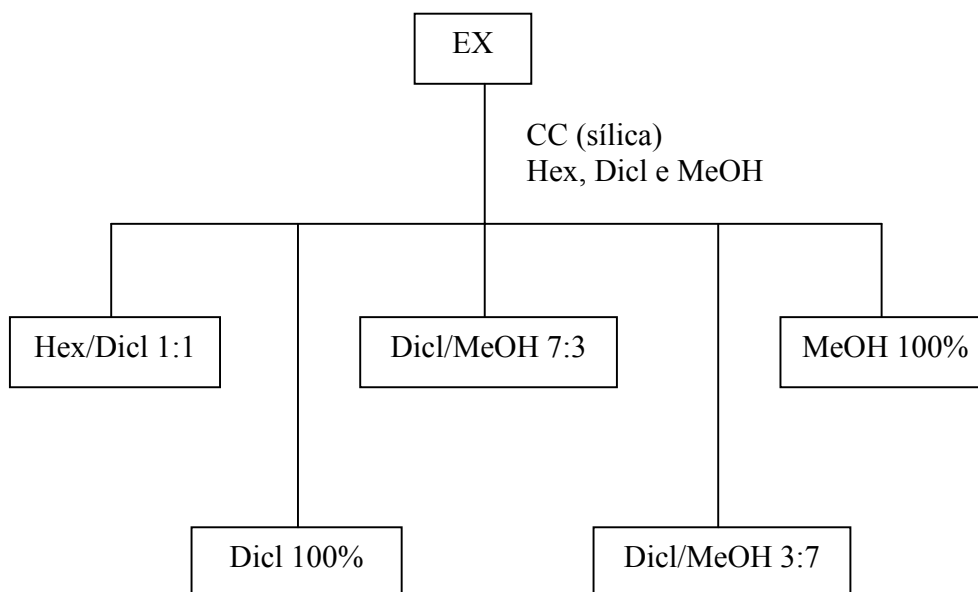
FLUXOGRAMA 05: Obtenção dos extratos do cultivo em arroz de *P. herquei* (*M. azedarach*)

3.2.5 - Fracionamento dos Extratos e Isolamento dos Metabólitos

3.2.5.1 - *Penicillium* sp A (*M. paniculata*)

3.2.5.1.1 -Meio sólido

Os extratos EMA, EDA, EDMA e EMc foram fracionados através de cromatografia em coluna a vácuo (FLUOGRAMA 06). As frações obtidas foram refractionadas através de cromatografia em coluna utilizando-se misturas de hexano, diclorometano e metanol, em gradiente de polaridade, como fase móvel e sílica gel como fase estacionária para a obtenção dos compostos. Quando necessário foram utilizadas cromatografia em camada delgada preparativa e HPLC para purificação dos constituintes químicos dos extratos.

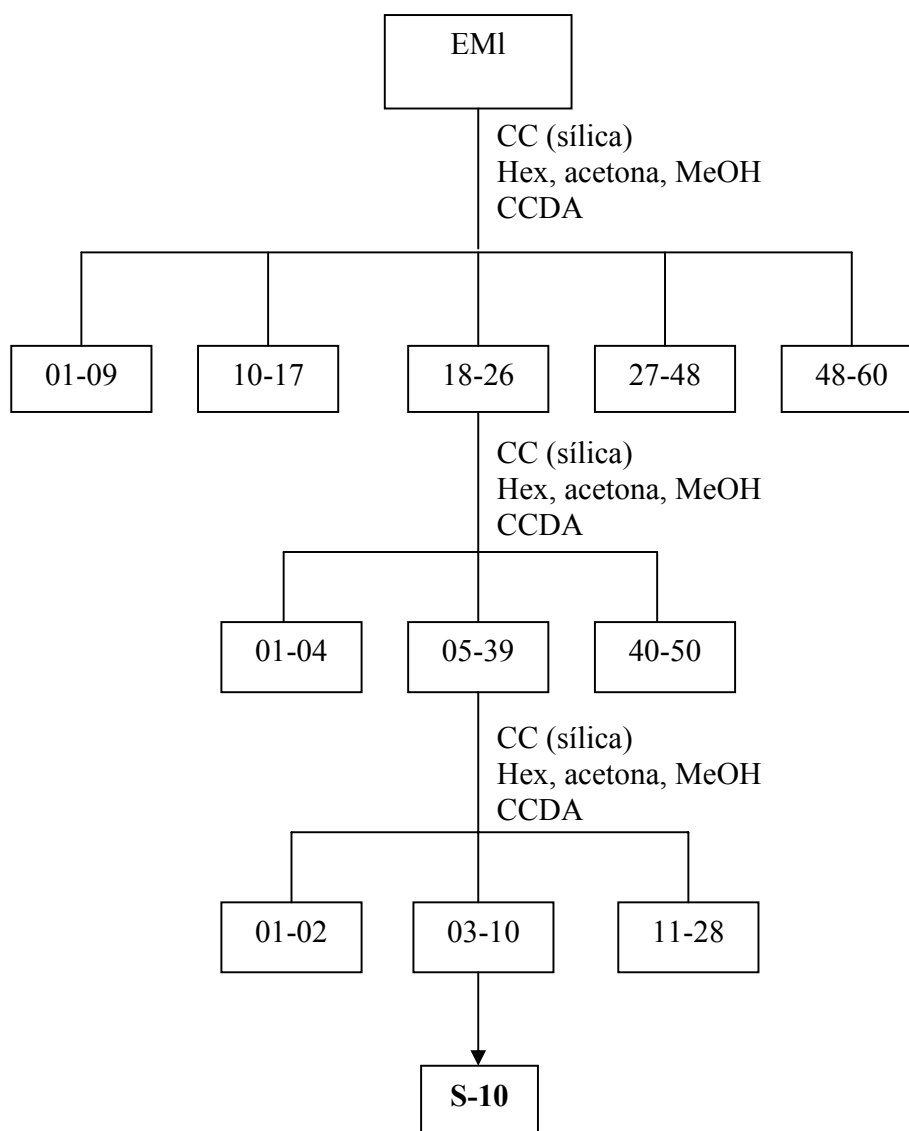


EX= EMA, EDMA, EDA e EMc

FLUXOGRAMA 06: Fracionamento dos extratos EMA, EDMA, EDA e EMc

3.2.5.1.2 - Meio líquido

Como o extrato EMI possuía pouca massa, não foi realizada cromatografia a vácuo, sendo realizada cromatografia em coluna por via úmida para o isolamento dos metabólitos secundários (FLUXOGRAMA 07).



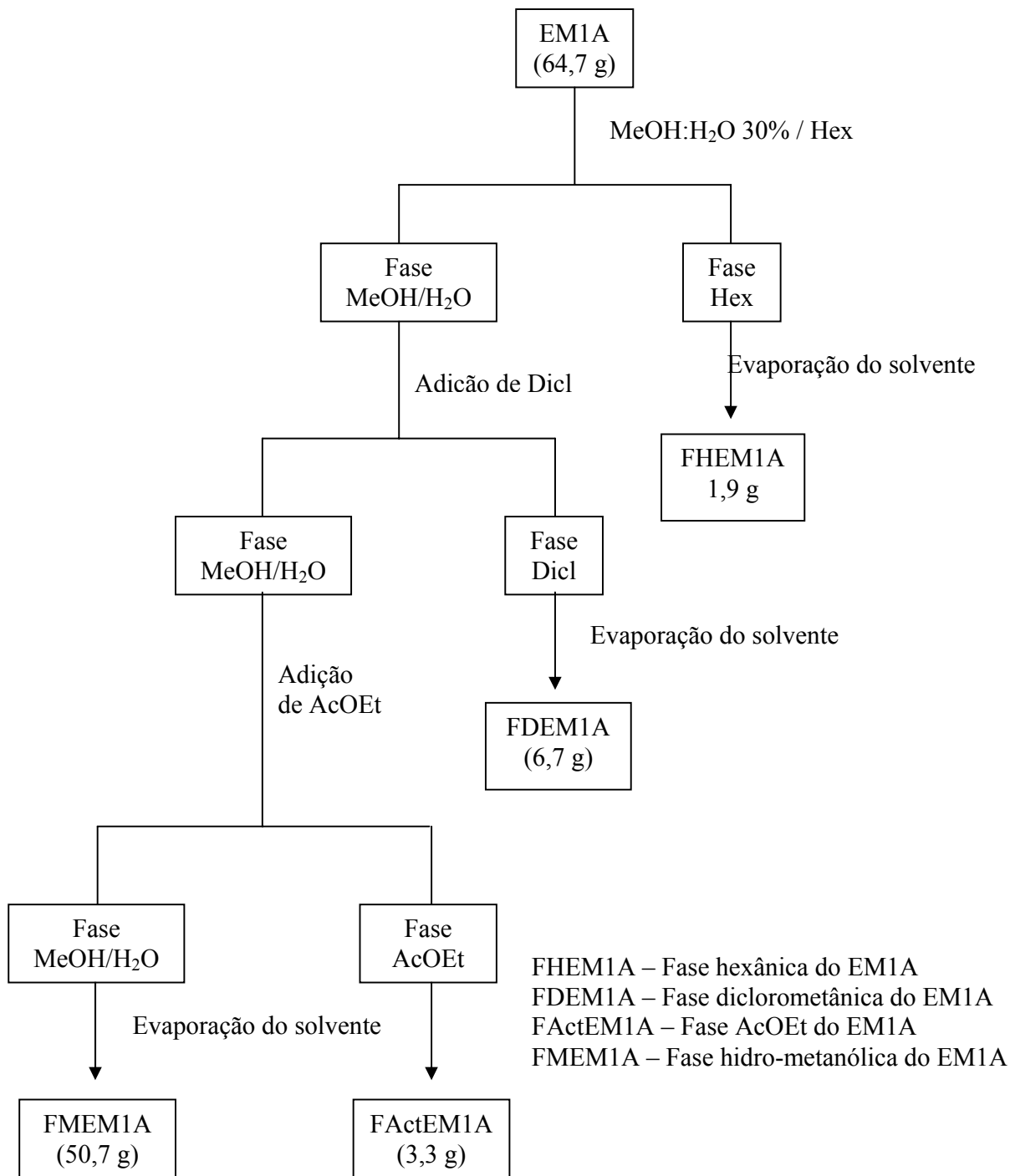
FLUXOGRAMA 07: Fracionamento do extrato EMI

3.2.5.2 - *Penicillium* sp B (*M. paniculata*)

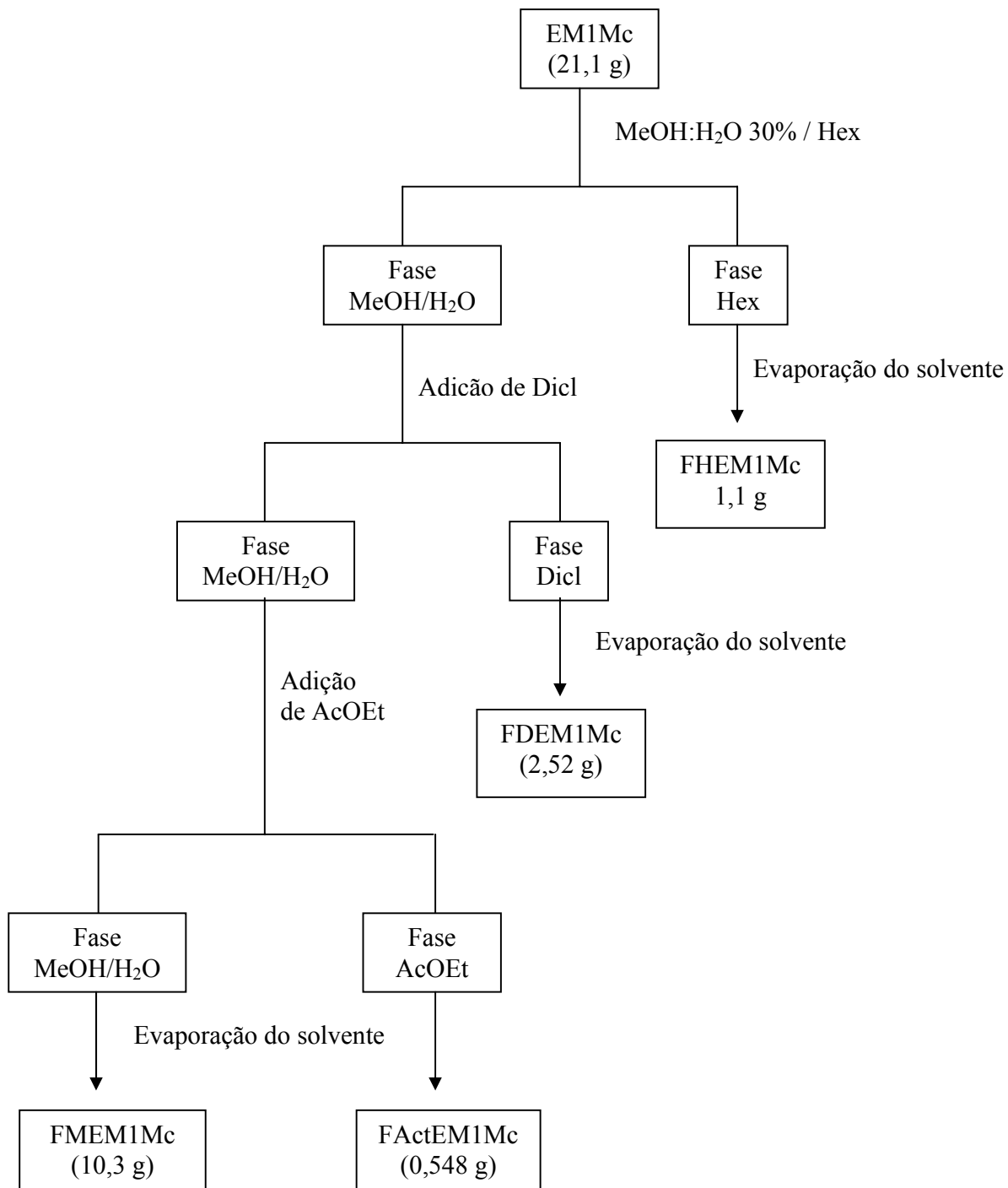
Os extratos EFActMI e EFDMI foram fracionados em coluna cromatográfica utilizando-se sílica gel como fase estacionária e misturas de hexano, acetona e MeOH, em gradiente de polaridade, como fase móvel para a obtenção das substâncias **S-1**, **S-2** e **S-11**. O extrato EMMc foi submetido a cromatografia em camada delgada preparativa para obtenção de **S-15**.

3.2.5.3 - *P. herquei* (*M. azedarach*)

As extratos EM1Mc, EMc, EM1A e EA foram submetidos a partição líquido-líquido conforme os FLUXOGRAMAs 08, 09 e 10. As fases obtidas foram refractionadas sucessivamente através de cromatografia em coluna utilizando sílica gel como fase estacionária e misturas de hexano, acetona e metanol, em ordem de polaridade, para a obtenção dos metabolitos secundários. Quando necessário foram utilizadas cromatografia em camada delgada preparativa e HPLC para a purificação das substâncias. Para o extrato EMI foram realizadas sucessivas cromatografias em coluna para a obtendo-se as substâncias **S-1**, **S-2** e **S-21**.

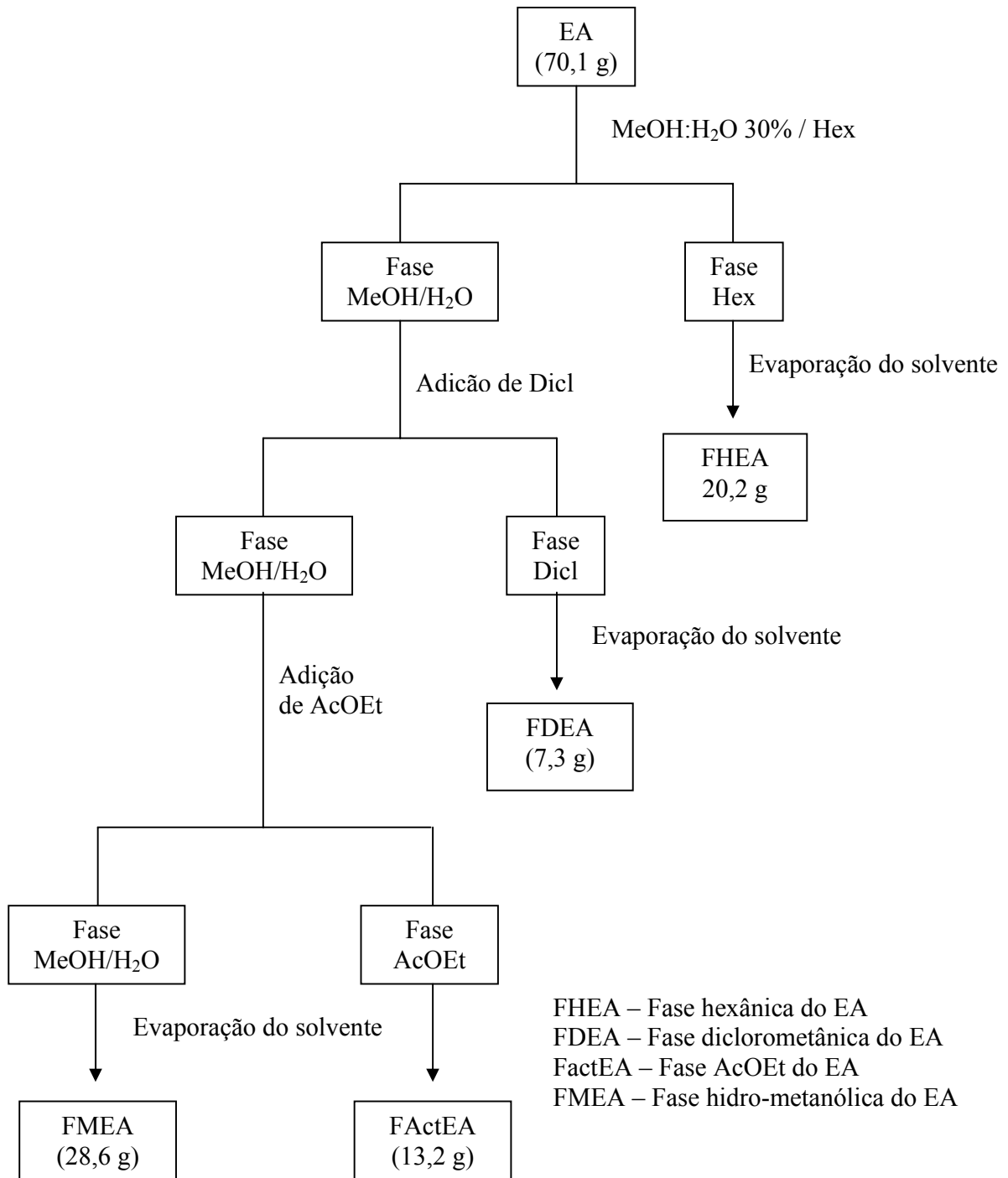


FLUXOGRAMA 08: Partição líquido-líquido do extrato EM1A



FHEM1Mc – Fase hexânica do EM1Mc
 FDEM1Mc – Fase diclorometânica do EM1Mc
 FActEM1Mc – Fase AcOEt do EM1Mc
 FMEM1Mc – Fase hidro-metanólica do EM1Mc

FLUXOGRAMA 09: Partição líquido-líquido do extrato EM1Mc



FLUXOGRAMA 10: Partição líquido-líquido do extrato EA

3.3 - Metodologia usada nos ensaios biológicos

3.3.1 - Ensaio antimicrobianos

Bactérias testadas

As cepas das bactérias teste foram cedidas pelo Departamento de Biologia da Universidade federal de São Carlos. Os microorganismos utilizados para os ensaios foram: *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* e *Pseudomona aeruginosa*.

Preparo dos meios de cultura utilizados durante os ensaios

Caldo BHI (Infuso Cérebro Coração)

Para 1 litro de caldo são utilizados 37 g de meio de cultura de BHI.

Agar BHI

Foram utilizados 4,5 g de agar bacteriológico em 100 mL de caldo BHI

Após essas dissoluções todos os meios foram autoclavados a 121°C por 15 minutos para garantir total esterilidade dos meios.

Ativação das bactérias

As bactérias testadas nos ensaios foram ativadas em placa de Petri de 9cm de diâmetro, contendo ágar BHI, por um período de 24h. Após esse tempo

foram transferidas, com o auxílio de um palito, aproximadamente três colônias de cada bactéria para tubos de ensaio contendo 3mL de caldo BHI e incubadas por mais um período de 24h. Suas concentrações foram padronizadas para se obter uma cultura com aproximadamente $1,0 \times 10^8$ UFC (unidades formadoras de colônias).

Padronização das culturas

Primeiramente preparou-se uma solução de sulfato de bário numa concentração referente a $1,0 \times 10^8$ UFC/mL. Para se obter essa concentração foi necessário fazer uma mistura das soluções de H_2SO_4 1% (9,95mL) e $BaCl_2$ 1% (0,05mL). Feito isso comparou-se o grau de turvação do tubo de ensaio contendo a bactéria com o do padrão contendo sulfato de bário. Com essa padronização o tubo contendo a bactéria apresentara uma concentração aproximadamente de $1,0 \times 10^8$ UFC.

Preparo das amostras

A partir de 1mg das substâncias a serem testadas, dissolveu-se em 100 μ L de DMSO, contidos em tubos de Eppendorf e agitou-se para homogeneizar a solução. Em seguida foram adicionados 900 μ L de caldo BHI esterilizado e agitou-se novamente a solução.

Preparo do antibiótico controle

Para o preparo dessa solução pesou-se 1 mg de terramicina e dissolveu-se em 1mL de água destilada. Desta solução pegou-se 5 μ L e dilui-se em 995 μ L de caldo BHI, contido em um tudo de Eppendorf. Obteve-se assim uma concentração de 5 μ L/mL.

3.3.2 - Ensaio preliminar

Em placas de petri de 15 cm de diâmetro contendo meio de cultura agar BHI inoculou-se as bactérias testes através de técnica de semeadura em superfície e deixou-se as placas a 37 °C por 24 h para crescimento das bactérias. Em cada placa foram feitos aproximadamente 34 furos com o auxílio de um tubo de vidro (FIGURA 3.2). Em cada furo foi acrescentado 50 μ L das substâncias a serem testadas na concentração de 1 mg/mL. Encubaram-se novamente as placas a 37 °C por 24 h. Após esse período observou-se quais substâncias tinham sido ativas através da formação do halo de inibição. As substâncias que mostraram atividade foram novamente ensaiadas para medir a concentração mínima inibitória (MIC).

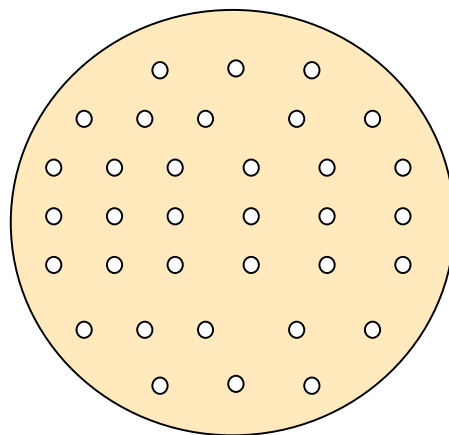


FIGURA 3.2: placa de petri usada no ensaio preliminar

3.3.3 - Ensaio para medir a concentração mínima inibitória (MIC).

Nas placas de ELISA de 96 furos foram adicionados 100µL de caldo BHI em cada cavidade. Em seguida acrescentou-se na primeira cavidade de cada coluna 100µL da solução contendo as amostras a serem testadas e homogeneizou-se essa solução. Após isso foram realizadas diluições sucessivas, retirando-se 100µL da primeira cavidade (cavidade A) transferindo esse volume para a próxima (cavidade B), homogeneizando, esse procedimento é repetido até a penúltima cavidade da placa de Elisa, de onde são retirados 100µL e descartados. A última linha da placa é usada como um controle do meio usado não acrescentando nessa a amostra a ser testada. Por fim, em cada cavidade foi adicionado 5µL da suspensão bacteriana e incubou-se as placas a 37°C por 24h. A leitura dos resultados é feita com TTC (cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólico) (FIGURA 3.3).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
B	○	○	○	●	○	○	○	○	●	○	○	●
C	○	○	○	●	○	○	○	○	●	○	○	●
D	○	●	○	●	○	○	○	○	●	●	○	●
E	●	●	○	●	●	○	○	○	●	●	○	●
F	●	●	○	●	●	○	●	○	●	●	●	●
G	●	●	●	●	●	●	●	○	●	●	●	●
H	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●

FIGURA 3.3: ensaio para medir o MIC das substâncias testadas realizado em placa de ELISA de 96 furos.

3.3.4 -Tipo de atividade

Após verificar o MIC das substâncias testadas é necessário saber o tipo de atividade apresentada em cada concentração (bacteriostática ou bactericida). Nas cavidades onde não apresentaram coloração vermelha as substâncias foram reinoculadas em placa de petri contendo meio de cultura agar BHI e incubadas a 37 °C por 24 h. Onde houve crescimento da bactéria indicou que a substância possui efeito bacteriostático a essa concentração, onde não houve crescimento da bactéria a substância possui efeito bactericida (FIGURA 3.4)

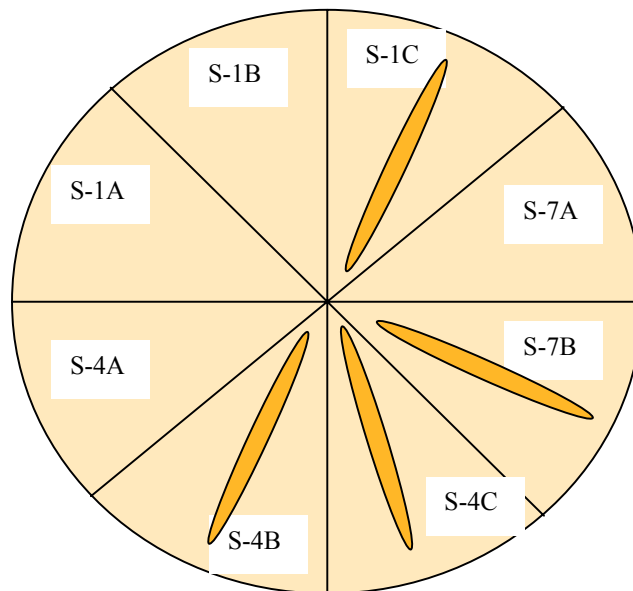


FIGURA 3.4: ensaio realizado em placa de petri para verificar o tipo de atividade em cada concentração inibitória.

3.3.5 -Ensaio leishmanicida

Os ensaios leishmanicidas foram realizados na Universidade Estadual de Maringá pela Profa Dra Izabel Piloto utilizando a metodologia descrita abaixo.

Cultura e manutenção do parasita

Formas promastigota de *Leishmania viannia braziliensis* MHOM/BR1987/M11272 foram cultivadas a 25 °C em meio Schneider's Drosophila suplementado com 10 % de soro bovino fetal (FCS). Células foram coletadas na fase logarítmica, ressuspensas em meio fresco, contadas em câmara de Neubauer e a concentração ajustada par 4×10^6 cel/mL.

Ensaio leishmanicida

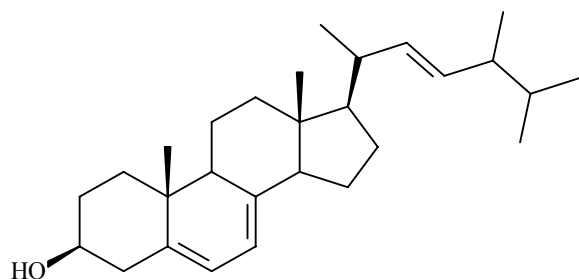
O ensaio foi realizado *in vitro* com as formas promastigotas do parasita. As substâncias foram adicionadas nas culturas de promastigotas com 4×10^6 cel/mL nas concentrações de 320 a 0,125 µg/mL solubilizados em DMSO e incubados a 25 °C por 24 h. Após esse período os parasitas sobreviventes foram contados em câmara de Neubauer e comparados com controles, os quais continham somente DMSO. Isetionato de pentamidina (Eurofarma®) foi usado como fármaco controle. O valor da LD50/24 foi determinado pela análise de regressão linear do percentual de inibição com erro estatístico de 10%.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÕES

No estudo químico dos fungos foram isoladas substâncias de diversas classes metabólitas com destaque para os policetídeos e esteróides, além de açúcares e gliceróis. As substâncias isoladas de cada fungo serão apresentadas a seguir com suas respectivas quantidades obtidas em massa e parte do fungo de onde está foi isolada. Para facilitar o entendimento esse capítulo foi dividido em dois tópicos, no primeiro serão feitas as discussões espectrais e identificação das estruturas, no segundo tópico serão mostrados os resultados obtidos nos ensaios biológicos. A biossíntese de alguns metabolitos obtidos será apresentada nos Anexos 01 e 02.

4.1 – Substâncias Isoladas

4.1.1 - Substâncias isoladas de *Penicillium* sp A (*M. paniculata*)



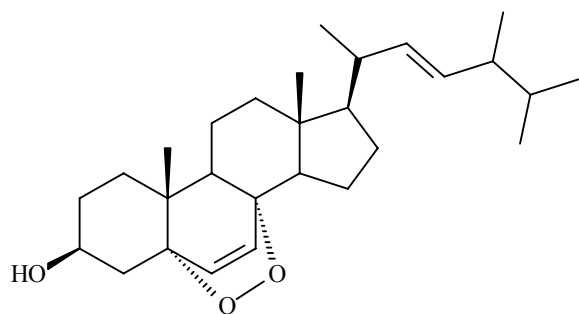
Ergosterol (S-1)

Extrato: EDA e EMc

Massa: 230 mg

Discussão espectral: página 62

Biossíntese: Anexo 01 p. 303



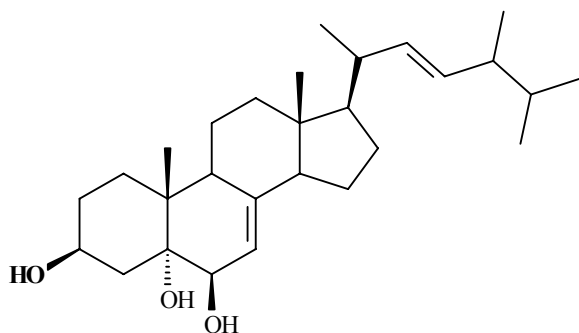
Peroxido de ergosterol (S-2)

Extrato: EDA e EMc

Massa: 85,9 mg

Discussão espectral: página 68

Biossíntese: Anexo 01 p. 304



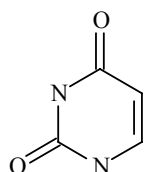
Cerivisterol (S-3)

Extrato: EMA

Massa: 5,0 mg

Discussão espectral: página 72

Biossíntese: Anexo 01 p. 304

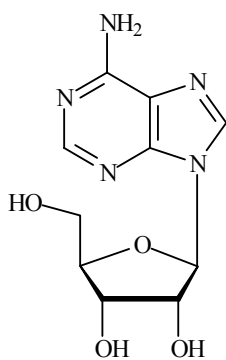


Uracila (S-15)

Extrato: EMc

Massa: 3,7 mg

Discussão espectral: página 213

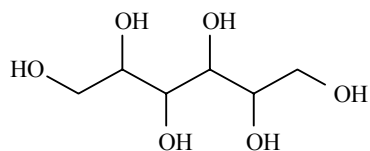


Adenosina (S-16)

Extrato: EMc

Massa: 2,3 mg

Discussão espectral: página 219

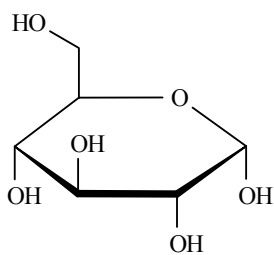


Ducitol (S-17)

Extrato: EMc

Massa: 4,9 mg

Discussão espectral: página 228

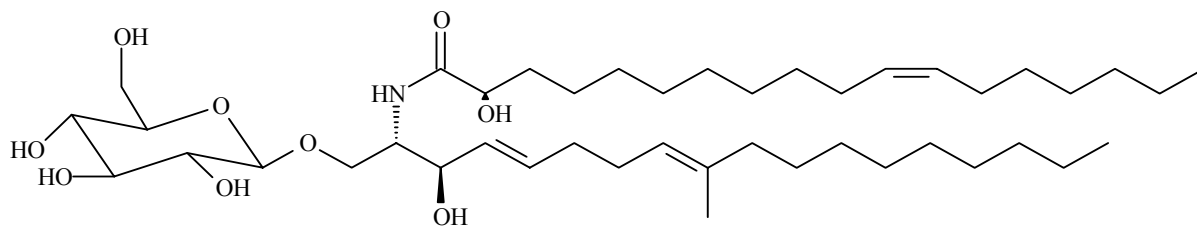


Alfa-D-glucopiranoze (S-18)

Extrato: EDMA

Massa: 3,5 mg

Discussão espectral: página 232



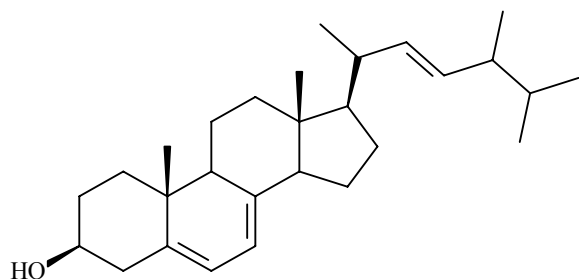
Cerebroside (S-22)

Extrato: EMA

Massa: 139,5 mg

Discussão espectral: página 263

4.1.2 - Substâncias isoladas de *Penicillium* sp B (*M. paniculata*)



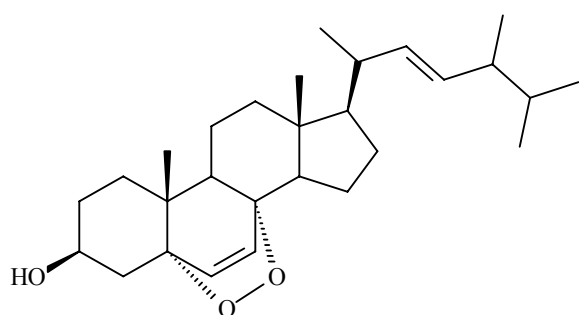
Ergosterol (S-1)

Extrato: EDMc

Massa: 10 mg

Discussão espectral: página 62

Biossíntese: Anexo 01 p. 303



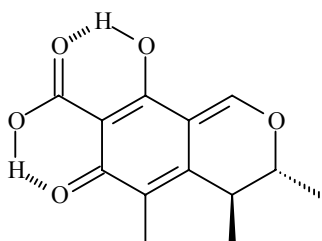
Peroxido de ergosterol (S-2)

Extrato: EDMc

Massa: 7 mg

Discussão espectral: página 68

Biossíntese: Anexo 01 p. 303



Citrinina (S-10)

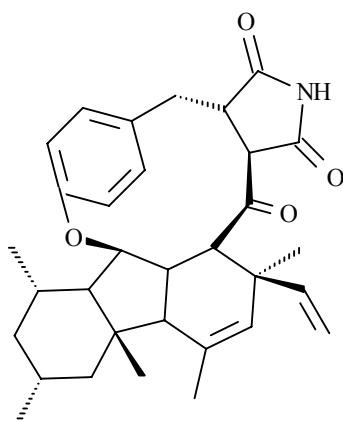
Extrato: EDMc

Massa: 8 mg

Discussão espectral: página 145

Ensaio Biológico: p. 274

Biossíntese: Anexo 02 p. 311



GKK1032 (S-14)

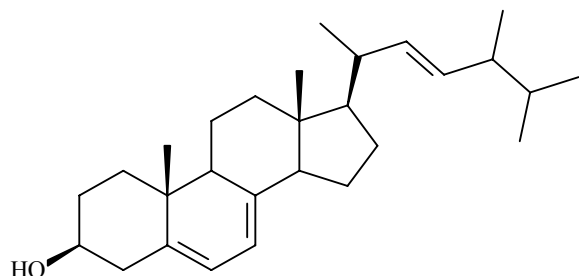
Extrato: EDMc

Massa: 8,5 mg

Discussão espectral: página 197

Biossíntese: Anexo 02 p. 314

4.1.3 - Substâncias isoladas de *P. herquei* (*M. azedarach*)



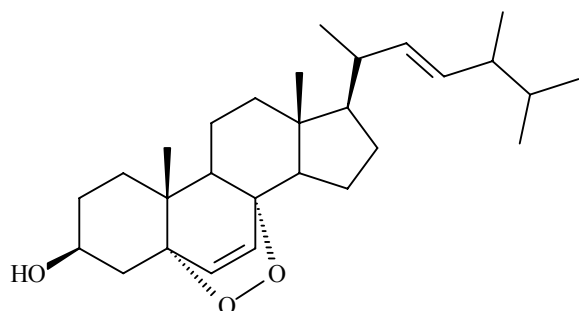
Ergosterol (S-1)

Extrato: FHEA

Massa: 210 mg

Discussão espectral: página 62

Biossíntese: Anexo 01 p. 303



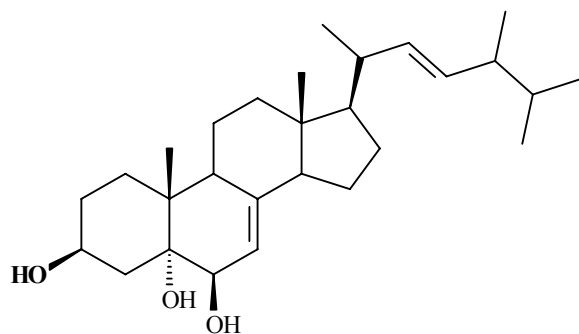
Peroxide of ergosterol (S-2)

Extrato: FDEA

Massa: 15 mg

Discussão espectral: página 68

Biossíntese: Anexo 01 p. 304



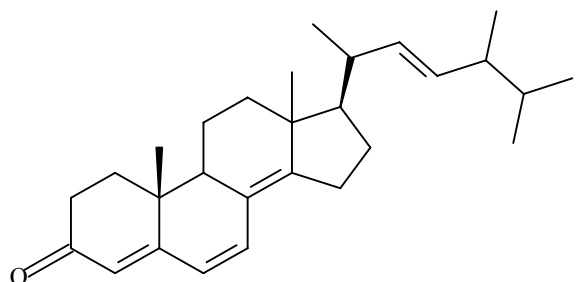
Cerivisterol (S-3)

Extrato: FMEA

Massa: 2,3 mg

Discussão espectral: página 72

Biossíntese: Anexo 01 p. 305



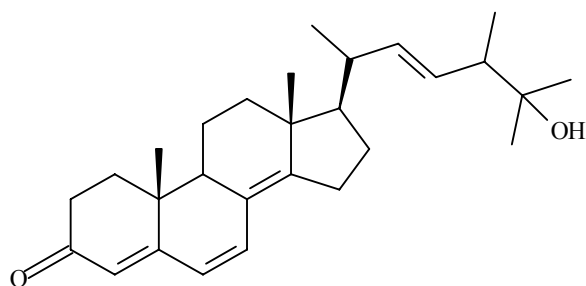
Esteróide 1A (S-4)

Extrato: FDEA

Massa: 2,1 mg

Discussão espectral: página 77

Biossíntese: Anexo 01 p. 305



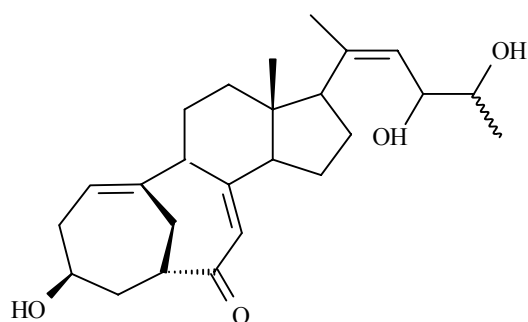
Esteróide 2A (S-5)

Extrato: FDEA

Massa: 4,0 mg

Discussão espectral: página 85

Biossíntese: Anexo 01 p. 305



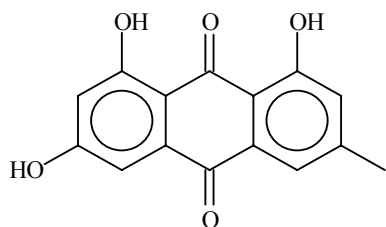
Neociclocitrinol (S-6)

Extrato: FDEA

Massa: 49,7 mg

Discussão espectral: página 95

Biossíntese: Anexo 01 p 306



Emodina (S-7)

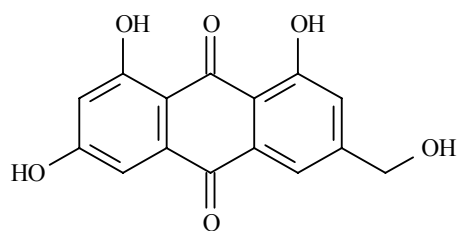
Extrato: FDEA

Massa: 6,2 mg

Discussão espectral: página 108

Biossíntese: Anexo 02 p. 309

Ensaio Biológicos: páginas 274 e 278



Citreorseina (S-8)

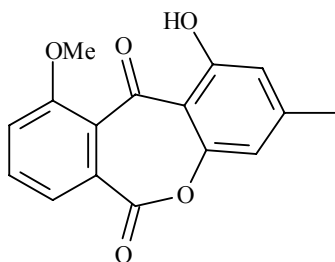
Extrato: FDEA

Massa: 20,3 mg

Discussão espectral: página 120

Biossíntese: Anexo 02 p. 309

Ensaio Biológico: páginas 274 e 279



Janthinona (S-9)

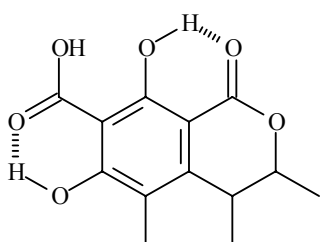
Extrato: FDEA

Massa: 22,0 mg

Discussão espectral: página 130

Biossíntese: Anexo 02 p. 310

Ensaio Biológico: páginas 274 e 280



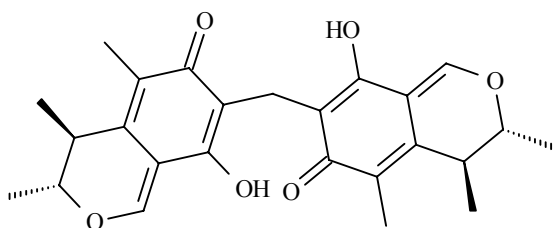
Dihidrocitrinona (S-11)

Extrato: FDEM1Mc

Massa: 22,0 mg

Discussão espectral: página 158

Biossíntese: Anexo 02 p. 312



Citrinina-D (S-12)

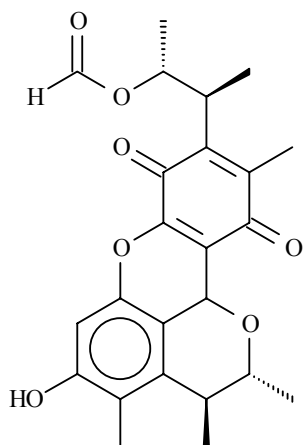
Extrato: FDEM1Mc

Massa: 6,9 mg

Discussão espectral: página 168

Biossíntese: Anexo 02 p. 312

Ensaio Biológico: páginas 274



Citrinina H1 (S-13)

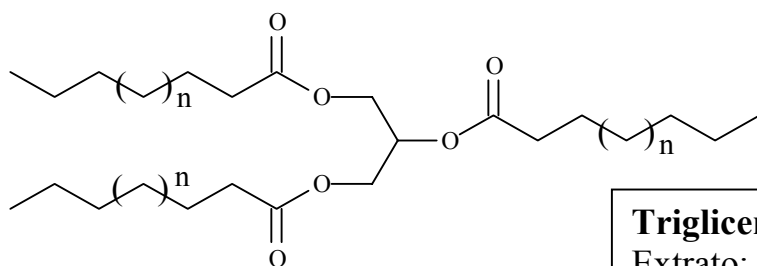
Extrato: FDEM1A

Massa: 30 mg

Discussão espectral: página 181

Biossíntese: Anexo 02 p. 313

Ensaio Biológico: páginas 274

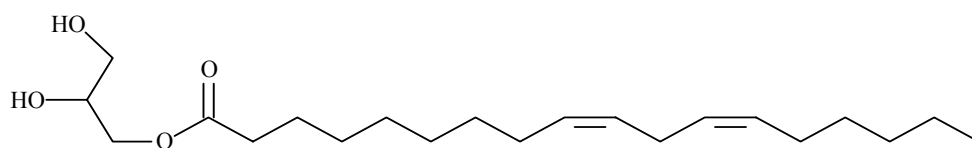


Triglicerideo (S-19)

Extrato: FHEA

Massa: 150,2 mg

Discussão espectral: página 235

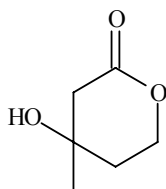


Monoglicerideo (S-20)

Extrato: FDEA e EMI

Massa: 106,9 mg

Discussão espectral: página 240

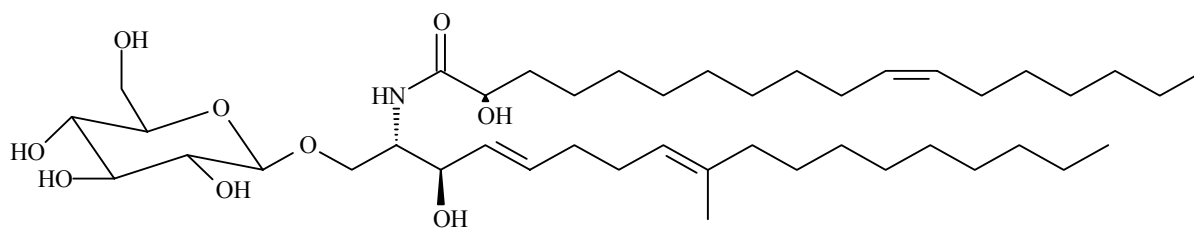


Lactona (S-21)

Extrato: FDEM1A

Massa: 22,0 mg

Discussão espectral: página 252



Cerebrosida (S-22)

Extrato: FDEM1A

Massa: 8,0 mg

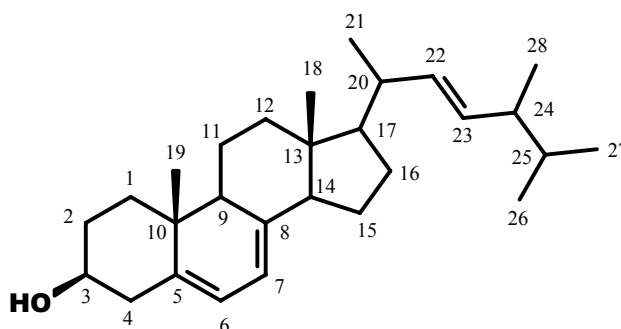
Discussão espectral: página 263

4.2 - IDENTIFICAÇÃO DAS ESTRUTURAS

4.2.1 - ESTERÓIDES

4.2.1.1 - S-1 – Ergosterol

A substância **S-1** foi isolada das frações apolares dos extratos de *Penicillium* sp A, *Penicillium* sp B (*M. paniculata*) e *P. herquei* (*M. azedarach*) na forma de um sólido cristalino branco solúvel em diclorometano e em grande quantidade (1,50 g). No seu espectro de RMN ^1H (FIGURA 4.1) podemos observar sinais em δ 0,63 (*s*), δ 0,82 (*d*, $J= 6,8$ Hz), δ 0,84 (*d*, $J= 6,8$ Hz), δ 0,92 (*d*, $J= 6,8$ Hz), δ 0,95 (*s*) e 1,04 (*d*, $J= 6,7$ Hz), o sinal na região de hidrogênios oximetínicos em δ 3,63 (*m*) e os sinais na região dos hidrogênios ligados a carbonos sp^2 em δ 5,20 (*m*), δ 5,38 (*m*) e δ 5,56 (*m*). O padrão espectral apresentado no RMN ^1H é típico de substância da classe dos esteróides. O ergosterol é um esteróide muito comum e abundante na maioria das espécies de fungos, então para confirmação da proposta foi realizado um espectro de RMN ^{13}C (FIGURA 4.2) de **S-1**.



Ergosterol

No espectro de RMN ^{13}C de **S-1** podemos observar sinais referentes a 28 carbonos, sendo seis referentes a carbonos metílicos (δ 12,0; 16,2; 17,5; 19,6; 21,1 e 33,0), sete metilênicos (δ 21,1; 23,0; 28,2; 31,9; 38,3; 39,1 e 40,7), onze metínicos (δ 19,9; 40,3; 42,8; 46,2; 54,5; 55,7; 70,4; 116,3; 119,6; 132,0 e 135,5), além de quatro sinais referentes a carbonos quaternários (δ 37,0; 42,8; 139,7 e 141,3). A multiplicidade dos carbonos foi atribuída com o auxílio do experimento de DEPT 135° (FIGURA 4.3). Esses dados foram confrontados com os dados de RMN ^{13}C obtidos da literatura para o ergosterol, o qual mostrou total similaridade (TABELA 4.1). A biossíntese do ergosterol encontra-se no Anexo 01 (p. 303)

TABELA 4.1: Dados de RMN ^{13}C de **S-1** (50 MHz, CDCl_3)

S-1		Lit [54]	
	H (δ, multiplicidade, J)	C	C
1		38,3	38,6
2		31,9	32,6
3	3,63 (<i>m</i>)	70,4	69,7
4		40,7	41,1
5		141,3	140,7
6	5,56 (<i>m</i>)	119,6	119,4
7	5,38 (<i>m</i>)	116,3	116,7
8		139,7	140,6
9		46,2	46,5
10		37,0	37,2
11		21,1	21,2
12		28,2	28,3
13		42,8	43,0
14		54,5	54,6
15		23,0	23,1
16		39,1	39,4
17		55,7	56,0
18	0,95 (<i>s</i>)	12,0	11,8
19	0,63 (<i>s</i>)	16,2	16,0
20		40,3	40,5
21	1,04 (<i>d</i> , 6,7)	19,6	19,4
22	5,20 (<i>m</i>)	132,0	132,2
23	5,20 (<i>m</i>)	135,5	136,0
24		42,8	43,0
25		19,9	19,7
26	0,82 (<i>d</i> , 6,8)	33,0	33,2
27	0,84 (<i>d</i> , 6,8)	21,0	21,0
28	0,92 (<i>d</i> , 6,8)	17,5	17,4

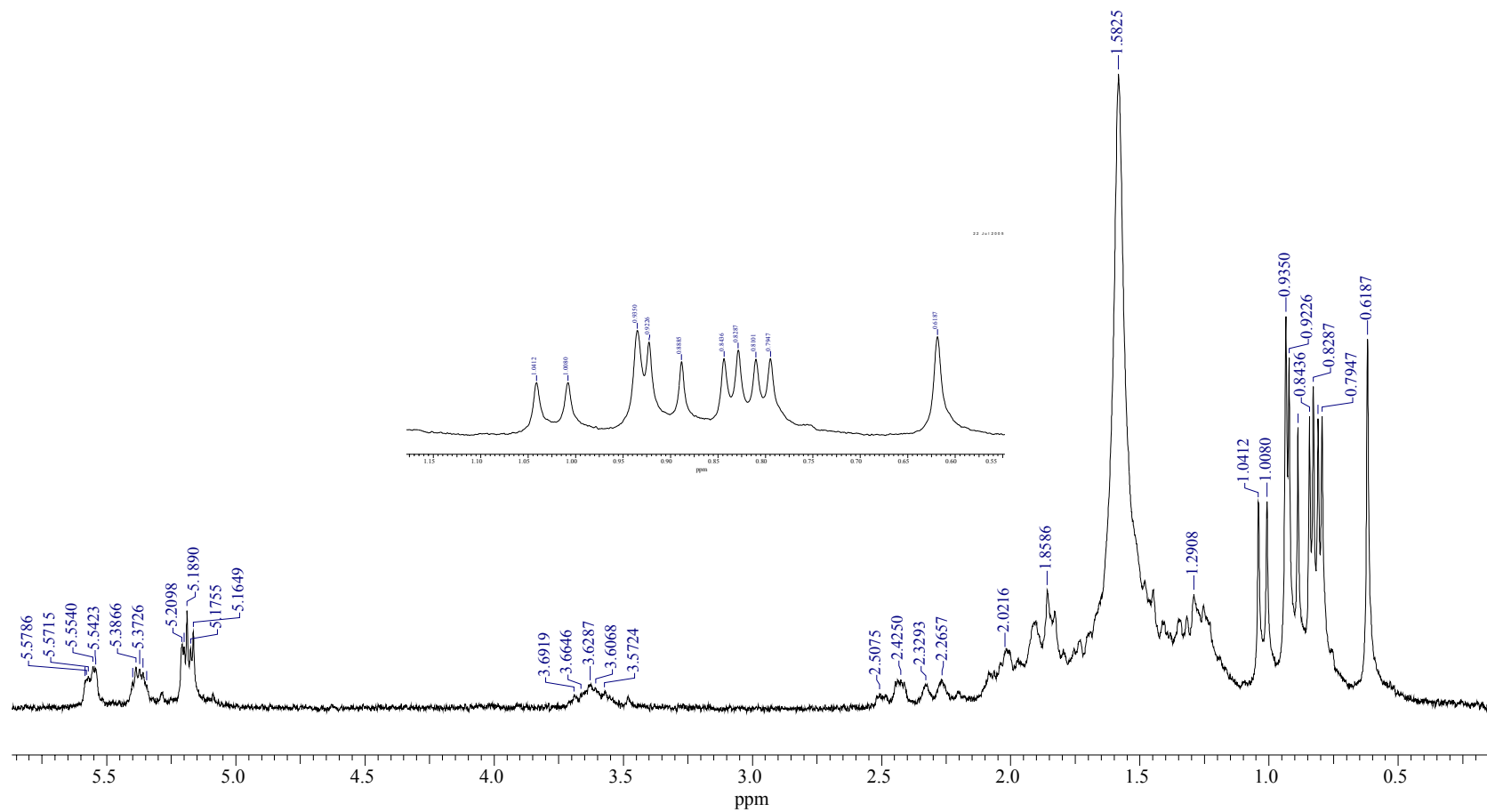


FIGURA 4.1: Espectro de RMN ^1H de S-1 (CDCl_3 , 200 MHz)

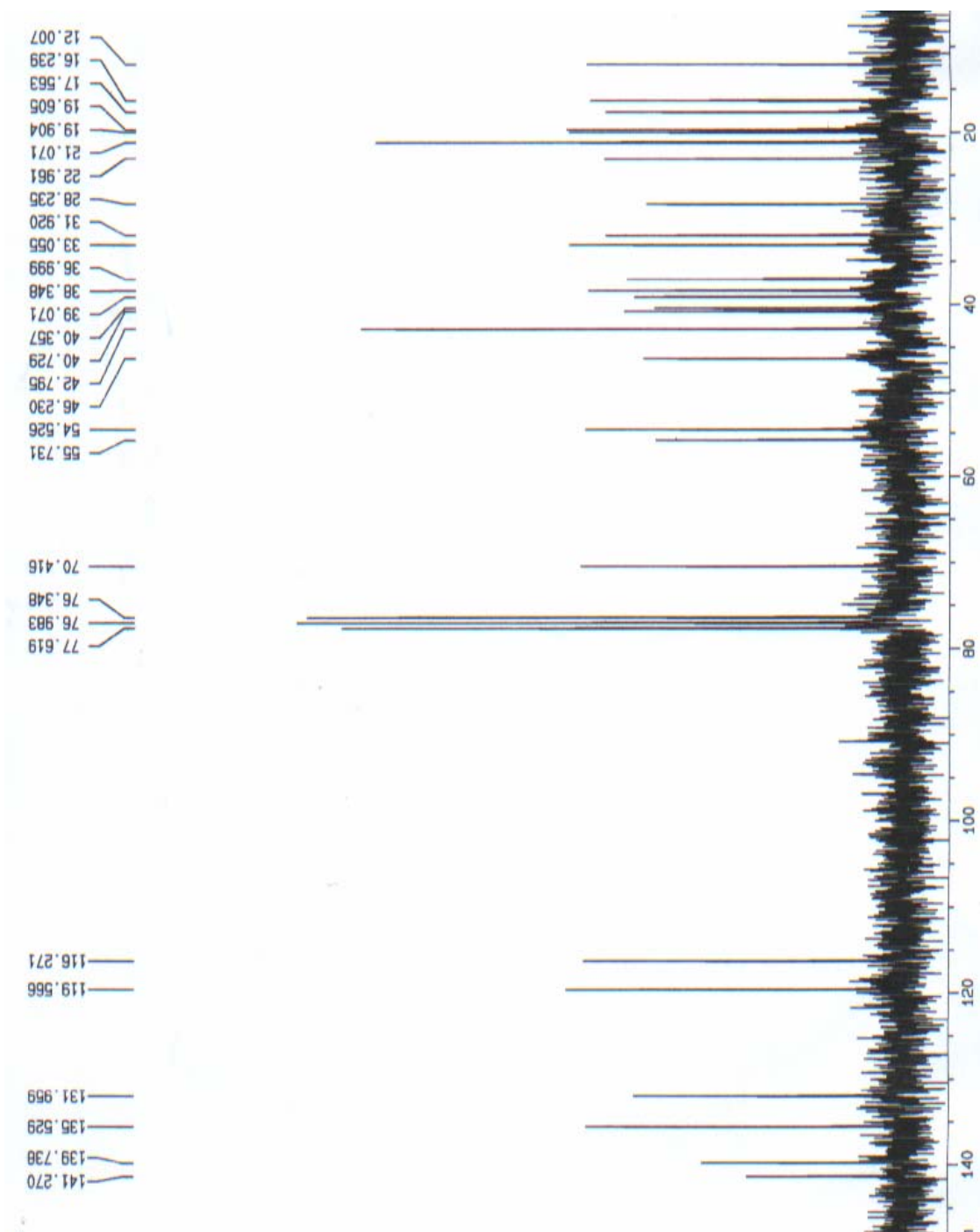


FIGURA 4.2: Espectro de RMN ^{13}C de S-1 (CDCl_3 , 50 MHz)

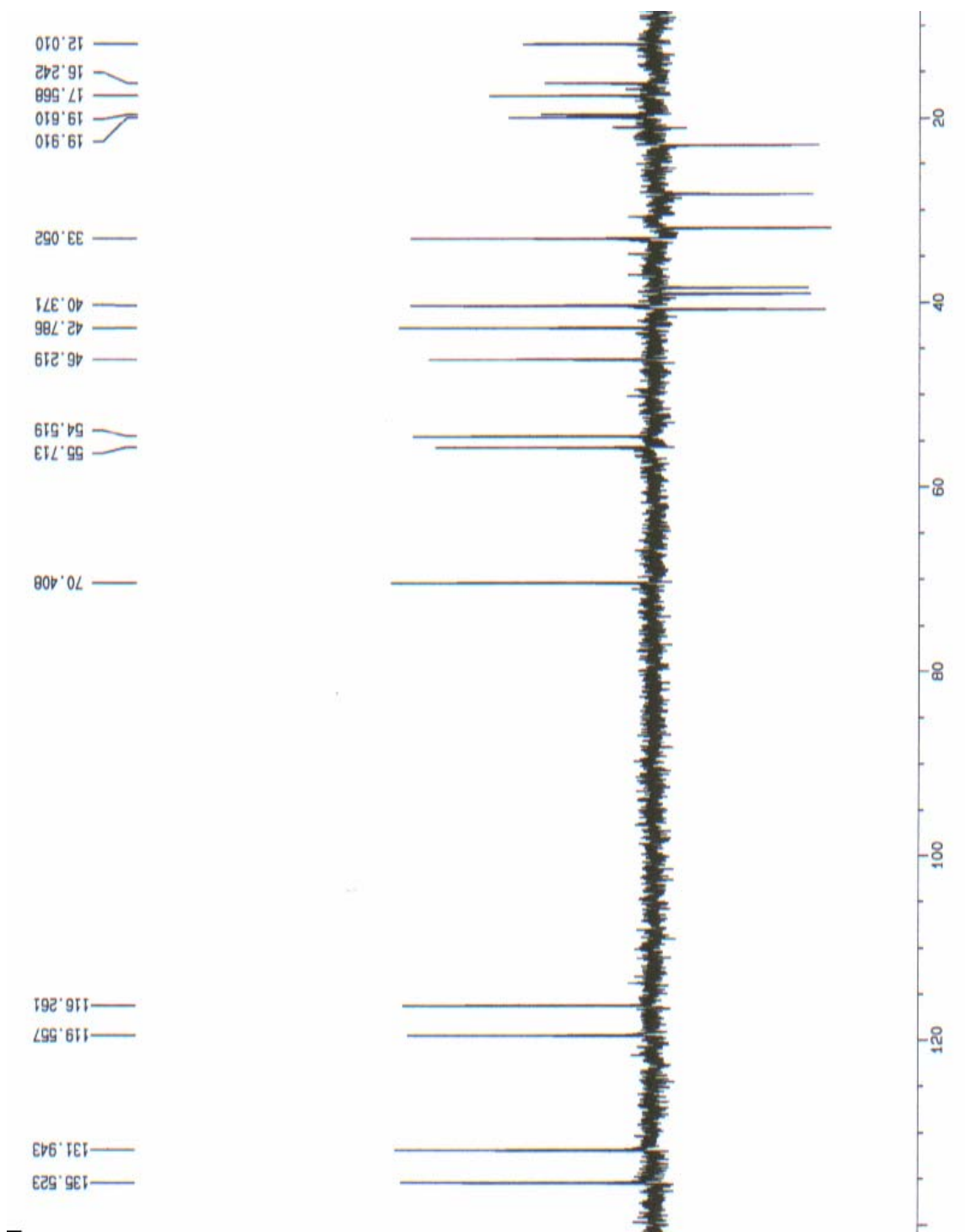
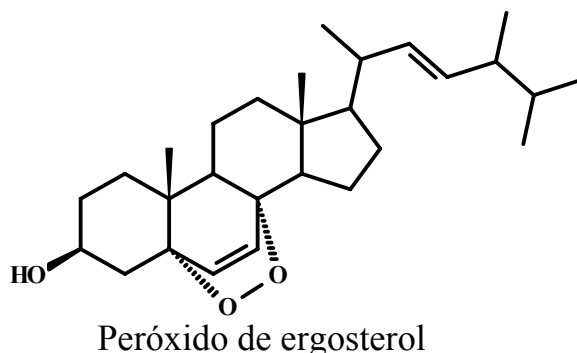


FIGURA 4.3: Espectro de DEPT 135 de S-1 (CDCl_3 , 50 MHz)

4.2.1.2 - S-2 – Peróxido de ergosterol

Este composto foi isolado das três espécies de *Penicillium* estudadas. Apresentou-se como um sólido branco solúvel em diclorometano. No seu espectro de RMN ^1H (FIGURA 4.4) observamos sinais típicos de um composto com esqueleto esteroidal. Podemos ver a região das metilas sinais em δ 0,80 (*d*), δ 0,83 (*d*), δ 0,88 (*s*), δ 0,89 (*d*), δ 0,98 (*d*) e δ 1,22 (*s*), temos ainda o sinal em δ 3,95 (*m*) atribuído a presença de um hidrogênio carbinólico em **S-2**, os sinais em δ 5,15 (*m*) e δ 5,21 (*m*) são comumente atribuídos a existência de ligações duplas na cadeia lateral de um esteróide. Além desses sinais foram observados também os sinais em δ 6,22 (*d*) e δ 6,49 (*d*) ambos acoplando entre si com constante de 8 Hz, que indica a estereoquímica *cis* para os hidrogênios.



Foi obtido então um espectro de RMN ^{13}C (FIGURA 4.5. O espectro possui sinais de impurezas) para **S-2**, onde podemos observar três sinais referentes a carbonos ligados a heteroátomo δ 66,5; δ 79,4 e δ 82,1; no espectro de RMN ^1H observamos apenas um sinal referente a hidrogênio carbinólico, com isso, é atribuída a existência de dois carbonos quaternários ligados a oxigênio no composto. São observados também os sinais em δ 130,8; δ 132,4; δ 135,2 e δ 135,4 indicando a existência de duas ligações duplas em **S-2**. Com essas informações resolveu-se então comparar os dados espectroscópicos de **S-2** com dados obtidos na

literatura para esteróides comumente isolados de fungos. Observou-se a total similaridade dos deslocamentos químicos dos sinais de **S-2** com o peróxido de ergosterol (TABELA 4.2). A proposta biogenética para o peróxido de ergosterol encontra-se no Anexo 01 (p. 304).

TABELA 4.2: Dados de RMN ^1H e ^{13}C de **S-2** (CDCl_3 , 200 MHz)

S-2		Lit [55]	
	H (δ, multiplicidade, J)	C	C
1		30,1	30,2
2		34,7	34,8
3	3,95 (<i>m</i>)	66,5	66,5
4		39,3	39,4
5		82,1	82,1
6	6,22 (<i>d</i> , 8,0)	135,2	135,2
7	6,49 (<i>d</i> , 8,0)	130,7	130,8
8		79,4	79,4
9		51,1	51,2
10		37,0	37,0
11		20,6	20,7
12		37,0	37,0
13		44,6	44,6
14		51,7	51,8
15		23,4	23,4
16		28,6	28,6
17		56,2	56,3
18	1,22 (<i>s</i>)	12,9	12,9
19	0,88 (<i>s</i>)	18,2	18,2
20		39,7	39,4
21	0,89 (<i>d</i> , 6,9)	20,9	20,9
22	5,21 (<i>m</i>)	135,4	135,4
23	5,15 (<i>m</i>)	132,3	132,4
24		42,8	42,8
25		33,1	33,1
26	0,83 (<i>d</i> , 6,7)	19,6	19,6
27	0,80 (<i>d</i> , 6,5)	19,9	19,9
28	0,98 (<i>d</i> , 6,8)	17,5	17,6

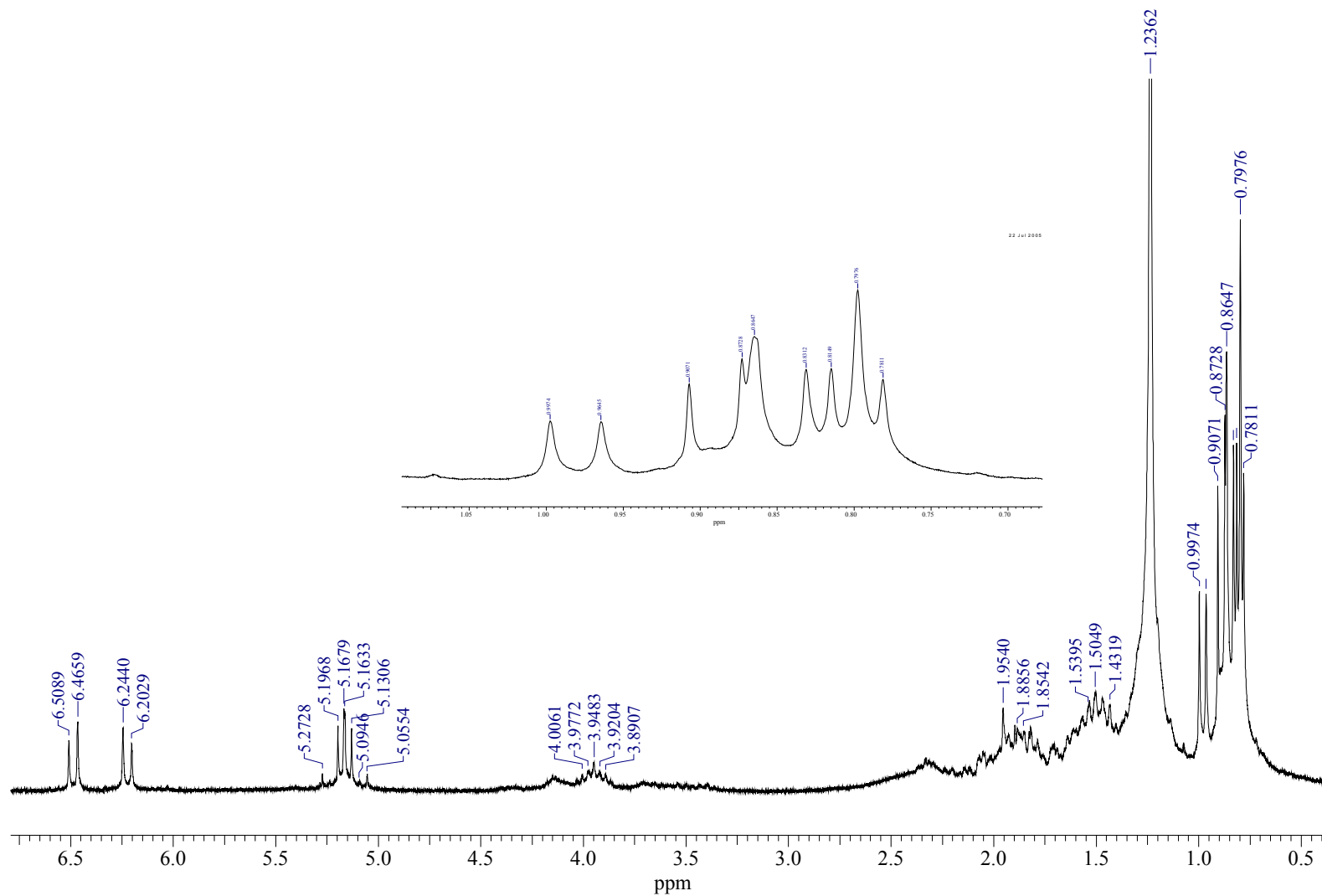


FIGURA 4.4: Espectro de RMN ^1H de S-2 (CDCl_3 , 200 MHz)

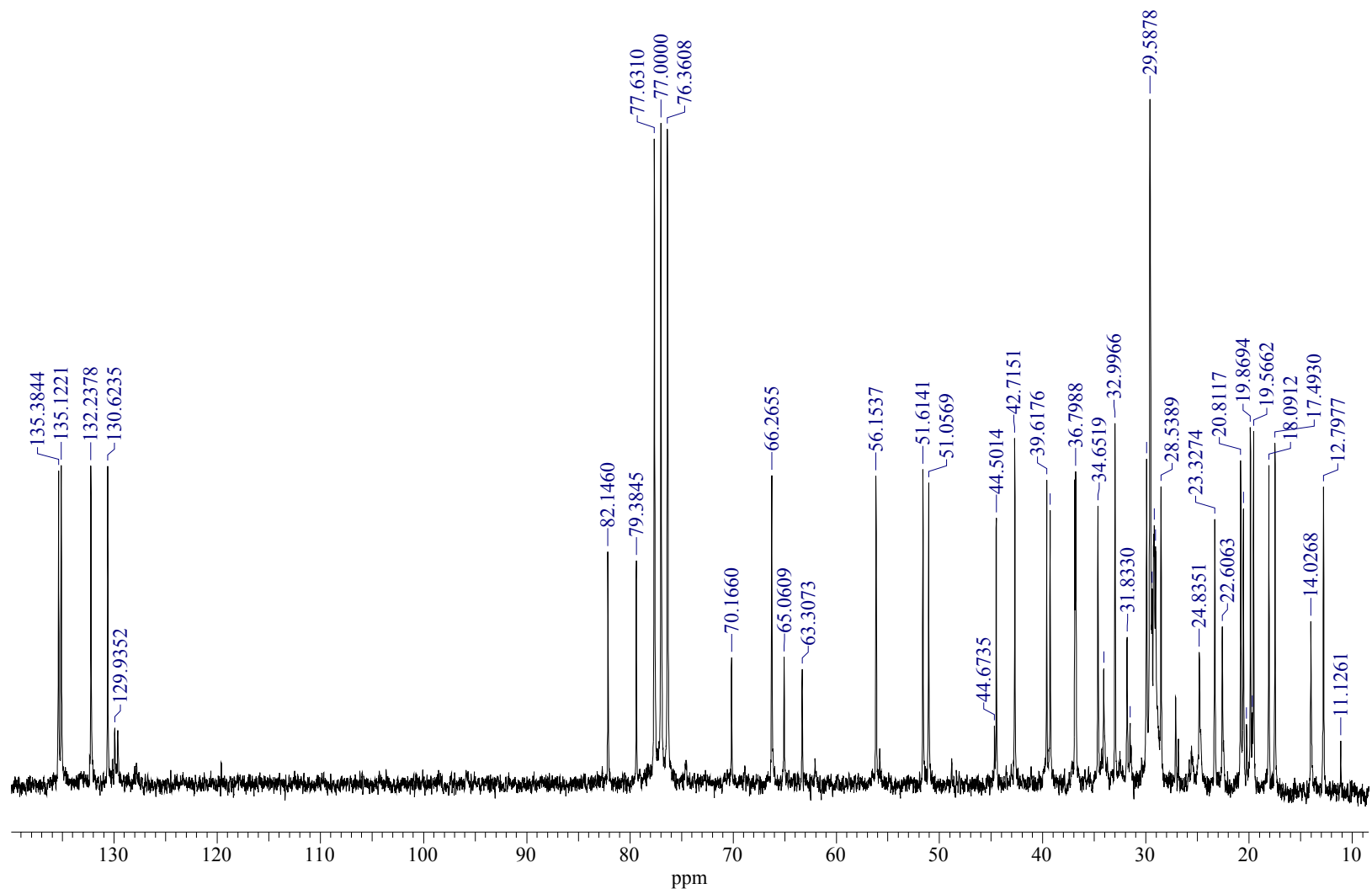
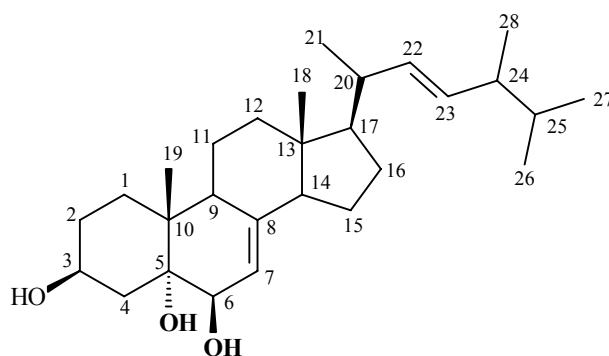


FIGURA 4.5: Espectro de RMN ^{13}C de S-2 (CDCl_3 , 50 MHz)

4.2.1.3 - S-3 – Cerivisterol

A substância **S-3** foi isolada das espécies de *Penicillium* sp A, *Penicillium* sp B (*M. paniculata*) e *Penicillium herquei* (*M. azedarach*), como um sólido branco solúvel em diclorometano e parcialmente solúvel em metanol. Foi realizada uma CCDA para comparar **S-3** com a amostra de ergosterol, no entanto **S-3** mostrou-se mais polar (com um menor Rf) do que a amostra de ergosterol. Sabido que **S-3** não se tratava do ergosterol realizou-se um espectro de RMN ^1H (FIGURA 4.6), onde podemos observar os sinais na região das metilas δ 0,59 (*s*), δ 0,81 (*s*), δ 0,83 (*d*), δ 0,90 (*d*), δ 1,02 (*d*) e δ 1,07 (*s*), dois sinais na região de hidrogênio oximetínico δ 3,61 (*m*) e δ 4,07 (*m*), além dos sinais na região dos hidrogênios olefinicos δ 5,18 (*m*) e δ 5,35 (*m*). O padrão espectral do RMN ^1H de **S-3** apresenta características de esteróide, então foi realizado um espectro de RMN ^{13}C (FIGURA 4.7) do composto para análise dos dados.



Cerivisterol

O espectro de RMN ^{13}C de **S-3** apresentou um padrão típico de substâncias com o esqueleto esteroidal, confirmando os dados obtidos no RMN ^1H . Nele observamos sinais em δ 117,6; δ 132,2; δ 135,4 e δ 144,0 que são comumente atribuídos a presença de duplas ligações na molécula, assim, atribuímos a existência de duas ligações duplas em **S-3**. Observou-se ainda no espectro de RMN ^{13}C de **S-3**, além dos sinais típicos de carbonos metílicos e metilênicos, sinais referentes a três carbonos carbinólicos δ 67,8; δ 73,7 e δ 76,0; como no espectro de RMN ^1H temos sinais de apenas dois hidrogênios oximetínicos um dos carbonos seria quaternário. Os dados de RMN ^{13}C de **S-3** foram confrontados com dados da literatura onde estes apresentaram total similaridade com o cerivisterol (TABELA 4.3). A proposta biogenética para o cerivisterol encontra-se no Anexo 01 (p. 304).

TABELA 4.3: Dados de RMN ^1H e ^{13}C de S-3 (CDCl_3 , 200 MHz)

S-3			Lit [56]
	H (δ , multiplicidade, J)	C	C
1		33,0	32,8
2		30,9	30,4
3	4,07 (<i>m</i>)	67,8	67,2
4		39,3	39,3
5		76,0	75,9
6	3,61 (<i>m</i>)	73,6	73,1
7	5,35 (<i>sl</i>)	117,6	117,3
8		144,0	143,2
9		43,5	43,2
10		37,2	37,0
11		22,1	22,0
12		39,5	38,9
13		43,8	43,6
14		54,8	54,7
15		22,9	22,9
16		27,9	28,0
17		56,0	55,9
18	0,59 (<i>s</i>)	12,3	12,3
19	1,07 (<i>s</i>)	18,8	18,4
20		40,4	40,4
21	1,02 (<i>d</i> , 6,4)	19,6	19,6
22	5,17 (<i>m</i>)	132,2	131,9
23	5,20 (<i>m</i>)	135,4	135,8
24		42,8	42,8
25		33,1	33,1
26	0,81 (<i>d</i> , 6,7)	19,9	19,9
27	0,83 (<i>d</i> , 6,5)	21,1	21,1
28	0,90 (<i>d</i> , 6,8)	17,6	17,6

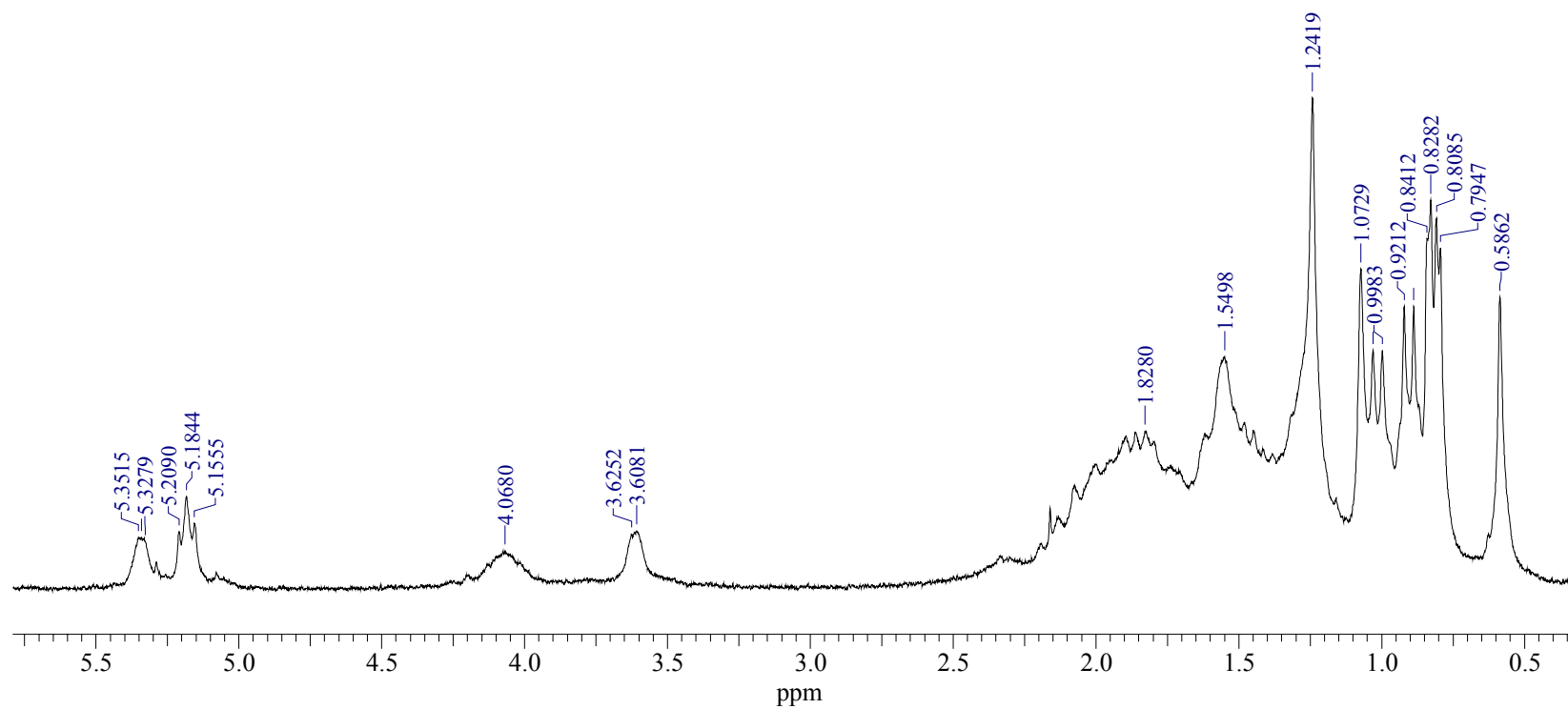


FIGURA 4.6: Espectro de RMN ¹H de S-3 (CDCl₃, 200 MHz)

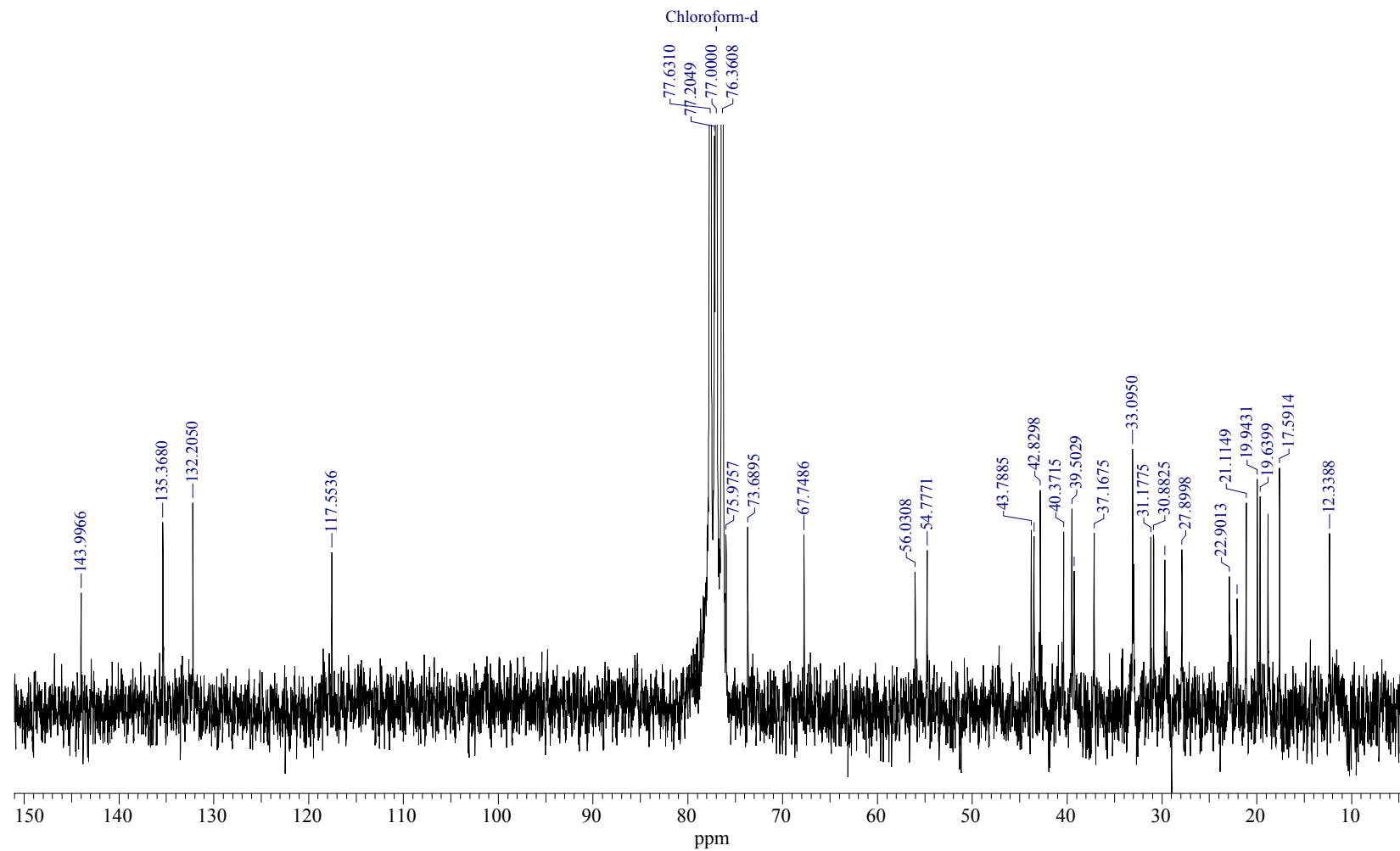
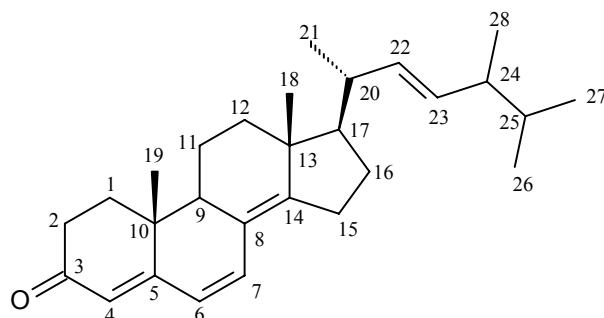


FIGURA 4.7: Espectro de RMN ^{13}C de S-3 (CDCl_3 , 50 MHz)

4.2.1.4 - S-4 – Esteróide 1A

O composto **S-4** foi isolado como um sólido amarelo através de métodos clássicos de cromatografia. Em seu espectro de RMN ^1H (FIGURA 4.8) podemos observar sinais nas regiões de metilas (δ 0,80 - δ 1,00) e de hidrogênios ligados a carbonos sp^2 (δ 5,00 – δ 6,80). Não foi observado sinal na região dos hidrogênios carbinólicos indicando a ausência desse grupo em **S-4**. Na região das metilas, ainda no espectro de RMN ^1H , temos os sinais em δ 0,82 (*d*, $J = 6,8$ Hz, 3H), δ 0,84 (*d*, $J = 6,8$ Hz, 3H), δ 0,92 (*d*, $J = 6,8$ Hz, 3H), δ 0,95 (*s*, 3H), δ 0,98 (*s*, 3H) e δ 1,05 (*d*, $J = 6,7$ Hz, 3H), com esses dados podemos atribuir a existência de duas metilas ligadas a carbonos quaternários, dando os singletos, e quatro metilas ligadas a carbonos metínicos, gerando os dubletos. Na região dos hidrogênios olefinicos temos os sinais δ 5,22 (*m*, 2H), δ 5,72 (*s*, 1H), δ 6,01 (*d*, $J = 9,4$ Hz, 1H) e δ 6,60 (*d*, $J = 9,4$ Hz, 1H), podemos através desses dados atribuir a existência de cinco hidrogênios de ligação dupla na molécula, sendo que dois deles estão *cis* relacionados conforme suas constantes de acoplamento ($J = 9,4$ Hz).

Os dados são típicos de um esqueleto esteroidal do tipo ergostano, no entanto o composto apresenta algumas insaturações e possivelmente C-3 oxidado a uma carbonila, informação esta reforçada pela ausência do sinal de hidrogênio carbinólico no espectro de RMN ^1H . Através da análise dos dados de RMN ^1H e ^{13}C juntamente com os dados de massas ESI (+) (m/z 393, $[\text{M}+\text{H}]^+$) pode-se propor a fórmula molecular $\text{C}_{28}\text{H}_{40}\text{O}$ para **S-4** e através de seus espectros de RMN 1D e 2D pode-se identificar a estrutura como sendo ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one e fazer a correta atribuição dos sinais. A seguir será feita a discussão dos dados espectrais de **S-4**.

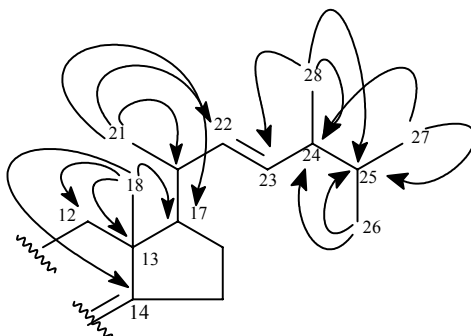


ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one

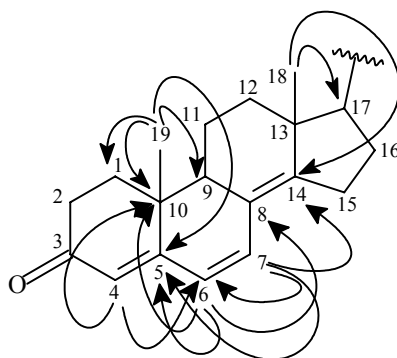
No espectro de RMN ^{13}C (FIGURA 4.9) foram observados 28 sinais sendo sete referentes a carbonos sp^2 C-4, C-5, C-6, C-7, C-8, C-14, C-22 e C-23 (δ 123,1; 164,2; 124,5; 133,9; 124,5; 156,0; 135,0; 132,6; respectivamente) e além de outros sinais foi observado um sinal em δ 199,3 (C-3) atribuído a uma carbonila conjugada. No experimento de HSQC (FIGURA 4.10) podemos ver as correlações de δ 0,82 (Me-26) com δ 20,0; δ 0,84 (Me-27) com δ 19,7; δ 0,92 (Me-28) com δ 17,6; δ 0,95 (Me-18) com δ 19,0; δ 0,98 (Me-19) com δ 16,7; δ 1,05 (Me-21) com δ 21,2; δ 5,22 (H-22 e H-23) com δ 135,0 e δ 132,6; δ 5,72 (H-4) com δ 123,1; δ 6,01 (H-6) com 124,5 e δ 6,60 (H-7) com δ 133,9; essas correlações confirmam a existência dos carbonos sp^2 e das metilas em **S-4**.

No experimento de HMBC (FIGURA 4.11) as correlações de δ 0,95 (Me-18) e δ 1,05 (Me-21) com o sinal δ 55,8 (C-17) permitiram atribuir de maneira correta δ 0,95 como sendo a metila Me-18 e a correlação desta com o sinal em δ 156,0 possibilitou a atribuição de δ 156,0 ao carbono C-14. Temos ainda a correlação de Me-18 com carbono em δ 35,7 (C-12) e δ 44,1 (C-13), as correlações de Me-21 com os carbonos em C-17, δ 39,2 (C-20) e δ 135,0 (C-22); as correlações de M-28 com os carbonos δ 132,6 (C-23), δ 42,9 (C-24) e δ 33,1 (C-25); as

correlações de Me-26 e Me-27 com os carbonos C-24 e C-25.. Essas correlações permitiram a determinar a cadeia lateral de **S-4**, assim como, fazer a correta atribuição dos sinais.



As correlações de Me-19 e H-7 com o sinal em δ 164,2 permitiram atribuir esse valor ao carbono C-5. Temos também as correlações de M-19 com os carbonos δ 34,1 (C-1), δ 36,8 (C-10) e δ 44,5 (C-9); as correlações de H-4 com os carbonos C-10 e C-6, por sua vês H-6 apresenta correlações com os carbonos C-10 e δ 124,5 (C-8) e o hidrogênio H-7 tem correlações com C-9, C-14 e C-5, através dessas correlações foi possível propor a estrutura do esqueleto de **S-4** bem como fazer a correta atribuição dos sinais.



Através da análise espectral **S-4** foi identificado como sendo o esteróide ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one e seus dados apresentaram total similaridade com os dados dispostos na literatura (TABELA 4.4). A proposta biogenética para o esteróide 1A encontra-se no Anexo 01 (p. 305).

TABELA 4.4: Dados de RMN ^1H e ^{13}C de **S-4** (CDCl_3 , 400 MHz)

S-4		Lit [57,58]		
	H (δ, multiplicidade, J)	C	H (δ, multiplicidade, J)	C
1		34,1		34,1
2		34,2		34,1
3		199,3		199,5
4	5,72 (<i>s</i>)	123,1	5,74 (<i>s</i>)	123,0
5		164,2		164,2
6	6,01 (<i>d</i> , 9,4)	124,5	6,03 (<i>d</i> , 9,6)	124,4
7	6,60 (<i>d</i> , 9,4)	133,9	6,61 (<i>d</i> , 9,6)	134,0
8		124,5		124,5
9		44,5		44,3
10		36,8		36,7
11		19,0		18,9
12		35,7		35,6
13		44,1		44,0
14		156,0		156,1
15		25,4		25,4
16		27,7		27,7
17		55,8		55,7
18	0,95 (<i>s</i>)	19,0	0,96 (<i>s</i>)	19,0
19	0,98 (<i>s</i>)	16,7	1,00 (<i>s</i>)	16,6
20		39,2		39,3
21	1,05 (<i>d</i> , 6,7)	21,2	1,06 (<i>d</i> , 6,7)	21,2
22	5,22 (<i>m</i>)	135,0	5,23 (<i>m</i>)	135,0
23	5,22 (<i>m</i>)	132,6	5,23 (<i>m</i>)	132,5
24		42,9		42,9
25		33,1		33,1
26	0,82 (<i>d</i> , 6,8)	20,0	0,83 (<i>d</i> , 6,7)	20,0
27	0,84 (<i>d</i> , 6,8)	19,7	0,85 (<i>d</i> , 6,7)	19,6
28	0,92 (<i>d</i> , 6,8)	17,6	0,93 (<i>d</i> , 7,0)	17,6

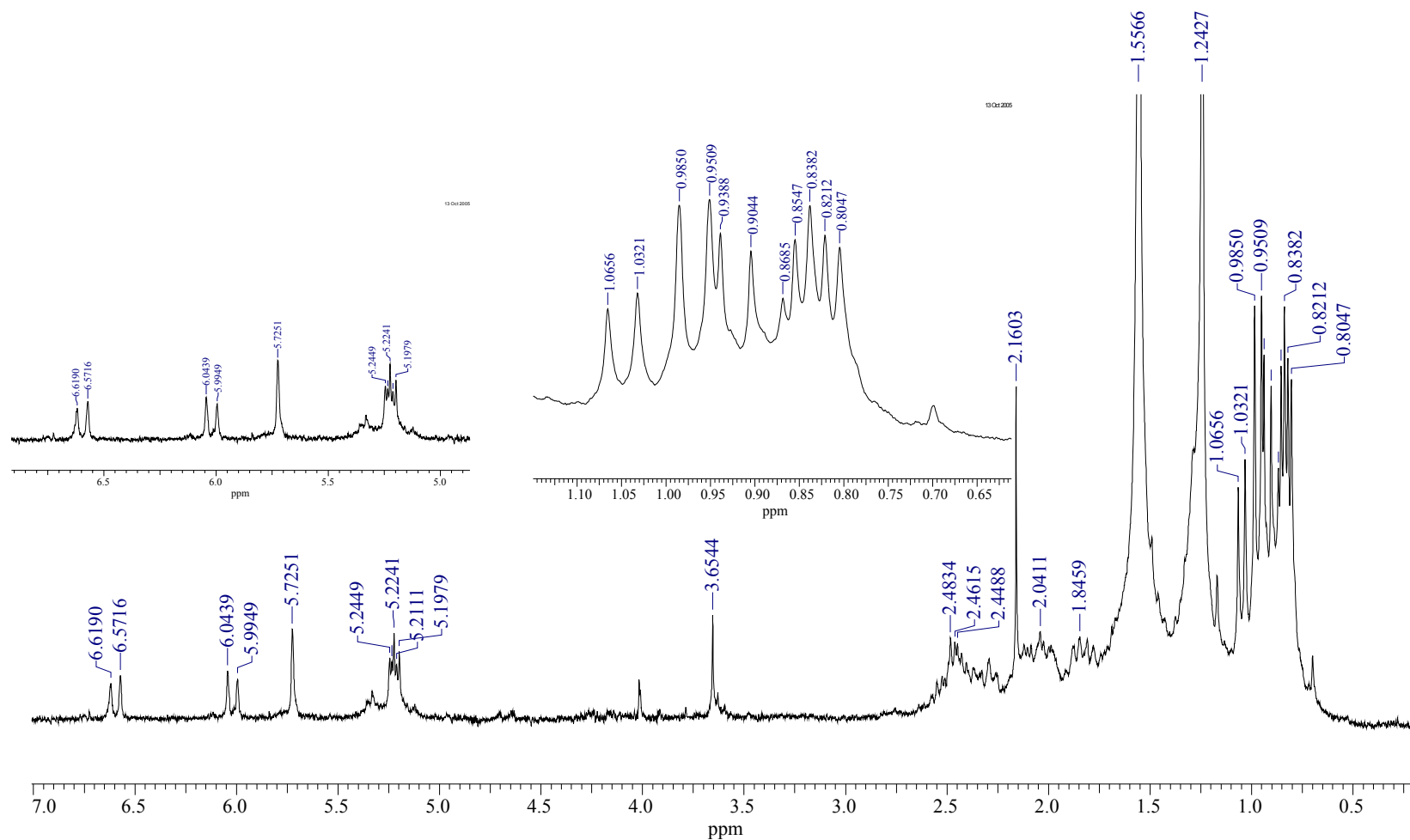


FIGURA 4.8: Espectro de RMN ^1H de S-4 (CDCl_3 , 200 MHz)

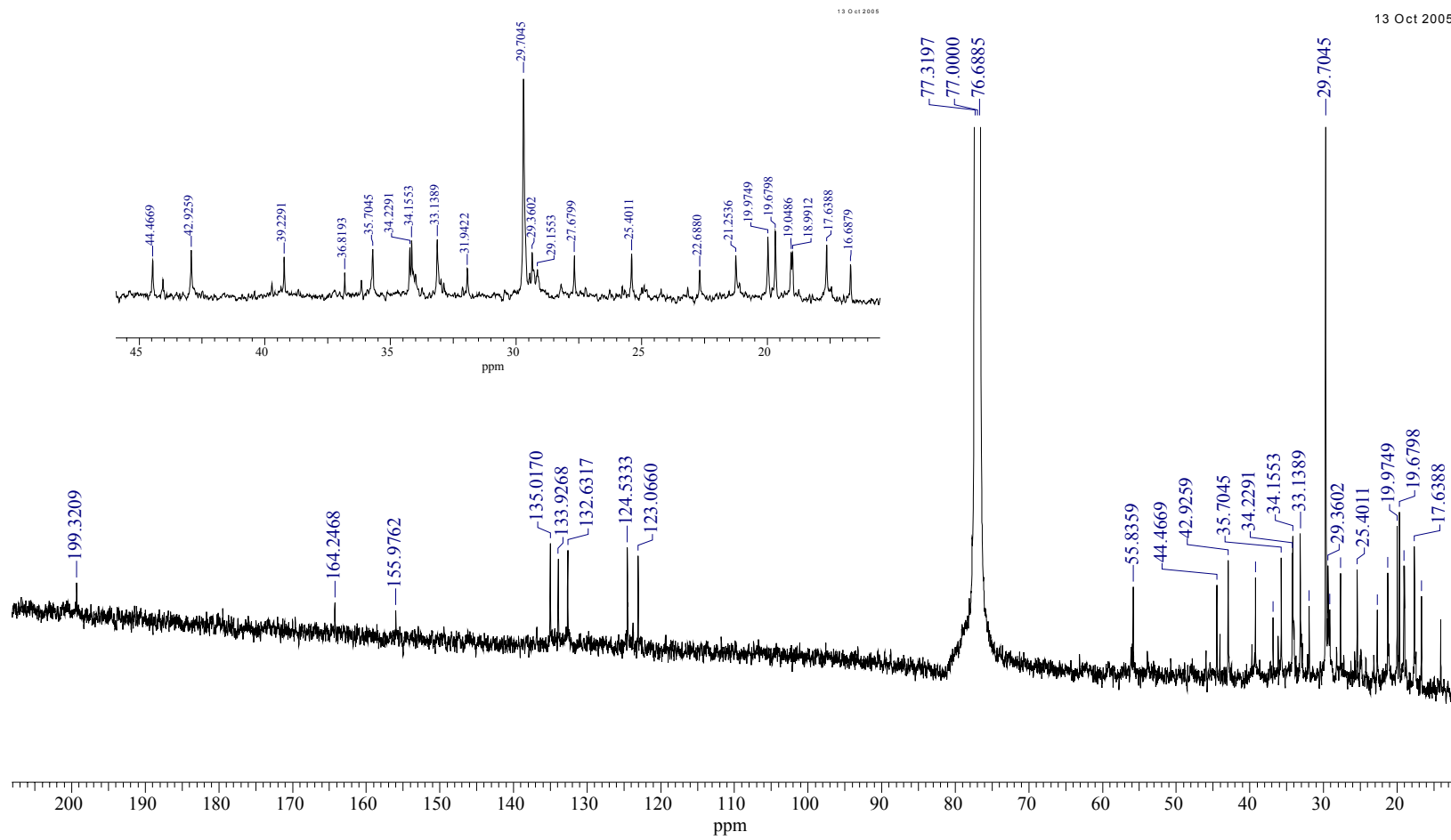


FIGURA 4.9: Espectro de RMN ^{13}C de S-4 (CDCl_3 , 100 MHz)

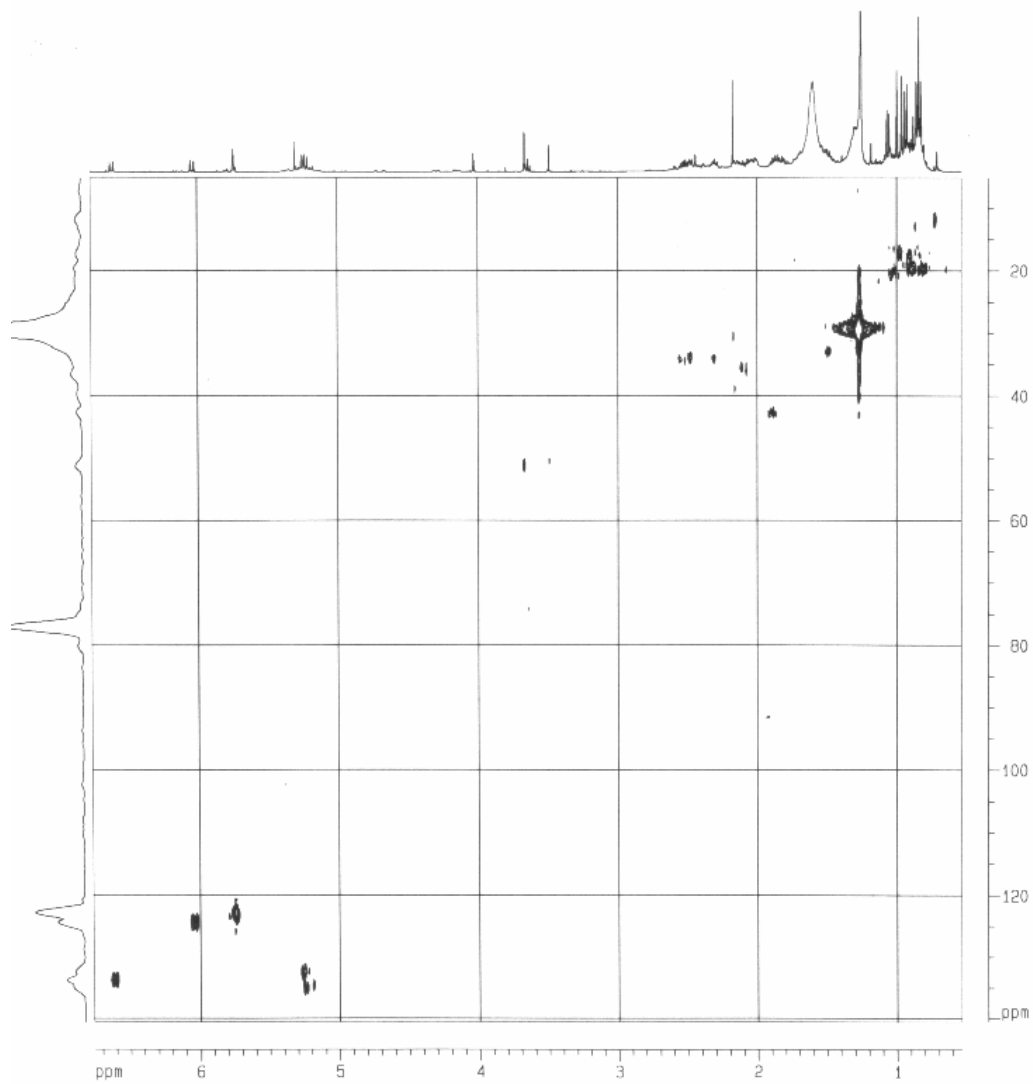


FIGURA 4.10: Experimento de HSQC de S-4

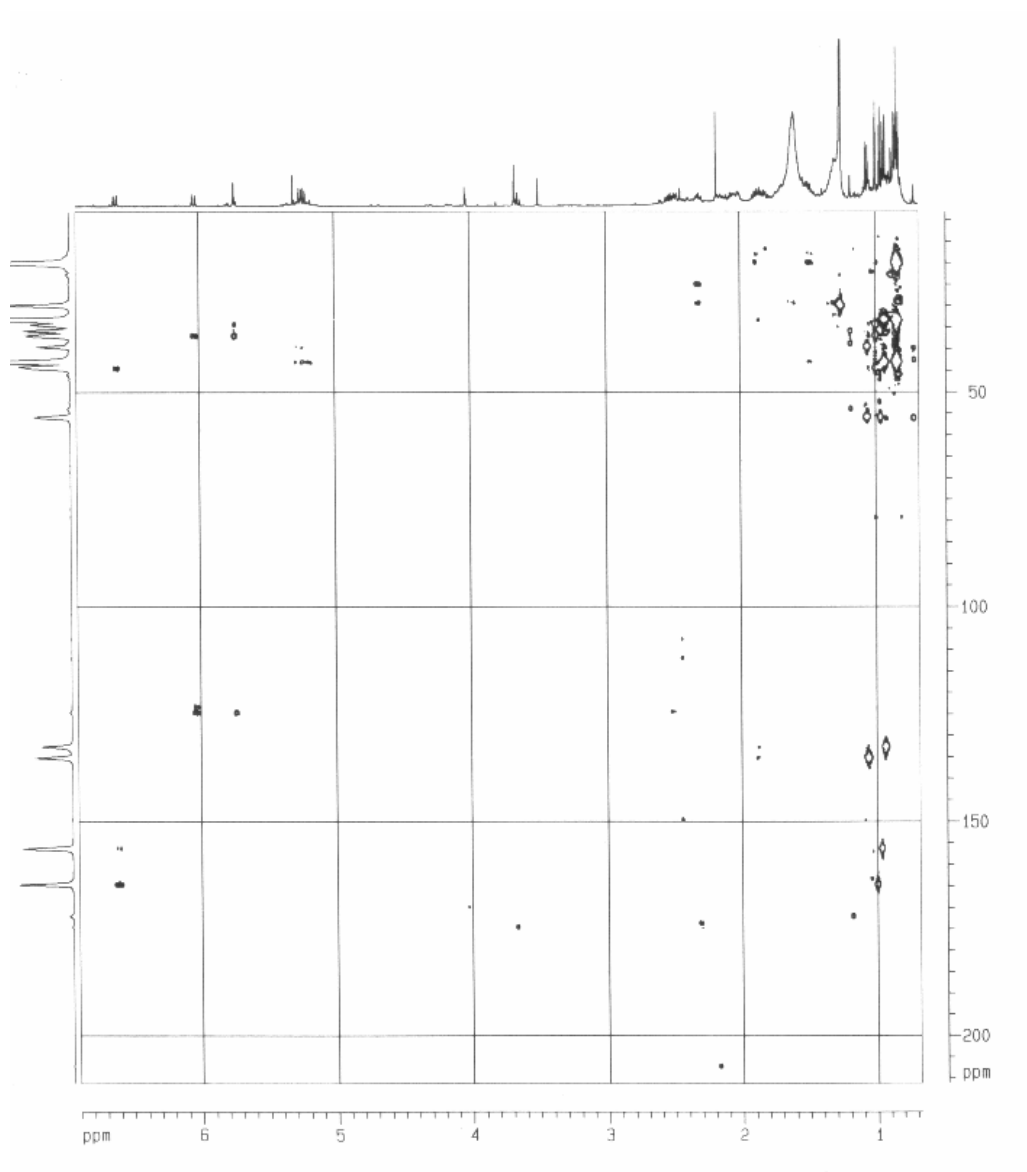
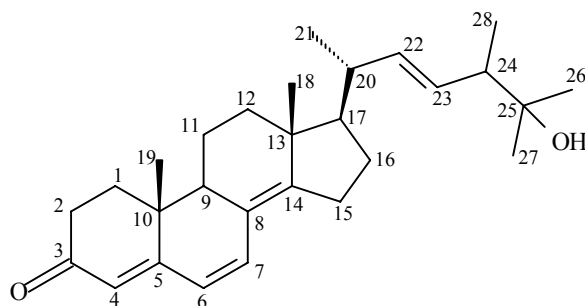


FIGURA 4.11: Experimento de HMBC de S-4

4.2.1.5 - S-5 – Esteróide 2A

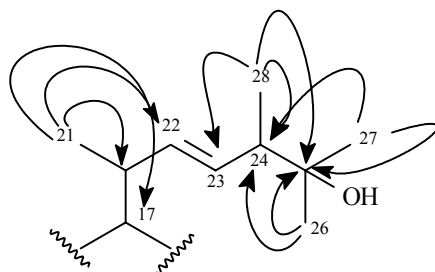
Esta substância foi isolada como um sólido amarelo através de métodos clássicos de cromatografia em coluna e por HPLC. O espectro de RMN ^1H (FIGURA 4.13) mostrou sinais para seis metilas em δ 0,97 (*s*, 3H), δ 1,00 (*s*, 3H), δ 1,01 (*d*, $J = 6,9$ Hz, 3H), δ 1,08 (*d*, $J = 6,7$ Hz, 3H), δ 1,15 (*s*, 3H) e δ 1,18 (*s*, 3H) sendo que dois sinais são dubletos e devem estar ligadas a carbonos metínicos e quatro geram singletos, indicando que estas metilas devem estar posicionadas diretamente a carbonos quaternários. Temos o espectro ainda sinais referentes a hidrogênios ligados a carbonos sp^2 , são os sinais δ 5,37 (*m*, 2H), δ 5,74 (*s*, 1H), δ 6,04 (*d*, $J = 9,7$ Hz, 1H) e δ 6,60 (*d*, $J = 9,7$ Hz, 1H), estes dados indicam que existem dois hidrogênios *cis* relacionados em S-5 devido apresentarem constante de acoplamento 9,7 Hz. Não foi observado no espectro de RMN ^1H sinal referente a hidrogênio carbinólico.

O padrão espectral assim como os dados de S-5 mostraram-se semelhantes ao de S-4, indicando que tínhamos um composto similar ao anterior, esta informação foi confirmada pela obtenção dos espectros de RMN 2D. Através das projeções no HSQC e HMBC foram observados sinais referentes a oito carbonos olefínicos (δ 123,5; 124,4; 124,5; 129,9; 134,0; 138,2; 156,0 e 164,3) e um sinal típico de carbonila conjugada em δ 199,5, foi observado um sinal referente a carbono carbinólico em δ 72,5, no entanto este carbono deve ser quaternário devido não ser observado no RMN ^1H presença de hidrogênio carbinólico. Através dos dados de RMN ^1H e com as projeções para ^{13}C juntamente com os dados de massas ApCI (+) (m/z 409 $[\text{M}+\text{H}]^+$) (FIGURA 4.14) pode-se propor a formula molecular $\text{C}_{28}\text{H}_{40}\text{O}_2$ para S-5. A estrutura de S-5 foi identificada pela análise de seus espectros de RMN 1D e 2D como sendo o esteróide 25-hidroxiergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona.

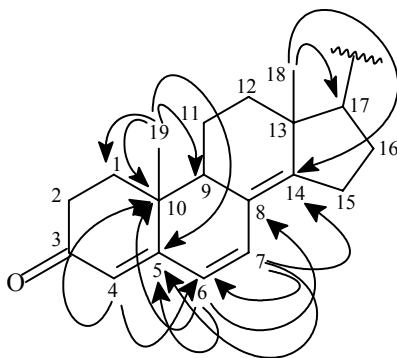


25-hidroxi ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona

No experimento de HSQC (FIGURA 4.15), para a cadeia lateral, pode-se ver as correlações de δ 1,08 (Me-21) com o carbono em δ 21,0; de δ 5,37 (H-22 e H-23) com os carbonos em δ 138,2 e δ 129,9; de δ 1,15 (Me-26) e δ 1,18 (Me-27) com os carbonos em δ 27,0 e 26,3 respectivamente. No espectro de HMBC (FIGURA 4.16) temos as correlações de Me-26, Me-27 e Me-28 com um sinal em δ 72,5, indicando que o carbono carbinólico observado no RMN ^{13}C está localizado na cadeia lateral de **S-5** e foi atribuído a C-25. Me-28 também correlaciona com o carbono em δ 129,9 onde este sinal foi atribuído ao C-23. Temos ainda a correlação de Me-21 com os sinais em δ 56,1 (C-17), δ 39,6 (C-20) e δ 138,2 (C-22). Através dessas correlações juntamente com as informações do espectro de RMN ^1H onde temos sinais singletos para Me-26 e Me-27 podemos propor a estrutura da cadeia lateral do esteróide sugerindo uma oxidação em C-25.



Ainda no experimento de HSQC pode-se observar as correlações de δ 0,97 (Me-18) e δ 1,00 (Me-19) com os sinais em δ 19,0 e δ 16,2, respectivamente. Observaram-se ainda as correlações de δ 5,74 (H-4) com δ 123,5; δ 6,04 (H-6) com δ 124,5 e δ 6,60 (H-7) com δ 134,0. No espectro de HMBC viu-se a correlação de Me-18 com o carbono C-17 (δ 56,0) e ainda com os sinais em δ 44,1 (C-13) e δ 156,0 (C-14). O hidrogênio H-7 apresenta correlação com C-14 confirmando a atribuição correta de δ 156,0 para este carbono, H-7 apresenta ainda correlações com δ 44,5 (C-9); δ 124,5 (C-6) e 164,3 (C-5); a atribuição de δ 164,3 a C-5 pode ser confirmada através da correlação de Me-19 com este valor de deslocamento químico, a metila Me-19 tem correlações ainda com δ 34,1 (C-1), C-9 e δ 36,8 (C-10). O hidrogênio H-6 mostra correlações com os carbonos C-5, C-10 e C-9 e δ 124,4 (C-8); para o hidrogênio H-4 foram observadas correlações com C-6 e C-10. Estas correlações permitiram identificar a estrutura de S-5 bem como fazer as corretas atribuições dos sinais.



As fragmentações obtidas através do espectro de massas de íons filhos de 409 (FIGURA 4.12 e 4.16) ajudaram a confirmara a estrutura de S-5. Os dados espectrais de RMN ^1H e ^{13}C de S-5 estão dispostos na TABELA 4.5. A proposta biogenética para o esteróide 2A encontra-se no Anexo 01 (p. 305).

TABELA 4.5: Dados de RMN ^1H e ^{13}C de **S-5** (CDCl_3 , 400 MHz)

S-5			Lit [57, 58]	
	H (δ, multiplicidade, J)	C	H (δ, multiplicidade, J)	C
1		34,1		34,1
2		34,2		34,1
3		199,5		199,5
4	5,74 (<i>s</i>)	123,5	5,74 (<i>s</i>)	123,1
5		164,3		164,2
6	6,04 (<i>d</i> , 9,7)	124,5	6,04 (<i>d</i> , 9,7)	124,5
7	6,60 (<i>d</i> , 9,7)	134,0	6,60 (<i>d</i> , 9,7)	133,9
8		124,4		124,5
9		44,5		44,3
10		36,8		36,8
11		19,0		18,9
12		35,6		35,6
13		44,1		44,0
14		156,0		155,6
15		25,4		25,3
16		27,7		27,7
17		56,1		55,5
18	0,97 (<i>s</i>)	19,0	0,97 (<i>s</i>)	19,0
19	1,00 (<i>s</i>)	16,2	1,00 (<i>s</i>)	16,7
20		39,6		39,3
21	1,08 (<i>d</i> , 6,7)	21,1	1,08 (<i>d</i> , 6,7)	21,1
22	5,37 (<i>m</i>)	138,2	5,37 (<i>m</i>)	138,3
23	5,37 (<i>m</i>)	129,9	5,37 (<i>m</i>)	129,8
24		49,0		48,2
25		72,5		72,4
26	1,15(<i>s</i>)	27,0	1,15 (<i>s</i>)	27,0
27	1,18(<i>s</i>)	26,3	1,18 (<i>s</i>)	26,5
28	1,01 (<i>d</i> , 6,9)	15,5	1,02 (<i>d</i> , 6,7)	15,7

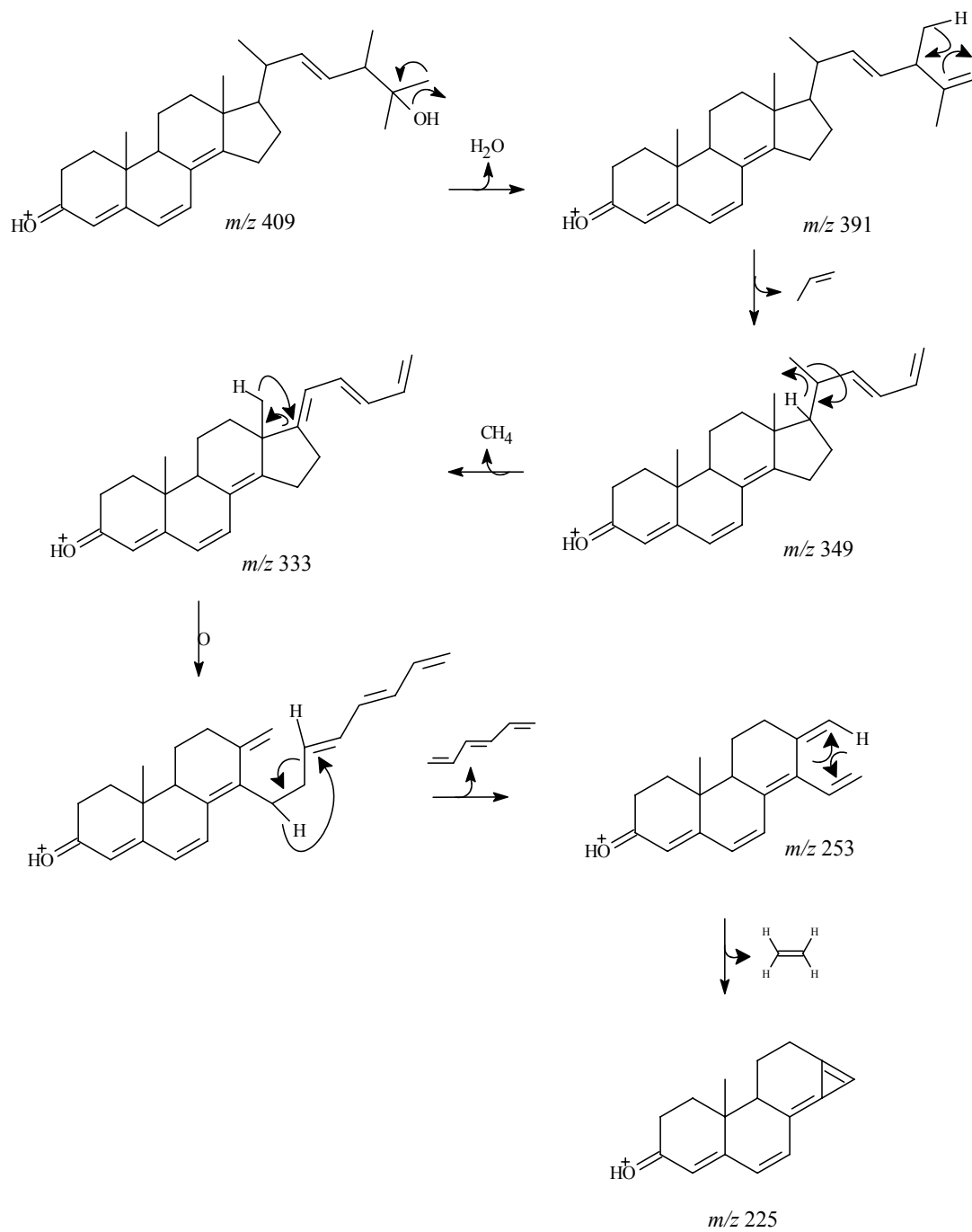


FIGURA 4.12: Proposta de fragmentação para S-5

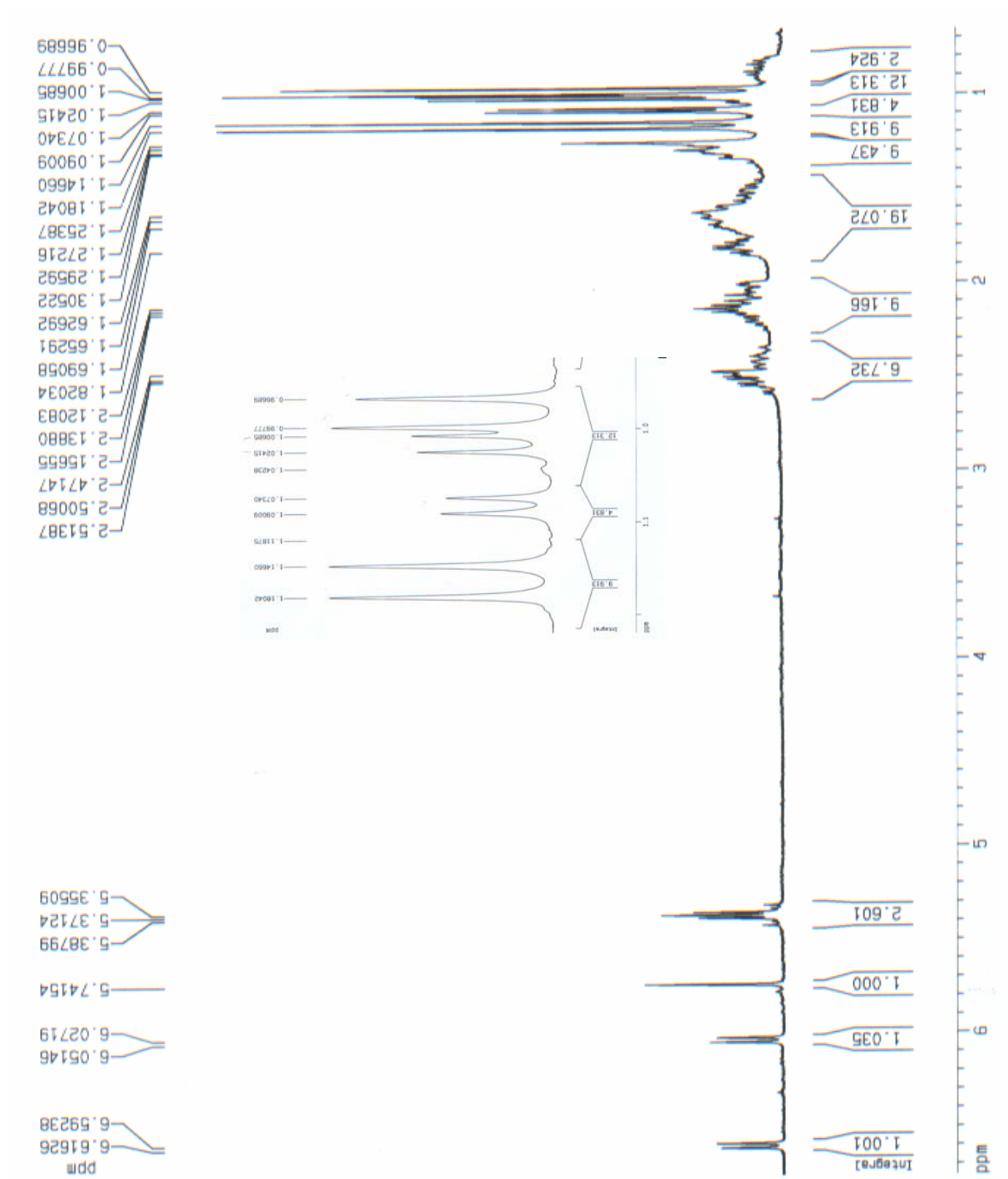


FIGURA 4.13: Espectro de RMN ¹H obtenido para S-5 (CDCl₃, 400 MHz)



FIGURA 4.14: Espectro de massas (*full scan*) APcI (+) de **S-5**

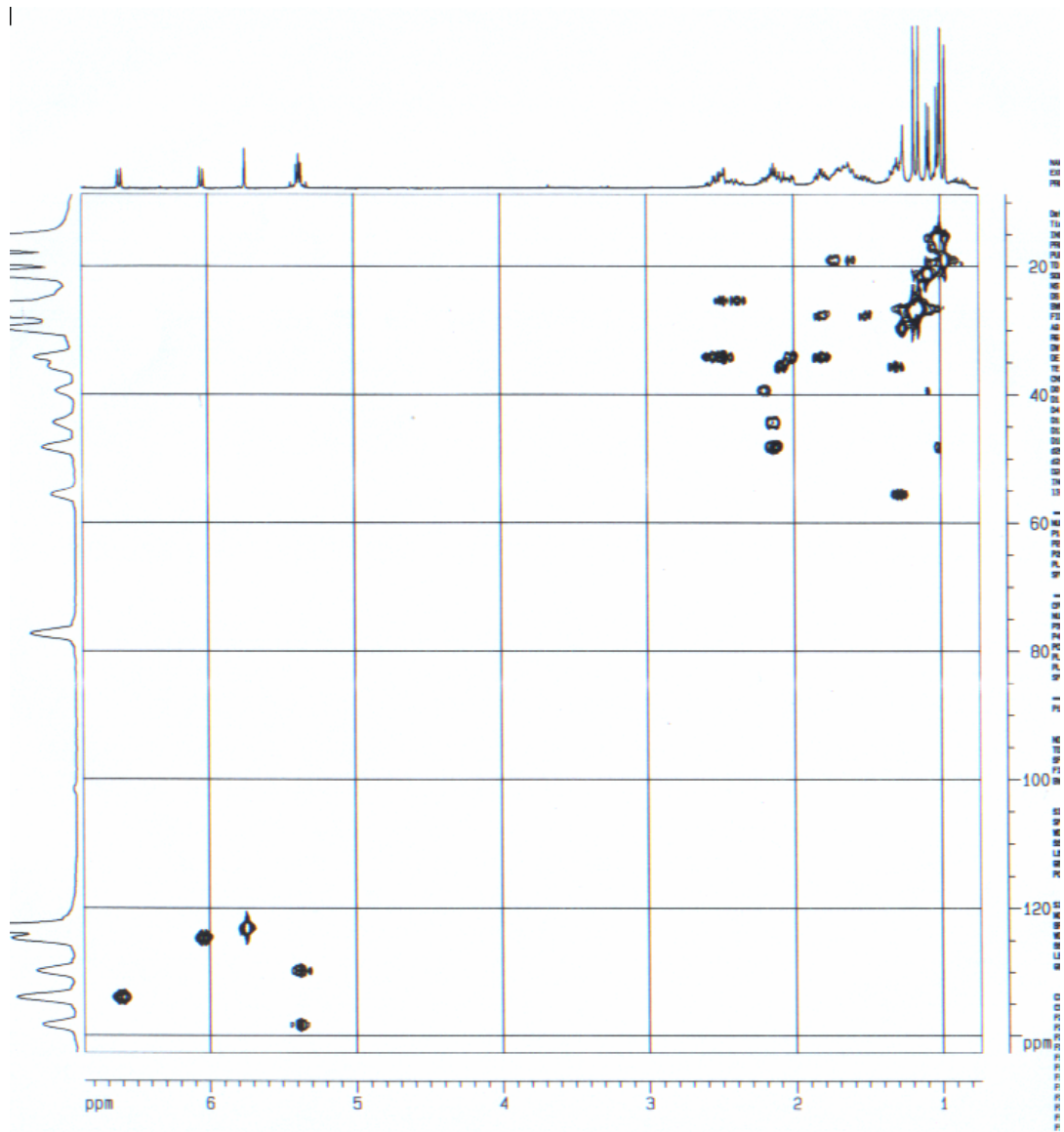


FIGURA 4.15: Experimento de HSQC de S-5

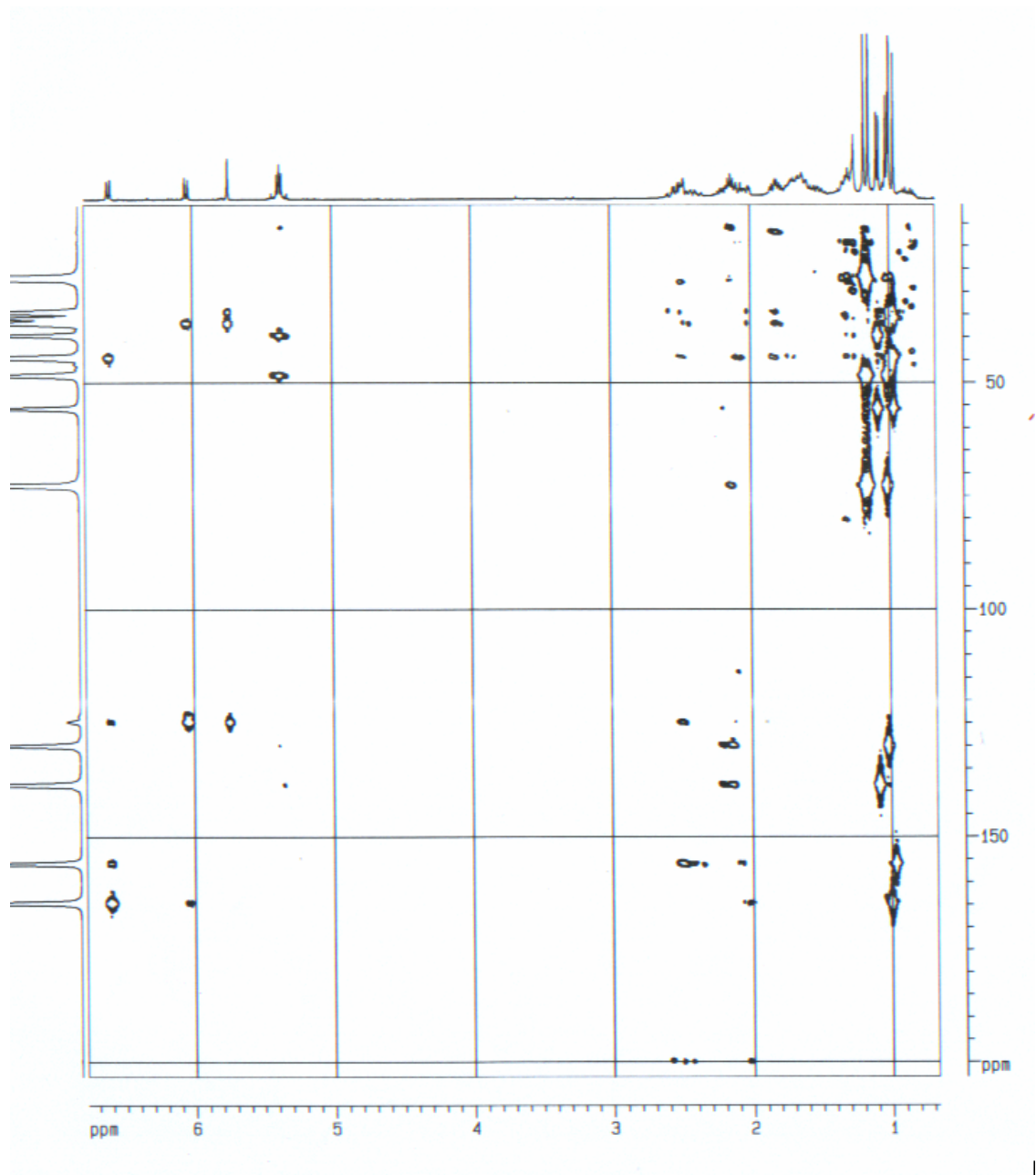


FIGURA 4.16: Experimento de HMBC de S-5

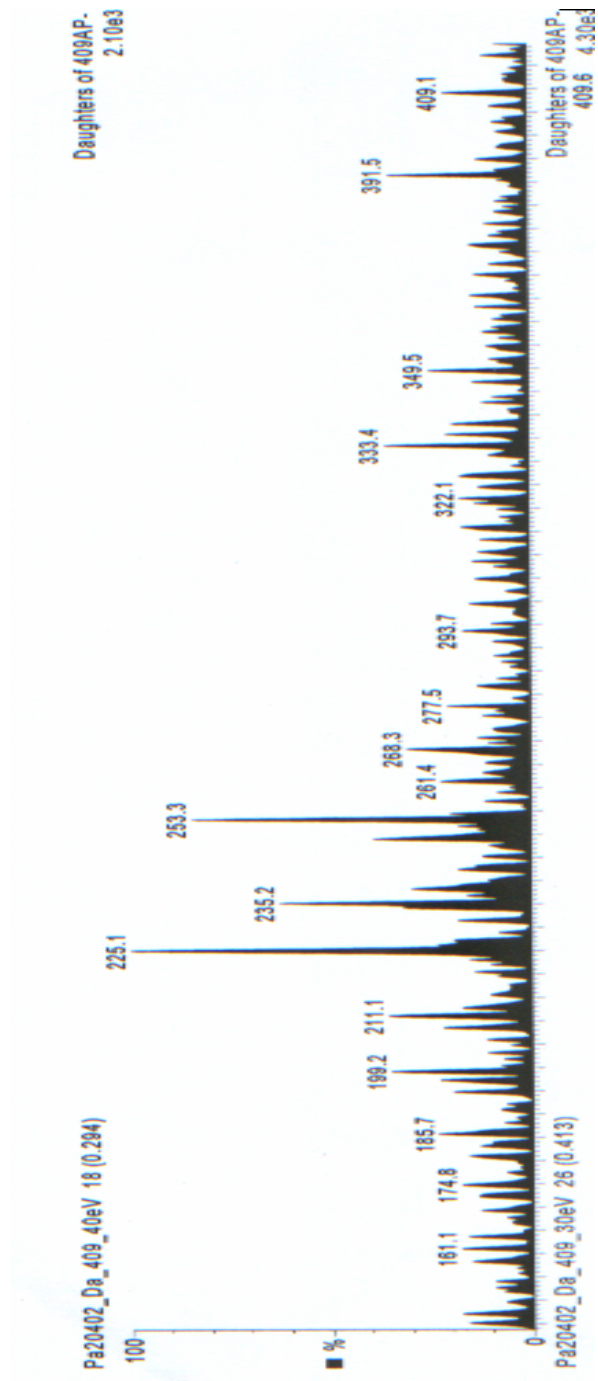


FIGURA 4.17: espectro de massas de íons filhos de m/z 409 (40 eV)

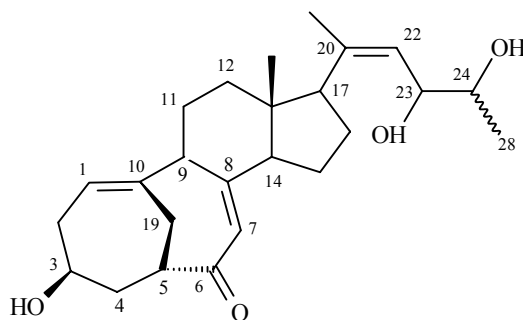
4.2.1.6 - S-6 – Neociclocitrinol

A substância **S-6** foi isolada como um sólido branco através de cromatografia em coluna. Seu espectro de RMN ^1H (FIGURA 4.19) mostrou um padrão bastante complexo e com alguns sinais duplicados. Podemos observar sinais característicos de metilas em δ 0,55 (*s*), δ 1,67 (*d*, $J = 1$ Hz)/ 1,65 (*d*, $J = 1$ Hz) e δ 1,29 (*d*, $J = 7,3$ Hz)/ 1,02 (*d*, $J = 6,8$ Hz). Sinais característicos da presença de hidrogênio oximetínicos na molécula em δ 3,24 (*m*), δ 3,60 (*quint*, $J = 6,3$ e 7,3 Hz)/ 3,47 (*quint*, $J = 6,8$ Hz) e δ 4,18 (*dd*, $J = 6,3$ e 9,0 Hz)/ 4,04 (*dd*, $J = 6,8$ e 8,4 Hz). Podem ser observados ainda sinais comumente atribuídos a hidrogênios ligados a carbono sp^2 em δ 5,26 (*d*, $J = 8,4$ Hz)/ 5,17 (*d*, $J = 9,0$ Hz), δ 5,47 (*sl*) e δ 5,51 (*dd*, $J = 6,8$ e 7,2 Hz). O espectro de RMN ^1H de **S-6** apresenta ainda vários sinais em δ 1,50 – 3,0 referentes as hidrogênios metilênicos.

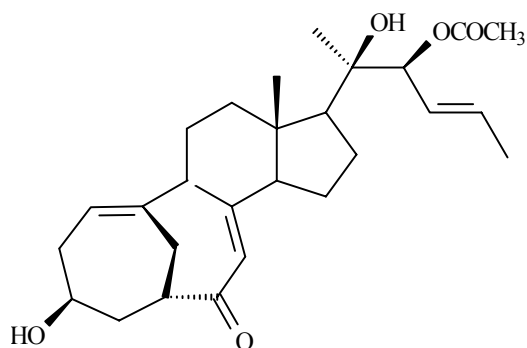
No espectro de RMN ^{13}C (FIGURA 4.20) também são observados sinais duplicados para alguns carbonos. São presentes no espectro sinais típicos de carbonos olefínicos em δ 123,30/ 123,28; δ 147,7; δ 139,97/ 139,43; δ 125,53/ 125,50 e δ 160,39/ 160,30; e sinais referentes a carbonos carbinólicos em δ 65,4; δ 74,15/ 73,39 e δ 72,54/ 71,83 é observado ainda um sinal em δ 207,8; sinal este comumente atribuído a presença de grupo cetona na molécula. A presença de sinais duplicados nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C levaram a conclusão de que tínhamos uma mistura de dois epímeros, o que dificultou bastante a determinação estrutural de **S-6**.

O espectro de massas ApCI (+) apresentou um (m/z 401, $[\text{M}+\text{H}]^+$) (FIGURA 4.21) que somados as informações do RMN ^1H e ^{13}C levaram a proposta da seguinte fórmula estrutural para **S-6** $\text{C}_{25}\text{H}_{36}\text{O}_4$. Após exaustivos estudos dos dados espectrais de **S-6** foi possível determinar a estrutura do composto como sendo um esteróide de uma classe bastante restrita na natureza, os ciclocitrinóis (**a**,

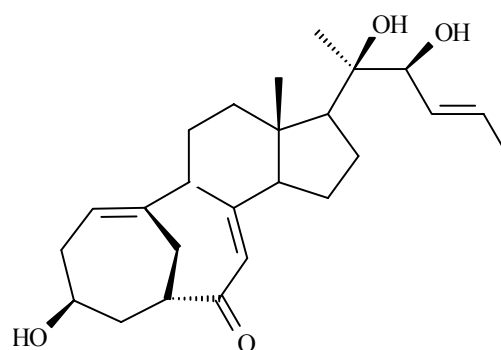
b), que foram isolados anteriormente de uma espécie de fungo *Penicillium citrinum* [22]. A substância **S-6**, no entanto mostrou uma diferença na cadeia lateral em relação aos ciclocitrinóis e este então foi denominada neociclocitrinol [21].



neociclocitrinol



Isociclocitrinol (a)



22-acetilisociclocitrinol (b)

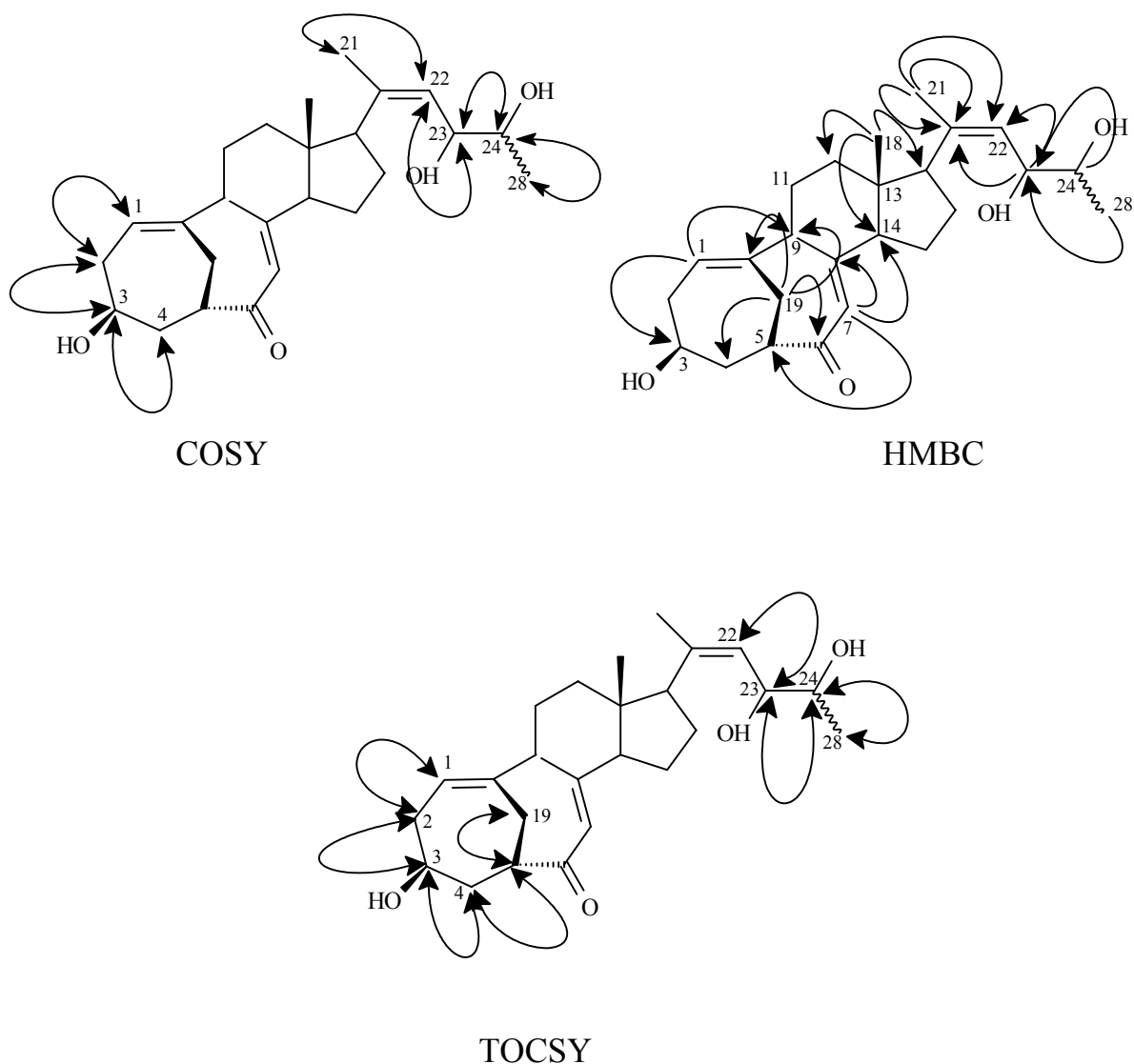
No experimento de HSQC (FIGURA 4.22) na região das metilas de **S-6** foi observado correlações dos sinais δ 0,55 com δ 14,21/ 14,15 (Me-18), de δ 1,67/ 1,65 com δ 18,28/ 18,17 (Me-21) e de δ 1,29/ 1,02 com δ 19,27/ 18,48 (Me-28). Na região dos hidrogênios carbinólicos observou-se correlações de δ 3,24 com

δ 65,41 (C-3), de δ 4,18/ 4,04 com δ 74,15/ 73,39 (C-23) e de δ 3,60/ 3,47 com δ 72,54/ 71,83 (C-24) e por fim na região dos hidrogênios olefínicos temos correlações de δ 5,51 com δ 123,30/ 123,28 (C-1), de δ 5,47 com δ 125,53/ 125,50 (C-7) e de δ 5,26/ 5,17 com δ 128,02/ 127,58 (C-22). Essas correlações confirmaram a presença desses grupos na molécula.

A metila Me-18 correlaciona no experimento de HMBC (FIGURA 4.23) com o sinal δ 61,04 atribuído ao C-17 e com os carbonos localizados em δ 39,04 (C-12) e δ 56,53 (C-14). A metila Me-21 correlaciona com C-17 confirmando a atribuição de δ 61,04 para este carbono, o H-17 correlaciona com δ 139,97/ 139,43 (C-20) e C-22, indicando que este está vizinho a uma dupla ligação o que justifica o seu alto deslocamento químico de C-17 ($\Delta\delta$ +6,34) em relação aos outros ciclocitrinóis. Me-21 também correlaciona com δ 139,97/ 139,43 (C-20) e C-22. Confirmando essas atribuições observamos no espectro de COSY (FIGURA 4.24) a correlação e H-22 com a metila Me-21 e com H-23. Observou-se ainda que a metila Me-28 correlaciona no HMBC com o carbono C-23, onde H-23 correlaciona também com C-22 no HMBC e com C-24 no HMBC e COSY. Estas correlações mostraram que **S-6** possuía uma cadeia lateral diferente dos isociclocitrinol e 22-acetilisociclocitrinol.

O sinal em δ 2,57 (*m*) correlaciona no HSQC com o carbono δ 28,68 e foi atribuído ao hidrogênio H-19. No Espectro de HMBC podemos ver as correlações de H-19 com os sinais em δ 55,69 (C-9), δ 50,10 (C-5), δ 147,70 (C-10), δ 207,84 (C-6) e C-1. Podemos observar ainda as correlações de H-1 com os carbonos C-9, C-3 e C-19. O hidrogênio H-7 correlaciona com os carbonos δ 160,39/ 160,30 (C-8) e com os carbonos C-14 e C-5. Observamos ainda as correlações de H-9 e δ 2,21 (H-14) com as ligações duplas C-1(10) e C-7(8). Essa estrutura foi confirmada pelo experimento de TOCSY (FIGURA 4.25) onde nele

observamos as correlações formando uma rede spins na cadeia lateral entre H-22, H-23, H-24 e Me-28, e no anel A entre H-1, H-2, H-3, H-4, H-5 e H-19. Na TABELA 4.6 estão dispostos os dados de **S-6**. As correlações de COSY, HMBC e TOCSY são mostradas a seguir.



A posição da ligação dupla entre os carbonos C-1(10) parece ser instável devido estar em cabeça de ponte, no entanto com a ajuda de programa

computacional pode-se fazer a otimização da geometria espacial da molécula, onde se observou uma conformação favorável que permite a estabilidade do composto (FIGURA 4.18). A proposta biogenética para o neociclocitrinol encontra-se no Anexo 01 (p. 306).

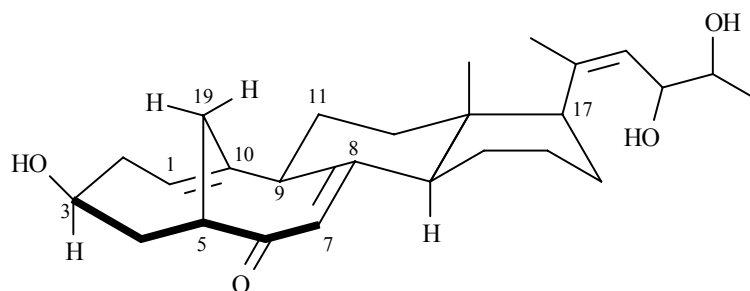


FIGURA 4.18: reprodução da visão espacial de S-6, obtida pela otimização geométrica feita por um programa computacional.

TABELA 4.6: Dados de RMN ^1H e ^{13}C de **S-6** (CDCl_3 , 400 MHz)

S-5		
	H (δ, multiplicidade, J)	C
1	5,51 (<i>dd</i> , 6,8 e 7,2)	123,30/123,28
2		36,99
3	3,24 (<i>m</i>)	65,41
4		42,30
5		50,10
6		207,84
7	5,47 (<i>sl</i>)	125,53/125,50
8		160,39/160,30
9		55,69
10		147,70
11		29,10/29,06
12		39,04
13		48,90
14		56,53
15		24,02
16		25,43
17		61,04
18	0,55 (<i>s</i>)	14,21/14,15
19		28,68
20		139,97/139,43
21	1,67 (<i>d</i> , 1)/1,65 (<i>d</i> , 1)	18,28/18,17
22	5,26 (<i>d</i> , 8,4)/5,17 (<i>d</i> , 9,0)	128,02/127,58
23	4,18 (<i>dd</i> , 6,3 e 9,0)/4,04 (<i>dd</i> , 6,8 e 8,4)	74,15/73,39
24	3,60 (<i>quint</i> , 6,3 e 7,3)/3,47 (<i>quint</i> , 6,8)	72,54/71,83
28	1,29 (<i>d</i> , 7,3)/1,02 (<i>d</i> , 6,8)	19,27/18,48

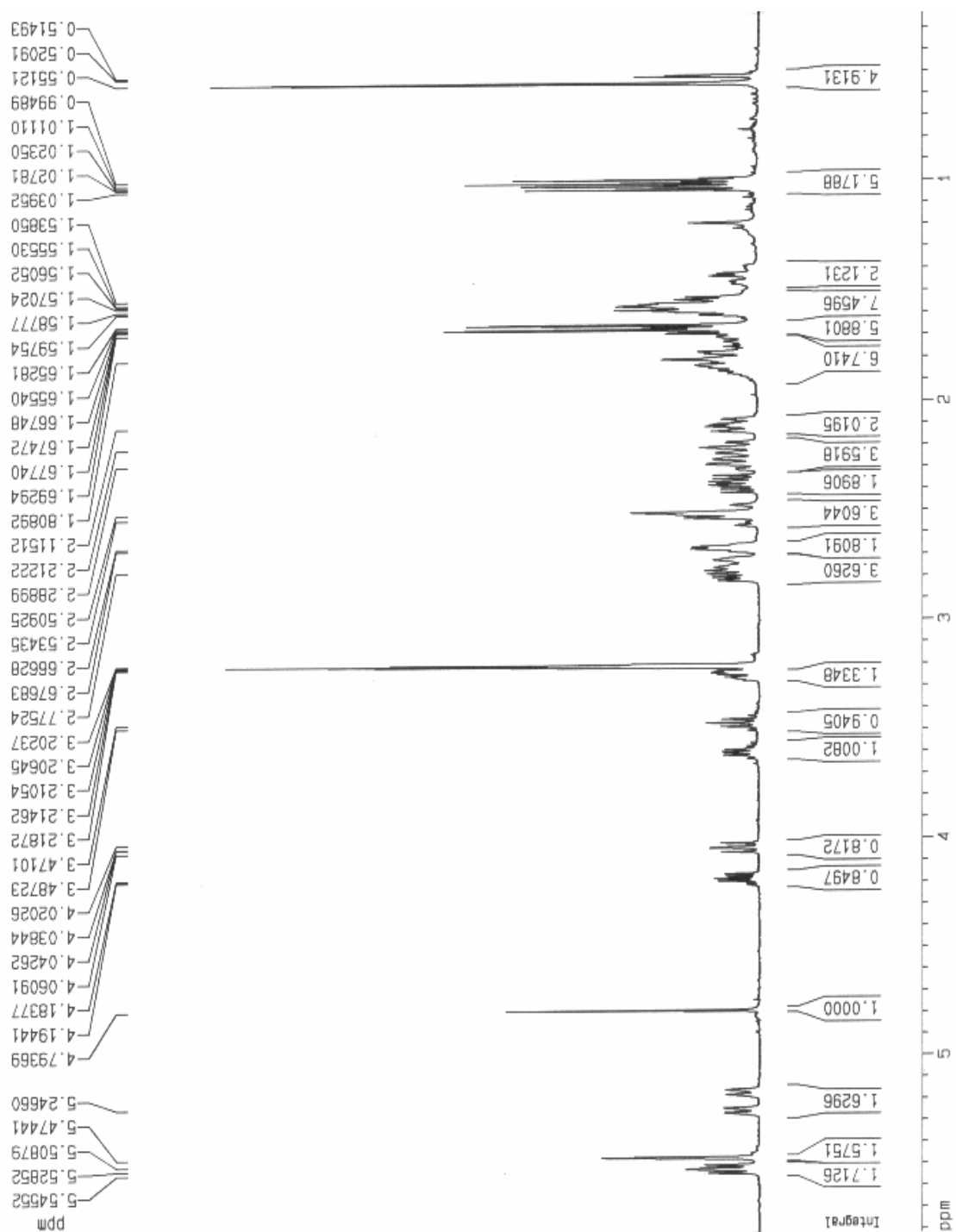


FIGURA 4.19: Espectro de RMN ^1H obtenido para S-6 (CD_3OD , 400 MHz)

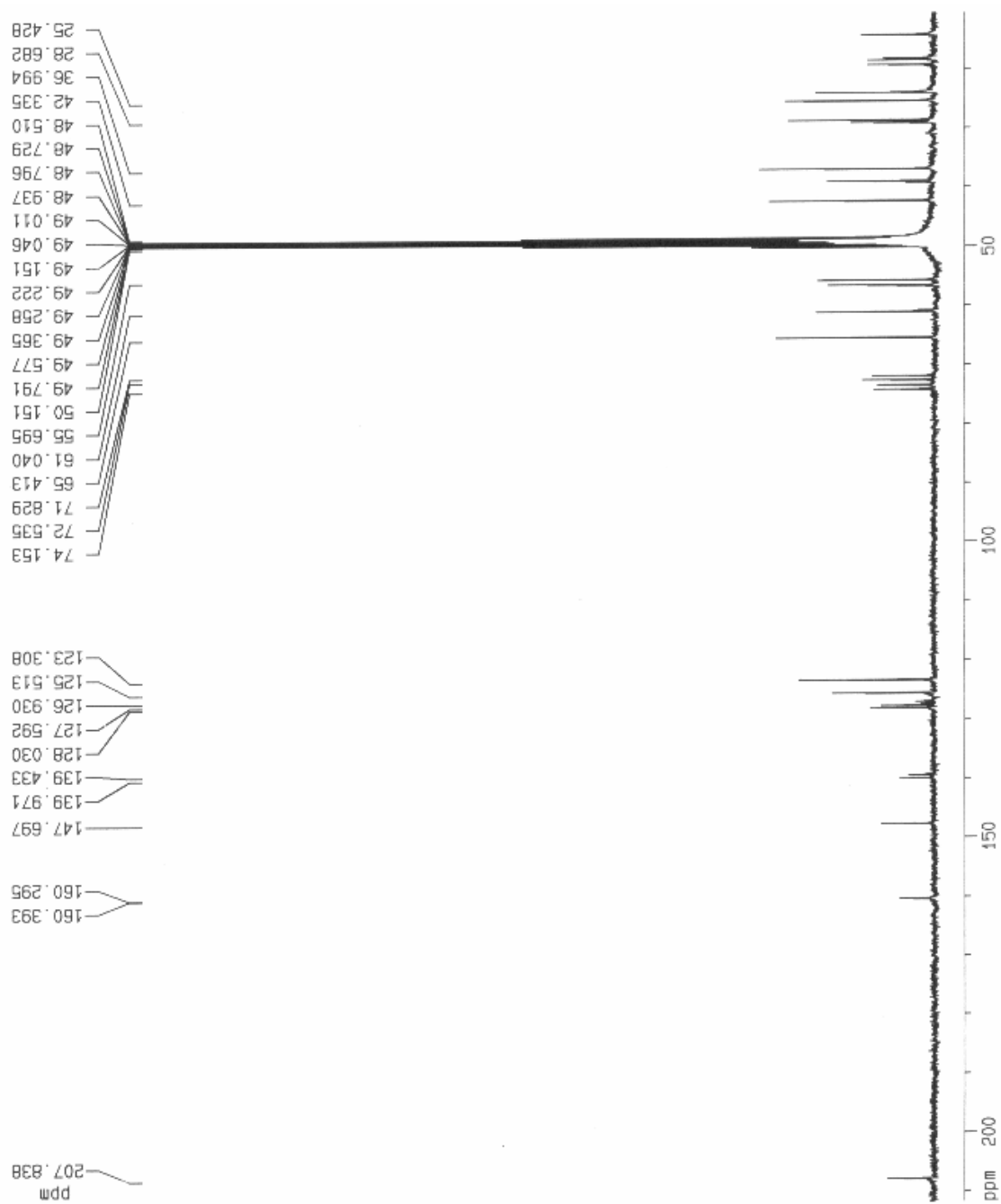


FIGURA 4.20: Espectro de RMN ^{13}C obtido para **S-6** (CD_3OD , 100 MHz)

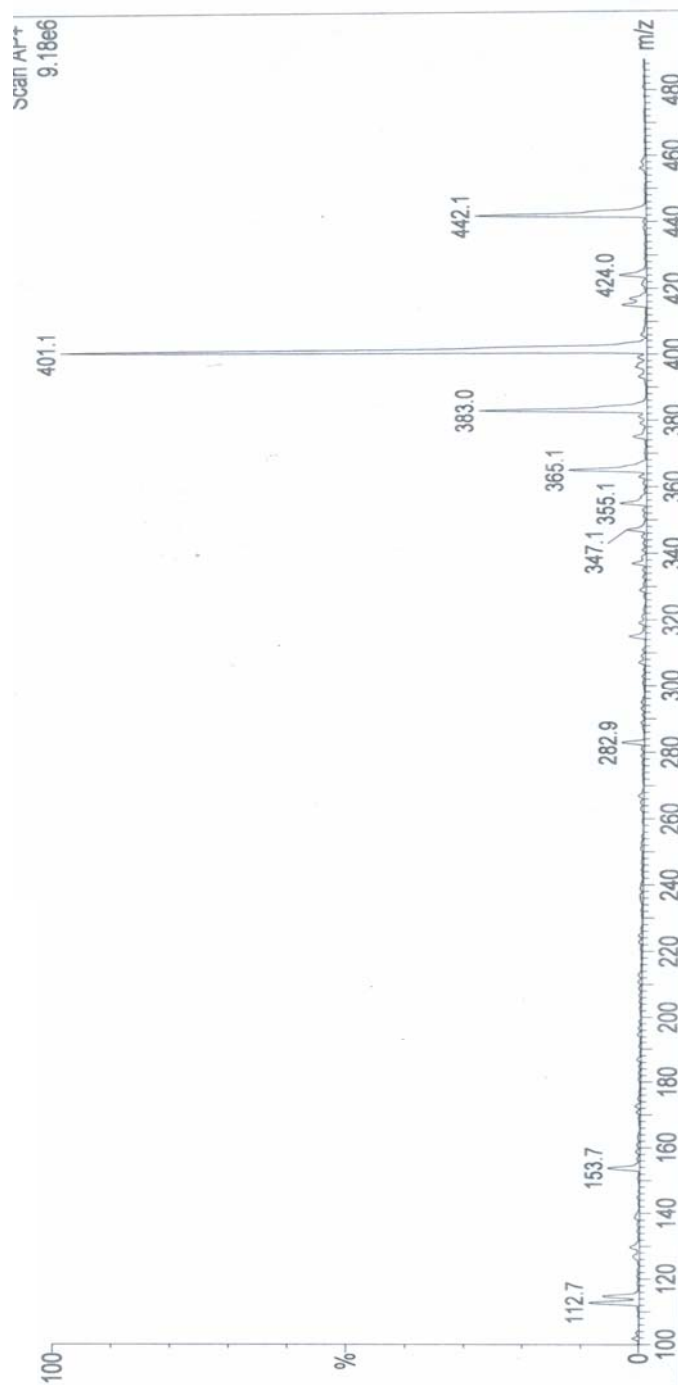


FIGURA 4.21: Espectro de massas (*full scan*) APci (+) de **S-6**

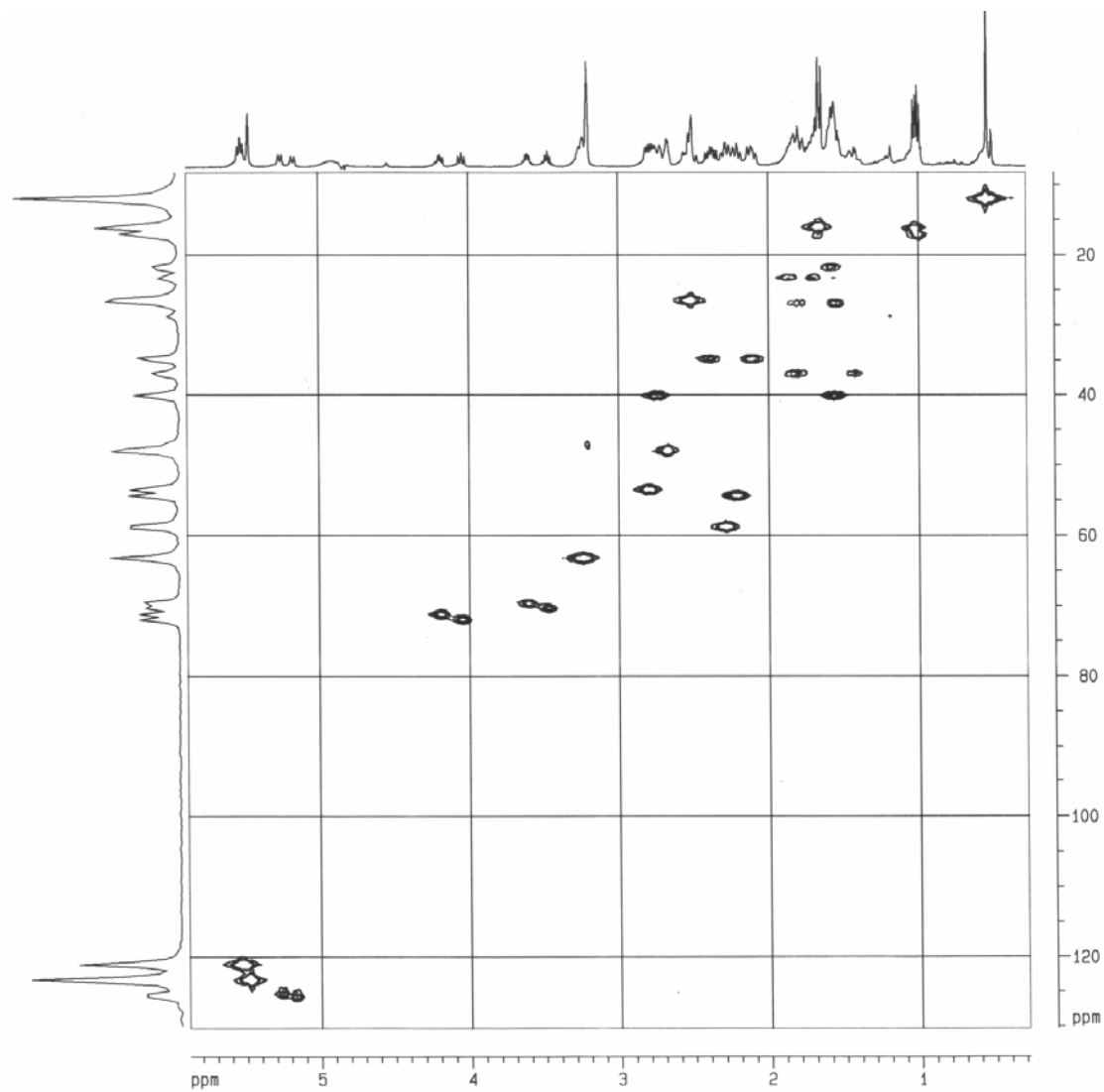


FIGURA 4.22: Experimento de HSQC S-6.

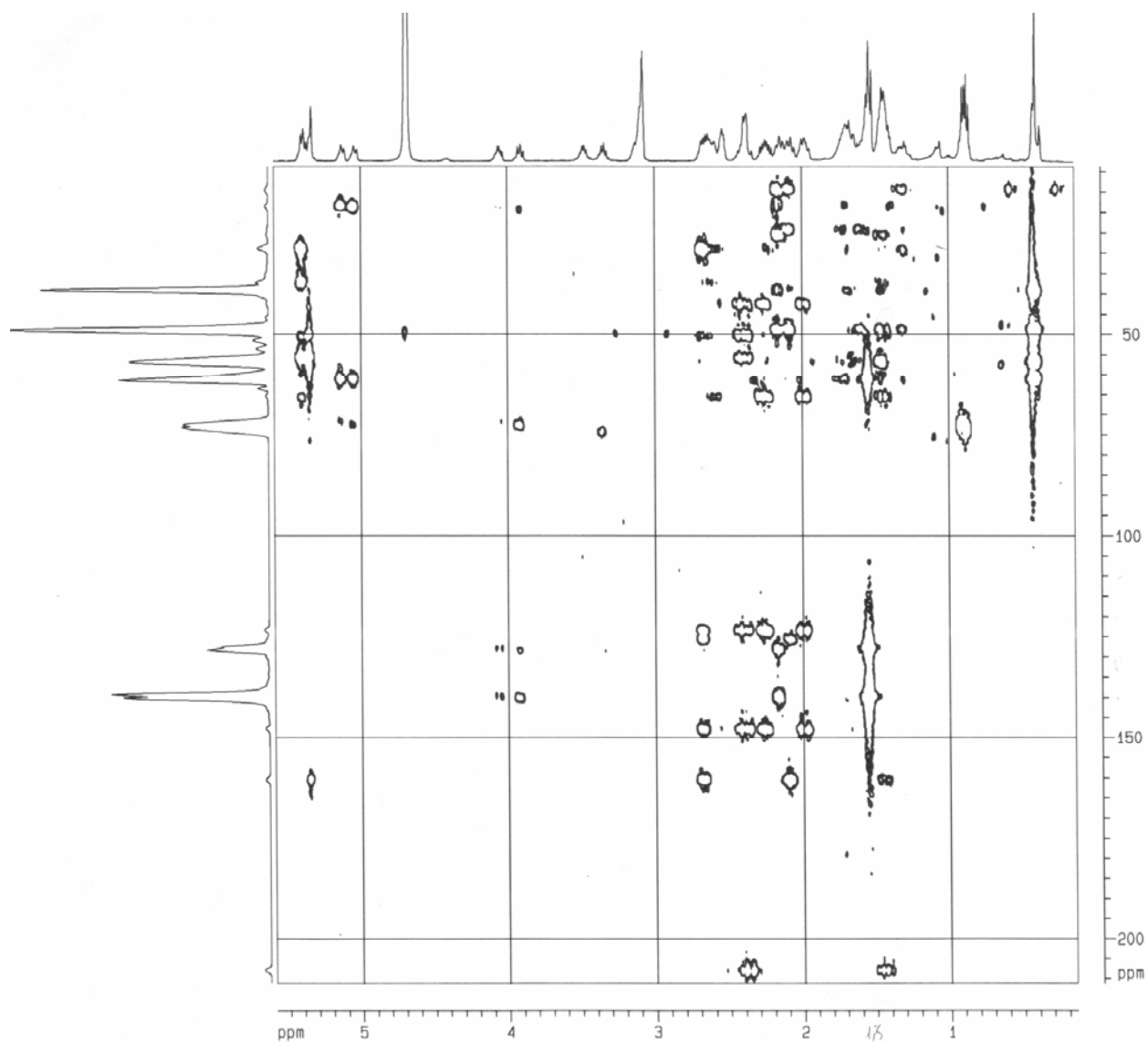


FIGURA 4.23: Experimento de HMBC S-6.

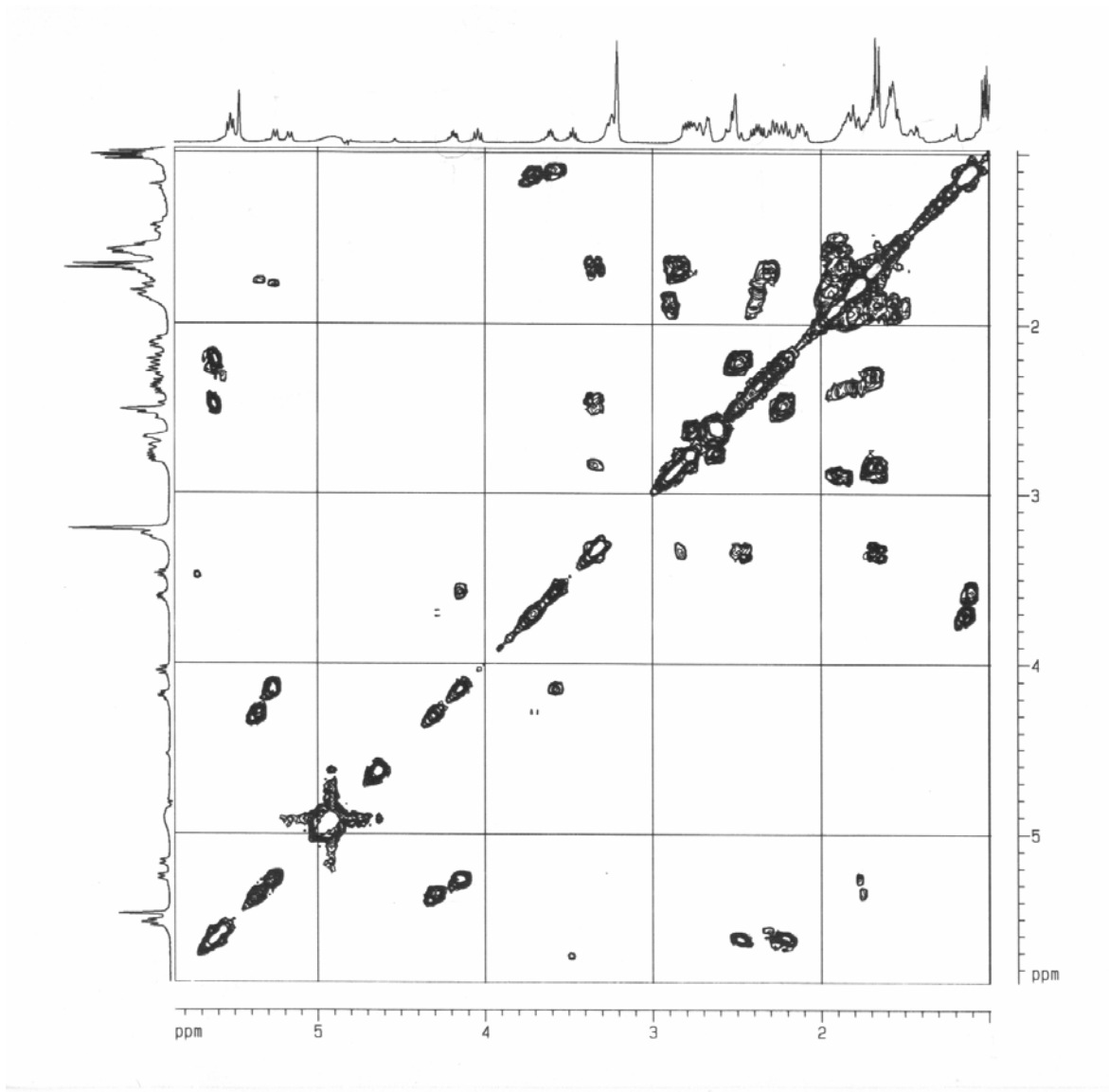


FIGURA 4.24: Experimento de COSY S-6.

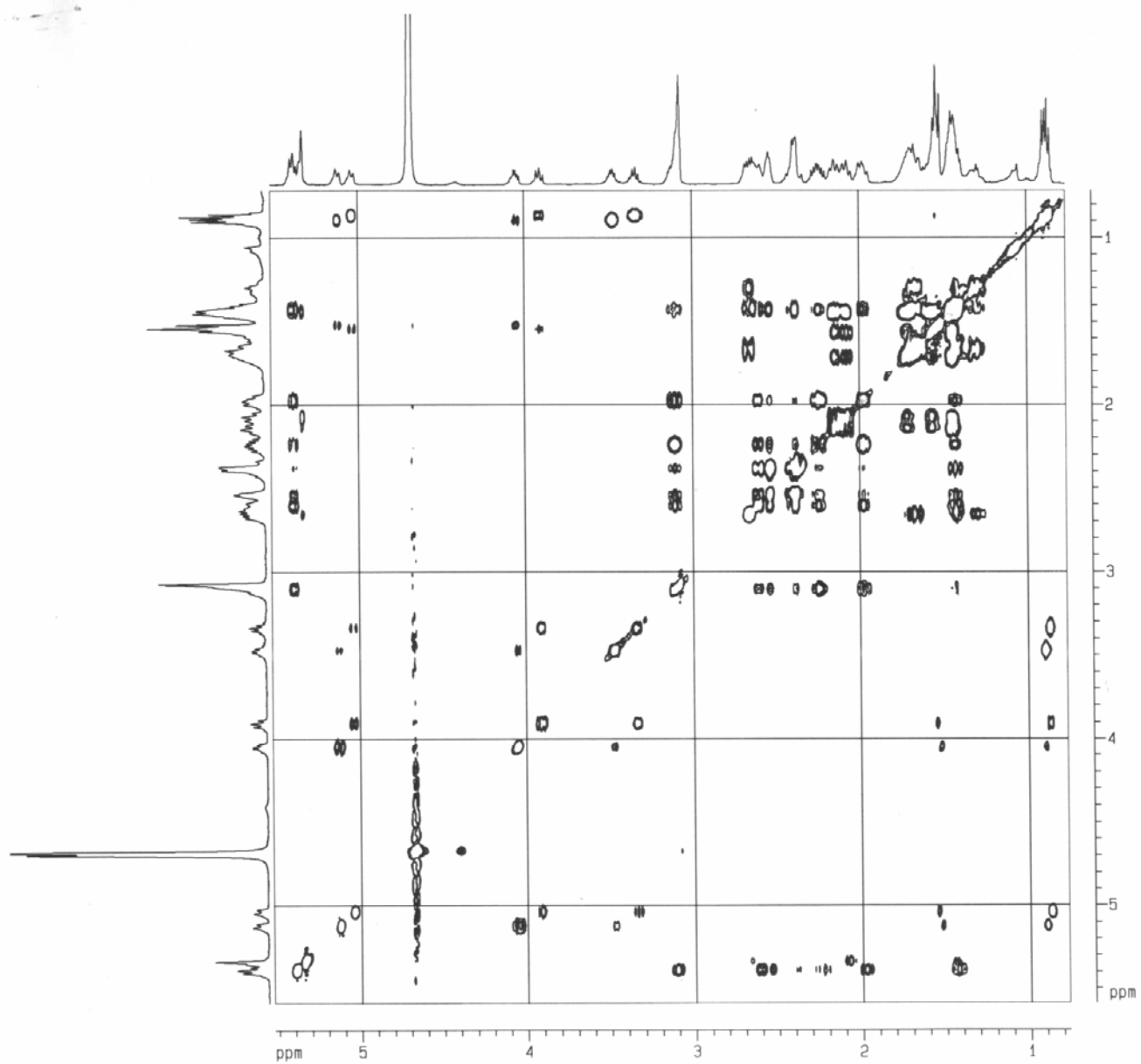


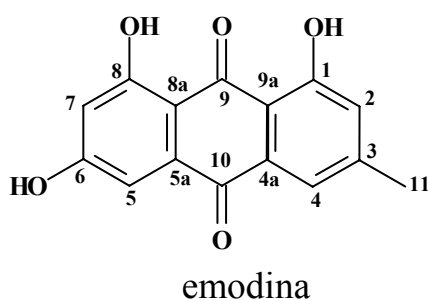
FIGURA 4.25: Experimento de TOCSY S-6.

4.2.2 - POLICETIDEOS

4.2.2.1 - S-7 – Emodina

Esta substância foi isolada como um cristal vermelho e apresentava uma mancha de coloração laranja na placa de CCDA, sem o uso de revelador. Em seu espectro de RMN ^1H (FIGURA 4.27) observamos a presença de poucos sinais. Temos um sinal em δ 2,46 (*s*) integrando para três hidrogênios, onde esse deslocamento químico é típico de metila ligada a anel aromático. Foram observados ainda os sinais em δ 6,66 (*d*, $J = 2,2$ Hz), δ 7,13 (*sl*), δ 7,24 (*d*, $J = 2,2$ Hz) e δ 7,56 (*sl*). Estes sinais sugerem a presença de anel aromático no composto, sendo que através dos valores das constantes de acoplamento temos um anel com hidrogênios *meta* relacionados.

O espectro de RMN ^{13}C (FIGURA 4.28) mostrou a existência de 15 carbonos em S-7, onde temos o sinal em δ 22,0 comumente atribuído a metila ligada a anel aromático, o que está coerente com o sinal em δ 2,46 no espectro de RMN ^1H . Além de outros sinais, observou os sinais em δ 182,2 e δ 191,7 no espectro. Através de buscas na literatura [59, 60] viu-se que o padrão espectral e os sinais δ 182,2 e δ 191,7 apresentados por S-7 em seus espectros são comuns para antraquinonas, com isso e com auxílio do espectro de massas ESI (-) que apresentou um (m/z 269, $[\text{M}-\text{H}]^-$) (FIGURA 4.29) pode-se propor a fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5$ para S-7. Através dos experimentos de RMN 1D e 2D chegou-se na estrutura de S-7.



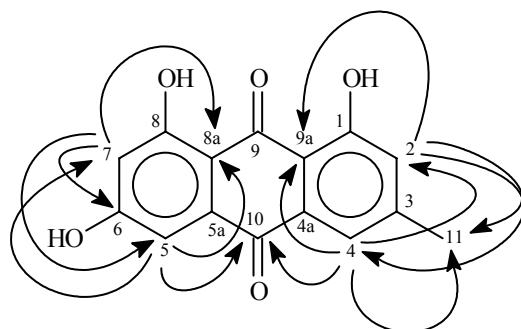
No experimento de HSQC (FIGURA 4.30) de **S-7** observou-se as correlações dos sinais em δ 6,66 (H-7), δ 7,13 (H-2), δ 7,24 (H-5) e δ 7,56 (H-4) com os carbonos em δ 109,7, δ 124,9, δ 110,4 e δ 121,5 e do sinal em δ 2,26 atribuído a Me-11 com o carbono em δ 22,0. Essas correlações confirmaram a existência do sistema aromático.

No experimento de COSY (FIGURA 4.31) observou-se correlação do hidrogênio H-5 com H-7, no entanto esses hidrogênios não correlacionam com H-2 e H-4, onde estes correlacionam entre si e com a metila Me-11. Essas correlações permitiram propor a existência de dois sistemas aromáticos em **S-7**.

O espectro de absorção no infravermelho (FIGURA 4.32) apresentou bandas de absorção em 1629 cm^{-1} e 3415 cm^{-1} , confirmando a existência de carbonila α - β insaturada e hidroxilas em **S-7**.

No experimento de HMBC (FIGURA 4.33) foi observada a correlação de Me-11 com os carbonos localizados em δ 121,5 (C-4), δ 124,9 (C-2) e δ 149,6 (C-3), por sua vez o hidrogênio H-2 correlaciona com os carbonos C-4, com C-11 e com δ 114,5 atribuído ao C-9a. A atribuição de C-9a pode ser confirmada através da correlação de H-4 com este sinal. Observou-se ainda para H-4, correlações com C-2, C-11 e com δ 182,2 atribuído a carbonila C-10. Esta atribuição pode ser confirmada pela correlação de H-5 com este sinal no HMBC, foi visto ainda para H-5 correlações com δ 108,9 (C-8a) e δ 109,7 (C-7). Já o hidrogênio H-7 correlaciona com C-5 e δ 108,9, confirmando essa atribuição a C-8a. As correlações de HMBC para **S-7** são mostradas a seguir.

As fragmentações propostas através do espectro de massas de íons filhos de 269 (FIGURAS 4.26 e 4.34) juntamente com a comparação dos dados de RMN com a literatura (TABELA 4.7) contribuíram para a identificação de **S-7** como sendo a antraquinona emodina. A biossíntese da emodina encontra-se no Anexo 02 (p. 309).



Correlações de HMBC para S-7

TABELA 4.7: Dados de RMN ^1H e ^{13}C de S-7 (acetona- d_6 , 400 MHz)

S-7			Lit [59]	
	H H (δ , <i>mult.</i> , <i>J</i> em Hz)	C	H (δ , <i>mult.</i> , <i>J</i> em Hz)	C
1		166,4		165,9
2	7,13 (<i>sl</i>)	124,9	7,19 (<i>s</i>)	124,8
3		149,6		149,3
4	7,56 (<i>sl</i>)	121,5	7,57 (<i>s</i>)	121,2
4a		136,6		136,6
5	7,24 (<i>d</i> , = 2,2)	110,4	7,26 (<i>d</i> , 2,5)	109,7
5a		134,2		134,0
6		166,3		167,0
7	6,66 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,2)	109,7	6,69 (<i>d</i> , 2,5)	108,6
8		163,3		161,9
8a		108,9		114,4
9		191,7		191,9
9a		114,5		110,0
10		182,2		182,2
11	2,46 (<i>s</i>)	22,0	2,48 (<i>s</i>)	21,8
OH-1	12,06			
OH-8	12,18			

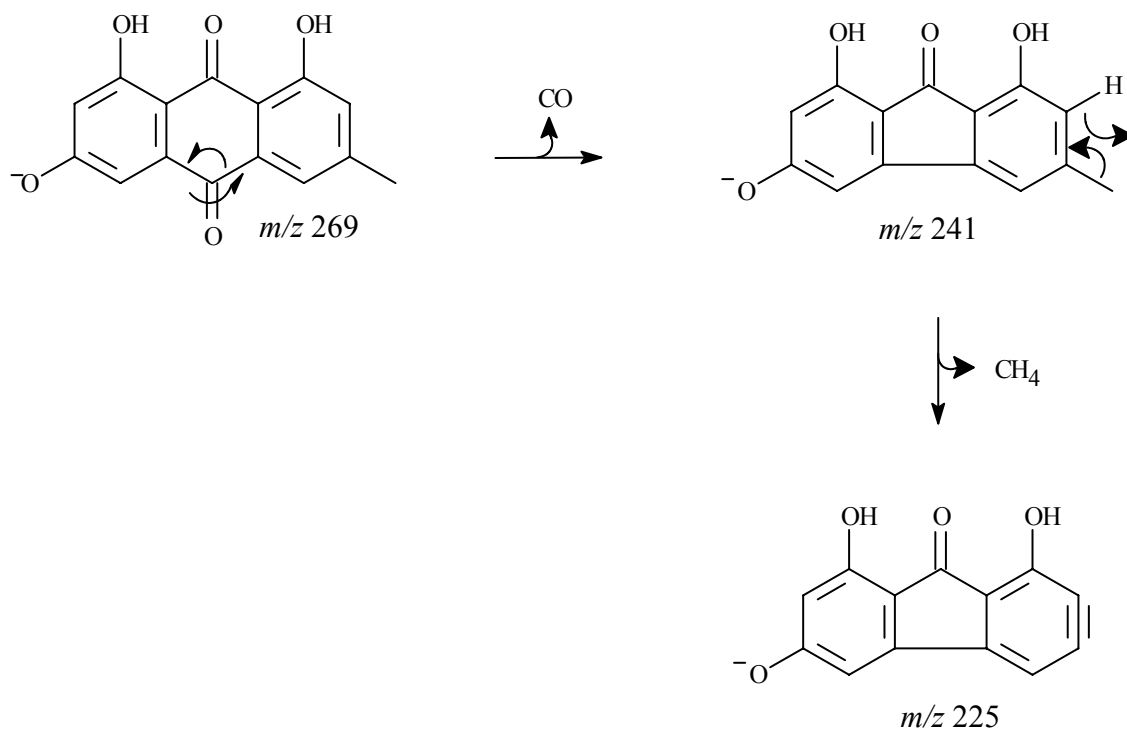


FIGURA 4.26: proposta de fragmentação para S-7

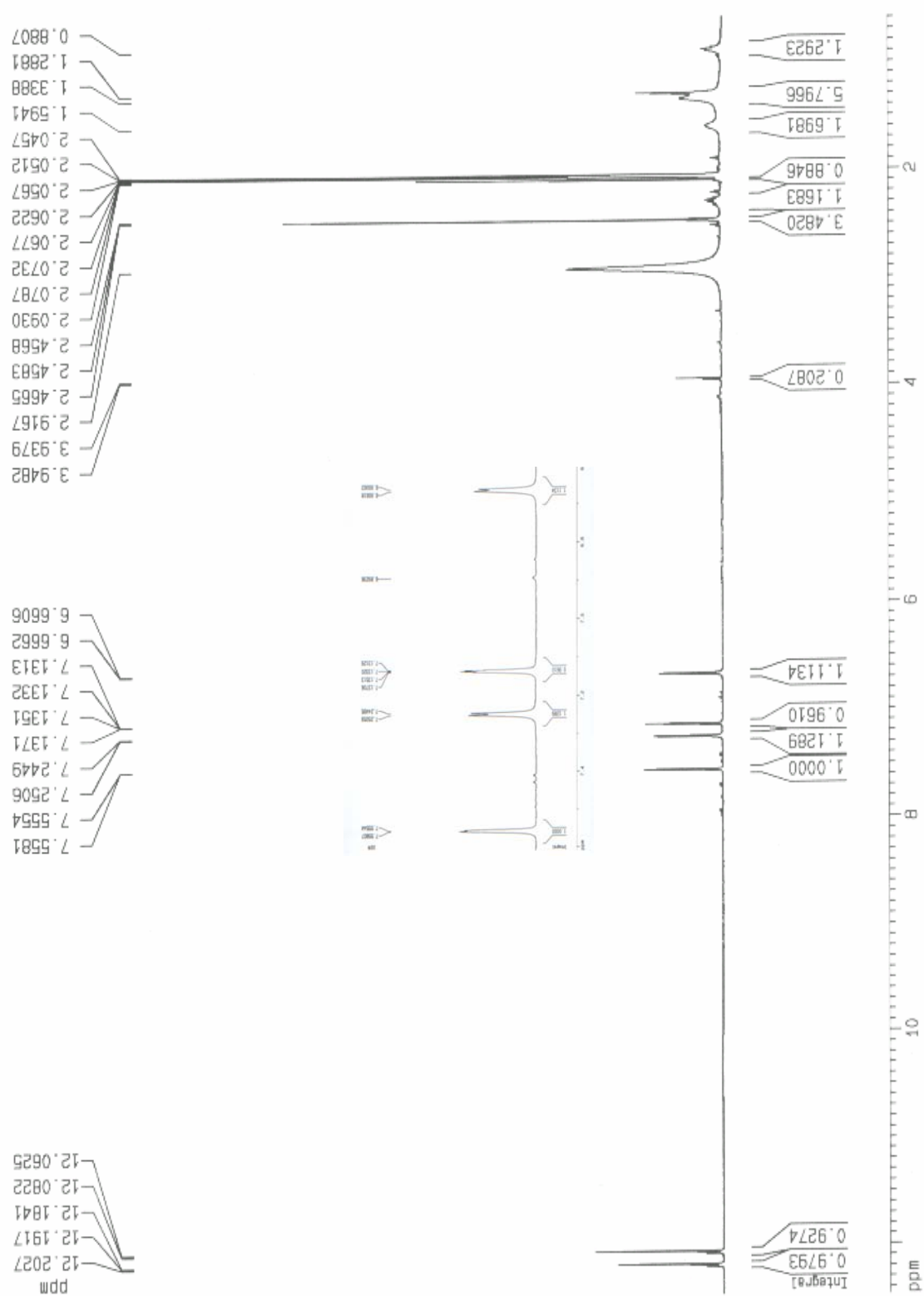


FIGURA 4.27: Espectro de RMN ^1H obtido para S-7 (400 MHz, acetona- d_6)

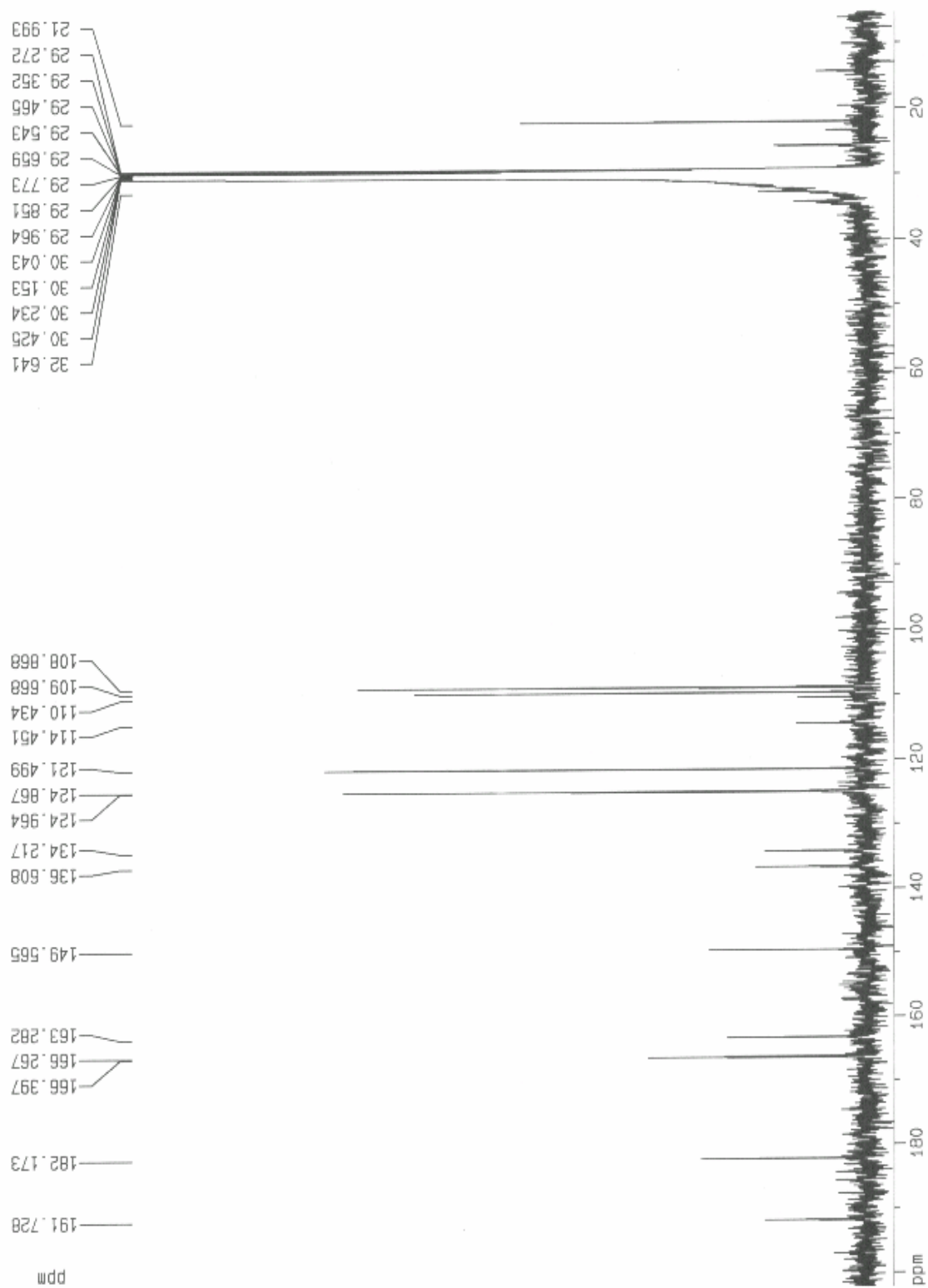


FIGURA 4.28: Espectro de RMN ^{13}C obtido para S-7 (100 MHz, acetona- d_6)

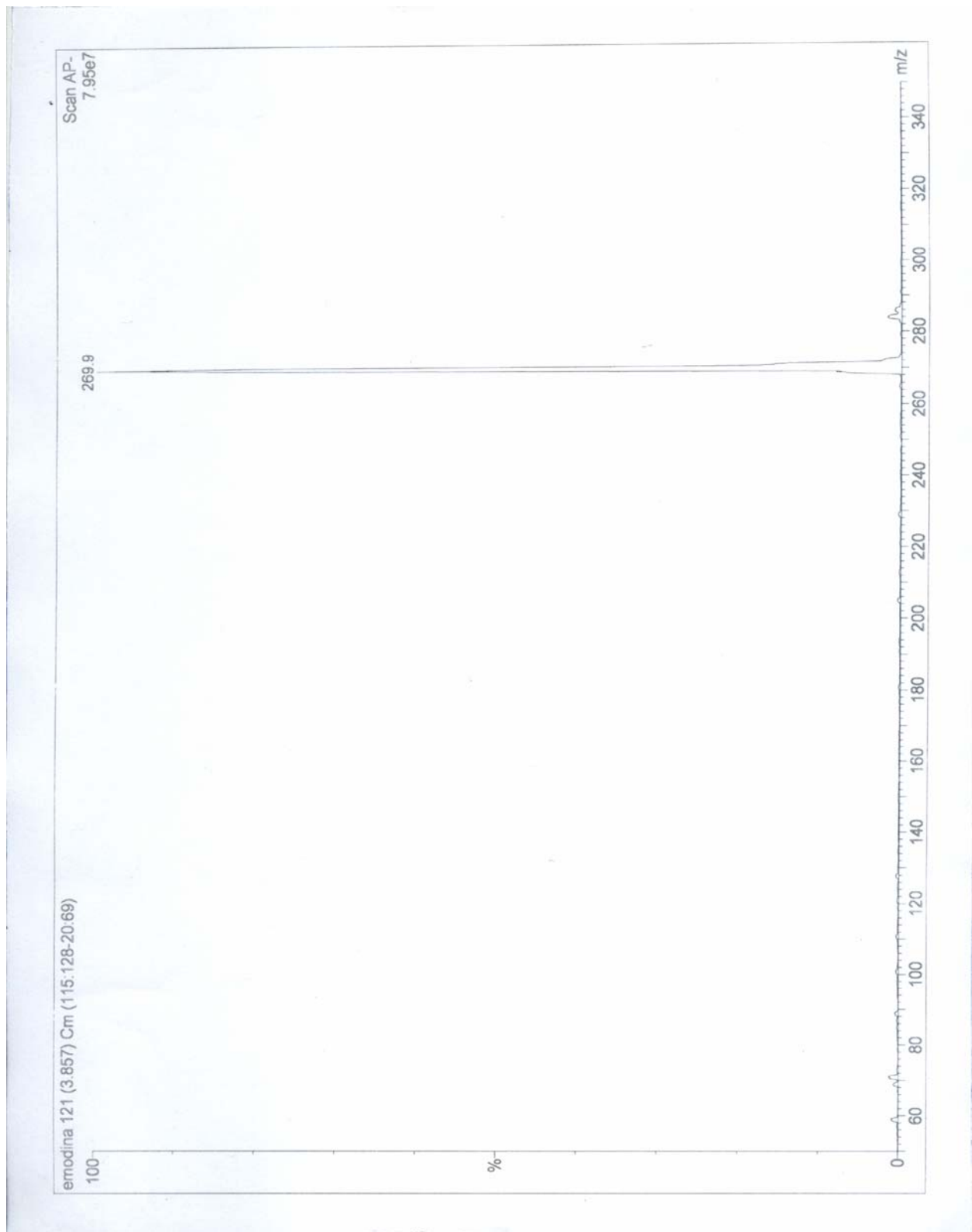


FIGURA 4.29: Espectro de massas (*full scan*) ESI de S-7.

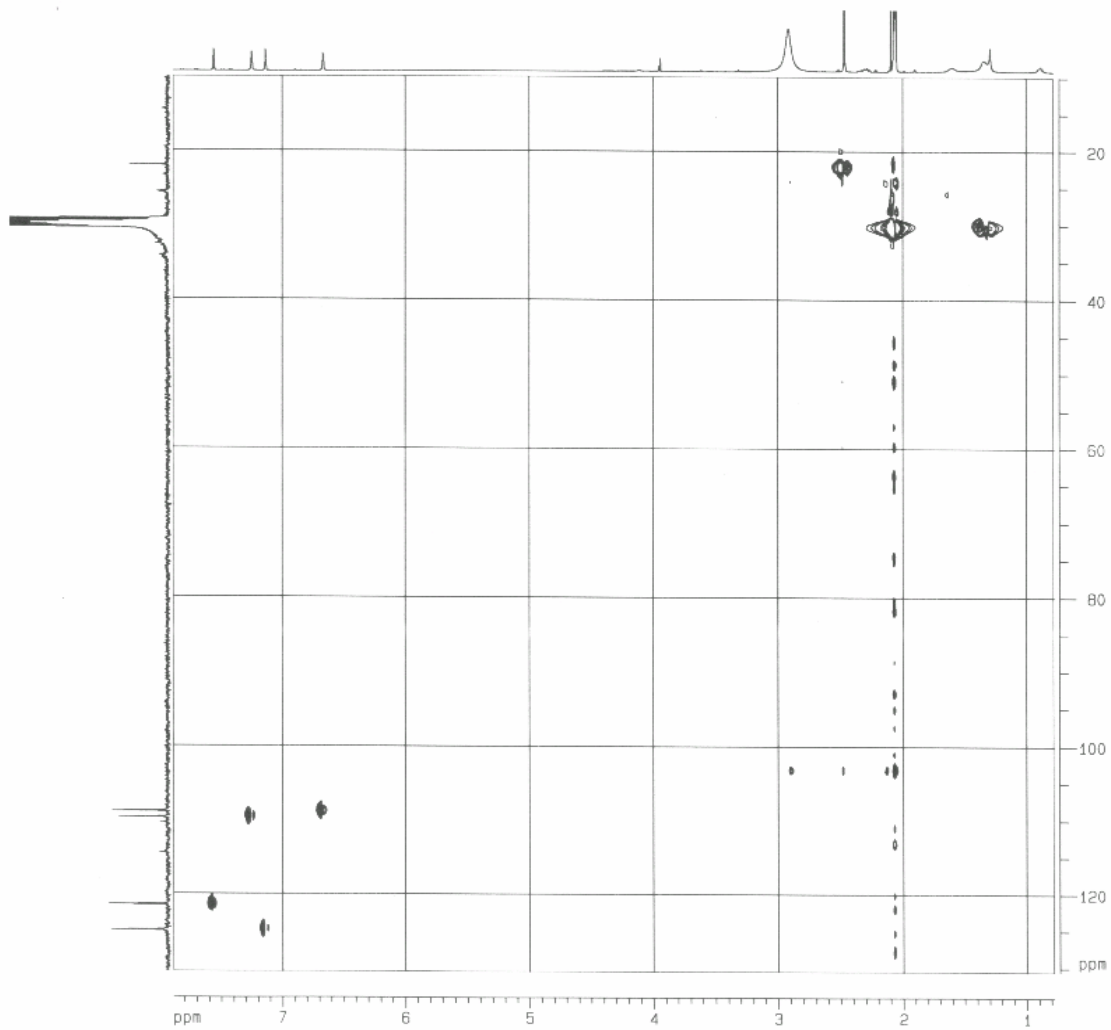


FIGURA 4.30: Experimento de HMQC S-7

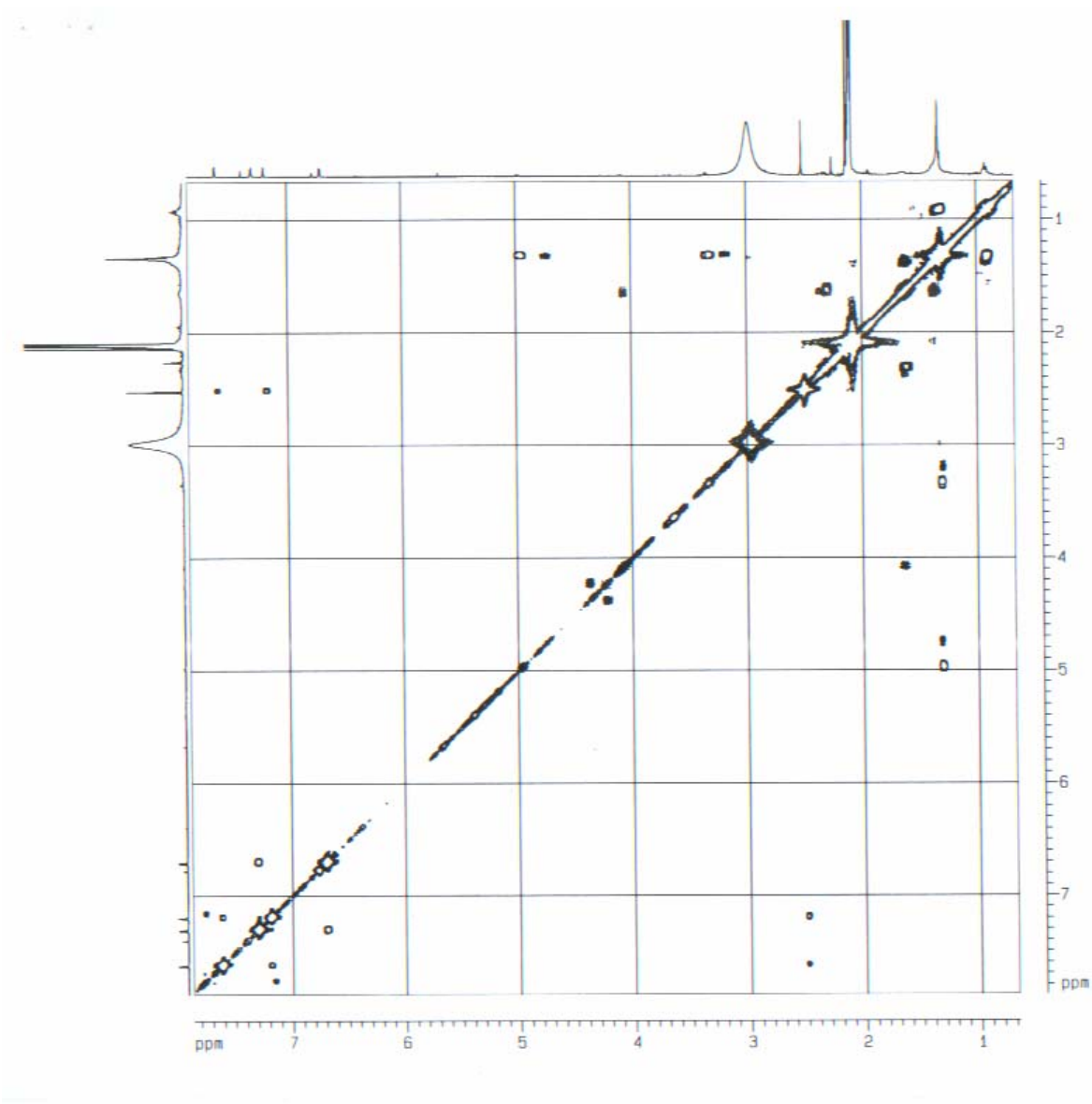


FIGURA 4.31: Experimento de COSY S-7

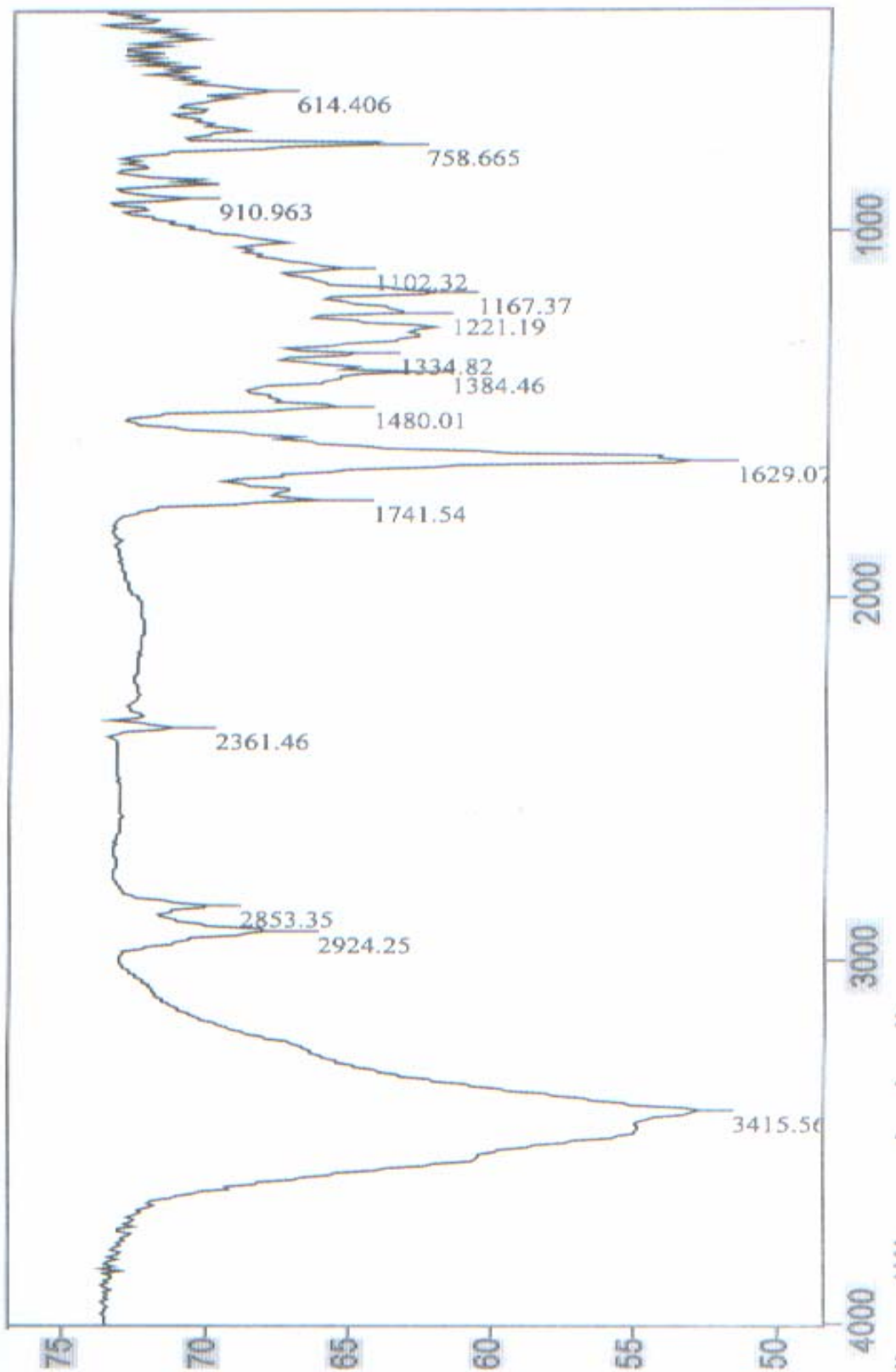


FIGURA 4.32: Espectro de absorção no infravermelho obtido para S-7 (KBr)

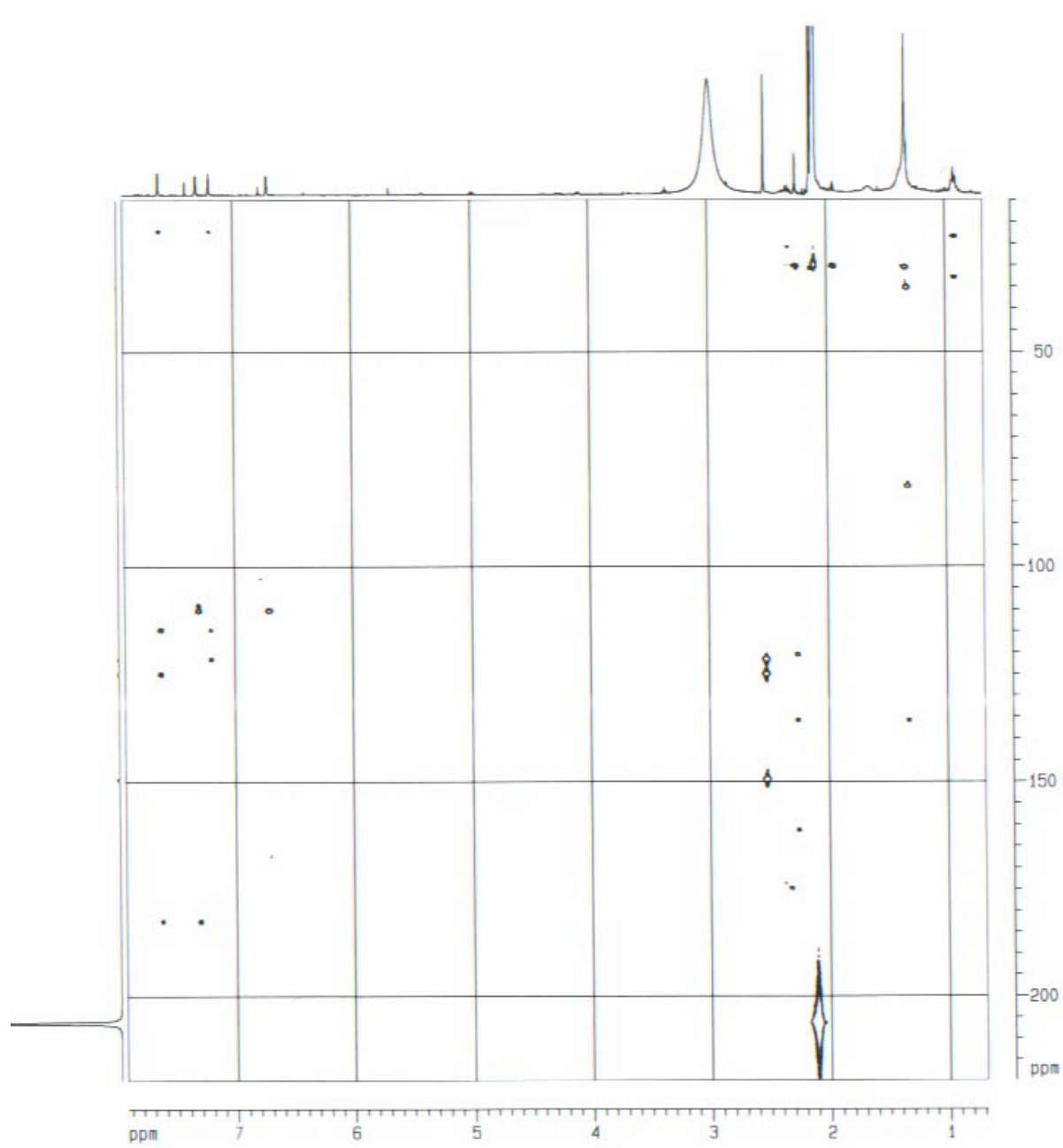


FIGURA 4.33: experimento de HMBC de S-7.

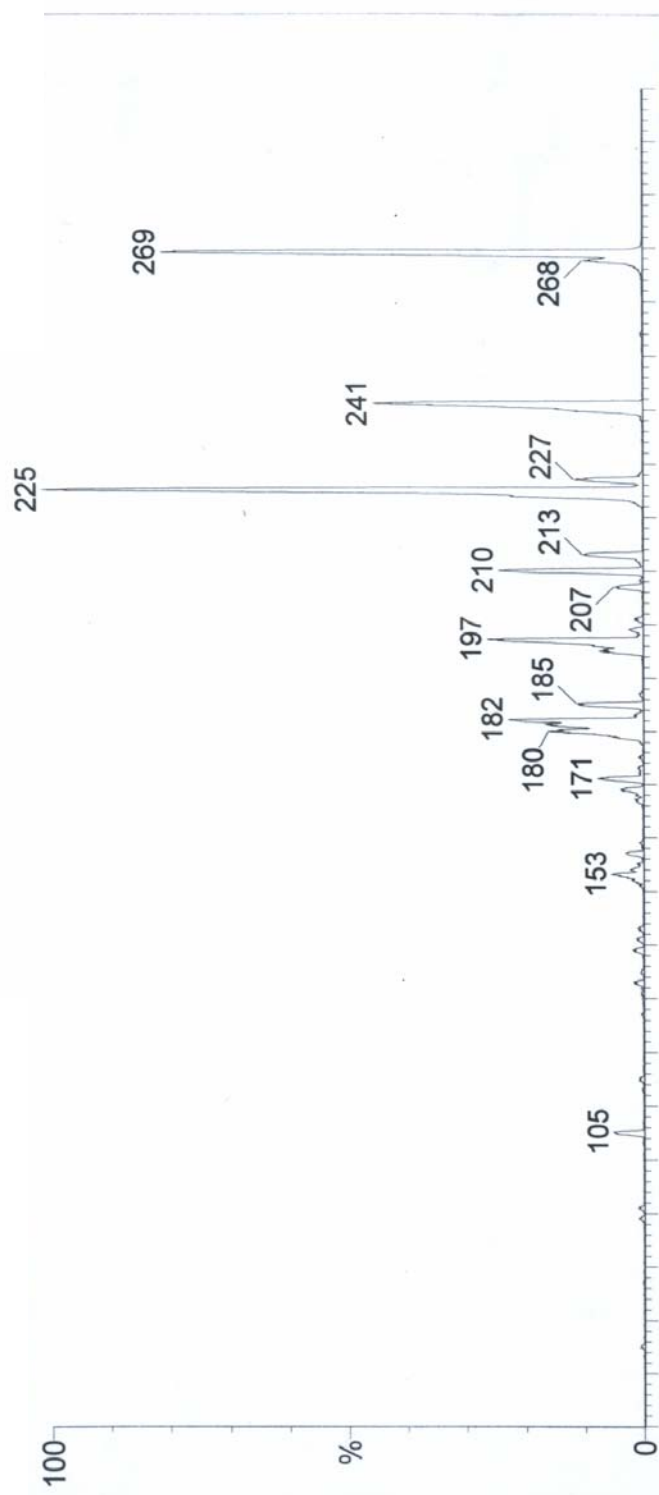
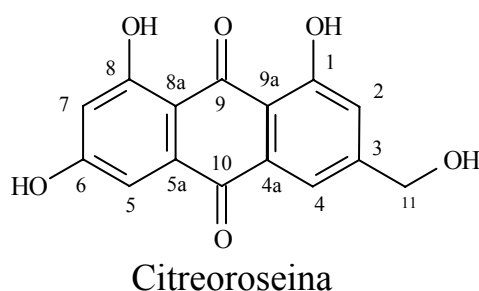


FIGURA 4.34: espectro de íons filhos de m/z 269 (30 eV)

4.2.2.2 - S-8 – Citreorseina

Este composto foi obtido na forma de cristais vermelhos através de técnicas clássicas de cromatografia. Em seu espectro de RMN ^1H (FIGURA 4.36) observamos sinais típicos de sistema aromático com hidrogênios *meta* relacionados. Temos os sinais dubleto em δ 6,67 (*d*, $J = 2,0$ Hz) e δ 7,27 (*d*, $J = 2,0$ Hz) e dois singletos largos em δ 7,31 (*sl*) e δ 7,75 (*sl*). Além de um sinal singlete em δ 4,78.

O espectro de RMN ^{13}C (FIGURA 4.37) de **S-8** apresentou 15 sinais. Observou-se ainda no espectro de RMN ^{13}C os sinais em δ 182,3 e δ 191,9, que como discutido anteriormente para a substância **S-7** estes sinais, juntamente com as informações do espectro de RMN ^1H , são típicos de antraquinonas. Fez-se então o espectro de absorção no infravermelho para **S-8** para confirmar a presença de grupos hidroxila e carbonila no composto, onde se observou neste bandas em 1627 cm^{-1} e 3419 cm^{-1} referentes a presença destes grupos no composto. O espectro de massas ESI (-) (FIGURA 4.38) apresentou um m/z 285 $[\text{M-H}]^-$, onde juntamente com os dados de RMN ^1H e ^{13}C pode-se propor a seguinte fórmula molecular para **S-8** $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6$. Após foram realizados experimentos de RMN 2D e identificou-se a estrutura de **S-8** como abaixo.

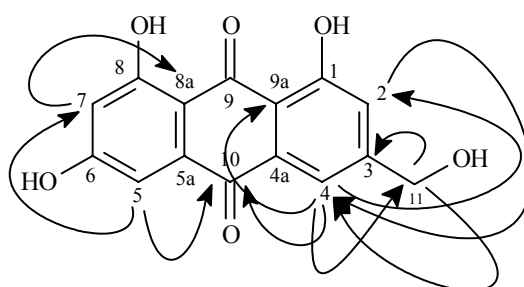


No experimento de HSQC (FIGURA 4.39) foram observadas as correlações de δ 6,67 (H-7) com o carbono localizado em δ 108,9. Este correlaciona no HMBC (FIGURA 4.39) com o carbono δ 110,5 (C-8a). O

hidrogênio localizado em δ 7,27 (H-5) está ligado ao carbono em δ 109,9, conforme observado no experimento de HSQC. Foi observado no experimento de HMBC para o hidrogênio H-5 correlação com os carbonos localizados em δ 108,9 (C-7), esta correlação confirma as atribuições feitas a C-5 e C-7, e H-5 correlaciona também com carbono carbonílico δ 182,3 atribuído a C-10.

Podemos ver que δ 7,75 (H-4) está ligado ao carbono δ 118,2 conforme observado no experimento de HSQC. Temos para o hidrogênio H-4 no experimento de HMBC correlações com o carbono carbonílico C-10, com o carbono localizado em δ 115,3 atribuído a C-9a, com δ 121,8 (C-2) e com o carbono localizado em δ 63,8 (C-11). O carbono C-11 está ligado ao singlete em δ 4,78, segundo o experimento de HSQC e podemos observar no espectro de HMBC H-11 correlacionando com os carbonos C-4 e com δ 154,0 atribuído para C-3. Vê-se ainda no HSQC que o sinal em δ 7,31 (H-2) está ligado ao carbono δ 121,8, já atribuído anteriormente a C-2. O hidrogênio H-2 apresenta no experimento de HMBC como principal correlação, a correlação com o carbono localizado em δ 118,2 C-4. As correlações de HMBC para **S-8** são mostra a seguir.

As fragmentações propostas através do espectro de massas de íons filho de 285 (FIGURAS 4.35 e 4.41) juntamente com a comparação dos dados de RMN com a literatura (TABELA 4.8) contribuíram para a identificação de **S-8** como sendo a antraquinona citreorseina. A proposta biogenética para a citreorseina encontra-se no Anexo 02 (p. 309).



Correlações de HMBC para S-8

TABELA 4.8: Dados de RMN ^1H e ^{13}C de S-8 (acetona- d_6 , 400 MHz)

S-8			Lit [57]	
	H (δ , <i>mult.</i> , <i>J</i> em Hz)	C	H (δ , <i>mult.</i> , <i>J</i> em Hz)	C
1		163,5		162,6
2	7,31 (<i>sl</i>)	121,8	7,32 (<i>sl</i>)	120,9
3		154,0		153,1
4	7,75 (<i>sl</i>)	118,2	7,76 (<i>sl</i>)	117,3
4^a		134,5		131,2
5	7,27 (<i>d</i> , 2,0)	109,9	7,28 (<i>d</i> , 2,4)	109,0
5^a		136,8		133,6
6		166,4		165,5
7	6,67 (<i>d</i> , 2,0)	108,9	6,68 (<i>d</i> , 2,4)	108,1
8		166,7		165,7
8^a		110,5		109,7
9		191,9		191,0
9^a		115,3		114,4
10		182,3		181,4
11	4,78 (<i>s</i>)	63,8	4,79 (<i>s</i>)	62,9
OH-1	12,14 (<i>s</i>)		12,14 (<i>s</i>)	
OH-8	12,20 (<i>s</i>)		12,20 (<i>s</i>)	

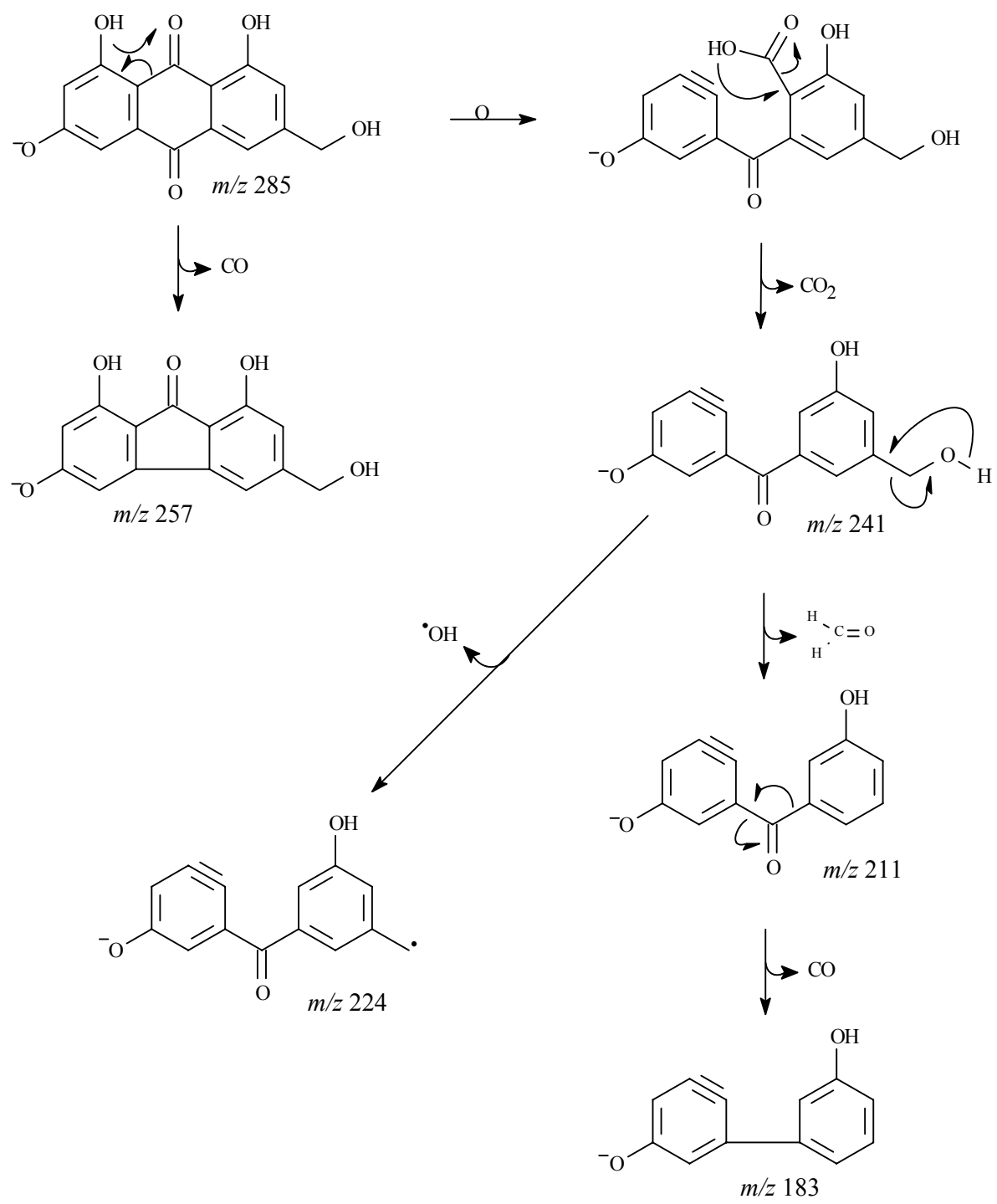


FIGURA 4.35: proposta de fragmentação para S-8

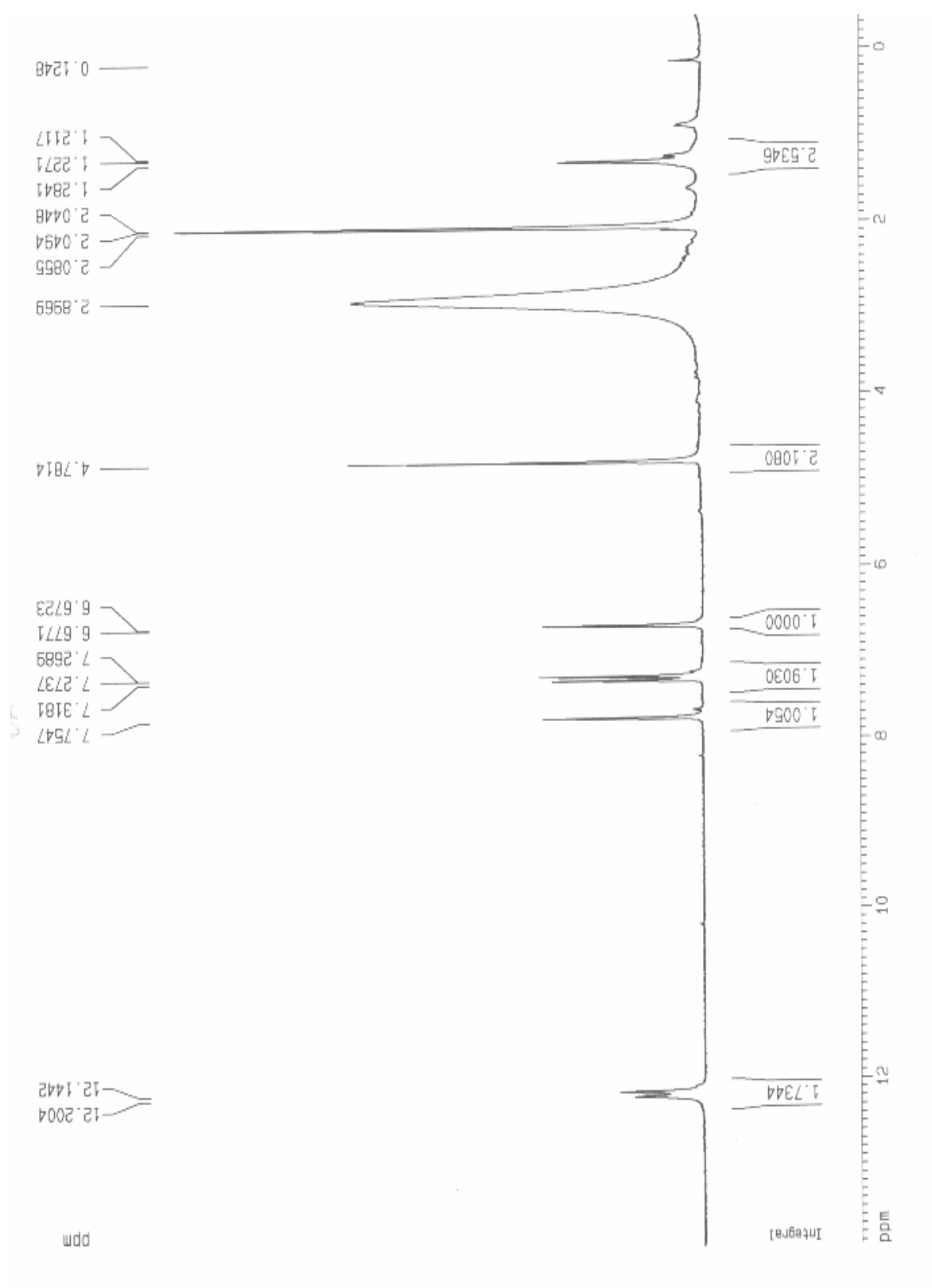


FIGURA 4.36: Espectro de RMN ^1H obtido para S-8 (400 MHz, acetona- d_6)

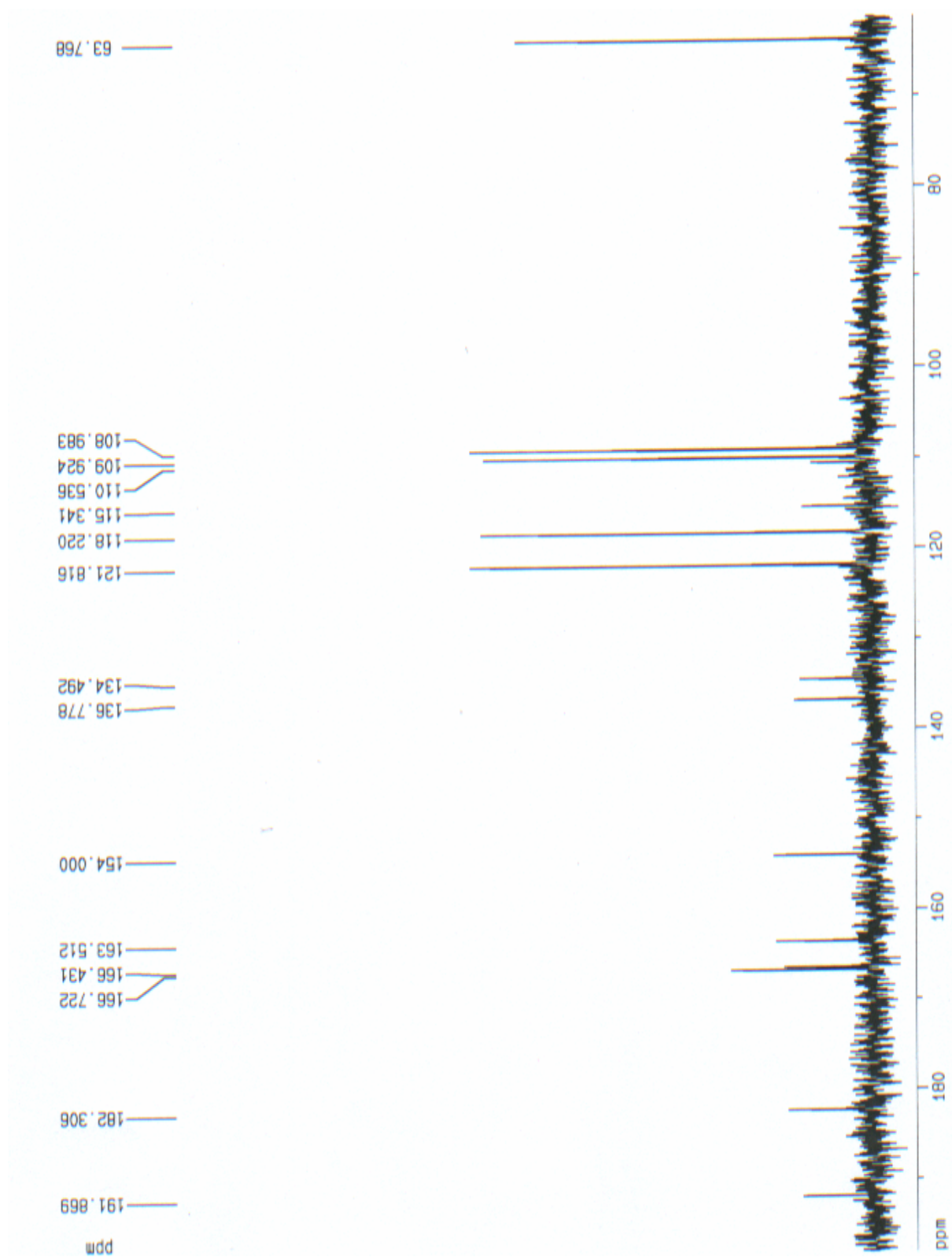


FIGURA 4.37: Espectro de RMN ^{13}C obtido para S-8 (100 MHz, acetona- d_6)

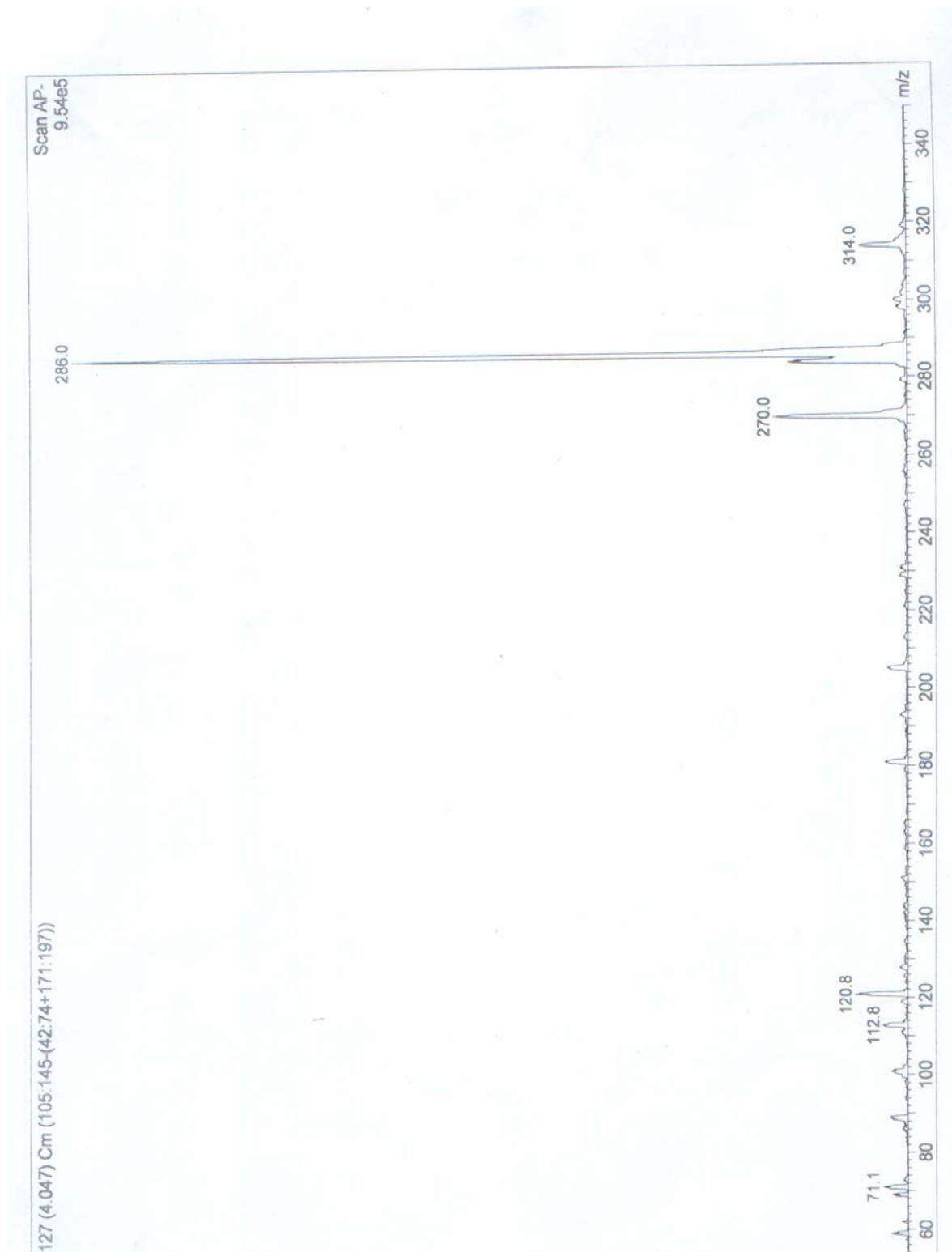


FIGURA 4.38: Espectro de massas (*full scan*) ESI⁻ de S-8.

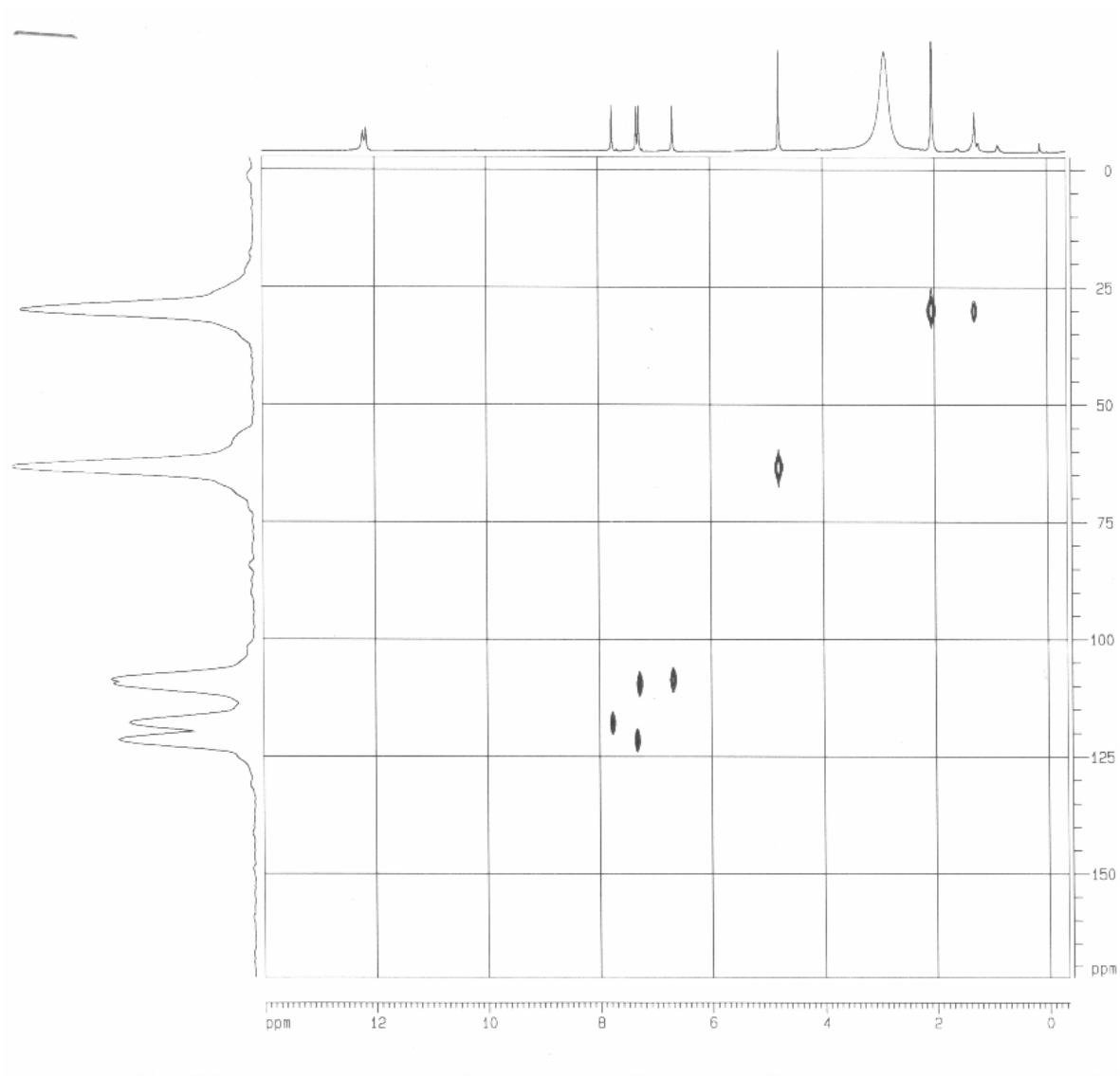


FIGURA 4.39: Experimento de HSQC S-8

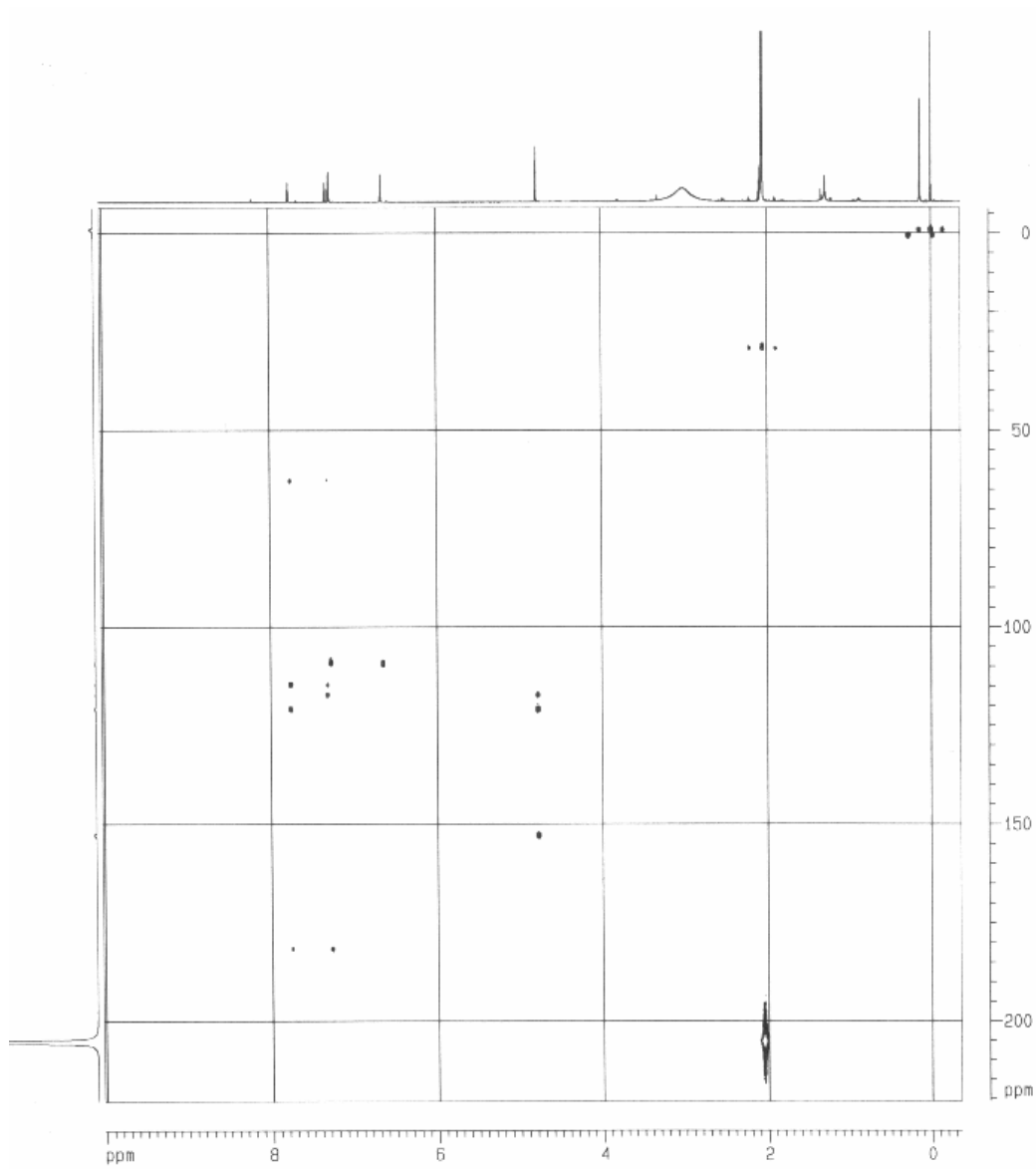


FIGURA 4.40: Experimento de HMBC de S-8

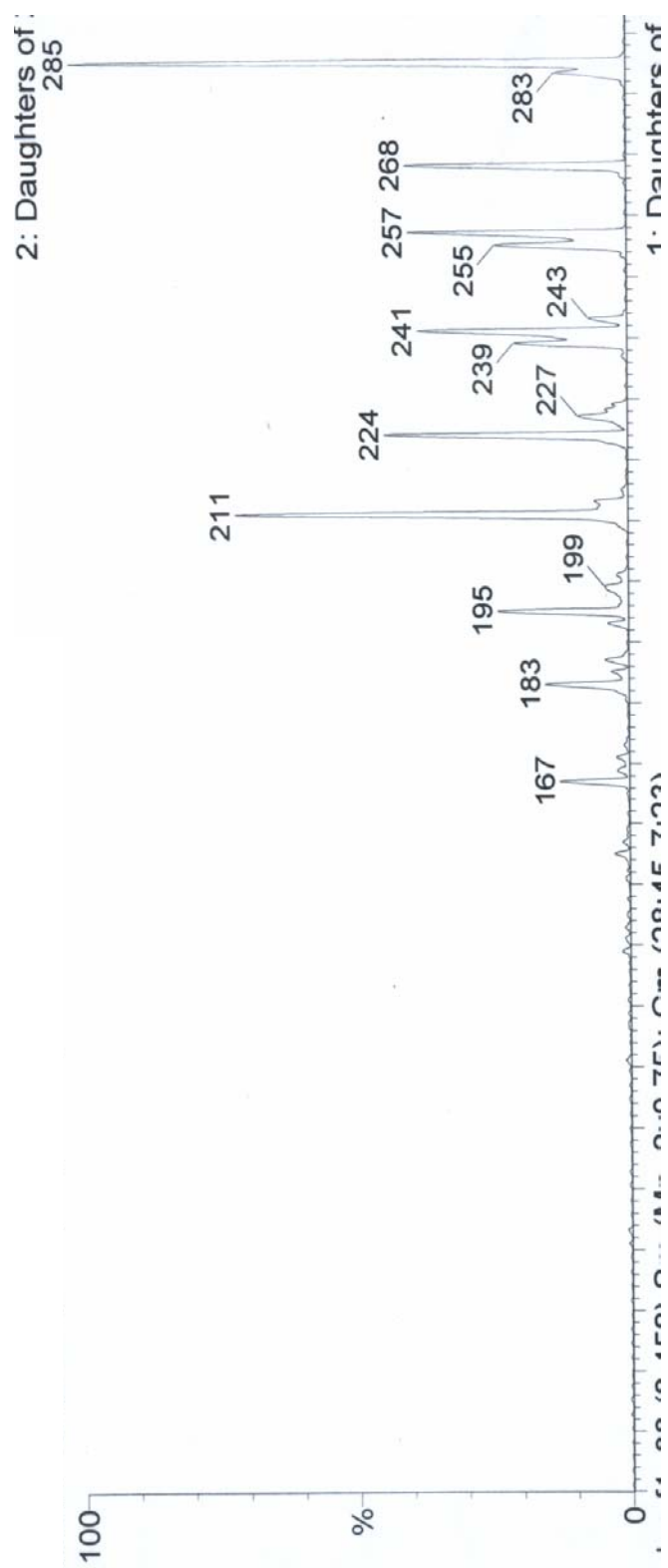


FIGURA 4.41: Espectro de massas de íons filhos de 285 (30 eV)

4.2.2.3 - S-9 – Janthinona

A substância **S-9** foi isolada na forma de um cristal amarelo através de cromatografia em coluna por via úmida dos extratos de média polaridade. Em seu espectro de RMN ^1H (FIGURA 4.44) foram observados sinais característicos de compostos aromáticos. Temos em δ 7,74 (*d*, $J = 7,3$ Hz) um sinal duplo dubleto com constante de acoplamento referente a hidrogênio *orto* relacionado, ainda nessa região tem outro duplo dubleto em δ 7,53 (*d*, $J = 8,5$ e 1,1 Hz) com constantes de acoplamento que sugerem que este esteja *orto-meta* relacionado, é observado ainda o sinal duplo dubleto em δ 7,30 (*d*, $J = 7,3$ e 1,1 Hz) que pelo valor das constantes de acoplamento também está *orto-meta* relacionado, por fim, temos os sinais quarteto em δ 6,75 (*m*) e δ 6,63 (*m*). Ainda no espectro de RMN ^1H temos os sinais em δ 4,03 (*s*) e δ 2,43 (*s*), que são comumente atribuídos a existência de grupos metoxila e metila ligados a anel aromático. O sinal singlete em δ 12,16 (*s*) caracteriza um hidrogênio em ligação de hidrogênio com um grupo carbonila.

O padrão espectral descrito acima é bastante semelhante ao padrão espectral dos compostos **S-7** e **S-8** e essa semelhança nos levou a sugerir que **S-9** viesse a ser uma antraquinona (FIGURA 4.42). No entanto ao se realizar o espectro de RMN ^{13}C (FIGURA 4.45) para **S-9** verificou-se que este não continha os sinais em δ 182,0 e δ 191,0 que caracterizam as antraquinonas. Quando se realizou o espectro de massas ESI(-) (FIGURA 4.46) foi observado um m/z 283 $[\text{M-H}]^-$ para **S-9**, sendo essa massa incompatível para uma antraquinona com os substituintes descritos. Assim, descartou-se a hipótese que **S-9** viesse a ser uma antraquinona. Através da massa obtida e dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C pode-se propor a seguinte fórmula molecular para o composto $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_5$.

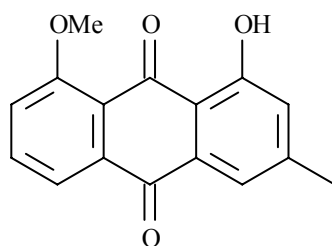
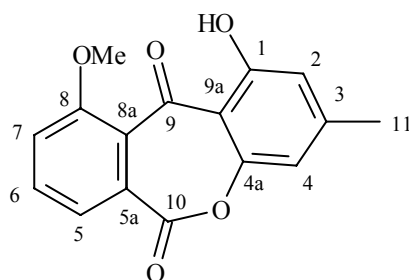


FIGURA 4.42: estrutura inicialmente sugerida para **S-9** com base no RMN ^1H

Realizou-se então um espectro de absorção no infravermelho (FIGURA 4.47) para a substância e foram observadas bandas em 3460 cm^{-1} referente a deformação axial da ligação O-H de hidroxila as bandas em 1653 cm^{-1} e 1742 cm^{-1} referentes a deformação axial da ligação C=O de carbonila, com isso, observou-se que além da hidroxila o composto **S-9** possuía duas carbonilas diferentes. Essas informações somadas a massa obtida para **S-9** m/z 283, levaram a conclusão de que a estrutura real do composto possuía um átomo de oxigênio a mais do que a estrutura inicialmente proposta e provavelmente seria uma lactona.

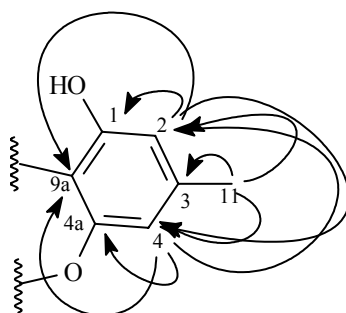
Foram realizados experimentos de RMN 2D, onde através das correlações observadas pode-se determinar a estrutura de **S-9** como sendo o policetídeo janthinona.



Janthinona

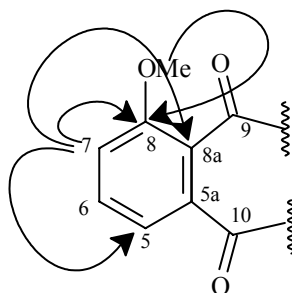
No experimento de HSQC (FIGURA 4.48) observou-se que o sinal em δ 6,63 (H-4) estava correlacionando com o carbono localizado em δ 111,7 e este apresentou correlação no experimento de COSY (FIGURA 4.49) com o

sinal em δ 6,75 (H-2) e com o sinal da metila Me-11 em δ 2,43. No experimento de HMBC (FIGURA 4.50) H-4 correlaciona com os sinais em δ 107,4 (C-2), δ 161,5 (C-4a) e com δ 106,9 (C-9a). Observou-se ainda no experimento de HSQC que o sinal em δ 6,75 (H-2) estava correlacionando com o carbono em δ 107,4, e por sua vez este correlaciona no experimento de COSY com os sinais de H-4 e da metila Me-11. No experimento de HMBC podemos observar para H-2 correlações com os sinais dos carbonos em δ 111,7 (C-4), δ 106,9 (C-9a) e δ 155,7 (C-1). Fechando a estrutura desta parte da molécula temos ainda a correlação de Me-11 (δ 22,6) no espectro de COSY com H-2 e H-4 e no experimento de HMBC com os sinais dos carbonos δ 107,4 (C-2), δ 111,7 (C-4) e δ 149,4 atribuído a C-3. Os hidrogênios H-2 e H-4 apresentam-se como quarteto no espectro de RMN ^1H devido aos seus acoplamentos a J^4 com os hidrogênios benzílicos da metila Me-11. As correlações de HMBC são mostradas a seguir.

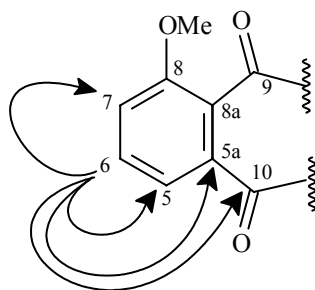


Continuando as correlações, temos no experimento de HSQC a correlação do sinal em δ 7,30 (H-7) com o carbono em δ 122,5. Este apresenta correlação no experimento de COSY com os sinais em δ 7,53 (H-5) e δ 7,74 (H-6), estas correlações observados no experimento de COSY mostram que estes hidrogênios fazem parte de outro sistema aromático em **S-9**. No experimento de HMBC H-7 esta correlacionando com os sinais em δ 117,5 (C-8a), com δ 119,4

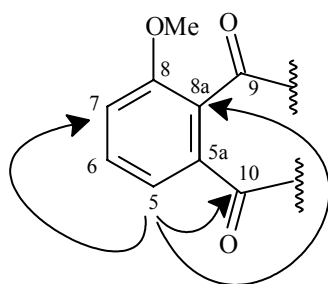
(C-5) e com δ 169,6 (C-8), confirmando a atribuição de δ 169,6 a C-8 temos a correlação de δ 4,03 (OMe) com este sinal, como mostrado a seguir.



Podemos ver no experimento de HSQC que o sinal em δ 7,74 (H-6) está correlacionando com δ 134,7. No espectro de COSY H-6 correlaciona com δ 7,30 (H-7) e com δ 7,53 (H-5). No experimento de HMBC H-6 apresenta correlações com os sinais em δ 122,5 (C-7), δ 119,4 (C-5), δ 133,5 atribuído a C-5a, e uma correlação a J^4 com o sinal em δ 155,9 atribuído a carbonila da lactona C-10, como mostrado a seguir.



No experimento de HSQC podemos ver que o sinal em δ 7,51 (H-5) esta correlacionando com o carbono localizado em δ 119,4. No espectro de COSY H-5 correlaciona com δ 7,74 (H-6) e δ 7,30 (H-7). Fechando a estrutura para esta parte da molécula temos no experimento de HMBC as correlações de H-5 com os sinais dos carbonos δ 122,5 (C-7), δ 117,5 (C-8a) e com δ 155,9 (C-10) confirmando a presença da carbonila da lactona nesta posição, como vemos a seguir.



Através das correlações observadas determinou-se então a estrutura de **S-9** como sendo o policetídeo janthinona já isolado anteriormente do fungo *Penicillium janthinellum*. As fragmentações obtidas através do espectro de íons filhos de 283 (FIGURA 4.43 e 4.51) ajudaram a confirmar a estrutura proposta. Os dados de RMN ^1H e ^{13}C encontram-se na TABELA 4.9. Podemos notar na TABELA 4.9 que os valores de C-8 e C-10 estão invertidos em comparação com a literatura, no entanto podemos afirmar que as atribuições aqui feitas estão corretas. A proposta biogenética para a janthinona encontra-se no Anexo 02 (p. 310).

TABELA 4.9: Dados de RMN ^1H e ^{13}C de S-9 (CDCl_3 , 400 MHz)

S-9			Lit [61]	
	H (δ , <i>mult.</i> , <i>J</i> em Hz)	C	H (δ , <i>mult.</i> , <i>J</i> em Hz)	C
1		155,7		155,6
2	6,75 (<i>m</i>)	107,4	6,74 (<i>d</i> , 1,8)	107,3
3		149,4		149,3
4	6,63 (<i>m</i>)	111,7	6,62 (<i>d</i> , 1,8)	111,5
4a		161,5		161,4
5	7,53 (<i>dd</i> , 8,5 e 1,1)	119,4	7,51 (<i>dd</i> , 8,2 e 2,0)	119,3
5a		133,5		133,5
6	7,74 (<i>dd</i> , 8,5 e 7,3)	134,7	7,74 (<i>dd</i> , 8,5 e 7,3)	134,0
7	7,30 (<i>dd</i> , 7,3 e 1,1)	122,5	7,30 (<i>dd</i> , 7,3 e 2,0)	122,4
8		169,6		155,9
8a		117,5		117,5
9		180,3		180,3
9^a		106,9		106,9
10		155,9		169,6
11	2,43 (<i>s</i>)	22,6	2,43 (<i>s</i>)	22,5
OH-1	12,15 (<i>s</i>)		12,16 (<i>s</i>)	
OMe	4,03 (<i>s</i>)	53,1	4,03 (<i>s</i>)	53,0

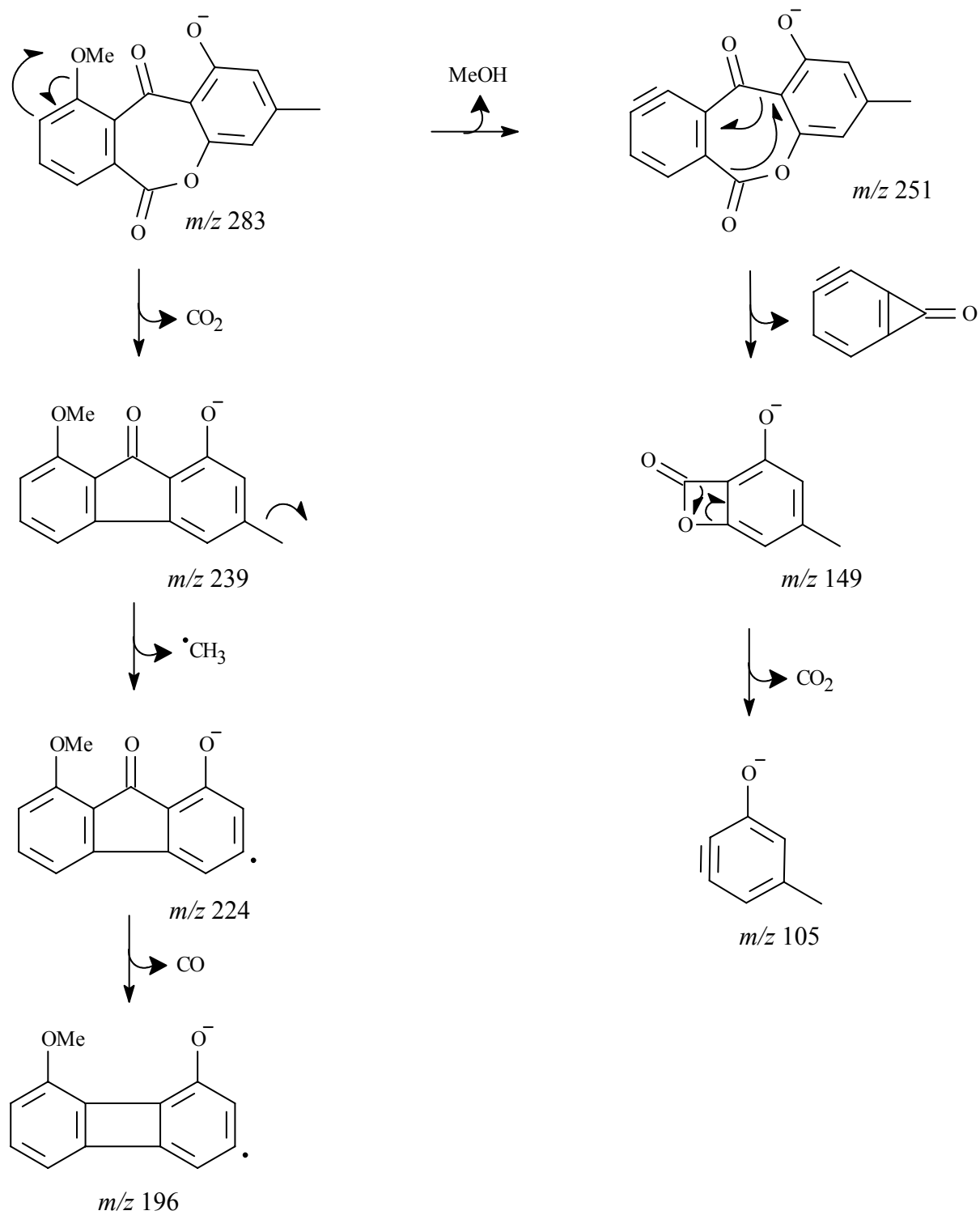


FIGURA 4.43: Proposta de fragmentação para S-9

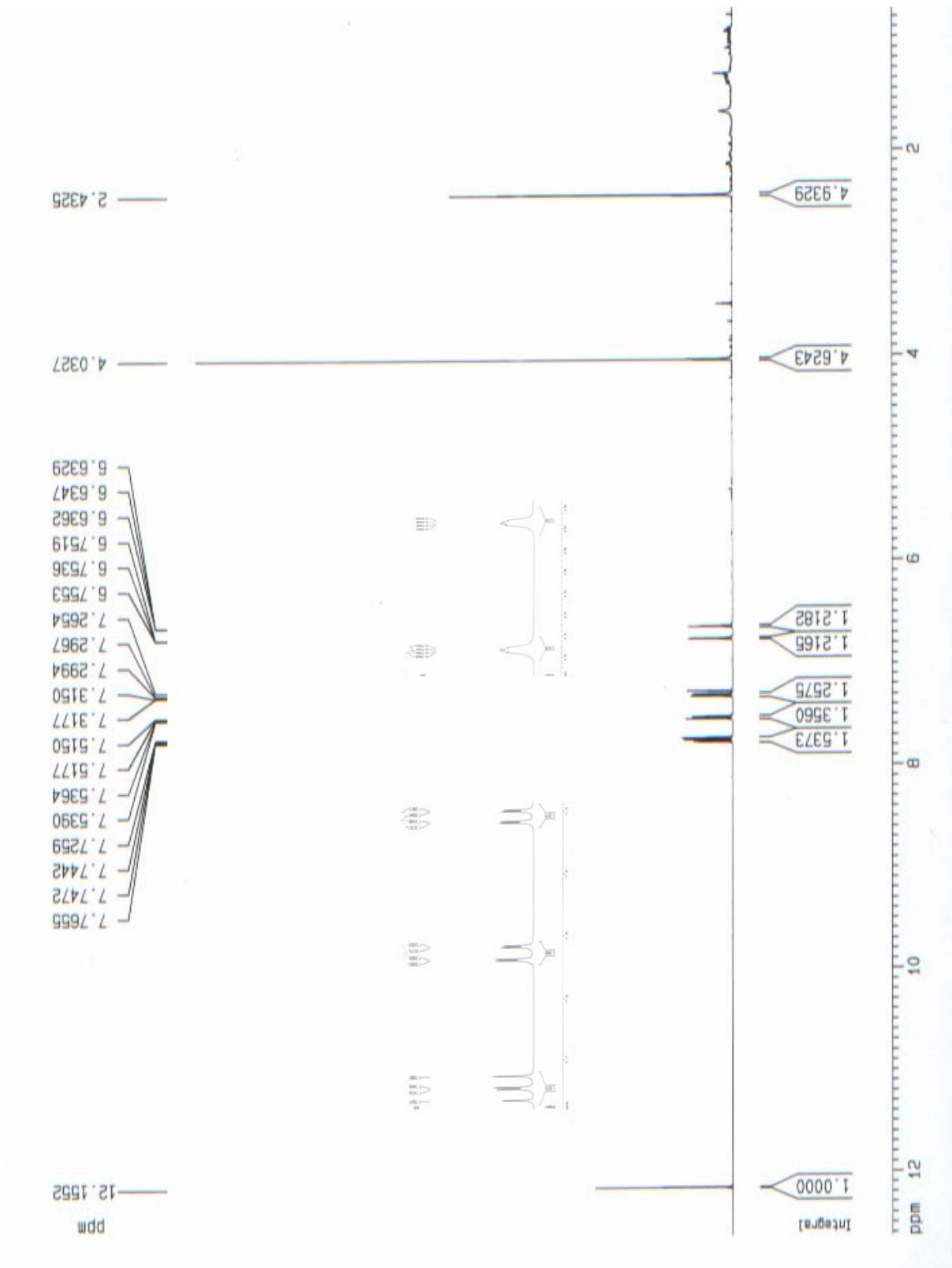


FIGURA 4.44: Espectro de RMN ^1H obtido para S-9 (CDCl_3 , 400 MHz)

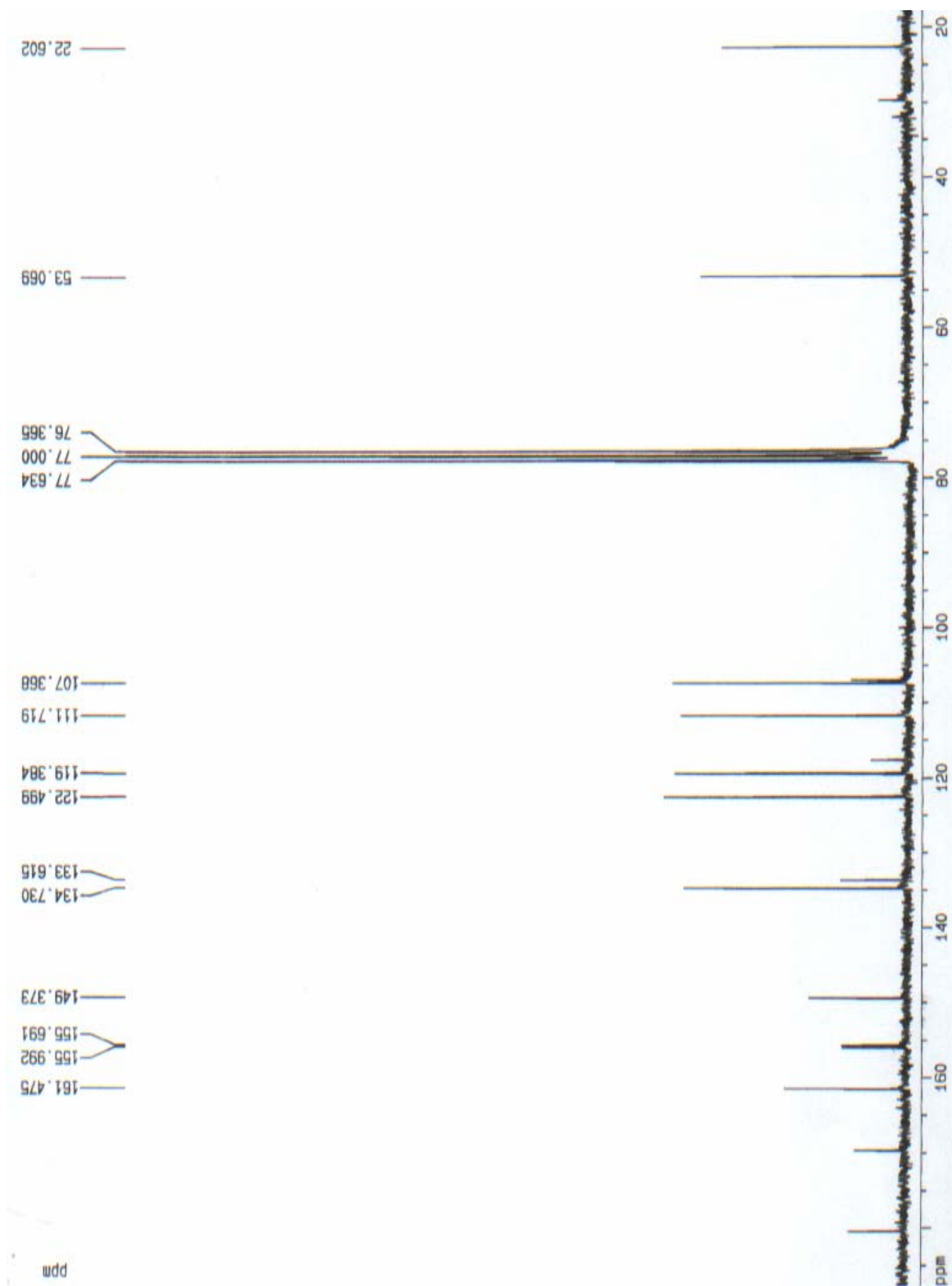


FIGURA 4.45: Espectro de RMN ^{13}C obtido para S-9 (CDCl_3 , 50 MHz)

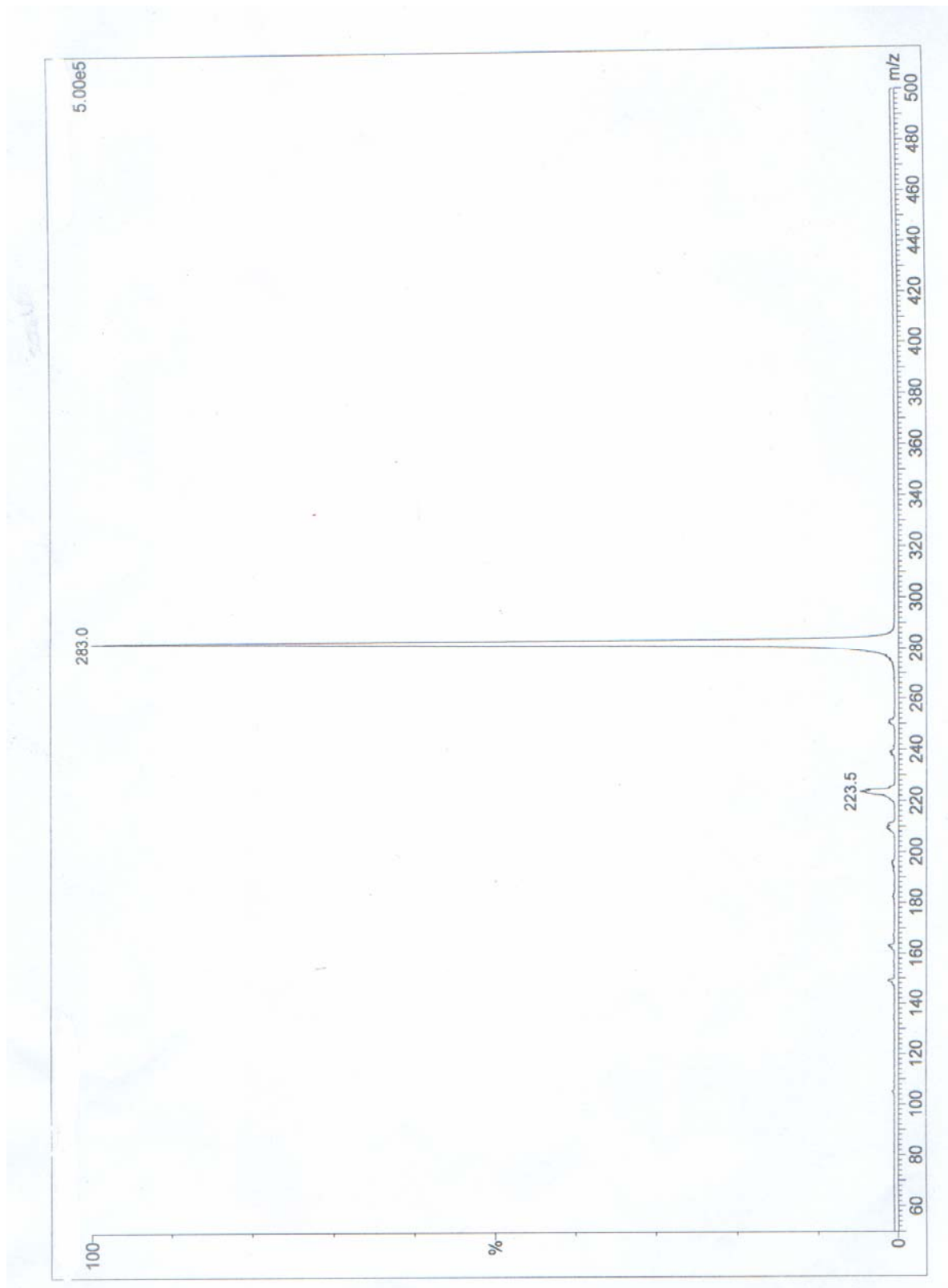


FIGURA 4.46: Espectro de massas (*full scan*) ESI de S-9

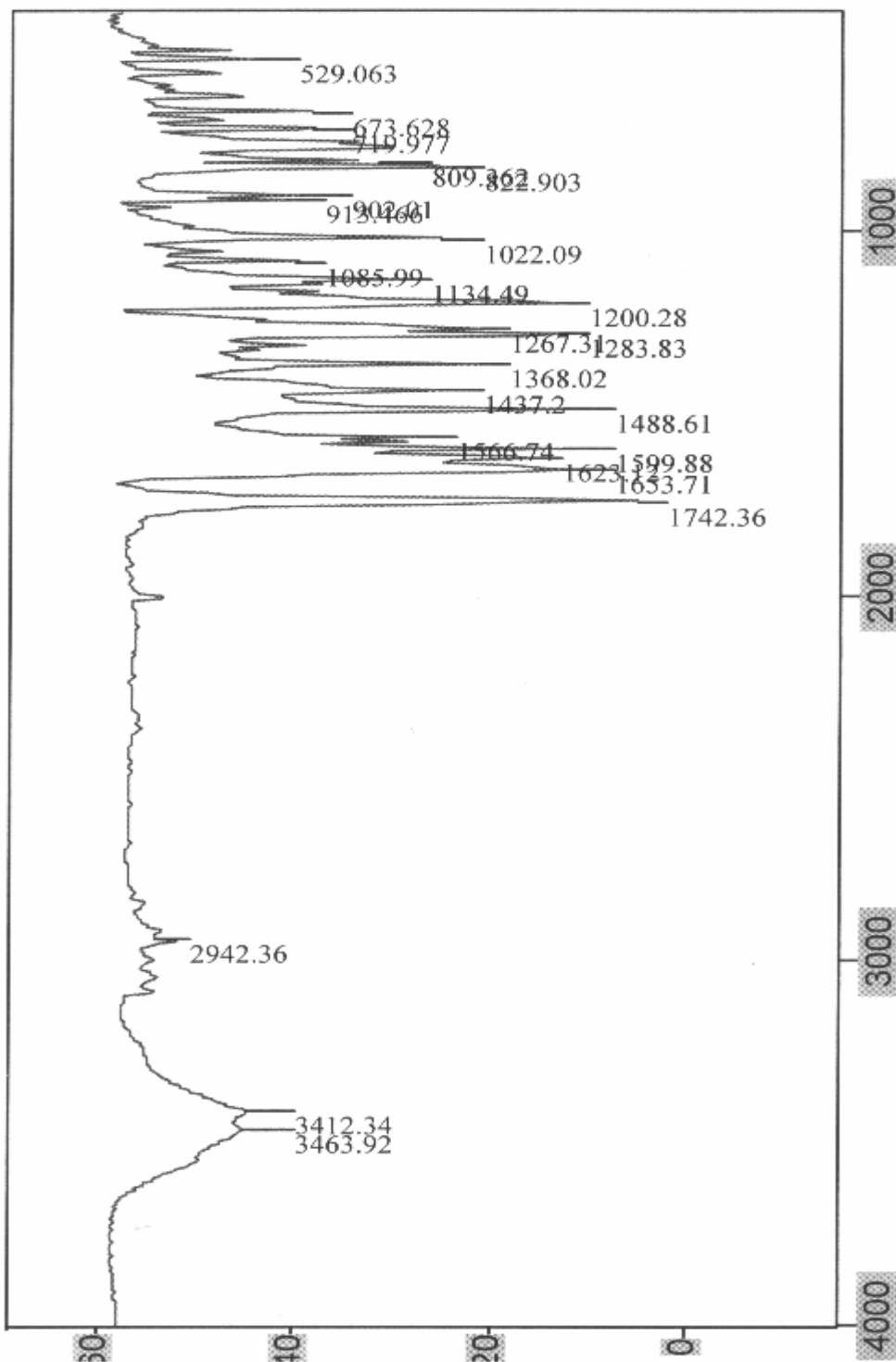


FIGURA 4.47: Espectro de absorção no infravermelho obtido para S-9 (KBr)

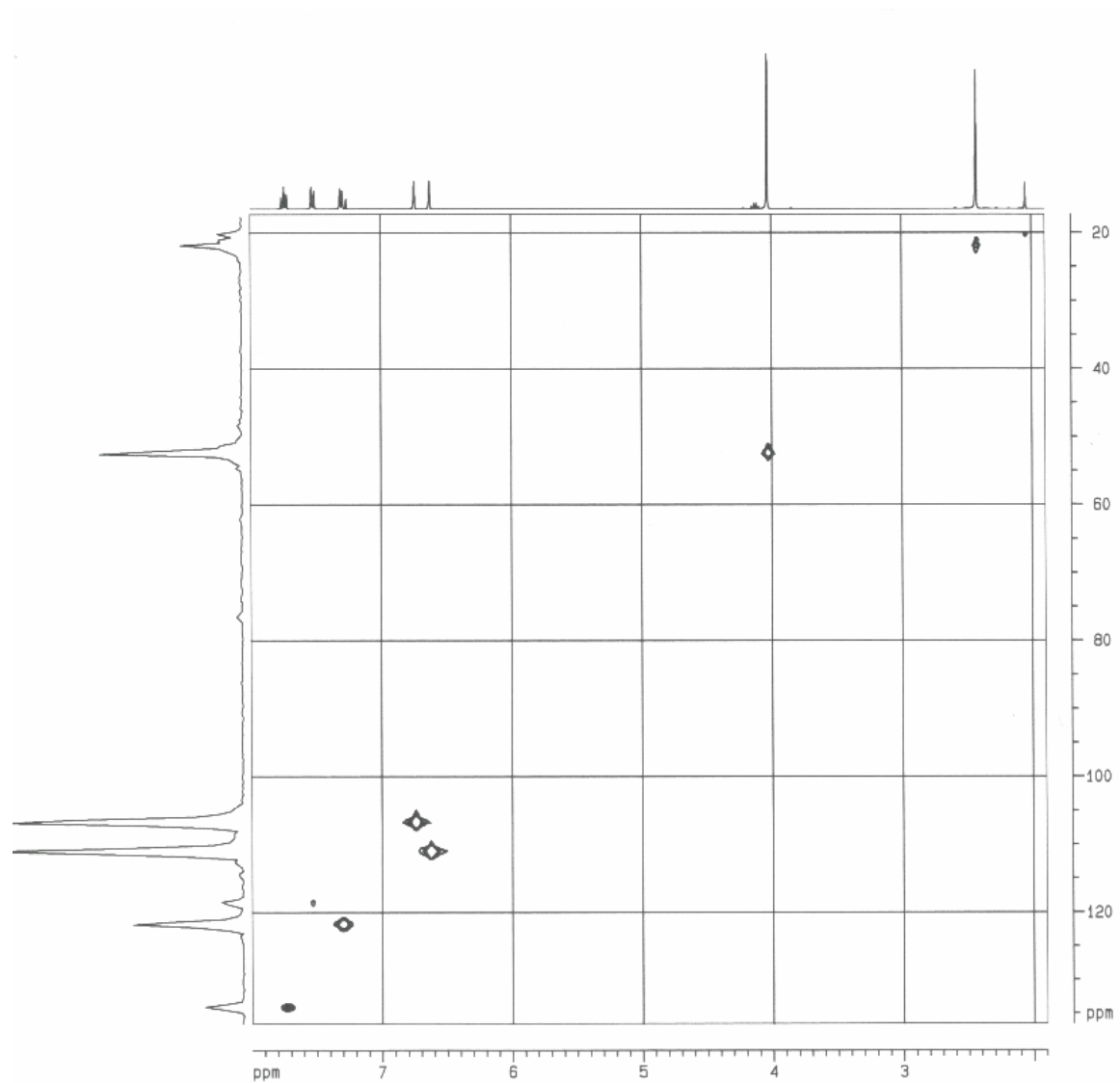


FIGURA 4.48: Experimento de HSQC S-9

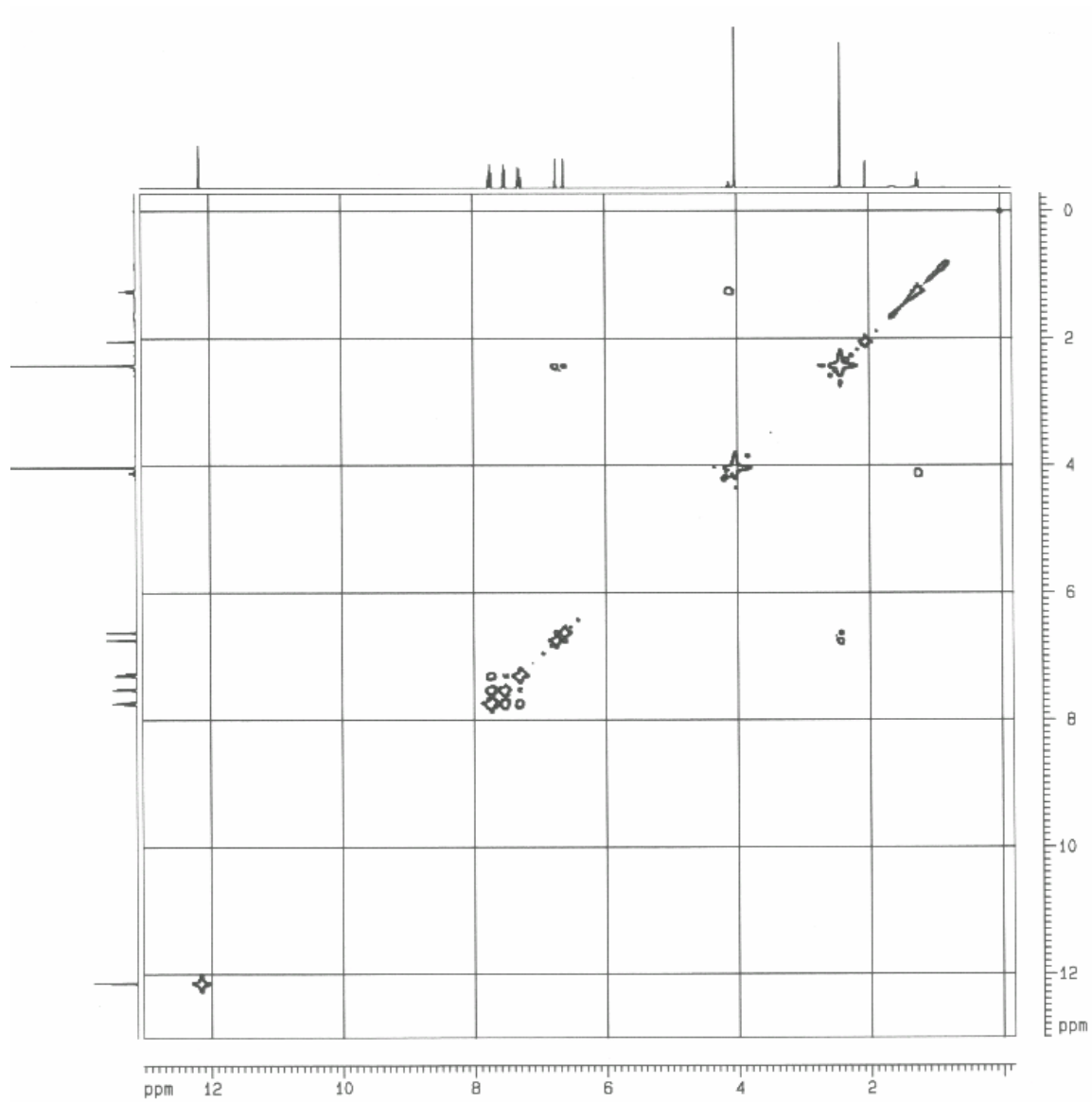


FIGURA 4.49: Experimento de COSY S-9

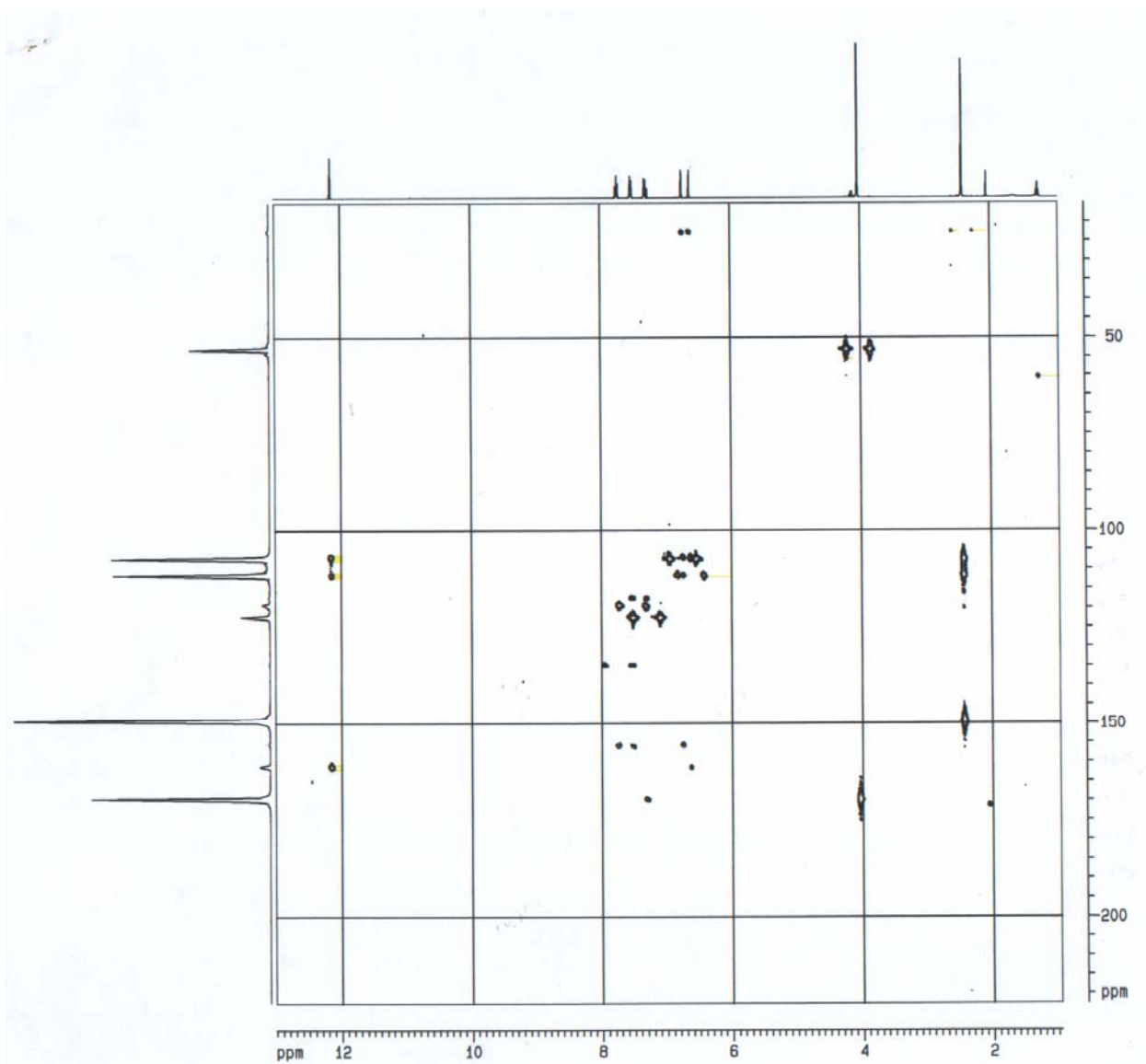


FIGURA 4.50: Experimento de HMBC S-9

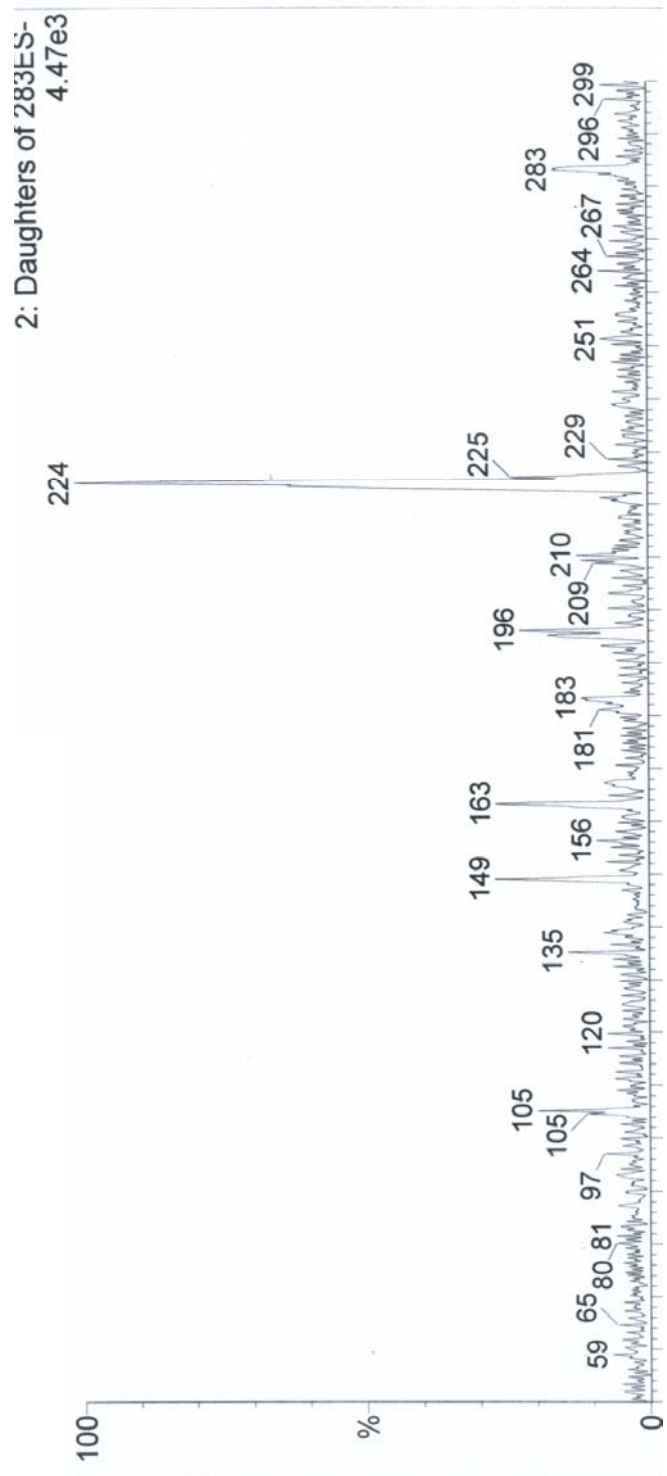


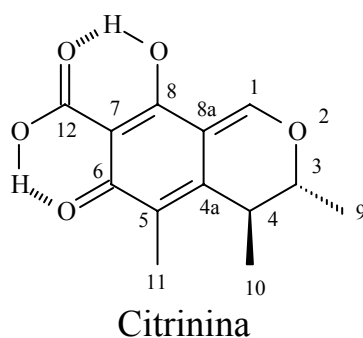
FIGURA 4.51: Espectro de massas de íons filhos de m/z 283 (30 eV) de S-9

4.2.2.4 - S-10 – Citrinina

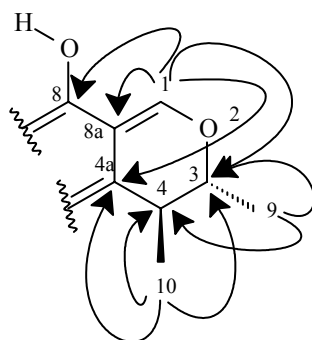
Esta substância foi isolada do extrato metanólico de *Penicillium* sp B (*M. paniculata*) através de técnicas clássicas de cromatografia como cromatografia em coluna por via úmida e cromatografia em camada delgada preparativa. Em seu espectro de RMN ^1H (FIGURA 4.53) podemos observar sinais de metilas em δ 1,23 (*d*, $J = 7,1$ Hz), δ 1,35 (*d*, $J = 6,7$ Hz) e um singlete de metila ligada dupla ligação em δ 2,02. Temos também sinais quarteto em δ 3,00 (*q*, $J = 7,1$ Hz) e δ 4,79 (*q*, $J = 6,7$ Hz) que pelos valores de suas constantes de acoplamento estão vizinhos as metilas. É observado ainda no espectro um singlete em δ 8,25 e dois singletos típico de hidrogênio quelado por ligação de hidrogênio a carbonila em δ 15,13 e δ 15,90.

No espectro de RMN ^{13}C (FIGURA 4.54) foram observados 13 sinais, sendo que com o auxílio do espectro de DEPT 135 (FIGURA 4.55) observou-se seis carbonos metínicos δ 9,3, δ 18,3, δ 18,4 sendo estes sinais comumente atribuídos a metilas, um sinal δ 34,4 e outro em δ 81,7, sendo este comum a carbono carbinólico, além do sinal em 162,9. Não foram observados sinais referentes a carbonos metilênicos. E pela comparação dos dois espectros contou-se sete carbonos quaternários, sendo os sinais δ 100,1, δ 107,3, δ 122,9 e δ 139,2 referentes a carbonos de ligações dupla e os sinais δ 174,4, δ 177,1 e δ 183,6 referentes a carbonos sp^2 oxigenados. Pelo espectro de absorção no infravermelho (FIGURA 4.56) observou-se as bandas em 1653 cm^{-1} e 3417 cm^{-1} sugerindo a presença de grupos carbonila e hidroxila no composto.

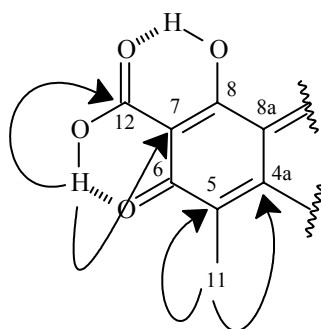
No espectro de massas ESI (-) observou-se um m/z 249 [M-H] (FIGURA 4.57), que juntamente com os dados de RMN ^1H e ^{13}C possibilitou a proposta da fórmula molecular como sendo $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{O}_5$. Com o uso das técnicas de RMN 2D identificou-se a estrutura de **S-10** como sendo o ácido (3R-trans)-4,6,dihidro-8-dihidroxi-3,4,6-trimetil-6-oxo-3H-2-benzopirano-7-carboxílico conhecido por citrinina, isolado primeiramente de *Penicillium citrinum*.



No experimento de HSQC (FIGURA 4.59) para **S-10** que o sinal da metila em δ 1,35 (Me-9) correlaciona com o carbono em δ 18,3. No experimento de COSY (FIGURA 4.60) observou-se a correlação entre Me-9 e o sinal em δ 4,79 (H-3) e no experimento de HMBC (FIGURA 4.61) Me-9 correlaciona com os carbonos δ 81,7 (C-3) e δ 34,5 (C-4). O sinal em δ 1,23 (Me-10) está correlacionando no experimento de HSQC com o sinal do carbono localizado em δ 18,1 (Me-10), onde no experimento de COSY Me-10 correlaciona com o sinal em δ 3,00 (H-4). No experimento de HMBC Me-10 está correlacionando com os sinais em δ 34,5 (C-4), δ 81,7 (C-3) e δ 139,2 (C-4a). Fechando essa parte da molécula, observamos no experimento de HSQC o sinal em δ 8,25 (H-1) correlacionando com os sinal em δ 162,9 e no experimento de HMBC H-1 apresentou correlações com os sinais em 81,7 (C-3), 139,2 (C-4a), δ 107,3 atribuído a C-8a e δ 177,1 atribuído a C-8. As correlações de HMBC são mostradas a seguir.



No experimento de HSQC temos a correlação do sinal em δ 2,02 (Me-11) com o carbono em δ 9,3. A metila Me-11 apresenta correlações no experimento de HMBC com carbonos localizados em δ 122,9 (C-5), δ 183,6 atribuído a carbonila C-6 e com o δ 139,2 (C-4a). O sinal do hidrogênio quelado em δ 15,90 apresentou correlações no HMBC com os carbonos δ 174,4 atribuído a carbonila do ácido carboxílico e com δ 100,7 atribuído a C-7. As correlações de HMBC são mostradas a seguir.



Estas correlações permitiram a identificação da estrutura de **S-10**, que pode ser confirmada através da comparação dos dados de RMN ^{13}C de **S-10** com os descritos na literatura para a citrinina (TABELA 4.10). As fragmentações propostas através do espectro de íons filhos de m/z 249 (FIGURA 4.52 e 4.58) confirmaram a estrutura. A biossíntese da citrinina encontra-se no Anexo 02 (p. 311)

TABELA 4.10: Dados de RMN ^1H e ^{13}C de **S-10** (CDCl_3 , 400 MHz)

S-10			Lit [62]	
	H (δ, <i>mult.</i>, <i>J</i> em Hz)	C	H *	C*
1	8,25 (<i>s</i>)	162,9	8,40	164,9
3	4,79 (<i>q</i> , 6,7)	81,7	4,90	82,5
4	3,00 (<i>q</i> , 7,1)	34,5	3,08	34,5
4^a		139,2		140,1
5		122,9		123,0
6		183,6		184,0
7		100,7		100,0
8		177,1		177,0
8a		107,3		107,0
9	1,35 (<i>d</i> , 6,7)	18,3	1,35	18,3
10	1,23 (<i>d</i> , 7,1)	18,1	1,21	18,7
11	2,02 (<i>s</i>)	9,3	2,02	10,0
12		174,4		175,1
OH-1	15,13 (<i>s</i>)			
OH-2	15,90 (<i>s</i>)			

* os espectros foram obtidos em CD_2Cl_2 e a $-70\text{ }^\circ\text{C}$

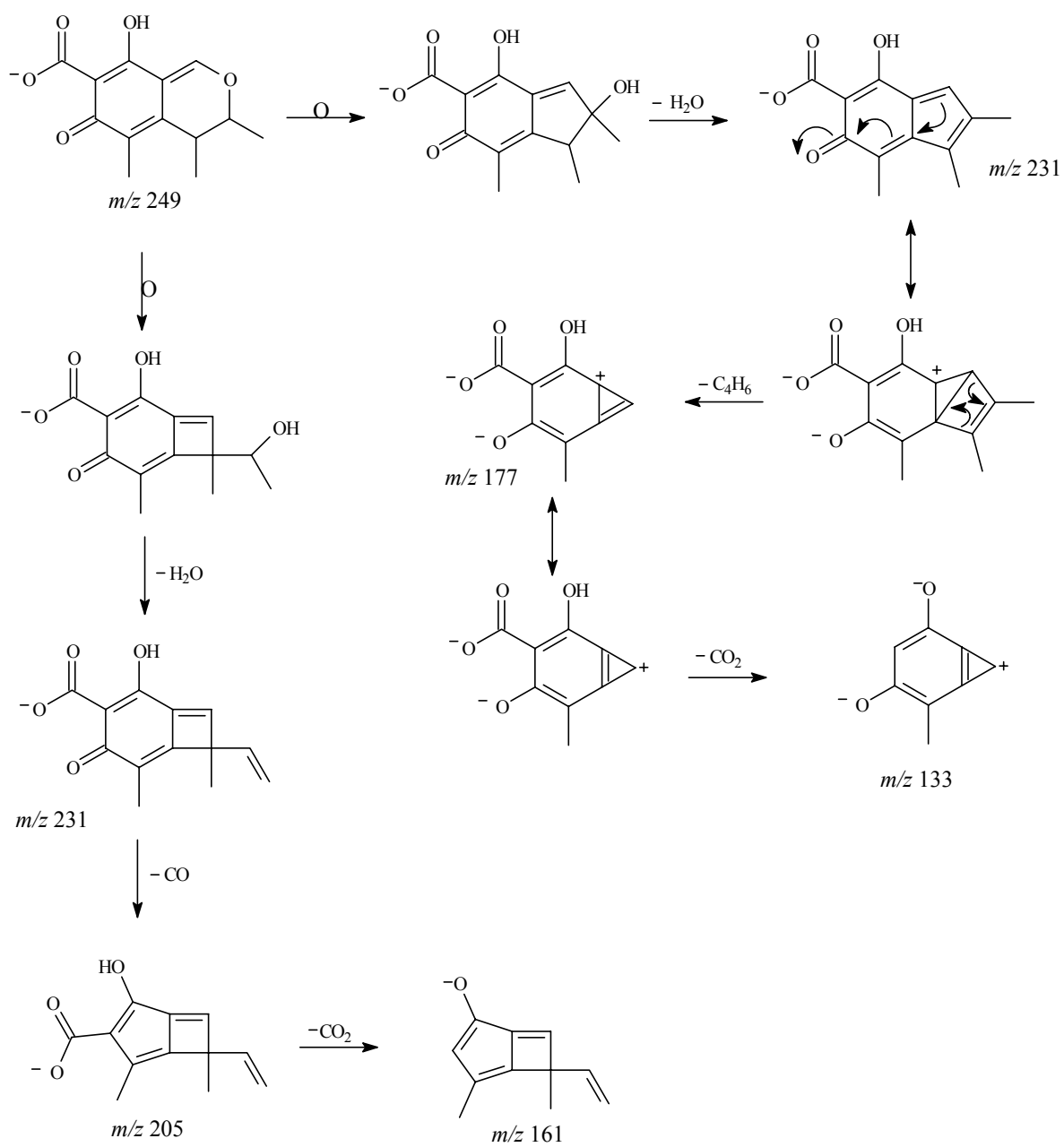


FIGURA 4.52: propostas de fragmentação para S-10 (ESI (-) íons filhos de m/z 249).

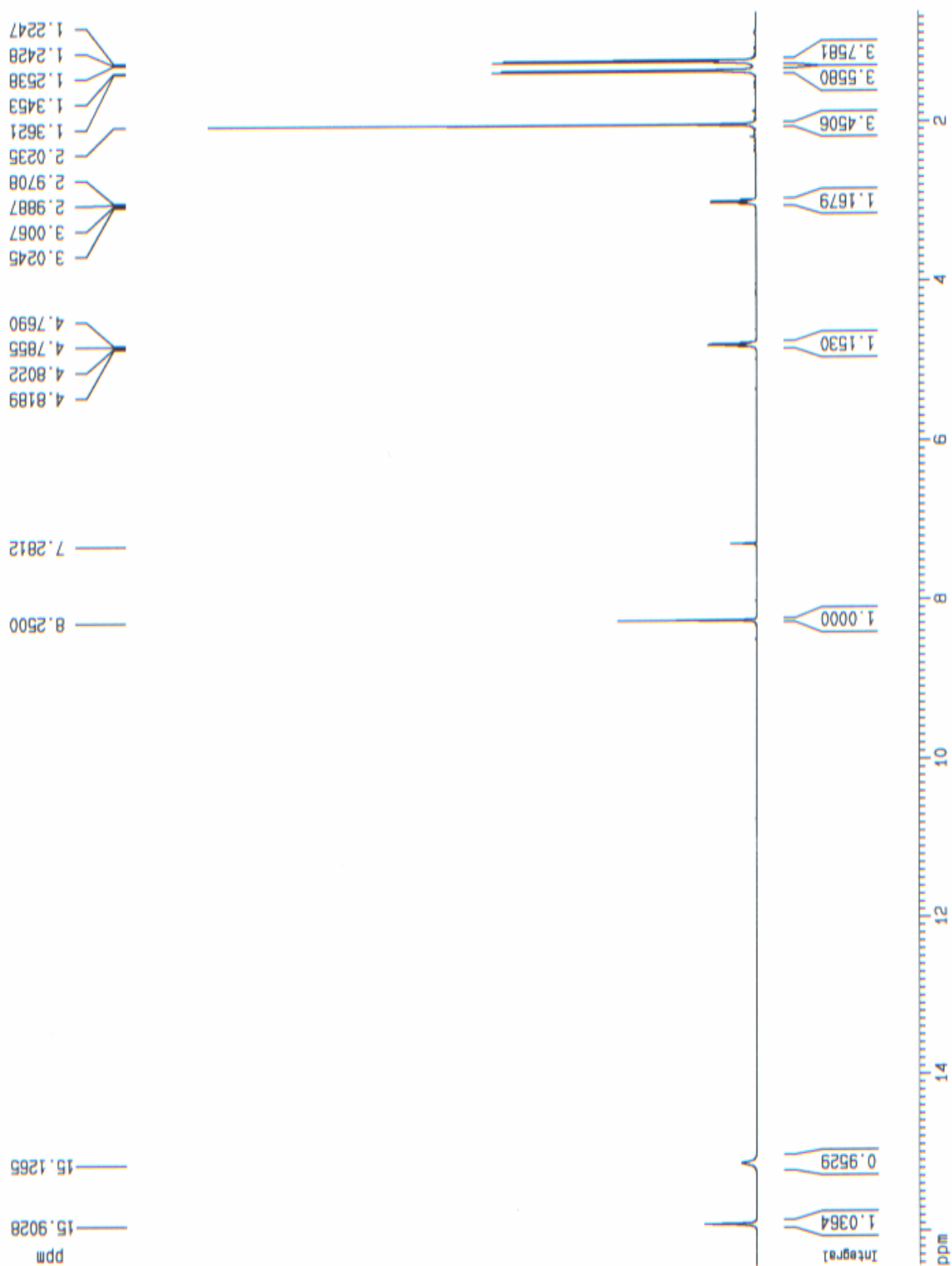


FIGURA 4.53: Espectro de RMN ^1H obtido para S-10 (400 MHz, CDCl_3)

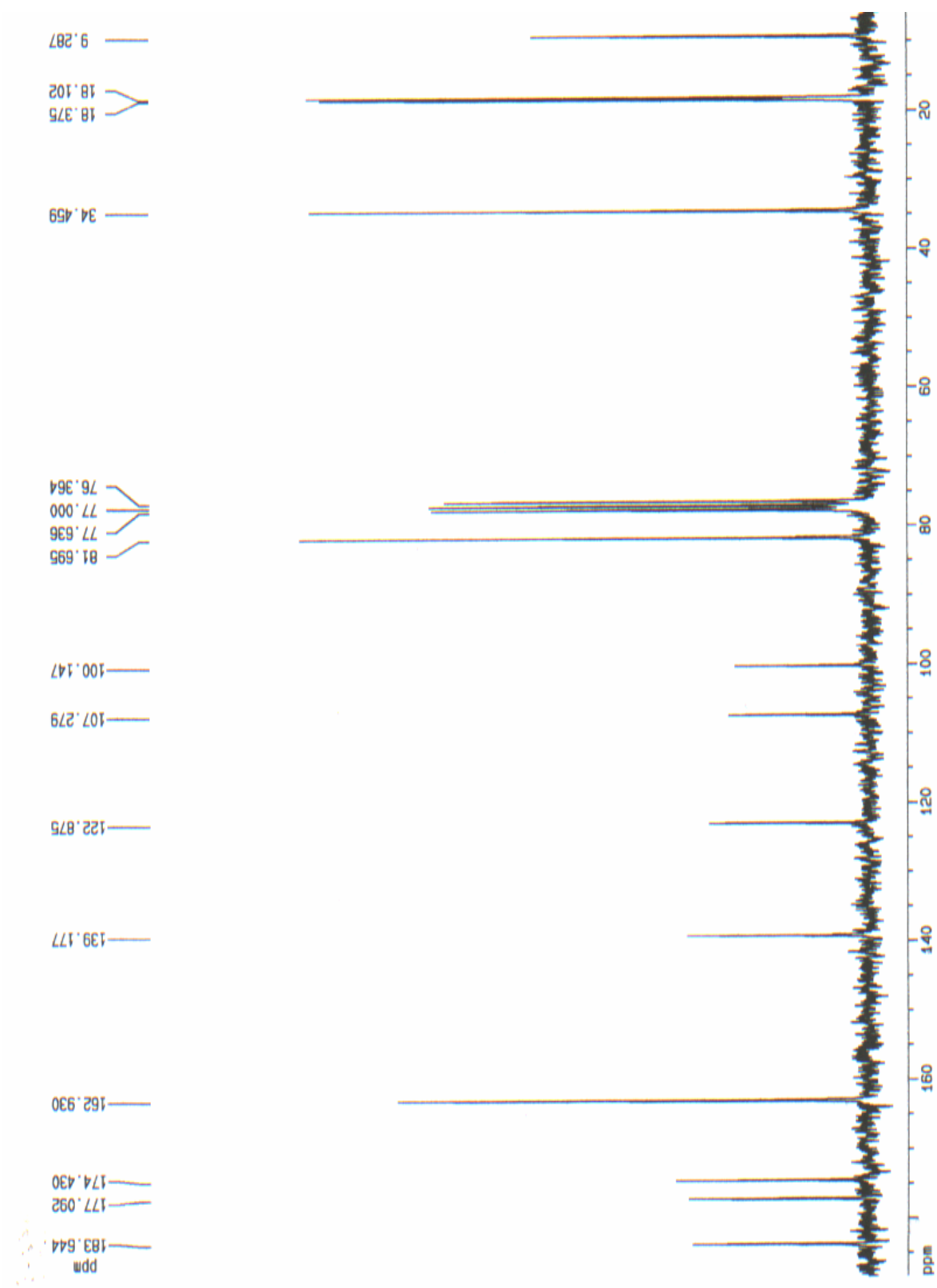


FIGURA 4.54: Espectro de RMN ^{13}C obtenido para S-10 (100 MHz, CDCl_3)

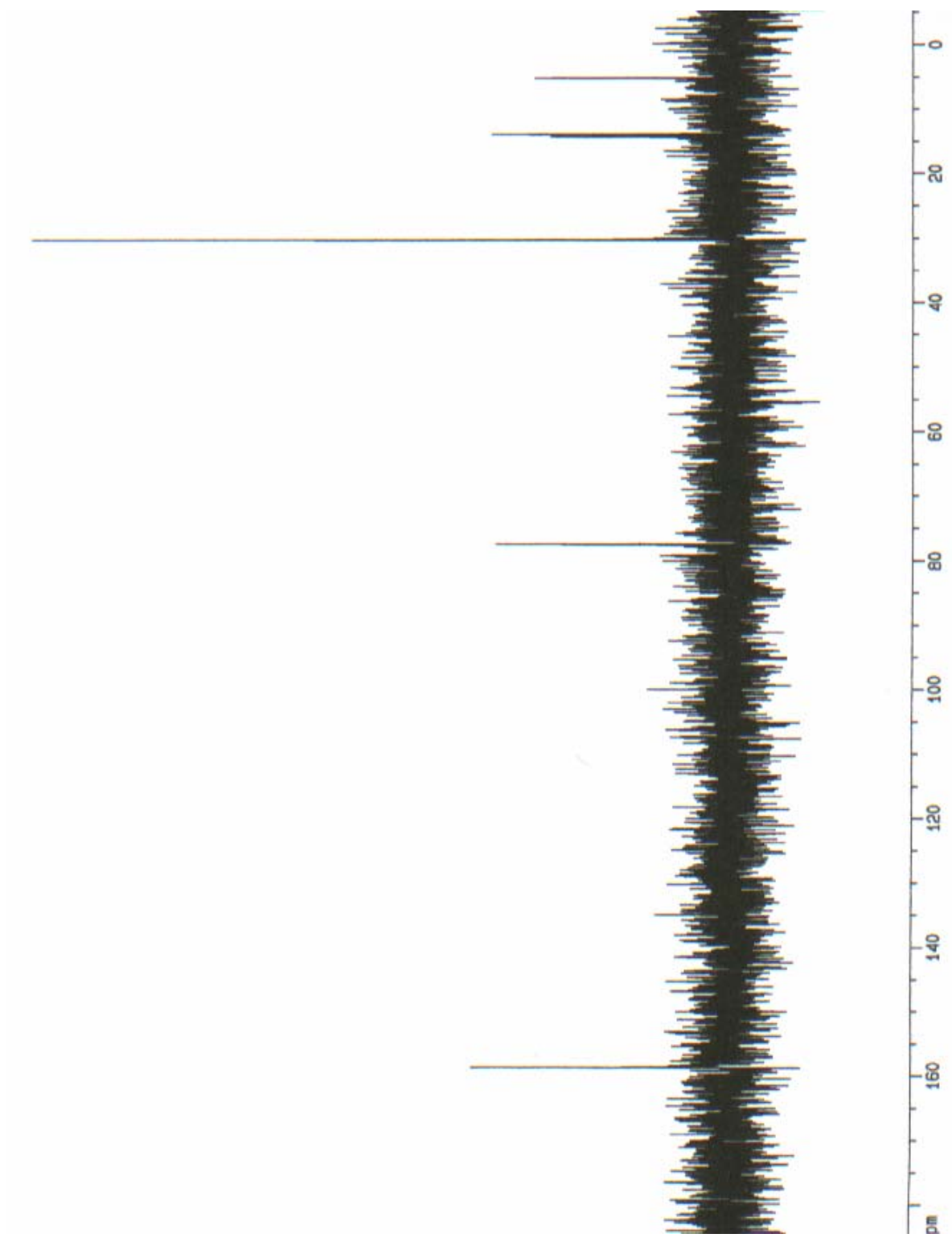


FIGURA 4.55: Espectro de DEPT S-10

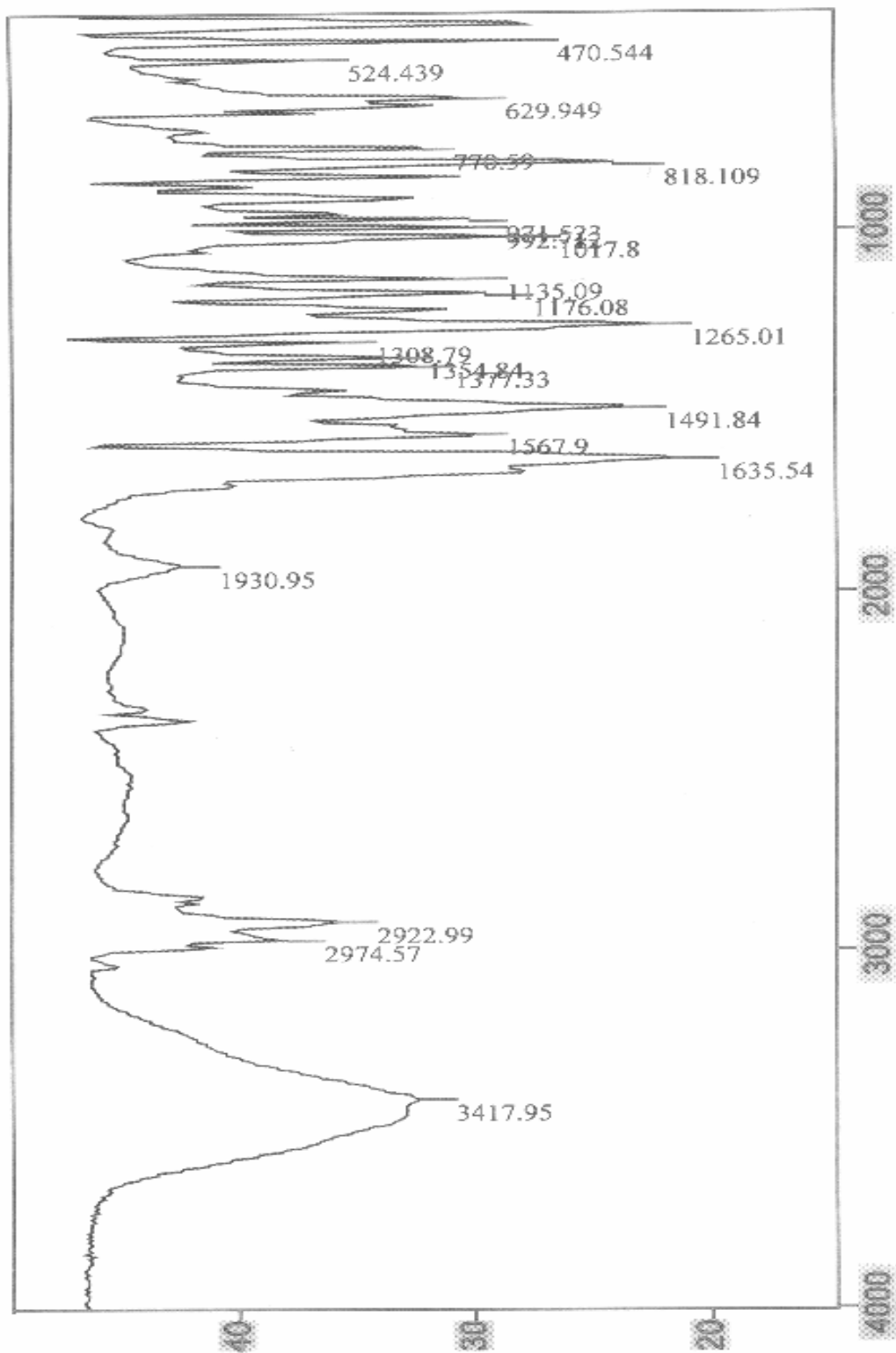


FIGURA 4.56: Espectro de absorção no infravermelho obtido para S-10 (KBr)

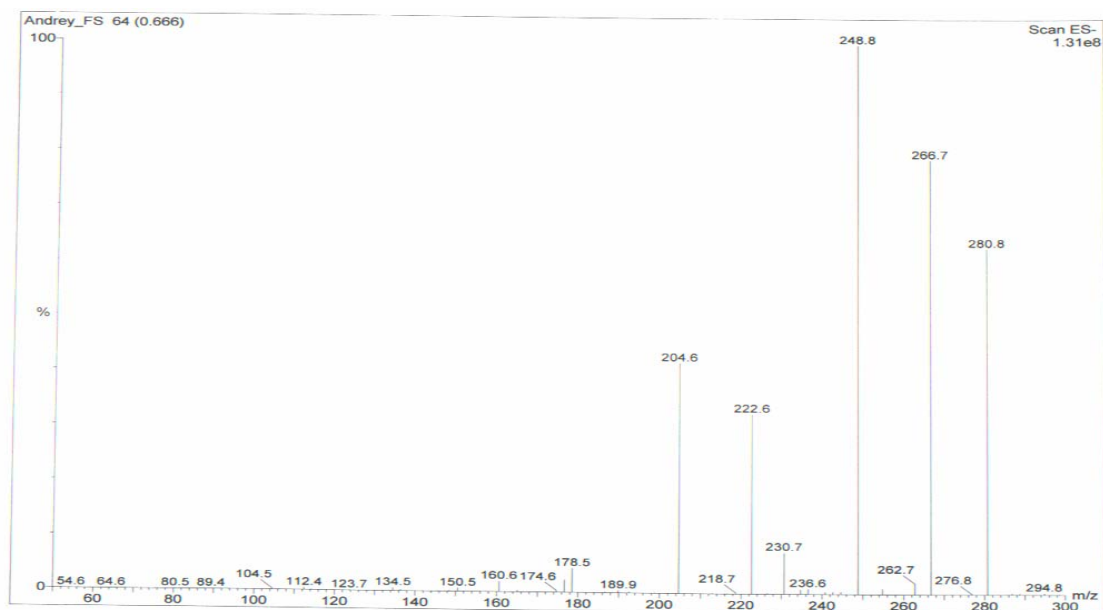


FIGURA 4.57: Espectro de *full scan* ESI⁻ de S-1

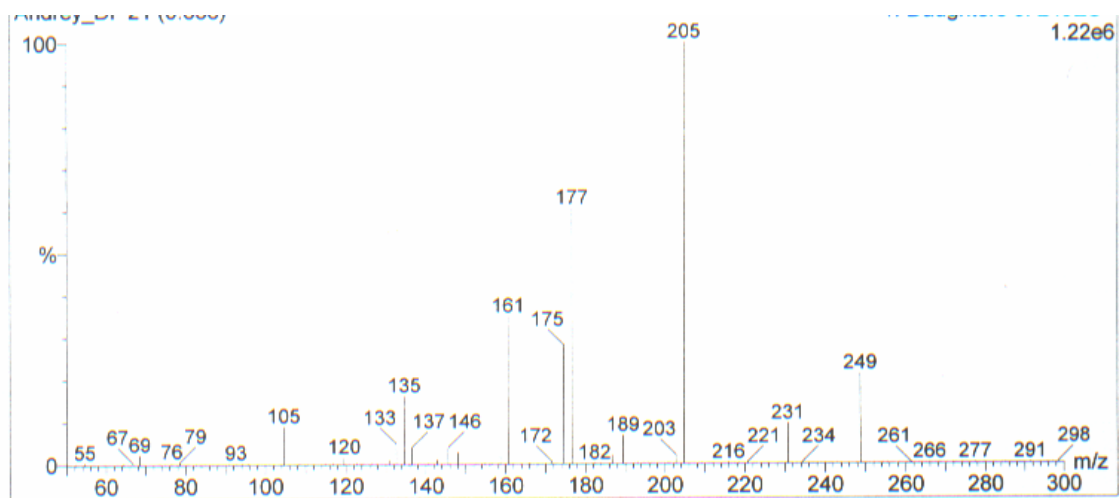


FIGURA 4.58: Íons filhos de m/z 249

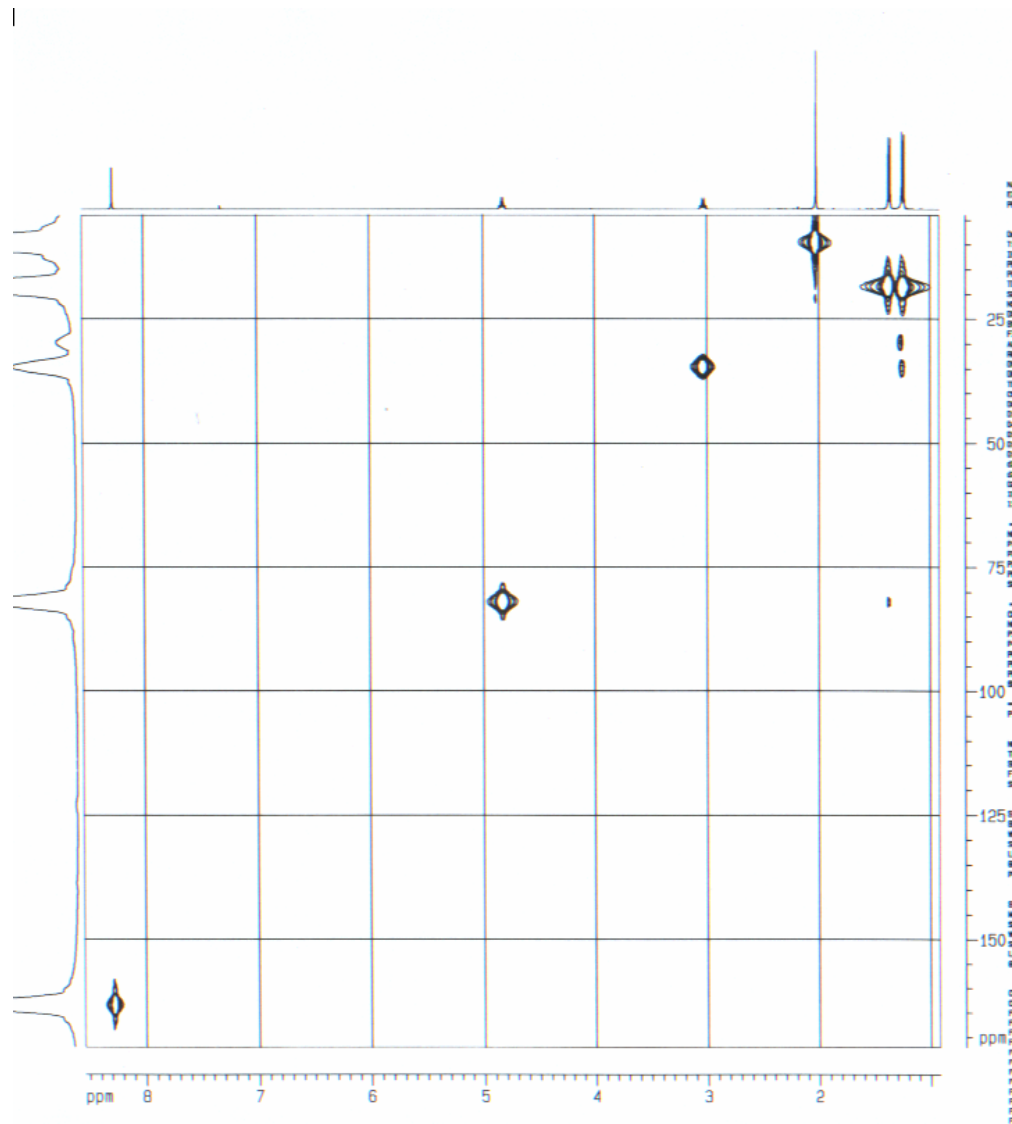


FIGURA 4.59: Experimento de HSQC de S-10

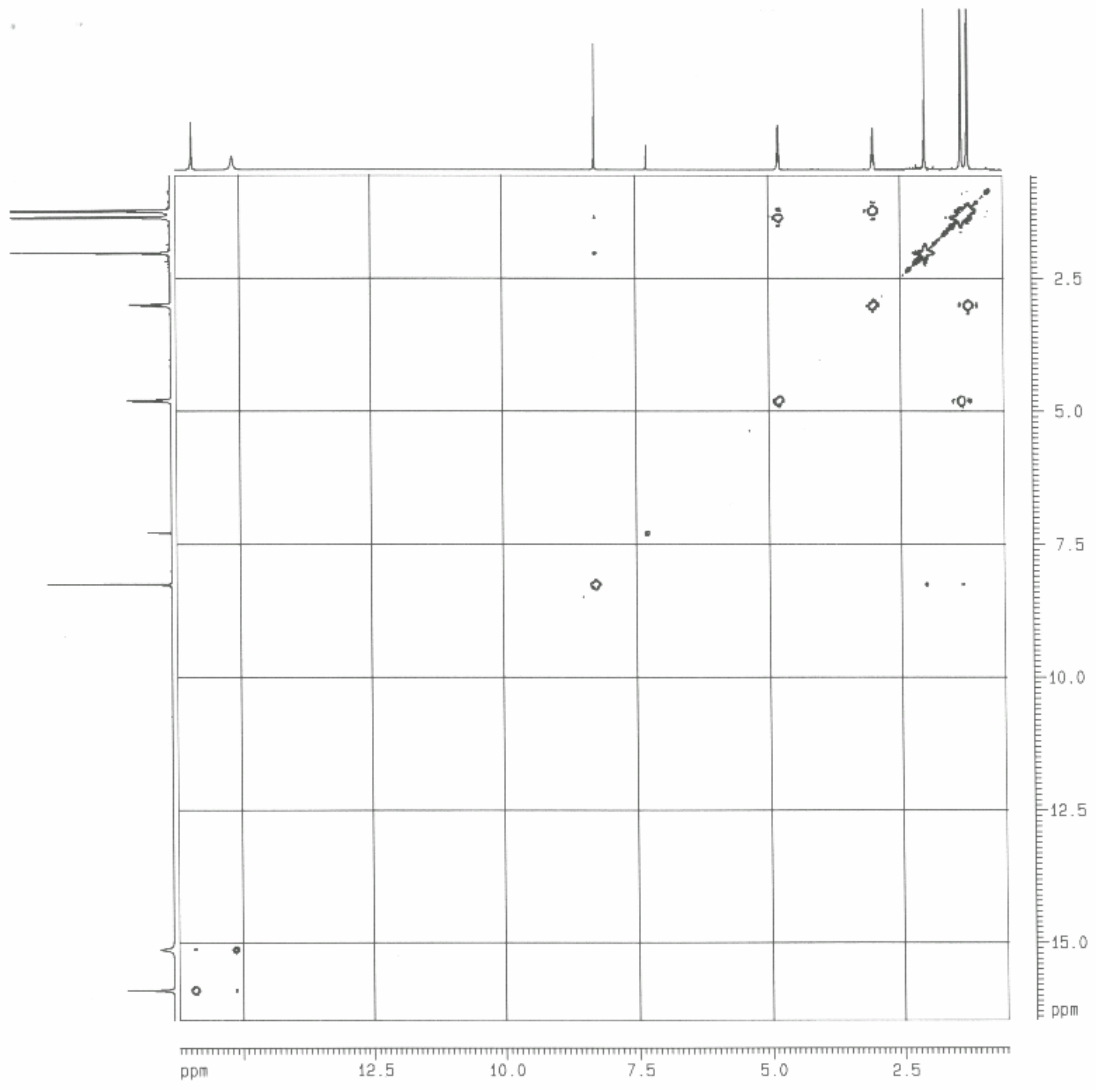


FIGURA 4.60: Experimento de COSY S-10

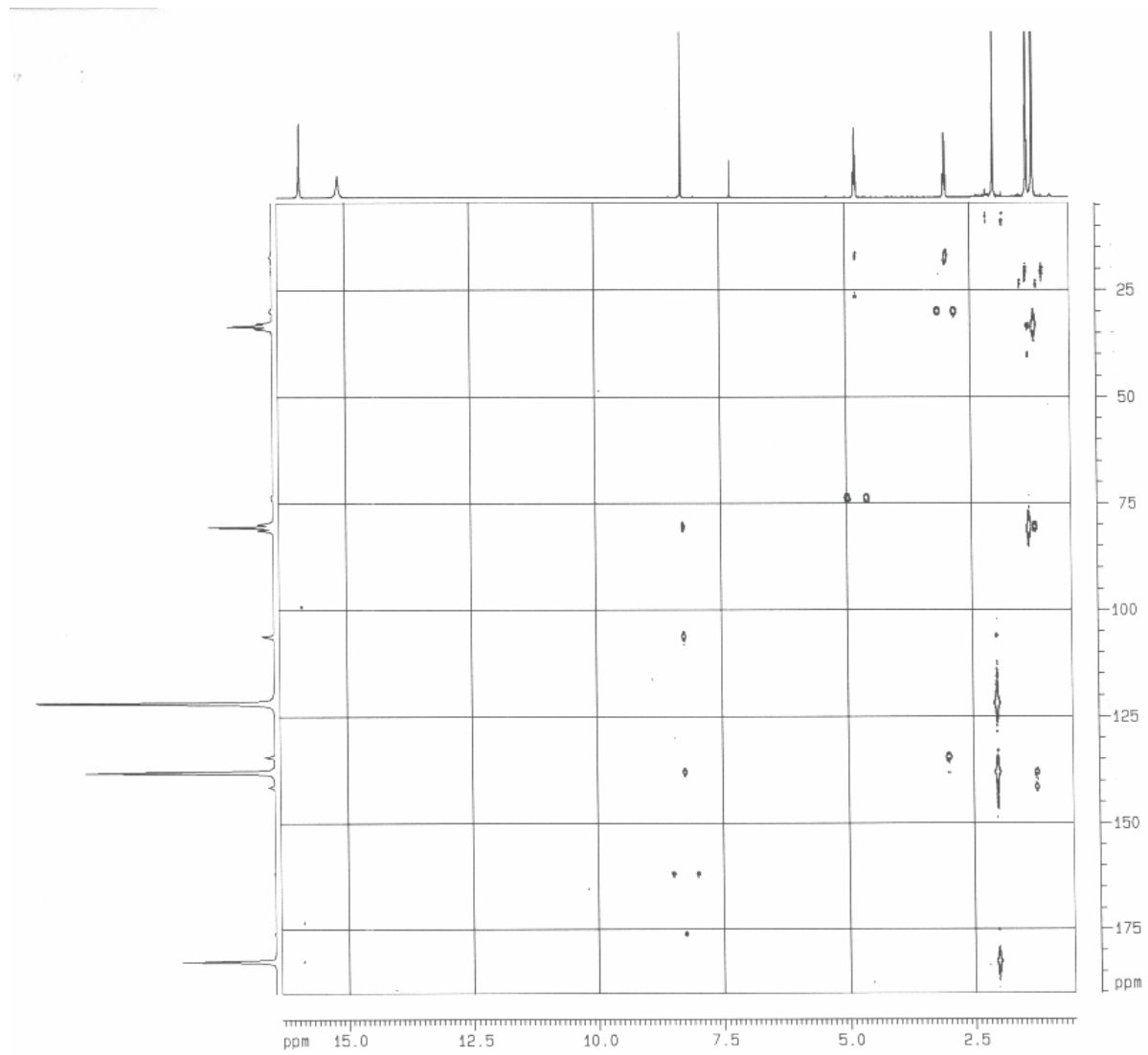
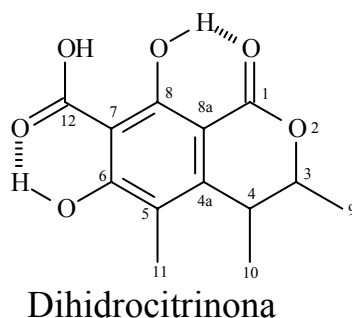


FIGURA 4.61: Experimento de HMBC S-10

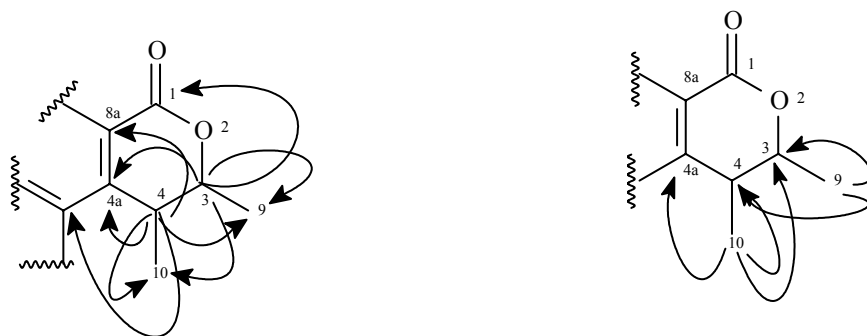
4.2.2.5 - S-11 – Dihidrocitrinona

Essa substância foi isolada como sólido amorfo amarelo através de cromatografia em coluna por via úmida e por cromatografia em camada delgada preparativa e revelava azul intenso a 365 nm na câmara de UV. Seu espectro de RMN ^1H (FIGURA 4.63) mostrou-se muito semelhante ao da citrinina com sinais referentes a dupletos de metila em δ 1,25 (*d*, $J = 7,2$ Hz) e δ 1,33 (*d*, $J = 6,7$), além de um sinal com deslocamento químico semelhante a metila Me-11 da citrinina em δ 2,06. Observaram-se ainda sinais quartetos parecidos aos de **S-10** em δ 3,04 (*q*, $J = 7,1$ Hz) e δ 4,73 (*q*, $J = 6,6$ Hz), com isso, sabia-se que **S-11** era estruturalmente semelhante a citrinina, no entanto, neste não foi observado o sinal referente a H-1 da citrinina (δ 8,25) e os sinais referentes aos hidrogênios quelados diferenciavam aos de **S-10**, sendo um em δ 14,3 e o outro em δ 17,8.

O espectro de RMN ^{13}C (FIGURA 4.64) de **S-11** mostrou muito semelhante ao espectro de RMN ^{13}C obtido para a citrinina, onde observou-se um maior valor de deslocamento químico para o sinal referente a C-1 ($\Delta +\delta$ 3,9) δ 166,8 e notou-se ainda a ausência do sinal referente a carbonila C-6 (δ 183,6). Realizou-se então um espectro de massas ESI (-) onde observou-se um m/z 265 [M-H] (FIGURA 4.65), que juntamente com os dados de RMN ^1H e ^{13}C possibilitou determinar a fórmula molecular de **S-11** como sendo $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{O}_6$. Através dos experimentos de RMN 2D foi possível determinar a estrutura de **S-11**.

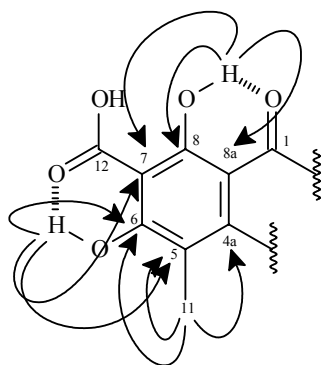


No experimento de HSQC (FIGURA 4.66) podemos ver o sinal em δ 1,33 (Me-9) está correlacionando com o carbono localizado em δ 19,0. No experimento de HMBC (FIGURA 4.67) Me-9 correlaciona com o sinal dos carbonos em δ 34,9 (C-4) e δ 81,4 (C-3). Podemos ver no HSQC que o sinal em δ 4,73 (H-3) correlaciona com o carbono carbinólico δ 81,4. No HMBC H-4 mostra correlações com os carbonos em δ 19,0 (C-9 e C-10), δ 143,3 atribuído ao carbono sp^2 C-4a e com o sinal em δ 166,8, que foi atribuído ao C-1 e devido ao seu valor de deslocamento químico e este não está ligado a nenhum átomo de hidrogênio, conforme foi visto no HSQC, foi proposto uma carbonila de lactona em C-1. A metila Me-10 δ 1,25 mostrou correlações no espectro de HMBC com os carbonos δ 34,9 (C-4), δ 81,4 (C-3) e com δ 143,3 (C-4a). Viu-se ainda no HSQC a correlação de δ 3,04 (H-4) com o carbono δ 34,9, mostrando que estes estão ligados. No espectro de HMBC H-4 apresentou correlações com o sinal δ 19,0 (Me-9 e Me-10), com o carbono C-4a, com um sinal em δ 93,6 que foi atribuído ao C-8a, e com δ 112,9 atribuído a C-5. Estas correlações são mostradas a seguir.



Continuando a determinação estrutural de **S-11**, podemos ver no experimento de HSQC a correlação de δ 2,06 (Me-11) com o sinal do carbono em δ 9,3. No experimento de HMBC Me-11 apresentou correlações com os carbonos δ 143,3 (C-4a), 112,9 (C-5) e com o sinal em δ 171,4 que foi atribuído ao carbono C-6. No experimento de HMBC podemos ver ainda a correlação do sinal em δ 14,28 referente a hidroxila quelada por ligação de hidrogênio (OH-6)

com os carbonos C-6, C-5 e com δ 101,1 (C-7). A outra hidroxila δ 17,81 (OH-8) apresenta correlações com δ 101,1, confirmando esta atribuição a C-7, com δ 93,6 (C-8a) e com δ 174,2 atribuído a C-8. Estas correlações são mostradas a seguir.



A estrutura proposta para **S-11** pode ser confirmada com o auxílio das fragmentações proposta através do seu espectro de massas de íons filhos de 265 (FIGURA 4.62 e 4.68). Os dados de RMN de **S-11** estão dispostos na TABELA 4.11. A proposta biogenética para a dihidrocitrinona encontra-se no Anexo 02 (p. 312).

TABELA 4.11: Dados de RMN ^1H e ^{13}C de **S-11** (CDCl_3 , 400 MHz)

S-11		
	H (δ, <i>mult.</i>, <i>J</i> em Hz)	C
1		166,8
3	4,73 (<i>q</i> , 6,6)	81,4
4	3,04 (<i>q</i> , 7,1)	34,9
4a		143,3
5		112,9
6		171,4
7		101,1
8		174,2
8a		93,6
9	1,33 (<i>d</i> , 6,7)	19,0
10	1,25 (<i>d</i> , 7,2)	19,0
11	2,06 (<i>s</i>)	9,3
12		175,4
OH-6	14,28 (<i>s</i>)	
OH-8	17,81 (<i>s</i>)	

m

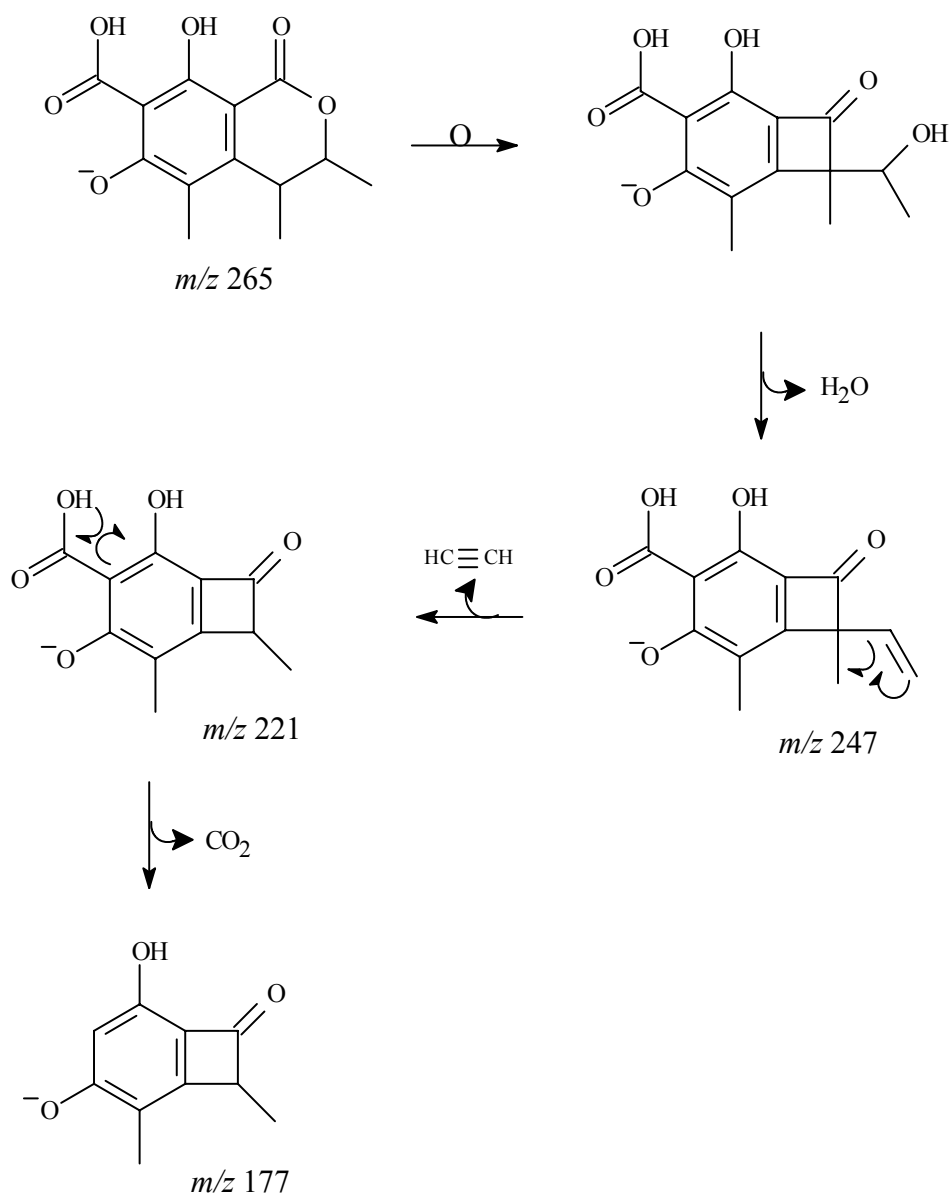


FIGURA 4.62: Propostas de fragmentação para S-11 (ESI (-) íons filhos de m/z 265).

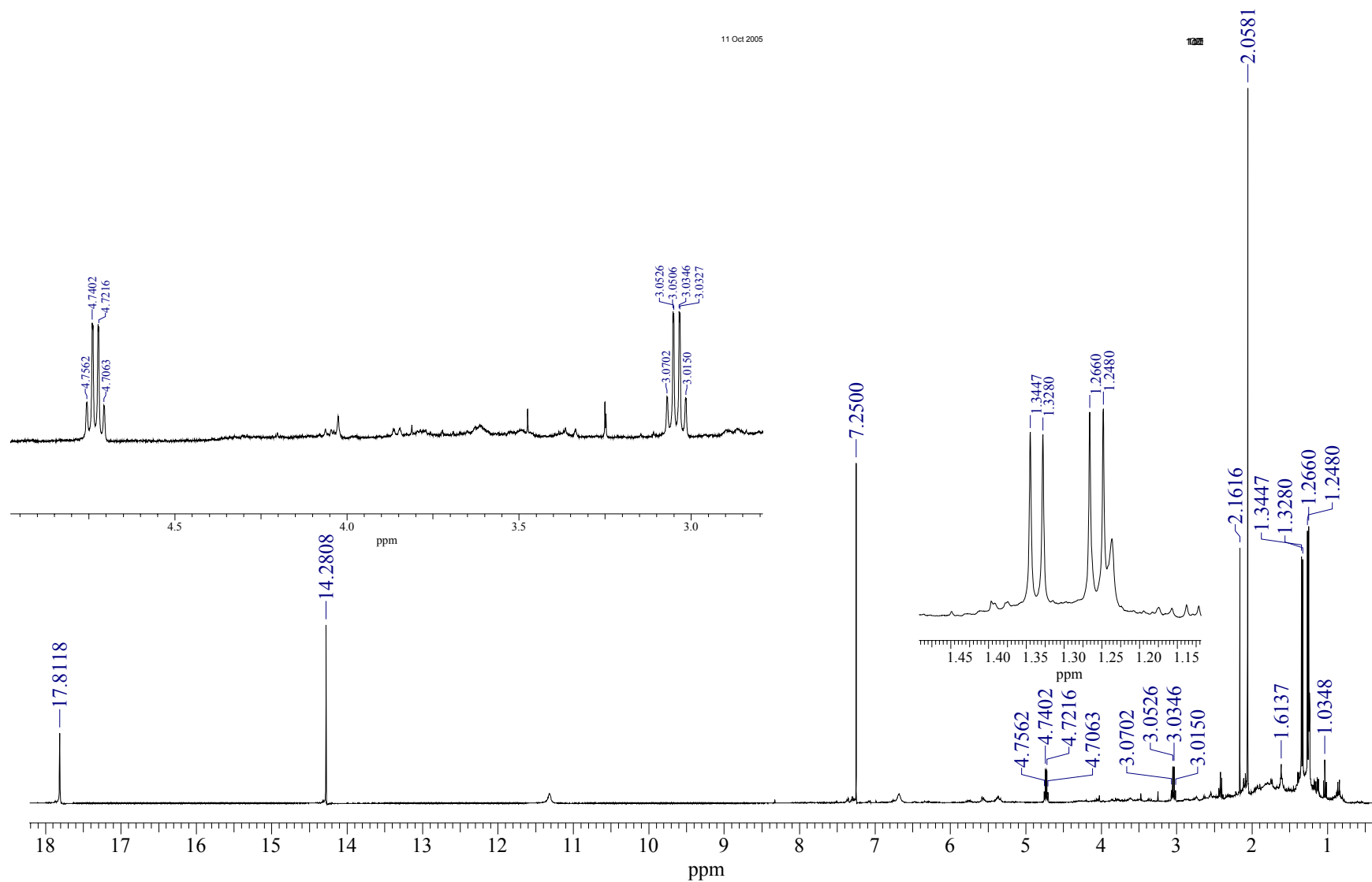


FIGURA 4.63: Espectro de RMN ^1H de S-11 (CDCl_3 , 400 MHz)

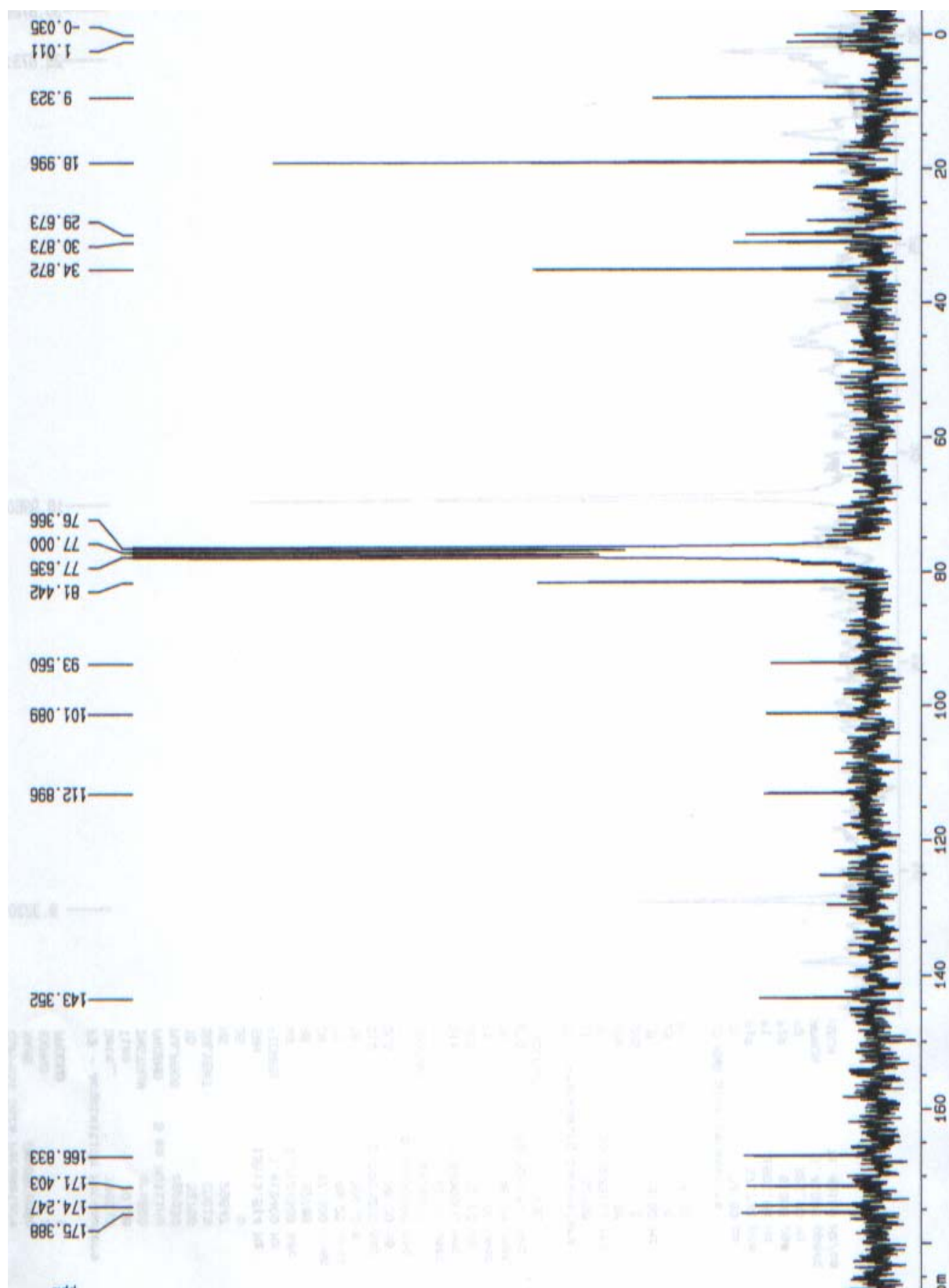


FIGURA 4.64: Espectro de RMN ^{13}C obtido para S-11 (CDCl_3 , 50 MHz)

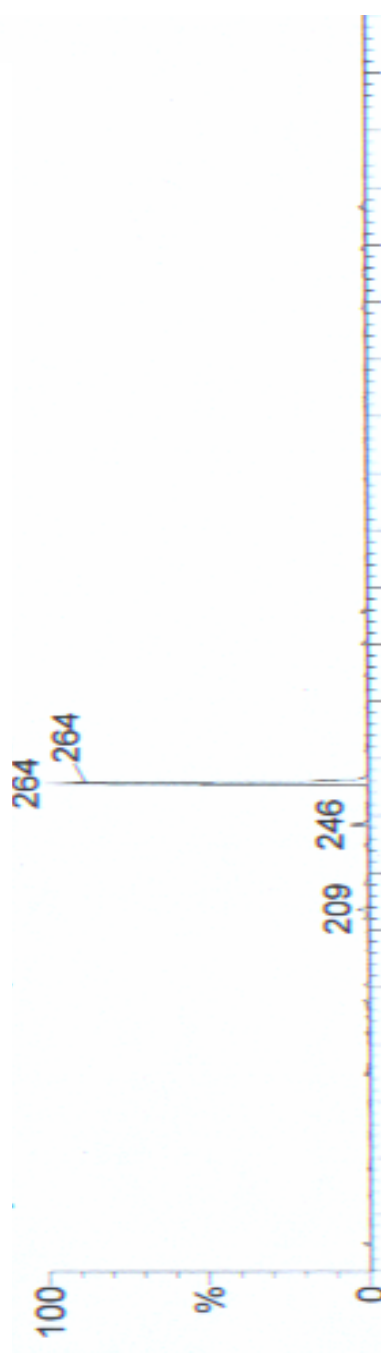


FIGURA 4.65: Espectro de massas (*ful scan*) ESI (-) de S-11

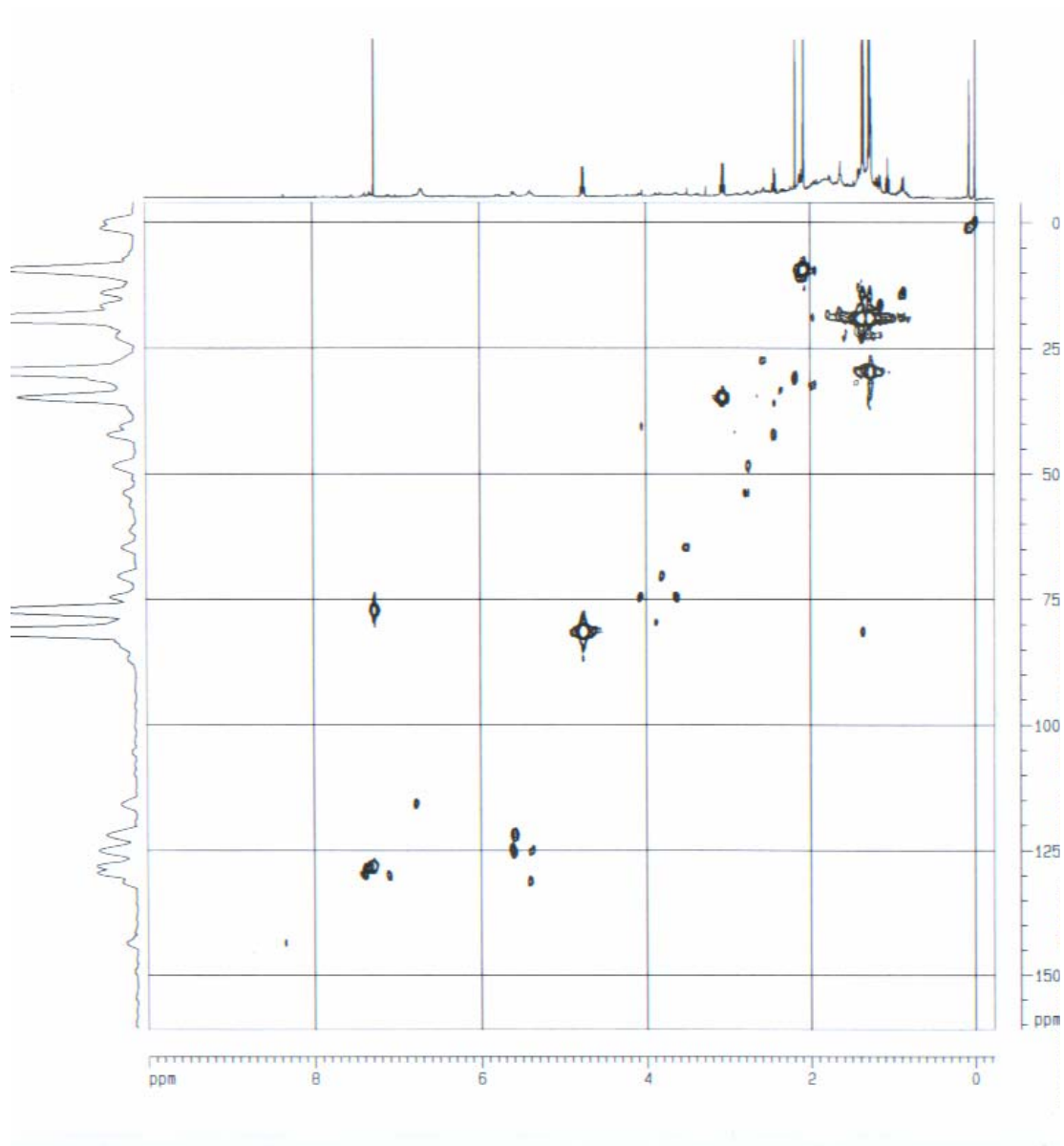


FIGURA 4.66: Experimento de HSQC de S-11

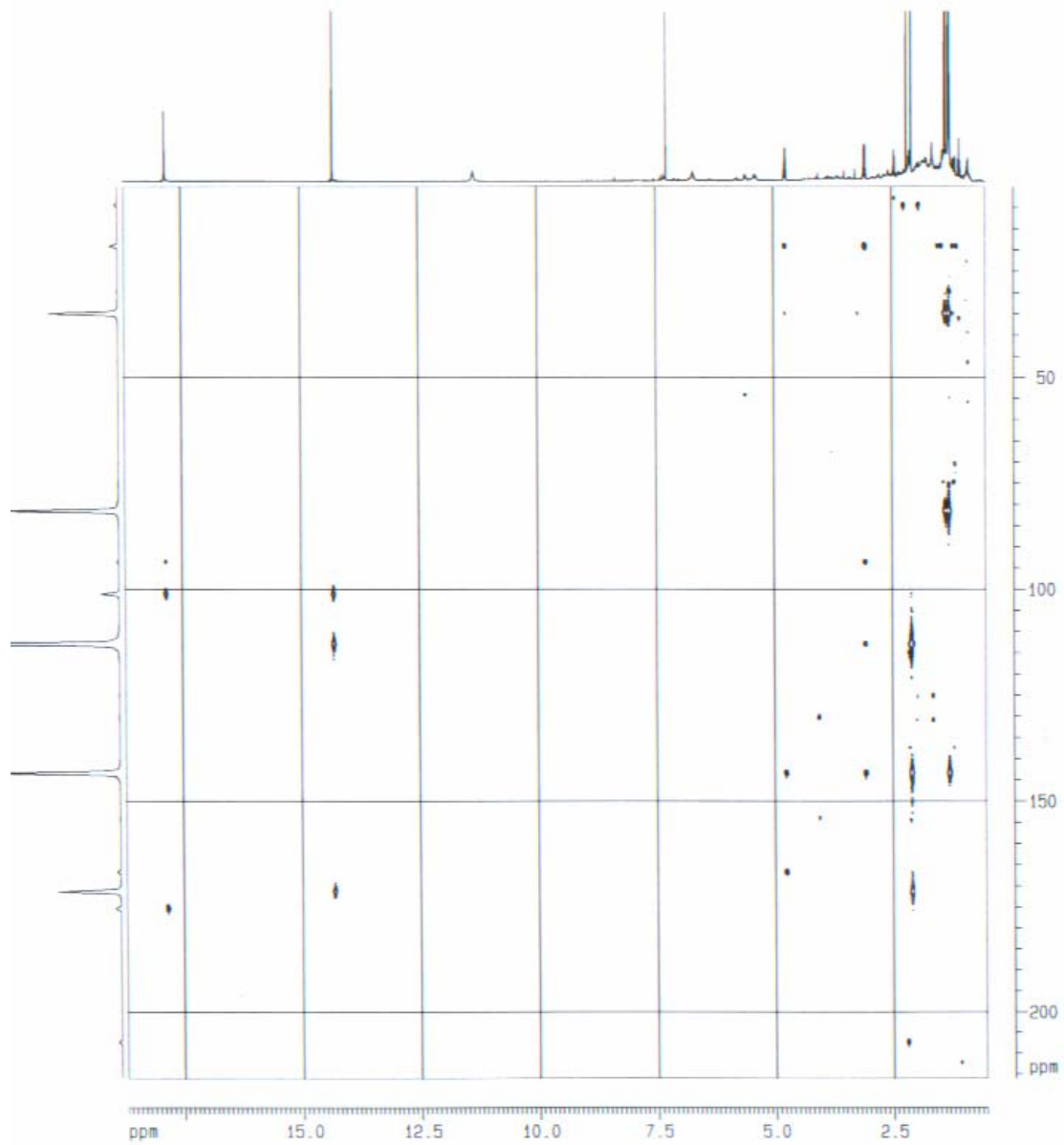


FIGURA 4.67: Experimento de HMBC de S-11

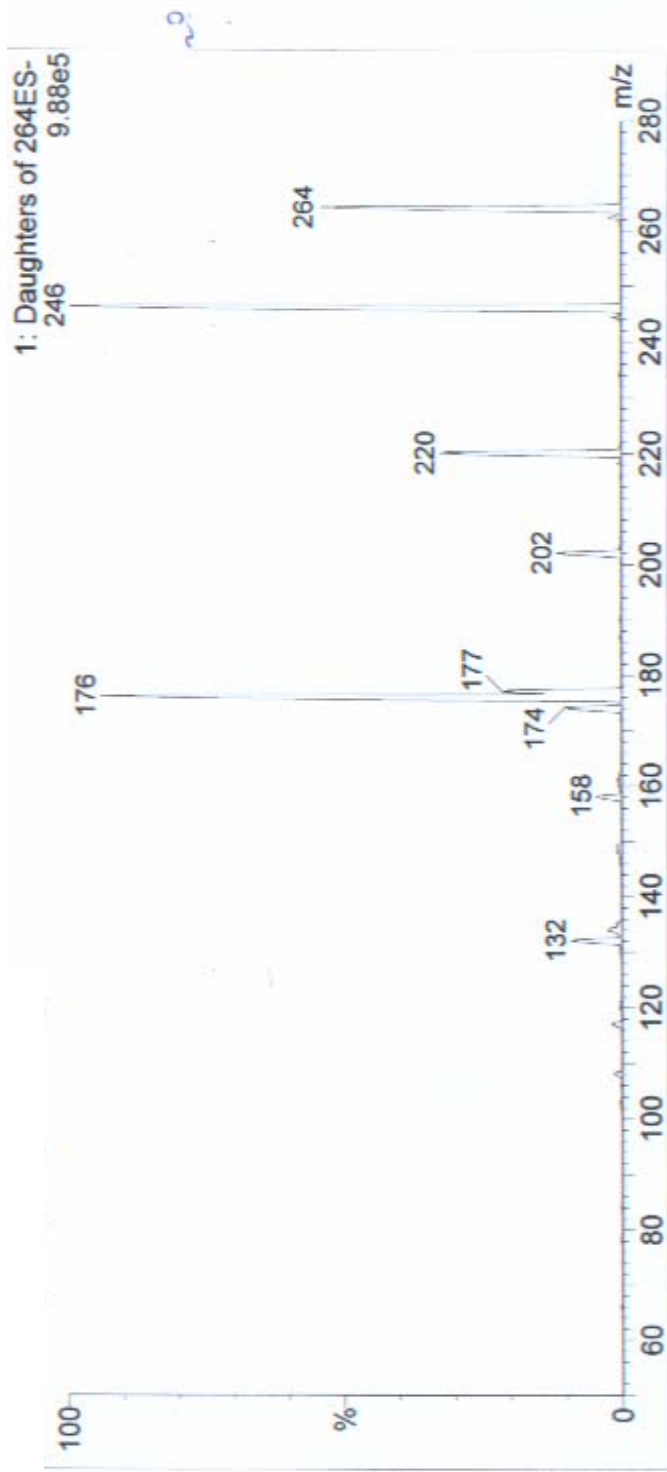


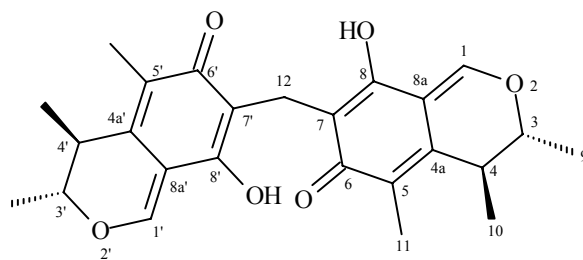
FIGURA 4.68: espectro de massas de íons filhos de m/z 265

4.2.2.6 - S-12 – Citrinina – D

Este composto foi obtido das frações de média polaridade através de técnicas de cromatografia em coluna por via úmida na forma de um sólido amarelo. Seu espectro de RMN ^1H (FIGURA 4.71) mostrou semelhança ao espectro da substância **S-10** (citrinina), com sinais nas regiões de δ 2,84 (*quint*, $J = 7,0$ Hz), δ 4,56 (*q*, $J = 6,7$ Hz) e um sinal singlete em δ 7,88. No entanto, na região das metilas é que se encontravam as principais diferenças. No espectro da citrinina são observados apenas dois sinais dubletos de metila, já no espectro de **S-12** observa-se quatro sinais referentes a dubletos de metila em δ 1,12 (*d*, $J = 7,2$ Hz), δ 1,17 (*d*, $J = 7,4$ Hz), δ 1,21 (*d*, $J = 7,0$ Hz) e δ 1,29 (*d*, $J = 6,7$ Hz), além de dois sinais singlete em δ 1,95 (*s*) e δ 1,97 (*s*) são observados ainda dois sinais em δ 3,49 (*d*, $J = 15,3$ Hz) e δ 3,58 (*d*, $J = 15,3$). Essas informações sugerem que **S-12** é estruturalmente semelhante a citrinina.

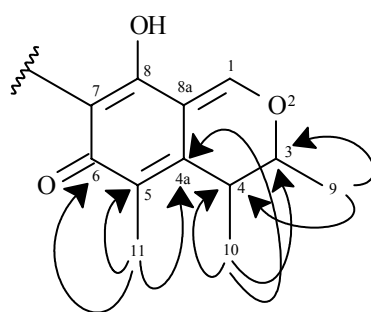
O espectro de RMN ^{13}C (FIGURA 4.72) mostrou-se muito parecido ao espectro da citrinina, mas ao se expandir as regiões do espectro notou-se que todos os sinais estavam duplicados, assim, contou-se 25 sinais de carbono. O espectro de massas APcI (-) (FIGURA 4.73) apresentou um m/z 424 [M^-] e o espectro de absorção na região do infravermelho (FIGURA 4.74) apresentou as bandas 3448 cm^{-1} e 1638 cm^{-1} indicando a existência de grupos hidroxila e carbonila no composto. Através dessas informações foi possível propor que **S-12** viesse a ser um dímero da citrinina e possuir a fórmula molecular $\text{C}_{25}\text{H}_{28}\text{O}_6$.

Através da análise dos dados de RMN 2D foi possível determinar a estrutura de **S-12** e esta foi constatada como um produto natural novo e nomeado de citrinina-D.



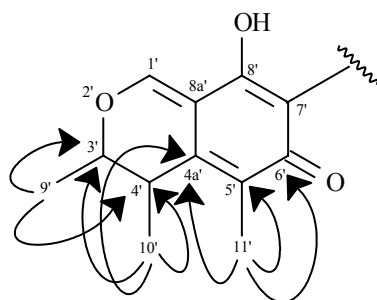
Citrinina-D

No experimento de HSQC (FIGURA 4.75) observou-se a correlação de δ 1,12 (Me-10) com sinal do carbono δ 18,6. No experimento de HMBC (FIGURA 4.76) Me-9 apresentou correlações com os carbonos δ 34,7 (C-4), δ 80,3 (C-3) e com δ 136,0 atribuído a C-4a. O sinal δ 1,21 correlacionou no espectro de HSQC com δ 18,2 e foi atribuído a Me-9, esta apresentou no espectro de HMBC correlações com os sinais dos carbonos δ 80,3 (C-3) e δ 34,7 (C-4). O sinal em δ 1,95 (Me-11) correlaciona no HSQC com o sinal do carbono em δ 10,1, podemos ver no experimento de HMBC para Me-11 correlações com os sinais dos carbonos C-4a, δ 125,7 (C-5) e com o sinal da carbonila atribuído a carbonila C-6 δ 187,3. Estas correlações são mostradas a seguir.

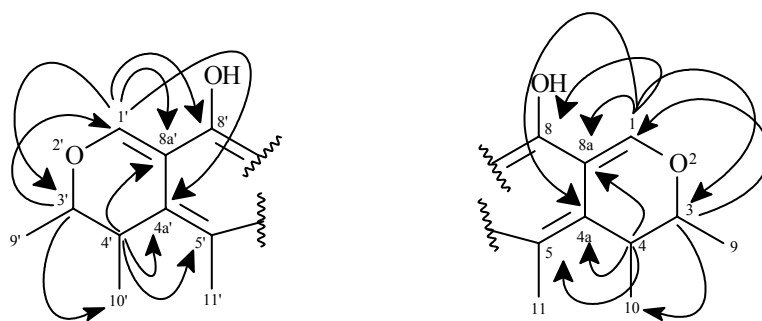


Observou-se no experimento de HSQC a correlação entre os sinais δ 1,29 (Me-9a') e δ 18,0. O experimento de HMBC Me-9a' correlaciona com os sinais dos carbonos δ 34,6 (C-4') e δ 80,2 (C-3'). Para a metila Me-10' foram atribuídos os valores δ 1,17 e δ 18,7 através de suas correlações no HSQC. Me-10' mostra correlações no HMBC com C-4', C-3' e com o sinal em δ 135,6 que

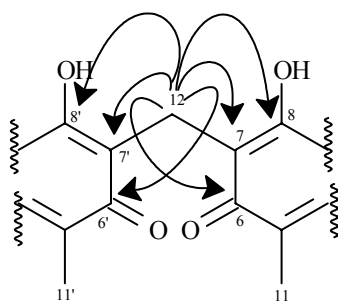
foi atribuído a C-4a'. Confirmando a atribuição feita a C-4a' observou-se no experimento de HMBC a correlação deste com Me-11' (δ 1,97 e δ 10,0, correlações observadas no HSQC). Me-11' correlacionou ainda com os sinais em δ 125,5 (C-5') e δ 187,3 atribuído a carbonila C-6'. Vejas as correlações abaixo.



Os sinais dos hidrogênios H-3 com H-3', H-4 com H-4', e H-1 com H-1' são equivalentes e apresentam o mesmo valor de deslocamento químico no espectro de RMN ^1H , por isso serão apresentadas as correlações de ambos hidrogênios com seus respectivos carbonos. No experimento de HSQC foi observada a correlação entre o sinal δ 4,56 (H-3 e H-3') com os sinais dos carbonos δ 80,3 e δ 80,2. No experimento de HMBC foi visto para H-3 e H-3' correlação com δ 18,6 e δ 18,7 (Me-10 e Me-10') e com δ 157,1 e δ 156,7 (C-1 e C-1'). O sinal em δ 2,84 (H-4 e H-4') está correlacionando com os sinais dos carbonos δ 34,7 e δ 34,6 segundo o espectro de HSQC. H-4 e H-4' mostraram correlações no HMBC com os sinais dos carbonos δ 136,0 e δ 135,6 (C-4a e C-4a'), com os carbonos em δ 125,7 e δ 125,5 (C-5 e C-5') e observou-se ainda correlações com os sinais δ 107,1 e δ 107,6 atribuído a C-8a e C-8a'. Confirmando estas atribuições podemos ver no HMBC as correlações de H-1 e H-1' (δ 7,88 no RMN ^1H e δ 157,1 e δ 156,7 no RMN ^{13}C) com os sinais δ 107,7 e 107,6 (C-8a e C-8a'), δ 136,0 e 135,6 (C-4a e C-4a'), correlaciona ainda com os sinais dos carbonos carbinólicos δ 80,3 e δ 80,2 (C-3 e C-3'), por fim H-1 e H-1' correlaciona com os sinais δ 163,1 e δ 162,9 atribuído a C-8 e C-8'. Estas correlações são mostradas a seguir.



No experimento de HSQC observou-se ainda que os hidrogênios em δ 3,49 e δ 3,58 (H-12a e H-12b) estavam ligados ao carbono em δ 18,3 através de suas correlações no experimento de HSQC. Por fim no espectro de HMBC observam-se suas correlações com os sinais dos carbonos δ 114,8 e 114,7 (C-7 e C-7'), com δ 163,1 e δ 162,4 (C-8 e C-8') e com as carbonilas C-6 e C-6' em δ 187,7. Estas correlações permitiram fazer a junção das duas partes da molécula determinando, assim, a estrutura de **S-12** como um dímero da citrinina e nomeado de citrinina-D. As correlações de HMBC de H-12 são mostradas a seguir.



As fragmentações obtidas através do espectro de massas de íons filhos de 423 (FIGURA 4.70 e 4.77) mostraram como principal fragmento a separação das duas unidades do monômero e ajudaram a confirmar a estrutura proposta. Os dados de RMN ^1H e ^{13}C de **S-12** encontram-se na TABELA 4.12.

Uma análise mais superficial da estrutura de **S-12** poderia nos levar a imaginar que o hidrogênio H-12 viria a dar um sinal singlete no espectro de RMN ^1H , porém através de uma análise da estrutura espacial de citrinina-D

podemos ver que há formação de ligações de hidrogênios entres as hidroxilas OH-8 e OH-8' com as carbonila C-6 e C-6', levando a formação de um sistema, de certa forma rígida, como se fosse um anel, que gera diferença entre os hidrogênios H-12a e H-12b levando os dois a acoplarem entre si (a conformação espacial de **S-12** é mostrada na FIGURA 4.69). A proposta biogenética para a citrinina-D encontra-se no Anexo 02 (p. 312).

TABELA 4.12: Dados de RMN ^1H e ^{13}C de **S-12** (CDCl_3 , 200 MHz)

S-12		
	H (δ, <i>mult.</i>, <i>J</i> em Hz)	C
1		157,1
3	4,56 (<i>q</i> , 6,7)	80,3
4	2,84 (<i>quint</i> , 7,0)	34,7
4a		136,0
5		125,7
6		187,3
7		114,8
8		163,1
8a		107,7
9	1,21 (<i>d</i> , 7,0)	18,2
10	1,12 (<i>d</i> , 7,2)	18,6
11	1,95 (<i>s</i>)	10,1
12a	3,49 (<i>d</i> , 15,3)	18,3
12b	3,58 (<i>d</i> , 15,3)	-
1'		156,7
3'	4,56 (<i>q</i> , 6,7)	80,2
4'	2,84 (<i>quint</i> , 7,0)	34,6
4a'		135,6
5'		125,5
6'		187,3
7'		114,7
8'		162,9
8a'		107,6
9'	1,29 (<i>d</i> , 6,7)	18,0
10'	1,17 (<i>d</i> , 7,4)	18,7
11'	1,97 (<i>s</i>)	10,0

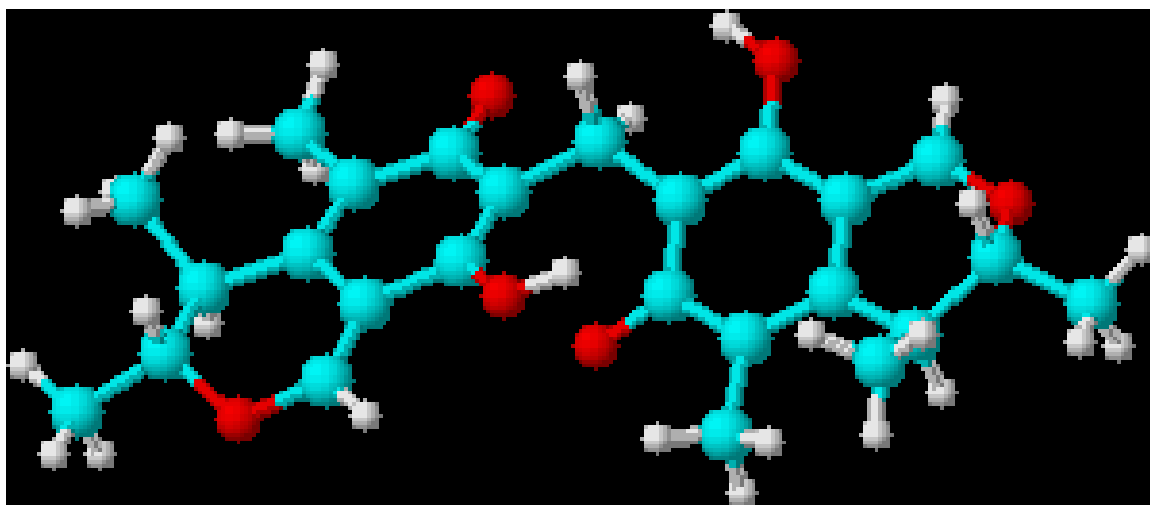


FIGURA 4.69: conformação espacial de S-12

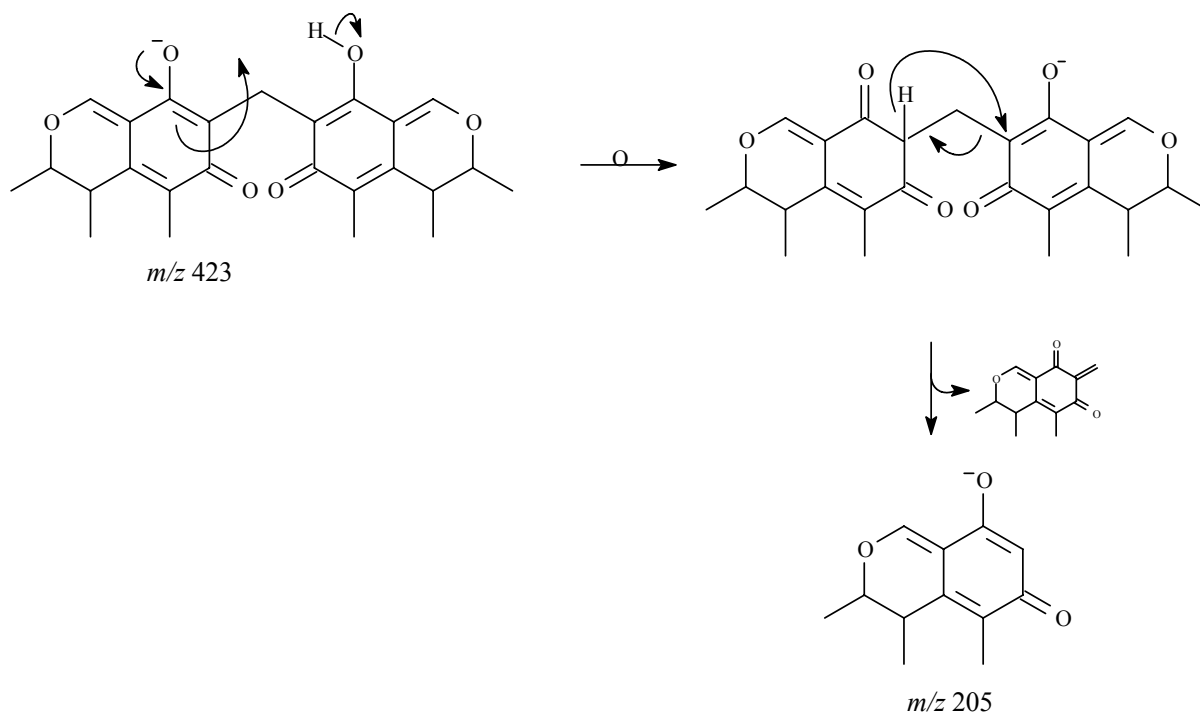


FIGURA 4.70: propostas de fragmentação para S-12 (APCl (-) íons filhos de m/z 423).

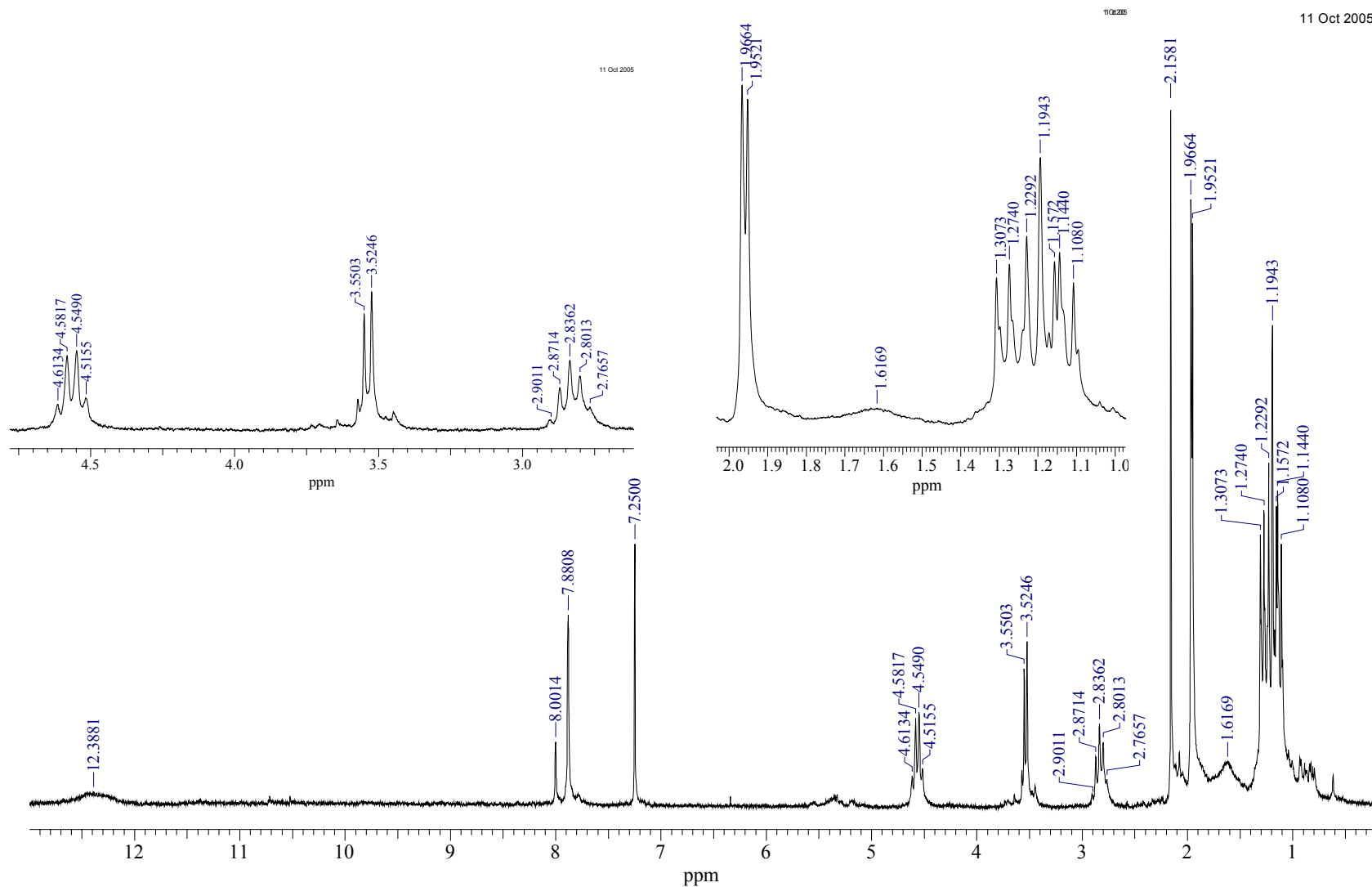


FIGURA 4.71: Espectro de RMN ^1H de S-12 (CDCl_3 , 200 MHz)

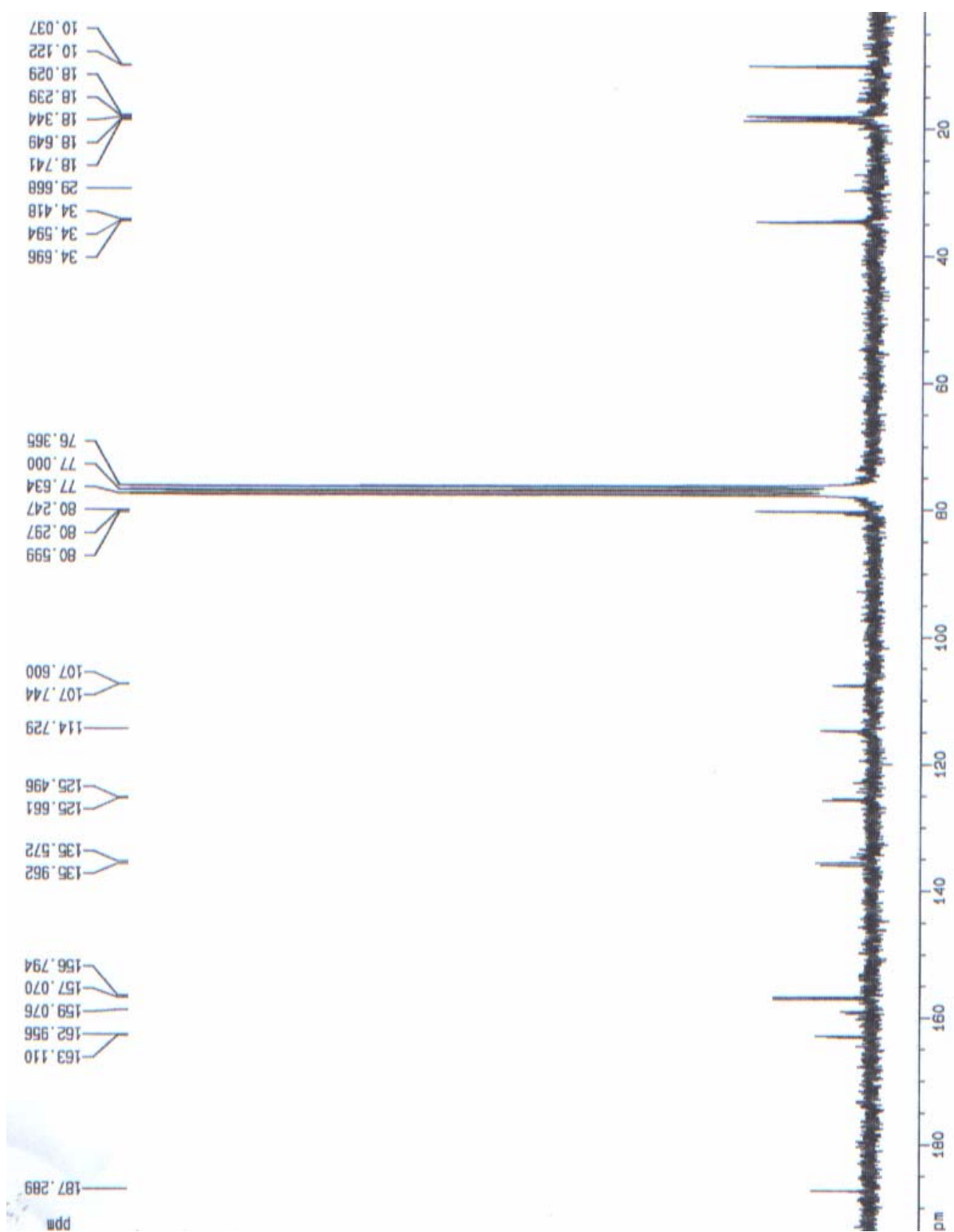


FIGURA 4.72: espectro de RMN ¹³C obtido para S-12 (CDCl₃, 50 MHz)

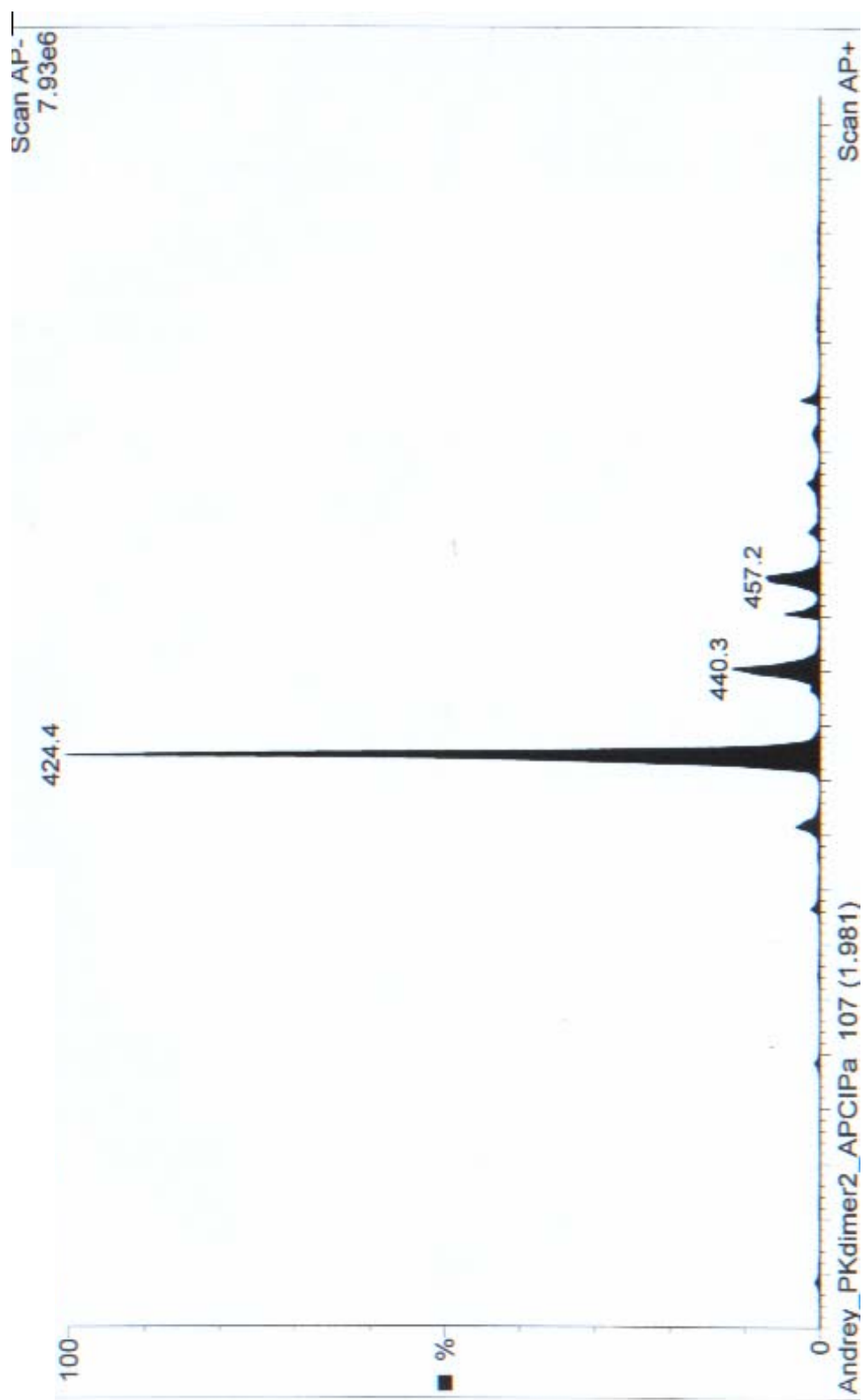


FIGURA 4.73: espectro de massas (*full scan*) de S-12

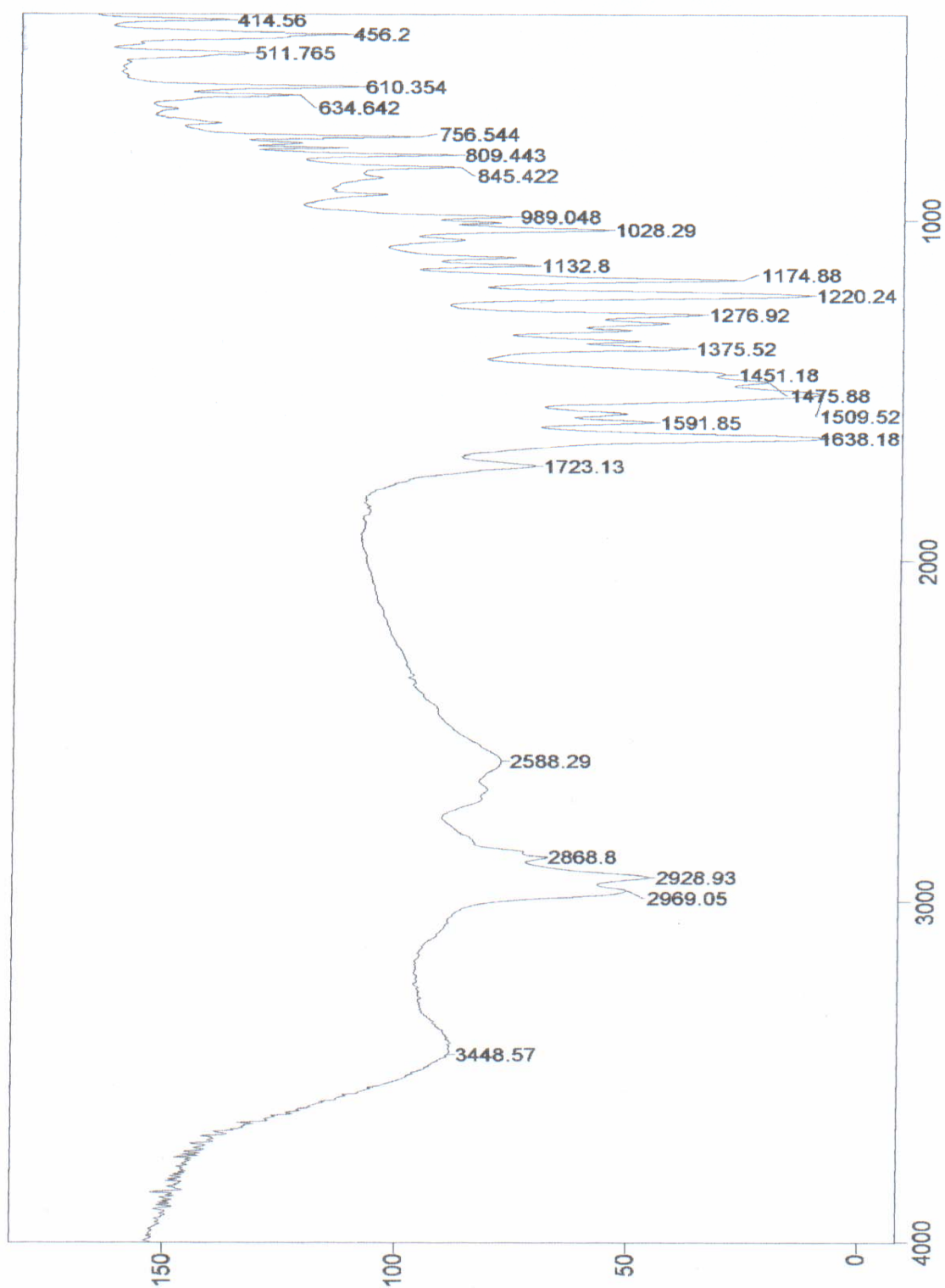


FIGURA 4.74: espectro de absorção no infravermelho de S-12 (KBr)

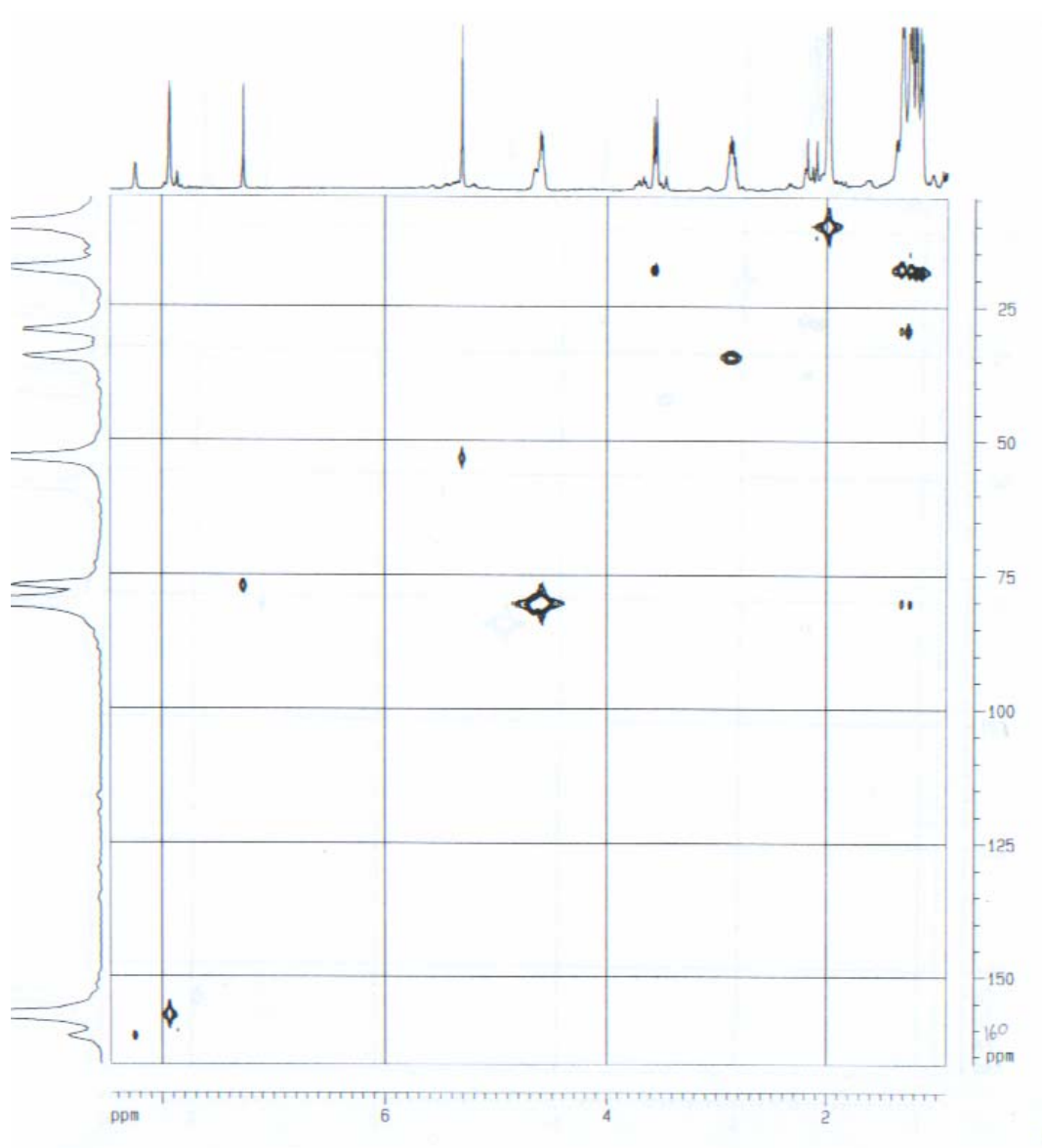


FIGURA 4.75: Experimento de HSQC de S-12

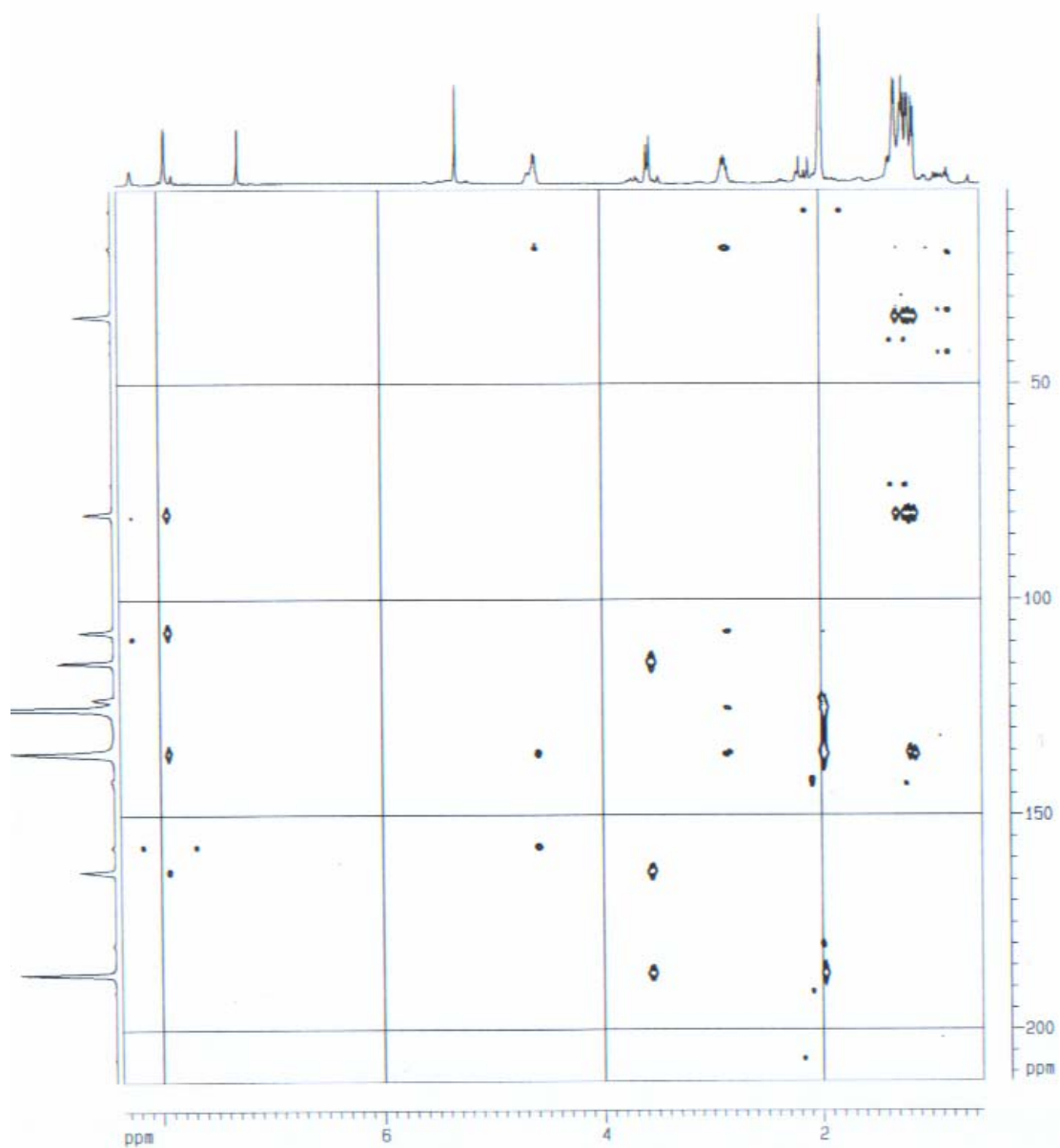


FIGURA 4.76: Experimento de HMBC de S-12

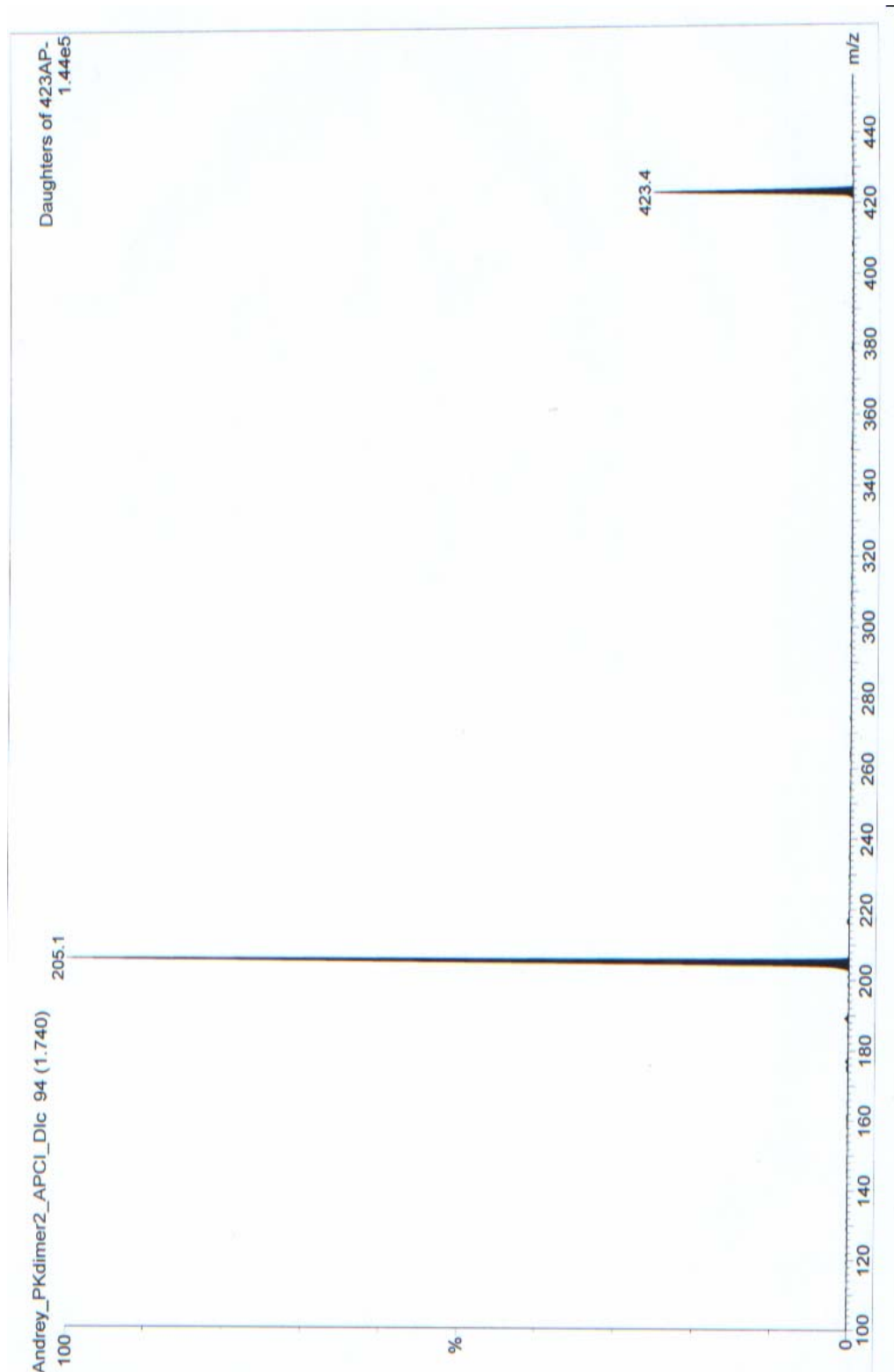


FIGURA 4.77: espectro de massas de íons filhos de m/z 423 (20 eV)

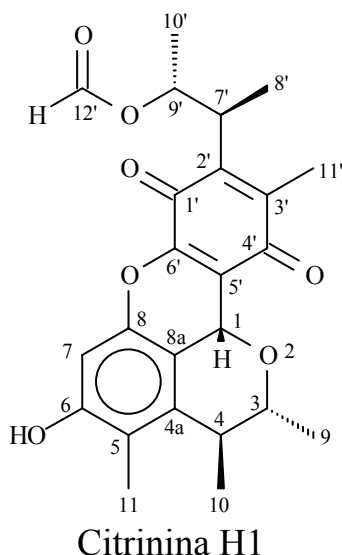
4.2.2.7 - S-13 – Citrinina H1

A substância **S-13** foi isolada das frações de média polaridade dos extratos de *Penicillium herquei* através de técnicas clássicas de cromatografia como um sólido vermelho. Seu espectro de RMN ^1H (FIGURA 4.79) apresentou alguma semelhança com o espectro da citrinina, porém mostrou ser mais parecido ao espectro de RMN ^1H de **S-12**. No espectro foram observados quatro sinais referentes a dubletos de metila (como no espectro de **S-12**) em δ 1,23 (*d*, $J = 6,3$ Hz), δ 1,30 (*d*, $J = 7,2$ Hz), δ 1,31 (*d*, $J = 6,9$ Hz) e δ 1,37 (*d*, $J = 6,2$ Hz). Também, como no espectro de citrinina-D, foram observados dois sinais singletos em δ 2,11 e δ 2,14. Além dos sinais referentes as metilas observaram-se ainda os sinais δ 2,94 (*dq*, $J = 7,3$ e $4,5$ Hz), δ 3,19 (*dq*, $J = 10,1$ e $7,2$ Hz), δ 4,00 (*dq*, $J = 6,3$ e $4,5$ Hz), δ 5,25 (*s*), δ 5,45 (*dq*, $J = 10,1$ e $6,2$ Hz), δ 6,59 (*s*) e δ 7,94 (*s*). O padrão espectral de **S-13** é muito semelhante ao de **S-12** e nos levou a sugerir que esta viesse a ser também um dímero da citrinina.

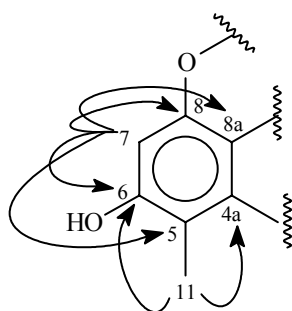
O espectro de RMN ^{13}C (FIGURA 4.80) apresentou sinais para 24 carbonos e apresentou alguns sinais com valores de deslocamento químico semelhantes aos da citrinina como δ 80,5 (C-3 da citrinina), δ 162,9 (valor próximo ao de C-1 da citrinina) e δ 185,7 (semelhante a carbonila C-6 da citrinina), no entanto não apresentou os sinais de carbono duplicados como em **S-13** indicando que **S-13** teria dimerizado por outro ponto da molécula.

Foi realizado, então, um espectro de massas APcI (-) (FIGURA 4.81) onde neste foi observado um m/z 424 $[\text{M-H}]^-$, este valor de m/z mostrou que **S-13** é duas unidades de massa maior que **S-12**. No espectro de absorção no infravermelho (FIGURA 4.82) foram observadas as bandas 3404 cm^{-1} mostrando a existência de hidroxila no composto e 1716 cm^{-1} e 1653 cm^{-1} mostrando que a substância possuía duas carbonilas diferentes.

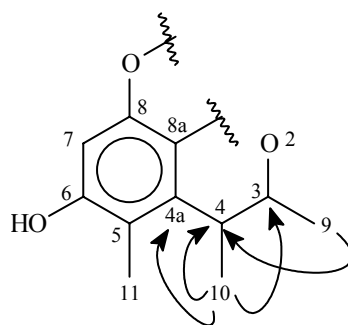
Foram obtidos os espectros de RMN 2D de **S-13**, onde após exaustivos estudos de suas correlações permitiram determinar a estrutura do composto como sendo o poliketídeo citrinina H1, um dímero da citrinina.



No experimento de HSQC (FIGURA 4.83) podemos a correlação do sinal na região de aromáticos δ 6,59 (s) (H-7) com o carbono δ 100,5, confirmando que este trata-se de um hidrogênio ligado a anel aromático. No experimento de HMBC (FIGURA 4.84) este sinal correlaciona com os carbonos δ 145,7 (C-8), δ 157,0 (C-6), δ 120,9 (C-5) e δ 111,9 (C-8a), todas essas correlações de H-7 indicam que a molécula tem um sistema aromático ligado a átomos de oxigênio. O sinal da metila em δ 2,14 (Me-11) correlaciona com o carbono δ 10,8 no experimento de HSQC. Na metila Me-11 correlaciona no HMBC com os sinais dos carbonos δ 157,0 (C-6), δ 141,4 atribuído ao carbono C-4a, e apresenta uma correlação fraca com 120,9 (C-5), estas correlações confirmam que Me-11 esta ligada ao anel aromático. Estas correlações são mostradas a seguir.

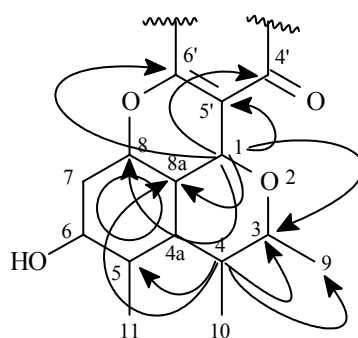


Continuando as correlações observadas para as metilas, podemos ver no experimento de HSQC que o sinal em δ 1,30 (Me-10) está correlacionando com o carbono localizado em δ 21,4. Me-10 apresenta no experimento de HMBC correlações com os sinais dos carbonos δ 38,6 (C-4), δ 80,5 (C-3) esta correlação mostra que Me-10 está próxima a um carbono oximetínico, e correlaciona ainda com δ 141,4 (C-4a) mostrando que Me-10 está próxima também ao anel aromático. Ainda no HMBC Me-9 (δ 1,23 e δ 22,9, segundo o experimento de HSQC) correlaciona com δ 38,6 (C-4). Correlações mostradas abaixo.

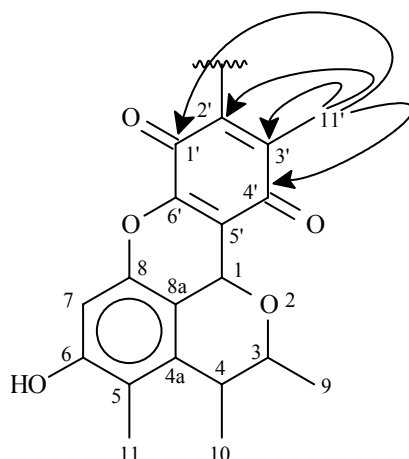


O sinal *duplo quadrupeto* em δ 2,94 (H-4, que está ligado ao carbono em δ 38,6 segundo o experimento de HSQC) correlacionou no experimento de COSY (FIGURA 4.85) com os sinais δ 1,30 (Me-11) e δ 4,00 (H-3), mostrando que ele está vizinho a metila Me-11 e a um dos hidrogênios carbinólicos. No experimento de HMBC H-4 apresentou correlações com os sinais dos carbonos em δ 22,9 (Me-9), δ 80,5 (C-3) e aos carbonos do sistema aromático δ 120,9 (C-5) e 111,9 (C-8a).

O sinal singlete em δ 5,25 (H-1) correlaciona com o carbono em δ 62,2 no experimento de HSQC. No experimento de HMBC podemos observar as correlações com o carbono carbinólico δ 80,5 (C-3) e com o sistema aromático δ 111,9 (C-8a), δ 145,7 (C-8) e δ 141,4 (C-4a), estas correlações permitiram propor um anel de seis membros ligado ao sistema aromático similar ao apresentado pela substância dihidrocitrinona (**S-12**), no entanto, H-1 apresentou ainda correlações com os sinais δ 149,9 (C-6'), δ 185,7 (C-4') e uma correlação fraca (J^2) com 116,1 (C-5'), estas últimas correlações indicaram que a ligação para a formação do dímero **S-13** se deu nos carbonos C-1 e C-8. As correlações que mostram o fechamento do anel e a ligação dos monômeros são mostradas a seguir.

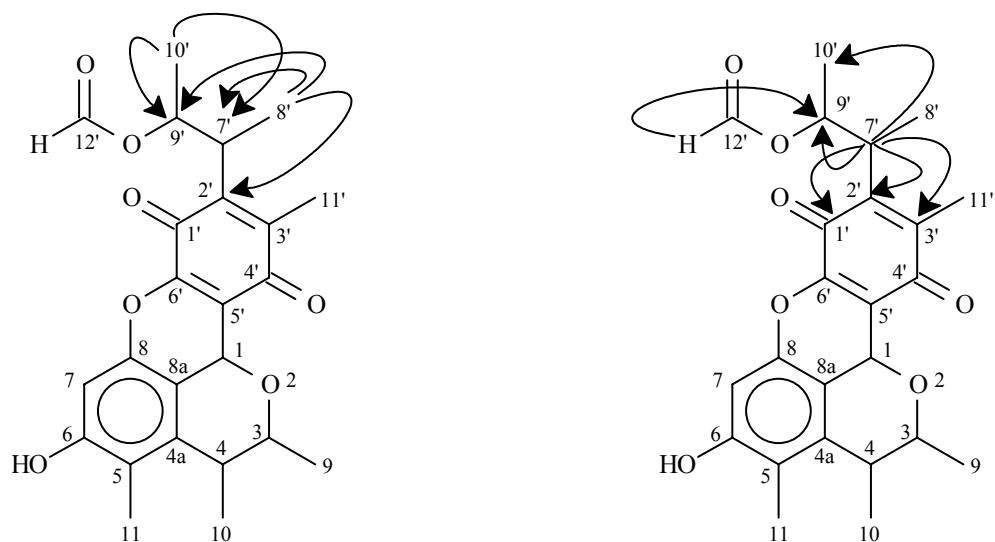


A metila em δ 2,11 (Me-11') está correlacionando no espectro de HSQC com o carbono em δ 12,2. No experimento de HMBC Me-11' correlaciona com o sinal da carbonila δ 185,7 (C-4'), com sinal em δ 143,2 (C-2'), δ 143,9 (C-3') e correlaciona a J^4 com o sinal em δ 180,7 (C-1') atribuído a presença de outra carbonila em **S-13**, estas correlações de Me-11' juntamente com as já apresentadas para H-1 permitiram atribuir a existência de um anel quinona no composto. As correlações para Me-11 são mostradas abaixo.



A metila Me-8' (δ 1,31 e δ 15,6 segundo o experimento de HSQC) está correlacionando no espectro de HMBC com os sinais δ 41,2 (C-7'), a um carbono carbinólico em δ 73,2 (C-9') e com 143,2 (C-2'), esta indicando que Me-8' está próxima ao grupo quinona. A metila Me-10' (δ 1,37 no RMN ^1H e 19,2 no RMN ^{13}C) também apresentou correlações com o carbono carbinólico C-9' e com δ 41,2 (C-7').

O sinal *duplo quadruplo* em δ 3,19 (H-7') apresenta correlações no experimento de HMBC com δ 143,2 (C-2'), δ 143,9 (C-3') com a carbonila δ 180,7 (C-1') e ainda com o carbono carbinólico C-9'. Podemos ver ainda para H-7' correlações no espectro de COSY com Me-8' (δ 1,31) e com o hidrogênio carbinólico δ 5,45 (H-9'), estas correlações mostram que a molécula possui um outro sistema de acoplamentos parecido ao anel B. No entanto o auto valor de deslocamento químico para H-9' (δ 5,45) sugere que este esteja vizinho a um grupo retirador de elétrons. A correlação de δ 7,94 (H-12') no experimento de HSQC com δ 161,3 mostra que este está ligado a um carbono bastante desprotegido, então foi atribuída a existência de um grupo formiato em **S-13**, que através da correlação apresentada no experimento de HMBC de H-12' com o carbono carbinólico δ 73,2 este foi ligado a C-9' o que justifica o auto deslocamento químico apresentado para H-9'. As correlações são mostradas abaixo.



Assim, a estrutura de **S-13** foi determinada como sendo o policetídeo citrinina 1H, um derivado da citrinina. Suas fragmentações foram obtidas através do espectro de massas de íons filhos de 425 (FIGURA 4.78 e 4.86) e ajudaram a confirmar a estrutura proposta. Os dados de RMN ^1H e ^{13}C foram comparados com dados da literatura para esse composto e mostraram boa similaridade tendo apenas poucas variações devido nossos espectros terem sido obtidos em acetona- d_6 e os espectros da literatura em CDCl_3 (TABELA 4.13). A proposta de biossíntese para citrinina H1 encontra-se no Anexo 02 (p. 313).

TABELA 4.13: Dados de RMN ^1H e ^{13}C de **S-13** (acetona- d_6 , 400 MHz)

S-13			Lit [63]	
	H (δ, <i>mult.</i>, <i>J</i> em Hz)	C	H (δ, <i>mult.</i>, <i>J</i> em Hz)	C
1	5,25 (<i>s</i>)	62,2	5,34 (<i>s</i>)	61,5
3	4,00 (<i>dq</i> , 6,3 e 4,5)	80,5	4,13 (<i>dq</i> , 6,2 e 4,8)	79,8
4	2,94 (<i>dq</i> , 7,2 e 4,)	38,6	2,92 (<i>dq</i> , 7,3 e 4,4)	37,9
4^a		141,4		140,4
5		120,9		120,1
6		157,0		155,0
7	6,59 (<i>s</i>)	100,5	6,57 (<i>s</i>)	100,6
8		145,7		145,0
8^a		111,9		111,4
9	1,23 (<i>d</i> , 6,3)	22,9	1,32 (<i>d</i> , 6,2)	21,2
10	1,30 (<i>d</i> , 7,2)	21,4	1,31 (<i>d</i> , 7,3)	22,7
11	2,14 (<i>s</i>)	10,8	2,16 (<i>s</i>)	10,6
1[']		180,7		180,2
2[']		143,2		142,4
3[']		143,9		143,9
4[']		185,7		185,5
5[']		116,1		115,1
6[']		149,9		149,3
7[']	3,19 (<i>dq</i> , 10,1 e 7,1)	41,2	3,10 (<i>dq</i> , 9,9 e 7,3)	40,4
8[']	1,31 (<i>d</i> , 6,9)	15,6	1,30 (<i>d</i> , 7,3)	15,5
9[']	5,45 (<i>dq</i> , 10,1 e 6,2)	73,2	5,49 (<i>dq</i> , 8,1 e 5,9)	73,0
10[']	1,37 (<i>d</i> , 6,2)	19,2	1,39 (<i>d</i> , 5,9)	19,1
11[']	2,11 (<i>s</i>)	12,2	2,14 (<i>s</i>)	12,3
12[']	7,94 (<i>s</i>)	161,3	7,83 (<i>s</i>)	160,2

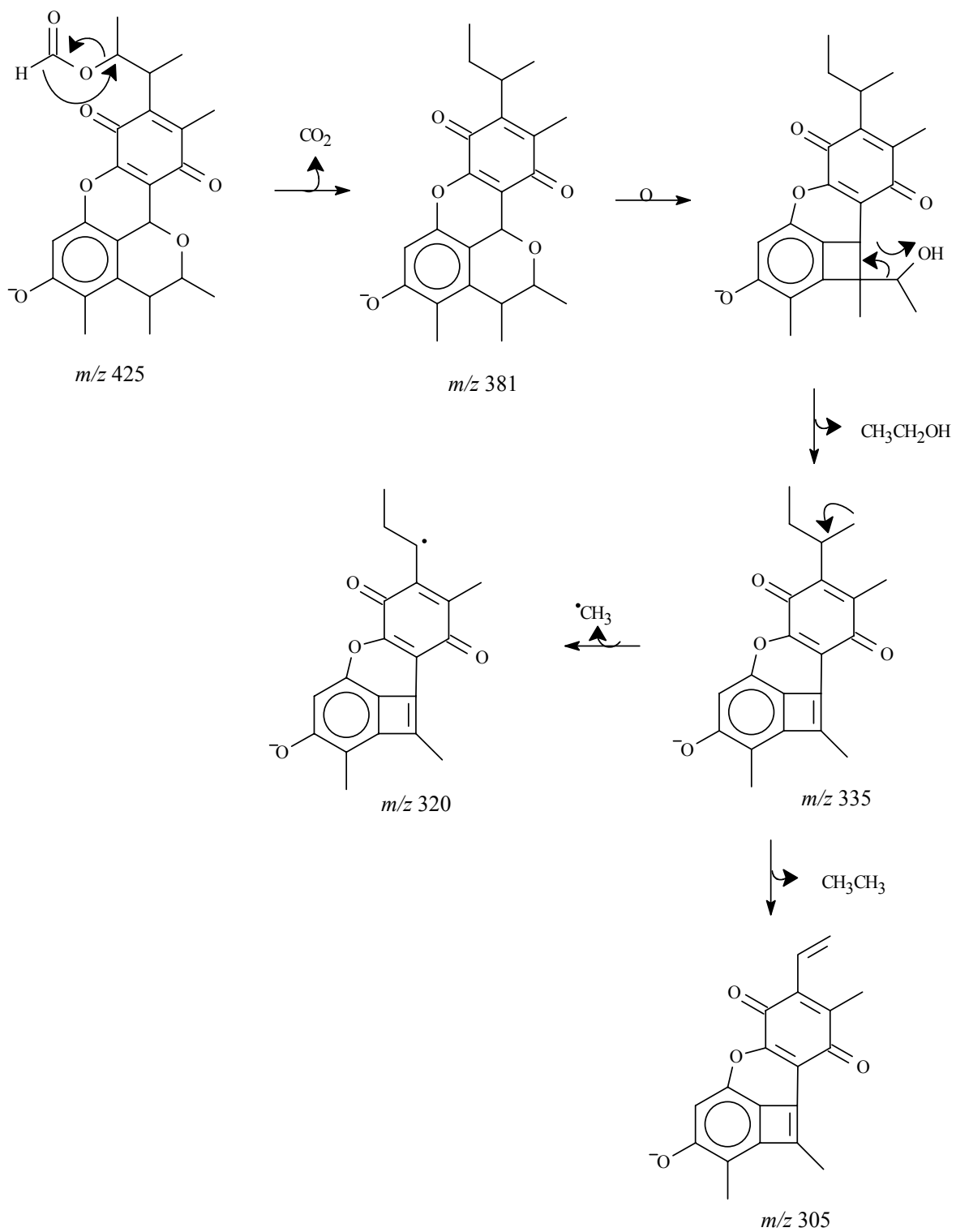


FIGURA 4.78: Propostas de fragmentação para S-13 (APCl (-) íons filhos de m/z 425).

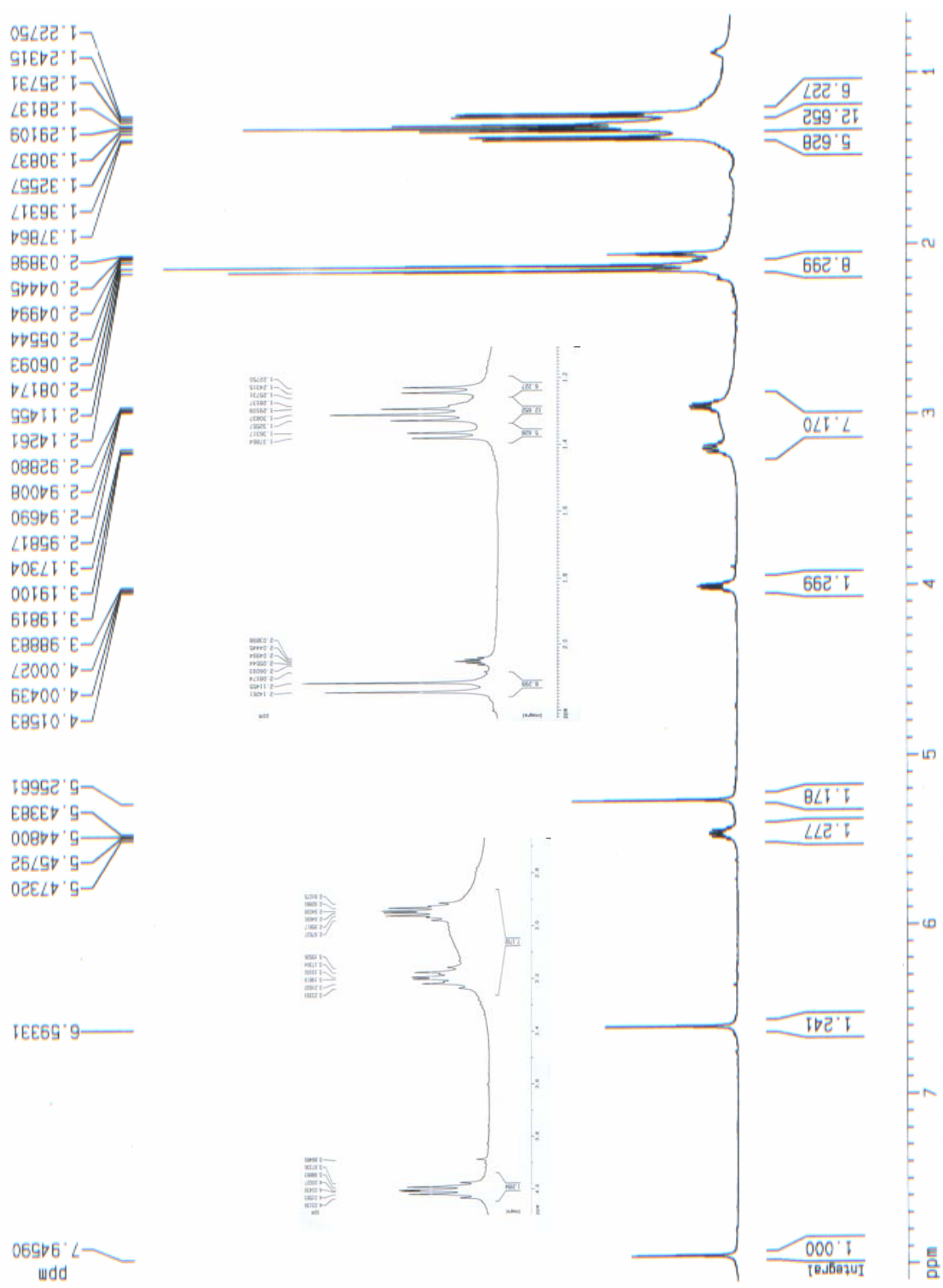


FIGURA 4.79: espectro de RMN ^1H obtido para S-13 (acetona- d_6 , 400 MHz)

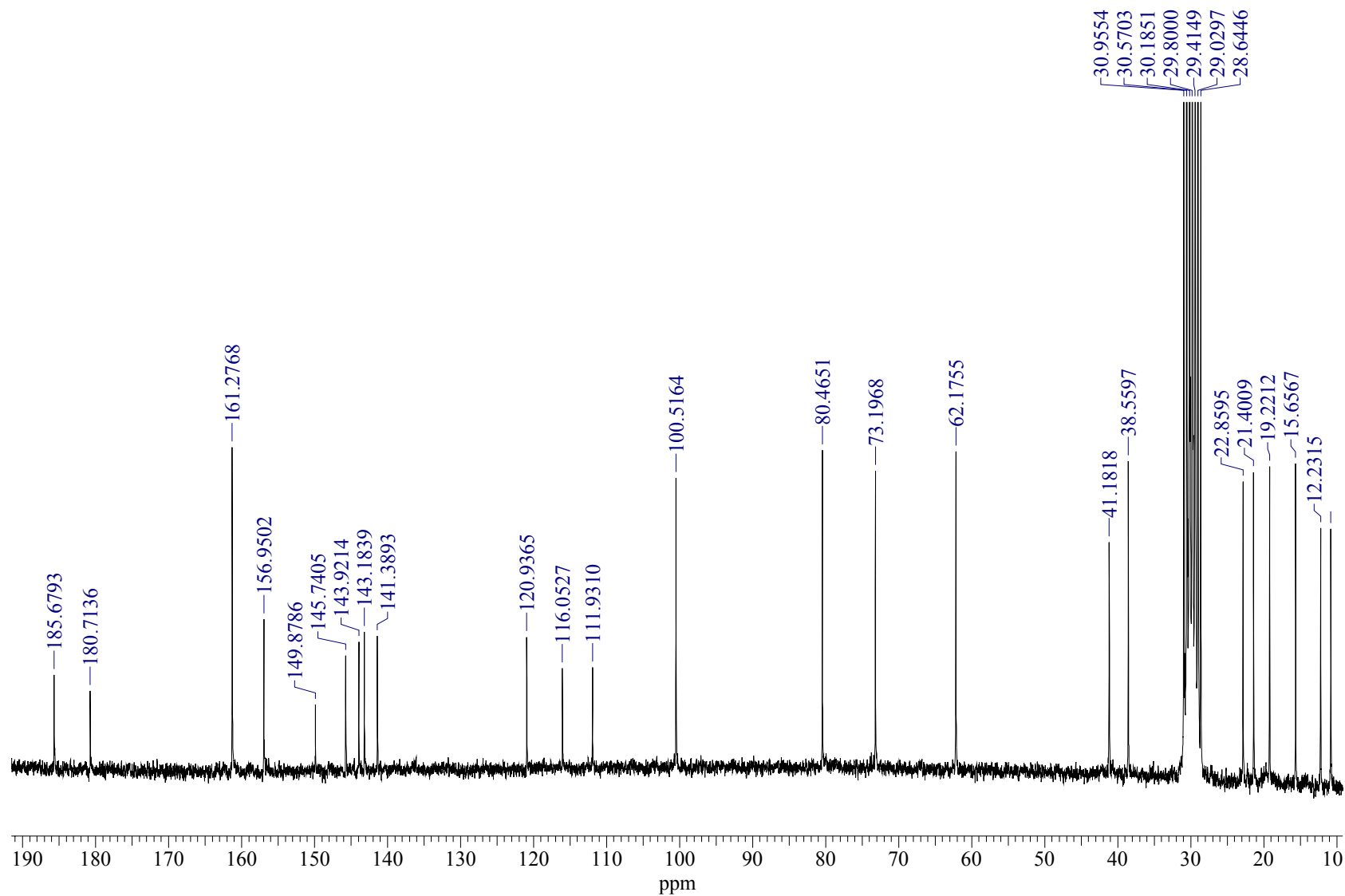


FIGURA 4.80: Espectro de RMN ¹³C de S-13 (acetona-d₆, 100 MHz)

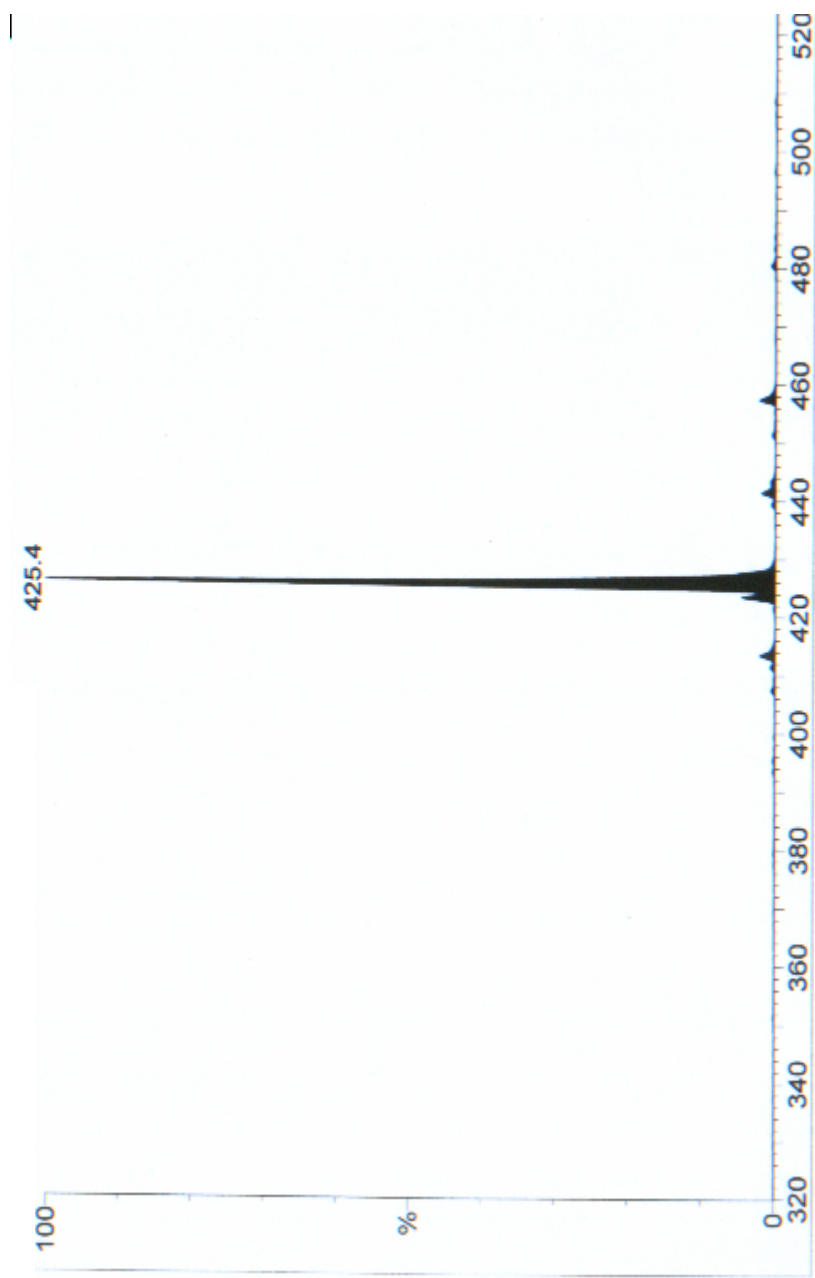


FIGURA 4.81: Espectro de massas (*full scan*) ESI (-) de S-13

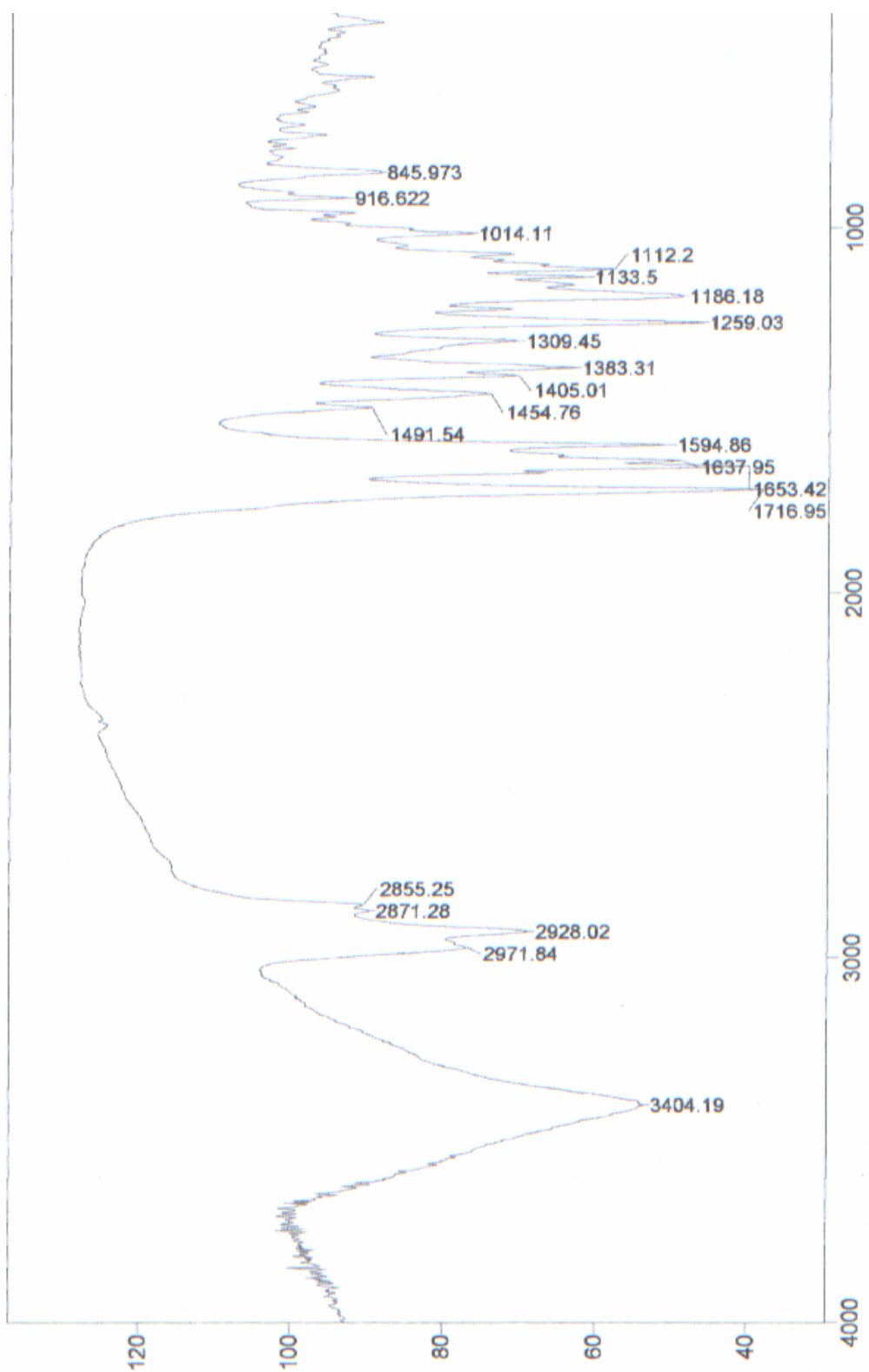


FIGURA 4.82: Espectro de absorção no infravermelho de S-13 (KBr)

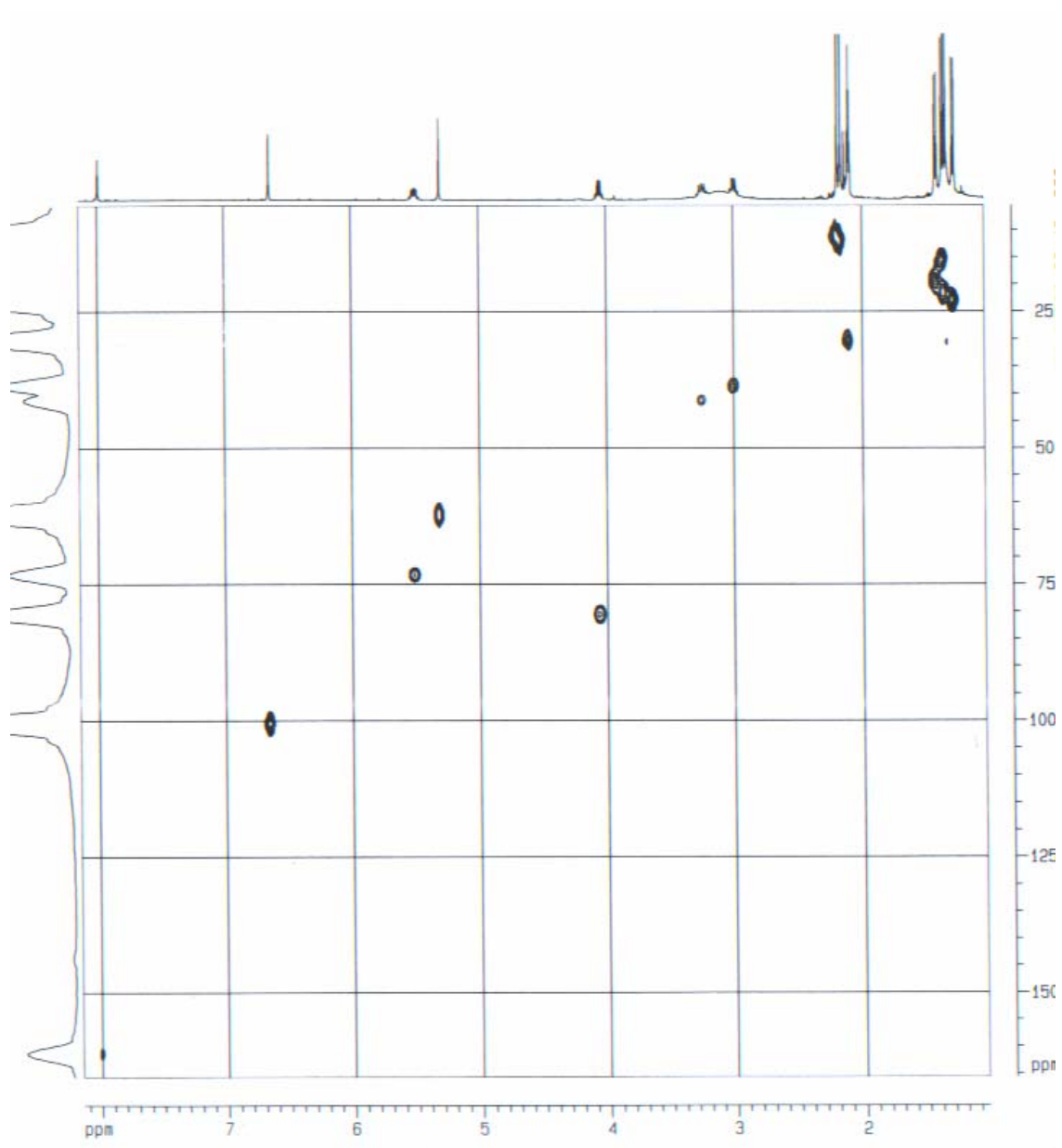


FIGURA 4.83: Experimento de HSQC de S-13

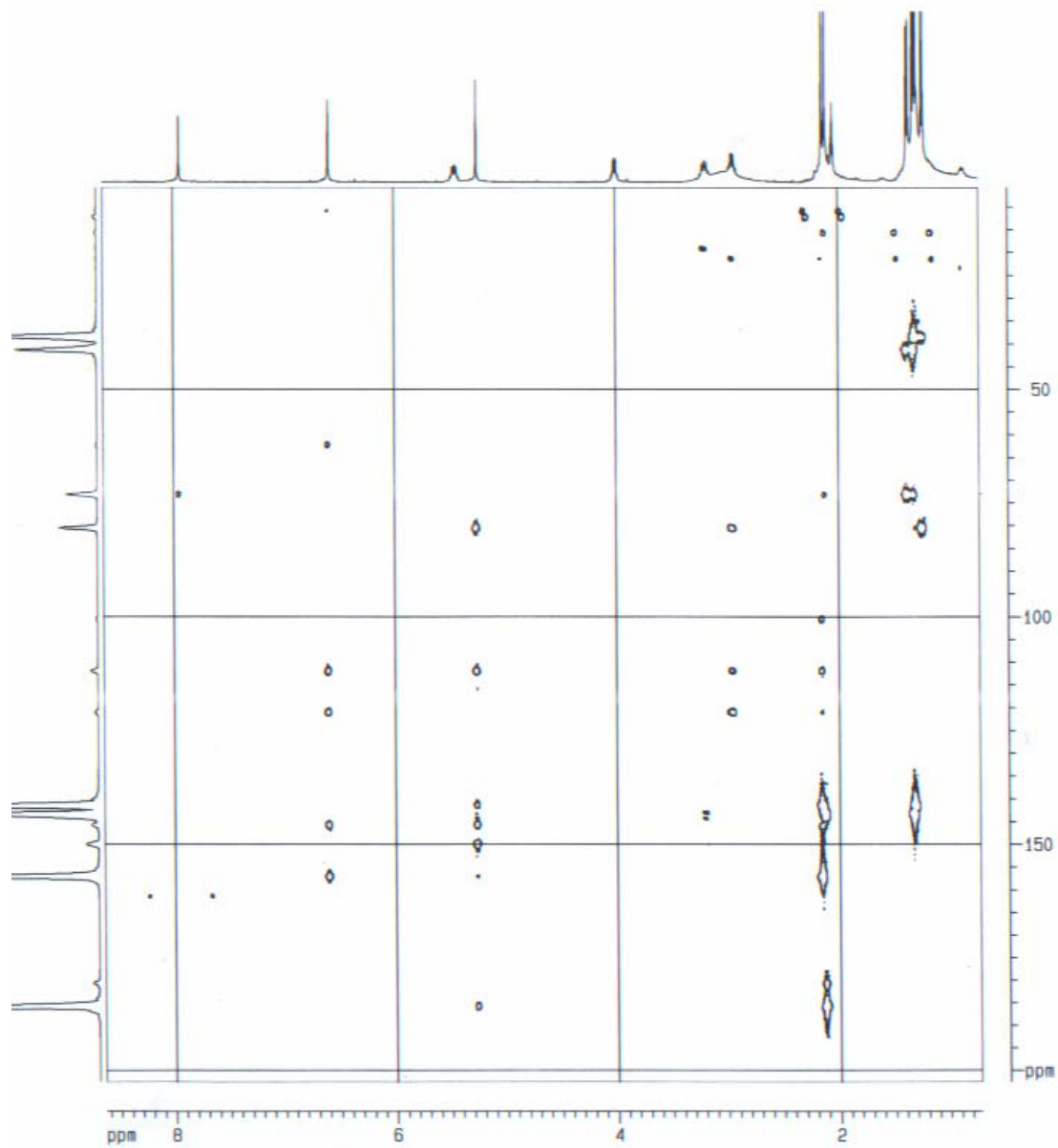


FIGURA 4.84: Experimento de HMBC de S-13

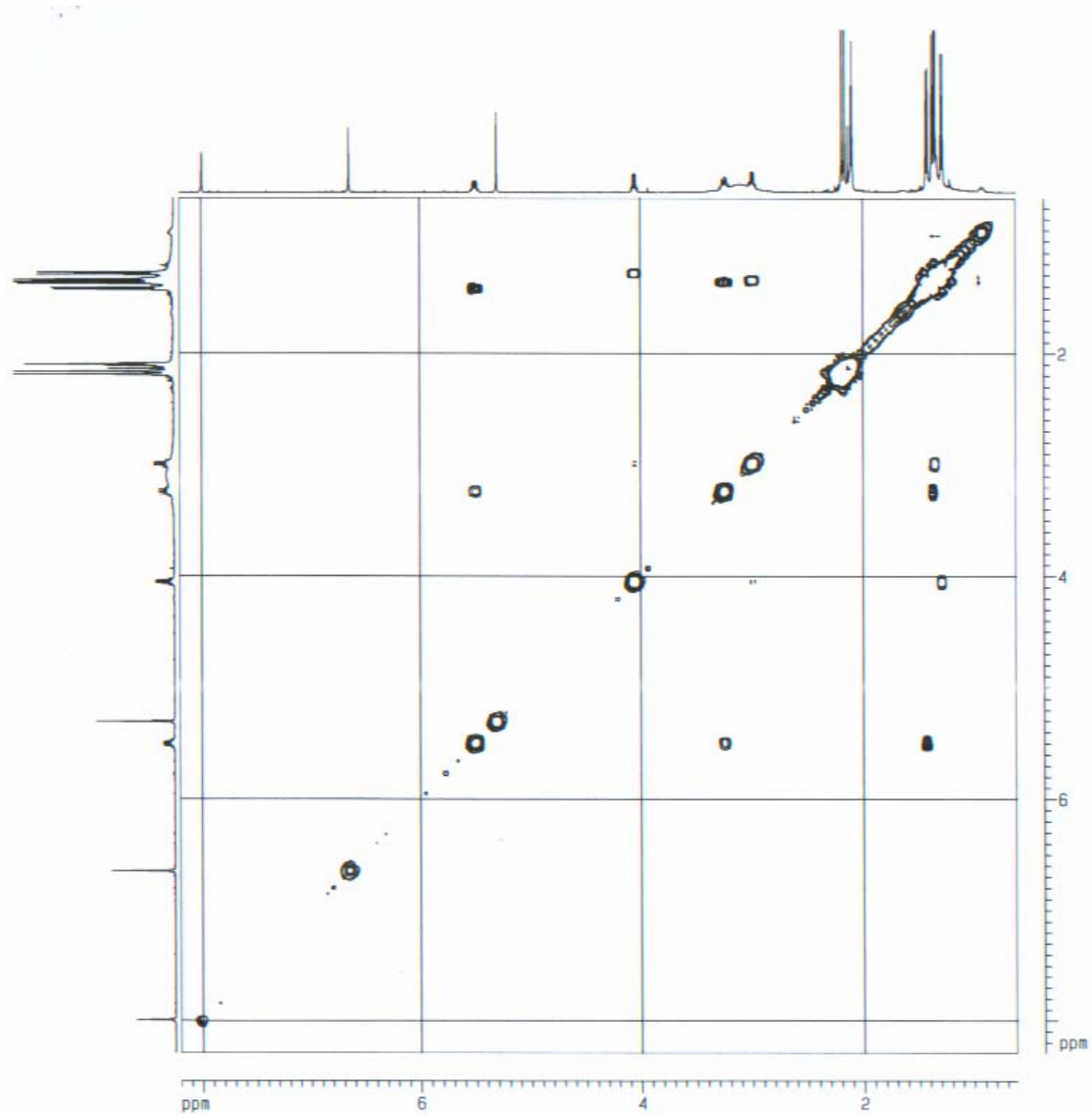


FIGURA 4.85: Experimento de COSY de S-13

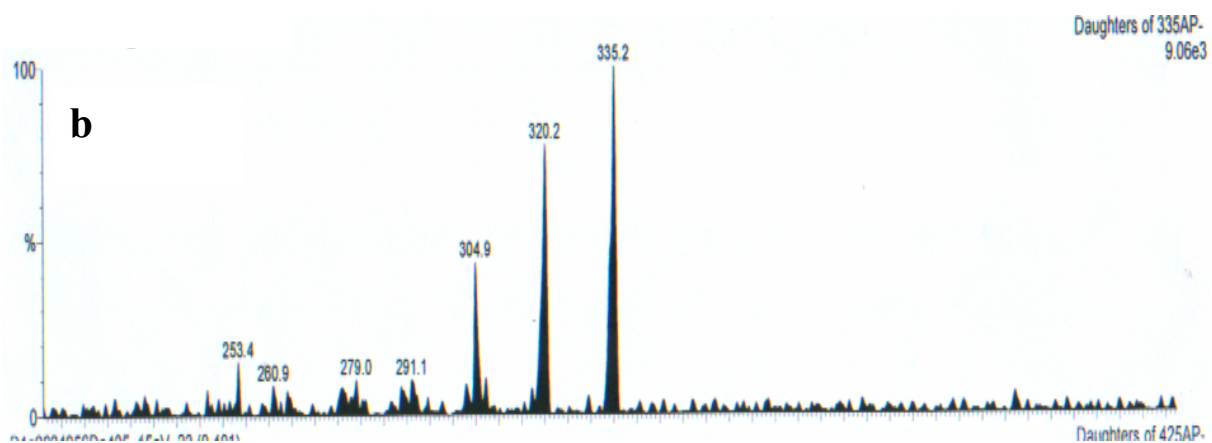
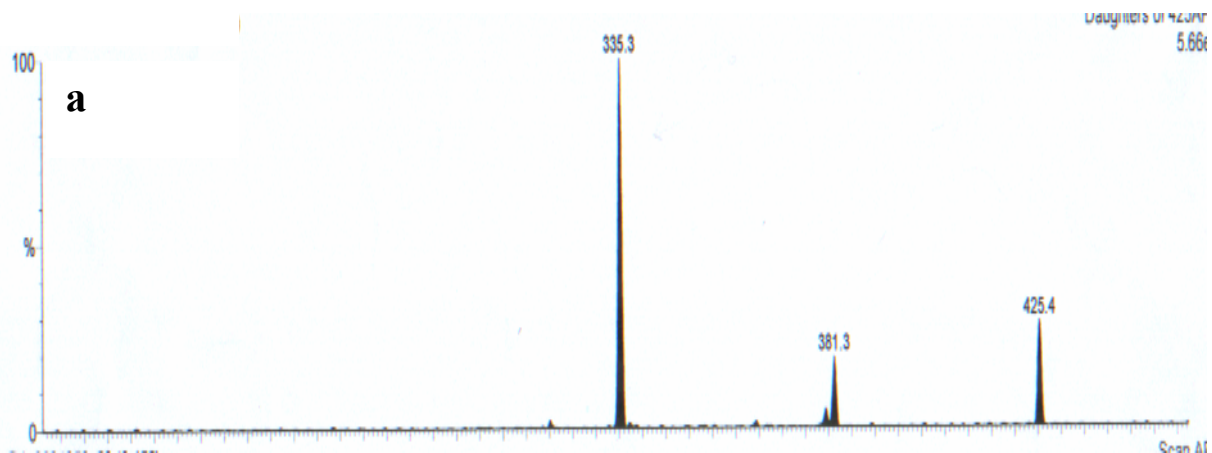


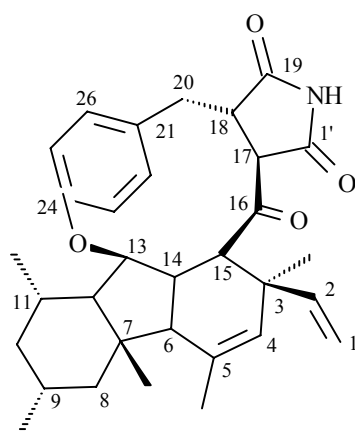
FIGURA 4.86: Espectro de massas de íons filho de m/z 425 15 eV (a), espectro de massas de íons filho de m/z 335 20 eV (b)

4.2.2.8 - S-14 – GKK1032

Esta substância foi obtida através de cromatografia em camada delgada preparativa realizada diretamente do extrato de *Penicillium* sp (*Melia azedarach*). Seu espectro de RMN ^1H (FIGURA 4.88) apresentou sinais nas regiões de metilas, de hidrogênios carbinólicos e olefinicos e na região de hidrogênios aromáticos, apresentou ainda um sinal singleto largo em δ 7,62 típico de hidrogênio ligado a átomo de nitrogênio. Podemos ver na região dos aromáticos os sinais δ 7,21 (*dd*, $J = 2,0$ e $8,3$ Hz), δ 7,03 (*dd*, $J = 2,5$ e $8,5$ Hz), δ 6,94 (*dd*, $J = 2,0$ e $8,5$ Hz) e δ 6,70 (*dd*, $J = 2,5$ e $8,3$ Hz). Temos sinais referentes a uma dupla ligação monosubstituída terminal em δ 5,21 (*dd*, $J = 10,8$ e $17,6$ Hz), δ 4,74 (*dd*, $J = 1,24$ e $10,8$ Hz) e δ 4,65 (*dd*, $J = 1,24$ e $17,6$ Hz). Existem também os sinais dubletos em δ 3,05 (*d*, $J = 9,7$ Hz) e δ 2,78 (*d*, $J = 5,2$ Hz) que sugerem a presença de hidrogênios alfa-carbônicos. Podemos ver os sinais referentes as metilas em δ 1,89 (*s*) esse valor de deslocamento químico sugere uma metila sobre ligação dupla, o sinal em δ 1,17 (*s*) de uma metila ligada a carbono quaternário e os dubletos de metilas em δ 1,16 (*d*, $J = 5,6$ Hz) e δ 0,90 (*d*, $J = 6,2$ Hz). Além desses são observados vários outros sinais no espectro o que indica a complexidade estrutural de **S-14**. O espectro de RMN ^{13}C (FIGURA 4.89) de **S-14** apresentou 32 sinais. Podemos observar sinais referentes a metilas em δ 16,3, δ 19,7, δ 20,4, δ 22,7 e δ 24,9. Sinais de carbonos olefinicos e sistema aromático δ 113,9, δ 131,7, δ 138,5 e δ 145,2, δ 133,9, δ 131,9, δ 126,7, δ 159,6, δ 120,6 e δ 133,4. Observa-se ainda um sinal em δ 93,0 e sinais comumente atribuídos a existência de carbonilas em δ 170,0, δ 176,6 e δ 200,7.

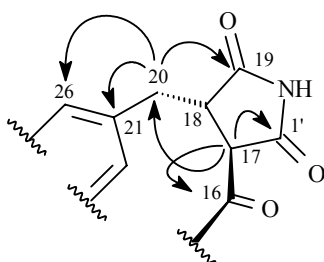
Foi realizado um espectro de massas ESI (-) (FIGURA 4.90) para o composto onde se observou um m/z 500 $[\text{M-H}]^-$, que juntamente com dados de

RMN ^1H e ^{13}C levou a proposta da seguinte fórmula molecular $\text{C}_{32}\text{H}_{39}\text{NO}_4$. Então foram realizados os experimentos de RMN 2D e através da análise dos dados obtidos conclui-se que a substância **S-14** pertence à classe das pirrocidinas, que são metabólitos produzidos por fungos filamentosos, onde estes exibem atividades antimicrobiana e antitumoral [64, 65].

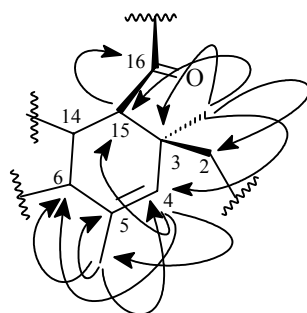


GKK1032

No experimento de HSQC (FIGURA 4.91) foi observada a correlação do sinal em δ 2,78 (H-17) com o carbono localizado em δ 60,2. No experimento de HMBC (FIGURA 4.92) H-17 apresentou correlações com os carbonos δ 34,7 (C-20), δ 170,0 (C-1') e δ 200,7 (C-16). Estas correlações mostram que H-17 está vizinho a duas carbonilas. C-20 (δ 34,7) está correlacionando os sinais de hidrogênio δ 2,40 e δ 3,66 (H-20). No HMBC H-20 correlaciona com δ 60,2 (C-17), com uma carbonila em δ 176,6 (C-19) e com sinais de carbonos de sistema aromático em δ 133,4 (C-26) e δ 133,9 (C-21). No experimento de COSY (FIGURA 4.93) os hidrogênios H-20 e H-17 correlacionam com o sinal em δ 3,81 (H-18). Com base nessas correlações foi proposta essa parte da molécula. Ver correlações de HMBC a seguir.

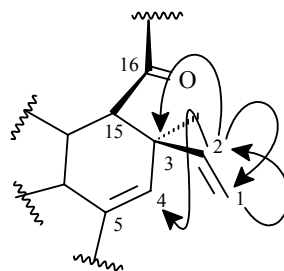


No experimento de HSQC observa-se a correlação do sinal em δ 3,05 (H-15) com o sinal do carbono δ 61,4. No HMBC H-15 correlaciona com a carbonila C-16 (δ 200,7), o que indica que H-15 está na mesma região da molécula. O sinal da metila em δ 1,16 (3-Me) correlaciona no experimento de HMBC com o carbono C-15, com o sinal do carbono δ 41,7 (C-3) e com os carbonos olefinicos δ 131,7 (C-4) e δ 145,2 (C-2). Por sua vez o hidrogênio δ 5,07 (H-4) está ligado ao carbono δ 131,7, segundo o experimento de HSQC. No experimento de HMBC H-4 correlaciona com os carbonos C-15, 3-Me, δ 53,9 (C-6) e δ 20,4 (5-Me). A metila 5-Me está correlacionando com os carbonos δ 53,9 (C-6), δ 138,5 (C-5) e com δ 131,7 (C-4). Estas correlações são mostradas a seguir.

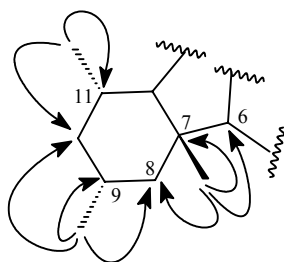


No experimento de COSY podemos as correlações dos sinais δ 4,65 (H-1a), δ 4,74 (H-1b) e δ 5,21 (H-2) entre si, indicando que estes estão em um

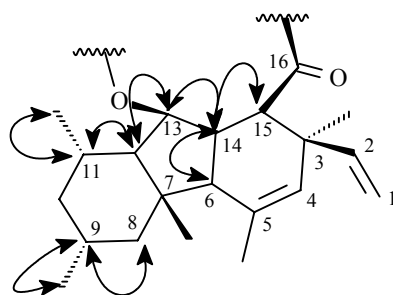
sistema *vinílico*. Os hidrogênios H-1a e H-1b estão ligados ao carbono δ 113,9 (C-1) segundo o HSQC e estão correlacionando no experimento de HMBC com o carbono δ 145,2 (C-2). H-5 correlaciona no HMBC com C-1 e δ 131,7 (C-4) e com δ 41,7 (C-3). Conforme vemos a seguir.



Podemos ver no experimento de HSQC a correlação do sinal em δ 0,90 (9-Me) com o carbono localizado em δ 22,7. A metila 9-Me está correlacionando no experimento de HMBC com os sinais dos carbonos δ 27,8 (C-9), 49,3 (C-8) e com δ 45,1 (C-10). O sinal da metila em δ 1,17 (7-Me) está correlacionando com o sinal do carbono δ 24,9 e experimento de HMBC a metila 7-Me apresenta correlações com os carbonos δ 41,1 (C-7), δ 53,9 (C-6) e com δ 49,3 (C-8), esta última correlação indicando que a metila 7-Me está próxima a metila 9-Me. Temos ainda a correlação do sinal da metila em δ 1,16 (11-Me) com o carbono em δ 16,3 segundo o experimento de HSQC. No HMBC a metila 11-Me apresenta correlações com os sinais δ 27,1 (C-11) e δ 45,1 (C-10), indicando que 11-Me também está próxima a metila 9-Me. As correlações de HMBC são mostradas a seguir.



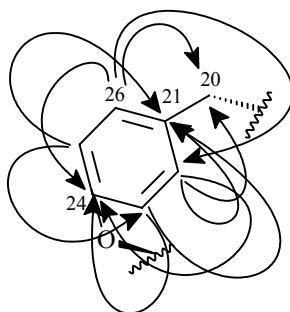
Através das correlações observadas no experimento de COSY foi possível fazer o restante das atribuições dos sinais, bem como, determinar parte da estrutura de **S-14**. Observou-se correlação da metila 9-Me com o sinal em δ 1,82 atribuído ao H-9, este correlaciona com o sinal δ 0,63 (H-10). O sinal em δ 1,95 foi atribuído ao H-11 e apresenta correlações com 11-Me e com o sinal δ 1,01 (H-12). H-12 correlaciona com δ 4,20 (H-13) e este com δ 2,18, atribuído ao H-14. Por fim H-14 correlaciona com os sinais δ 1,95 (H-6) e δ 3,05 (H-15) fechando essa parte da molécula. As correlações de COSY são mostradas a seguir.



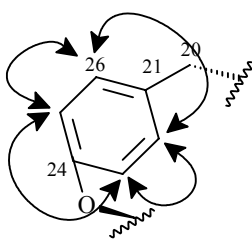
COSY

A atribuição dos sinais do anel aromático foi feita com base nas correlações observadas nos experimentos de HSQC, HMBC e COSY. No experimento de HSQC podemos ver a correlação do sinal δ 6,94 (H-26) com o sinal dos carbonos δ 131,9 (C-22), δ 159,6 (C-24) e com δ 34,7 (C-20). O hidrogênio H-22 correlaciona com os sinais em δ 159,6 (C-24), δ 34,7 (C-20) e com δ 133,9 (C-

21). O experimento de HSQC mostra ainda a correlação do sinal em δ 6,70 (H-23) com o sinal do carbono δ 126,7. No experimento de HMBC H-23 correlaciona com os sinais de C-24, 133,9 (C-21) e com δ 120,6 (C-25), este está correlacionando no experimento de HSQC com o sinal em δ 7,03 (H-25). Fechando as correlações observadas para o anel aromático H-25 correlaciona com os sinais δ 126,7 (C-23) e δ 133,9 (C-21). As correlações de HMBC são mostradas a seguir.



No experimento de COSY foram observadas correlações de H-23 com H-22 e H-25 e do hidrogênio H-26 com H-22 e H-25. Estas correlações foram úteis para a correta atribuição dos sinais no sistema aromático e são mostradas a seguir.



COSY

O sinal em δ 4,20 (H-13) está correlacionando com sinal do carbono em δ 93,0 segundo o experimento de HSQC. Estes valores foram atribuídos a H-13 e C-13, devido estes pertencerem ao um anel de cinco membros, o que é coerente

com este valor de deslocamento químico, pois carbonos carbinólicos pertencentes a anel de cinco membros apresentam uma maior desblindagem em relação a carbonos carbinólicos pertencentes a anel de seis membros. O espectro de RMN ^{13}C tem um sinal em δ 159,6 que foi atribuído a carbono C-24 do anel aromático, fechando assim o macrociclo em **S-14**.

Para o anel aromático é esperado se observar um sistema AA' BB' no espectro de RMN ^1H devido este ser dissubstituído *para*, o que tornaria o anel simétrico e conseqüentemente os hidrogênios e carbonos equivalentes dando o mesmo valor de deslocamento químico. No entanto, isto não é observado, provavelmente como o anel aromático faz parte de um macrociclo isto impede a livre rotação do anel fazendo com que os hidrogênios e carbonos não se tornem equivalentes dando, portanto, valores de deslocamentos químicos diferentes.

As fragmentações obtidas através do espectro de massas de íons filhos de m/z 500 (FIGURA 4.87 e 4.94) confirmam a estrutura proposta. Os dados de RMN ^1H e ^{13}C de **S-14** estão na TABELA 4.14. A biossíntese de **S-14** está mostrada no Anexo 02 p. 314.

TABELA 4.14: dados de RMN ^1H e ^{13}C de **S-14** (CDCl_3 , 400 MHz)

S-14		
	H (δ, <i>mult.</i>, <i>J</i> em Hz)	C
1a	4,65 (<i>dd</i> , 1,24 e 17,6)	113,9
1b	4,74 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 1,24 e 10,8)	
2	5,21 (<i>dd</i> , 10,8 e 17,6)	145,2
3		41,7
4	5,07 (<i>m</i>)	131,7
5		138,5
6	1,95 (<i>m</i>)	53,9
7		41,1
8a	0,79 (<i>t</i> , 12,1)	49,3
8b	1,95 (<i>m</i>)	
9	1,82 (<i>m</i>)	27,8
10a	0,63 (<i>q</i> , 12,7)	45,1
10b	1,82 (<i>m</i>)	
11	1,95 (<i>m</i>)	27,1
12	1,01 (<i>dd</i> , 6,9 e 11,1)	61,3
13	4,20 (<i>dd</i> , 3,4 e 6,9)	93,0
14	2,18 (<i>ddd</i> , 3,4; 9,7 e 12,2)	55,3
15	3,05 (<i>d</i> , 9,7)	61,4
16		200,7
17	2,78 (<i>d</i> , 5,2)	60,2
18	3,81 (<i>ddd</i> , 5,2, 8,3 e 11,2)	43,4
19		176,6
20a	2,40 (<i>dd</i> , 11,2 e 12,7)	34,7
20b	3,66 (<i>dd</i> , 8,3 e 12,7)	
21		133,9
22	7,21 (<i>dd</i> , 2,0 e 8,3)	131,9
23	6,70 (<i>dd</i> , 2,5 e 8,3)	126,7
24		159,6
25	7,03 (<i>dd</i> , 2,5 e 8,5)	120,6
26	6,94 (<i>dd</i> , 2,0 e 8,5)	133,4
1'		170,0
3-Me	1,17 (<i>s</i>)	19,7
5-Me	1,89 (<i>s</i>)	20,4
7-Me	1,17 (<i>s</i>)	24,9
9-Me	0,90 (<i>d</i> , 6,2)	22,7
11-Me	1,16 (<i>d</i> , 5,6)	16,3

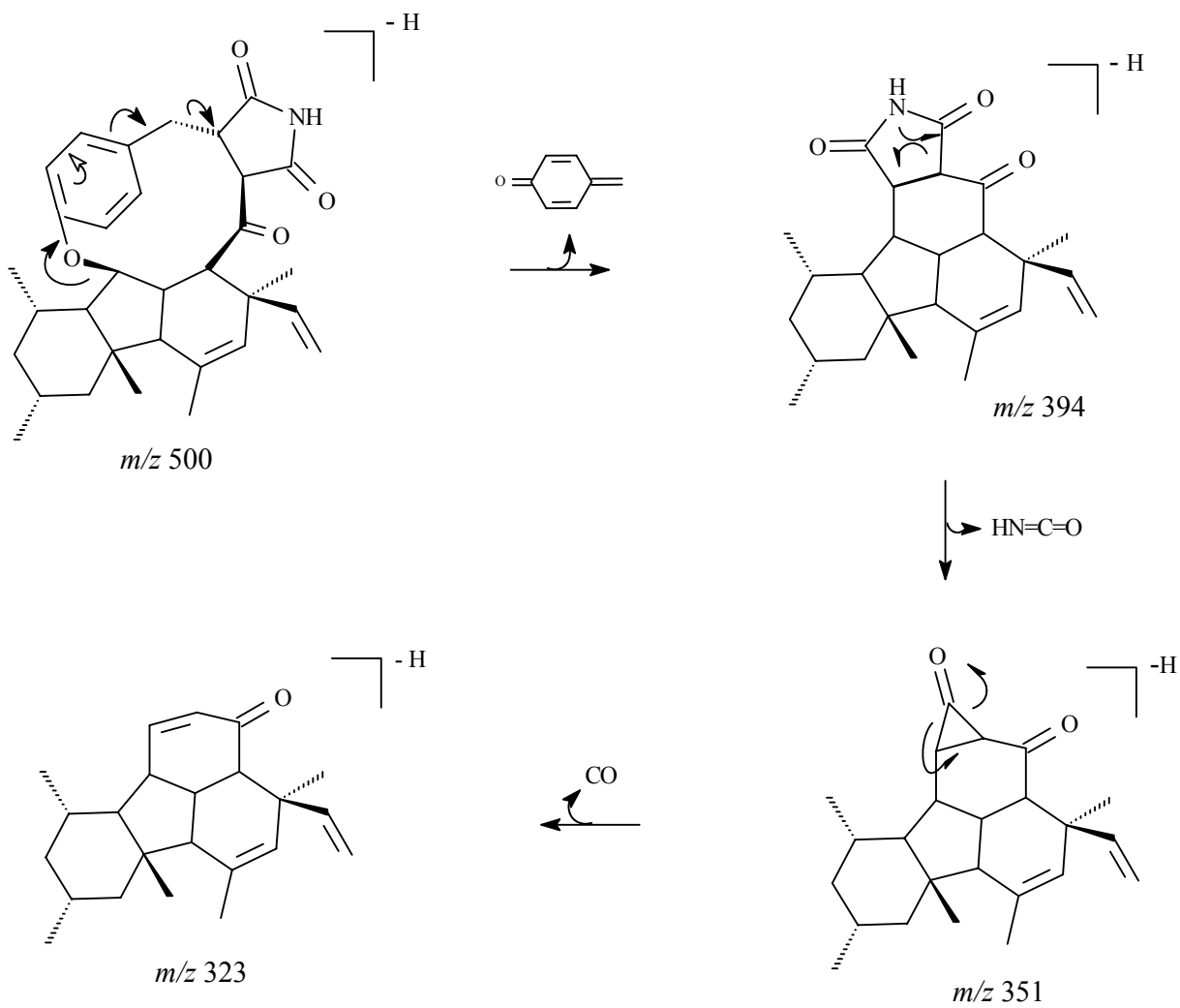


FIGURA 4.87: Fragmentações proposta para S-14

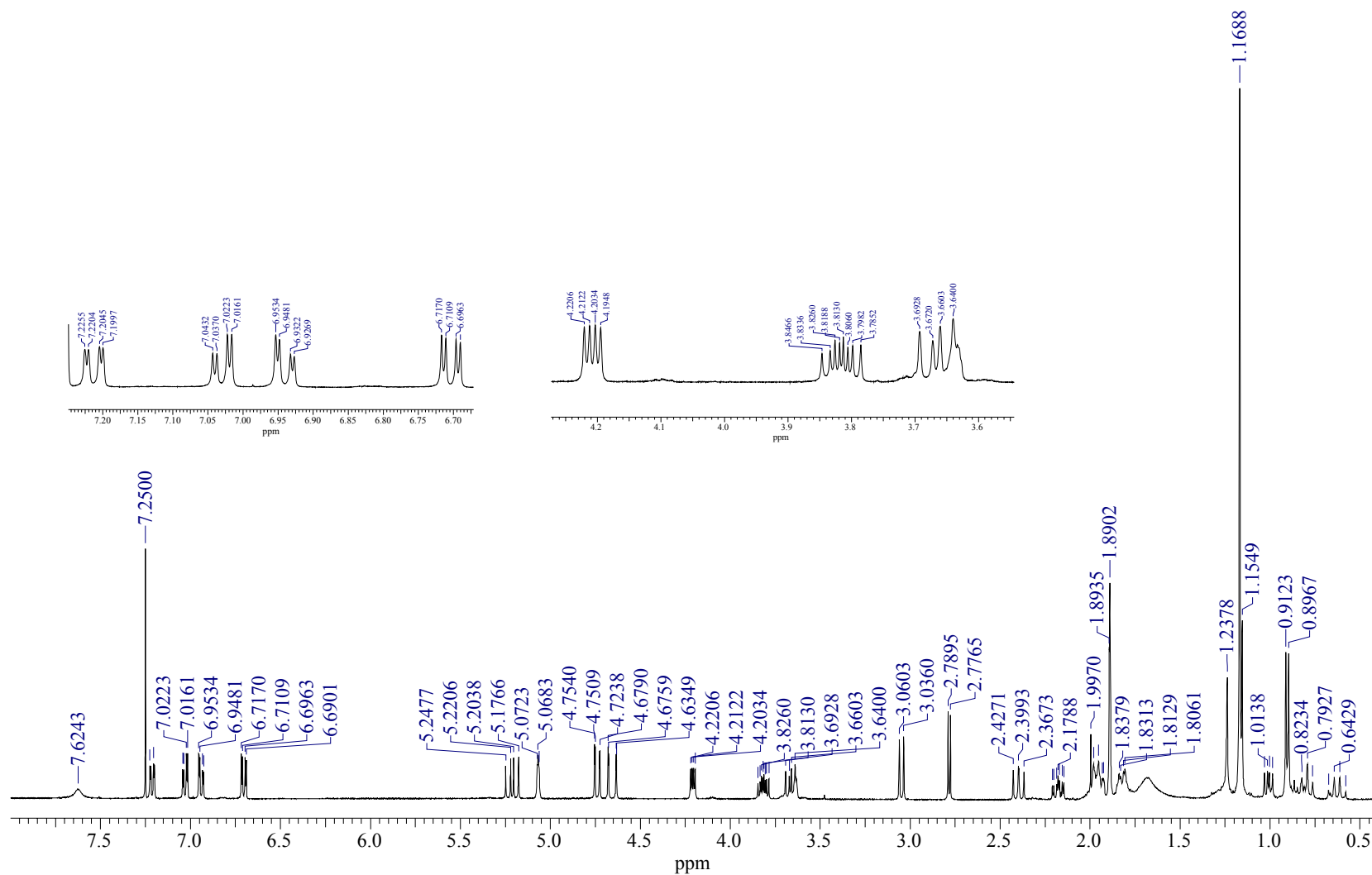


FIGURA 4.88: Espectro de RMN ^1H de S-14 (CDCl_3 , 400 MHz)

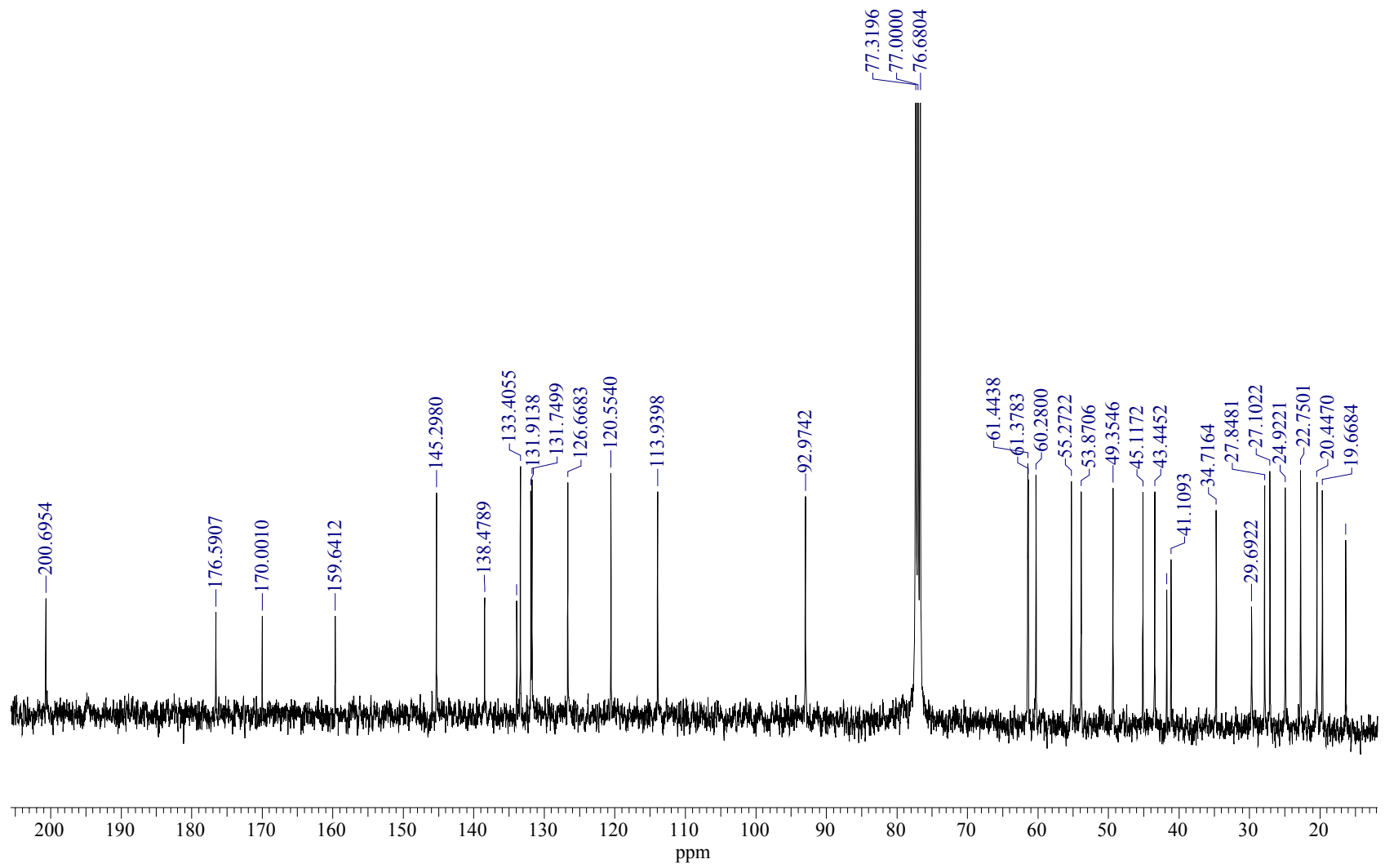


FIGURA 4.89: Espectro de RMN ^{13}C de S-14 (CDCl_3 , 100 MHz)

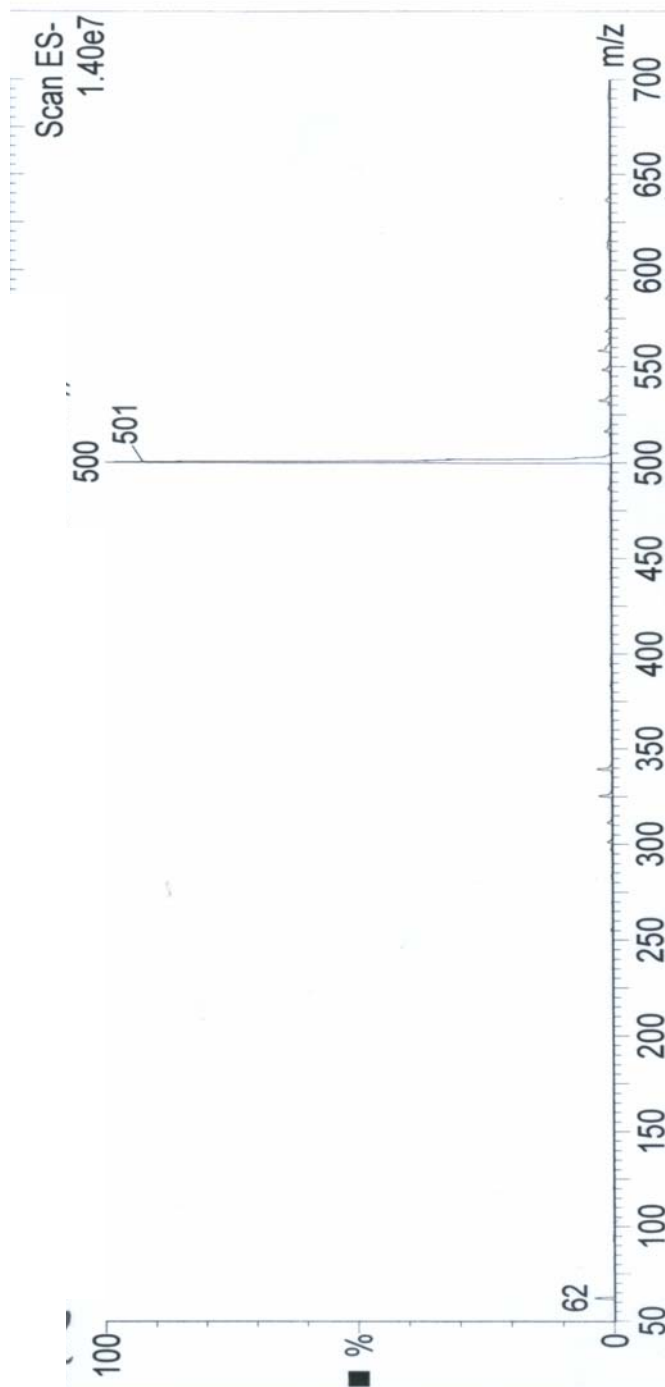


FIGURA 4.90: Espectro de massas (*full scan*) ESI (-) de S-14

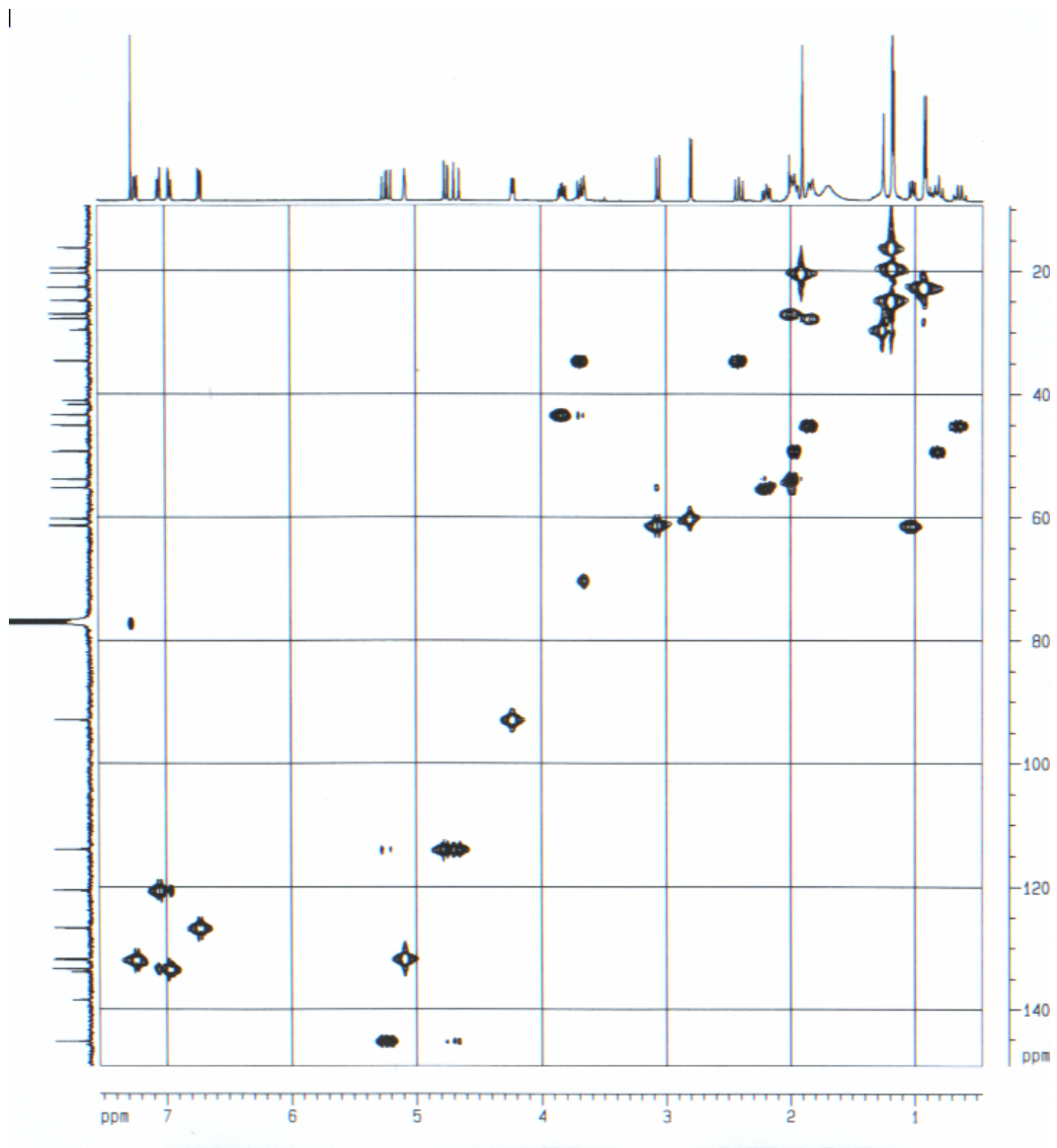


FIGURA 4.91: Experimento de HSQC para S-14

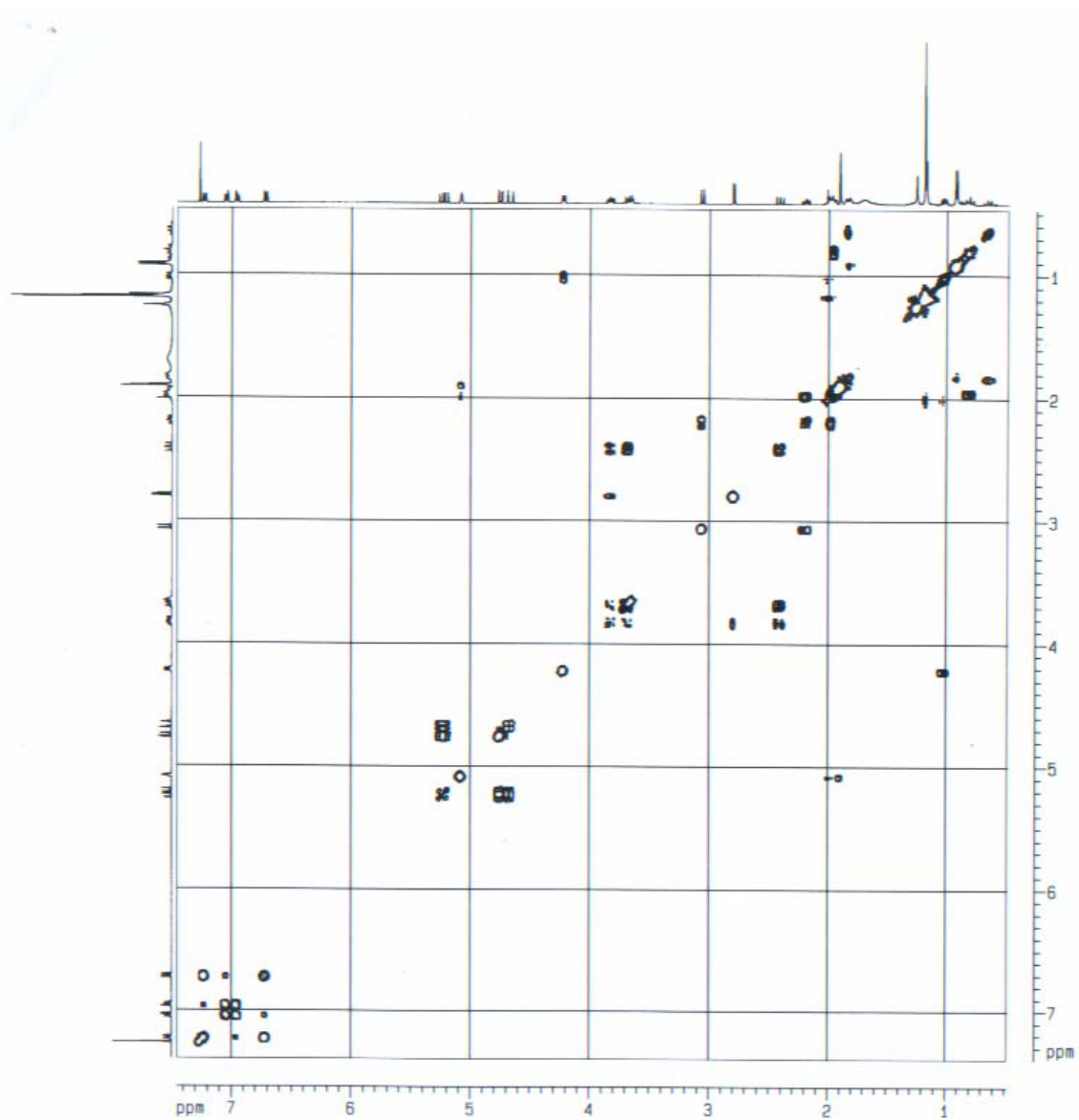


FIGURA 4.93: Experimento de COSY para S-14

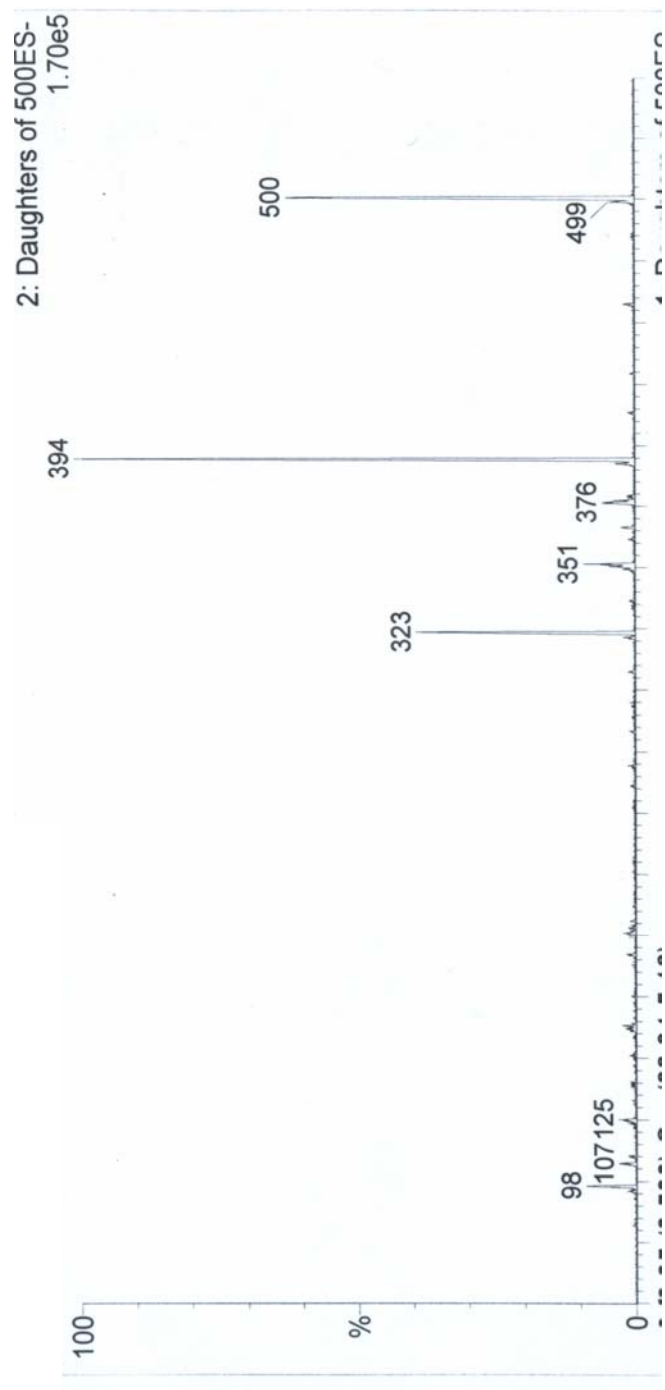


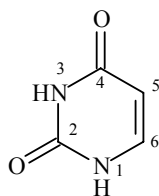
FIGURA 4.94: Espectro de massas de íons filhos de m/z 500 (ESI (-), 30 eV)

4.2.3 – BASES E NUCLEOSÍDEOS

4.2.3.1 - S-15 – Uracila

A substância **S-15** foi isolada através de cromatografia em coluna utilizando-se sephadex LH-20 como fase estacionária e metanol como fase móvel na forma de um cristal branco. Seu espectro de RMN ^1H (FIGURA 4.95) apresentou apenas dois sinais dubletos em δ 5,56 (*d*, $J = 7,6$) e δ 7,51 (*d*, $J = 7,6$). A ausência de outros sinais indicou que tínhamos uma molécula bastante simples. Foi realizado o espectro de massas para o composto onde neste foi observado um m/z 113 $[\text{M}+\text{H}]$ que pode levar a proposta da seguinte fórmula molecular para **S-15** $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_2\text{N}_2$.

O espectro de RMN ^{13}C (FIGURA 4.96) apresentou somente quatro sinais sendo dois comumente atribuídos a carbonilas insaturadas δ 151,7 e δ 164,4 e outros dois típicos de ligações duplas δ 100,2 e δ 142,5. Estes dados nos levaram a propor a existência de uma carbonila alfa-beta insaturada no composto, que é coerente com os valores de deslocamento químico apresentados no espectro de RMN ^1H . Através dessas informações foi proposta a estrutura de **S-15** como sendo o nucleosídeo uracila. Os dados de RMN ^{13}C de **S-15** foram confrontados com os dados da literatura para a uracila e mostraram similaridade (TABELA 4.15).



Uracila

A estrutura de **S-15** pode ser confirmada pela obtenção de seus espectros de RMN 2D, onde podemos ver no experimento de HSQC (FIGURA 4.97) a correlação do sinal em δ 5,56 (H-5) com o carbono em δ 100,2. O hidrogênio H-5 apresentou correlações no experimento de HMBC (FIGURA 4.98) com os sinais dos carbonos δ 164,4 (C-4) e δ 142,5 (C-6), este correlaciona no HSQC com o sinal em δ 7,51 (H-6) e H-6 mostrou correlações no HMBC com os sinais de C-4 e o sinal em δ 151,7 atribuído a carbonila C-2. Estas correlações são mostradas a seguir.

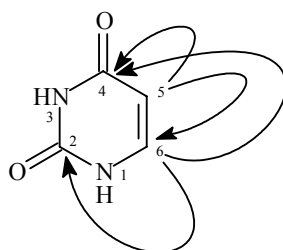


TABELA 4.15: dados de RMN ^1H e ^{13}C de **S-15** (DMSO- d_6 , 200 MHz)

S-15		Lit [54]	
H (δ , <i>mult.</i> , <i>J</i> em Hz)	C	C	
2		151,7	151,4
4		164,4	164,2
5	5,56 (<i>d</i> , <i>J</i> = 7,6)	100,2	100,3
6	7,51 (<i>d</i> , <i>J</i> = 7,6)	142,5	142,2

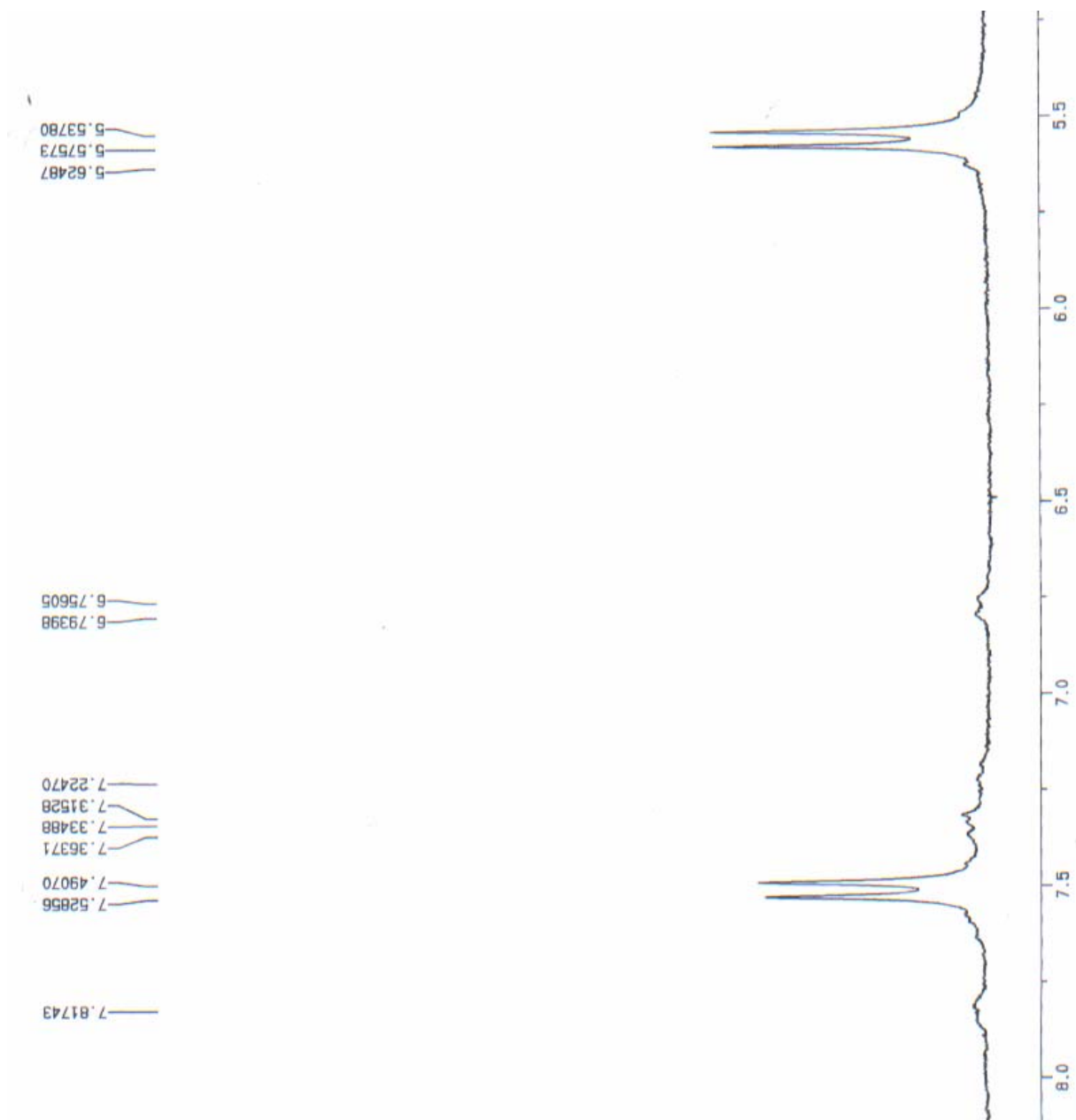


FIGURA 4.95: Espectro de RMN ¹H obtenido para S-15 (DMSO-d₆, 200 MHz)

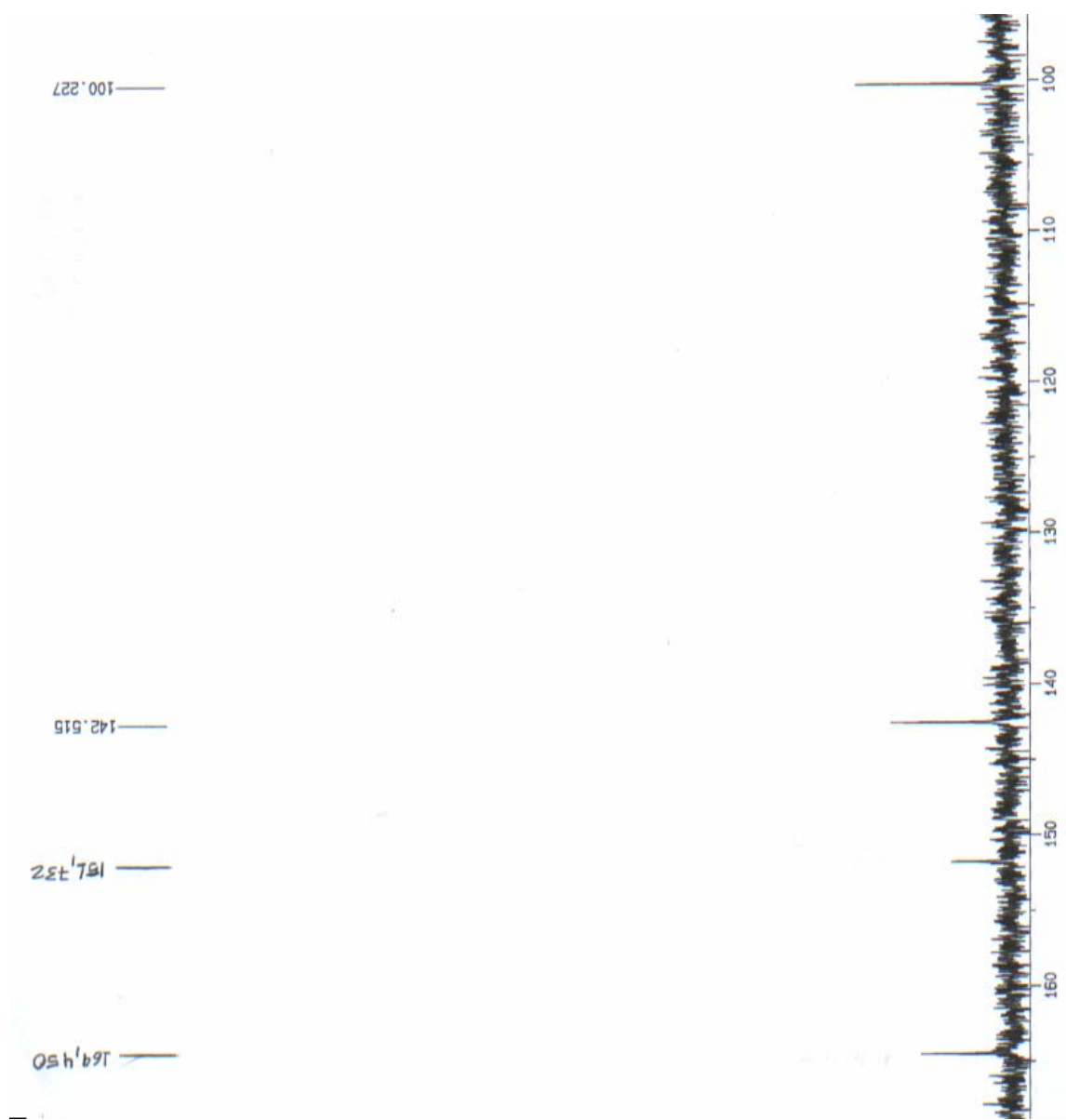


FIGURA 4.96: Espectro de RMN ^{13}C obtido para S-15 (DMSO- d_6 , 200 MHz)

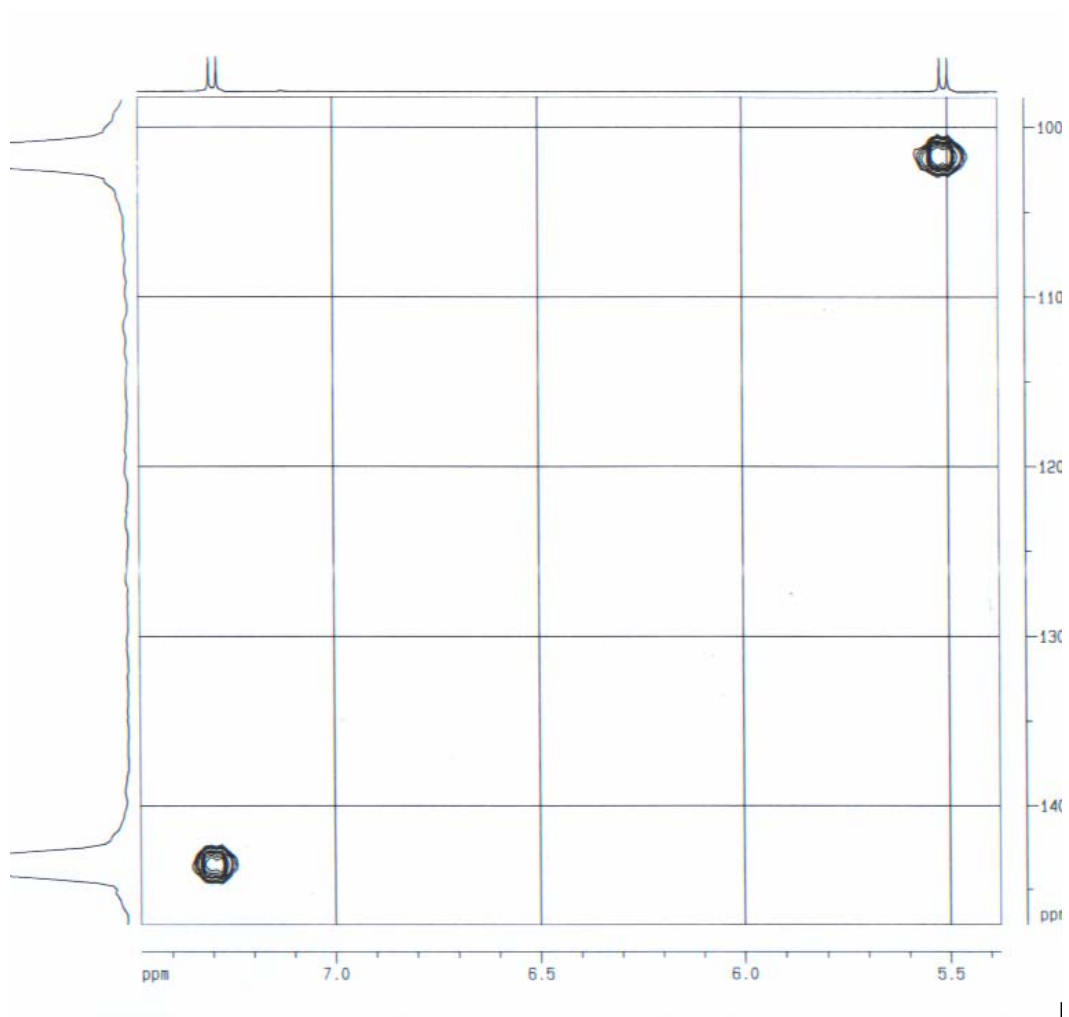


FIGURA 4.97: Experimento de HSQC de S-15

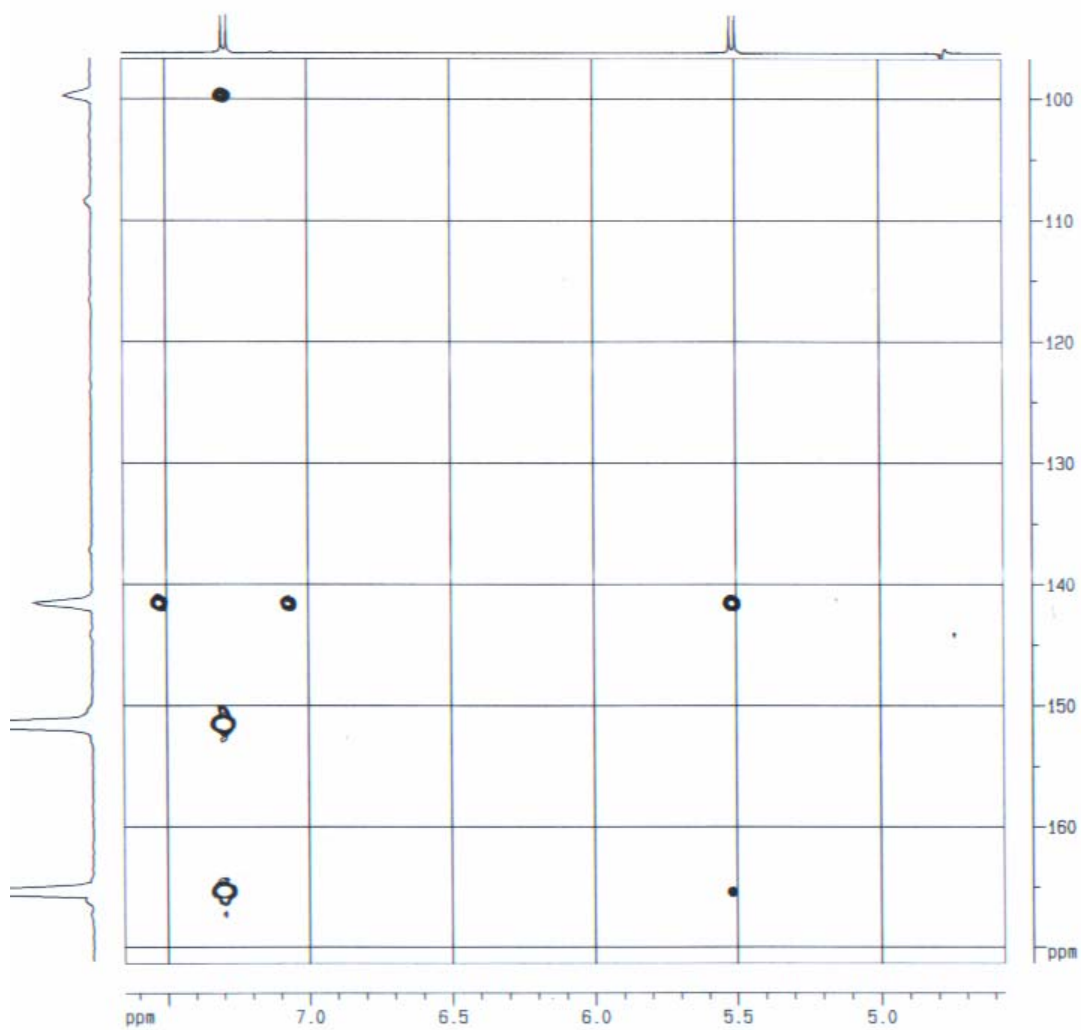
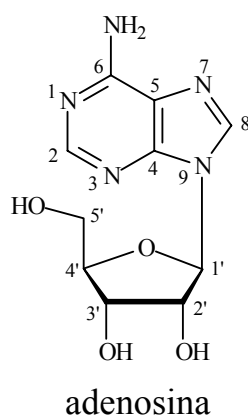


FIGURA 4.98: Experimento de HMBC de S-15

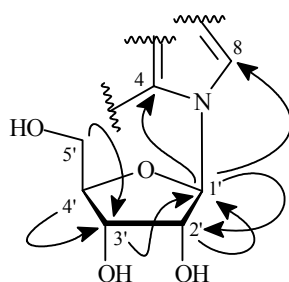
4.2.3.2 - S-16 – Adenosina

A substância **S-16** também foi isolada através de cromatografia em coluna utilizando-se sephadex LH-20 como fase estacionária e metanol como fase móvel na forma de um cristal branco. Seu espectro de RMN ^1H (FIGURA 4.99) apresentou três sinais singlete em δ 8,73, δ 8,14 e δ 7,38. Foram observados também os sinais dubleto δ 5,87 (*d*, $J = 6,1$ Hz), δ 4,59 (*t*, $J = 5,4$ Hz), δ 4,15 (*t*, $J = 3,8$ Hz), δ 3,97 (*q*, $J = 3,1$ Hz), δ 3,66 (*dd*, $J = 12,2$ e $3,4$ Hz) e δ 3,55 (*d*, $J = 11,7$ Hz).

No espectro de RMN ^{13}C (FIGURA 4.100) de **S-16** foram observados 10 sinais, sendo que os sinais δ 87,9, δ 73,4, δ 70,6, δ 83,9 e δ 61,7 são típicos de açúcares. Realizou-se, então, o espectro de massas ESI (+) do composto (FIGURA 4.101) onde foi observado um m/z 268 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Essas informações levaram a proposta da seguinte fórmula estrutural para a substância $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{O}_4\text{N}_5$. Através da obtenção dos experimentos de RMN 2D pode-se concluir que **S-16** tratava-se do nucleosídeo adenosina.



No experimento de HSQC (FIGURA 4.102) foi observada a correlação do sinal em δ 8,36 (H-8) com o carbono localizado em δ 139,9. No experimento de HMBC (FIGURA 4.103) H-8 correlaciona com os sinais dos carbonos δ 119,3



Foi realizado um espectro de massas de íons filhos de m/z 268 (FIGURA 4.104) onde observou-se como único fragmento o pico m/z 136 referente a separação das unidades de açúcar e base nitrogenada. Os dados de RMN ^{13}C de **S-16** foram comparados com os obtidos na literatura para a adenosina (TABELA 4.16).

TABELA 4.16: dados de RMN ^1H e ^{13}C de **S-16** (DMSO- d_6 , 400 MHz)

S-16		Lit [54]	
	H (δ, <i>mult.</i>, J em Hz)	C	C
2	8,14 (<i>s</i>)	152,4	152,6
4		149,0	149,3
5		119,3	119,6
6		156,1	156,3
8	8,36 (<i>s</i>)	139,9	140,2
1'	5,87 (<i>d</i> , $J = 6,1$ Hz)	87,9	88,2
2'	4,59 (<i>t</i> , $J = 5,4$ Hz)	73,4	73,8
3'	4,15 (<i>t</i> , $J = 3,1$ Hz)	70,6	70,9
4'	3,97 (<i>q</i> , $J = 3,1$ Hz)	83,6	86,2
5a'	3,55 (<i>d</i> , $J = 12,0$ Hz)	61,7	61,9
5b'	3,66 (<i>dd</i> , $J = 12,0$ e $3,4$ Hz)		
	7,38 (<i>s</i>) $-\text{NH}_2$		

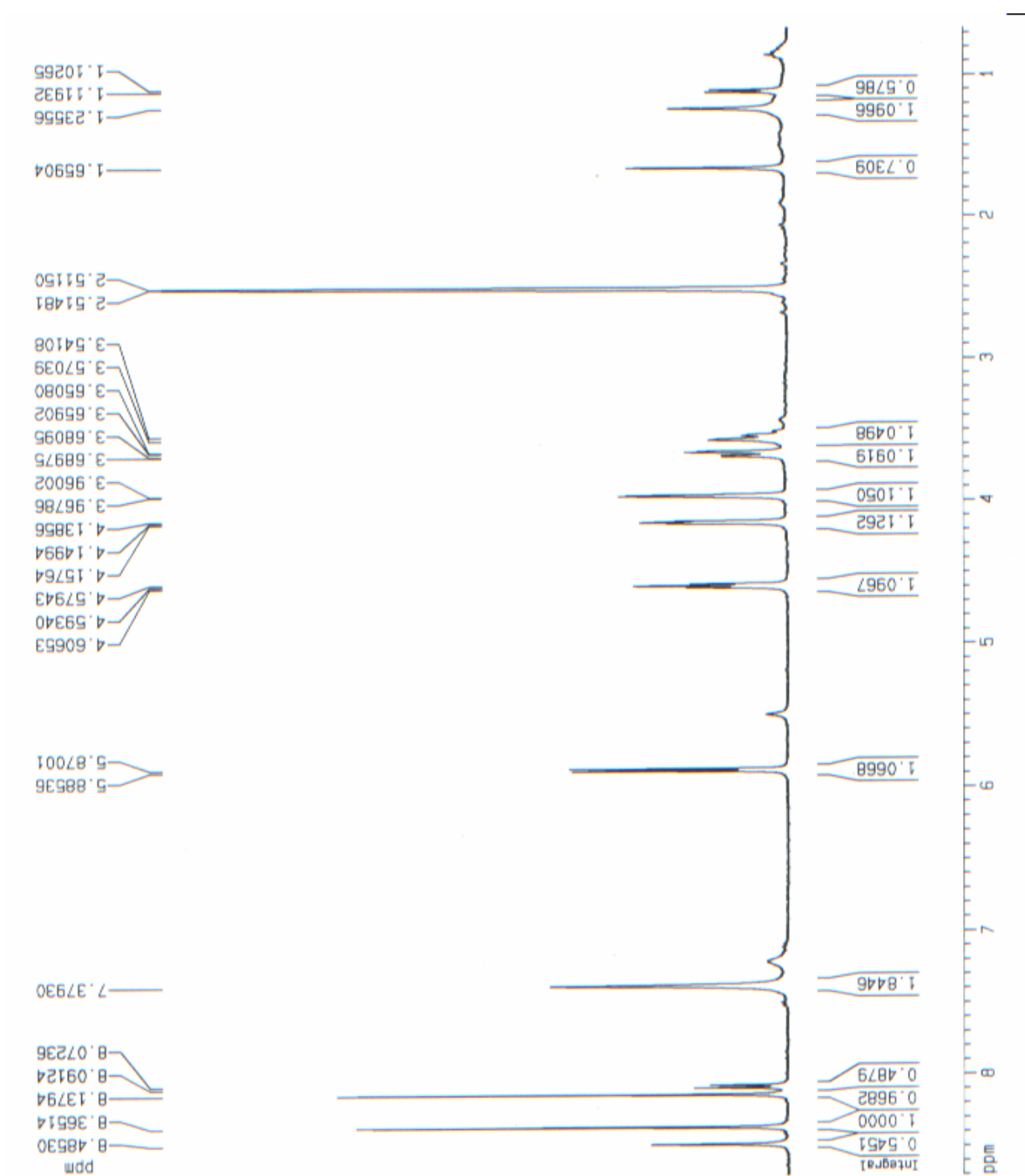


FIGURA 4.99: Espectro de RMN ¹H de S-16 (DMSO-d₆, 400 MHz)

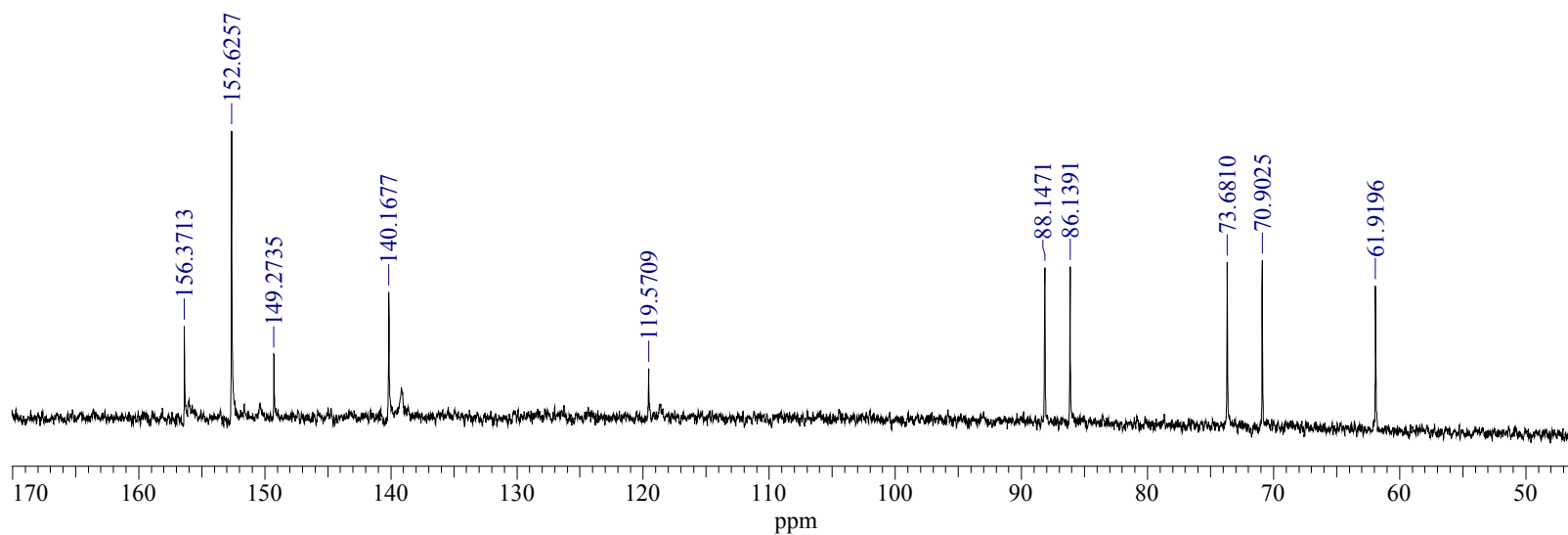


FIGURA 4.100: Espectro de RMN ^{13}C de S-16 (DMSO- d_6 , 100 MHz)

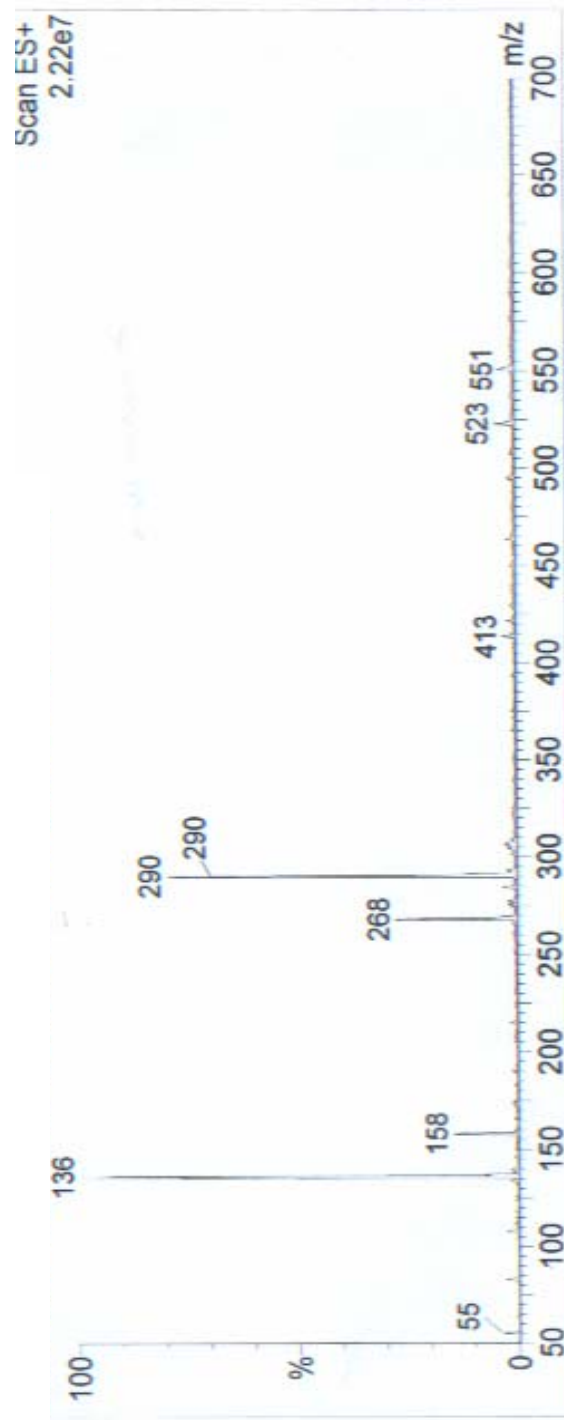


FIGURA 4.101: Espectro de massas (*full scan*) ESI (-) de S-16

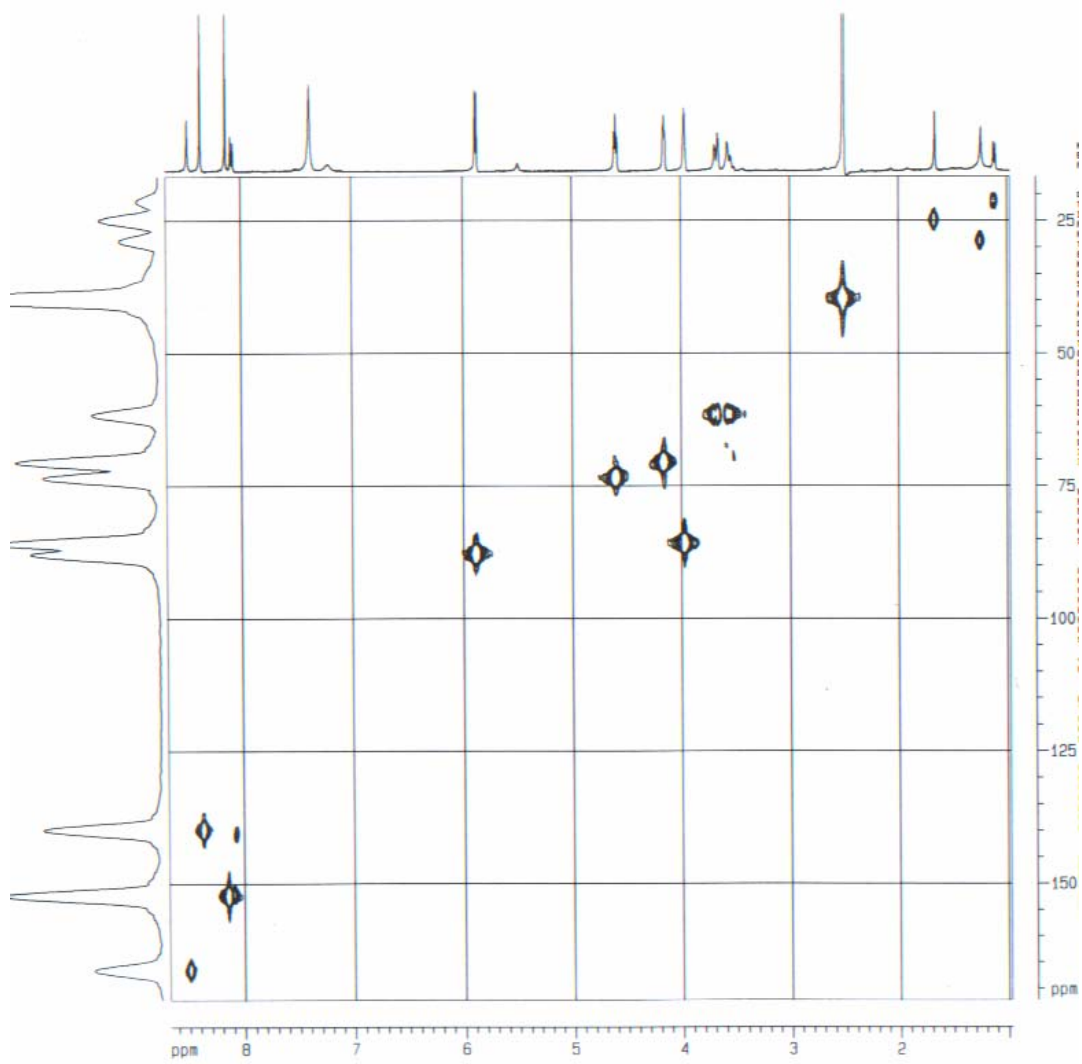


FIGURA 4.102: Experimento de HSQC de S-16

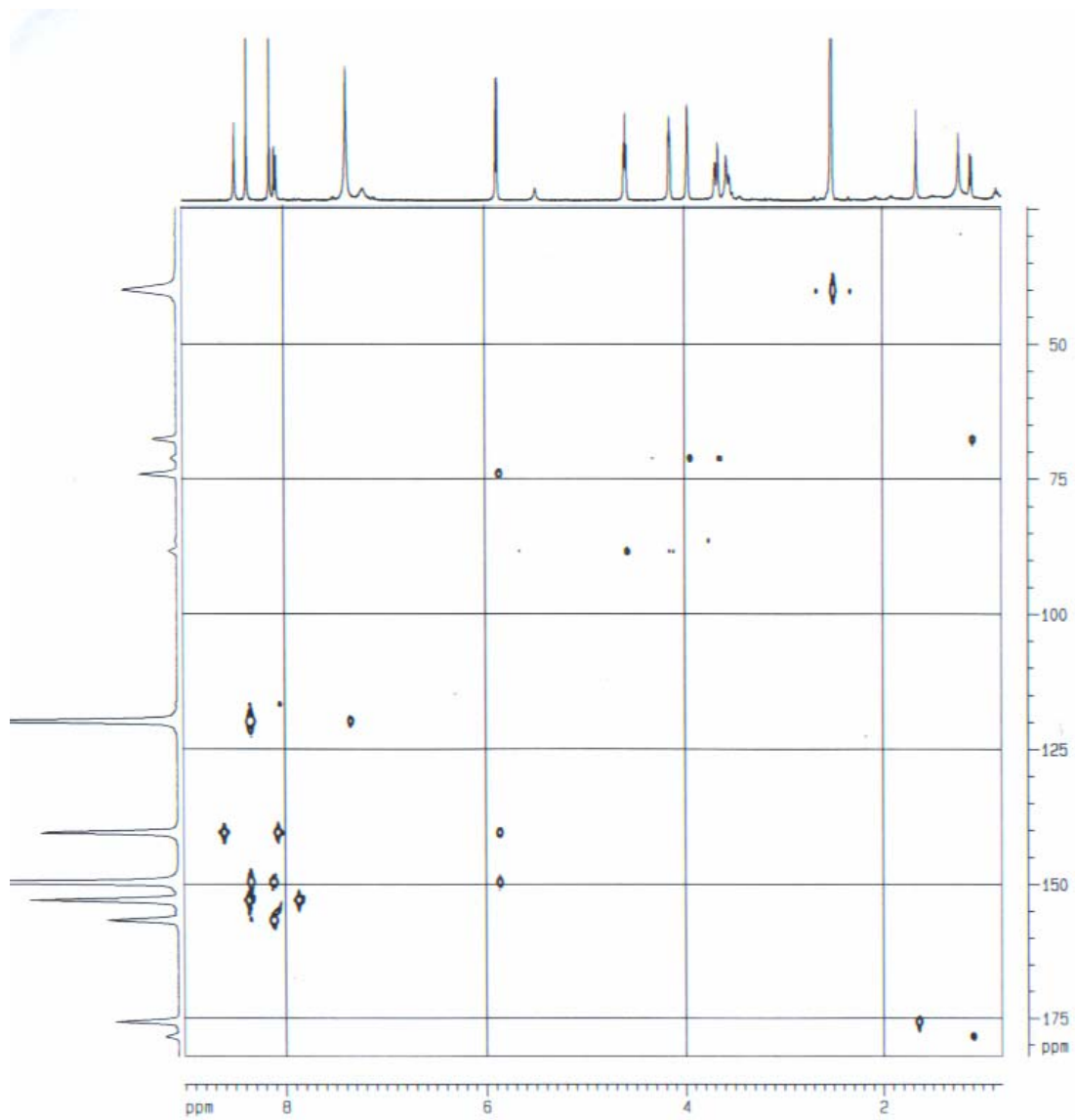


FIGURA 4.103: Experimento de HMBC de S-16

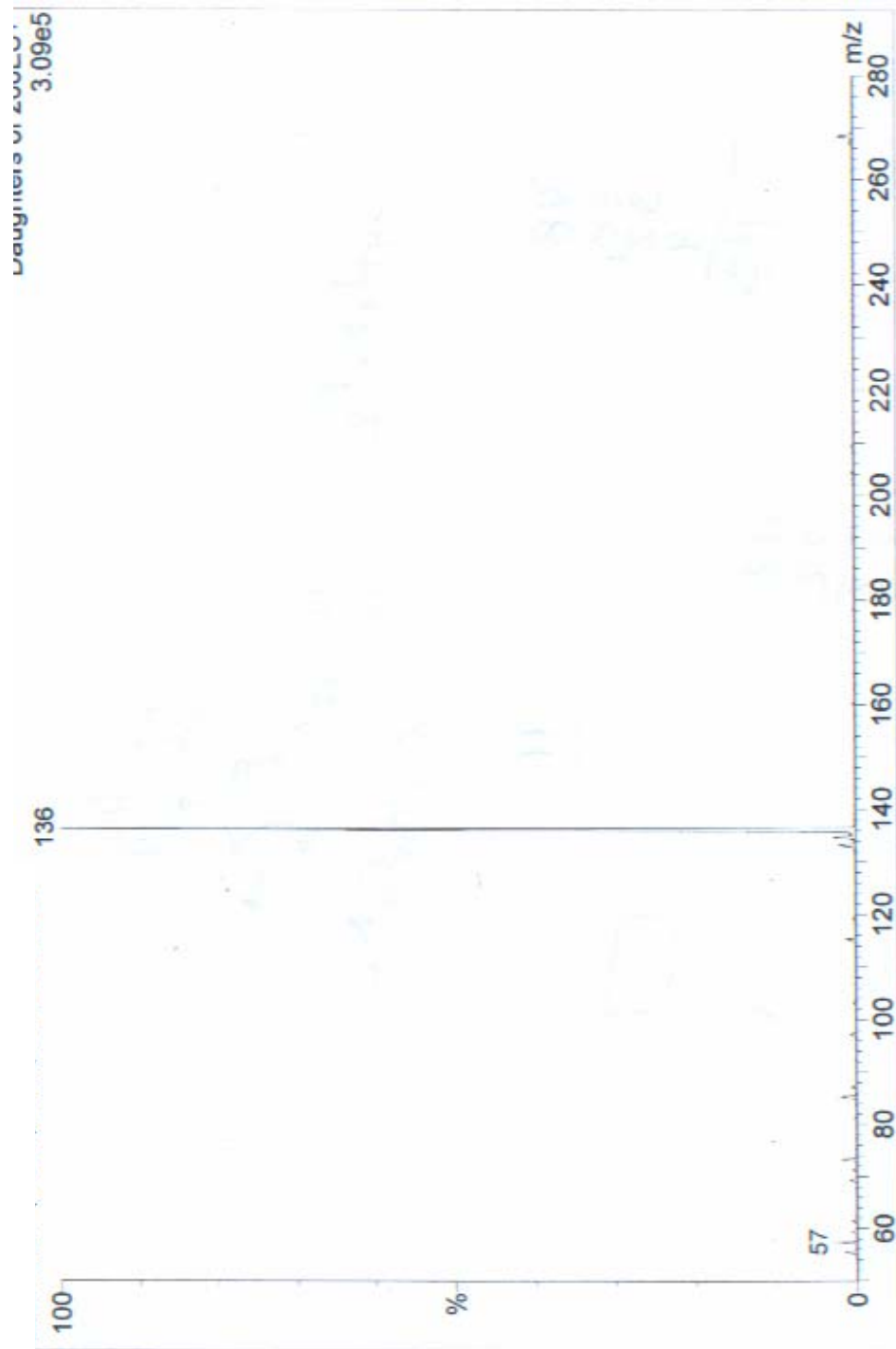


FIGURA 4.104: Espectro de íons filhos de m/z 268 de **S-16** (ESI (+), 20 eV)

4.2.4 - CARBOIDRATOS

4.2.4.1 - S-17 – Ducitol

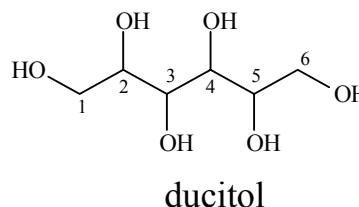
Essa substância foi isolada através de cromatografia em coluna utilizando-se sílica gel como estacionária e misturas de solventes orgânicos (hexano, acetona e metanol) em gradiente de polaridade como fase móvel na forma de um cristal branco solúvel em água.

Seu espectro de RMN ^1H (FIGURA 4.105) apresentou apenas um sinal multipeto em δ 3,70. Este sinal então foi atribuído aos hidrogênios carbinólicos presentes no composto. Fez-se, então, um espectro de RMN ^{13}C (FIGURA 4.106) para S-17 e observou-se apenas três sinais no espectro δ 63,2, δ 69,3 e δ 70,9 todos referentes a carbonos carbinólicos.

Realizou-se um espectro de massas ESI (-) (FIGURA 4.107) onde foi observado o m/z 181 que levou a proposta da seguinte fórmula molecular $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_6$. Os dados foram comparados com a literatura (TABELA 4.17) onde observou similaridade com os dados do ducitol, que é um polioliol com um centro de simetria, o que justifica a presença de apenas três sinais no espectro de RMN ^{13}C . Então S-17 foi identificado como sendo o polioliol ducitol.

TABELA 4.17: dados de RMN ^{13}C de S-17 (D_2O , 200 MHz)

C	S-17	Lit [67]
1/6	63,2	63,2
2/5	69,3	69,4
3/4	70,9	70,2



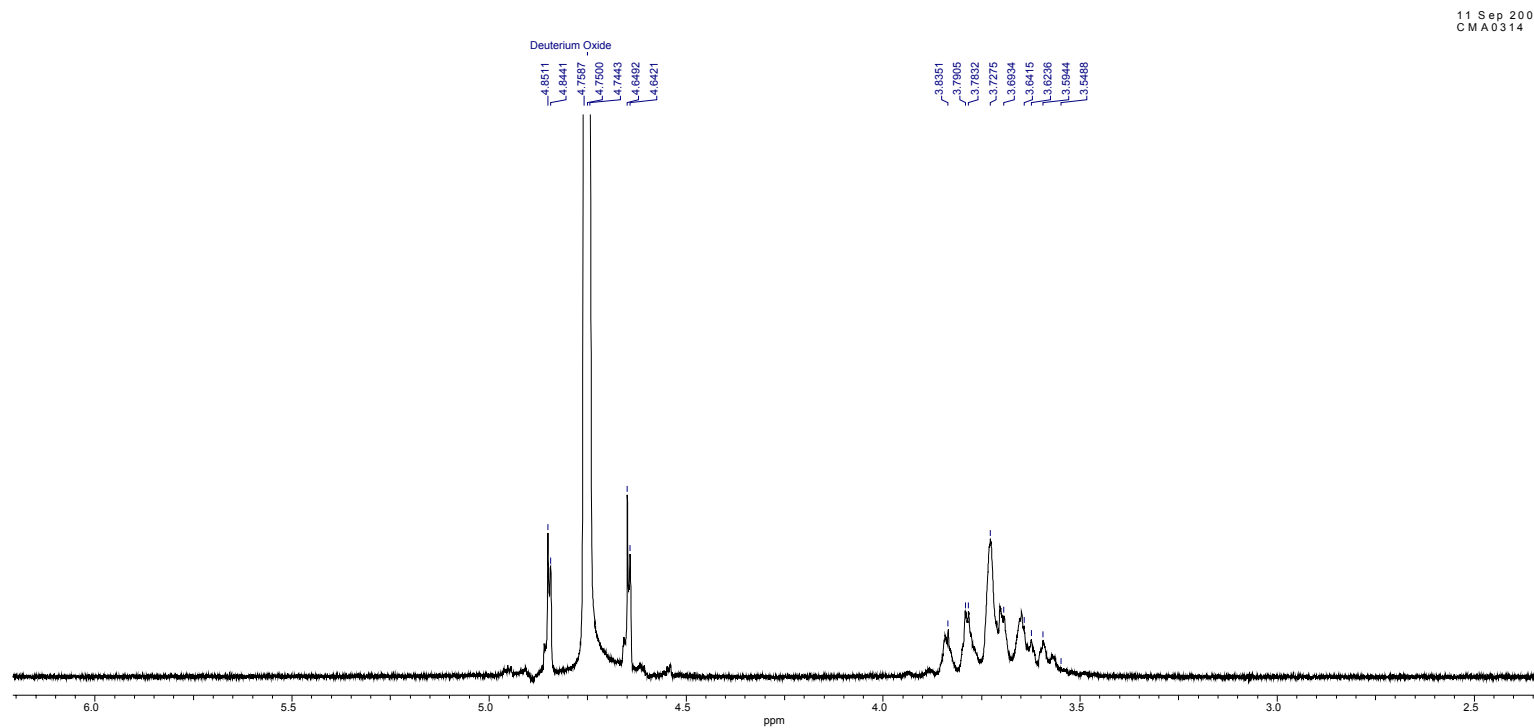


FIGURA 4.105: Espectro de RMN ^1H de S-17 (D_2O , 200 MHz)

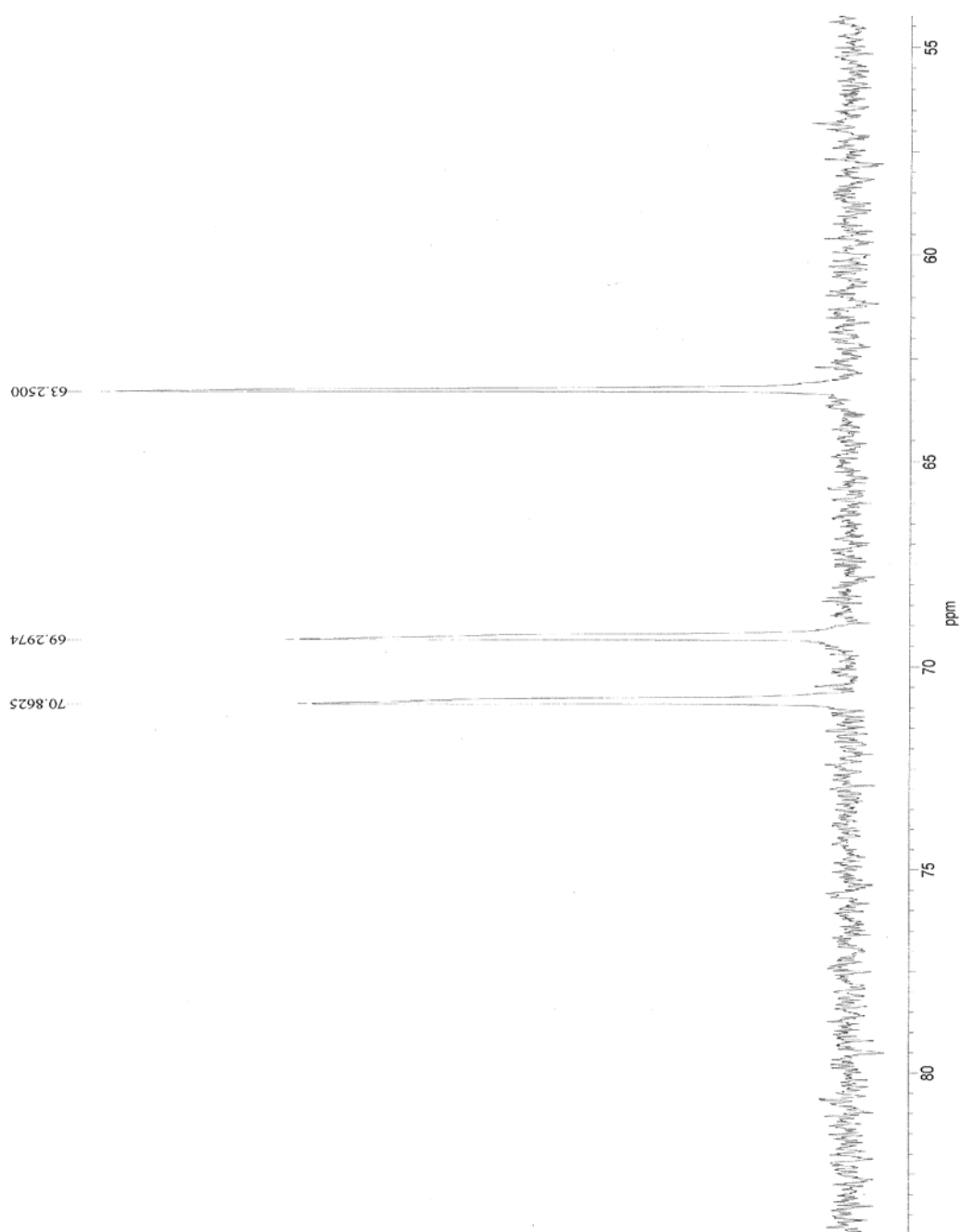


FIGURA 4.106: Espectro de RMN ^{13}C obtido para S-17 (D_2O , 50 MHz)

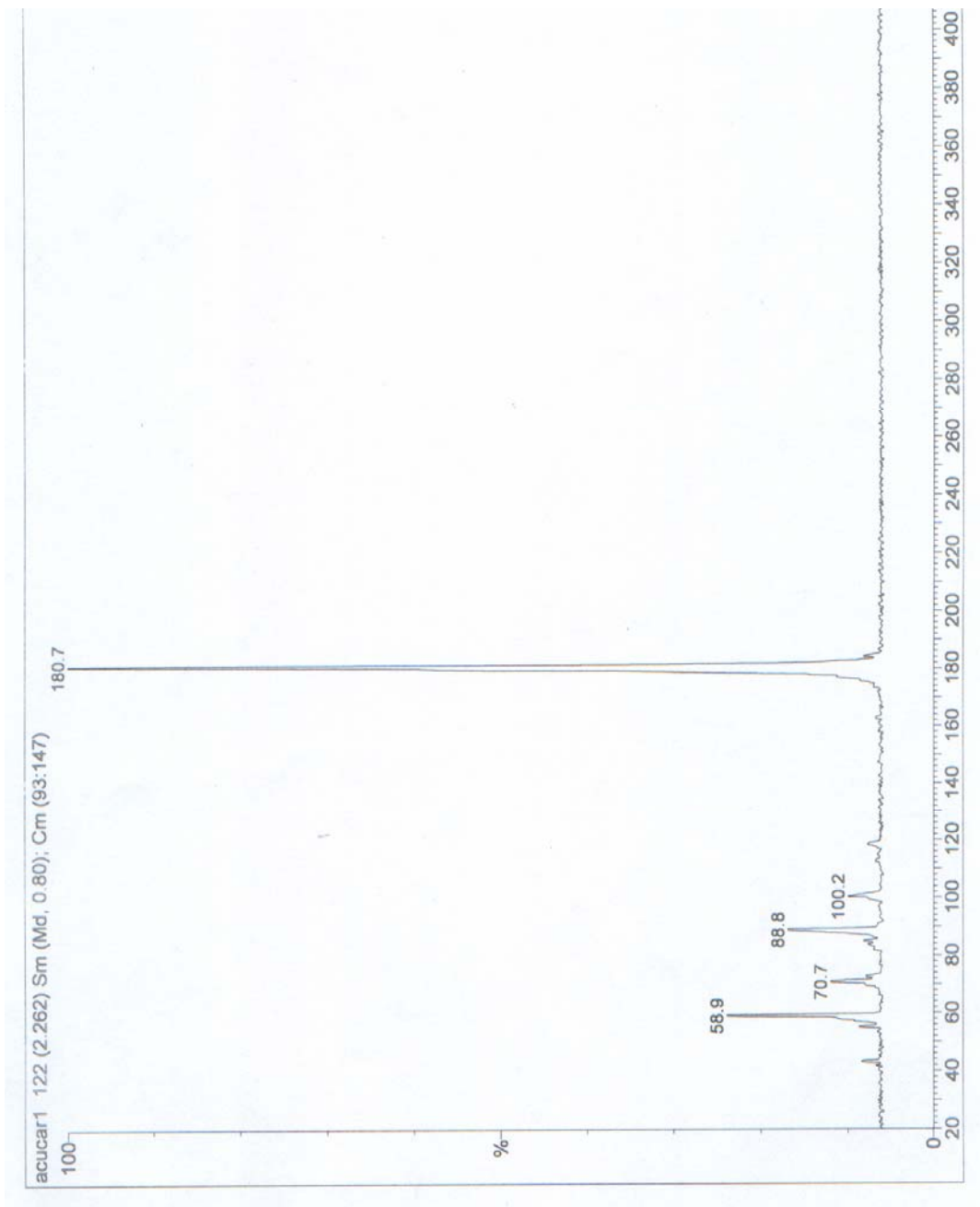


FIGURA 4.107: Espectro de massas (*full scan*) ESI (-) obtido para S-17

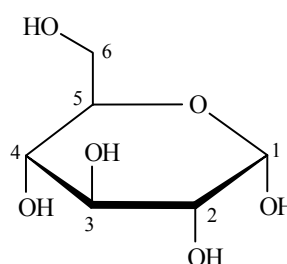
4.2.4.2 - S-18 – Alfa-D-glucopirranose

A substância **S-18** foi obtida na forma de um cristal branco solúvel em água através de métodos clássicos de cromatografia. Estas informações nos levaram a propor que **S-18** tratava-se de um outro açúcar. O espectro de RMN ^1H (FIGURA 4.108) mostrou-se típico de um açúcar com sinal multipletto em δ 3,20 - 3,90, observou-se ainda um sinal dubleto em δ 5,11 com constante de acoplamento de 3,6 Hz, este valor de J indica que temos um açúcar com o hidrogênio anomérico na posição pseudo-equatorial.

Foi realizado um espectro de RMN ^{13}C (FIGURA 4.109) onde observou-se a presença de seis sinais no espectro, sendo um sinal em δ 92,8 confirmando a existência de um carbono anomérico no composto. Seus dados de RMN ^{13}C foram comparados com dados da literatura (TABELA 4.18) onde se conclui que **S-18** tratava-se do açúcar alfa-glucopirranose.

TABELA 4.18: dados de RMN ^{13}C de **S-18** (D_2O , 200 MHz)

C	S-18	Lit [54]
1	92,8	91,9
2	71,6	71,3
3	72,4	72,5
4	69,7	69,4
5	71,0	71,3
6	60,4	60,4



Alfa-glucopirranose

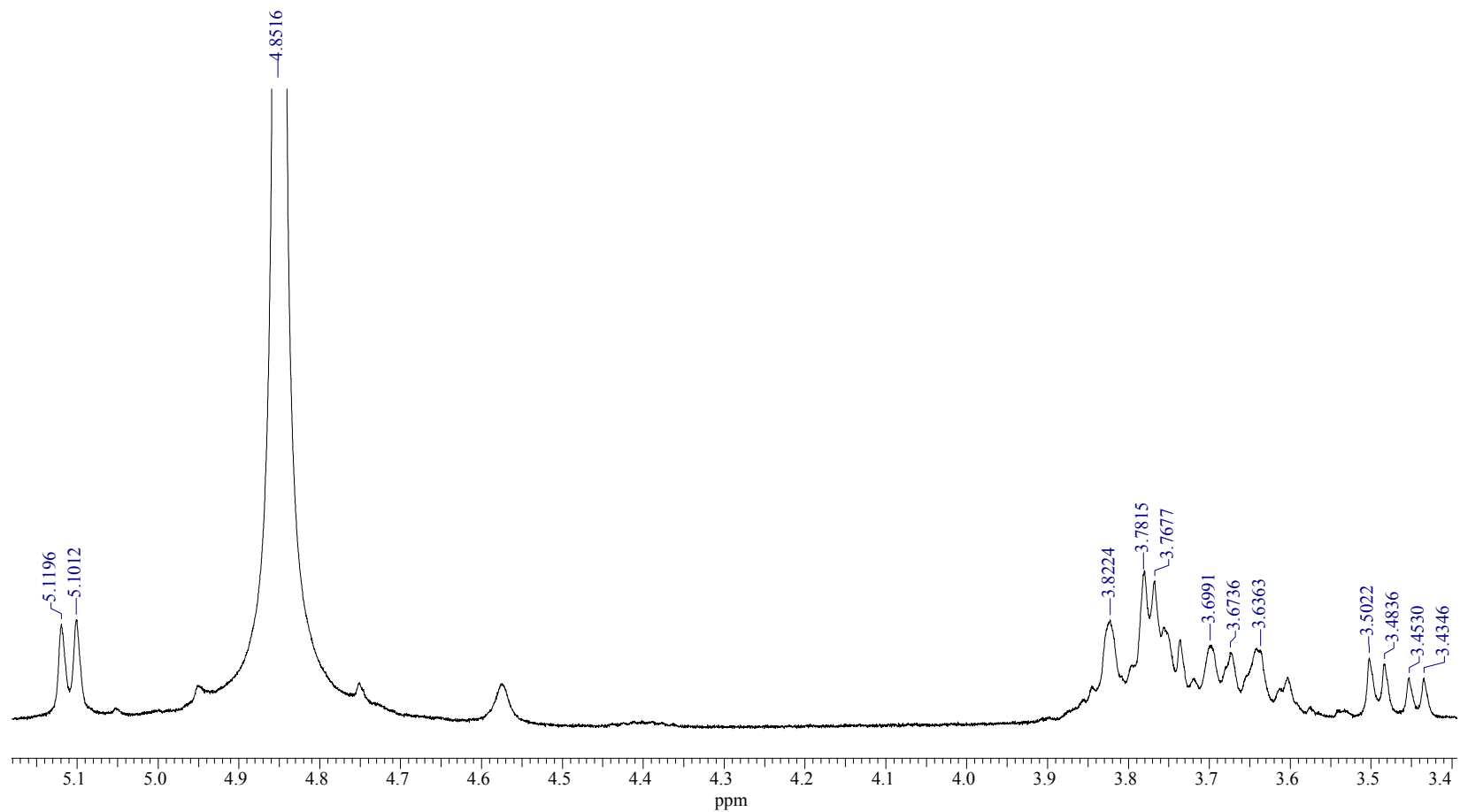


FIGURA 4.108: Espectro de RMN ¹H de S-18 (D₂O, 200 MHz)

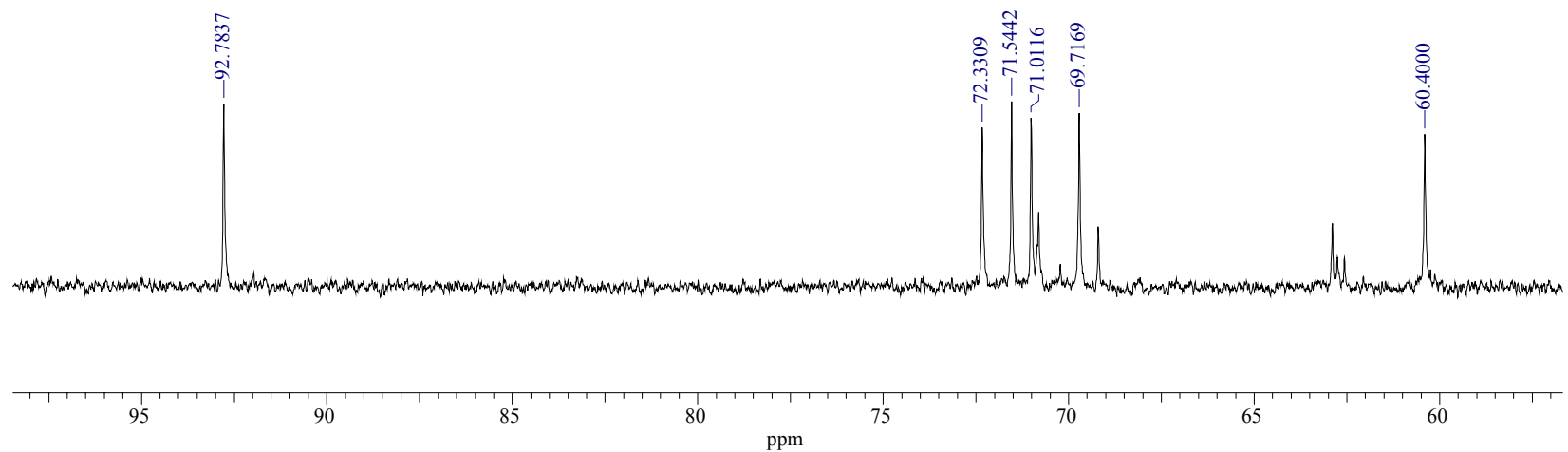


FIGURA 4.109: Espectro de RMN ¹³C de **S-18** (D₂O, 50 MHz)

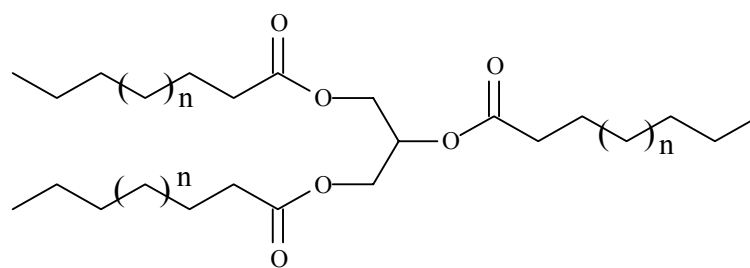
4.2.5 - GLICERÍDEOS

4.2.5.1 - S-19 – Triglicerídeos

Essa substância foi isolada como um óleo amarelo das frações apolares com o uso de cromatografia em coluna. Seu espectro de RMN ^1H (FIGURA 4.110) apresentou sinais típicos de triglicerídeos, um sinal triplete referente a metila terminal de cadeia alcânica em δ 0,82, outro sinal triplete de hidrogênio ligado a carbono vizinho a carbonila de éster em δ 2,25, dois sinais duplo dubleto em δ 4,08 e δ 4,45 referentes aos hidrogênios do glicerol e o multiplete em δ 5,32 refere-se aos hidrogênios olefinicos.

No espectro de RMN ^{13}C (FIGURA 4.111) foram observados sinais de carbonilas em δ 172,5 e δ 173,0, este referente a duas carbonilas. Foram observados sinais referentes a carbonos olefinicos em δ 127,6, δ 129,5, δ 129,7, δ 129,8 e δ 129,9, que indicam a presença de três ligações duplas no composto. Além dos sinais referentes aos carbonos metilênicos e de metilas viu-se ainda sinais referentes a carbonos carbinólicos em δ 61,9 e δ 68,8, que pelo espectro de DEPT 135 (FIGURA 4.112) δ 61,9 é referente a carbonos metilênicos e δ 68,8 a carbono metínico.

Para a identificação dos ácidos graxos que esterificam o glicerol foi realizado uma reação de transesterificação e o produto obtido foi injetado no CG/EM para análise (TABELA 4.19).



triglicerídeo

TABELA 4.19: ácidos graxos que esterificam o glicerol

Ácido graxo	Abundância (%)	Tempo de retenção (min)
Ácido hexadenóico (palmítico)	35,20	9,97
Ácido 12,15-octadenóico	14,46	12,60
Ácido 10-octadenóico	50,14	12,70

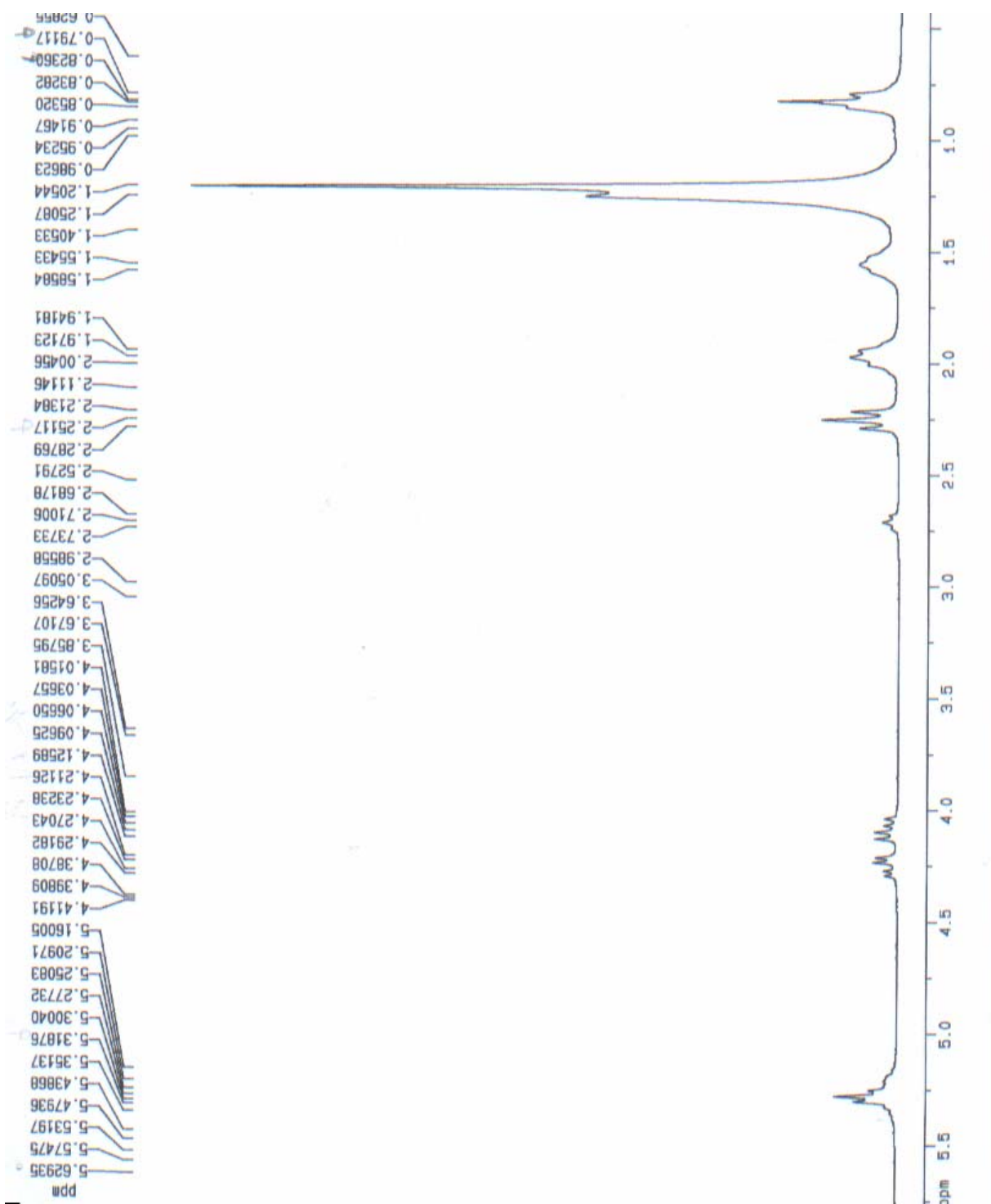


FIGURA 4.110: Espectro de RMN ^1H obtido para **S-19** (CDCl_3 , 200 MHz)

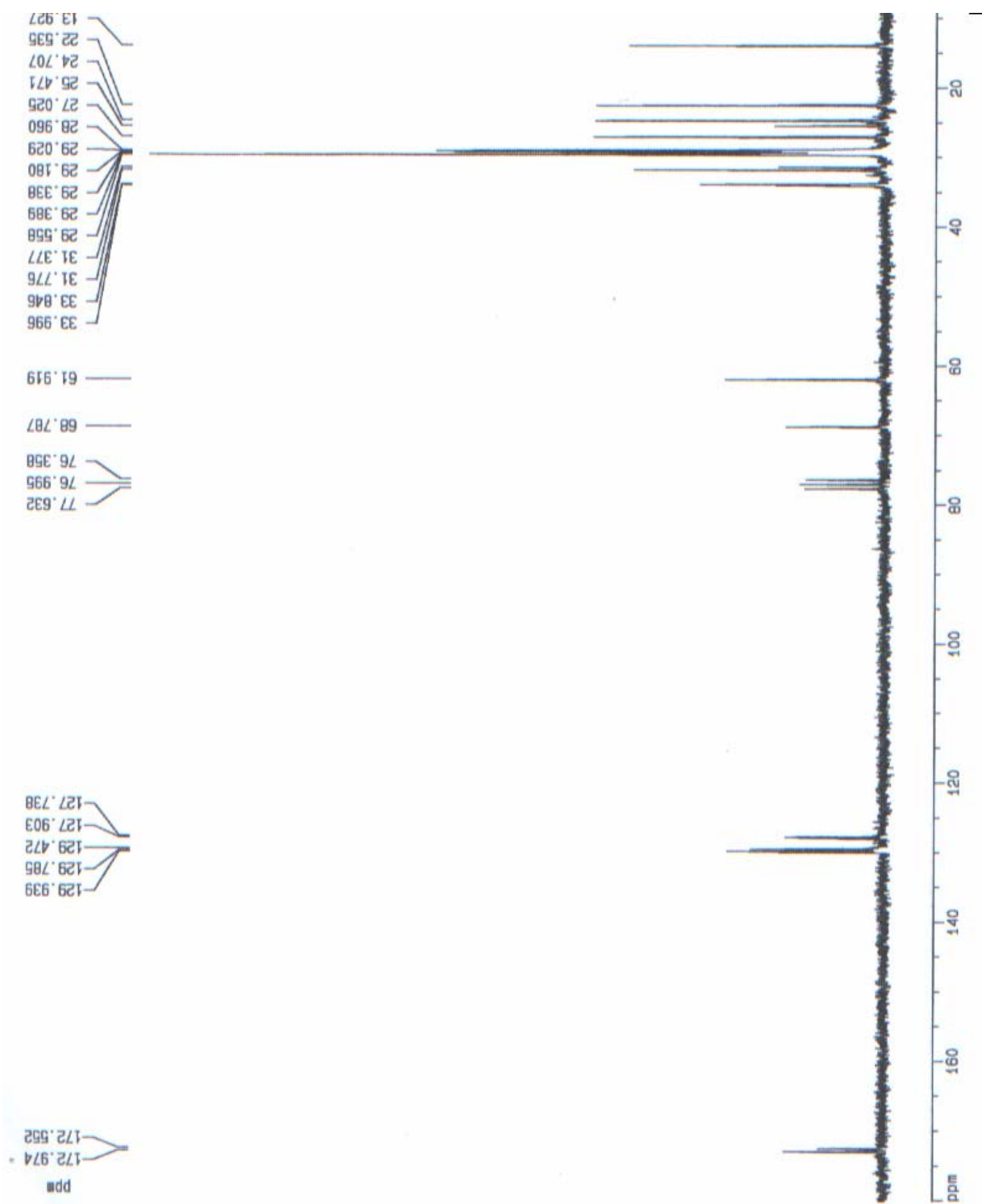


FIGURA 4.111: Espectro de RMN ¹³C obtido para **S-19** (CDCl₃, 50 MHz)

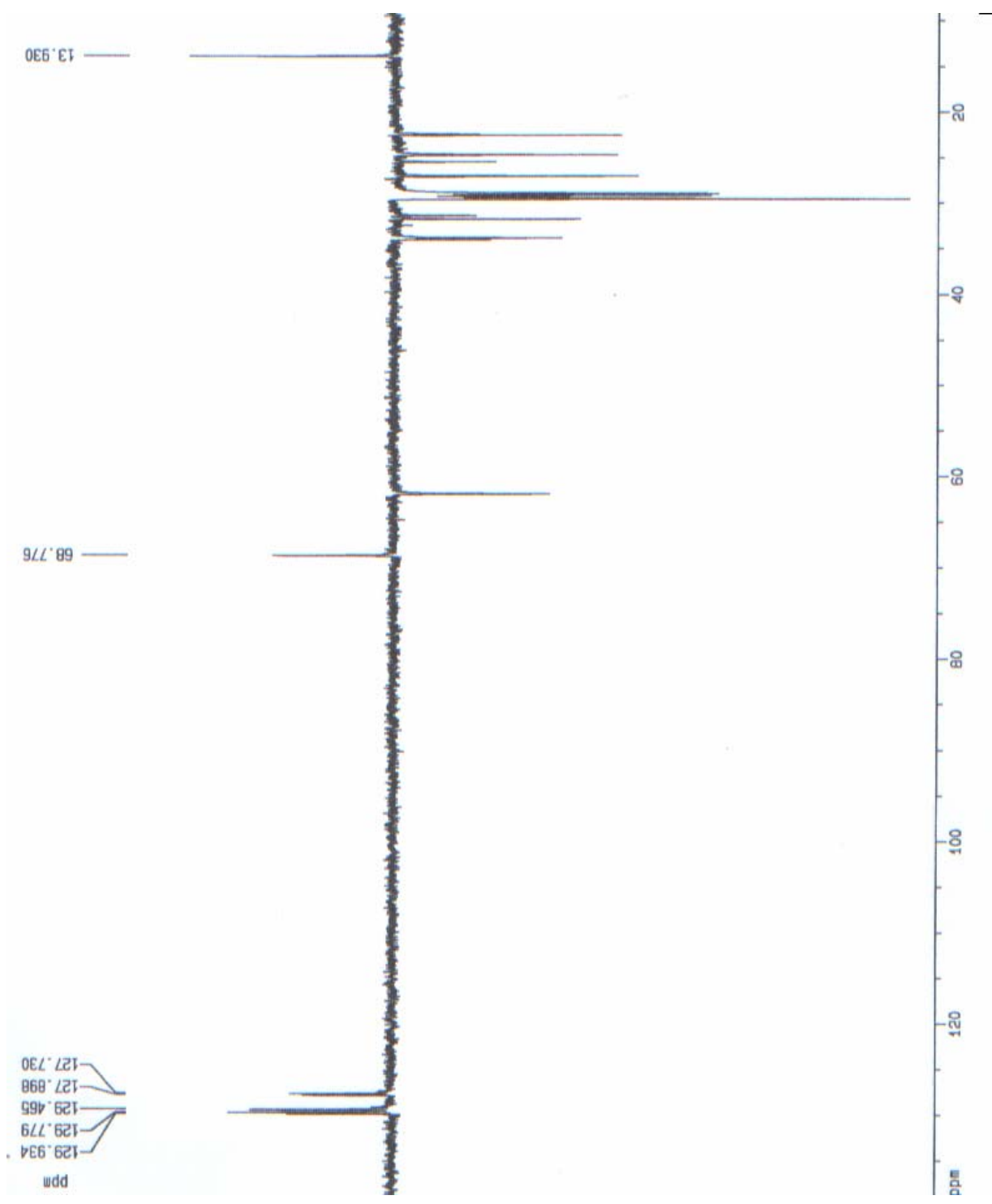


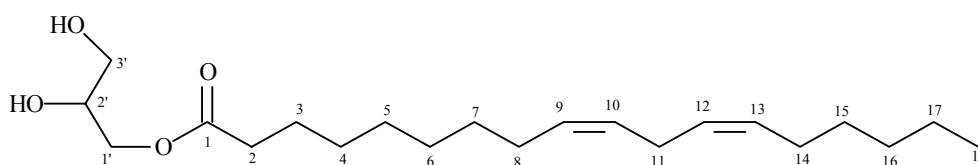
FIGURA 4.112: Espectro de DE`PT 135 obtido para S-19 (CDCl₃, 50 MHz)

4.2.5.2 - S-20 – Monoglicerídeo

A substância **S-20** foi isolada da fase diclorometânica do extrato do arroz de *P. herquei* através de métodos clássicos de cromatografia como um óleo vermelho. O padrão espectral apresentado no espectro de RMN ^1H (FIGURA 4.113) é parecido ao de **S-19** com sinal referente a metila terminal de ácido graxo em δ 0,86 (*t*, $J = 6,8$ Hz), um sinal singlete intenso referente aos hidrogênios metilênicos em δ 1,28, apresentou também um sinal em δ 2,31 (*t*, $J = 7,6$ Hz) típico de hidrogênio vizinho a carbonila, mostrou ainda o sinal δ 5,33 (*m*) atribuído a presença de hidrogênio olefínicos no composto. Mas a diferença estava na região dos hidrogênios carbinólicos do glicerol, no espectro de RMN ^1H de **S-19** era observado dois sinais duplo dubleto entre δ 4,00 – 4,30, enquanto que no espectro de **S-20** os sinais referentes aos hidrogênios carbinólicos estão mais blindados e o espectro apresenta dois sinais adicionais. Temos dois sinais duplo dubleto em δ 3,55 (*dd*, $J = 6,3$ e $11,7$ Hz) e δ 3,64 (*dd*, $J = 3,7$ e $11,7$ Hz), um sinal quinteto em δ 3,89 (*q*, $J = 5,5$ Hz) e um sinal dubleto em δ 4,10 (*d*, $J = 5,5$ Hz).

O espectro de RMN ^{13}C (FIGURA 4.114) apresentou 21 sinais e um padrão comum para glicerídeos com um sinal em δ 174,2 referente a uma carbonila de éster, quatro sinais de carbonos olefínicos em δ 127,8, δ 128,0, δ 129,9 e δ 130,1 indicando a existência de duas ligações duplas no composto, mostrou também três sinais típicos de carbonos carbinólicos em δ 63,3, δ 65,0 e δ 70,1. Pelo espectro de DEPT 135 (FIGURA 4.115) observou-se que os sinais δ 63,3 e δ 65,0 eram referentes a carbonos metilênicos e o sinal δ 70,1 referente a carbono metínico. Foram observados ainda no espectro de RMN ^{13}C sinais de carbonos metilênicos e um sinal em δ 13,9 de metila terminal.

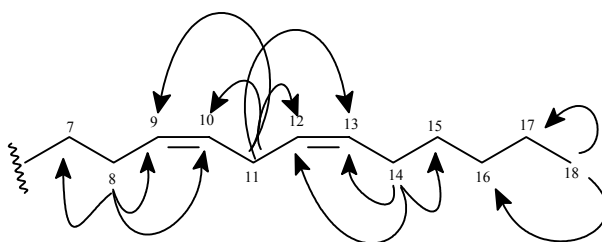
No espectro de massas ESI (+) de **S-20** (FIGURA 4.116) observou-se um m/z 377 [M+Na] referente ao adulto de sódio do composto indicando que o este possuía a massa 354 Da. Estas informações juntamente com os dados de RMN ^1H e ^{13}C permitiram propor a seguinte formula molecular $\text{C}_{21}\text{H}_{38}\text{O}_4$. Através da análise dos dados de RMN 2D foi possível determinar a estrutura de **S-20** como sendo um monoglicerídeo constituído por uma unidade de glicerol ligada e uma unidade de ácido linoléico.



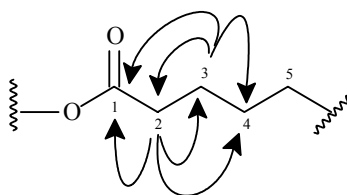
monoglicerídeo

No experimento de HSQC (FIGURA 4.117) temos a correlação do sinal em δ 0,86 (Me-18) com o sinal do carbono em δ 13,9. No experimento de HMBC (FIGURA 4.118) Me-18 apresentou correlações com os sinais de δ 22,5 (C-17) e δ 31,4 (C-16) e no experimento de COSY (FIGURA 4.119) correlaciona com o sinal singlete em δ 1,28 referente aos hidrogênios metilênicos da cadeia graxa. Podemos ver no HSQC que hidrogênio em δ 2,02 (H-8 e H-14) está ligado ao carbono em δ 27,1. No experimento de HMBC o sinal de H-8/14 correlaciona com os sinais dos carbonos em δ 128,0/127,8 (C-9/13) e δ 130,1/129,0 (C-10/12) além de correlacionar com o sinal em δ 29,0 e no experimento de COSY correlaciona com o sinal em δ 5,33 e δ 1,28 indicando que H-8/14 está próximo a ligação dupla. Temos também a correlação no espectro de HSQC de δ 2,74 (H-11) com o carbono δ 25,5. H-11 apresenta correlações no experimento de HMBC com C-9/13 e com c-

10/12 e no experimento de COSY apresenta como única correlação com δ 5,33 sugerindo que H-11 esteja localizado entre as ligações duplas. As correlações de HMBC são mostradas a seguir.

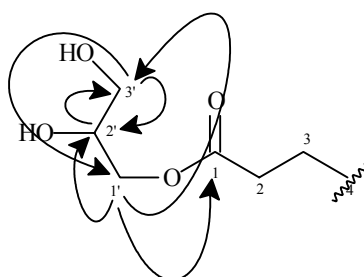


O sinal em δ 1,59 (H-3) está correlacionando no HSQC com o carbono em δ 24,8. O espectro de HMBC H-3 correlaciona com δ 29,0, com δ 174,2 atribuído a carbonila C-1 e com o carbono em δ 34,0 (C-2). Este está correlacionando no HSQC com o sinal do hidrogênio em δ 2,31 (H-2). H-2 correlaciona no espectro de HMBC com os carbonos C-3, carbonila C-1 e com os carbonos metilênicos δ 29,0.



Na parte da molécula referente ao glicerol temos a correlação no experimento de HSQC do sinal em δ 3,89 (H-2') com o carbono localizado em δ 70,1. No HMBC este correlaciona com o carbono δ 63,3 (C-3'). Os sinais duplo dubleto δ 3,55 e δ 3,64 (H-3'a e H-3'b) correlacionam no experimento de HSQC com o carbono C-3' onde estes no mapa de correlações de HMBC correlacionam

com os carbonos em δ 70,1 e 65,0 (C-1'). Fechando as correlações temos no experimento de HSQC a correlação de δ 4,10 (H-1') com o carbono C-1'. E no experimento de HMBC H-1' correlaciona com os carbonos C-2', C-3' e com o sinal da carbonila 174,2 (C-1), esta correlação mostra o ponto de ligação entre o glicerol e o ácido linoleico para a formação do monoglicérideo. As correlações são mostradas a seguir.



Através da análise dos dados espectrais foi possível determinar a estrutura de **S-20** como sendo um monoglicérideo. Seus dados de RMN ^1H e ^{13}C encontram-se na TABELA 4.20.

TABELA 4.20: Dados de RMN ^1H e ^{13}C de **S-20** (CDCl_3 , 200 e 400 MHz)

S-20		
	H (δ, <i>mult</i>, <i>J</i> em Hz / 400 MHz)	C (200 MHz)
1		174,2
2	2,31 (<i>t</i> , 7,6)	34,0
3	1,59 (<i>q</i> , 7,3)	24,8
4	1,28 (<i>sl</i>)	29,5
5	1,28 (<i>sl</i>)	29,2
6	1,28 (<i>sl</i>)	29,1
7	1,28 (<i>sl</i>)	29,0
8	2,02 (<i>q</i> , 6,8 e 13,6)	27,1
9	5,33 (<i>m</i>)	128,0
10	5,33 (<i>m</i>)	130,1
11	2,74 (<i>t</i> , 6,3)	25,5
12	5,33 (<i>m</i>)	129,9
13	5,33 (<i>m</i>)	127,8
14	2,02 (<i>q</i> , 6,8 e 13,6)	27,1
15	1,28 (<i>sl</i>)	29,0
16	1,28 (<i>sl</i>)	31,4
17	1,28 (<i>sl</i>)	22,5
18	0,86 (<i>t</i> , <i>J</i> = 6,8)	13,9
1'	4,10 (<i>d</i> , <i>J</i> = 5,5)	65,0
2'	3,89 (<i>m</i>)	70,1
3'a	3,65 (<i>dd</i> , 3,7 e 11,7)	63,3
3'b	3,55 (<i>dd</i> , 6,3 e 11,7)	

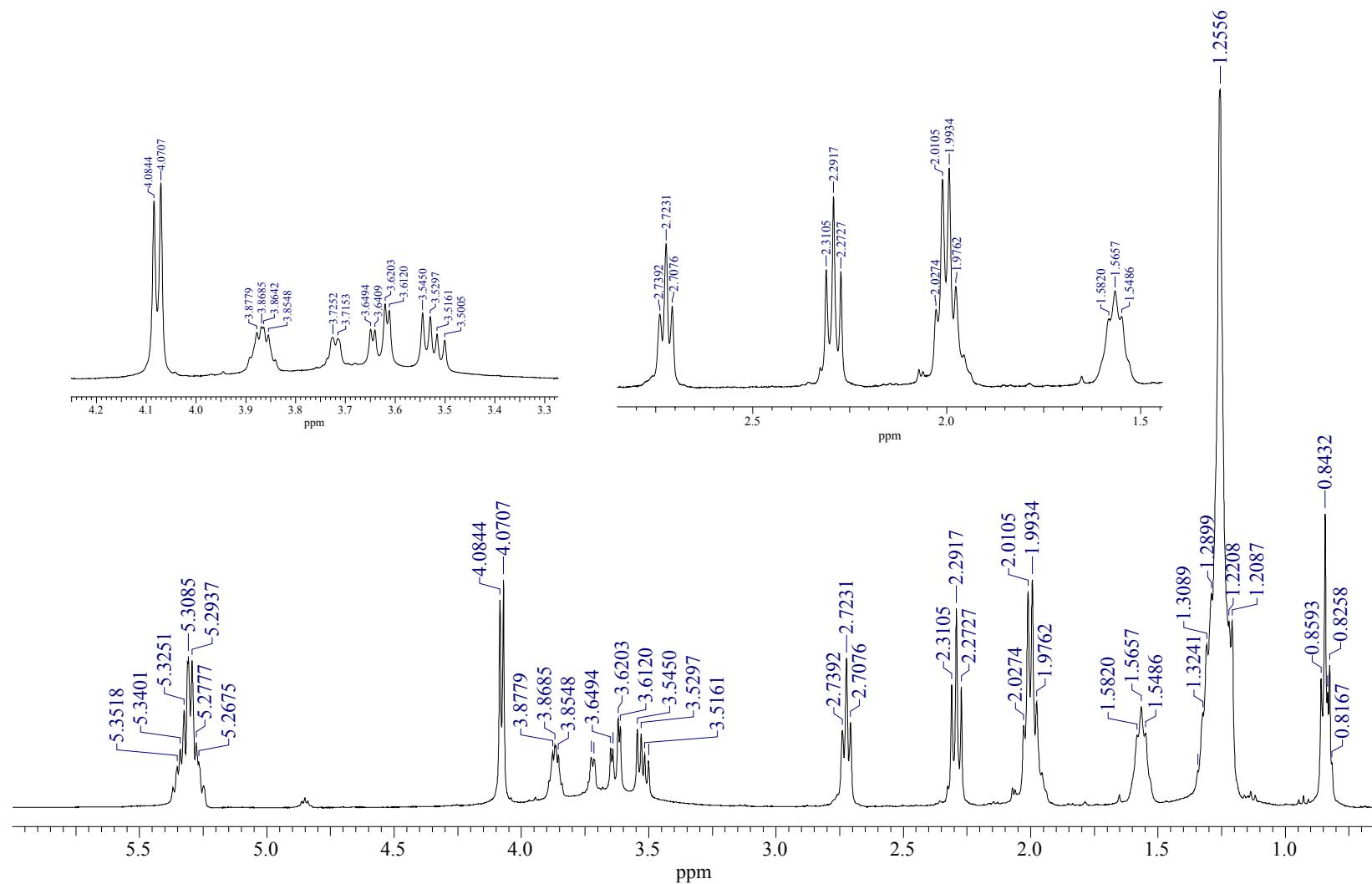


FIGURA 4.113: Espectro de RMN ^1H de S-20 (CDCl_3 , 400 MHz)

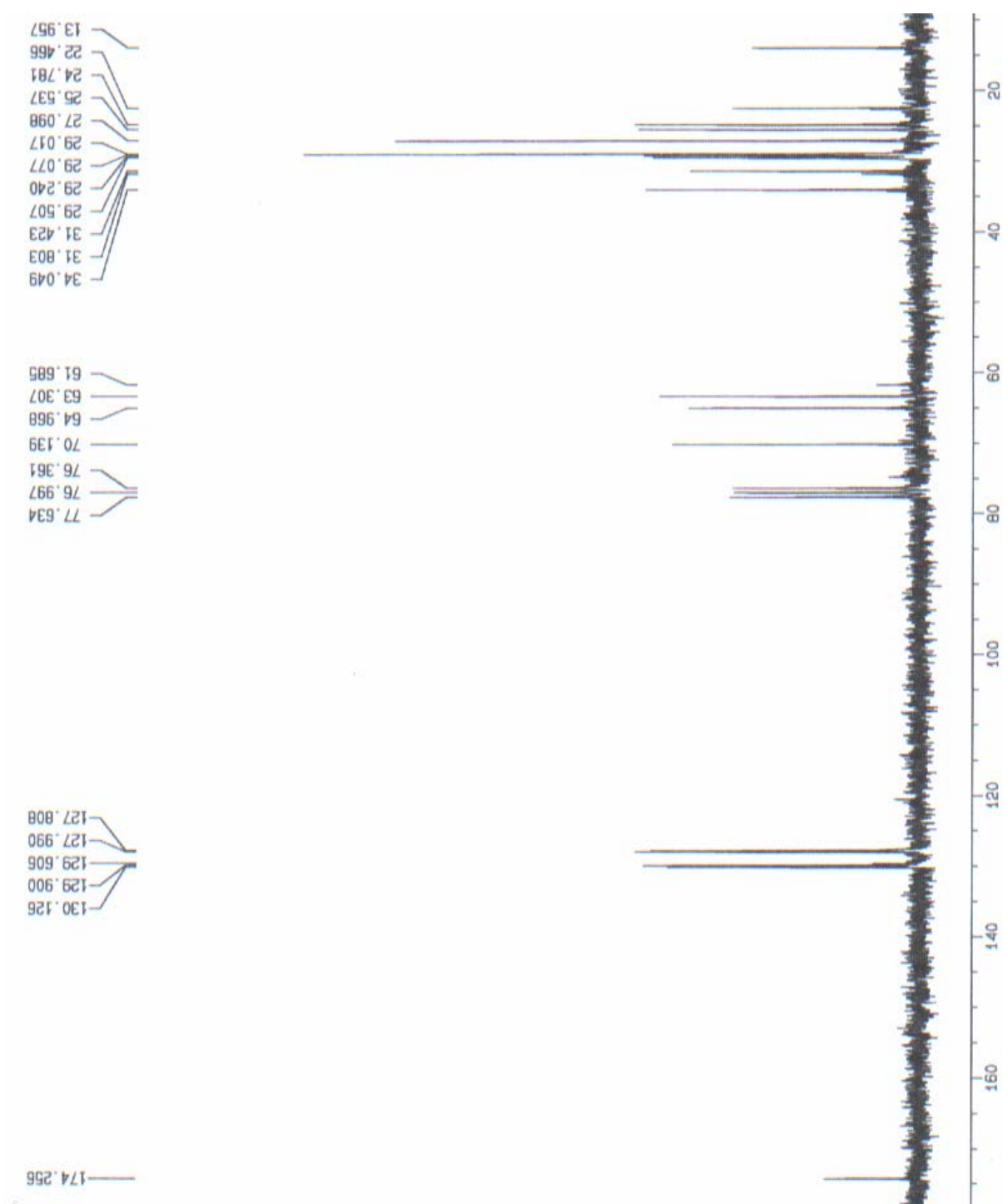


FIGURA 4.114: Espectro de RMN ^{13}C obtido para **S-20** (CDCl_3 , 200 MHz)

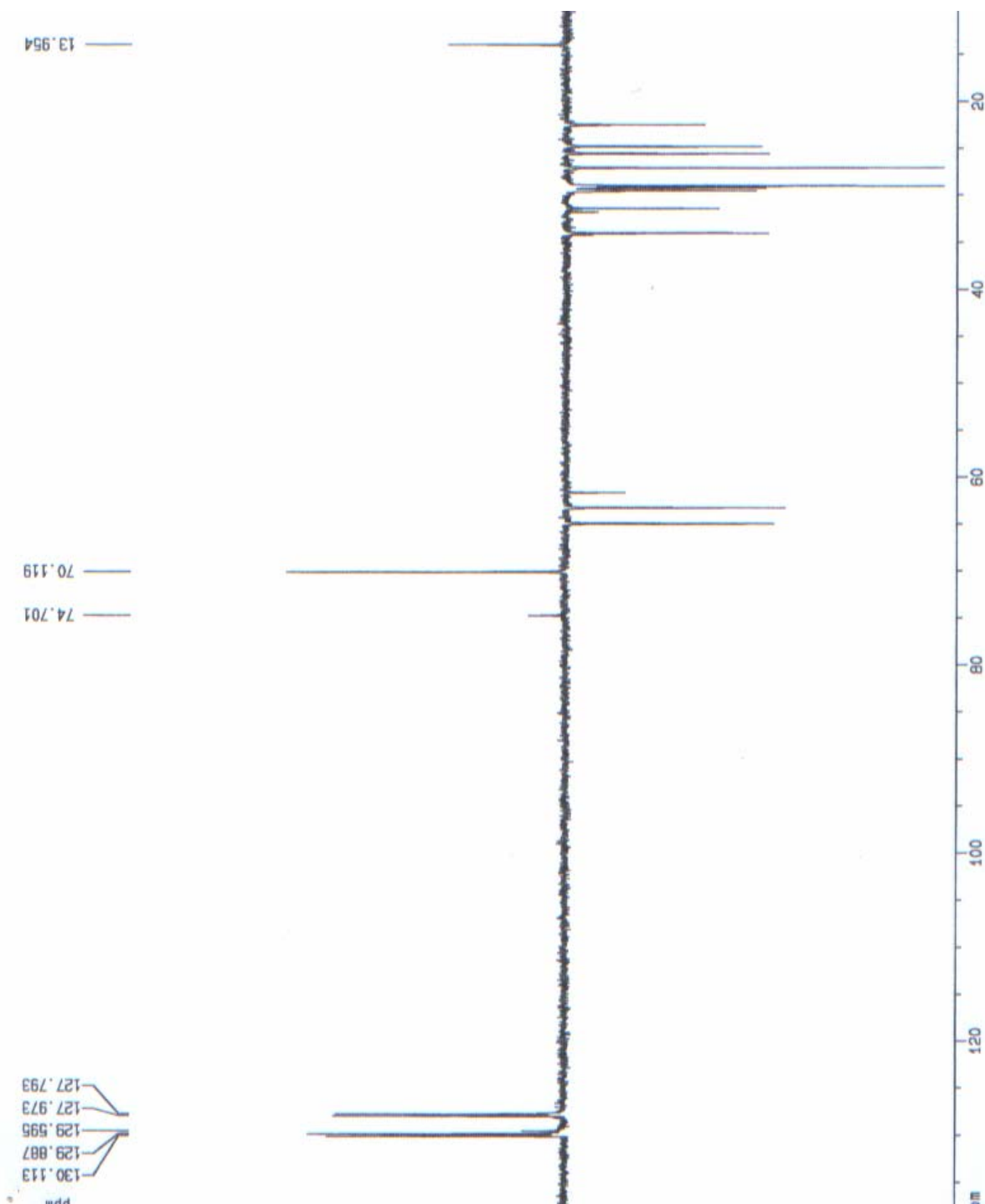


FIGURA 4.115: Espectro de DEPT 135° obtido para **S-20** (CDCl₃, 200 MHz)

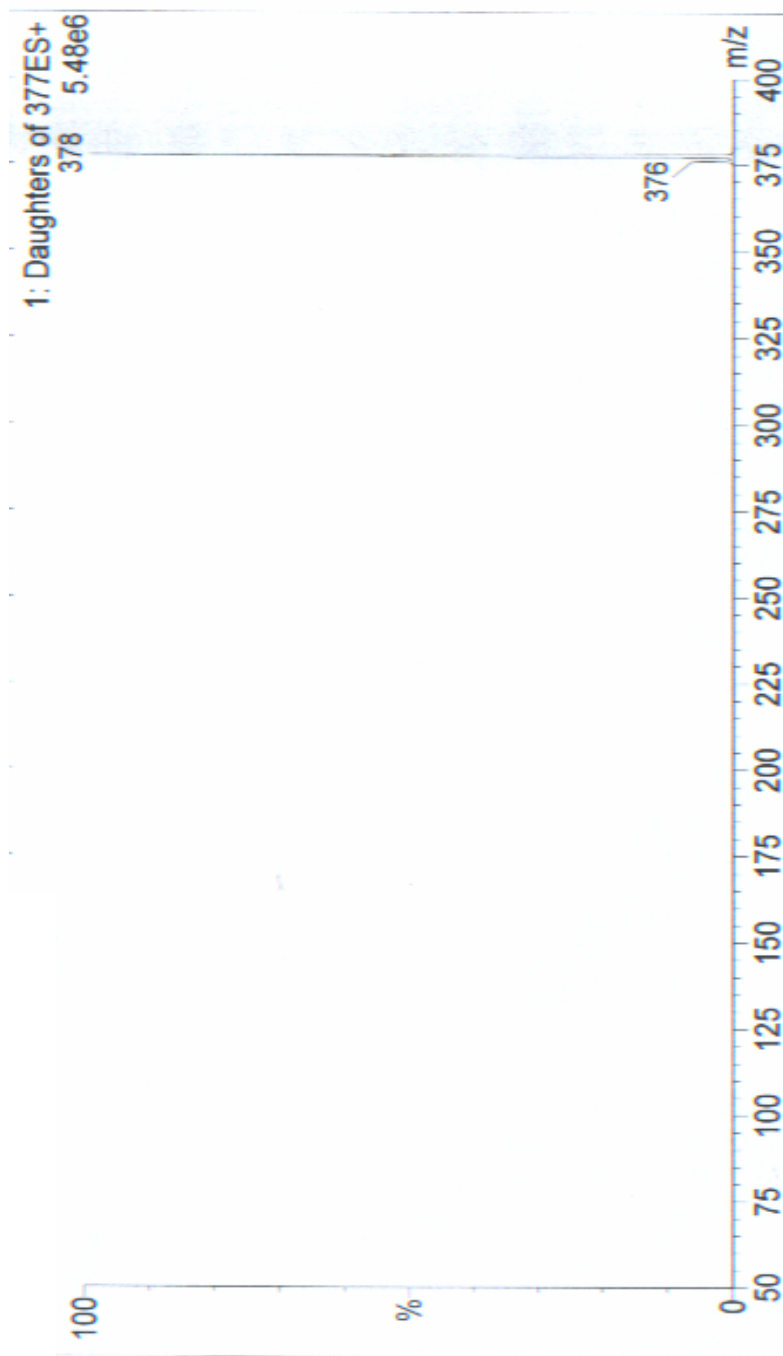


FIGURA 4.116: Espectro de massas (*full scan*) ESI (+) de S-20

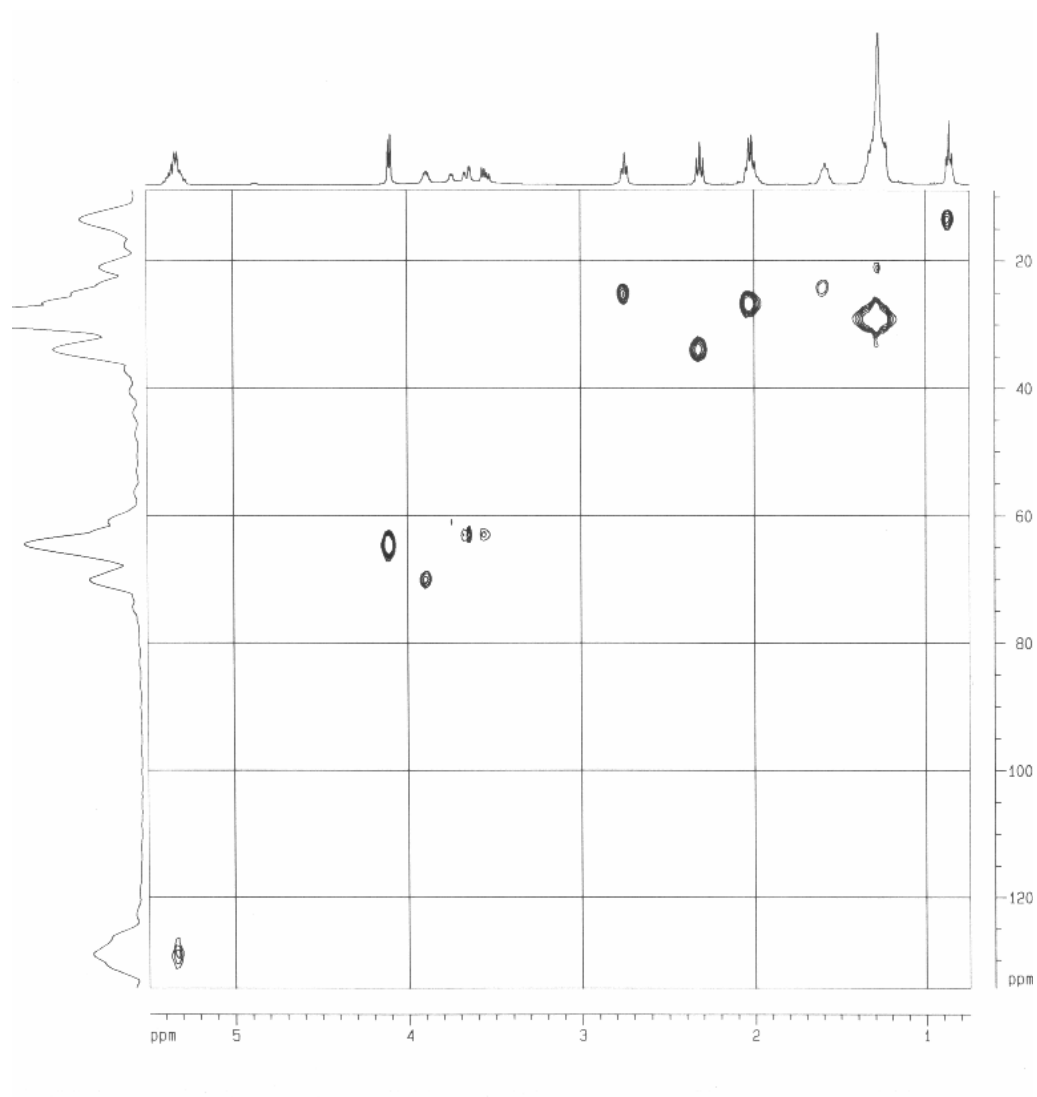


FIGURA 4.117: Experimento de HSQC de S-20

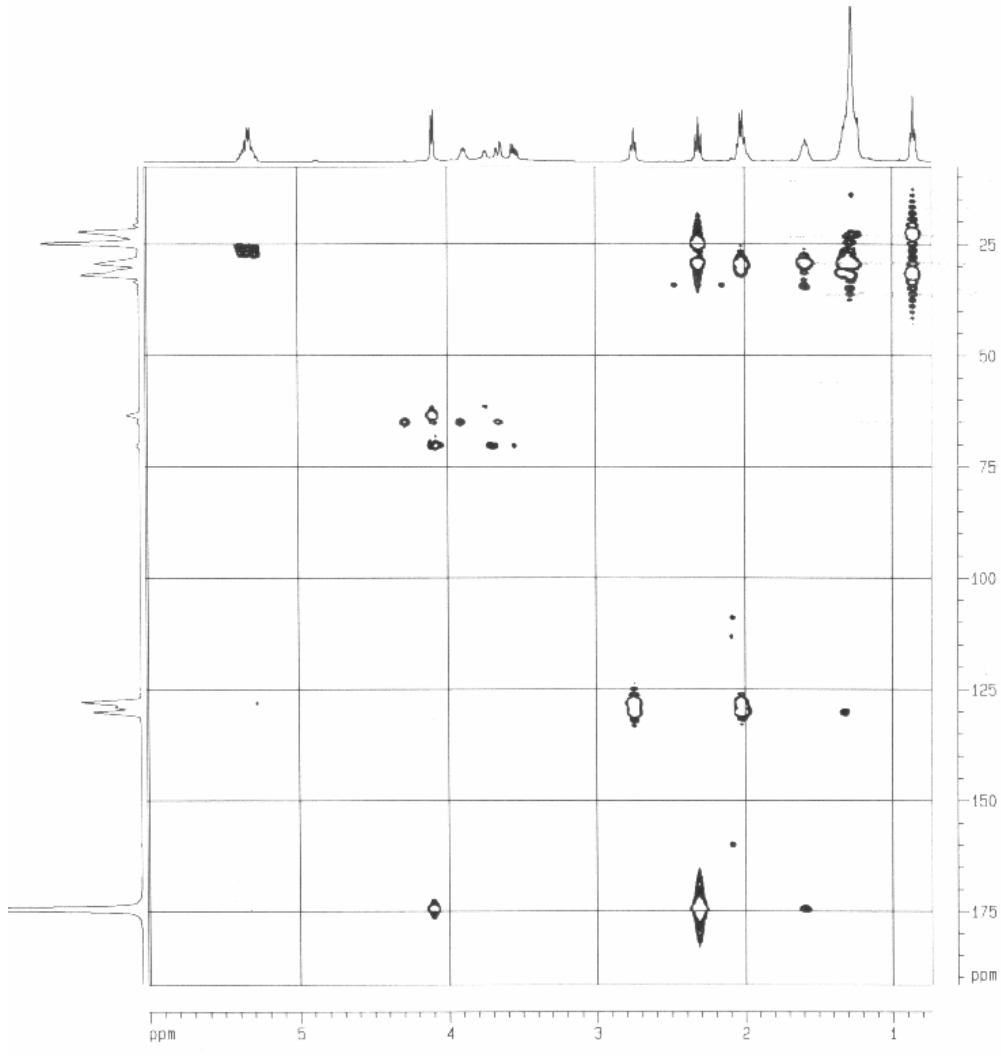


FIGURA 4.118: Experimento de HMBC de S-20

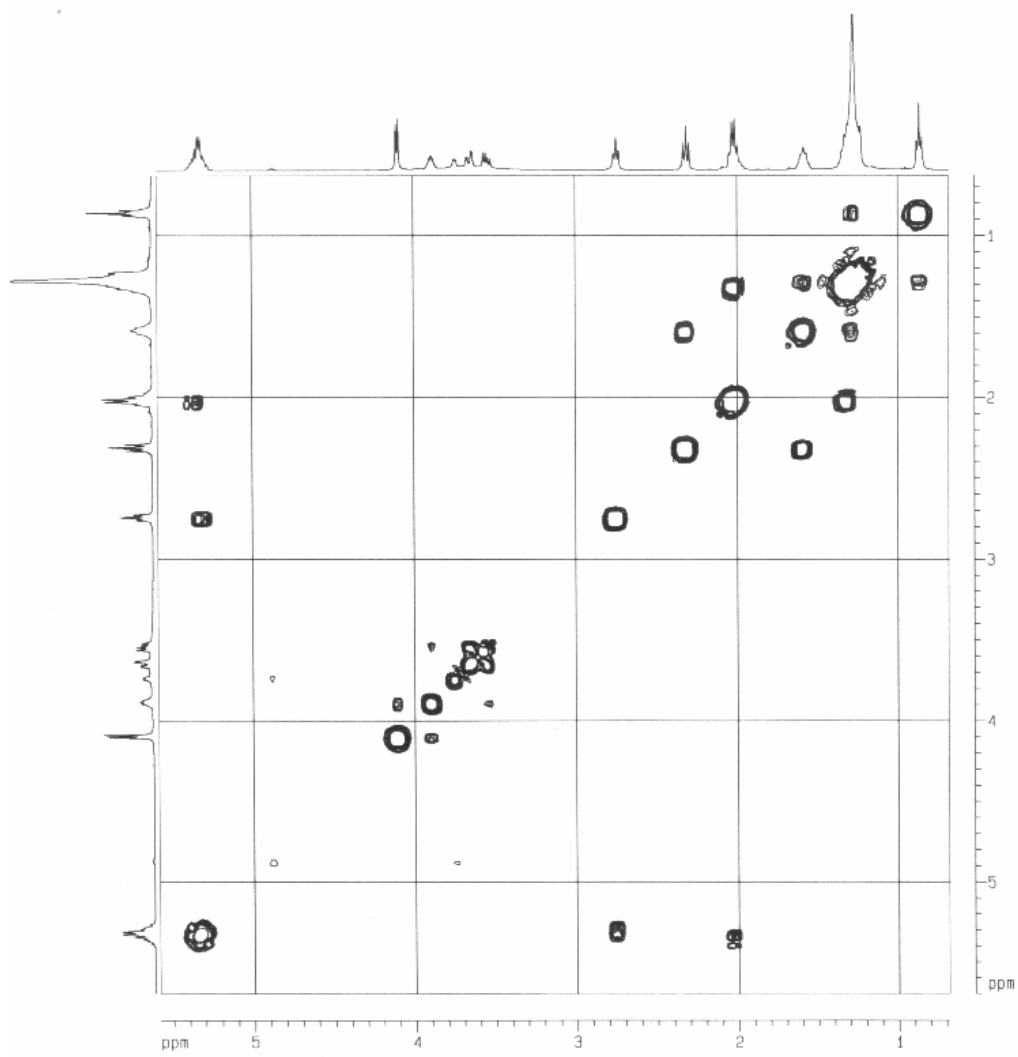


FIGURA 4.119: Experimento de COSY de S-20

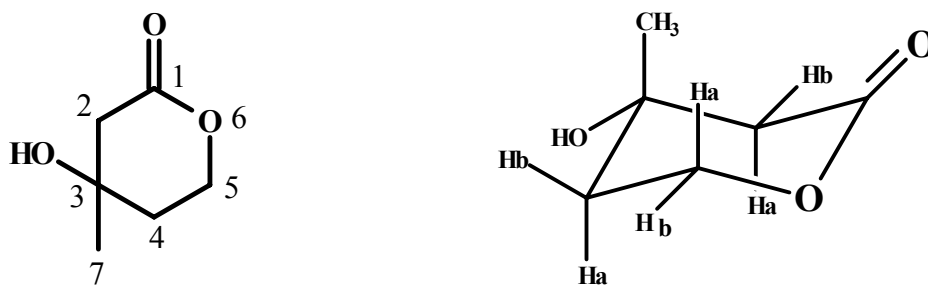
4.2.6 - OUTRAS CLASSES

4.2.6.1 - S-21: Lactona

Essa substância foi isolada, através de métodos clássicos de cromatografia, como um óleo amarelado, que revelava verde azulado em CCDA utilizando-se solução de vanilina como revelador. O espectro de RMN ^1H (FIGURA 4.121) apresentou um sinal *ddd* em δ 4,60 ($J= 11,3; 8,9$ e $5,9$ Hz) e outro sinal *ddd* em δ 4,35 ($J= 11,3; 5,0$ e $4,4$ Hz), ambos integrando para um hidrogênio; um sinal duplo triplete em δ 2,67 ($J= 17,4$ e $1,3$ Hz), um dubleto em δ 2,51 ($J= 17,4$ Hz), ambos integrando para um hidrogênio, um multipletto em δ 1,91 integrando para dois hidrogênios e um singletto em δ 1,39 integrando para três hidrogênios.

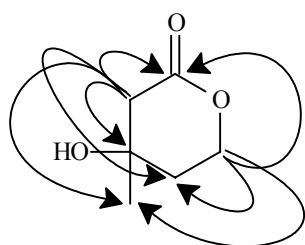
No espectro de RMN ^{13}C (FIGURA 4.122) temos a presença de seis sinais, δ 29,4; δ 35,7; δ 44,5; δ 66,2; δ 67,9 e δ 171,2, sugerindo que tínhamos um composto com esqueleto simples apresentando em sua estrutura dois carbonos carbinólicos e uma carbonila possivelmente de lactona devido ao baixo deslocamento químico.

Foram obtidos para a substância os experimentos de RMN 2D, onde através da interpretação desses espectros chegou-se a proposta estrutural abaixo.

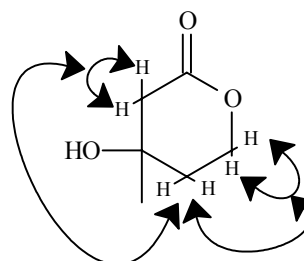
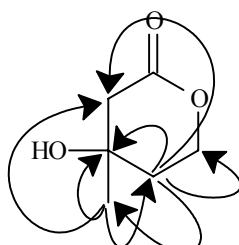


No experimento de HSQC (FIGURA 4.123) podemos ver a correlação de δ 4,31 e δ 4,57 (H-5a e H-5b) com carbono em δ 66,2; a correlação dos sinais δ 2,47 e δ 2,64 (H-2a e H-2b) com o sinal em δ 44,5; a correlação do multiplete em δ 1,88 (H-4) com carbono em δ 35,7 e da metila em δ 1,35 (Me-7) com o carbono δ 29,4. A desblindagem observada para H-2b e H-5b em relação a H-2a e H-5a está de acordo para o esperado para um anel de seis membros, pois em sistemas desse tipo os hidrogênios na posição equatorial apresentam um efeito de desproteção devido estarem no mesmo eixo das ligações C–C.

No experimento de HMBC (FIGURA 4.124) podemos ver as correlações de H-2a e H-2b com os sinais em δ 29,4 (C-7), δ 35,7 (C-4), δ 67,9 (C-3) e δ 171,2 (C-1), da metila Me-7 com os carbonos δ 44,5 (C-2), C-3 e C-4; o multiplete atribuído a H-4 apresenta correlações com C-2, C-3, C-6 e δ 66,2 (C-5); os hidrogênios H-5a e H-5b correlacionam com os carbonos C-3, C-4 e com C-1 fechando o anel lactônico. No experimento de COSY (FIGURA 4.125) temos as correlações de H-2a com H-2b e destes com H-4, este correlaciona também com H-5a/b e os H-5a e H-5b correlacionam entre si. As correlações de HMBC e COSY são mostradas a seguir.



Correlações de HMBC



Correlações de COSY

O espectro de massas ESI (+) (FIGURA 4.126) apresentou um pico m/z 131 $[M+H]^+$ confirmando a estrutura proposta para **S-21**. Através da obtenção do espectro de massas de íons filhos de m/z 131 (FIGURA 4.127) pode-se propor um esquema de fragmentação coerente com a estrutura (FIGURA 4.120). Os dados de RMN de **S-21** estão dispostos na TBABELA 4.21.

TABELA 4.21: dados de RMN ^{13}C de **S-21** (CDCl_3 , 400 MHz)

S-21			Lit [67]
	H (δ, <i>mult.</i>, <i>J</i> em Hz)	C	C
1		171,2	170,0
2	δ 2,67 (<i>dt</i> , 17,4 e 1,3) 2,51 (<i>d</i> , 17,4)	44,5	44,8
3		67,9	68,0
4	δ 1,91 (<i>m</i>)	35,7	36,0
5	δ 4,60 (<i>ddd</i> , 11,3; 8,9 e 5,9) δ 4,35 (<i>ddd</i> , 11,3; 5,0 e 4,4)	66,2	65,9
Me	1,39 (<i>s</i>)	29,4	29,9

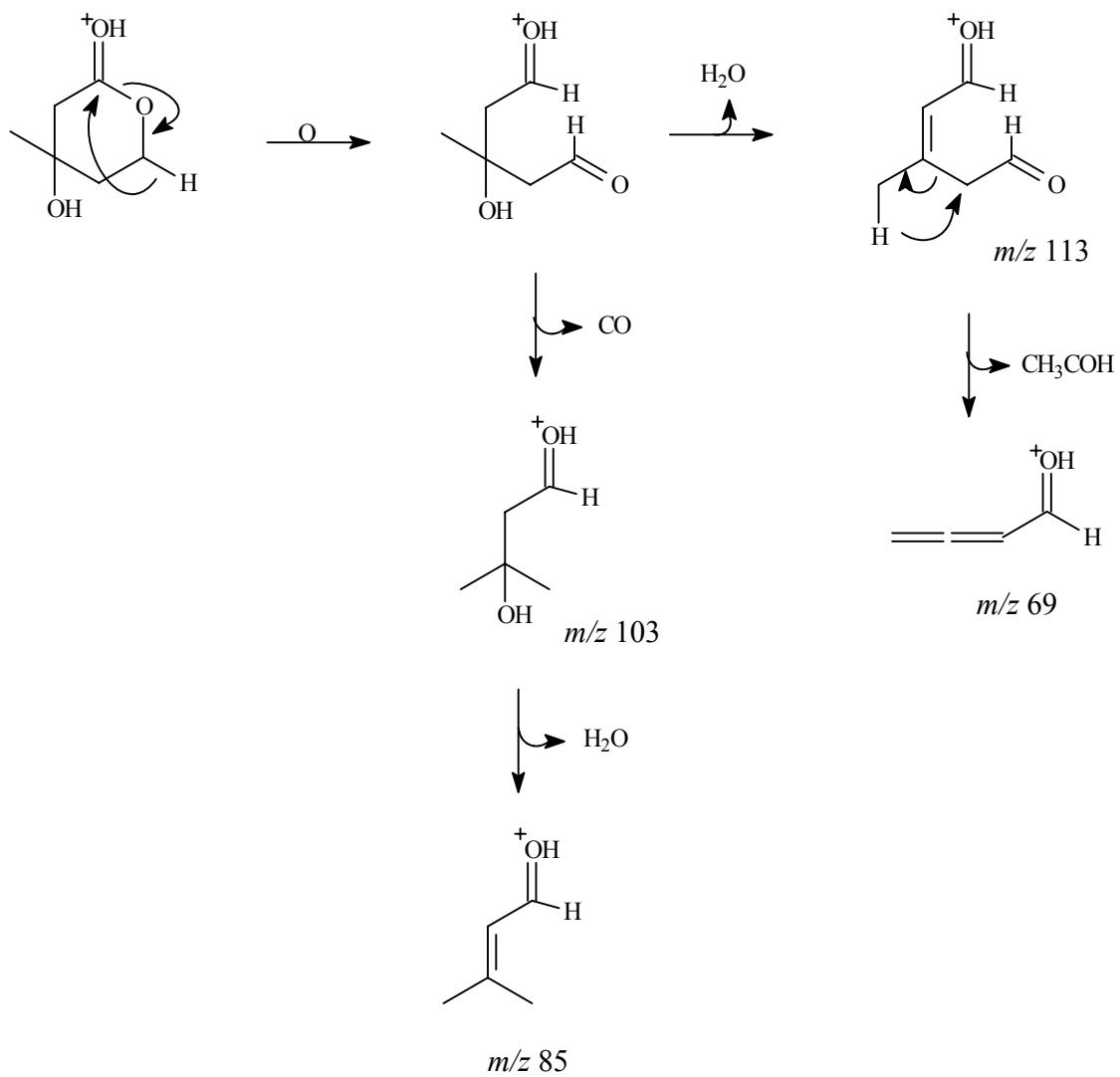


FIGURA 4.120: Proposta de fragmentação de S-21

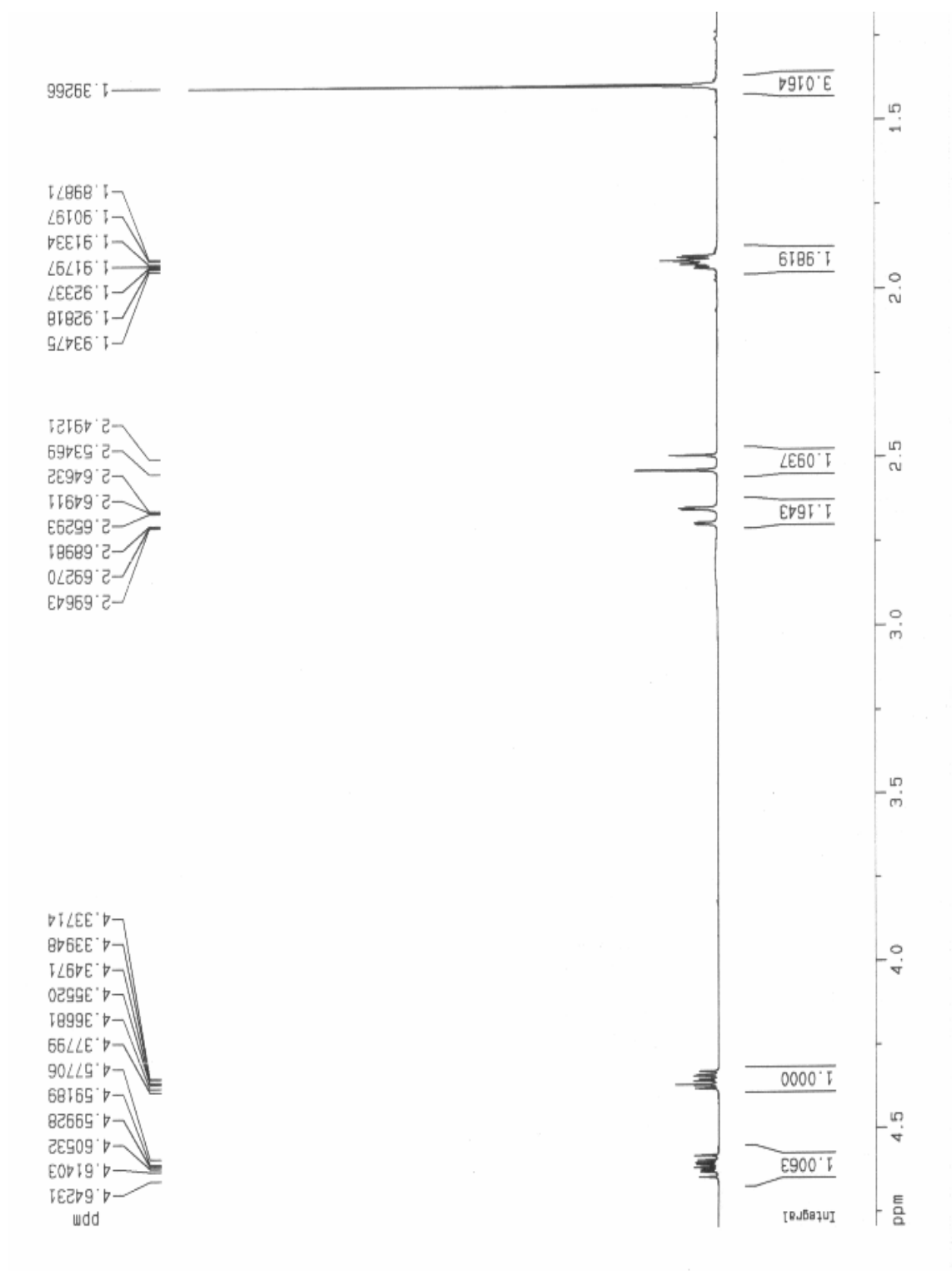


FIGURA 4.121: Espectro de RMN ^1H de S-21 (400 MHz, CDCl_3)

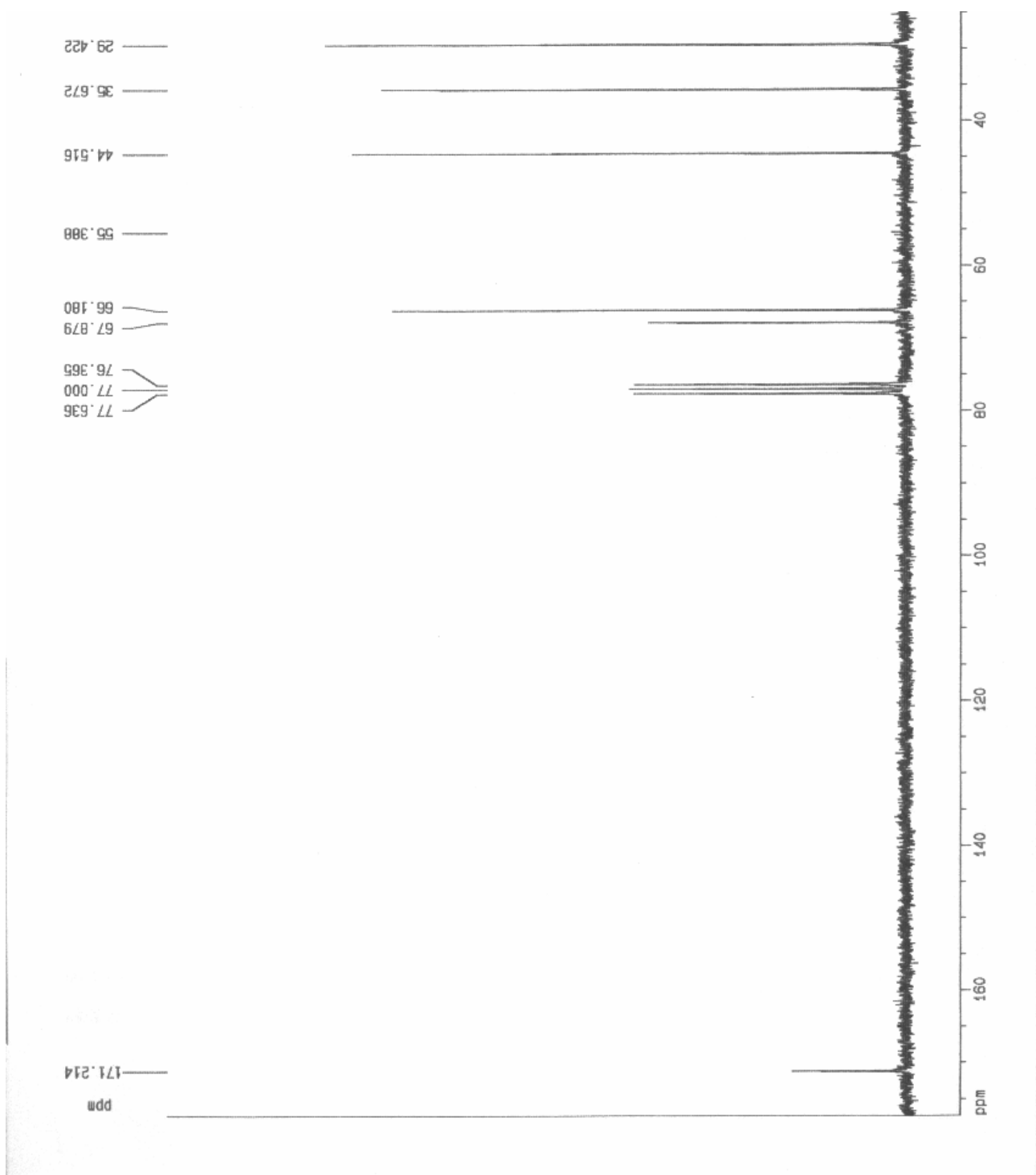


FIGURA 4.122: Espectro de RMN ^{13}C de S-22 (50 MHz, CDCl_3)

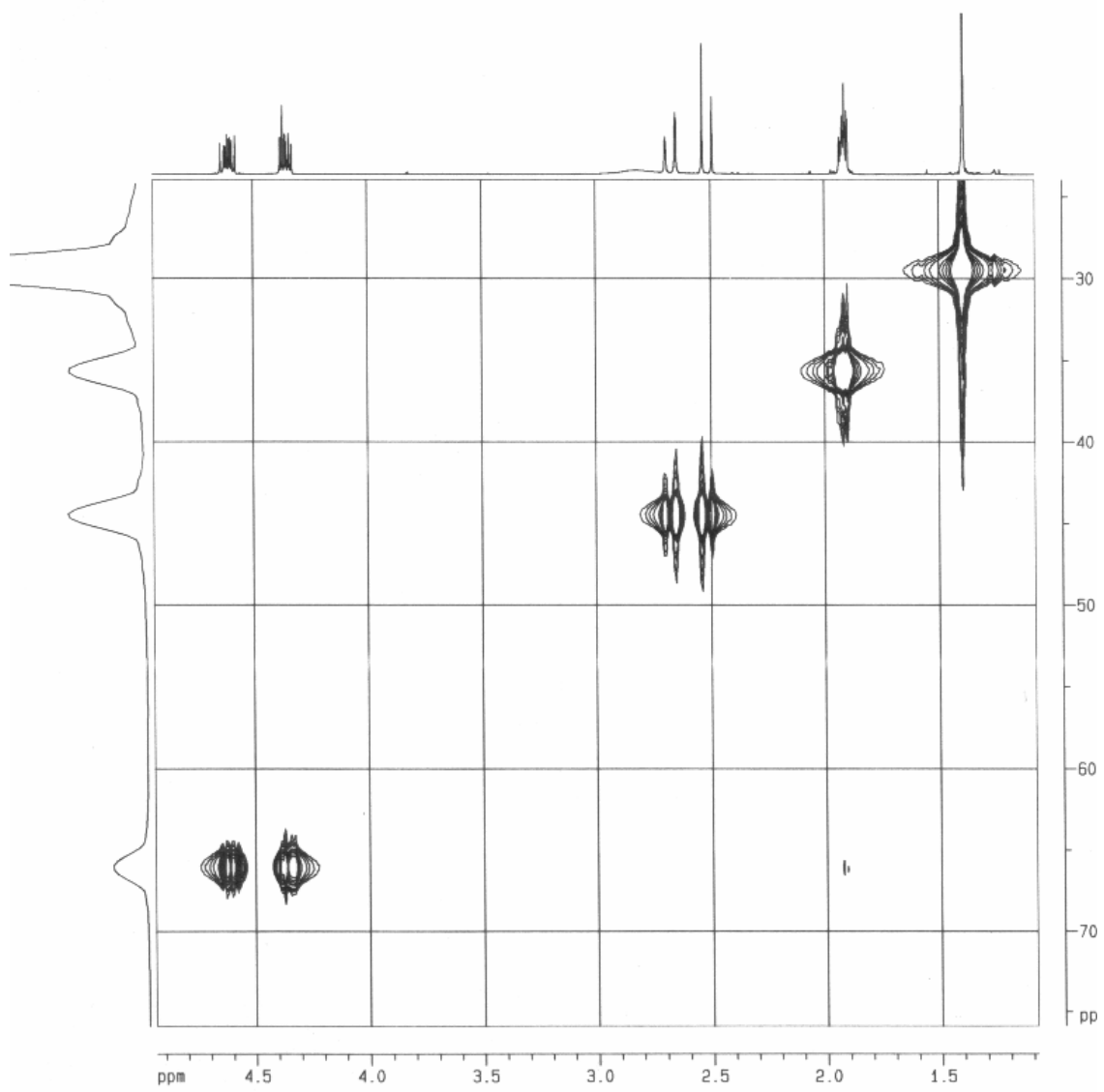


FIGURA 4.123: Experimento de HSQC de S-21

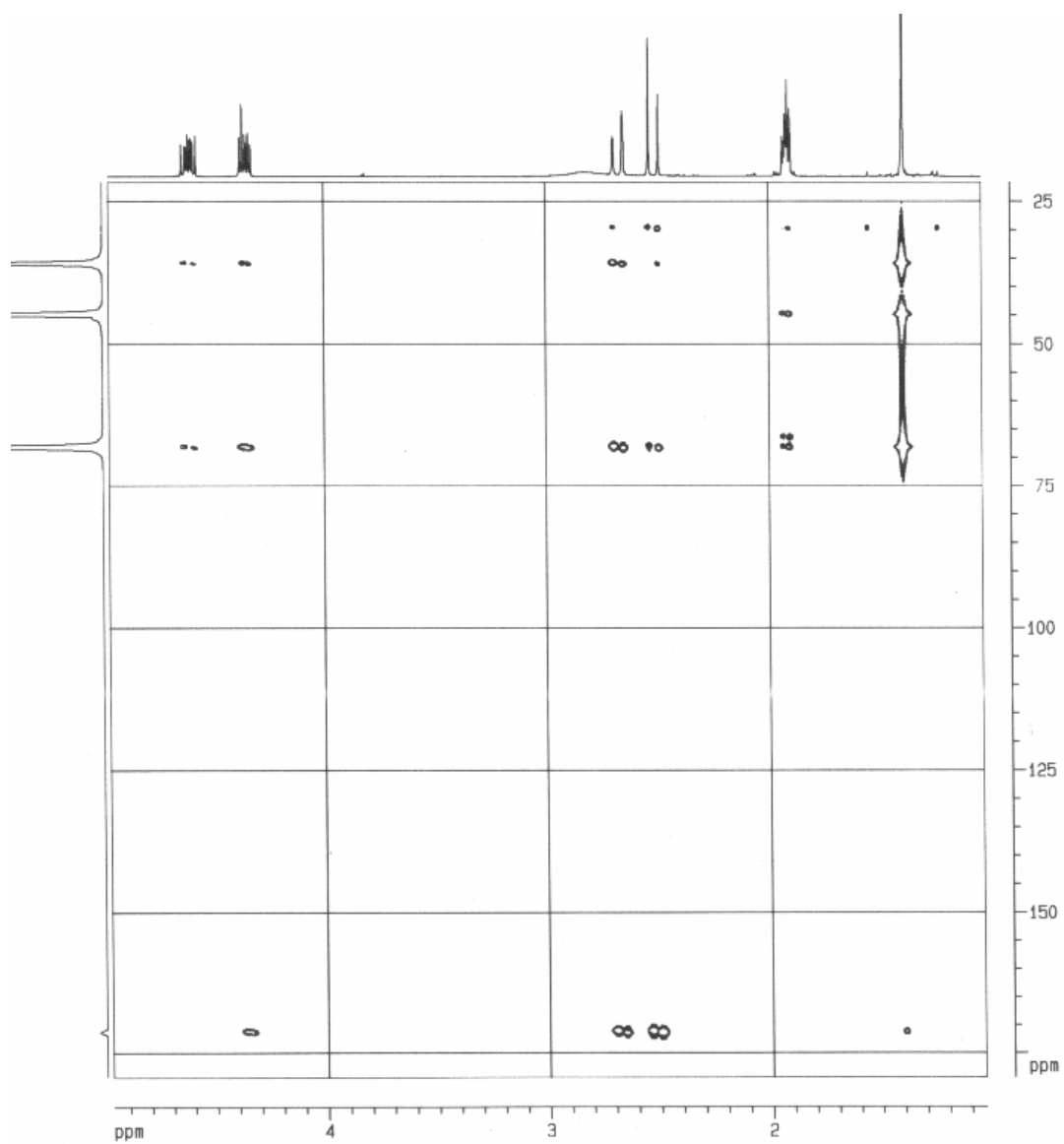


FIGURA 4.124: Experimento de HMBC de S-21

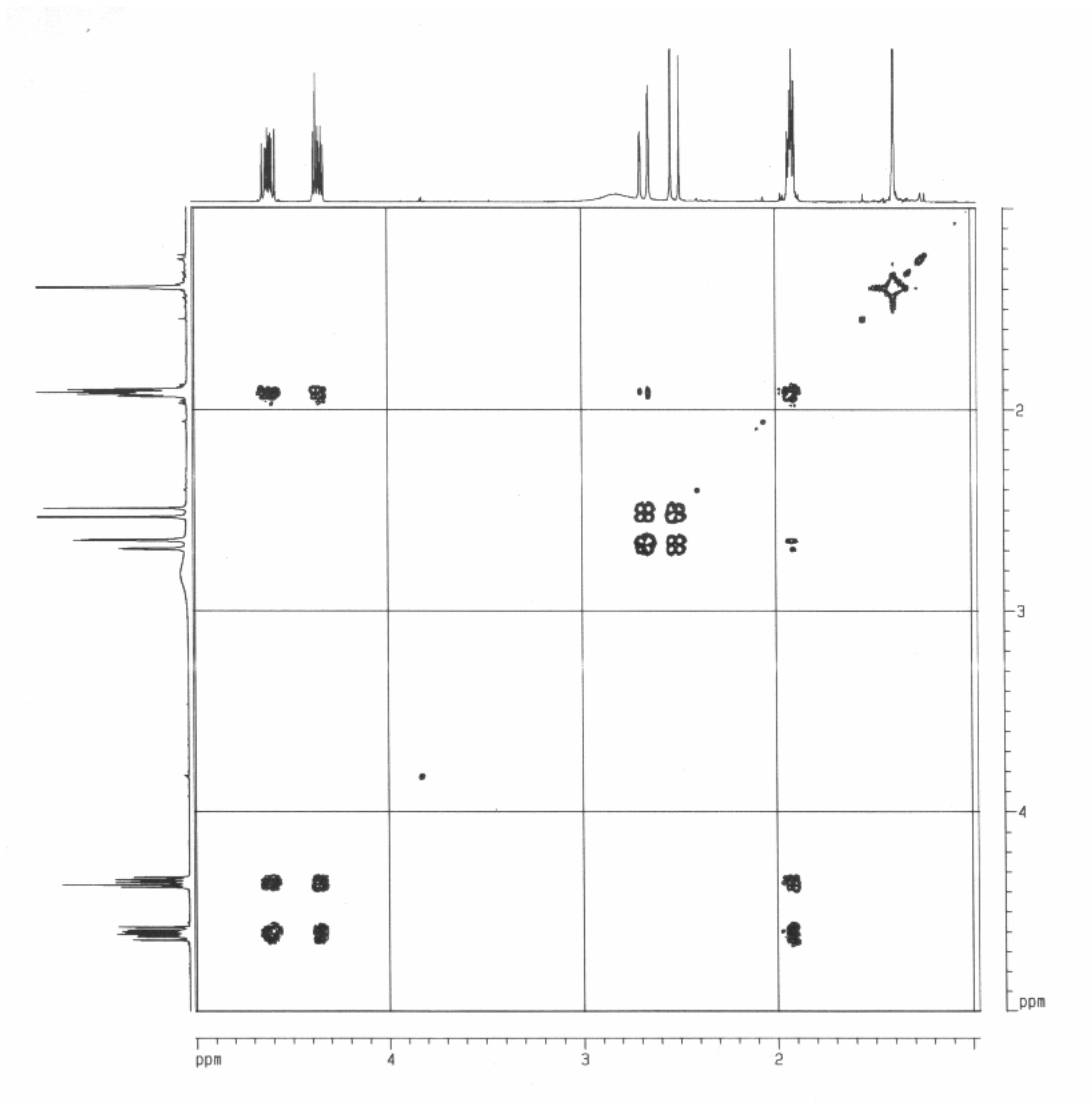


FIGURA 4.125: Experimento de COSY de S-21

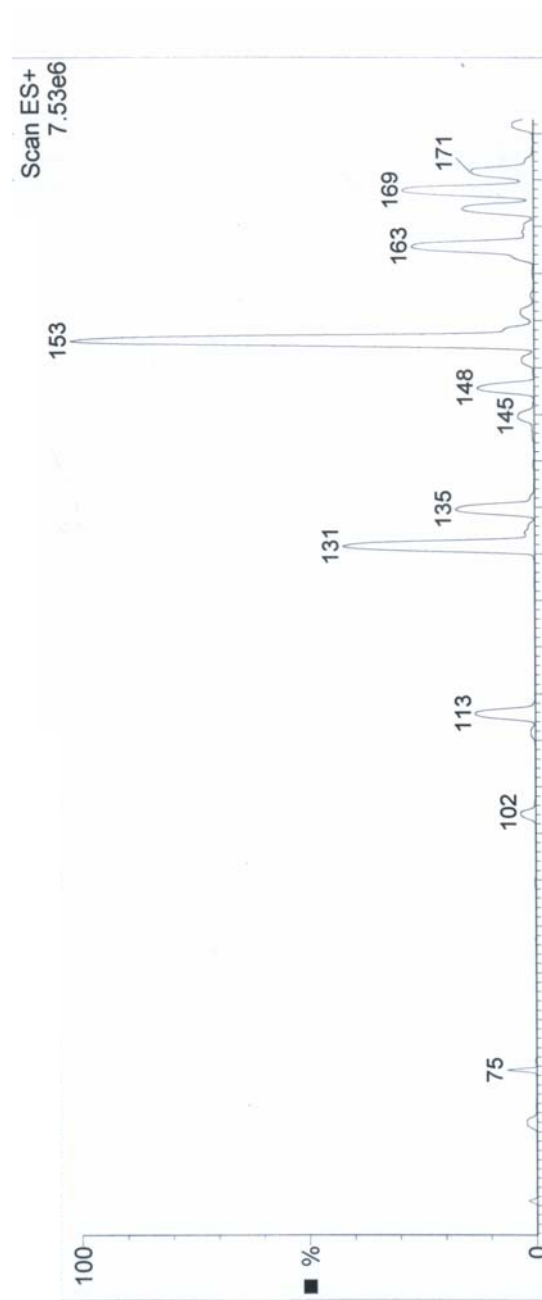


FIGURA 4.126: Espectro de massas (*full scan*) ESI (+) de **S-21**

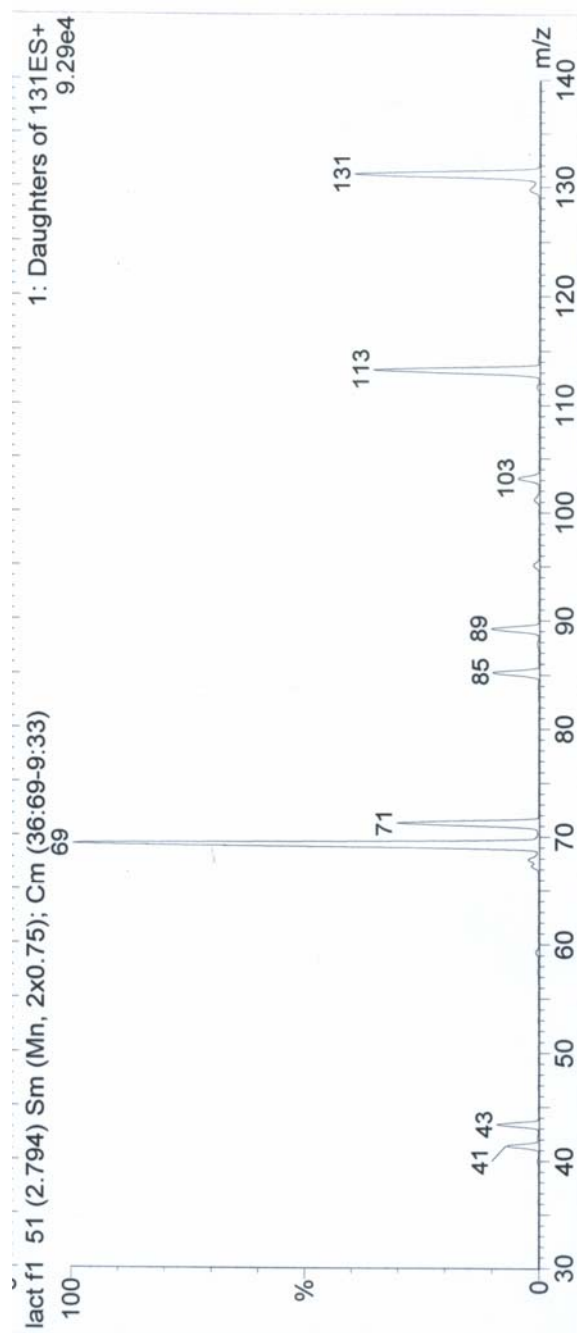


FIGURA 4.127: Espectro de íons filhos de m/z 131 (ESI (+), 10 eV)

4.2.6.2 - S-22 – Cerebrosida

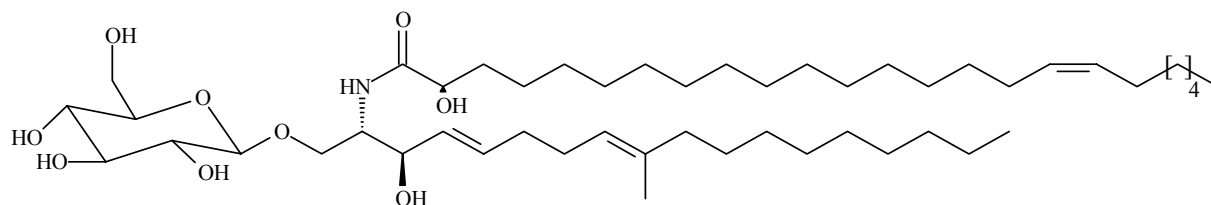
A substância **S-22** foi obtida como um sólido branco através de métodos clássicos de cromatografia. O espectro de RMN ^1H (FIGURA 4.129) de **S-22** apresentou um padrão bastante complexo com a presença de vários sinais. Observou-se sinais referentes a hidrogênios carbinólicos em δ 3,19 (*m*), δ 3,37 (*m*), δ 3,66 (*dd*, $J = 4,7$ e $11,8$ Hz), δ 3,71 (*dd*, $J = 3,3$ e $10,3$ Hz), δ 3,86 (*d*, $J = 11,8$ Hz), δ 3,28 (*m*), δ 3,97 (*d*, $J = 7,5$ Hz), δ 3,99 (*d*, $J = 7,3$ Hz), δ 4,12 (*m*) e δ 4,26 (*d*, $J = 7,7$ Hz). Observou-se ainda no espectro sinais referentes a hidrogênios olefínicos em δ 5,13 (*m*), δ 5,46 (*m*) e δ 5,74 (*m*), um sinal singlete típico de metila ligada a carbono sp^2 em δ 1,59, outro sinal singlete intenso em δ 1,29 referente a uma cadeia graxa e um sinal em δ 0,90 (*t*, $J = 6,8$ Hz) de metila terminal de cadeia alcânica aberta. Por fim, observaram-se os sinais em δ 1,97 (*t*, $J = 7,3$ Hz) e δ 2,06 (*m*).

O espectro de RMN ^{13}C (FIGURA 4.130) de **S-22** apresentou sinais referentes a carbonos carbinólicos em δ 62,7, δ 69,7, δ 71,6, δ 72,9, δ 73,1, δ 75,0, δ 77,9, δ 78,0 e δ 104,7 a presença desses sinais indicaram a existência de uma molécula de açúcar ligada ao composto. Foi observado no espectro sinais de carbonos olefínicos em δ 124,8, 130,0, δ 131,1, δ 134,6 e δ 136,8, um sinal em δ 177,2 mostrando a presença de um grupo carbonila e um sinal em δ 54,6 de carbono ligado a um grupo amida.

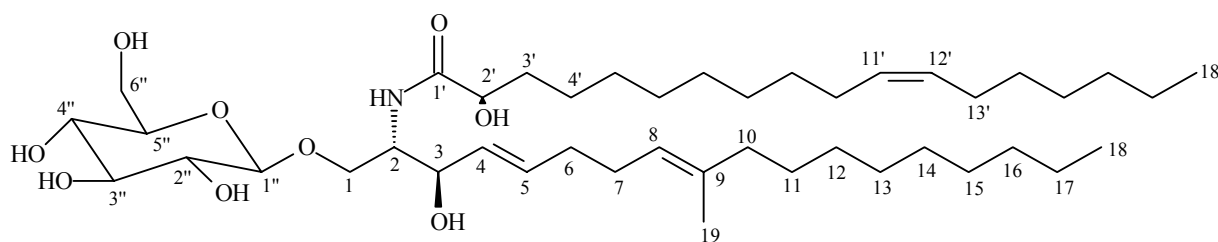
O espectro de massas ESI (-) (FIGURA 4.131) confirmou a existência de um átomo de nitrogênio no composto através do pico m/z 753 $[\text{M}]^-$, onde este juntamente com os dados de RMN ^1H e ^{13}C ajudaram na proposta da seguinte fórmula molecular para o composto $\text{C}_{43}\text{O}_{79}\text{NO}_9$.

Através da análise dos dados dos espectros de RMN 1D e 2D juntamente com os dados dos espectros massas e buscas na literatura chegou-se na

estrutura de **S-22** como sendo uma cerebrosida, onde **S-22** mostrou ser estruturalmente semelhante a catacerebrosida A isolada do fungo *Catathelasma ventricosa* [71]. No entanto, **S-22** apresentou 84 Da a menos indicando que tínhamos seis unidades CH₂ a menos em **S-22**.



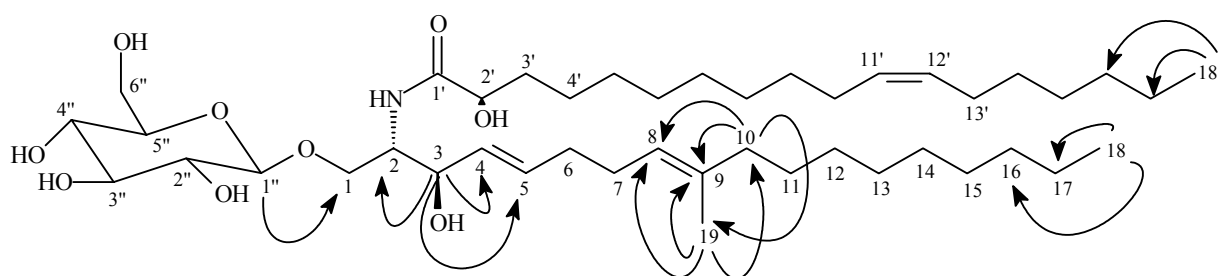
Catcerebrosida A



S-22

Os experimentos de RMN 2D não foram muito úteis na determinação estrutural desse composto devido ao aglomerado de sinais em certas regiões dos espectros e a própria qualidade dos mesmos. No entanto, algumas correlações úteis foram observadas. No experimento de HSQC (FIGURA 4.132) viu-se a correlação do sinal em δ 4,26 (H-1'') com o carbono anomérico δ 104,7. No experimento de HMBC (FIGURA 4.133) H-1'' apresentou como principal correlação a correlação com o sinal do carbono em δ 69,7 (C-1), indicando o ponto de ligação da molécula de açúcar ao composto. No experimento de HSQC observou-se a correlação do sinal em δ 3,27 (H-3) com o carbono em δ 71,6. No experimento de HMBC H-3 apresentou correlação com o carbono δ 54,6 (C-2) ligado ao átomo de nitrogênio e

com os carbonos olefinicos δ 131,0 (C-4) e δ 134,6 (C-5). A metila sobre dupla em δ 1,59 correlaciona no experimento de HSQC com δ 16,1 e apresenta correlações no HMBC com os carbonos olefinicos δ 124,8 (C-8) e δ 136,8 (C-9) e correlaciona ainda com o carbono 40,8 (C-10). O carbono C-10 está correlacionando no experimento de HSQC com o sinal em δ 1,97 (H-10). H-10 correlaciona no HMBC com os carbonos olefinicos C-8 e C-9, com a metila Me-19 e com o sinal em δ 29,1 referente a cadeia graxa. O sinal referente as metilas terminais em δ 0,90 (Me-18 e Me-18') correlaciona no experimento de HSQC com δ 14,4 e no experimento de HMBC com os carbonos δ 23,7 e δ 33,8. As correlações são mostradas a seguir. Os dados de RMN ^1H e ^{13}C de **S-22** estão na TABELA 4.22 e mostraram-se similares ao da catacerebrosida A confirmando a proposta estrutural.



O tamanho das cadeias laterais de **S-22** foi determinado com base nas fragmentações obtidas através do espectro de massas de íons filhos de m/z 753 (FIGURA 4.134). Nele podemos observar o m/z 573 referente a perda da molécula de açúcar seguida do m/z 297 referente a perda da uma das cadeias laterais e o m/z 251 referente a outra cadeia lateral. As fragmentações são mostradas na FIGURA 4.128.

TABELA 4.22: dados de RMN ¹H e ¹³C de S-22 (CD₃OD, 400 MHz)

S-22			Lit [68]	
	H (δ , <i>mult.</i> , <i>J</i> em Hz)	C		C
1a	3,71 (<i>dd</i> , 3,3 e 10,3)	69,7	1	70,3
1b	4,12 (<i>m</i>)			
2	3,99 (<i>d</i> , 7,3)	54,6	2	55,1
3	3,27 (<i>m</i>)	71,6	3	73,4
4	5,46 (<i>m</i>)	131,0	4	131,6
5	5,74 (<i>m</i>)	134,6	5	135,1
6		33,8	6	34,9
7		28,7	7	29,2
8	5,13 (<i>m</i>)	124,8	8	125,3
9		136,8	9	137,3
10	1,97 (<i>t</i> , 7,3)	40,8	10	41,3
11		29,1	11	29,5
12-15		30,5-30,8	12-15	30,8-31,4
16		33,8	16	33,6
17		23,7	17	24,2
18	0,90 (<i>t</i> , 6,8)	14,4	18	15,0
19	1,59 (<i>s</i>)	16,1	19	16,7
1'		177,2	1'	177,7
2'	3,97 (<i>m</i>)	73,1	2'	73,6
3'		35,9	3'	36,4
4'		26,2	4'	26,7
5'-9'		30,5-30,8	5'-15'	30,8-31,4
10'		28,7	16'	28,5
11'-12'	5,46 – 5,74 (<i>m</i>)	131,1	17'-18'	131,4
13'		28,5	19'	28,5
14'-15'		30,5-30,8	20'-21'	30,8-31,4
16'		33,1	22'	33,6
17'		23,7	23'	24,2
18'	0,90 (<i>t</i> , 6,8)	14,4	24'	15,0
1''	4,26 (<i>d</i> , 7,7)	104,7	1''	105,2
2''	3,19 (<i>m</i>)	75,0	2''	75,5
3''	3,37 (<i>m</i>)	77,9	3''	78,5
4''	3,86 (<i>m</i>)	72,9	4''	72,0
5''	3,28 (<i>m</i>)	78,0	5''	78,5
6a''	3,66 (<i>dd</i> , 4,7 e 11,8)	62,7	6''	63,2
6b''	3,86 (<i>d</i> , 11,8)			

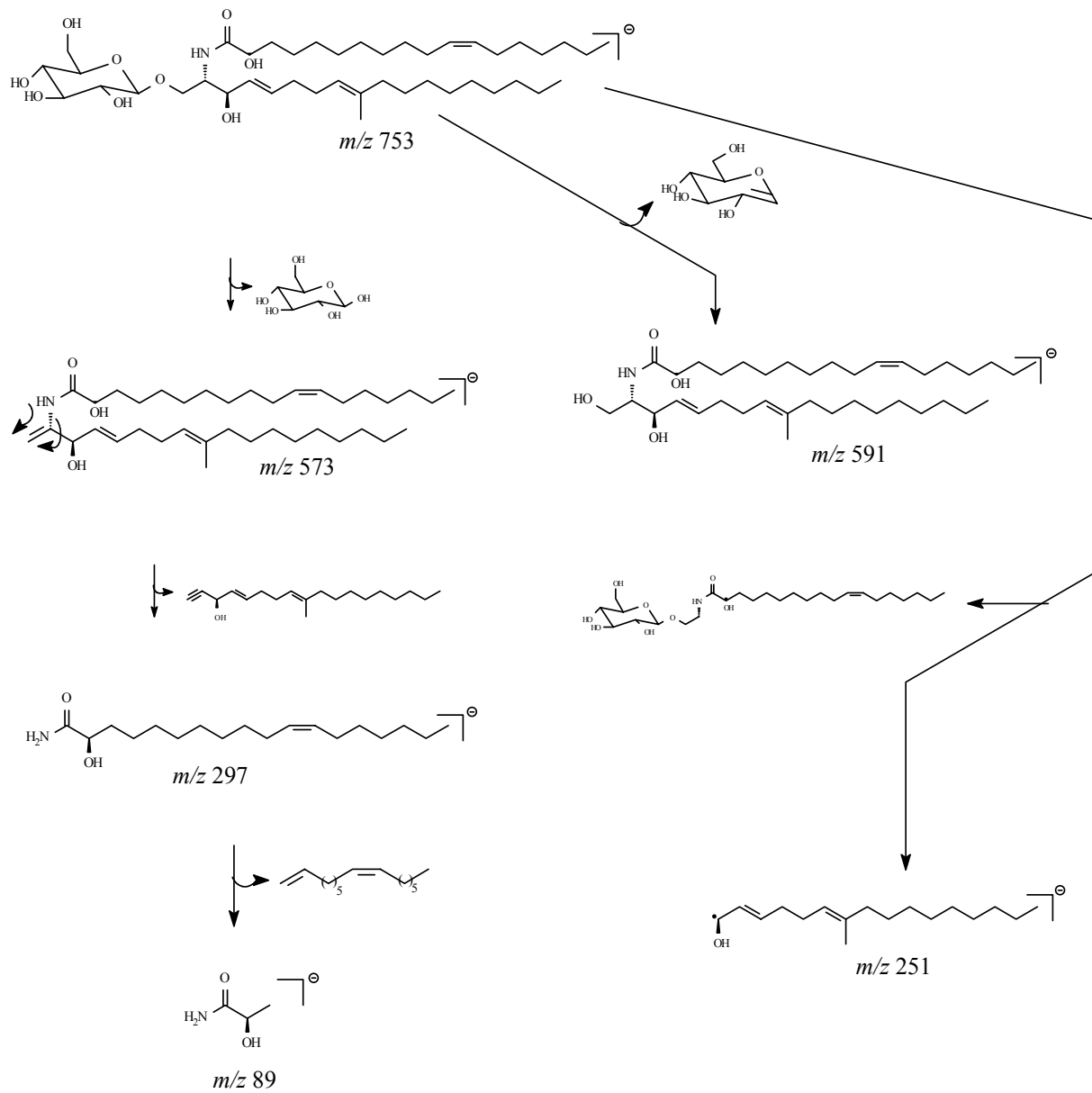


FIGURA 4.128: proposta de fragmentação para S-22

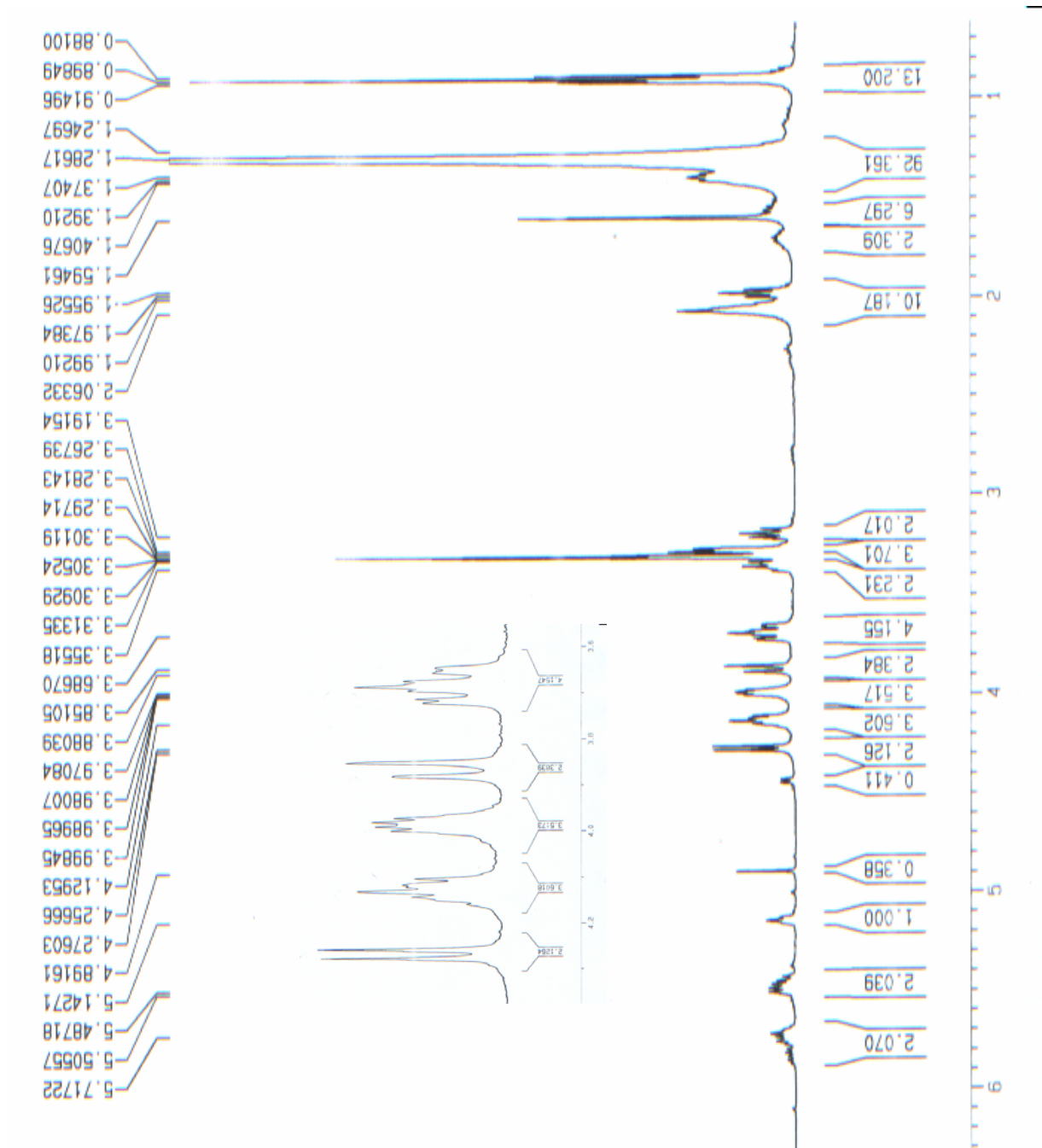


FIGURA 4.129: Espectro de RMN ¹H obtenido para S-22 (CD₃OD, 400 MHz)

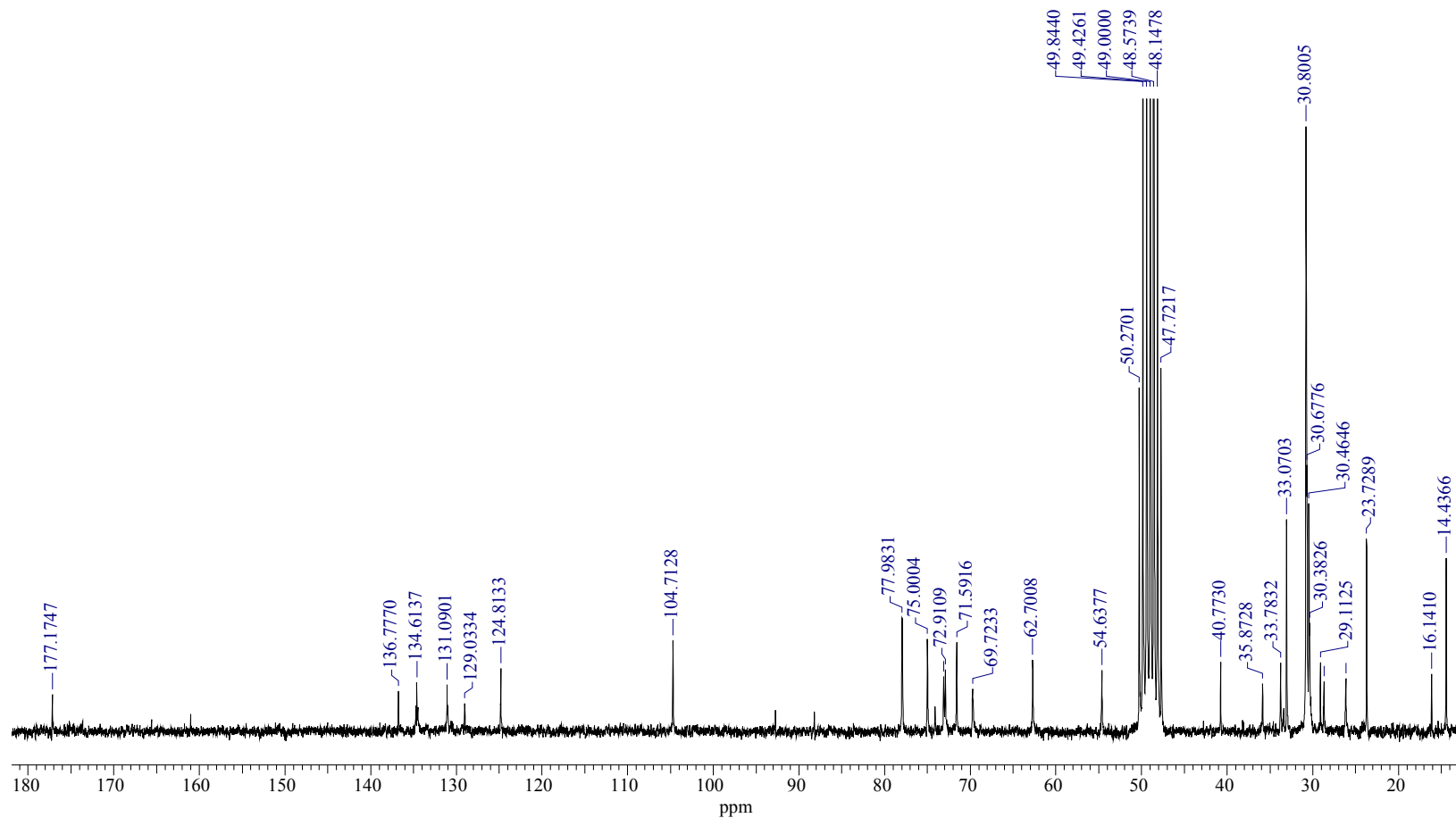


FIGURA 4.130: Espectro de RMN ^{13}C de S-22 (CD_3OD , 50 MHz)

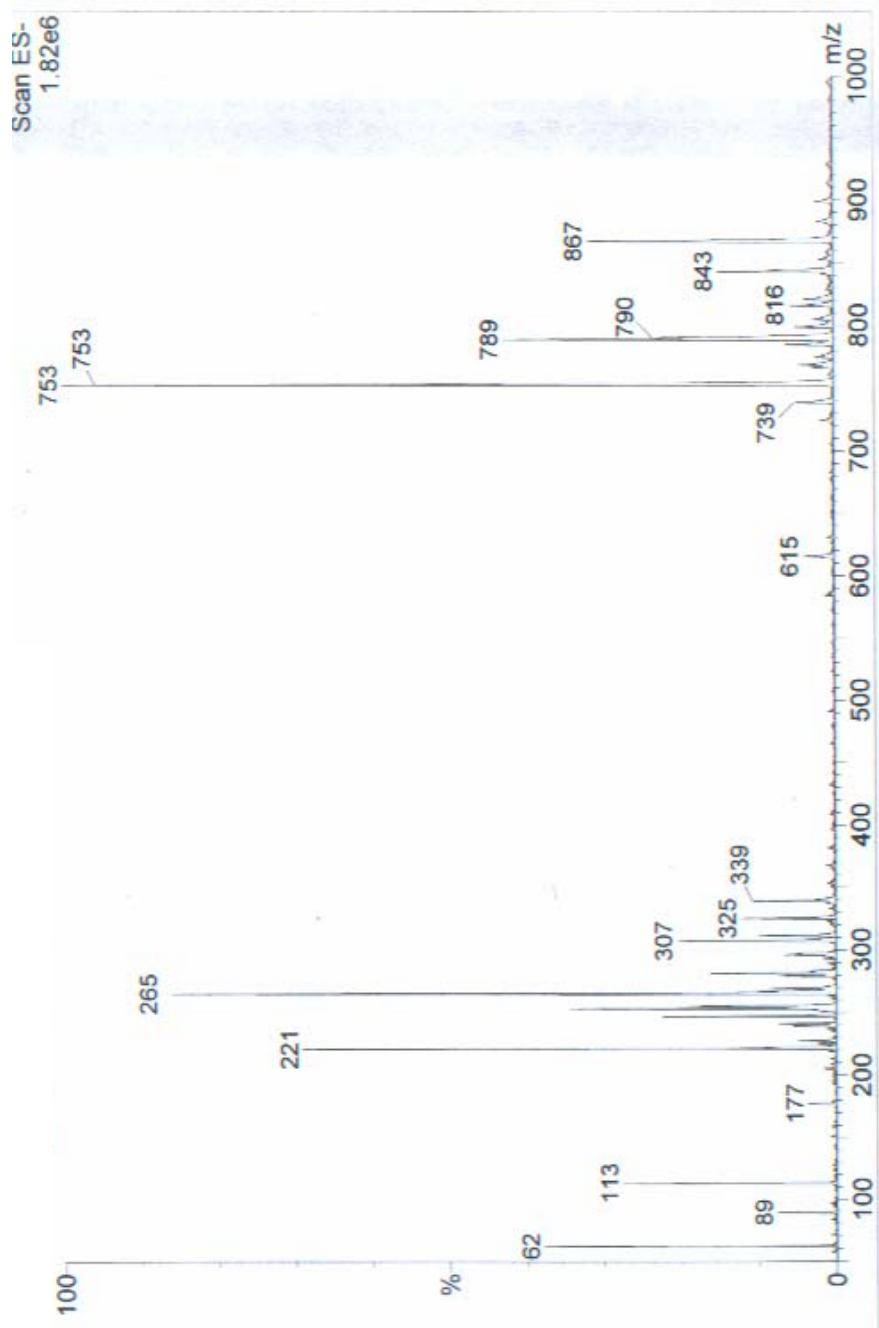


FIGURA 4.131: Espectro de massas (*full scan*) ESI (-) de S-22

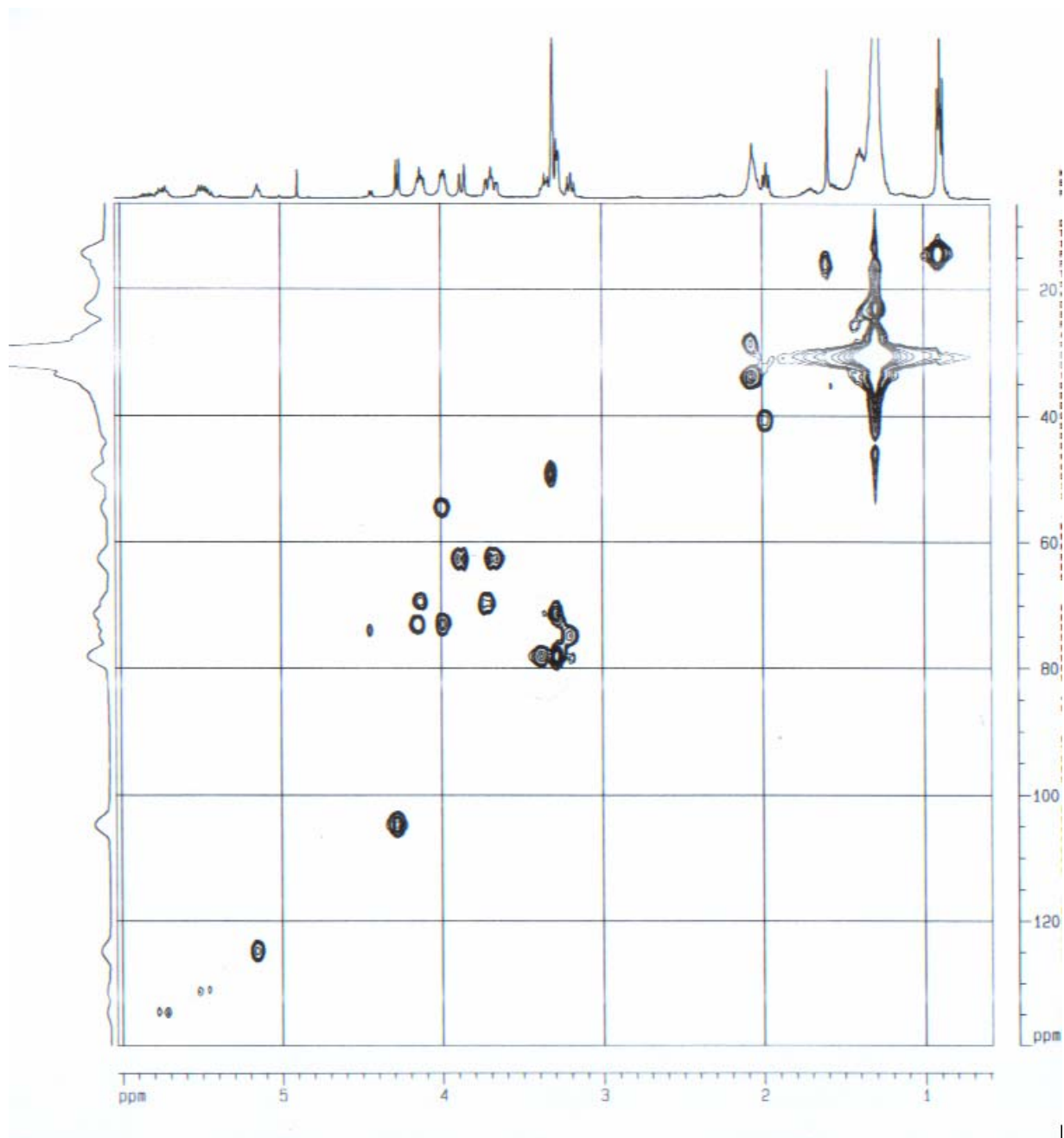


FIGURA 4.132: Experimento de HSQC para S-22

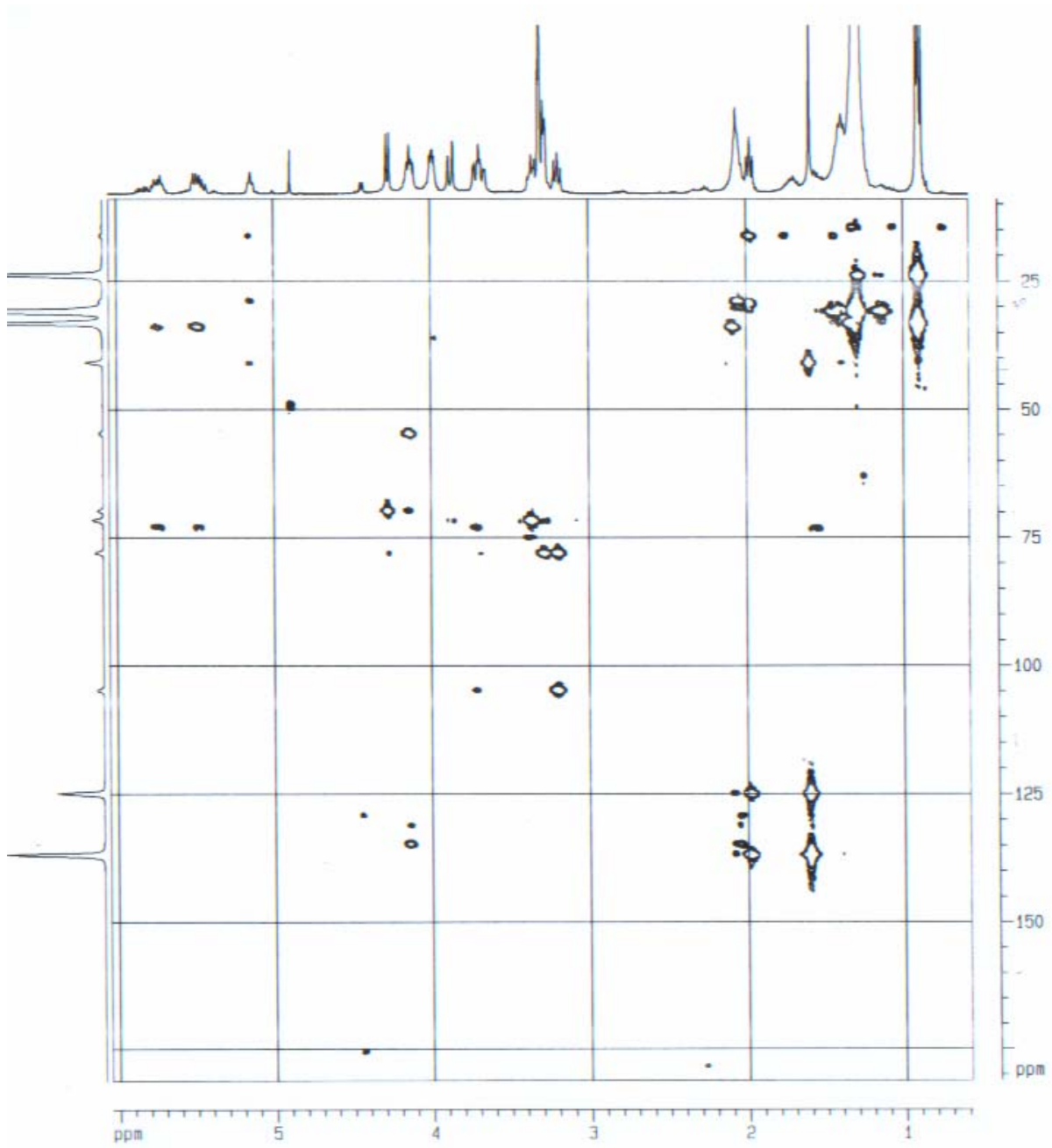


FIGURA 4.133: Experimento de HMBC para S-22

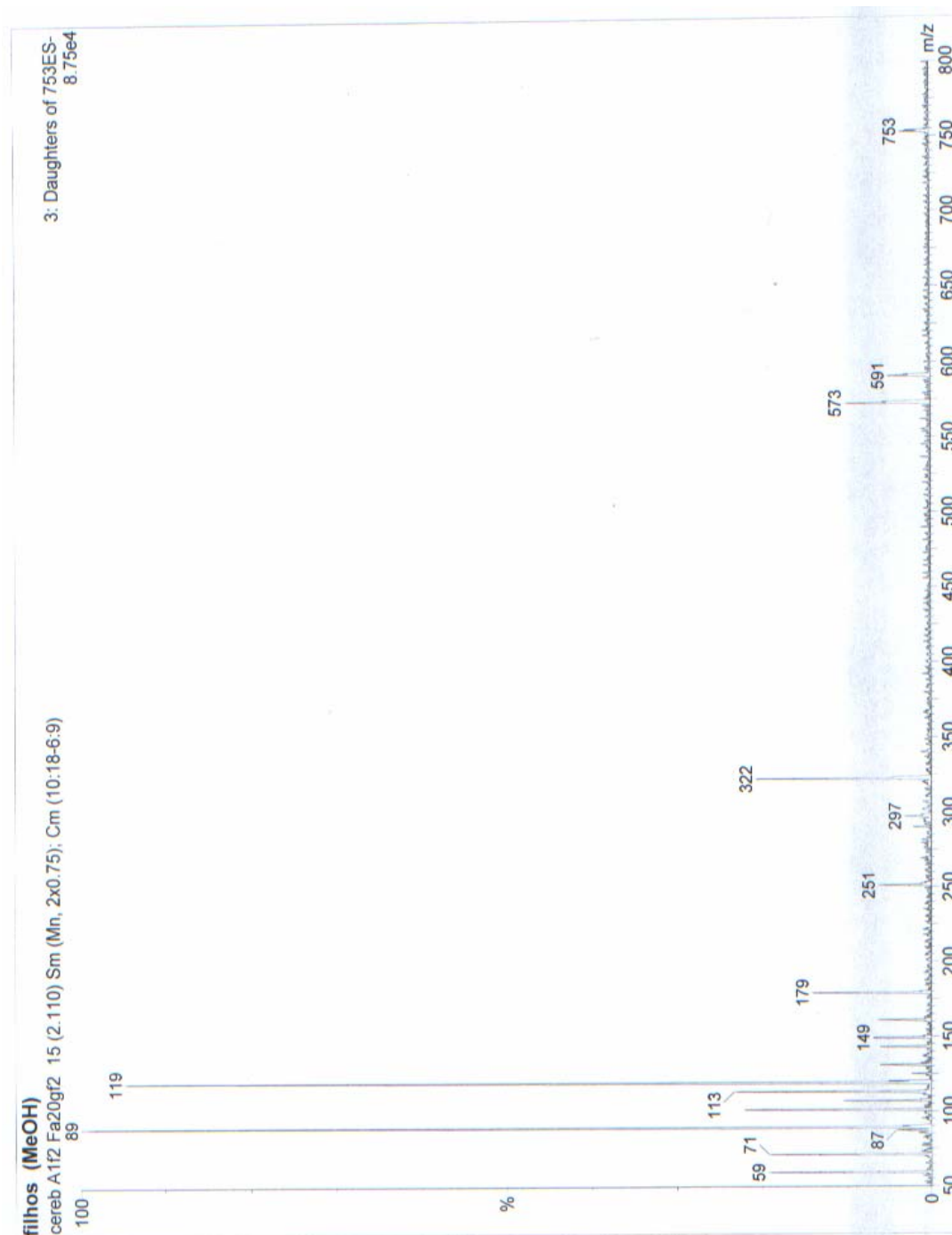


FIGURA 4.134: Espectro de massas de íons filhos de m/z 753 (ESI (-))

4.3 - RESULTADO DOS ENSAIOS BIOLÓGICOS

A busca de substâncias com atividades biológicas úteis ao homem é um dos campos mais estudados na ciência como um todo, seja em nível acadêmico como até mesmo em indústrias farmacêuticas, agroquímicas entre outras. Existe sempre a necessidade de se estar renovando o arsenal de compostos ativos devido os parasitas adquirirem resistência as drogas já existentes no mercado e também devido ao aparecimento de novas doenças.

Os fungos são bons produtores metabólitos secundários, muitos com atividade biológica útil. Entre os fungos os endofíticos geralmente produzem substâncias com alguma atividade, onde estas iram ajudara a planta hospedeira no combate a infestações por outros fungos, vírus e bactérias. Por esta razão é de grande importância o estudo das atividades biológicas de substâncias produzidas por esses fungos.

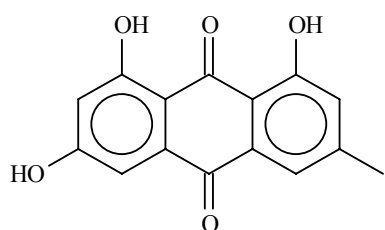
4.3.1 - ENSAIOS ANTIMICROBIANOS

As substâncias isoladas das espécies de *Penicillium* foram ensaiadas frente as bactérias *E. coli*, *P. aeruginosas* e *B. subtilis*. Inicialmente fez-se um ensaio preliminar em placa de petri contendo meio de cultura agar BHI mais a bactéria teste, onde inoculou-se as substâncias a uma concentração de 1 mg/mL. As substâncias que apresentaram halo de inibição foram ensaiadas em placas de ELISA para medir a concentração mínima inibitória (MIC).

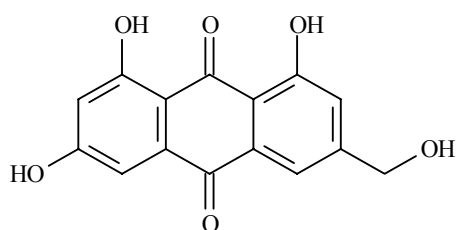
O aparecimento de turvação nas cavidades da placa de ELISA indica crescimento da bactéria e conseqüentemente ausência de atividade da substância. Nas cavidade que ficaram límpidas as substâncias apresentaram algum tipo de atividade. Para a confirmação da atividade acrescentou-se 10 µL de TCC (cloreto

de 2,3,5-trifeniltetrazólico) a 2% em cada cavidade. O aparecimento de coloração vermelha indica crescimento da bactéria, portanto, sem ação. Onde não houve aparecimento de coloração fez-se semeadura em placas de petri com meio agar BHI para confirmar o tipo de atividade, que pode ser bacteriostática onde a substância apenas inibe o crescimento das colônias, mas retirada as bactérias da presença da substância estas voltam a se multiplicar; ou bactericida onde a substância causa a morte das bactérias.

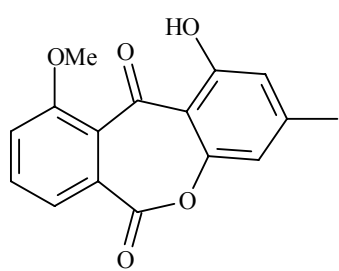
Os policetídeos abaixo foram as substâncias que apresentaram algum tipo de atividade nos ensaios antimicrobianos onde os resultados são mostrados a seguir em forma de quadros.



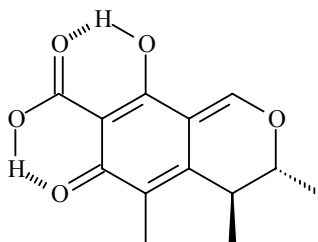
emodina (S-7)



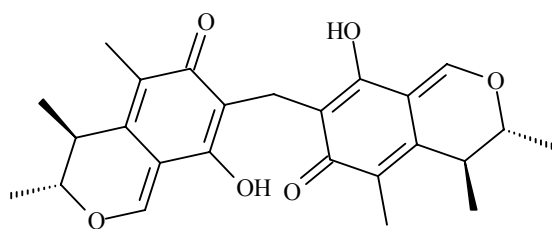
citreorseina (S-8)



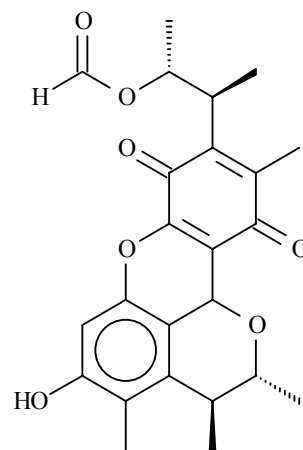
janthinona (S-9)



citrinina (S-10)



citrinina-D (S-12)



citrinina 1H (S-13)

QUADRO 02: resultado dos ensaios antimicrobianos frente a *E. coli*

C (µg/mL)	S-7	S-8	S-9	S-10	S-12	S-13
500,0 A	=	=	-	=	-	=
250,0 B	+	=	+	+	-	=
125,0 C	+	=	+	+	-	=
62,50 D	+	=	+	+	-	=
31,25 E	+	=	+	+	-	=
15,63 F	+	+	+	+	+	=
7,810 G	+	+	+	+	+	+

+ sem ação, - bacteriostático, = bactericida

QUADRO 03: resultado dos ensaios antimicrobianos frente a *P. aeruginosas*

C (µg/mL)	S-7	S-8	S-9	S-10	S-12	S-13
500,0 A	=	=	=	=	-	=
250,0 B	=	=	-	=	-	-
125,0 C	=	=	+	=	-	-
62,50 D	=	=	+	-	+	-
31,25 E	-	+	+	+	+	+
15,63 F	-	+	+	+	+	+
7,810 G	-	+	+	+	+	+

+ sem ação, - bacteriostático, = bactericida

QUADRO 04: resultado dos ensaios antimicrobianos frente a *B. subtilis*

C (µg/mL)	S-7	S-8	S-9	S-10	S-12	S-13
500,0 A	=	=	-	-	-	=
250,0 B	=	-	+	-	-	=
125,0 C	-	+	+	-	-	=
62,50 D	-	+	+	-	+	-
31,25 E	-	+	+	-	+	+
15,63 F	+	+	+	+	+	+
7,810 G	+	+	+	+	+	+

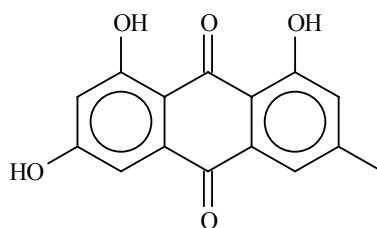
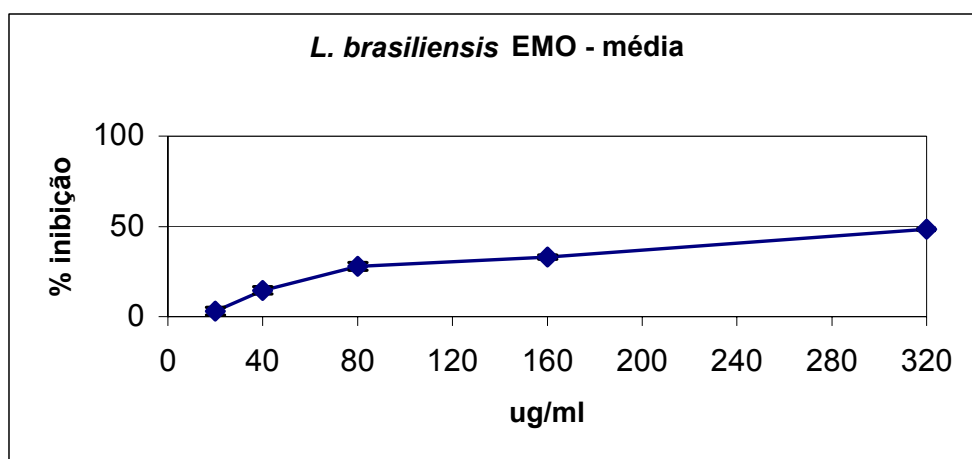
+ sem ação, - bacteriostático, = bactericida

Os resultados obtidos nos ensaios antimicrobianos nos levam a propor que a atividade biológica esteja relacionada ao grupo quinona. Dentre as substâncias que deram atividade as que mostraram melhores resultados são aquelas que apresentam esse grupo em sua estrutura, reforçando esse fato temos a substância citrinina 1H (S-13) que possui um grupo quinona de fato como a mais ativa e as substâncias janthinona (S-9) e citrinina-D (S-12) que possuem um grupo quinona modificado como as menos ativas.

4.3.2 - ENSAIOS LEISHMANICIDAS

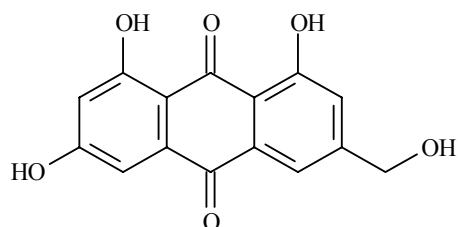
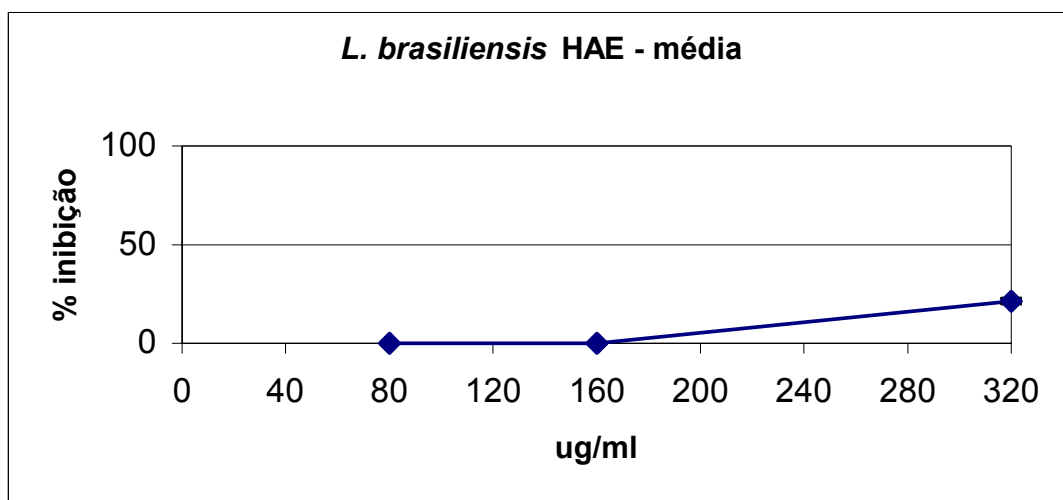
Foram ensaiadas apenas três substâncias frente ao parasita *L. brasiliensis* por razões de quantidade de amostra necessária aos ensaios. Foram testadas as substâncias emodina (S-7), citreoroseina (S-8) e janthinona (S-9).

Os ensaios foram realizados na Universidade Estadual de Maringá pela Prof. Dra. Izabel Piloto. As substâncias foram adicionadas a culturas de promastigota de *L. brasiliensis* a 25°C e o resultado obtido após 24h em comparação ao controle. Os resultados são mostrados nos gráficos a seguir.



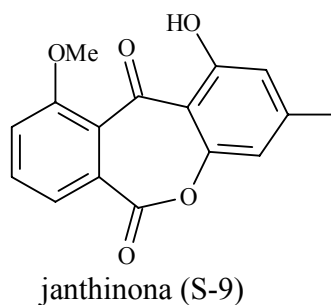
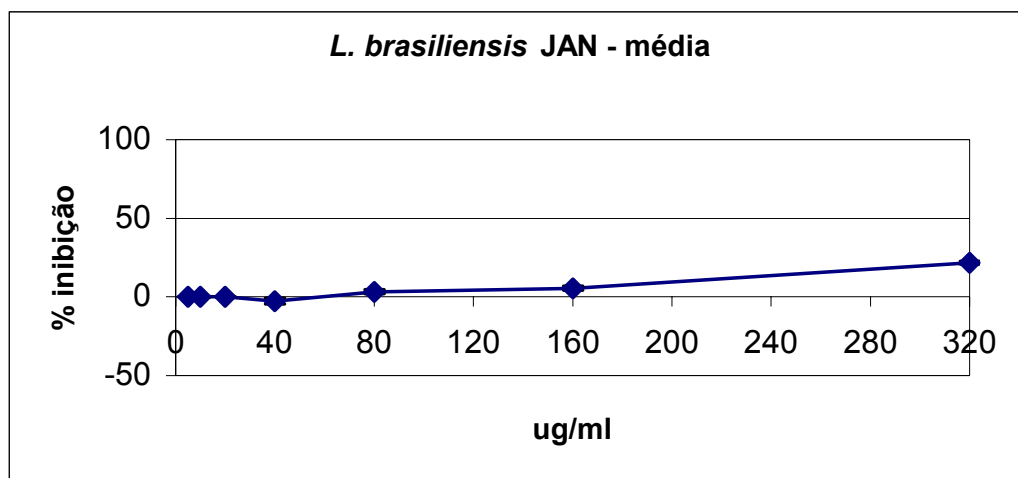
emodina (S-7)

A substância inibiu 50% dos parasitas a uma concentração de 320 µg/mL, mostrando um resultado promissor.



citreoroseina (S-8)

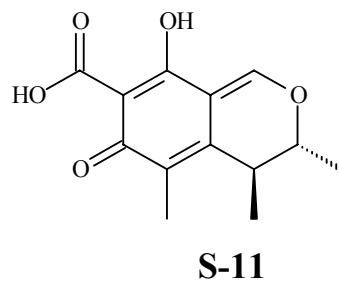
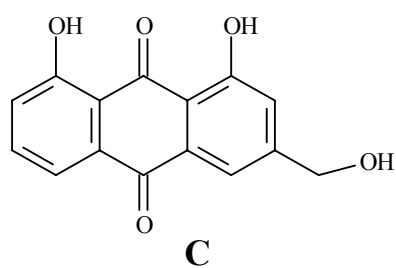
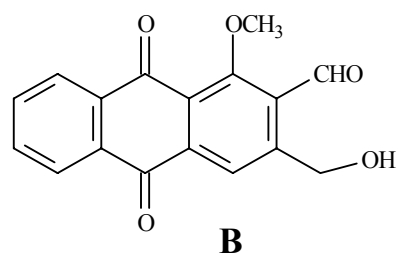
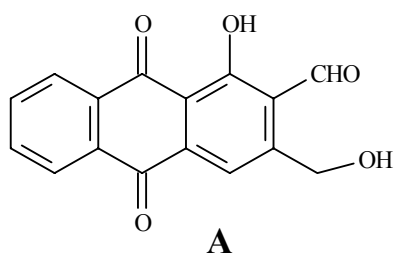
A substância inibiu cerca de 20% dos parasitas a uma concentração de 320 µg/mL. Parece que a hidroxilação da metila reduziu a atividade da substância em mais de 50%.

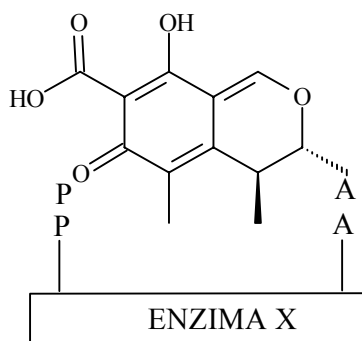
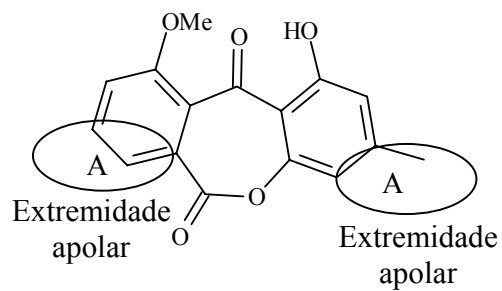
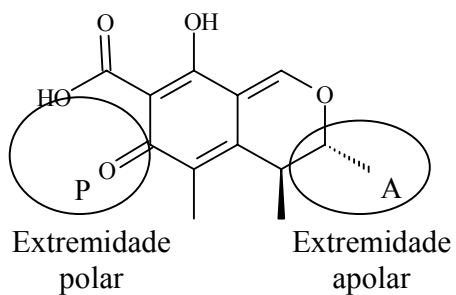


A substância S-9 também não apresentou um bom resultado com inibição de cerca de 22% dos parasitas a uma concentração de 320 $\mu\text{g/mL}$.

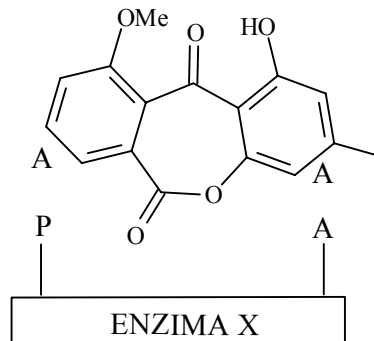
Os resultados obtidos nos ensaios leishmanicidas com as substâncias S-7, S-8 e S-9 juntamente com os dados obtidos para a citrinina (S-11) que inibiu 100% dos parasitas de *L. mexicana* [60] e das antraquinonas 2-carbaldeídos (A e B) e da aloe-emodina (C) [51] que têm atividade leishmanicida, levam a sugerir que a existência de um grupo polar e outro apolar nas extremidades da molécula é fundamental para que esta venha a ter atividade leishmanicida. As moléculas ligariam-se de maneira específica a alguma enzima do protozoário (FIGURA

4.135) bloqueando a atividade enzimática causando a morte do parasita. As substâncias com duas extremidades polares ou duas extremidades apolares não se ligariam a essa enzima, não sendo, portanto, ativa. No entanto, para a confirmação dessa hipótese é necessário realizar estudos envolvendo estrutura-atividade e modelagem molecular para a confirmação ou não dessa observação.





Ligação efetiva ao sítio enzimático.
Bloqueio da atividade enzimática.
Substância ativa



Ligação não efetiva ao sítio enzimático.
Permanência da atividade enzimática.
Substância inativa

FIGURA 4.135: Mecanismo de ação hipotético baseado, nas observações experimentais (ver comentário acima).

5 - CONCLUSÃO

O estudo do metabolismo secundário de fungos é muito fascinante devido a diversidade das classes estruturais encontradas em um única espécie de fungo e também a complexidade das substâncias isoladas, que exigem um bom conhecimento de espectroscopia de RMN e EM além de muita noção das biossínteses dos produtos naturais por parte do pesquisador que se aventure nesta área. Os fungos são também grandes produtores de substâncias com atividade biológicas úteis. Devido eles estarem sempre em competição com outras espécies (seja de outros fungos ou bactérias, entre outras) pela sobrevivência tornaram-se especialistas em produzir substâncias com as mais diversas atividades.

Neste trabalho foram estudadas três espécies de fungos do gênero *Penicillium*. Foram isoladas substâncias das classes dos nucleosídeos, esteróides, carboidratos, policetídeos entre outras. O policetídeo citrinina-D foi identificado como um dímero da citrinina e é um produto natural novo. Algumas das substâncias isoladas mostraram uma grande complexidade estrutural, revelando a grande habilidade principalmente do fungo *P. herquei* em produzir metabólitos secundários.

Os policetídeos citrinina, citrinina-D, citrinina H1, emodina, citreoroseina e janthinona mostraram boa atividade antimicrobiana nos ensaios realizados. O fungo quando em associação com a planta hospedeira poderia estar metabolizando estes compostos com o intuito de impedir a invasão de outros microorganismos em seu “território”. A planta também estaria se beneficiando desta associação, pois as substâncias impediriam a infestação desta por algum microorganismo patógeno.

A substância emodina também apresentou moderada atividade leishmanicida. Foi observada também uma possível relação estrutura-atividade, onde os compostos com uma das extremidades polar e a outra apolar deram bons resultados nos ensaios realizados, já as substâncias onde observou-se conter as duas

partes polares ou as duas partes apolares não mostraram bons resultados, o que pode ser importante no estudo de possíveis protótipos para novos fármacos contra essa doença.

Assim, julga-se necessário a continuidade de estudos visando a química de fungos endofíticos, com o intuito de se obter possíveis substâncias ativas, bem como, contribuir para o entendimento da interação fungo/planta.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] PETRINI, O.; SIEBER, T. N.; TOTI, L. & VIRET, O. "Ecology, metabolite production, and substrate utilization in endophytic fungi". *Natural Toxins*, **1**: 185-196, 1992.
- [2] JARVIS, B. B. & MILLER, J. D. "Natural Products, Complexity and Evolution" IN: *Phytochemical Diversity and Redundancy in Ecological Interactions*. Romeo et al. New York, Plenum Press, 1996. p. 265-293.
- [3] LI, J. Y., *et al.* "The induction of taxol production in the endophytic fungus – *Periconia* sp from *Torreya grandifolia*". *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. **20**: 259-264, 1998.
- [4] STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D.; GROTHAUS, P. AND BIGNAMI, G. "The search for a taxol-producing microorganism among the endophytic fungi of the pacific yew, *Taxus brevifolia*". *J. Natural Products*, **58** (9): 1315-1324, 1995.
- [5] SELOSSE, M. A., Le TACON, F. The land flora: a phototroph-fungus partnership ?. *Trends in Ecology & Evolution*, **13** (1): 15-20, 1998.
- [6] PASCHOALATI, S. F.; STANGARLIN, J. R.; LEITE, B. and SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. Mecanismos de patogenicidade em fungos. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, **6**: 1-47, 1998.
- [7] AGRIOS, G. N. *Plant Pathology*. 3^a ed. New York, Academic Press, 1988.
- [8] ROHR, J. "Biosynthesis of taxol". *Angewandte Chemie- International Edition English*. **36** (20): 2190-2195, 1997.
- [9] MCMILLIAN, J. AND SUTER, P. J. *Naturwissenschaften*, **45**, p. 46, 1958.

- [10] JARVIS, B. B.; REJALI, N. M.; SCHENKEL, E. P.; BARROS, C. S. and MATZENBACHER, N. I. “Trichothecene mycotoxins from Brazilian *Baccharis* species”. *Phytochemistry*, **30**(3): 789-797, 1991.
- [11] DESJARDINS, A. E.; HOHN, T. M.; MCCORNICK, S. P. & PROCTOR, R. H. *Curr. Top. Plant Physiol.* **15**: 211-219, 1995.
- [12] PENNINGTON, T. D.; STYLES, B. T. A generic monograph of the Meliaceae. *Blumea*, **22** (3): 419-540, 1975.
- [13] JOLY, A. B. *Introdução à Taxonomia Vegetal*. São Paulo, EDUSP, 1966, p. 355-356.
- [14] KAPOOR, V. K. & CHAWLA, A. S. *J. Scient. Ind. Res.* **45**(11): 503-511, 1986.
- [15] SANTOS, R. M. dos. *Interação Planta- Microorganismo: o papel de metabólitos secundários na interação de Melia azedarach com fungos filamentosos*. São Carlos. Programa de Pós- Graduação em Química – UFSCar, 1999. Dissertação de Mestrado, p. 28 e 70.
- [16] ENGLER, A. *Die Natürlichen Pflanzenfamilien*. 2^a ed. Leipzig: engelmann, 187-458, 1931.
- [17] KONG, Y. C. et al. Yuehchukeno, a novel anti-implantation indole alkaloid from *Murraya paniculata*. *Planta medica*, **304**, 1985.
- [18] FERRACIN, R. J., “Estudo fitoquímico de *Murraya paniculata*”, Tese de Doutorado. São Carlos, 1996.
- [19] DEWICK, P. M. *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*. 2a ed. John Wiley & Sons, 2001.

- [20] RODRIGUES-Fo, E. dados não publicados.
- [21] MARINHO, A. M. R.; RODRIGUES-Fo, E.; FERREIRA, A. G.; SANTOS, L. S. C25 steroid epimers produced by *Penicillium janthinellum*, a fungus isolated from fruits *Melia azedarach*. *J. Braz. Chem. Soc.*, **16** (x), xx-xx, 2005.
- [22] AMAGAT, T.; AMAGATA, A.; TENNEY, K.; VALERIOTE, F. A., LOBKOVSKY, E.; CLARDY, J.; CREWS, P. Unusual C25 steroids produced by a sponge-derived *Penicillium citrinum*. *Organic Letters*, **5** (23): 4393-4396, 2003.
- [23] PENN, J.; SWIFT, R.; WIGLEY, L. J.; MANTLE, P. G.; BILTON, J. N. and SHEPPARD, R. N. Janthitrem B and C, two principal indole-diterpenoids produced by *Penicillium janthinellum*. *Phytochemistry*, **32** (6), 1431-1434, 1993.
- [24] PENN, J.; MANTLE, P. G. Biosynthetic intermediates of indole-diterpenoid mycotoxins from selected transformations at C-10 of paxilline. *Phytochemistry*, **35** (4): 921-926, 1994.
- [25] YAMAGUCHI, T.; NOZAWA, K.; HOSOE, T.; NAKAJIMA, S.; KAWAI, K. Indoloditerpenes related to tremorgenic mycotoxins, penitrem, from *Penicillium crustosum*. **32** (5): 1177-1181, 1993.
- [26] MILES, C.; WILKINS, A.; GARTHWAITE, I.; EDE, R.; MUNDAY-FINCH, S. C. Immunochemical techniques in natural products chemistry: isolation and structure determination of a novel indole-diterpenoid aided by TLC-ELISAgram. *J. Org. Chem.* **60**: 6067-6069, 1995.

- [27] KIMURA, Y.; TANI, K.; KOJIMA, A.; SOTOMA, G.; OKADA, K.; SHIMADA, A. Cyclo-(L-tryptophyl-L-phenilalanyl), a plant growth regulator produced by the fungus *Penicillium* sp. *Phytochemistry*, **41** (3): 665-669, 1996.
- [28] MUSUKU, A.; SELALA, M. I.; BRUYNE, T.; CLAEYS, M.; SCHEPENS, P. J. C. Isolation and structure determination of a new roquefortine-related mycotoxin from *Penicillium verrucosum* var. *Cyclopium* isolated from cassava. *J. Nat. Prod.* **57** (7): 983-987, 1994.
- [29] KOZLOVSKY, A. G.; VINOKUROVA, N. G.; ADANIN, V. M.; BURKHARDT, G.; DAHSE, H.; GRÄFE, U. New diketopiperazine alkaloids from *Penicillium fellutanum*. *J. Nat. Prod.* **63**: 698-700, 2000.
- [30] SORENSEN, D.; LARSEN, T. O.; CHRISTOPHERSEN, C.; NIELSEN, P. H.; ANTHONI, U. Dipodazine, a diketopiperazine from *Penicillium dipodomyis*. *Phytochemistry*, **51**: 1181-1183, 1999.
- [31] MANTLE, P. G.; WEEDON, C. M. Biosynthesis and transformation of tremorgenic indole-diterpenoids by *Penicillium paxilli* and *Acremonium lolii*. *Phytochemistry*, **36** (5): 1209-1217, 1994.
- [32] DAI, M. C.; TABACCHI, R.; SATURNIN, C. nitrogen-containing aromatic compound from the culture médium of *Penicillium chrysogenum* Thom. *Chimia* **47**: 226-229, 1993.

- [33] KOSEMURA, S. Meroterpenoids from *Penicillium citreo-viride* B. IFO 4692 and 6200 hybrid. *Tetrahedron*, **59**: 5055-5072, 2003.
- [34] PHIPPS, R. K.; PETERSEN, B. O.; CHRISTENSEN, K. B.; DUUS, J. O.; FRISVAD, J. C.; LARSEN, T. O. Hesseltin A, a novel antiviral metabolite from *Penicillium hesseltinei*. *Organic Letters*, **6** (20): 3441-3443, 2004.
- [35] STIERLE, D. B.; STIERLE, A. A.; HOBBS, J. D.; STOKKEN, J.; CLARDY, J. Berkeleydione and berkeleytrione, new bioactive metabolites from a acid mine organism. *Organic Letters*, **6** (6): 1049-1052, 2004.
- [36] GRABLEY, S.; HAMMANN, P.; HÜTTER, K.; KIRSCH, R.; KLUGE, H.; THEIRICKE, R. Secondary metabolites by chemical screening. 20. Decarestrictines, a new family of inhibitors of cholesterol biosynthesis from *Penicillium*: III. Decarestrictines E to M. *The Journal of Antibiotics*, **45** (7): 1176-1181, 1992.
- [37] SAKUDA, S.; OTSUBO, Y.; YAMADA, Y. Structure of patulodin, a new azaphilone epoxide, produced by *Penicillium urticae*. *The Journal of Antibiotics*, **48** (1): 85-86, 1995.
- [38] KIMURA, Y.; YOSHINARI, T.; SHIMADA, A.; HAMASAKI, T. Isofunicone, a pollen growth inhibitor produced by the fungus, *Penicillium* sp. *Phytochemistry*, **40** (3): 629-631, 1995.

- [39] MILLER, R.; HUANG, S. Isolation and structure of sorrentanone: a new tetrasubstituted quinone from *Penicillium chrysogenum*. *The Journal of Antibiotics*, **48** (6): 520-521, 1995.
- [40] KIMURA, Y.; SHIOJIMA, K.; NAKAJIMA, H.; HAMASAKI, T. Structure and biological activity of plant growth regulators produced by *Penicillium* sp No. 31f. *Biosci. Biotech. Biochem.* **56** (7), 1138-1139, 1992.
- [41] TABATA, N.; TOMODA, H.; IWAI, Y.; OMURA, S. Arohynapene d, a new anticoccidial agent produced by *Penicillium* sp FO-2295. *The Journal of Antibiotics* **48** (1): 83-84, 1995.
- [42] LIU, W.; GU, Q.; ZHU, W.; CUI, C.; FAN, G.; ZHU, T.; LIU, H.; FANG, Y. Penicillones A and B, two novel polyketides with tricyclo [5.3.1.0^{3,8}] undecane skeleton, from a marine-derived fungus *Penicillium terrestre*. *Tetrahedron Letters* **46**: 4993-4996, 2005.
- [43] BUGNI, T. S.; JANSO, J. E.; WILLIAMSON, T.; FENG, X.; BERNAN, V. S.; GREENSTEIN, M.; CARTER, G.; MAIESE, W. M.; IRELAND, C. M. Dictyosphaeric acids A and B: new decalactones from an undescribed *Penicillium* sp obtained from the alga *Dictyosphaeria versluyii*. *J. Nat. Prod* **67** (8): 1396-1399, 2004.
- [44] BUBNI, T. S.; BERNAN, V. S.; GREENSTEIN, M.; JANSO, J. E.; MAIESE, W. M.; MAYNE, C. L.; IRELAND, C. M. Brocaenols A-C: novel polyketides from a marine derived *Penicillium brocae*. *J. Org. Chem.* **68**: 2014-2017, 2003.

- [45] FUJII, Y.; ASAHARA, M.; ICHINOE, M.; NAKAJIMA, H. Fungal melanin inhibitor and related compounds from *Penicillium decumbens*. *Phytochemistry* **60**: 703-708, 2002.
- [46] BELOFSKY, G. N.; GLOER, K. B.; GLOER, J. B.; WICKLOW, D. T.; DOWD, P. F. New p-terphenyl polyketide metabolites from the sclerotia of *Penicillium raistrickii*. *J. Nat. Prod.* **61** (9): 1115-1119, 1998.
- [47] STIERLE, D. B.; STIERLE, A. A.; GANSER, B. K. Isolation of two highly methylated polyketide derivatives from a yew-associated *Penicillium* species. *J. Nat. Prod.* **62** (8): 1147-1150, 1999.
- [48] PAVIANI, E. R.; STADNIK, C. B.; HEINEK, I. Estudos da epidemiologia e perfil de sensibilidade da *Pseudomonas aeruginosa*. *Infarma* **15** (11-12), 2003 e 2004.
- [49] Manual das doenças transmitidas por alimentos. *Centro de vigilância epidemiológica – CVE*. www.cve.saude.sp.gov. acessado em 26/09/2005.
- [50] TRABULSI, L. R. *Microbiologia*. 2^a ed. Rio de Janeiro, São Paulo. Livraria Atheneu Editora, 1991. p. 173.
- [51] CHAN-BACAB, M. J.; PENÃ-RODRÍGUEZ. Plant Natural Products with Leishmanicidal Activity. *Journal of Natural Report*: **18**, 674-688, 2001.
- [52] RABELLO, A.; ORSINI, M.; DISCH, J. Leishmania/HIV co-infection in Brazil: na appraisal. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*. **97** (1): S17-S28, 2003.

- [53] SANTOS, R. M. G. Metabolismo secundário dos fungos *Penicillium* sp e *Fusarium moliniforme* isolados como endofíticos de *Melia azedarach* (Meliaceae). Tese de Doutorado, DQ – UFSCar, 2003.
- [54] BREITMAEIR, E. *Carbon-13 NMR Spectroscopy*. New York, John Wiley & Sons, 1987.
- [55] YUE, J.; CHEN, S.; LIN, Z.; SUN, H. Sterol from the fungus *Lactarium volemus*. *Phytochemistry*, **56**, 801-806. 2001.
- [56] KAWAGISHI, H.; KATSUMI, R.; SAZAWA, TAKASHI, M.; HAGIWARA, T. and NAKAMURA, T. “Cytotoxic Steroids from the Mushroom *Agaricus blazei*” *Phytochemistry*, **27**: 2777 – 2779, 1988.
- [57] FUGIMOTO, H.; NAKAMURA, E.; OKUYAMA, E.; ISHIBASHI, M. Six immunosuppressive features from the Ascomycete, *Zopfiella longicaudata*, found in a screening study monitored by immunomodulatory activity. *Chem. Pharm. Bull.* **52** (8): 1005-1008, 2004.
- [58] CIMINIELLO, P.; FATTORUSSO, E.; MAGNO, S.; MANGONI, A. A novel conjugated ketosteroid from the marine sponge *Dictyonella incisa*. *J. Nat. Prod.* **52** (6): 1331-1333, 1989.
- [59] COHEN, P. A. & TOWERS, G. H. N. The antraquinones of *Heterodermia obscurata*. *Phytochemistry*, **40**: 911-9915, 1995.
- [60] GAMBOA, T. *Tese de Doutorado* DQ – UFSCar, 2000

- [61] MARINHO, A. M. R.; RODRIGUES-Fo, E.; MOITINHO, M. L. R.; SANTOS, L. S. Biologically active polyketides produced by *Penicillium janthinellum* isolated as an endophytic fungus from fruits of *Melia azedarach*. *J. Braz. Chem. Soc.* **16** (2): 280-283, 2005.
- [62] POUPKO, R.; LUZ, Z.; DESTRO, R. Carbon -13 NMR of citrinin in the Solid State and Solutions. *J. Phys. Chem. A*, **101**, 5097-5102.. 1997.
- [63] TRIVEDI, A. B.; HIROTA, M.; DOI, E.; KITABATAKE, N. Formation of a new toxic compound, citrinin H1, from citrinin on mild heating in water. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*. 2167-2171, 1993.
- [64] OIKAWA, H. Biosynthesis of structural unique fungal metabolite GKK1032A₂: indication of novel carbocyclic formation mechanism in polyketide biosynthesis. *J. Org. Chem.* **68** (9): 3552-3557, 2003.
- [65] ISAKA, M.; KITTAKOOP, P.; KIRTIKARA, K.; HYWEL-JONES, N. L.; THEBTARANONTH, Y. Bioactive substances from insect pathogenic fungi. *Acc. Chem. Res.* **38** (10): 813-823, 2005.
- [66] MARINHO, A. M. R. Investigação química e propriedades biológicas dos extratos do fungo *Penicillium janthinellum* associado como endofítico aos frutos de *Melia azedarach* (MELIACEAE). *Dissertação de Mestrado*. DQ – UFSCar, 2002.

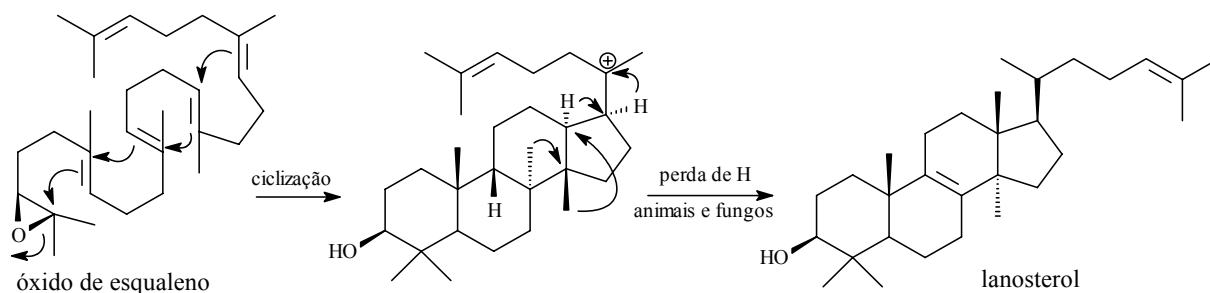
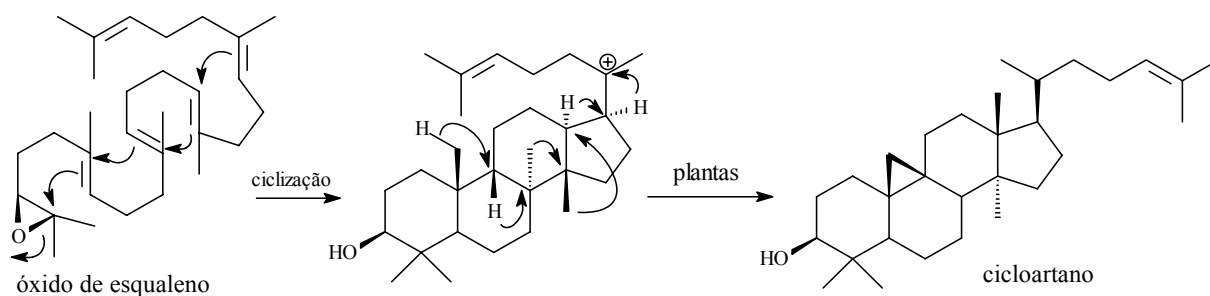
- [67] DE SOUZA, A. D. L. Perfis químicos e metabólitos de fungos endofíticos dos gêneros *Eutypia*, *Trichoderma* e *Pestalotiopsis*, isolados das plantas *Murraya paniculata*, *Pinus taeda* e *Gustavia* CF. *Elliptica*. Tese de Doutorado DQ – UFSCar, 2005.
- [68] ZHAN, Z.; YUE, J. New glycosphingolipids from the fungus *Catathelasma ventricosa*. *J. Nat. Prod.* **66** (7): 1013-1016, 2003.

ANEXO 01

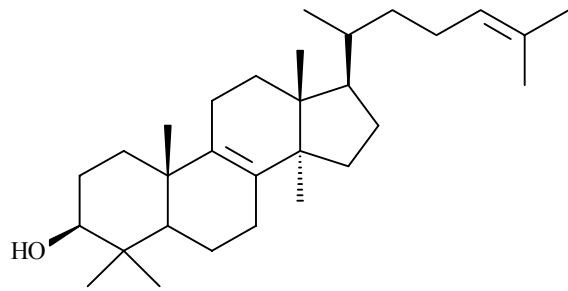
7 - BIOGÊNESE E FORMAÇÃO DE ALGUNS METABÓLITOS ISOLADOS

7.1 - ESTERÓIDES

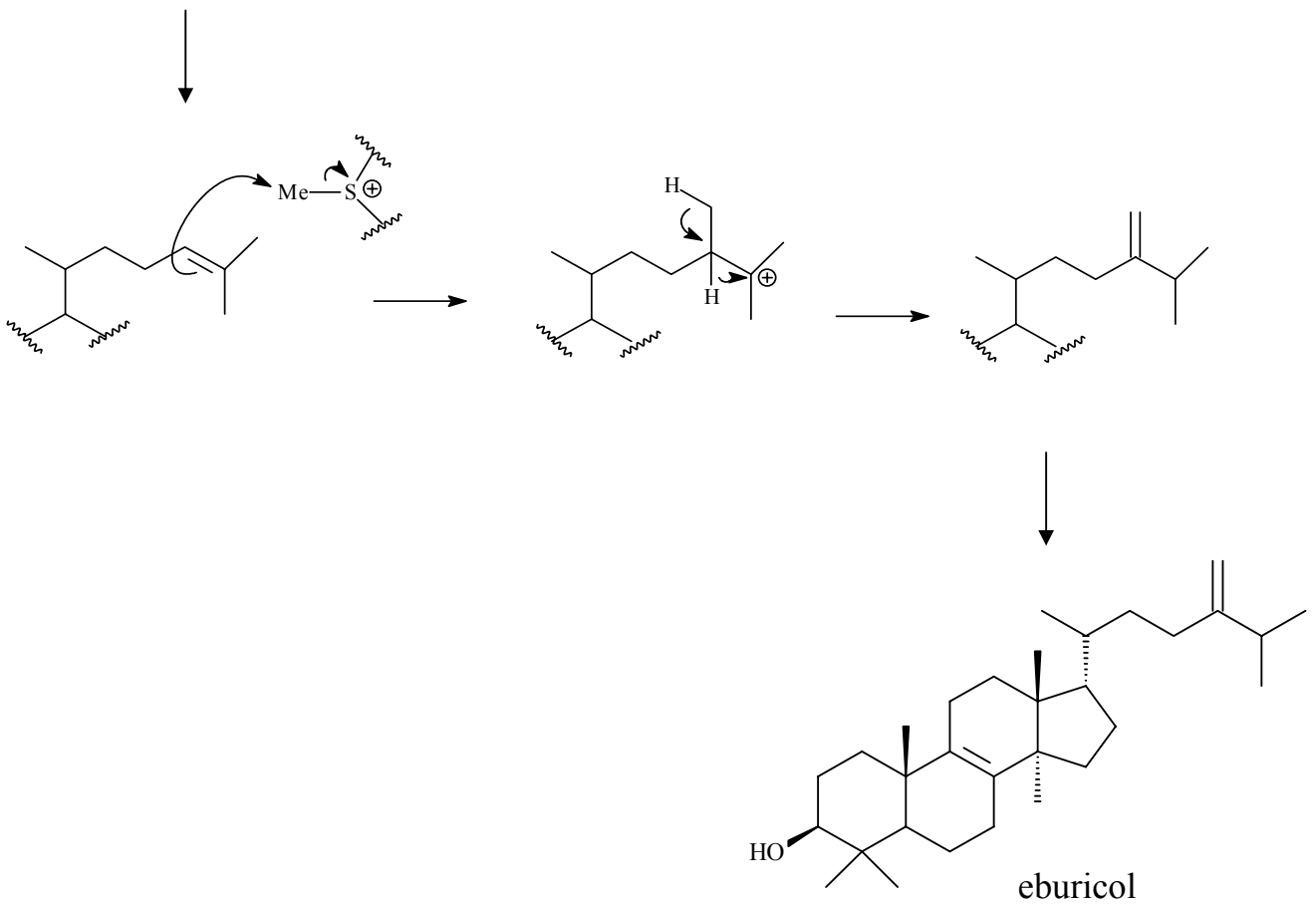
A formação dos esteróides se dá através da ciclização do óxido de esqualeno levando ao cátion protosteril, que de acordo com o tipo de migrações sofrida por esse cátion ele levará ou a formação dos ciclortanos, precursores dos esteróides em plantas, ou ao lanosterol precursor dos esteróides em fungos e animais.

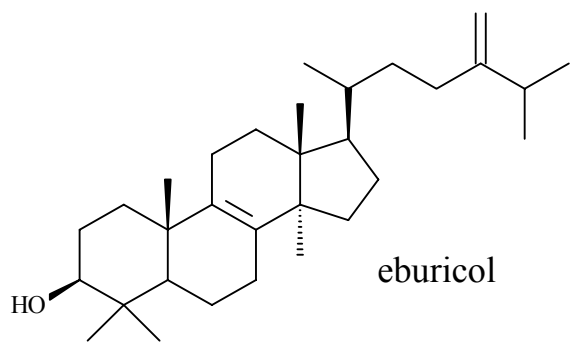


Biosíntese ergosterol [19]

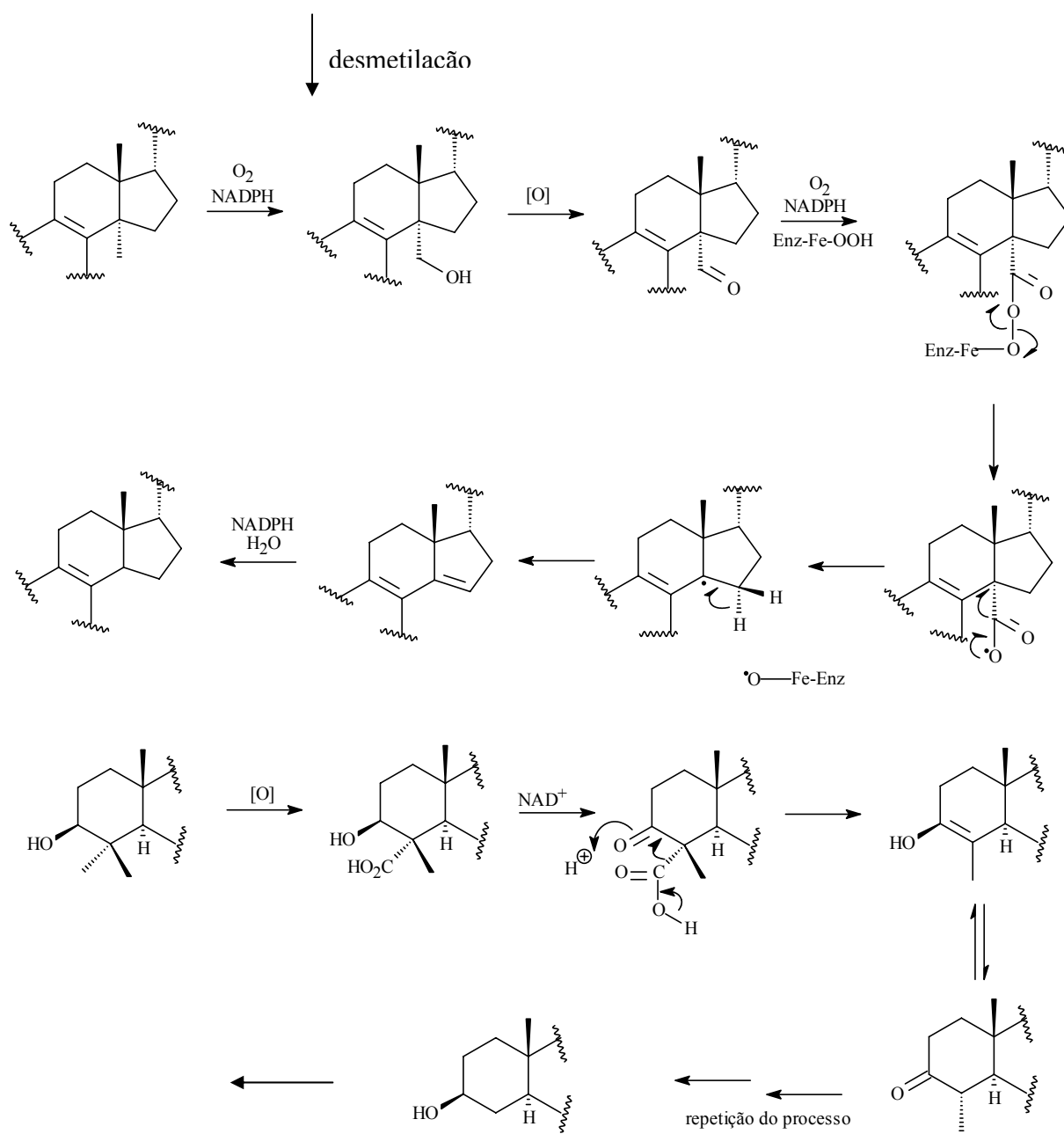


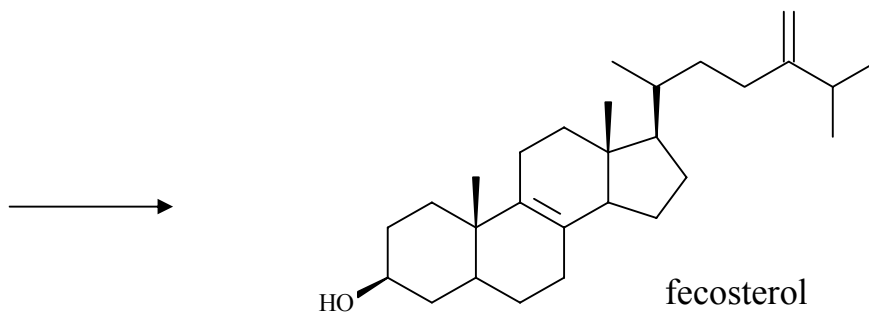
lanosterol



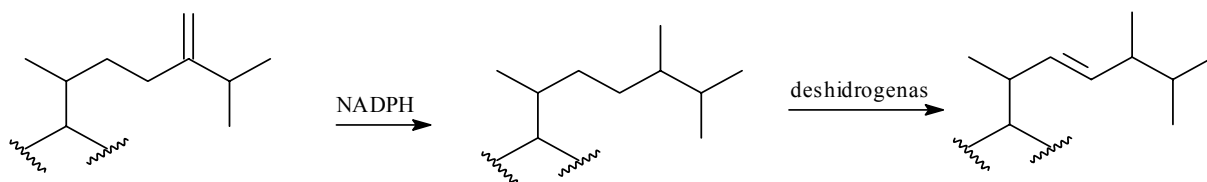


desmetilação

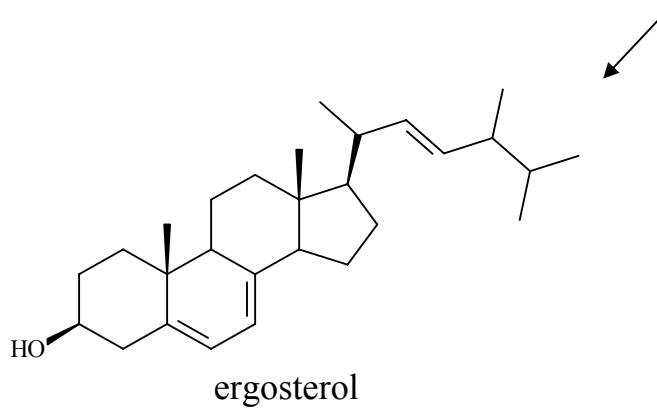
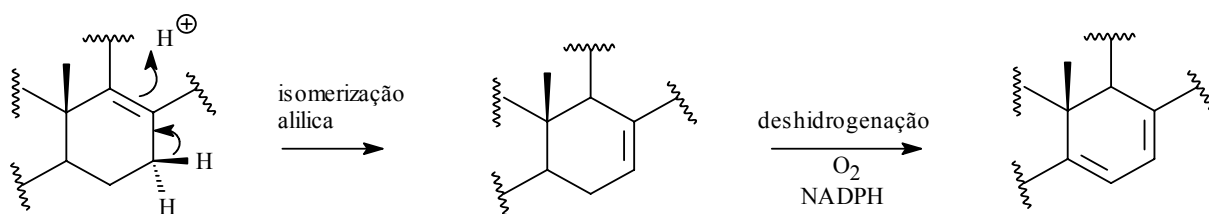




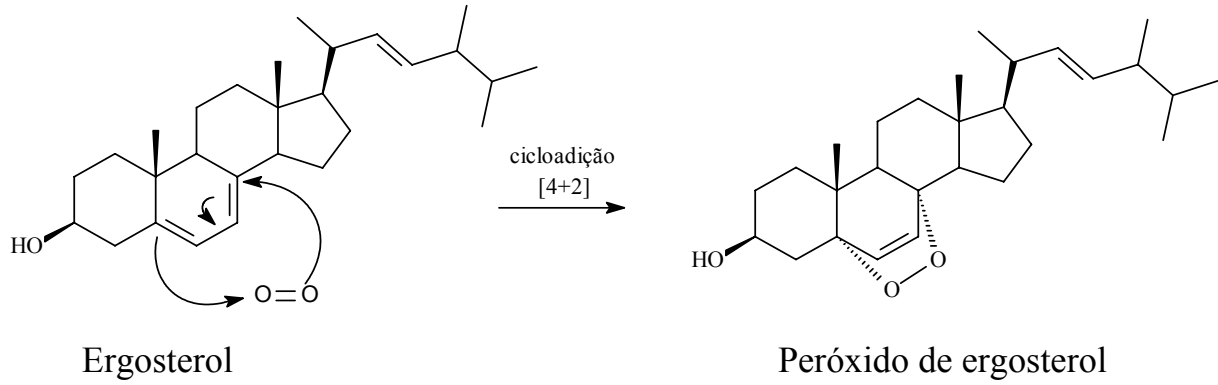
Modificação da cadeia lateral



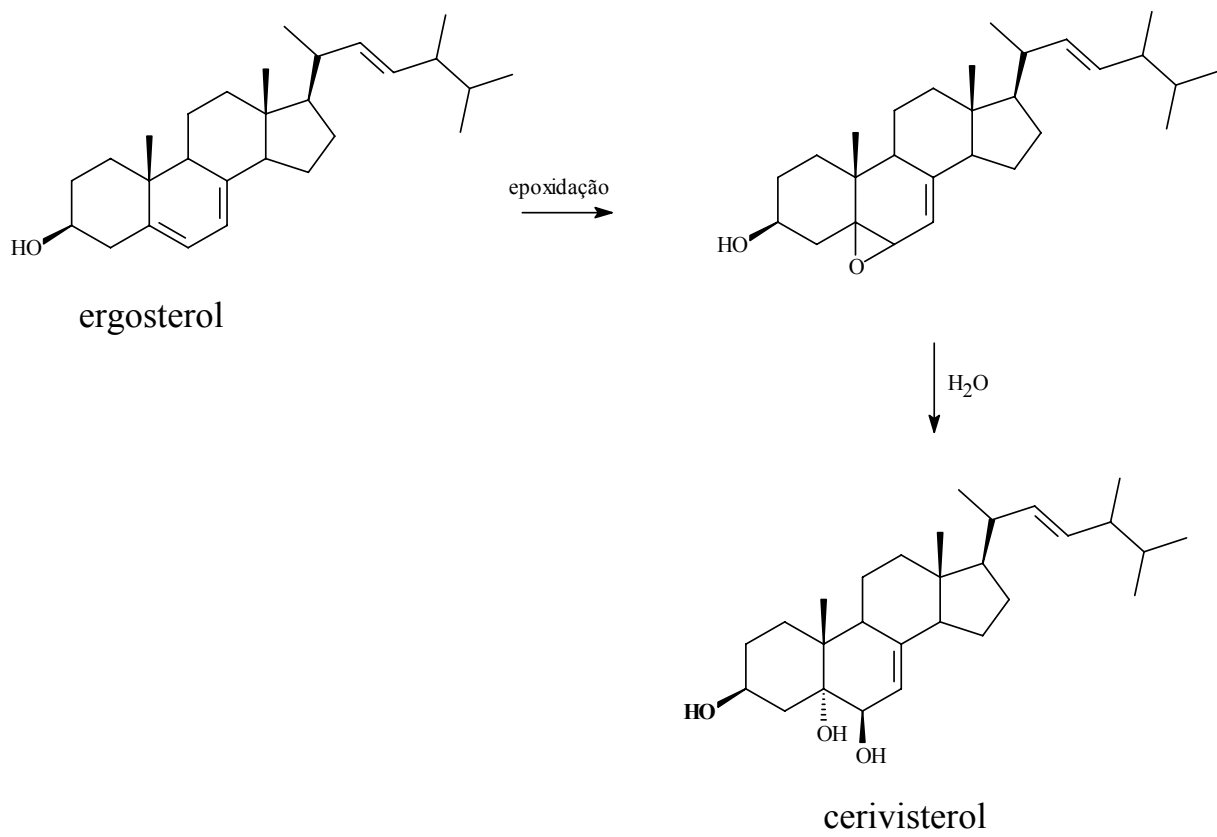
Modificação do anel B



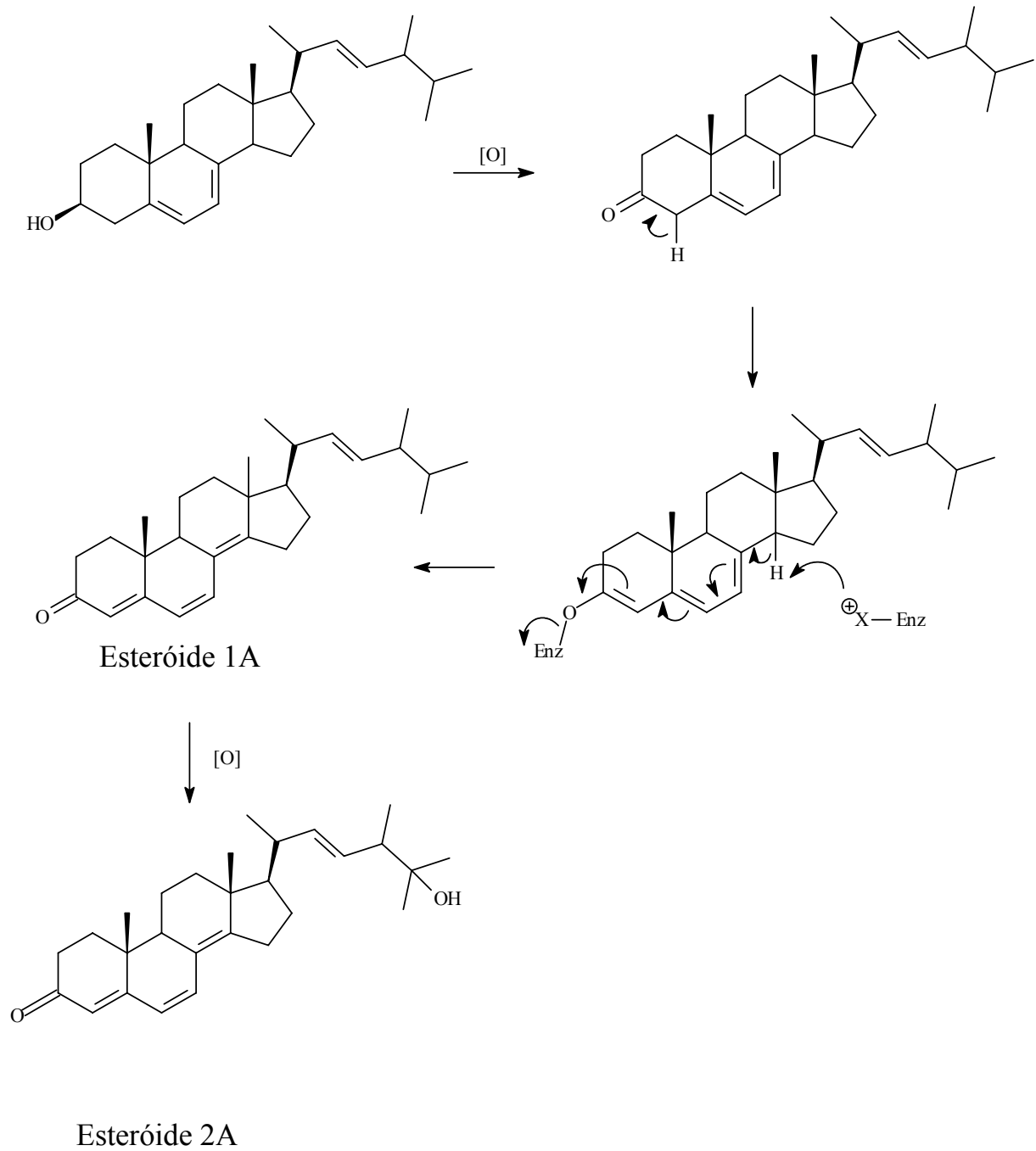
Biogênese peróxido de ergosterol



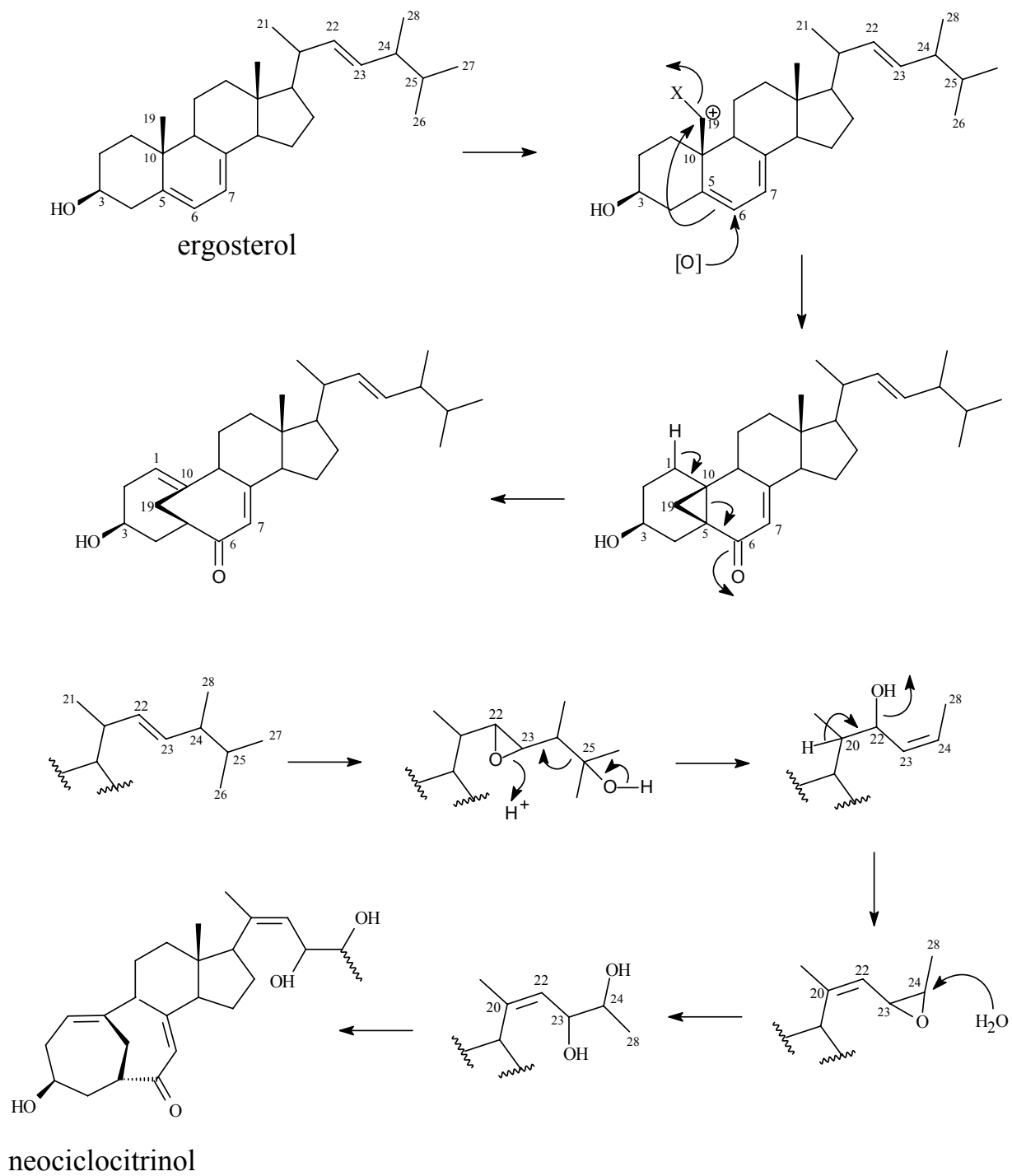
Biogênese cerivisterol



Biogênese esteróide 1A e esteróide 2A



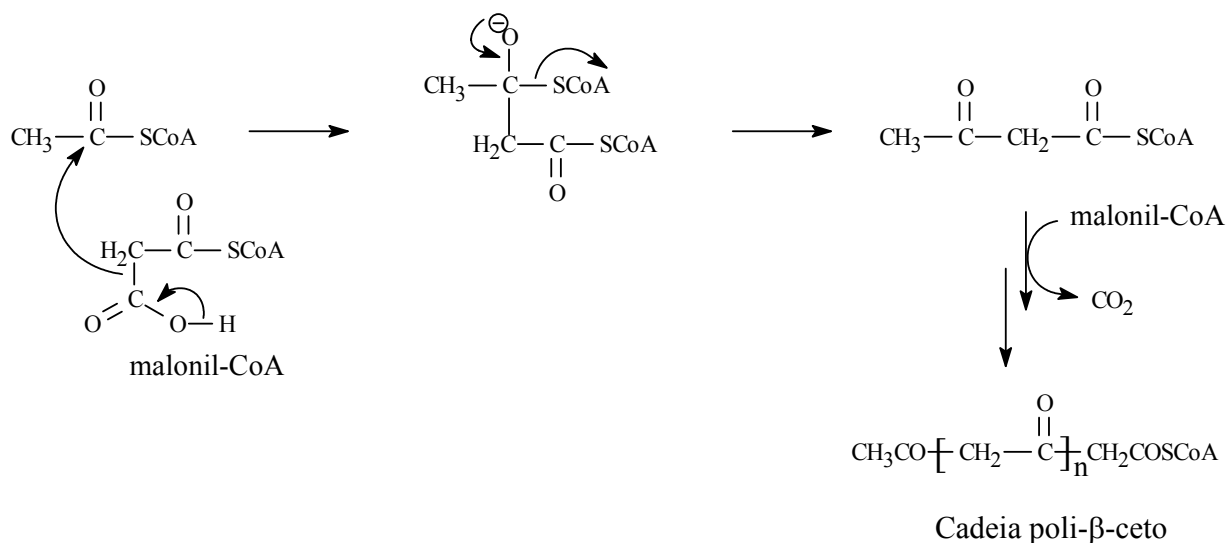
Biogênese neociclocitrinol [21]



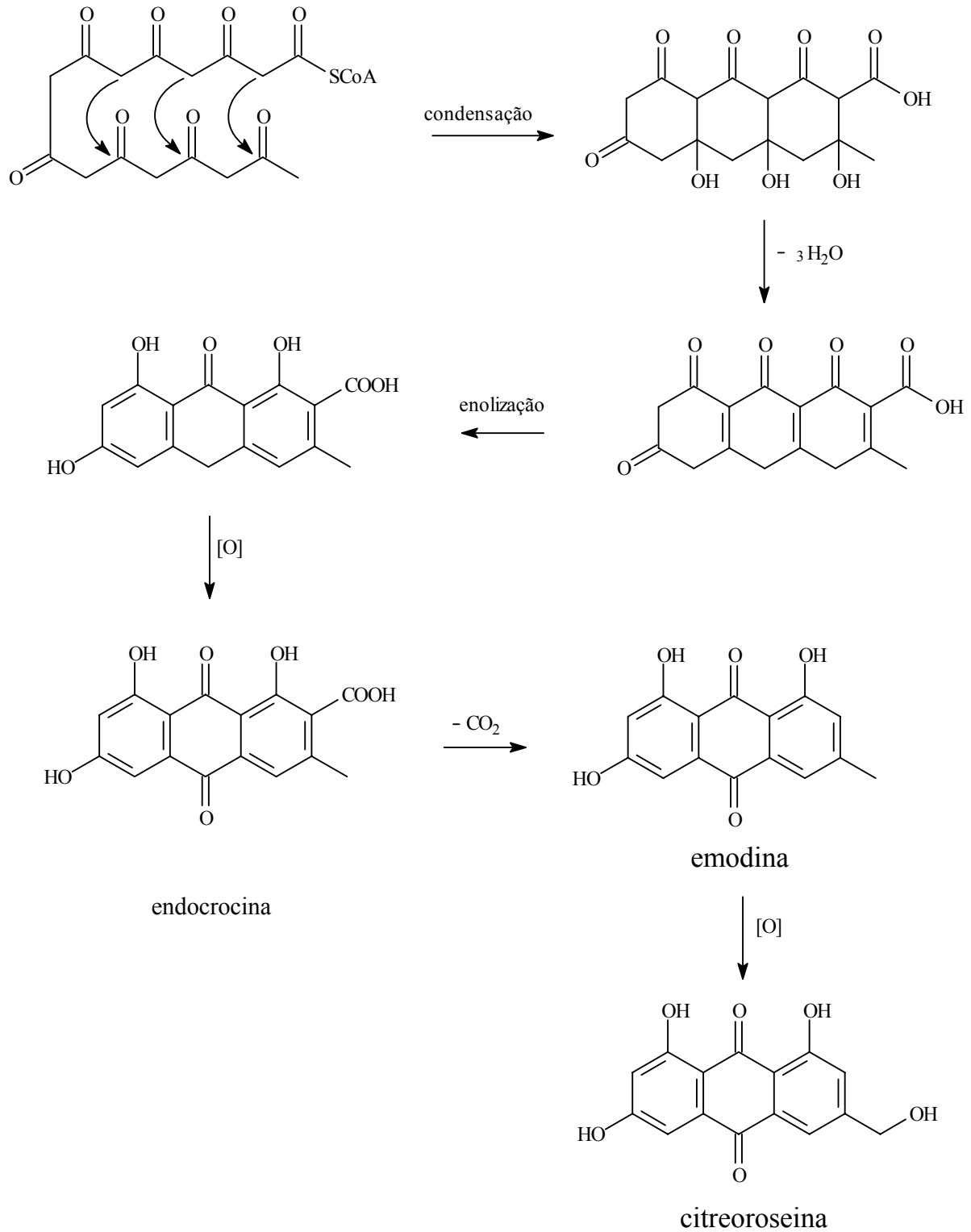
ANEXO 02

7.2 - POLICETÍDEOS

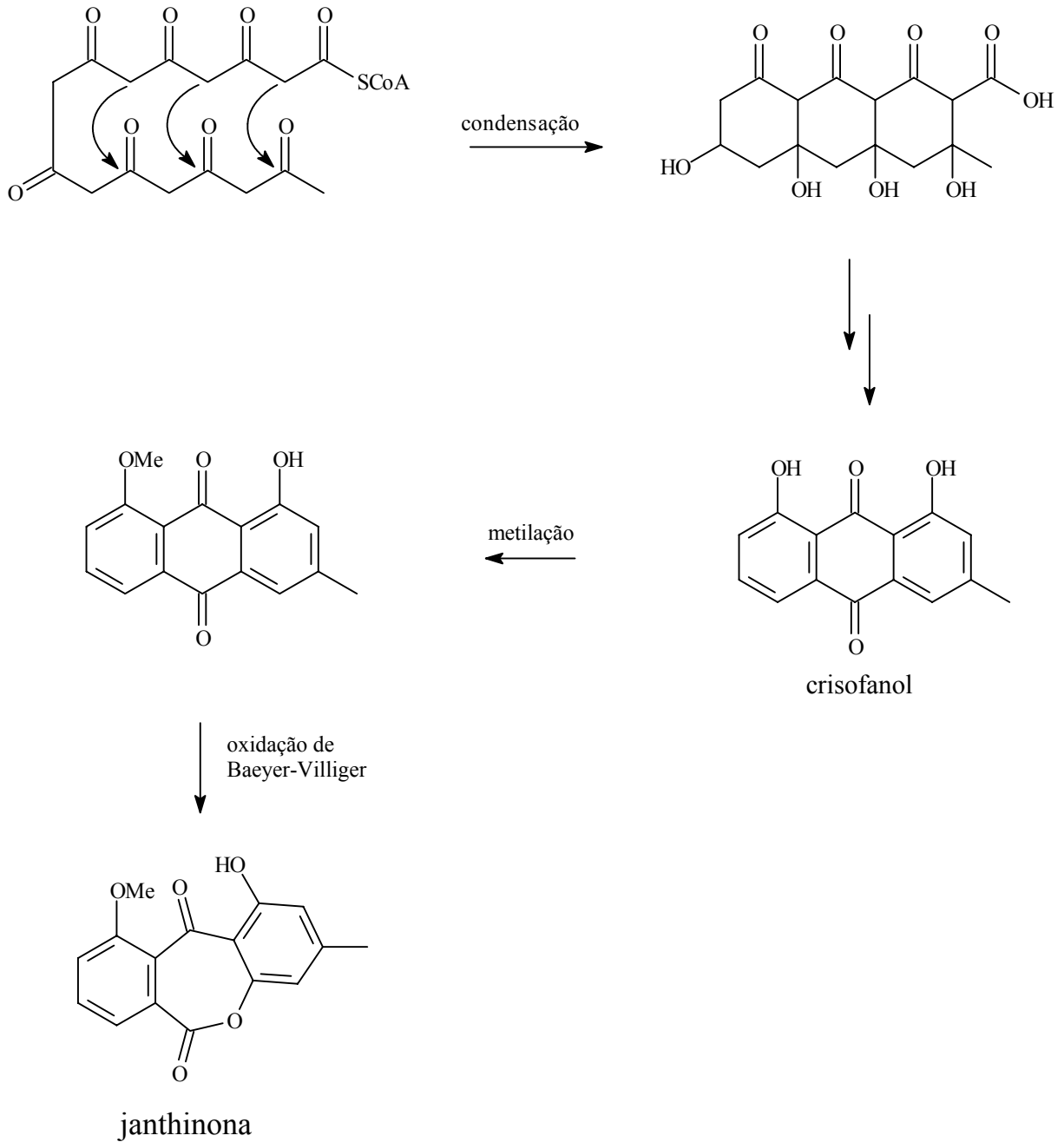
Os policetídeos constituem uma larga classe produtos naturais. Sua diversidade estrutural pode ser explicada devido as várias conformações possíveis para a cadeia poli- β -ceto antes da ciclização. Esta cadeia é formada por unidades de ácido acético (unidades C2) via reações de condensação. Constituem a classe dos policetídeos os ácidos graxos, poliacetilenos, prostaglandinas, macrolídeos e alguns compostos aromáticos como antraquinonas e tetraciclinas.



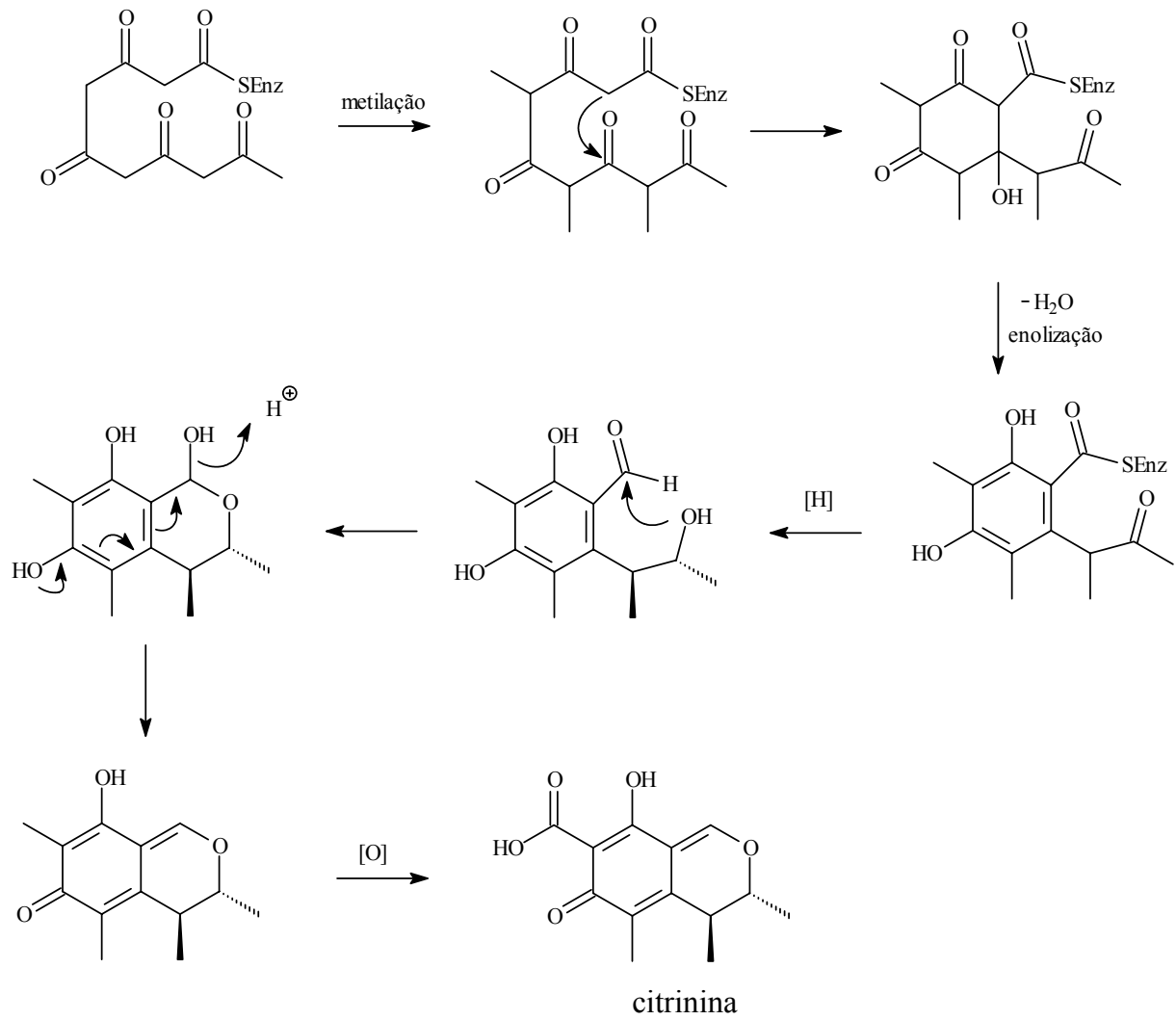
Biossíntese emodina e citreorseina [19]



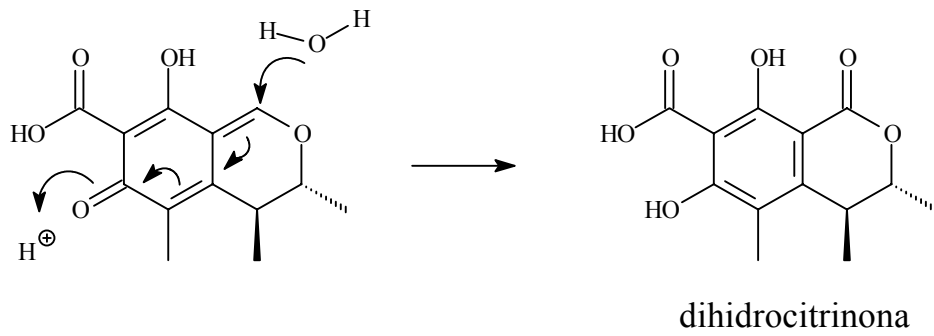
Biogênese janthinona



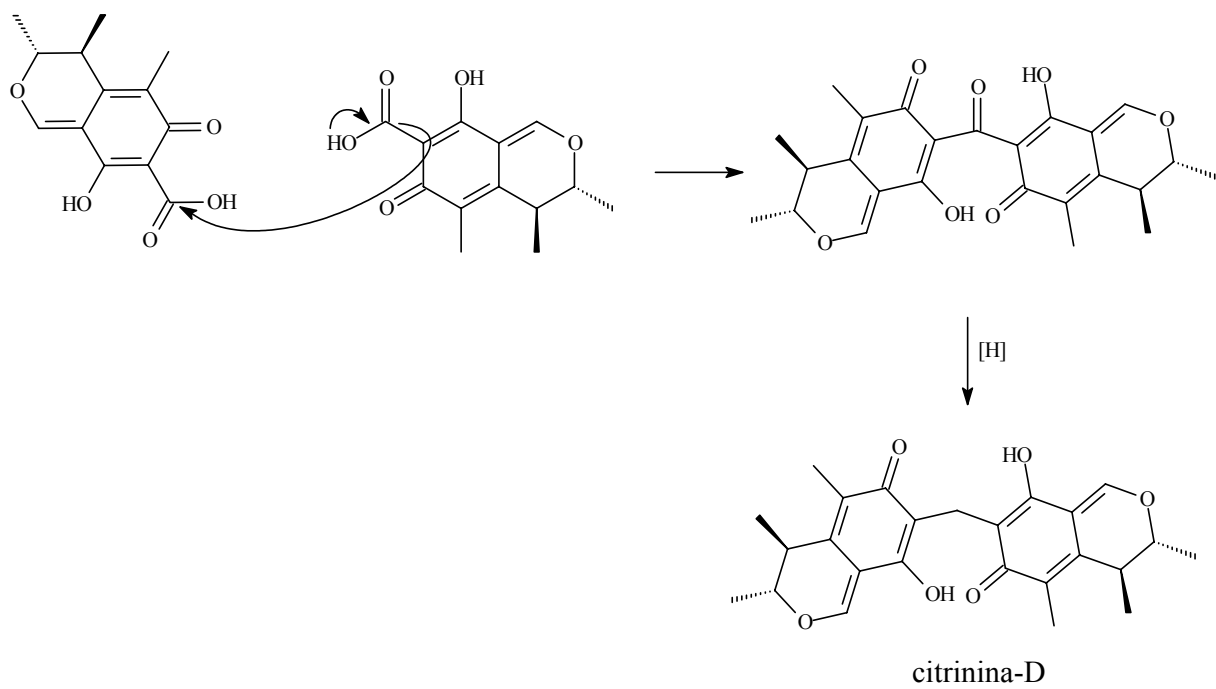
Biossíntese citrinina [19]



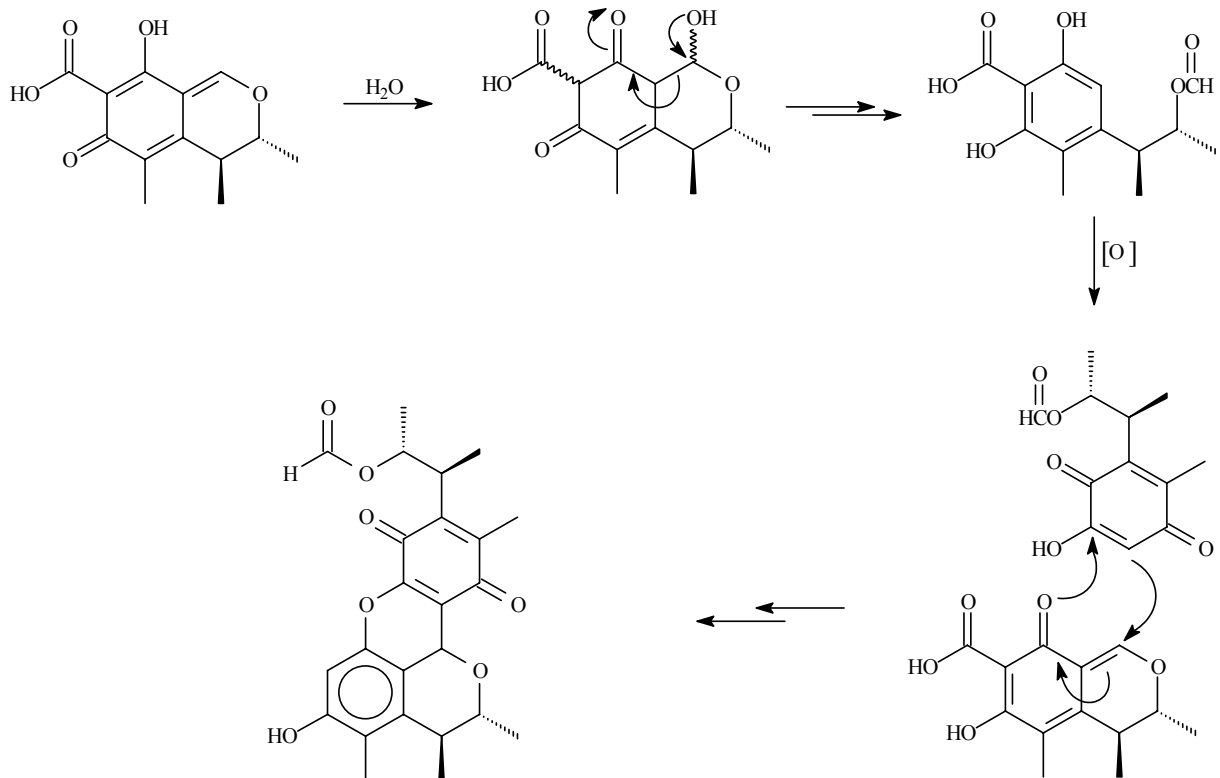
Biogênese dihidrocitrinona



Biogênese citrinina-D



Formação da citrinina 1H [63]



Biosintese GKK1032 [64]

