

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

**“BIOTRANSFORMAÇÃO DE CICLOADUTOS DE DIELS-
ALDER POR CÉLULAS INTACTAS DE *Penicillium*
brasilianum, ENDOFÍTICO DE *Melia azedarach*”**

ANA CAROLINA ALVES DOS SANTOS*

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

Orientador: Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho

***BOLSISTA CAPES**

São Carlos – SP

2014

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

S237bc

Santos, Ana Carolina Alves dos.

Biotransformação de cicloadutos de Diels-Alder por células intactas de *Penicillium brasilianum*, endofítico de *Melia azedarach* / Ana Carolina Alves dos Santos. -- São Carlos : UFSCar, 2015.
176 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2014.

1. Microorganismos endofíticos. 2. *Penicillium brasilianum*. 3. Biotransformação. 4. Células intactas. 5. Diels-Alder. 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 Mestrado Acadêmico

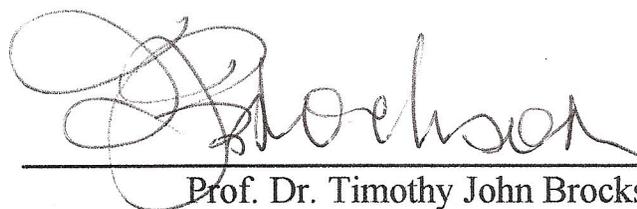
Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a defesa de dissertação de Mestrado Acadêmico da candidata Ana Carolina Alves dos Santos, realizada em 27 de março de 2014:



Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho



Profa. Dra. Cintia Duarte de Freitas Milagre



Prof. Dr. Timothy John Brocksom

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, minha eterna gratidão a Deus pela oportunidade que me concedeu e pela maneira como tem dirigido a minha vida. Obrigada, Pai!

Ao prof. Dr. Edson Rodrigues-Filho pela orientação e ensinamentos ao longo desses anos.

À CAPES, CNPQ e FAPESP pelo auxílio à pesquisa.

Aos meus familiares, por todo apoio e incentivo. Em especial à minha mãe, meus irmãos e avós maternos. Amo vocês de todo o meu coração!

Às minhas queridas amigas que estão sempre ao meu lado, Graziani, Sarah, Thayse, Tatiane, Juliana Beatriz, Ana Cláudia: obrigada por tudo!

Aos grandes amigos que adquiri ao longo desses anos, em especial ao Alessander, Myriam, Regis, Denis, Amanda, Ricardo, Ingrid, Sarinha, Ana Julia, Thiago, Sheylla, Bruna, Rubens, Rodrigo e Darlisson por toda amizade, compreensão, torcida e orações. Vocês são parte desta vitória!

À minha família LaBioMMi, obrigada por toda ajuda, discussões científicas, contribuições, amizade e companheirismo ao longo desses anos: José Vinícius, Luciana, Lívia, Marília, Zia, Douglas, Renata, Diana, Taícia, Tatiana, Gabriela, Carolina.

Ao Prof. Dr. Tiago Venâncio, ao Dr. Sergio Scherrer Tomasi e a Luciana Vizotto do Laboratório de RMN pelas análises de Ressonância Magnética Nuclear.

Ao Prof. Dr. Timothy J. Brocksom e ao Prof. Dr. Kleber T. de Oliveira por todas as contribuições científicas para que esse projeto pudesse ser executado.

À Patrícia e ao Bruno pelas análises no polarímetro e simulações computacionais: meu muitíssimo obrigada!

Aos amigos Maria Carolina (Carol), Francisco Fávero (Chiko), Nicholas Gobo (Shrek) do grupo de Síntese Orgânica pelos substratos, ajuda com as reações, paciência e amizade.

E por fim, ao Enzo, pelo carinho, paciência e convivência. Parte do que sou e do que serei devo a você. Obrigada. Te amo!

PRINCIPAIS ABREVIACÕES

δ	-	Deslocamento químico em partes por milhão
[M+H] ⁺	-	Íon <i>quasi</i> molecular
[M+Na] ⁺	-	Aduto ou cluster de sódio
1D	-	Experimento de RMN de uma dimensão
2D	-	Experimento de RMN de duas dimensão
ACN	-	Acetonitrila
AcOEt	-	Acetato de etila
BDA	-	Batata, dextrose e Agar
Calc	-	Calculado
CCD	-	Cromatografia de camada delgada
Cln	-	Células intactas
CLAE	-	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-EM	-	Cromat. Líq. acoplada à Espectrometria de Massas
COSY	-	<i>Correlation spectroscopy</i>
CR	-	Células residuais
<i>d</i>	-	dubleto
DCM	-	Diclorometano
<i>dd</i>	-	duplo dubleto
<i>dt</i>	-	duplo tripleto
EFS	-	Extração em fase sólida
ESI	-	Ionização por electrospray
EtOH	-	Etanol
Hex	-	Hexano
HMBC		Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HRMS	-	<i>High Resolution Mass Spectrometry</i>
HSQC	-	Heteronuclear Single Quantum Correlation
<i>m</i>	-	múltiplo
MCPBA	-	ácido <i>m</i> -cloroperbenzóico
<i>m/z</i>	-	Relação massa/carga
M+F	-	Meio + fungo
M+F+S	-	Meio + fungo+ substrato

M+S	-	Meio + substrato
MeOH	-	Metanol
ODS	-	Octadecilsilano (C-18)
<i>P. brasilianum</i>	-	<i>Penicillium brasilianum</i>
<i>q</i>	-	quadrupletto
<i>quint</i>	-	quintupletto
RMN ¹³ C	-	Ressonância Magnética Nuclear de carbono – 13
RMN ¹ H	-	Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio - 1
RMN	-	Ressonância Magnética Nuclear
<i>s</i>	-	singleto
<i>sept</i>	-	septupletto
<i>septd</i>	-	septudoubleto
<i>t</i>	-	tripletto
t _R	-	Tempo de retenção
Φ	-	Diâmetro

OBSERVAÇÃO: As siglas mais populares em Química Orgânica serão utilizadas no idioma inglês serão mantidas neste idioma, como por exemplo *HRMS*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 – Vantagens e desvantagens do uso de células intactas e enzimas purificadas como biocatalisadores.....	2
TABELA 3.1 – Sistema de eluição utilizado para fracionamento dos extratos obtidos a partir da biotransformação de Q3, Q4, Q5 e Q6.....	21
TABELA 3.2 – Método cromatográfico utilizado para separação das frações F2-F4	22
TABELA 3.3 – Método cromatográfico utilizado na análise da substância Q4_F2_15	23
Tabela 3.4 – Condições do espectrômetro de massas para análise de Q4_F2_15 .	23
Tabela 3.5 - Condições do espectrômetro de massas para análise de íons filhos de Q4_F2_15.....	23
TABELA 3.6 – Método cromatográfico estabelecido para análises dos extratos de biotransformação.....	24
TABELA 3.7 – Método cromatográfico utilizado para purificação dos produtos de redução por cromatografia líquida de média pressão.....	28
TABELA 5.1 – Dados de deslocamento químico de ^1H (δ em ppm) para a substância verruculogenina	45
TABELA 5.2 – Dados de deslocamento químico de ^1H para a substância brevianamida F	47
TABELA 5.3 – Dados de deslocamento químico de ^1H (δ em ppm) para a substância 12,13-dihidroxi-fumitremorgina C	50
TABELA 5.4 – Dados de deslocamento químico de ^1H (δ em ppm) para o metabólito ácido penicílico	51
TABELA 5.5 – Dados de RMN (^{13}C e ^1H) de Q1	56
TABELA 5.6 – Dados de RMN obtidos para a substância Q1A_CR_16	60
Tabela 5.7 – Dados de RMN obtidos para a substância Q1A_CR_26	64
TABELA 5.8 – Dados de RMN (^{13}C e ^1H) de Q2	66
TABELA 5.9 – Dados de RMN obtidos para a substância Q2A_CR_5	69
TABELA 5.10 – Dados de RMN obtidos para a substância Q2A_CR_6	73
TABELA 5.11 – Dados de RMN obtidos para a substância Q2A_CR_9_majoritário	76
TABELA 5.12 – Dados de RMN obtidos para a substância Q2A_CR_9_minoritário	78
TABELA 5.13 – Dados de RMN (^{13}C e ^1H) do substrato Q3	80

TABELA 5.14 – Dados de RMN obtidos para a substância Q3A_CR_8_majoritário	87
TABELA 5.15 – Dados de RMN para a substância Q3A_CR_8_minoritário	89
TABELA 5.16 – Dados de ^1H e ^{13}C do substrato Q4	92
TABELA 5.17 – Dados de RMN da substância Q4A_CR_10	95
TABELA 5.18 – Dados de RMN para a substância Q4A_CR_20	101
TABELA 5.19 – Dados de RMN para a substância Q5A_CR_15	106
Tabela 5.20 – Dados de RMN para a substância Q5A_CR_18.....	110
Tabela 5.21 – Tamanho dos coleótilos de trigo (cm) do ensaio de fitotoxicidade dos substratos Q1-Q5	112
TABELA 5.22 – Resultado das análises por cromatografia quiral	125

LISTA DE ESQUEMAS

ESQUEMA 3.1 – Protocolo utilizado para isolamento e identificação dos produtos de biotransformação	22
ESQUEMA 3.2 – Metodologia abordada para a reação de redução Q1-Q4 por H ₂ /Pd	28
ESQUEMA 3.3 – Metodologia abordada para a reação de redução Q1-Q4 por ácido acético e Zn _(s)	29
ESQUEMA 3.4 – Metodologia abordada para a reação epoxidação de Q1-Q3 com MCPBA	30
ESQUEMA 4.1 – Metodologia abordada para a reação de redução do sistema carbonílico α,β-insaturado de Q4 e Q5	31
ESQUEMA 5.1 – Esquema reacional de redução com H ₂ /Pd	114
ESQUEMA 5.2 – Reação de redução dos substratos Q2-Q4 utilizando-se Zn e ácido acético	116
ESQUEMA 5.3 – Reação de epoxidação dos substratos Q1, Q2 e Q3	118
ESQUEMA 5.4 – Reação de redução carbonílica com NaBH ₄	122

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 – Biotransformação do esteroide DHEA (A) por <i>P. griseopurpureum</i> envolvendo reações de B) redução e oxidação, C e E) oxidação de Baeyer- Villiger, D, F e G) hidroxilação.....	5
FIGURA 1.2 – Biotransformação da 2',4',6'-trimetoxiacetofenona por <i>P. griseoroseum</i>	6
FIGURA 1.3 – Biotransformações envolvendo <i>P. brasilianum</i> e os substratos 1) cânfora e 2) 1-indanona.....	7
FIGURA 1.4 – Reação de Diels-Alder entre o ciclopentadieno ou 2,3-dimetil-butadieno para formação dos compostos Q1-Q5.....	8
FIGURA 1.5 – Estrutura química dos substratos Q1, Q2, Q3, Q4, Q5 e Q6	9
FIGURA 1.6 – Esqueleto de sesqui- e diterpenos de diversas classes.....	10
FIGURA 1.7 – Meroterpenos produzidos por <i>P. brasilianum</i>	11
FIGURA 1.8 – Biotransformação de adutos de Diels-Alder pelo fungo <i>Mucor ramosissimus</i>	12
FIGURA 3.1 – Placas de Petri contendo meio BDA e o micro-organismo <i>P. brasilianum</i> após 7 dias de cultivo	17
FIGURA 5.1 – Cromatograma dos ensaios A) experimento E1 (adição do substrato junto com inóculo do fungo) e B) experimento E2 (adição do substrato junto após 3 do inóculo do fungo)	36
FIGURA 5.2 – Experimento de biotransformação de <i>P. brasilianum</i> com os diferentes substratos após 20 dias de cultivo: A) Q3, B) Q4, C) Q5 e D) Q6	37
FIGURA 5.3 – CCD dos extratos obtidos para Q3, Q4, Q5 e Q6 em que: M+F = controle meio+fungo; 1-6: replicatas do experimento contendo meio, fungo e substrato (M+F+S), P= controle positivo (M+S). Eluente utilizado: AcOEt:Hex 8:2	38
FIGURA 5.4 – Análise por CCD da fração Q4A_F2_15	39
FIGURA 5.5 – A) Cromatograma de íons totais da amostra Q4_F2_15 e B) Espectro de massas da banda em destaque em A ($t_R = 33,05$ min)	39
FIGURA 5.6 – Espectro de massas obtido nos experimentos de íons filhos de A) m/z 219 (substrato), B) m/z 255 e C) m/z 257.....	40
FIGURA 5.7 – Espectro de massas de alta resolução da amostra Q4A_F2_15	41

Figura 5.8 – Espectros de UV das substâncias A) substrato Q4 e B) produto de biotransformação Q4_F2_15.....	42
Figura 5.9 – Possibilidades de halogenação do substrato Q4 para a formação do produto de biotransformação.....	42
Figura 5.10 - Proposta de fragmentação do íon m/z 255 (pico do íon <i>quasi</i> molecular encontrado para Q4_F2_15)	43
FIGURA 5.11 – Espectros de RMN ^1H obtido para a substância verruculogenina (400 MHz, CDCl_3).....	44
FIGURA 5.12 – Estrutura molecular da substância verruculogenina.....	46
FIGURA 5.13 – Espectro de RMN de ^1H para a dicetopiperazina brevianamida F (CDCl_3 , 400 MHz).....	47
FIGURA 5.14 – Estrutura molecular da substância brevianamida F	47
FIGURA 5.15 – Biossíntese da verruculogenina em ascomicetos (retirado de LI (2011)).....	48
FIGURA 5.16 – Espectro de RMN de ^1H para a substância 12,13-dihidroxi-fumitremorgina C (400 MHz, CDCl_3).....	49
FIGURA 5.17 – Estrutura molecular da substância 12,13-dihidroxi-fumitremorgina C	50
FIGURA 5.18 – Espectro de RMN ^1H obtido para o ácido penicílico (400 MHz, CDCl_3)	51
FIGURA 5.19 – Estrutura molecular do ácido penicílico.....	52
FIGURA 5.20 – Cromatogramas dos extratos de acetato do ensaio do experimento de células residuais em que A) tampão fosfato pH = 7,2, B) tampão fosfato pH = 8,4, C) tampão tris-HCl pH = 7,2 e D) tampão tris-HCl pH = 8,4.....	54
FIGURA 5.21 – Espectros de ^1H RMN de A) Q1A_CR_16 e B) substrato Q1. (CDCl_3 , 400 MHz).....	58
FIGURA 5.22 – Estrutura parcial da substância Q1A_CR_16.....	59
FIGURA 5.23 – Segunda parte da estrutura parcial de Q1A_CR_16.....	59
FIGURA 5.24 – Estrutura molecular de Q1A_CR_16.....	60
Figura 5.25 – Substância Q1A_CR_16	61
FIGURA 5.26 – Representação das estruturas de Q1A_CR_16 otimizada por simulação computacional	62
Figura 5.27 – Espectro de ^1H da substância Q1A_CR_26 (400 MHz, CDCl_3).....	63
Figura 5.28 – Estrutura parcial da substância Q1A_CR_26	65

Figura 5.29 - Estrutura tridimensional da substância Q1A_CR_26	65
FIGURA 5.30 – Espectros de ¹ H RMN de A) substrato Q2 e B) Q2A_CR_5. (CDCl ₃ , 400 MHz)	67
FIGURA 5.31 – Estrutura parcial da substância Q2A_CR_5.....	68
FIGURA 5.32 – Segunda parte da estrutura parcial de Q2A_CR_5.....	68
FIGURA 5.33 – Estrutura molecular da substância Q2A_CR_5.....	69
FIGURA 5.34 – Estrutura molecular de Q2A_CR_5.....	70
FIGURA 5.35 – Estrutura tridimensional de Q2A_CR_5	70
FIGURA 5.36 – Espectros de ¹ H RMN de A) substrato Q2 e B) Q2A_CR_6. (CDCl ₃ , 400 MHz)	71
FIGURA 5.37 – Estrutura molecular de Q2A_CR_6.....	72
FIGURA 5.38 – Estrutura molecular de Q2A_CR_6 estabelecida após experimentos de NOE-diff.....	72
FIGURA 5.39 – Estrutura tridimensional de Q2A_CR_6	73
FIGURA 5.40 – Espectros de ¹ H RMN de A) substrato Q3 e B) Q2A_CR_9. (CDCl ₃ , 400 MHz)	74
FIGURA 5.41 – Estrutura de molecular de Q2A_CR_9_majoritário estabelecida após experimentos de NOE-diff	76
FIGURA 5.42 – Estrutura tridimensional de Q2A_CR_9_majoritário.....	77
FIGURA 5.43 – Estrutura de molecular de Q2A_CR_9_minoritário estabelecida após experimentos de NOE-diff	78
FIGURA 5.44 – Estrutura tridimensional de Q2A_CR_9_minoritáro	79
FIGURA 5.45 – Biotransformação de Q2 através da metodologia de células residuais	79
FIGURA 5.46 – Espectros de ¹ H RMN de A) substrato Q3 e B) Q3A_CR_5. (CDCl ₃ , 400 MHz)	81
FIGURA 5.47 – Estrutura molecular de Q3A_CR_5.....	82
FIGURA 5.48 – Estrutura tridimensional de Q3A_CR_5	83
FIGURA 5.49 – Espectros de ¹ H RMN de A) substrato Q3 e B) Q3A_CR_7. (CDCl ₃ , 400 MHz)	84
FIGURA 5.50 – Espectros de ¹ H RMN Q3A_CR_7_pico2. (CDCl ₃ , 600 MHz)	85
FIGURA 5.51 – Estrutura molecular de Q3A_CR_7_pico2	86
FIGURA 5.52 – Estrutura tridimensional de Q3A_CR_7_pico2.....	86
FIGURA 5.53 – Estrutura molecular de Q3A_CR_8_majoritário	88

FIGURA 5.54 – Estrutura tridimensional de Q3A_CR_8_majoritário.....	88
FIGURA 5.55 – Estrutura molecular de Q3A_CR_8_minoritário	89
FIGURA 5.56 – Estrutura tridimensional de Q3A_CR_8_minoritário.....	90
FIGURA 5.57 – Resumo da biotransformação de Q3 por células residuais de <i>P. brasilianum</i>	91
FIGURA 5.58 – Espectros de ¹ H RMN de A) substrato Q4 e B) Q4A_CR_10. (CDCl ₃ , 400 MHz).....	93
FIGURA 5.59 – Estrutura parcial da substância Q4A_CR_10 (sistema enodiona) ..	94
FIGURA 5.60 – Estrutura parcial da substância Q4A_CR_10 – parte 2.....	94
FIGURA 5.61 – Estrutura molecular de Q4A_CR_10.....	95
FIGURA 5.62 Estrutura de molecular de Q4A_CR_10 estabelecida após experimentos de NOE-diff.....	96
FIGURA 5.63 – Estrutura tridimensional de Q4A_CR_10	96
FIGURA 5.64 – Espectros de ¹ H RMN de A) substrato Q4 e B) Q4A_CR_15. (CDCl ₃ , 400 MHz).....	97
FIGURA 5.65 – Estrutura molecular de Q4A_CR_15.....	98
FIGURA 5.66 – Estrutura de molecular de Q4A_CR_15 estabelecida após experimentos de NOE-diff	98
FIGURA 5.67 – Estrutura tridimensional de Q4A_CR_15	99
FIGURA 5.68 – Espectros de ¹ H RMN de A) substrato Q4 e B) Q4A_CR_20. (CDCl ₃ , 400 MHz).....	100
FIGURA 5.69 – Estrutura molecular de Q4A_CR_20 após experimentos de NOE-Diff	101
FIGURA 5.70 – Estrutura tridimensional de Q4A_CR_20	102
FIGURA 5.71 – Espectros de ¹ H RMN de A) substrato Q4 e B) Q4A_CR_23. (CDCl ₃ , 400 MHz).....	103
FIGURA 5.72 – Estrutura molecular de Q4A_CR_23.....	104
Figura 5.73 - Estrutura tridimensional de Q4A_CR_23	104
FIGURA 5.74 – Resumo da biotransformação de Q4 por células residuais de <i>P. brasilianum</i>	105
FIGURA 5.75 – Estrutura química da substância Q5A_CR_15.....	107
Figura 5.76 - Estrutura tridimensional de Q5A_CR_15	107
Figura 5.77 - Reações de formação de éter	108

Figura 5.78 - Proposta mecanística para a formação do produto de biotransformação Q5A_CR_15	109
Figura 5.79 - Formação da substância Q5A_CR_15 via reação radicalar.....	109
Figura 5.80 - Estruturas de ressonância do intermediário radicalar de Q5A_CR_15	110
Figura 5.81 – Estrutura química de Q5A_CR_18	111
Figura 5.82 – Biotransformação de Q5 por <i>P. brasilianum</i>	111
FIGURA 5.83 – Espectros de ¹ H dos produtos reduzidos utilizando-se como material de partida A) Q1, B) Q2 e C) Q3	115
FIGURA 5.84 – Espectros dos compostos reduzidos com zinco e ácido acético: A) Q2, B) Q3 e C) Q4 (CDCl ₃ , 400 MHz)	117
FIGURA 5.85 – Espectros dos compostos oxidados com MCPBA: A) Q1, B) Q2 e C) Q3 (CDCl ₃ , 400 MHz)	119
FIGURA 5.86 – Espectros dos compostos obtidos após incubação em tampão fosfato obtidos a partir de: A) Q1, B) Q2 e C) Q3 (CDCl ₃ , 400 MHz)	120
FIGURA 5.87 – Proposta mecanística para formação do triciclo a partir do norborneno	121
FIGURA 5.88 – Espectros dos compostos reduzidos com NaBH ₄ : A) Q4, B) Q5 (CDCl ₃ , 400 MHz)	123
Figura 5.89 – Possibilidades de ataque do hidreto em <i>a</i> e <i>b</i> . A seta em destaque representa o modo predominante de ataque. [Figura retirada de CHUNJIAN & BURNELL (1997)].....	124
Figura 5.90 – Estrutura química das substâncias ciclohexanona e duroquinona ...	126

RESUMO

BIOTRANSFORMAÇÃO DE CICLOADUTOS DE DIELS-ALDER POR CÉLULAS INTACTAS DE *Penicillium brasilianum*, ENDOFÍTICO DE *Melia azedarach*. Devido às estratégias usadas para a colonização do hospedeiro e à convivência com a planta em um ambiente inicialmente hostil, os micro-organismos endofíticos possuem um grande potencial enzimático para biotransformar substâncias de origem natural e seus análogos sintéticos. A transformação dos cicloadutos de Diels-Alder feitas pelo endofítico *P. brasilianum* utilizando-se células intactas resultou na produção de 17 produtos de biotransformação. Esses produtos foram identificados como sendo produtos de halogenação (Q4_F2_15), epoxidação (Q1A_CR_16, Q2A_CR_6, Q3A_CR_5), epoxidação e redução da olefina conjugada (Q2A_CR_5), redução da dupla ligação α , β - insaturada (Q2A_CR_9, Q3A_CR_7_pico2, Q3A_CR_8, Q4A_CR_23), redução da olefina isolada (Q1A_CR_26), oxidação alílica de metila e redução da dupla conjugada (Q4A_CR_10), redução carbonílica e dupla conjugada (Q4A_CR_20), redução carbonílica e formação de éter (Q5A_CR_15) e redução de grupos carbonílicos (Q4A_CR_15 e Q5A_CR_18). As reduções das olefinas pertencentes ao sistema α , β - insaturada podem ter sido catalisadas por enzimas da família “Old Yellow Enzymes” (OYE), também conhecidas por enoato redutases. Os produtos de redução C=C do sistema α , β - insaturado e redução carbonílica também foram sintetizados quimicamente e a enantiosseletividade de ambos os processos foram comparadas. Em todos os casos, as transformações microbiológicas apresentaram uma maior enantiosseletividade.

ABSTRACT

BIOTRANSFORMATION OF DIELS-ALDER CYCLOADDUCTS USING INTACTS CELL BY *Penicillium brasilianum*, AN ENDOPHYTE ISOLATED FROM *Melia azedarach*. Endophytic microorganisms have a great enzymatic potential to biotransform substances of natural and synthetic origin due to strategies developed during colonization to coexist with the plant in an initial hostile environment. Microbial transformation of Diels-Alder cycloadducts were trailed by the endophyte *P. brasilianum* using intact cells and resulted in the production of several products (17). These products were identified as products of chlorination (Q4_F2_15), epoxidation (Q1A_CR_16, Q2A_CR_6, Q3A_CR_5), epoxidation and reduction of conjugated double bond (Q2A_CR_5), reduction of conjugated double bond (Q2A_CR_9, Q3A_CR_7_pico2, Q3A_CR_8, Q4A_CR_23), reduction of isolated double bond (Q1A_CR_26), oxidation of allylic methyl group and reduction of conjugated double bond (Q4A_CR_10), reduction of carbonyl and conjugated double bond (Q4A_CR_20), reduction of carbonyl and ether formation (Q5A_CR_15) and finally, reduction of carbonyl group (Q4A_CR_15 e Q5A_CR_18). The reduction of conjugated double bond can be performed by enzymes called "Old Yellow Enzymes" (OYE), also known as enoate reductase enzymes. The products of carbonilic or double bond reduction were also synthesized chemically and the enantioselectivity of both *in vitro* and *in vivo* process were compared. In all cases, microbiological transformations were more enantioselectivity.

SUMÁRIO

1. – Introdução	1
1.1 – Biotransformações – aspectos gerais	1
1.2 – Biotransformação de compostos sintéticos.....	3
1.3 – Biotransformações envolvendo micro-organismos do gênero <i>Penicillium</i> ..	4
1.4 – Uso de adutos de Diels-Alder como substratos para biotransformações....	7
2. – Objetivos	13
3. Procedimento experimental.....	14
3.1 – Materiais utilizados	14
3.2 – Equipamentos.....	15
3.3 – Repique do micro-organismo em placa de Petri contendo meio BDA (batata, dextrose e Agar)	16
3.4 – Preparo da solução de esporos de <i>P. brasilianum</i>	17
3.5 – Experimento de biotransformação utilizando células em crescimento	18
3.5.1 – Ensaio iniciais	18
3.5.2 – Experimentos de biotransformação de Q3, Q4, Q5 e Q6 em larga escala utilizando-se células em crescimento.....	19
3.5.2.1 – Fracionamento por coluna cromatográfica dos extratos obtidos para Q3, Q4, Q5 e Q6.....	20
3.5.2.2 – Isolamento dos metabólitos e produtos de biotransformação por cromatografia líquida de média pressão	21
3.5.2.3 – Análise da substância Q4_F2_15 por CLAE-EM.....	22
3.5.3 – Estabelecimento de protocolo de análise por CLAE-UV dos diversos extratos de biotransformação	24
3.6 – Experimento de biotransformação utilizando células residuais.....	24
3.6.1 – Ensaio com tampões fosfato 10 mM e tris-HCl em dois pH distintos (7,2 e 8,5) utilizando-se Q1 como substrato.....	24
3.6.2 – Biotransformação de Q1, Q2, Q3, Q4, Q5 por <i>P. brasilianum</i> utilizando-se o protocolo de células residuais	26
3.7 – Redução química de Q1, Q2 e Q3 utilizando-se H ₂ /Pd	27

3.8 – Redução química seletiva de Q1, Q2 e Q3 utilizando-se Zn/Ácido acético	
28	
3.9 – Epoxidação química de Q1, Q2 e Q3 com MCPBA e abertura do epóxido em tampão fosfato pH 7,6 (10 mM)	29
4. – Abertura do epóxido de Q1, Q2 e Q3 em tampão fosfato pH = 7,2 (10 mM)	31
4.1 – Redução química de carbonila de Q4 e Q5 com NaBH ₄	31
4.2 – Análise de rotação óptica.....	32
4.3 – Análise da quiralidade por cromatografia quiral	32
4.4 – Otimização da geometria molecular dos produtos de biotransformação ..	33
4.5 – Ensaio de fitotoxicidade dos substratos Q1-Q5	33
5. – Resultados e discussão.....	35
5.1 - Ensaio iniciais	35
5.2 – Experimentos de biotransformação de Q3, Q4, Q5 e Q6 em larga escala (células em crescimento)	37
5.2.1 – Substância Q4A_F2_15.....	38
5.2.2 – Caracterização dos metabólitos secundários isolados	44
5.2.2.1 – Caracterização da substância verruculogenina	44
5.2.2.2 – Caracterização da substância brevianamida F	46
5.2.2.3 – Caracterização do alcaloide 12,13-dihidroxi-fumitremorgina C	49
5.2.2.4 – Caracterização da substância ácido penicílico	50
5.3 – Experimento de biotransformação utilizando células residuais.....	52
5.3.1 – Ensaio com tampões fosfato 10 mM e tris-HCl em dois pH distintos (7,2 e 8,5) utilizando-se Q1 como substrato.....	53
5.3.2 – Biotransformação de Q1, Q2, Q3, Q4, Q5 por <i>P. brasilianum</i> utilizando-se o protocolo de células residuais	55
5.3.2.1 – Biotransformação de Q1 por células residuais de <i>P. brasilianum</i> ...	55
5.3.2.1.1 – Substância Q1A_CR_16.....	56
5.3.2.1.2 – Substância Q1A_CR_26.....	62
5.3.2.2 – Biotransformação de Q2 por células residuais de <i>P. brasilianum</i> ...	65
5.3.2.2.1 – Substância Q2A_CR_5.....	66
5.3.2.2.2 – Substância Q2A_CR_6.....	70

5.3.2.2.3 – Amostra Q2A_CR_9	74
5.3.2.3 – Biotransformação de Q3 por células residuais de <i>P. brasilianum</i> ...	80
5.3.2.3.1 – Substância Q3A_CR_5	81
5.3.2.3.2 – Amostra Q3A_CR_7	83
5.3.2.3.3 – Amostra Q3A_CR_8	87
5.3.2.4 – Biotransformação de Q4 por células residuais de <i>P. brasilianum</i> ...	91
5.3.2.4.1 – Substância Q4A_CR_10	92
5.3.2.4.2 – Substância Q4A_CR_15	96
5.3.2.4.3 – Substância Q4A_CR_20	99
5.3.2.4.4 – Substância Q4A_CR_23	102
5.3.2.5 – Biotransformação de Q5 por células residuais de <i>P. brasilianum</i> .	105
5.3.2.5.1 - Substância Q5A_CR_15	105
5.3.2.5.2 - Substância Q5A_CR_18	110
5.4 – Considerações sobre os produtos de biotransformações	111
5.5 -Ensaio de fitotoxicidade dos substratos Q1-Q5	112
5.6 – Reações de redução e epoxidação	113
5.6.1 – Redução química de Q1, Q2 e Q3 utilizando-se H ₂ /Pd	113
5.6.2 – Redução química seletiva de Q2, Q3 e Q4 utilizando-se Zn/Ácido acético 115	
5.6.3 – Epoxidação química de Q1, Q2 e Q3 com MCPBA e abertura do epóxido em tampão fosfato pH 7,6 (10 mM)	117
5.6.4 – Redução química de carbonila de Q4 e Q5 com NaBH ₄	121
5.6.5 – Análise da quiralidade	124
6. - Conclusões	127
Referências bibliográficas	128

1. – Introdução

1.1 – Biotransformações – aspectos gerais

Biotransformações consistem em reações químicas realizadas por um agente biológico em que há conversão de um substrato (geralmente uma substância orgânica) em um ou mais produtos através de catalisadores enzimáticos (BROCKSOM e SANTOS, 1988; DEMIRJIAN et al., 1999). De um modo geral, esses processos levam a um menor custo, alta especificidade e maior robustez (ADELIN et al., 2011).

As biotransformações podem ser realizadas de duas formas distintas (Tabela 1.1): 1) utilizando-se enzimas purificadas ou 2) células intactas de organismos vivos (plantas, micro-organismos ou pequenos animais). O uso de células intactas consiste em processos que não necessitam da regeneração de cofatores e permitem estudar diversas reações concomitantemente (já que as células consistem em um *pool* enzimático). A maior vantagem de se utilizar células intactas é o baixo custo, uma vez que não se faz isolamento de enzimas – processo bastante dispendioso. Como desvantagens, tem-se que em geral, os rendimentos são baixos, ocasionando em pequenas quantidades de produtos – o que dificulta o isolamento dos mesmos. Além disso, à presença dos metabólitos secundários provenientes do desenvolvimento do organismo vivo dificulta ainda mais o isolamento dos produtos de biotransformação, tornando o processo mais complexo (BOMMARIUS e RIEBEL, 2004).

Por sua vez, a utilização de enzimas dá ao processo maior seletividade e maiores rendimentos, contudo, torna-o mais caro, uma vez que é necessário o uso de cofatores (BOMMARIUS e RIEBEL, 2004). Um aspecto a ser considerado ao utilizar enzimas purificadas é a solubilidade do substrato em água, uma vez que a maior parte das enzimas tolera baixas concentrações de etanol/isopropanol como cossolvente e os substratos são pouco solúveis em água (HIROSE, 2008; KELLY, 2008).

Tabela 1.1 – Vantagens e desvantagens do uso de células intactas e enzimas purificadas como biocatalisadores

Biocatalisador	Vantagens	Desvantagens
Células intactas	<ul style="list-style-type: none"> • Baixíssimo custo comparado ao uso de enzimas; • Regeneração dos cofatores; • Estudo concomitante de diversas reações. 	<ul style="list-style-type: none"> • Baixos rendimentos; • Reações paralelas devido ao metabolismo celular; • Processo de isolamento mais complexo devido a presença de metabólitos secundários.
Enzimas purificadas	<ul style="list-style-type: none"> • Maior seletividade; • Alta especificidade; • Maiores rendimentos; • Facilidade no isolamento dos produtos. 	<ul style="list-style-type: none"> • Uso de cofatores; • Encarecimento do processo;

Atualmente, biotransformações tem se tornado uma ferramenta muito importante no desenvolvimento de novas tecnologias e para a síntese de compostos com alto valor agregado, devido à capacidade que fungos têm de reagir seletivamente em grupos funcionais que estão quimicamente situados em regiões diferentes da molécula e realizando reações em regiões que dificilmente ocorreriam por síntese química convencional, principalmente quando se deseja obter fármacos enantioméricamente puros (ADELIN et al., 2011; FABER, 1997).

Outra aplicação de etapas biocatalíticas é a introdução de quiralidade no produto de biotransformação (BLASER et al., 2003). Nos últimos dez anos, muitos métodos foram desenvolvidos para gerar centros estereogênicos através de métodos biocatalíticos (HONDA et al., 2006). Um exemplo disso é a geração de alcoóis enantiopuros através de “processos verdes” utilizando micro-organismos (FABER, 2004; NAKAMURA e MATSUDA, 2008).

As reações biocatalíticas têm sido apreciadas e amplamente estudadas devido aos seus aspectos inerentes de “Química Verde”, uma vez que faz pouco ou nenhum uso de solventes orgânicos e levam à formação de uma menor quantidade de produtos indesejáveis (HOLLMANN et al., 2011).

O reflexo das diversas vantagens de se utilizar biotransformações é o aumento da aplicação desta na indústria como intermediários de rotas sintéticas de fármacos, pró-fármacos, pesticidas, dentre outros.

1.2 – Biotransformação de compostos sintéticos

A área "Química de Produtos Naturais" sempre teve papel fundamental na descoberta de compostos bioativos. Apesar dos estudos químicos de plantas serem mais frequentes, os micro-organismos, especialmente fungos endofíticos, vêm sendo explorados como hábeis produtores de metabólitos secundários. Substâncias produzidas por micro-organismos apresentam um vasto leque de aplicações, tais como antibióticos, anti-inflamatórios, agroquímicos, inseticidas e até mesmo anticancerígenos (CARVALHO et al., 1999; WRIGLEY, 2000).

A despeito de ter se destacado como ponto de partida para o descobrimento de novas drogas, em sua grande maioria, os metabólitos secundários não possuem propriedades físico-químicas adequadas para sua utilização como fármacos. Assim, a geração de análogos é muitas vezes necessária para adequação das propriedades (THIERICKE e ROHR, 1993).

A biotransformação de compostos sintéticos utilizando micro-organismos é uma importante ferramenta para geração destes novos análogos de produtos naturais. Devido ao seu grande potencial enzimático, os micro-organismos são capazes de gerar uma gama de produtos análogos a produtos naturais a partir dos substratos administrados.

A geração de análogos de produtos naturais é uma área intermitente entre a Química de Produtos Naturais e a Síntese Orgânica. Através da utilização de ferramentas de biologia química, podem-se determinar as relações estrutura-atividade e o modo de interação entre produtos naturais e biomoléculas-alvo. Além disso, a geração de análogos é necessária nos estudos de biodisponibilidade e tem como alvos a produção de novos produtos naturais, o aumento da atividade biológica, diminuição da toxicidade, conhecimento quimio-ecológico, entendimento de processos biossintéticos e do potencial enzimático do ser vivo em estudo (GOSS et al., 2012).

Uma das abordagens/técnicas deveras utilizada é a "biossíntese dirigida por precursor" (KIRSCHNING et al., 2007) (tradução livre do termo), também chamada de "Chem-Bio" por GOSS et al. (2012) e "biotransformações biossinteticamente modeladas" por HANSON (2008) (tradução livre do termo). Essa abordagem consiste

em “explorar a flexibilidade de substratos sintéticos frente enzimas envolvidas na biossíntese dos metabólitos secundários”. Ao contrário das transformações xenobióticas em que apenas uma etapa enzimática é envolvida (como por exemplo, hidroxilações) as transformações de biossíntese dirigida por precursor acontecem em uma sequência de etapas enzimáticas (Hanson, 2008). Esta abordagem/técnica representa uma alternativa promitente na síntese total ou parcial de substâncias bioativas complexas. Além disso, novos análogos de metabólitos secundários podem ser obtidos visando a obtenção de novas substâncias bioativas (HARVEY et al., 2012; KENNEDY, 2008; KIRSCHNING et al., 2007).

A abordagem mais comum para uso de biotransformações em um processo sintético, em geral, inicia-se com a escolha do micro-organismo a ser utilizado. Para isso, buscam-se resultados semelhantes já disponíveis na literatura em relação à reação de interesse, na tentativa de se obter informações às possíveis enzimas envolvidas no processo. Em seguida, as cepas microbianas escolhidas devem ser obtidas através de isolamento ou em coleções de cultura de outras instituições de pesquisa. Na ausência de dados na literatura, o estudo torna-se mais aleatorizado: micro-organismos isolados e/ou obtidos de outras instituições são testados através de um processo empírico de seleção (*screening*). Nessa seleção realizam-se experimentos em pequena escala e analisam-se os extratos brutos obtidos, comparando-se a um controle positivo (meio contendo apenas o substrato) e um controle negativo (o qual não foi adicionado substrato). Embora seja possível que novas rotas biossintéticas possam ser induzidas pela presença de substâncias exógenas, em geral, se houver a formação de novos metabólitos isso deve significar que aquele organismo realizou alguma transformação química no substrato.

1.3 – Biotransformações envolvendo micro-organismos do gênero *Penicillium*

O gênero *Penicillium* possui bastante destaque frente a outros micro-organismos devido a sua capacidade de produção de micotoxinas cujo potencial de aplicação é vasto. Esta pronunciada habilidade deve-se à grande e variada expressão enzimática deste micro-organismo, ocasionando uma alta expressão do seu metabolismo secundário.

Em geral, micro-organismos pertencentes a este gênero são hábeis em realizar diversos tipos de reações, tais como redução, metilação e demetilação, oxidações e halogenações (FRAGA et al., 2003; HUANG et al., 2012; MAURS et al., 1999). Por exemplo, HUANG et al. (2012) realizaram a biotransformação do esteroide DHEA ao micro-organismo *Penicillium griseopurpureum* e observaram uma série de produtos de biotransformações envolvendo reações de oxidação (hidroxilações e oxidação do tipo Baeyer-Villiger) e reduções, como mostrado na FIGURA 1.1.

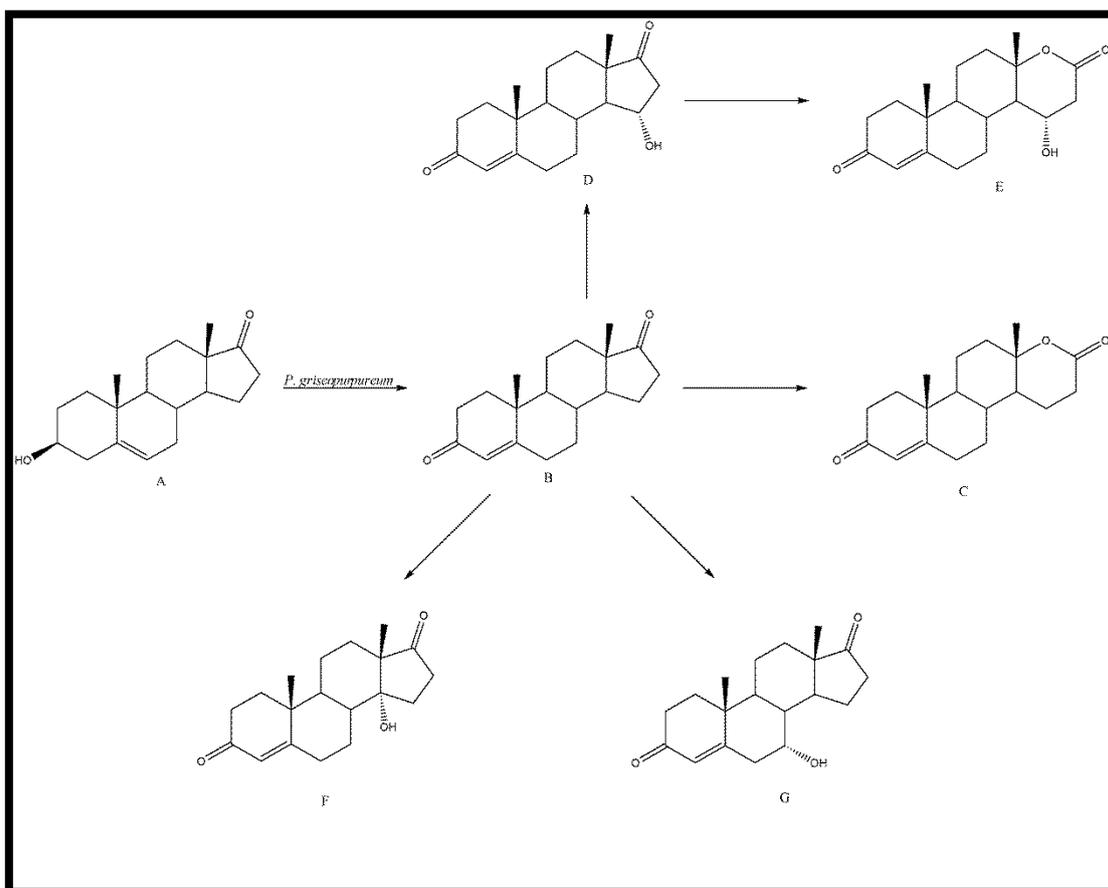


FIGURA 1.1 – Biotransformação do esteroide DHEA (A) por *P. griseopurpureum* envolvendo reações de B) redução e oxidação, C e E) oxidação de Baeyer- Villiger, D, F e G) hidroxilação.

Reações de demetilação e halogenação já foram observadas em biotransformações envolvendo o fungo *Penicillium griseoroseum* em trabalhos realizados em nosso grupo de pesquisa (SILVA, 2009). Para tal, foi administrado ao micro-organismo a 2',4',6'-trimetóxiacetofenona que levou à demetilação da posição 4' e a cloração da posição 5' (posição mais ativada para reações de substituição eletrofílica aromática), como mostrado na figura abaixo.

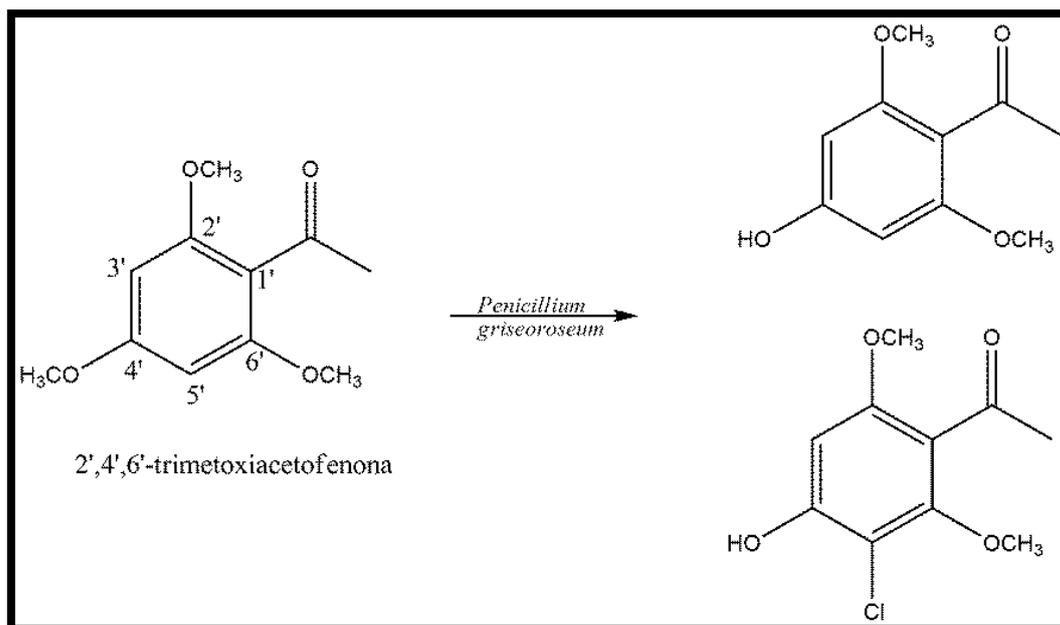


FIGURA 1.2 – Biotransformação da 2',4',6'-trimetoxiacetofenona por *P. griseoroseum*

Por sua vez, o micro-organismo *Penicillium brasilianum* é conhecido como “fábrica de enzimas” (PANAGIOTOU et al., 2007) e mostrou-se hábil na biotransformação da cânfora e da 1-indanona. Para a cânfora, foi observado um produto de oxidação de Baeyer-Villiger gerando um anel lactônico. Por sua vez, a 1-indanona foi convertida a 1-hidróxiindanona e produtos de oxidação de Baeyer-Villiger seguido de abertura do anel lactônico, conforme representado na FIGURA 1.3 (FILL et al., 2012; MIHOVILOVIC et al, 2006; MIHOVILOVIC, 2006).

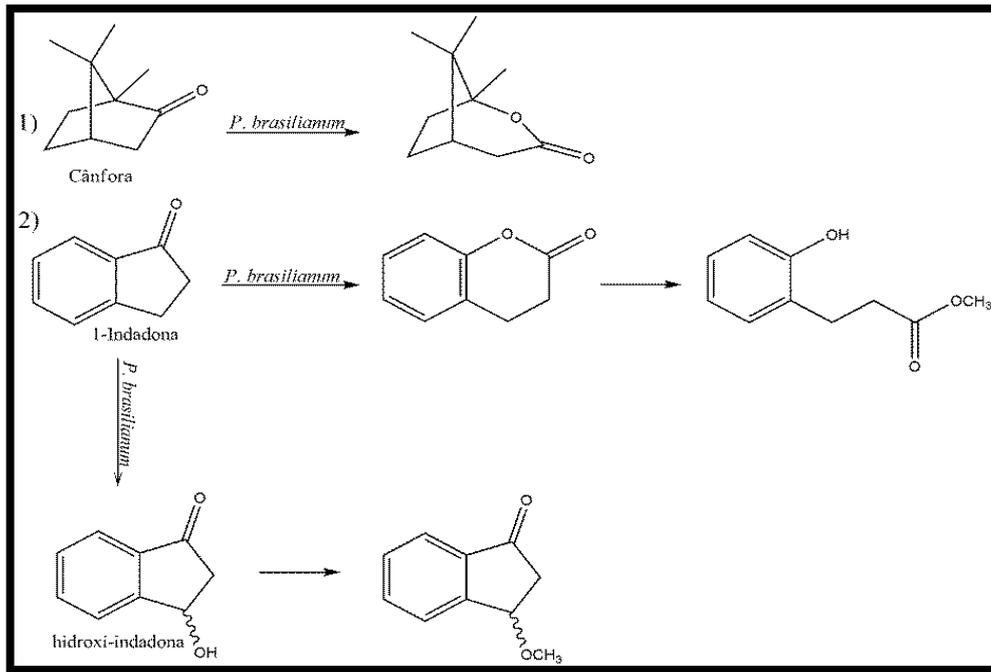


FIGURA 1.3 – Biotransformações envolvendo *P. brasilianum* e os substratos 1) cânfora e 2) 1-indanona.

Além destes, muitos outros exemplos de biotransformação podem ser encontrados na literatura envolvendo micro-organismos do gênero *Penicillium*, justificando assim sua utilização para biotransformações diversas.

1.4– Uso de adutos de Diels-Alder como substratos para biotransformações

Os substratos escolhidos como objeto de estudo são do tipo cicloadutos de Diels-Alder e estão mostrados na figura abaixo. Sua síntese se dá pela reação de *p*-benzoquinonas com ciclopentadieno ou do 2,3-dimetil-1,3-butadieno sob micro-ondas e ocasiona apenas a formação do aduto endo.

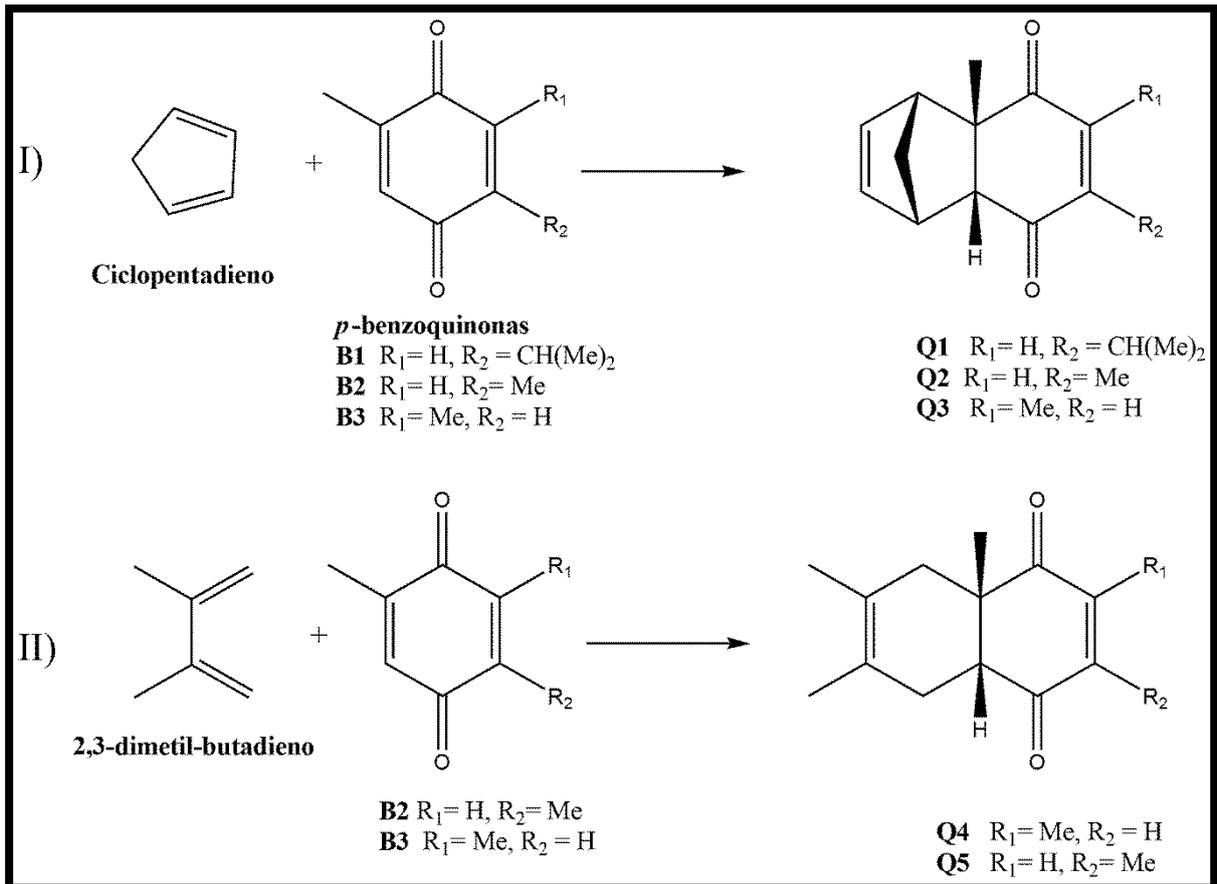


FIGURA 1.4 – Reação de Diels-Alder entre o ciclopentadieno ou 2,3-dimetil-butadieno para formação dos compostos Q1-Q5.

No total foram utilizados cinco substratos (FIGURA 1.5) codificados como Q1, Q2, Q3, Q4 e Q5, dos quais três eram derivados do ciclopentadieno (Q1, Q2, Q3) e dois do 2,3-dimetil-1,3-butadieno (Q4 e Q5).

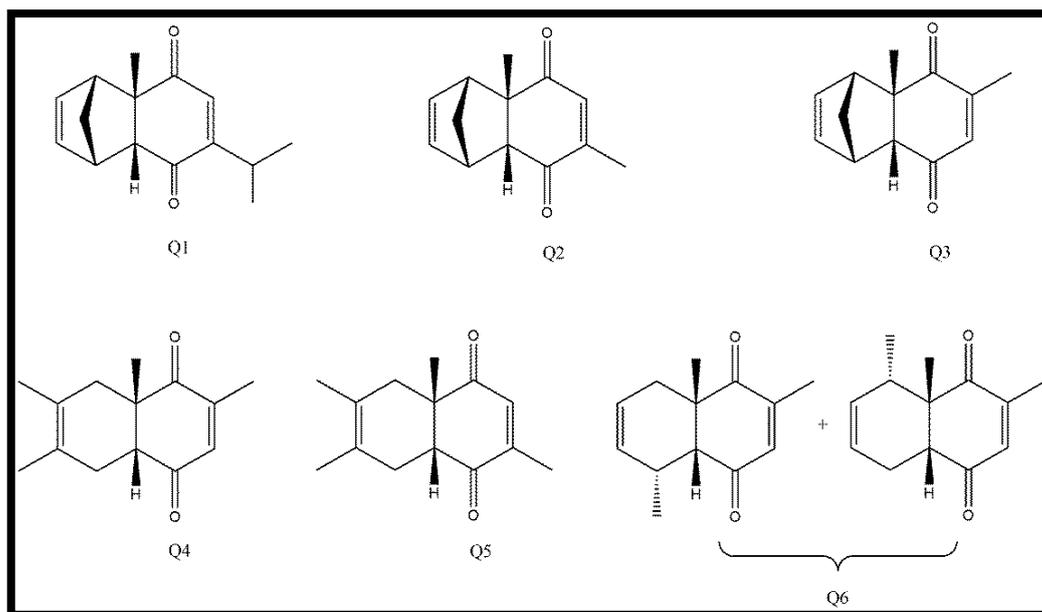


FIGURA 1.5 – Estrutura química dos substratos Q1, Q2, Q3, Q4, Q5 e Q6

A reação de Diels-Alder é definida como uma reação pericíclica concertada de cicloadição [4+2] entre um dieno conjugado com quatro elétrons π e um segundo componente, um alceno com dois elétrons π (chamado de dienófilo) (BROCKSOM et al., 2010).

A reação de Diels-Alder possui características que a tornam de grande importância do ponto de vista de química orgânica sintética. Dentre estas características destacam-se a sua elevada régio- e estereosseletividade. Além disso, esta reação ocorre com total economia de átomos, ou seja, todos os átomos encontrados nos materiais de partida são preservados nos produtos formados (TROST, 1991). Esta reação também leva a formação de moléculas de elevada complexidade estrutural podendo ser gerados em uma única etapa até quatro novos centros estereogênicos (WENDER, 1996).

Alguns fatores a serem considerados que os torna propícios a serem utilizados como substrato é o fato da reação de Diels-Alder possuir bons rendimentos e ser simples de ser executada. Isso se deve ao fato de que, em geral, as reações de biotransformações utilizando células intactas possuem baixo rendimento (1-10%) por se tratar de um complexo sistema enzimático em que há competição pelos “processos” ao qual o substrato será submetido. Assim sendo, faz-se necessário a utilização de uma grande quantidade de substrato para que se possam obter quantidades de produtos passíveis de serem identificados/caracterizados

devidamente (DONATONI, 2013; MARCOS et al., 2012, PETERS, 2010; SCHUBERT e METZ, 2011).

Já do ponto de vista bioquímico, os cicloadutos de Diels-Alder tornam-se interessantes devido ao seu esqueleto ser semelhante àqueles de terpenos bioativos. Em especial, os cicloadutos utilizados como substratos na execução deste projeto de mestrado possuem um sistema decalínico encontrado em diversas classes de terpenos, tais como sesquiterpenos dimaranos, eudesmanos, eremofilanos, avarenos, diterpenos tricíclicos e labdanos (FIGURA 1.6). Assim, o estudo de biotransformação desse tipo de compostos pode levar a produção de novos terpenos bioativos (DONATONI, 2013; MARCOS et al., 2012, PETERS, 2010; SCHUBERT e METZ, 2011).

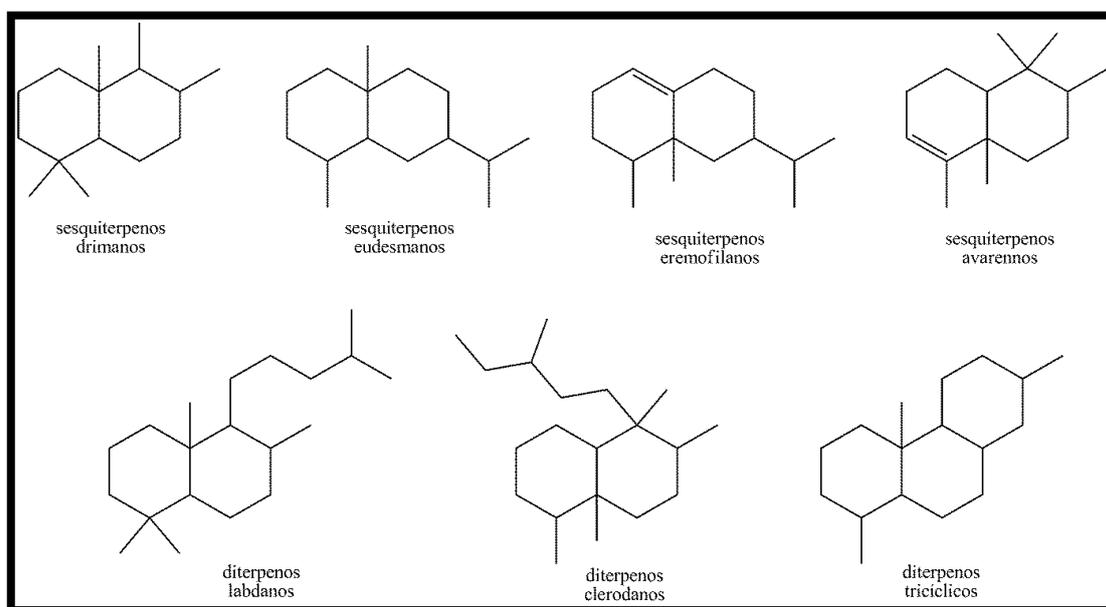


FIGURA 1.6 – Esqueleto de sesqui- e diterpenos de diversas classes

Além de possuir esqueleto semelhante àqueles encontrados em terpenos, esses compostos são pouco funcionalizados, e as reações de biotransformações deve levar a uma maior funcionalização destes, tornando-os assim, bastante interessante do ponto de vista químico.

A utilização de cicloadutos de Diels-Alder em que se possam gerar centros estereogênicos através das reduções enzimáticas, mostra-se muito interessante, já que é possível realizar os testes da enantiosseletividade do fungo diante destes compostos. Através das reduções *in vitro* dos compostos sintetizadas,

e das reduções *in vivo* (biotransformações) pode-se comparar a enantiosseletividade destes processos.

Além disso, sabe-se que o micro-organismo *P. brasilianum* é um hábil produtor de meroterpenos cuja biossíntese é de rota mista (acetato e mevalonato). O uso deste tipo de substrato expõe o metabolismo do fungo a substâncias que imitam o sistema terpenoídico dos meroterpenos e seus compostos derivados. Essas características estruturais podem então ser desafiadoras ao sistema enzimático microbiano.

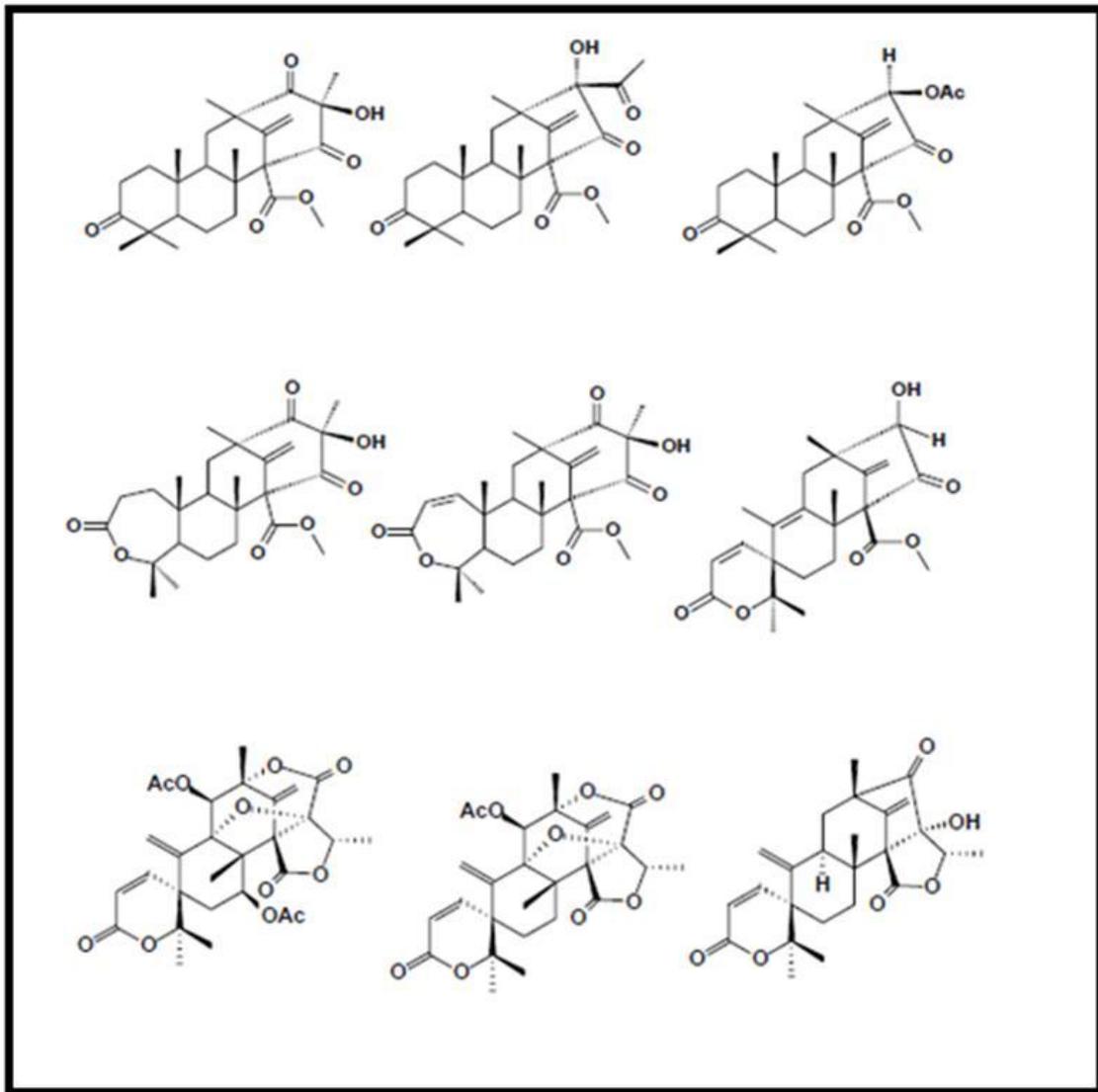


FIGURA 1.7 – Meroterpenos produzidos por *P. brasilianum*

Apesar das diversas vantagens de aplicar este tipo de substratos em experimentos de biotransformação, poucos estudos são encontrados na literatura a este respeito. Até o momento encontramos apenas um relato em que a biotransformação do aduto de Diels-Alder triciclo[6.2.1.0^{2,7}]undeca-4,9-dien-3,6-diona e dois outros derivados sintéticos é realizada pelo fungo saprófito *Mucor ramosissimus*. Nesse estudo, diversos produtos de oxidação, isomerização e redução regio- e enantiosseletiva, mostrado na FIGURA 1.8, foram obtidos.

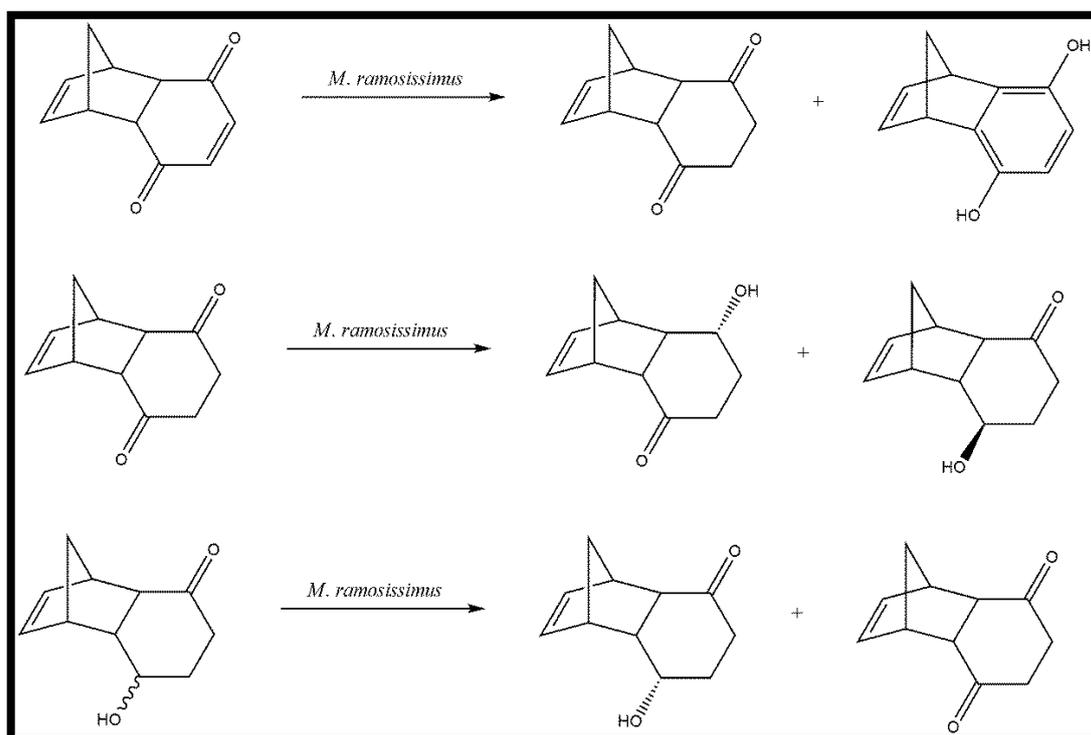


FIGURA 1.8 – Biotransformação de adutos de Diels-Alder pelo fungo *Mucor ramosissimus*

2. – Objetivos

O objetivo deste trabalho consistiu em investigar a capacidade enzimática do endofítico *P. brasilianum* em biotransformar cicloadutos de Diels-Alder, principalmente seu potencial para redução de centros pró-quirais.

Para isso, alguns objetivos específicos foram determinados. São eles:

- ▶ Estabelecer protocolos de biotransformação utilizando-se como substratos cicloadutos de Diels-Alder e o fungo *P. brasilianum*;
- ▶ Testar a viabilidade enzimática do micro-organismo para redução de centros pró-quirais;
- ▶ Isolar e identificar os produtos de biotransformação utilizando-se técnicas analíticas como CLAE-EM, CLAE-UV e RMN;
- ▶ Desenvolvimento de método e análise por CLAE quiral dos produtos de biotransformação;
- ▶ Isolamento dos metabólitos secundários produzidos por *P. brasilianum* na presença dos substratos exógenos;
- ▶ Realizar reações de redução e oxidação enzimáticas e não-enzimáticas a fim de comparar a seletividade;
- ▶ Realizar ensaios para avaliação das atividades biológicas (por exemplo, fitotoxicidade) dos produtos de biotransformação.

3. Procedimento experimental

3.1 – Materiais utilizados

a) Fases estacionárias:

- Sílica gel 70-230 Mesh
- Sílica gel 230-400 Mesh

b) Material para cromatografia em camada delgada

- Placas de CCD (MACHEREY-NAGEL) ALUGRAM® SIL G/UV₂₅₄ für die DC

c) Colunas cromatográficas:

- Coluna analítica PHENOMENEX Luna Phenyl-Hexyl 250 x 4.6mm (5µm);
- Coluna analítica Lux Chiral Column Cellulose-1 (0.46 cm×5 cm, 5µm);
- Coluna analítica Lux Chiral Column Cellulose-2 (0.46 cm×5 cm, 5µm);
- Coluna analítica Chiralcel OB-H column (0.46 cm×25 cm, 5µm);
- Coluna preparativa PHENOMENEX LUNA C18 250 x 21,20mm (10µ);
- Coluna semipreparativa Phenyl-Hexyl 300 x 4,6 mm (10µ);

d) Solventes:

- Solventes destilados no departamento de química;
- Solventes grau HPLC Tedia, JT Baker e Panreac®;
- Solventes PA Panreac®, Synth, Vetex;
- Solventes deuterados MERCK® e ALDRICH® (98,0 – 99,9 %), para a obtenção dos espectros de RMN;
- Água purificada em aparelho Milli-Q;

e) Meios de cultura:

- BDA (Batata inglesa, Dextrose e Agar);
- Czapek:
 - ✓ *D*-Glicose;
 - ✓ NaNO₃;
 - ✓ MgSO₄·7H₂O;
 - ✓ KCl;
 - ✓ FeSO₄·7H₂O;

- ✓ K_2HPO_4 ;
- ✓ Agar;
- ✓ Extrato de Levedura;
- Tampão fosfato pH 7,2, 10 mM (fosfato de sódio monobásico e fosfato de sódio bibásico);
- Tampão Tris-HCl pH 7,2 10mM

3.2 – Equipamentos

a) Espectrômetro de RMN:

- BRUKER DRX 400.

b) Espectrômetros de Massas:

- MICROMASS Quattro LC- triplo quadrupolo, ESI;
- LTQ Orbitrap Velos Thermo – orbitrap, ESI;

c) Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência

- Waters Alliance 2695: Detector de UV (PDA) para HPLC Waters 2996 e Waters 2695 Separations Module.
- Shimadzu LC-10AD: Bomba LC10AD gradient pumps, SHIMADZU; Bomba LC-8A, SHIMADZU; Detector de UV (PDA) para CLAE SHIMADZU SPD-10A e SPD-6A UV-Vis; Módulo de comunicação detector/computador em HPLC SHIMADZU CBM-10A; Communication BUS Module; Injetor para HPLC SHIMADZU Auto Injector SIL-10ADVp, *software*: CLASS-VP.
- Shimadzu LC-20AD: Cromatógrafo líquido de alta eficiência preparativo SHIMADZU composto por: Injetor para HPLC SHIMADZU SIL-20AP Vp, módulo de comunicação detector/computador em HPLC SHIMADZU CBM-20A Communication BUS Module, bomba SHIMADZU LC20AP gradient pumps, detector de UV para HPLC SHIMADZU SPD-20AV UV-Vis, degaseificador DGU-20A; *software*: LC SOLUTION;

d) Cromatógrafo líquido de média pressão:

- TELEDYNE-ISCO® *Combiflash* RF 200 UV/VIS

e) Evaporadores Rotatórios:

- Rotaevaporador Tecnal (TE 120)
- Rotaevaporador Buchi 461-water bath (EL 131)

- f) Câmara de Fluxo Laminar:
 - Veco VL FS-12M;
 - Pachane.
- g) Autoclave Vertical:
 - Phoenix AV 70;
 - Phoenix AV 75;
- h) Mesa Incubadora Rotativa
 - Tecnal TE 140;
- i) SpeedVac
 - Tecnal
- j) Banho de ultrassom
 - Tecnal TE 140;
- k) Balança analítica
 - Tecnal;
 - Metler Toledo
- l) Estufa de secagem
 - Quimis
- m) Centrífuga
 - Eppendorf 5810 R
- n) Filtro Millipore 0.20 µm

3.3 – Repique do micro-organismo em placa de Petri contendo meio BDA (batata, dextrose e Agar)

O fungo endofítico *P. brasilianum* (LaBioMMi 236) foi isolado anteriormente do córtex das raízes de *Melia azedarach* no laboratório LaBioMMi do Departamento de Química da UFSCar, por SANTOS (2003) e conservado no LaBioMMi em conservas de óleo mineral e em placas de Petri.

As placas de Petri previamente limpas, embaladas em papel pardo e ensacadas em saco plástico foram autoclavadas durante 40 minutos (120 °C, 1 atm). Para a secagem, as placas ainda embaladas foram deixadas em estufa (60 °C). Depois de secas, deixou-se as placas de Petri sob luz UV em um fluxo laminar durante 40 minutos.

O preparo do meio BDA consistiu em pesar 200 g de batata inglesa descascada em um béquer de 2 L de capacidade. Em seguida, adicionou-se 1000 mL de água destilada e então e cozeu-se em forno de micro-ondas (60 W) por 15 minutos.

Após cozimento, amassaram-se as batatas com auxílio de um garfo e em seguida filtrou-se o caldo obtido com auxílio de filtro de pano e uma proveta volumétrica de 1 L até que se obteve um 1 L deste. Depois, transferiu-se o caldo para um Erlenmeyer de 1,5 L de capacidade. Em seguida, adicionou-se 20,0 g de dextrose e 15,0 g de ágar. Preparado o meio, fez-se a esterilização do mesmo em autoclave a 120 °C e 1 atm durante 15 minutos. Em seguida, com o conteúdo ainda quente e fazendo-se uso do fluxo laminar, verteu-se a mistura às placas de Petri.

Depois de resfriadas e ainda no fluxo laminar, inoculou-se uma porção do micélio do fungo *P. brasilianum* com auxílio de uma alça de platina esterilizada previamente na chama. A placa contendo o micro-organismo foi deixada em crescimento por sete dias.



FIGURA 3.1 – Placas de Petri contendo meio BDA e o micro-organismo *P. brasilianum* após 7 dias de cultivo

3.4 – Preparo da solução de esporos de *P. brasilianum*

Com o intuito de padronizar a quantidade de esporos a ser inoculada em experimentos posteriores com o fungo *P. brasilianum*, em uma capela de fluxo laminar, realizou-se a raspagem dos esporos do micro-organismo com o auxílio de uma alça de platina previamente esterilizada. Os esporos foram então transferidos para um tubo de ensaio contendo 10 mL de água destilada, também previamente

esterilizado. (A esterilização foi feita em autoclave vertical por 15 minutos, 120 °C, 1 atm).

3.5 – Experimento de biotransformação utilizando células em crescimento

3.5.1 – Ensaio iniciais

Com o objetivo de investigar a capacidade de biotransformação do fungo *P. brasilianum* e influência no tempo de adição do substrato, o fungo foi cultivado em meio líquido Czapek enriquecido com 2% de extrato de levedura em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 37,5 mL de meio de cultivo. A partir daí, 2 experimentos foram realizados concomitantemente, sendo eles:

- Experimento 1 (E1): adição do substrato e inóculo do micro-organismo no mesmo dia;
- Experimento 2 (E2): adição do substrato após 3 dias de cultivo do micro-organismo.

A composição do meio Czapek enriquecido com 2% de extrato de levedura utilizada no estudo foi

- 1,0 g de K₂HPO₄
- 0,5 g de MgSO₄
- 0,5 g de KCl
- 0,01 g de FeSO₄
- 30 g de glicose
- 20 g de extrato de levedura
- 1L de água destilada

Para isso, foram preparados 10 frascos, sendo que 6 foram usados como replicatas nos experimentos 1 e 2 (codificados como M+F+S), um frasco como controle positivo (meio contendo apenas substrato, codificado como M+S) e um frasco como controle negativo (meio com inóculo do micro-organismo, codificado como M+F).

Os frascos foram então autoclavados durante 15 minutos à temperatura de 120 °C e pressão de 1 atm, e os esporos do micro-organismo (100 µL da suspensão de esporos) foram transferidos assepticamente para os frascos. No caso do experimento 1, logo após o inoculo do micro-organismo, fez-se a adição do substrato (1 mL) a partir de uma solução etanólica 5 mg/mL de substrato. Esse experimento foi realizado em modo estático, à temperatura ambiente e sem iluminação por um período de 15 dias.

Para o experimento 2, após o inoculo do fungo, os frascos foram deixados agitando em mesa agitadora a 120 rpm por 3 dias. No terceiro dia de cultivo, fez-se a adição do substrato de maneira análoga àquela realizada para o experimento 1. Este experimento também foi realizado em modo estático, à temperatura ambiente e sem iluminação de 15 dias.

O experimento foi interrompido após 15 dias de cultivo através da filtração do conteúdo presente presentes nos frascos de Erlenmeyer em funil de Büchner sob pressão reduzida. Aos micélios, foram adicionados 50 mL EtOH e deixados em repouso por 24 h à temperatura ambiente em local não iluminado. A fase aquosa foi extraída com acetato de etila (3 x 40 mL), seca com Na₂SO₄ anidro e concentrada em evaporador rotatório a pressão reduzida.

Em seguida, os extratos obtidos foram analisados por CLAE-UV.

3.5.2 – Experimentos de biotransformação de Q3, Q4, Q5 e Q6 em larga escala utilizando-se células em crescimento

Visto que o fungo *P. brasilianum* mostrou-se hábil na biotransformação do cicloaduto Q1, realizou-se experimentos de biotransformação em larga escala utilizando-se como substratos os compostos Q3, Q4, Q5 e Q6. O procedimento adotado foi análogo àquele para o Experimento 1 (E1, item 3.5.1), alterando-se apenas as quantidades utilizadas de meio de cultura e substrato. No total foram preparadas seis replicatas (M+F+S) e um controle positivo (M+S) para cada substrato além de dois controles negativos (M+F). Assim sendo, preparou-se 3,0 L de meio Czapek enriquecido com 2% extrato de levedura, sendo que este foi repartido em 30 frascos de Erlenmeyer de 500 mL de capacidade (100 mL de meio de cultura por frasco).

As soluções etanólicas de cada substrato a serem adicionadas tinham as seguintes concentrações:

Q3: 11,55 mg·mL⁻¹

Q4: 14,80 mg·mL⁻¹

Q5: 14,64 mg·mL⁻¹

Q6: 14,30 mg·mL⁻¹.

Assim, foi adicionado 1 mL solução e 100 µL de solução de esporos preparada previamente (item 3.4) à cada replicata de cada experimento. Para os controles positivos, fez-se apenas a adição de 1 mL de solução de substratos e para os controles negativos, adição de 100 µL de solução de esporos. O experimento foi mantido em modo estático, no escuro e a temperatura ambiente por 20 dias.

Cessado o período de 20 dias, o experimento foi finalizado através da filtração em funil de Büchner do conteúdo presentes nos frascos de Erlenmeyer sob pressão reduzida. Aos micélios, foram adicionados 100 mL de EtOH e deixados em repouso por 24 h à temperatura ambiente em local não iluminado. A fase aquosa foi extraída com acetato de etila (3 x 100 mL), seca com Na₂SO₄ anidro e concentrada em evaporador rotatório a pressão reduzida.

Em seguida, os extratos obtidos foram analisados por CCD (fase normal) utilizando-se como eluente acetato de etila:hexano 8:2 e reunidos de acordo com o substrato utilizado para biotransformação.

3.5.2.1 – Fracionamento por coluna cromatográfica dos extratos obtidos para Q3, Q4, Q5 e Q6

Os extratos de acetato de etila (provenientes da partição da fase aquosa com AcOEt) reunidos de Q3, Q4, Q5 e Q6 foram pesados submetidos a fracionamento por coluna filtrante (h= 45cm, φ= 6 cm). Para cada extrato, utilizou-se aproximadamente 80 g de sílica gel (230-400 mesh) e 300 mL de cada um dos eluentes:

TABELA 3.1 – Sistema de eluição utilizado para fracionamento dos extratos obtidos a partir da biotransformação de Q3, Q4, Q5 e Q6

Fração correspondente	Eluente utilizado
F1	AcOEt: Hexano 1:9
F2	AcOEt: Hexano 3:7
F3	AcOEt: Hexano 7:3
F4	AcOEt 100%
F5	EtOH: AcOEt 3:7
F6	EtOH 100%

As frações obtidas foram concentradas em evaporador rotatório de baixa pressão e transferidas para potes de vidro de 50 mL de capacidade. A nomeação de cada fração se deu utilizando-se o seguinte código:

Tipo de substrato_M+F+S_fração

Feito isso, todas as frações obtidas foram analisadas por CCD utilizando-se como eluente hexano:acetato de etila 8:2. Dentre essas, as frações F2-F4 mostraram-se mais promissoras e foram selecionadas para isolamento dos possíveis produtos de biotransformação.

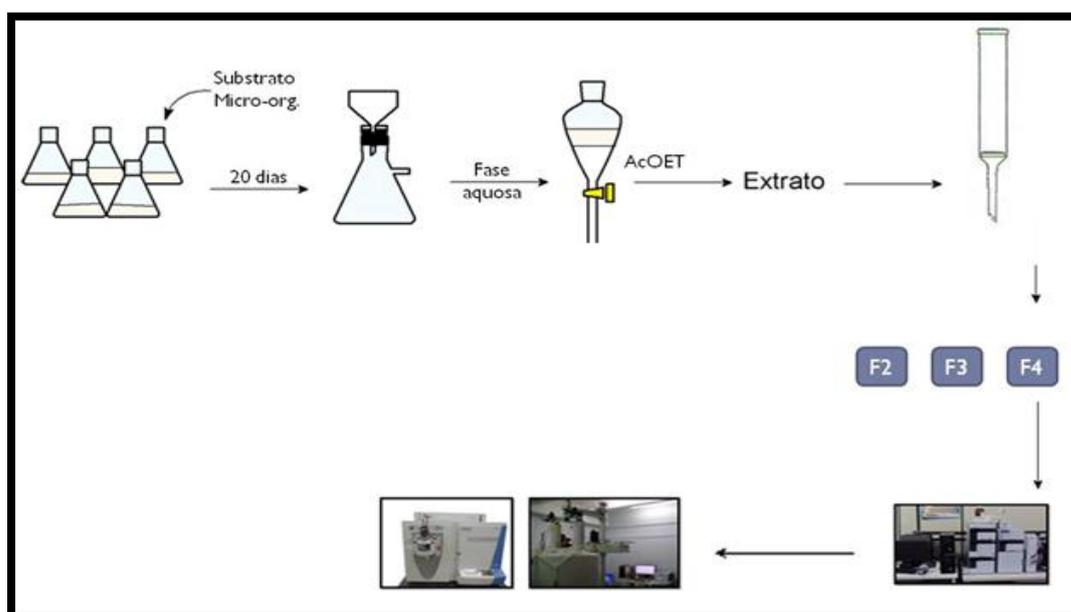
3.5.2.2 – Isolamento dos metabólitos e produtos de biotransformação por cromatografia líquida de média pressão

As frações F2-F4 (ESQUEMA 3.1) foram submetidas à separação cromatográfica por cromatografia automatizada de média pressão (*Combiflash®*). A fase estacionária consistiu em uma coluna de sílica *RediSep* 12g (fase normal). Os eluentes utilizados foram hexano e acetato de etila e o método foi otimizado a partir das separações cromatográficas observadas nas placas de CCD, como descrito na TABELA 3.2. A vazão selecionada foi 7 mL/min e os comprimentos de onda monitorados 210 e 240 nm.

TABELA 3.2 – Método cromatográfico utilizado para separação das frações F2-F4

Tempo (min)	%B
0.01	0
5.00	0.60
5.80	1.20
35.00	20.20
49.00	50.00
60.00	50.00

As sub-frações obtidas foram analisadas por CCD utilizando-se como eluentes Hex:AcOEt 8:2; Hex:AcOEt 1:1; Hex:AcOEt 1:9 conforme necessário. Através da análise por CCD, as subfrações foram reunidas e algumas foram submetidas a análise por ^1H RMN.



ESQUEMA 3.1 – Protocolo utilizado para isolamento e identificação dos produtos de biotransformação

3.5.2.3 – Análise da substância Q4_F2_15 por CLAE-EM

A substância Q4_F2_15 apresentou coloração rosa após revelação com vanilina-ácido sulfúrico na análise por CCD e foi submetida à análise por ^1H RMN. Contudo, apenas esta substância não gerou espectros passíveis de serem interpretados.

Uma vez que a substância Q4_F2_15 não pode ser analisada por RMN, fez-se a análise desta por CLAE-EM valendo-se dos seguintes parâmetros:

Condições cromatográficas: coluna Luna Phenyl-Hexyl 150 X 4,6 mm (5 µm), vazão: 0,3 mL/min; método cromatográfico descrito na TABELA 3.3.

TABELA 3.3 – Método cromatográfico utilizado na análise da substância Q4_F2_15

Tempo (min)	%B
0.01	0
5	0,6
5,8	1,2
35,0	20,2

As condições do espectrômetro de massas utilizadas para o experimento de *full scan* seguem descritas na tabela abaixo.

Tabela 3.4 – Condições do espectrômetro de massas para análise de Q4_F2_15

Condições do espectrômetro de massas	
Ionização	ESI (+)
Capilar	3,5 kVolts
Cone	25 V
Extrator	5 V
RF das lentes	0,70 V
Temp. bloco da fonte	80 °C
Temp. dessolvatação	250 °C

Para o experimento de íons filhos de Q4_F2_15, os parâmetros utilizados no espectrômetro de massas foram:

Tabela 3.5 - Condições do espectrômetro de massas para análise de íons filhos de Q4_F2_15

Condições do espectrômetro de massas	
Ionização	ESI (+)
Capilar	3,5 kVolts
Cone	25 V
Extrator	5 V
RF das lentes	0,70 V
Temp. bloco da fonte	80 °C
Temp. dessolvatação	250 °C

3.5.3 – Estabelecimento de protocolo de análise por CLAE-UV dos diversos extratos de biotransformação

A fim de estabelecer um protocolo de análise para os experimentos de biotransformação por *P. brasilianum*, fez-se um método cromatográfico exploratório com as seguintes condições: coluna analítica Luna Phenyl-Hexyl 250 x 4,6 mm (5 µm de diâmetro de poro), fases móveis: MeOH, H₂O; vazão de 0,8mL/min., método: 5-100% MeOH em 60 minutos.

A partir disso, foram testados vários métodos, porém o que mais se ajustou as amostras foi aquele descrito na TABELA 3.6: (as fases móvel e estacionária permaneceram as mesmas)

TABELA 3.6 – Método cromatográfico estabelecido para análises dos extratos de biotransformação

Tempo	%B
0,01	50
42,00	100
50,00	100
51,00	50
60,00	50

Todos os cromatogramas foram processados em dois comprimentos de onda distintos: 210 e 240 nm.

3.6 – Experimento de biotransformação utilizando células residuais

3.6.1 – Ensaio com tampões fosfato 10 mM e tris-HCl em dois pH distintos (7,2 e 8,5) utilizando-se Q1 como substrato

Tendo em vista que os experimentos utilizando células em crescimentos não levaram a resultados satisfatórios, uma nova metodologia foi testada. Esse experimento consiste em cultivar o micro-organismo em um meio rico e apropriado

para o seu desenvolvimento e expressão gênica. Após certo período, quando o micro-organismo encontra-se na sua fase de crescimento (e, portanto, há uma atividade enzimática bastante pronunciada), faz-se a filtração destas células do meio de cultura e sua posterior transferência para um tampão contendo o substrato a ser biotransformado.

Primeiramente, fizeram-se ensaios em triplicata a fim de observar se o fungo em estudo seria capaz de biotransformar os cicloadutos. Para isso, foram utilizados dois tampões (fosfato e tris-HCl) em dois pH diferentes (7,2 e 8,5) a fim de observar se algum desses dois fatores influenciariam a atividade enzimática e conseqüentemente, a quantidade e variedade de produtos de biotransformação.

Como citado anteriormente, a primeira etapa deste experimento consistiu em pré-cultivar o fungo *P. brasilianum* em meio rico de nutrientes e fontes de carbono (meio Czapek enriquecido com extrato de levedura). O procedimento adotado foi àquele semelhante ao item 3.5.1, sendo a única diferença o fato de que o micro-organismo foi colocado em agitação a 25 °C. Após três dias de desenvolvimento microbiano, fez-se a transferência dos *pellets* para um tampão previamente preparado e devidamente esterilizado.

Para cada tampão a ser preparado utilizou-se:

- Fosfato 10 mM, pH 7,2: 0,4363 g/L de fosfato monossódico, 1,8326 g/L de fosfato dissódico heptaidratado, 1 L água destilada.
- Fosfato 10 mM, pH 8,2: 0,0313 g/L de fosfato monossódico, 2,6193 g/L de fosfato dissódico heptaidratado, 1 L água destilada.
- Tris-HCl, pH 7,2: 1,211 g/L de tris base e 738 µL HCl concentrado.
- Tris-HCl, pH 8,2: 1,211 g/L de tris base e 206 µL HCl concentrado.

Preparado os tampões, aferiu-se o pH dos mesmos com auxílio de um pHmetro. E em caso de desvio do pH escolhido, o ajuste foi feito utilizando-se NaOH ou HCl.

Os tampões foram transferidos para frascos de Erlenmeyer de 125 mL e cada frasco foi preenchido com 37 mL de tampão. Em seguida, os frascos foram autoclavados a 120 °C e 1 atm de pressão por 15 minutos. Após resfriarem, fez-se a adição do substrato Q1 de modo idêntico àquele descrito no item 3.5.1. A transferência dos *pellets* também foi realizada em capela de fluxo laminar com auxílio de um funil analítico, papel de filtro e espátula. Para isso, filtrou-se o conteúdo dos frascos de

Erlenmeyer em que foi cultivado o micro-organismo e as *células* foram então transferidas com uma espátula para os frascos contendo tampão.

Esse experimento foi então conduzido em agitação a 25 °C em mesa incubadora com controle de temperatura, no escuro por 15 dias.

(As condições de tempo de pré-cultivo do micro-organismo bem como tempo de experimento foram determinadas segundo experimentos realizados anteriormente ao longo da execução deste trabalho e em condições pré-estabelecidas em outros estudos desenvolvidos por SILVA (2009).

A extração e análise dos extratos obtidos foram feitos de modo semelhante àquelas descritas nos itens 3.5.1 e 3.5.3, respectivamente.

3.6.2 – Biotransformação de Q1, Q2, Q3, Q4, Q5 por *P. brasilianum* utilizando-se o protocolo de células residuais

Como o ensaio com células residuais mostrou-se promissor e viável, realizou-se o experimento em larga escala com os substratos Q1, Q2, Q3, Q4 e Q5. (O substrato Q6 não foi utilizado, pois fora todo utilizado em experimentos anteriores.) Além disso, através da análise por CLAE-UV, observou-se o perfil cromatográfico não se alterava com as mudanças de tampão e pH. Portanto, adotou-se o tampão fosfato (10 mM) pH 7,2 como tampão a ser utilizado para os demais experimentos de biotransformação.

A metodologia adotada foi semelhante àquela descrita no item 3.6.1 sendo que apenas as quantidades de meio de cultura, tampão e substrato foram alteradas. Para este experimento foram utilizados frascos de Erlenmeyer de 500 mL de capacidade contendo 100 mL de tampão. No total foram preparados 15 frascos Erlenmeyer de M+F+S para cada substrato, 2 frascos de Erlenmeyer M+S para cada substrato e um frasco de Erlenmeyer M+F.

As soluções metanólicas de substratos adicionadas (1 mL) a cada frasco apropriado foram:

Q1= 17,47 mg/mL (total utilizado: 262,05 mg)

Q2= 20,08 mg/mL (total utilizado: 301,20 mg)

Q3= 20,25 mg/mL (total utilizado: 303,75 mg)

Q4= 15,22 mg/mL (total utilizado: 228,30 mg)

Q5= 11,72 mg/mL (total utilizado: 175,80 mg)

O experimento foi deixado por 15 dias em agitação a 25°C e sem iluminação.

Cessado esse período, o conteúdo do frasco de Erlenmeyer foi filtrado em pressão reduzida com auxílio de um funil de Büchner e as replicatas foram reunidas. Ao micélio, adicionou-se 1 L de EtOH e deixou-se em repouso por 24 h. A fase aquosa foi particionada com AcOEt (3x 500 mL), seca com Na₂SO₄ anidro e concentrada em evaporador rotatório a pressão reduzida.

Os extratos obtidos foram analisados por CLAE-UV como descrito no item 3.5.3 e submetidos ao isolamento em um CLAE preparativo utilizando as seguintes condições cromatográficas:

- Fases estacionárias: 1) coluna preparativa PHENOMENEX LUNA C18 250 x 21,20mm (utilizada para os extratos M+F+S de Q2, Q3 e Q4); 2) coluna semipreparativa Phenyl-Hexyl 300 x 4,6 mm (utilizada para os extratos M+F+S de Q2, Q3 e Q4);
- Fase móvel: MeOH, H₂O
- Vazão: 12 mL/min; 2) 4,5 mL/min
- Método cromatográfico: idem àquele descrito no item 3.5.3.

Os produtos de biotransformação isolados foram submetidos a análise por espectrometria de massas de alta resolução em um equipamento LTQ Orbitrap Velos Thermo equiparado com um analisador de massas do tipo orbitrap e uma fonte de ionização ESI. As análises foram adquiridas no modo positivo por inserção direta.

3.7 – Redução química de Q1, Q2 e Q3 utilizando-se H₂/Pd

As reações de redução química foram realizadas em um balão de fundo redondo selados com septo de borracha (ESQUEMA 3.2). Para tal, foram dissolvidos 20 mg de cada substrato em 5 mL de diclorometano. Em seguida, fez-se a purga do balão com Ar_(g) a fim de remover todo oxigênio ali presente. Removido o oxigênio, fez-se adição de quantidades catalíticas de Pd_(s) e acoplou-se ao sistema um balão contendo H_{2(g)}. O sistema foi deixado a temperatura ambiente, em agitação e a reação foi monitorada por análise de CCD. Após 2 h, observou-se que a reação estava

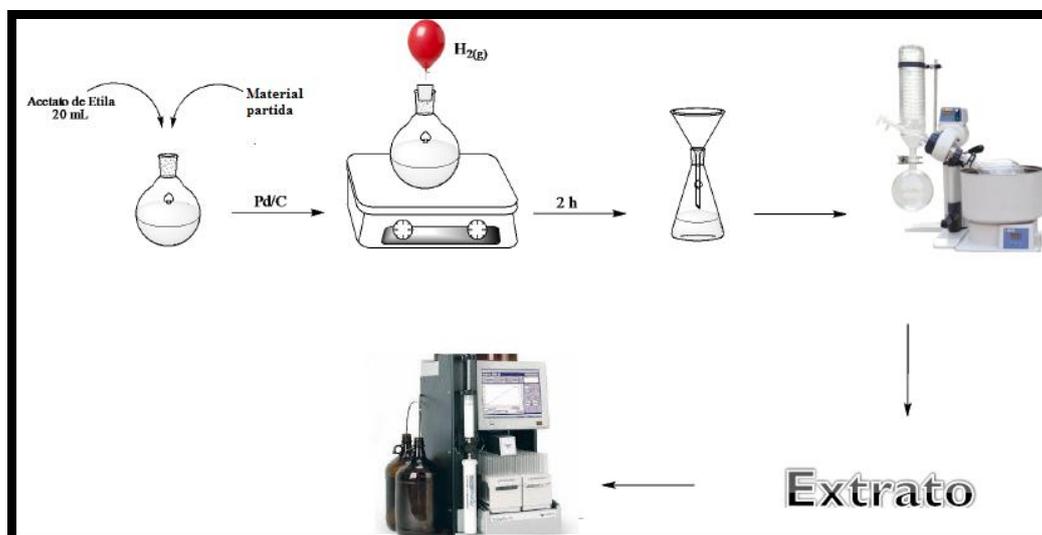
completa (não restava material de partida) e a mesma foi interrompida com a filtração com auxílio de um funil analítico da mistura presente no balão de fundo redondo.

A fase orgânica foi concentrada em evaporador rotatório a pressão reduzida e submetida a separação cromatográfica por cromatografia líquida de média pressão. A análise dos produtos obtidos foi feita por ^1H RMN.

O sistema de eluição utilizado foi MeOH:H₂O, com vazão de 7 mL/min. A coluna cromatográfica utilizada foi uma coluna de fase reversa RediSep Column: C18 4.3g. O método cromatográfico segue descrito na TABELA 3.7.

TABELA 3.7 – Método cromatográfico utilizado para purificação dos produtos de redução por cromatografia líquida de média pressão

Tempo (min)	%B
0.01	50
60.00	100
70	100



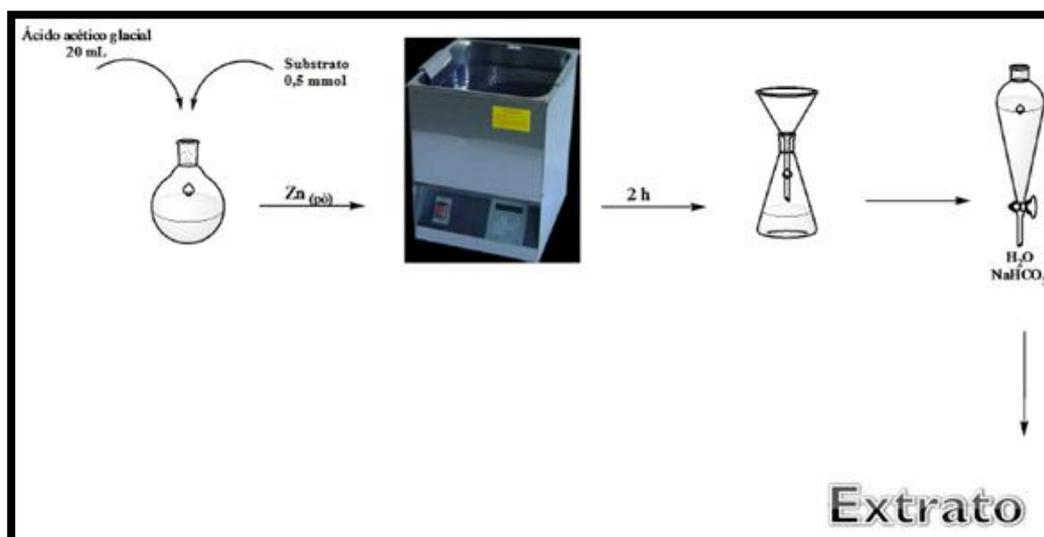
ESQUEMA 3.2 – Metodologia abordada para a reação de redução Q1-Q4 por H₂/Pd

3.8 – Redução química seletiva de Q1, Q2 e Q3 utilizando-se Zn/Ácido acético

As reações de hidrogenações utilizando-se $Zn_{(s)}$ e ácido acético glacial (COMINS et al., 2001) foram efetuadas em um balão de fundo redondo de 50 mL de capacidade. Para isso, uma solução de 20 mL de ácido acético contendo o substrato (0.5 mmol de substrato, 100 mg) foi adicionada ao balão. Em seguida, adicionou-se $Zn_{(s)}$ em pó (0,15 mmol, 100 mg) e o balão foi colocado em banho de ultrassom por 2h. A reação foi monitorada por placas de CCD reveladas em um detector de UV a 254 nm.

Após o consumo de todo o material de partida, fez-se a remoção do zinco em pó com auxílio de um funil de placa sinterizada contendo celite. Em seguida, fez-se extração ácido-base com $NaHCO_3$ saturado (3 x 25 mL) e lavou-se a fase orgânica com água destilada (2 x 25 mL). Por fim, a fase aquosa foi seca com Na_2SO_4 anidro e concentrada em evaporador rotatório a pressão reduzida.

Os produtos obtidos foram analisados e caracterizados por RMN uni- e bidimensional.



ESQUEMA 3.3 – Metodologia abordada para a reação de redução Q1-Q4 por ácido acético e $Zn_{(s)}$

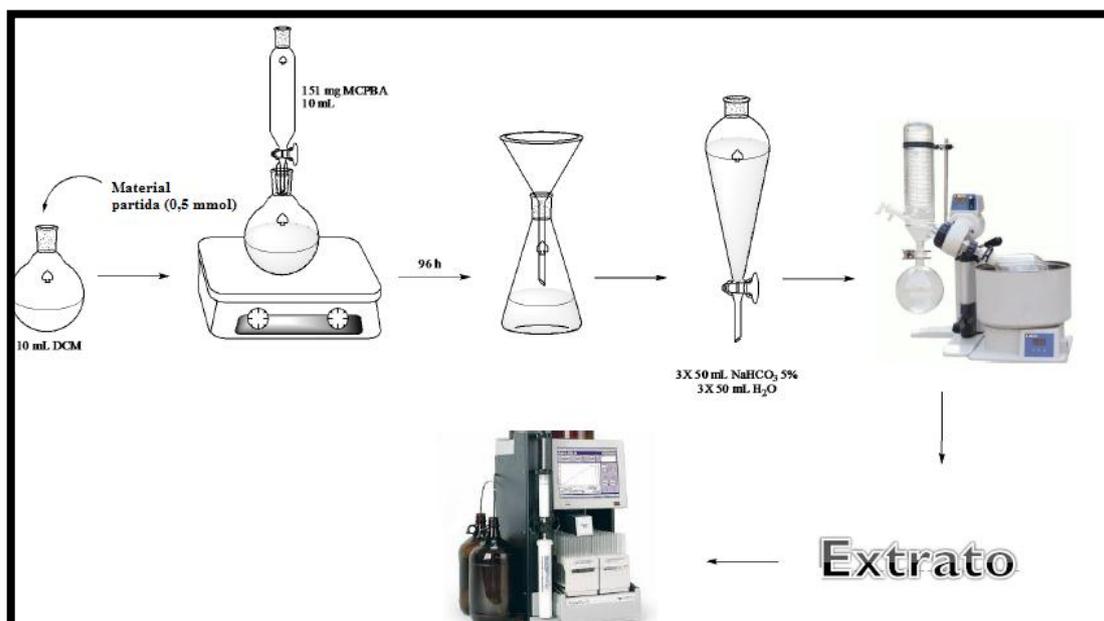
3.9 – Epoxidação química de Q1, Q2 e Q3 com MCPBA e abertura do epóxido em tampão fosfato pH 7,6 (10 mM)

As reações químicas de epoxidação (MARCHAND et al., 1998) de Q1, Q2 e Q3 foram realizadas em um balões distintos de fundo redondo selado com um septo de borracha. À estes balões foram adicionadas 10 mL de soluções de DCM contendo os materiais a serem epoxidados (0,5 mmol) e estes foram mantidos em banho de gelo a 0 °C e em agitação.

Outras soluções de 10 mL de DCM contendo o agente oxidante (0.6mmol, 151 mg) ácido *m*-cloroperbenzóico 77% foram adicionadas aos balões através do auxílio de funis de adição.

As reações foram monitoradas por placa de CCD visualizadas a 254 nm em um detector de UV. Após 96h, os conteúdos dos balões foram filtrados em funil analítico e a fase orgânica foi extraída com NaHCO₃ saturado (3 x 30 mL) a fim de remover o sub-produto (ácido benzóico) e lavada com água destilada (2 x30 mL).

Em seguida, secaram-se as fases orgânicas com Na₂SO₄. Após a remoção do Na₂SO₄, estas foram concentradas em evaporador rotatório a pressão reduzida. Os produtos obtidos foram purificados em um cromatógrafo líquido de média pressão com eluição isocrática constituída de hexano:acetato de etila 9:1 v/v, com uma vazão de 7 mL/min e uma coluna de sílica *RediSep* 12g. Por fim, os produtos purificados foram identificados e caracterizados por RMN.



ESQUEMA 3.4 – Metodologia abordada para a reação epoxidação de Q1-Q3 com MCPBA

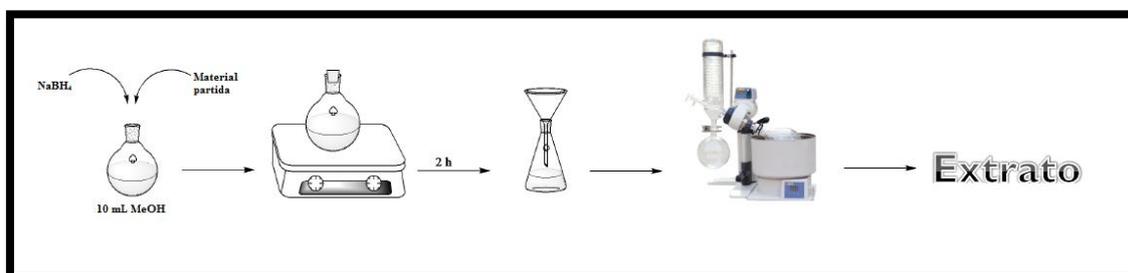
4. – Abertura do epóxido de Q1, Q2 e Q3 em tampão fosfato pH = 7,2 (10 mM)

Fez-se o preparo do tampão fosfato de modo idêntico àquele descrito no item 3.6.1 em frascos de Erlenmeyer de 125 mL de capacidade contendo 3 mL de tampão. Em seguida, em capela de fluxo laminar, fez-se adição de 1 mL de uma solução etanólica de 10mg/mL de substrato devidamente esterilizada com auxílio de filtro Millipore 0,20 μm . Os frascos foram deixados em agitação a 25 °C no escuro por 15 dias.

Os processos de extração e análise dos produtos obtidos foram feitas de maneira idêntica às aquelas descritas nos item 3.5.1e 3.5.3.

4.1 – Redução química de carbonila de Q4 e Q5 com NaBH_4

Para a redução do sistema carbonílico α,β -insaturado dos cicloadutos Q4 e Q5 (CHUNJIAN e BURNELL, 1997) utilizou-se como agente redutor NaBH_4 . A uma solução do cicloaduto Q4 (100 mg, 0,5 mmol) em MeOH grau HPLC (10 mL) a temperatura ambiente, adicionou-se NaBH_4 (24,65 mg, 0,65 mmol). Após 2 h de agitação, a reação foi finalizada pela adição de uma solução saturada de NH_4Cl . A mistura resultante foi extraída com acetato de etila e a fase orgânica lavada com água destilada e solução saturada de NaCl . Após secagem com Na_2SO_4 anidro, o solvente foi removido em evaporador rotatório a pressão reduzida. O produto obtido foi analisado e caracterizado por RMN.



ESQUEMA 4.1 – Metodologia abordada para a reação de redução do sistema carbonílico α,β -insaturado de Q4 e Q5

4.2 – Análise de rotação ótica

As soluções a serem analisadas no polarímetro foram preparadas em MeOH grau HPLC na concentração de 10 mg/mL nos volumes de 1 mL ou 200 µL conforme a massa que se tinha de cada produto. As análises foram realizadas a 30 °C e o cálculo da rotação ótica ($[\alpha]_D^t$) foi realizado seguindo a seguinte fórmula:

$$[\alpha]_D^t = \frac{\alpha}{[C] \cdot l}$$

Equação 4.1 – Equação utilizada para o cálculo da rotação ótica

Em que α é o valor empírico obtido; $[C]$ é a concentração da amostra em g/mL e l é a comprimento da cuba em dm.

4.3 – Análise da quiralidade por cromatografia quiral

Para cada cicloaduto e seus respectivos produtos de biotransformação foram otimizados diferentes métodos cromatográficos a fim de obter as proporções enantioméricas entre eles através da integração das bandas cromatográficas. As condições utilizadas seguem descritas abaixo.

- Q1 e seus derivados: coluna OB-H, vazão: 0,6 mL/min; método isocrático de 10% MeOH, 15 minutos de corrida cromatográfica;
- Q2 e seus derivados: coluna OB-H, vazão: 1,0 mL/min; método isocrático de 10% MeOH, 15 minutos de corrida cromatográfica;
- Q3 e seus derivados: coluna Lux Chiral Column Cellulose-1, vazão: 1,0 mL/min; método isocrático de 10% MeOH, 15 minutos de corrida cromatográfica;
- Q4 e seus derivados: coluna Lux Chiral Column Cellulose-2, vazão: 1,0 mL/min; método isocrático de 10% MeOH, 15 minutos de corrida cromatográfica;
- Q5 e seus derivados: idem a Q4.

O excesso enantiomérico foi calculado pela diferença das proporções das bandas integradas pelo software *Class Vp*.

4.4 – Otimização da geometria molecular dos produtos de biotransformação

As geometrias moleculares de todos os produtos de biotransformação isolados foram otimizadas utilizando o nível de teoria B3LYP/6-31+G(d,p). Foram calculadas as frequências vibracionais das estruturas otimizadas no mesmo nível de teoria e não foram observados valores negativos de frequência, caracterizando as estruturas como mínimos locais. Todos os cálculos foram feitos no pacote de programas Gaussian revisão A.01 2003.

4.5 – Ensaio de fitotoxicidade dos substratos Q1-Q5

A avaliação da atividade fitotóxica foi determinada a partir do bioensaio de coleóptilo de trigo (*Triticum aestivum* L. variedade Pizon). Assim, cariopses de trigo foram pré-germinadas em água destilada e mantidas em câmara de germinação a 25°C por 4 dias em ausência de luz. Em seguida, os coleóptilos foram selecionados e cortados com uma guilhotina de Van der Weij em luz verde para evitar a estagnação do crescimento das células. Os ápices dos coleóptilos foram descartados enquanto o restante foi cortado e colocado em tubos de ensaio contendo água destilada.

Em cada tubo foram adicionados 2 mL das respectivas soluções dos substratos nas concentrações de 10^{-3} M; 10^{-4} M $3 \cdot 10^{-4}$ M; 10^{-5} M e $3 \cdot 10^{-5}$ M e cinco coleóptilos. Como controle positivo, utilizou-se o herbicida GOAL® (240 g.i.a L⁻¹) nas mesmas concentrações. Para controle negativo, utilizou-se uma solução com DMSO. Esses tubos, distribuídos aleatoriamente, foram mantidos a 25°C no escuro, sob rotação constante de 6 rpm. No total, foram utilizadas três repetições por tratamento. Após 24h, os coleóptilos foram retirados dos tubos, fotografados e medidos com auxílio do *software* ImageJ.

Os dados foram avaliados estatisticamente pela porcentagem de inibição ou estímulo em relação ao controle positivo. Todos os resultados foram submetidos ao teste de normalidade e homogeneidade de Shapiro-Wilk e Levene,

respectivamente. Para os dados normais e homogêneos utilizou-se ANOVA seguida do teste de Tukey.

5. – Resultados e discussão

5.1 - Ensaio iniciais

Os ensaios iniciais utilizando-se a metodologia de células em crescimento levaram em resultados semelhantes quando se analisa o perfil cromatográfico dos extratos (FIGURA 5.1). Porém, uma diferença significativa na intensidade das bandas é expressa para o experimento 2, sugerindo que há maior conversão do substrato à produto(s) de biotransformação ou mesmo maior expressão do metabolismo secundário.

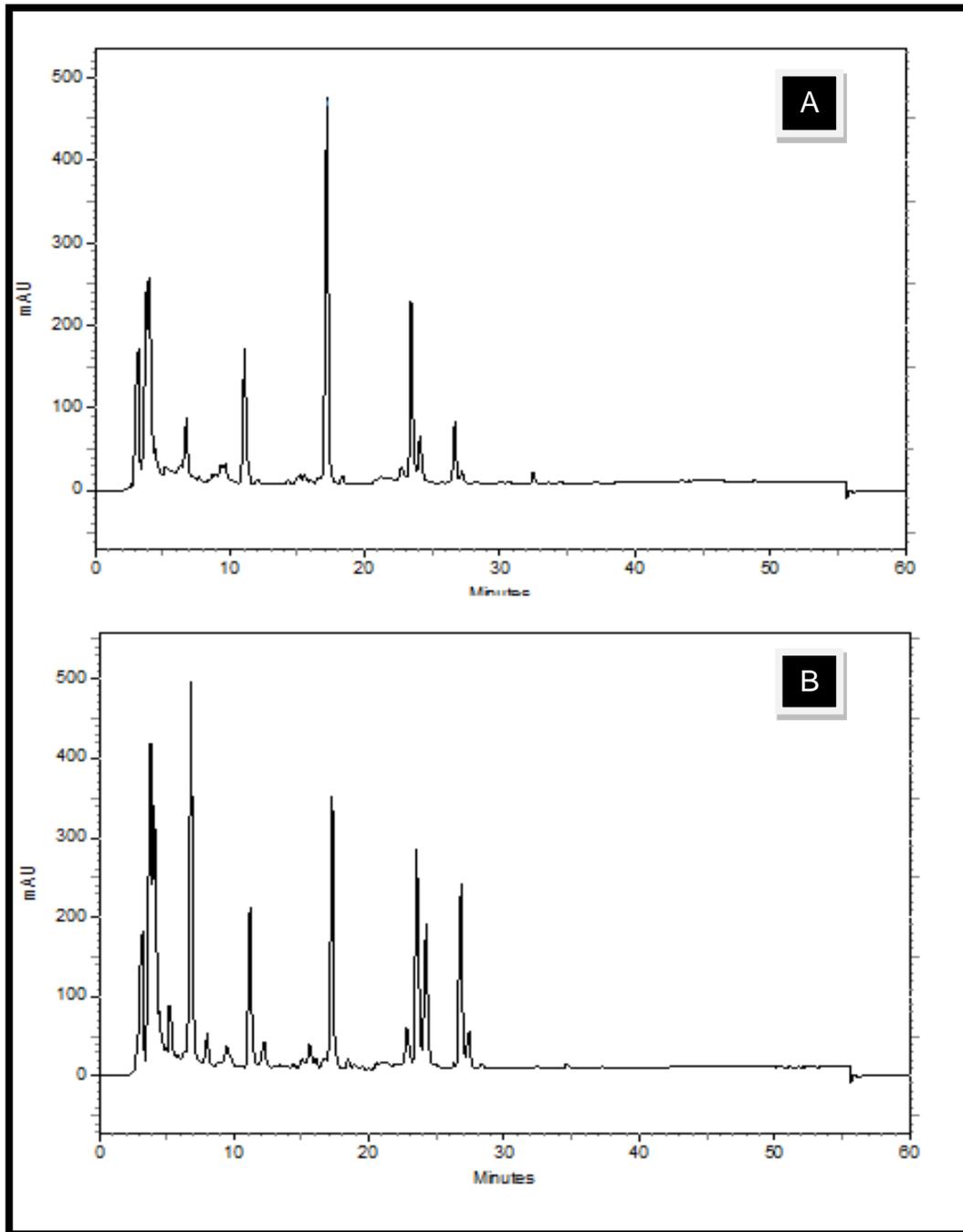


FIGURA 5.1 – Cromatograma dos ensaios A) experimento E1 (adição do substrato junto com inóculo do fungo) e B) experimento E2 (adição do substrato junto após 3 do inóculo do fungo)

Após observar que ambos experimentos geraram praticamente os mesmos resultados, fez-se o escalonamento da metodologia a fim de que se pudesse isolar quantidades mensuráveis e analisáveis de produtos de biotransformação.

5.2 – Experimentos de biotransformação de Q3, Q4, Q5 e Q6 em larga escala (células em crescimento)

O experimento de biotransformação de células em crescimento ocasionou um bom desenvolvimento micelial do fungo *P. brasilianum*, exceto para o substrato Q4, como pode ser visto na FIGURA 5.2B abaixo.

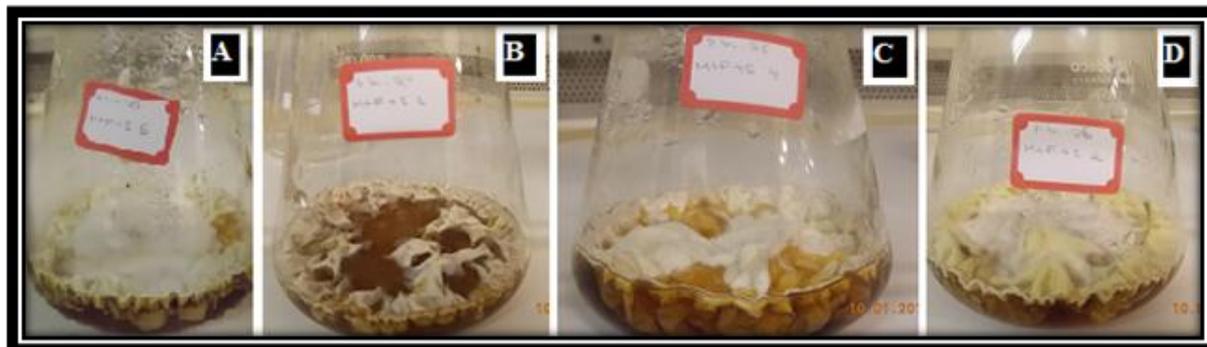


FIGURA 5.2 – Experimento de biotransformação de *P. brasilianum* com os diferentes substratos após 20 dias de cultivo: A) Q3, B) Q4, C) Q5 e D) Q6

Através da análise por CCD destes (FIGURA 5.2), observou-se que as replicatas do extrato de acetato de etila eram similares e então estas foram reunidas resultando nas seguintes massas: Q3: 312,5 mg; Q4: 186,6 mg; Q5: 245,4 mg e Q6: 335,2 mg. As replicatas do extrato etanólico também foram analisadas por CCD, porém, ao comparar as replicatas com o controle negativo (M+F), observou-se que estas continham poucos (ou nenhum) possíveis produtos de biotransformação. Por este motivo, decidiu-se dar continuidade aos estudos propostos utilizando-se apenas os extratos de acetato de etila.

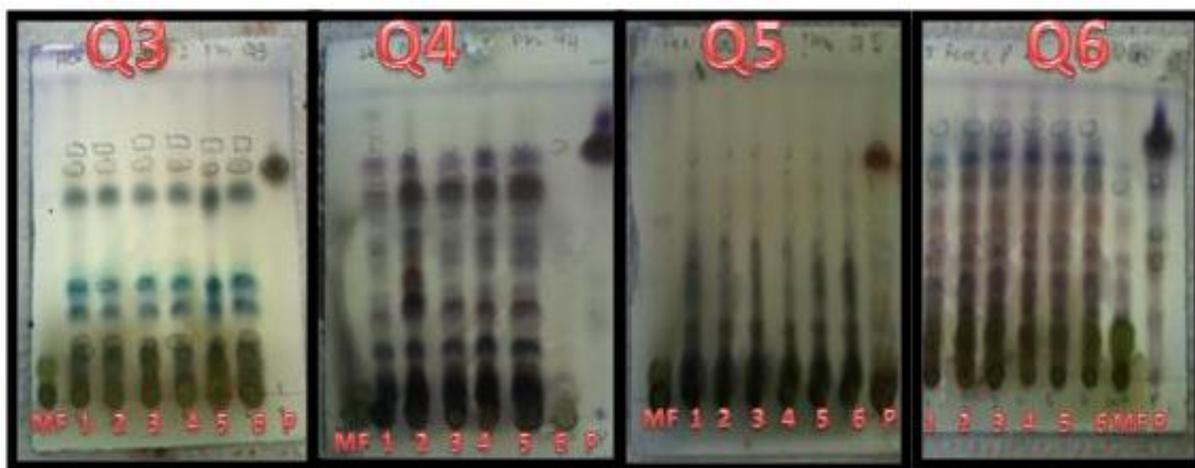


FIGURA 5.3 – CCD dos extratos obtidos para Q3, Q4, Q5 e Q6 em que: M+F = controle meio+fungo; 1-6: replicatas do experimento contendo meio, fungo e substrato (M+F+S), P= controle positivo (M+S). Eluente utilizado: AcOEt:Hex 8:2

Comparando-se o ponto mais à esquerda em que foi aplicado o controle negativo (M+F) e os pontos centrais contendo as replicatas 1, 2, 3, 4, 5 e 6 (M+F+S), observa-se a presença de bandas nas replicatas que não estão presentes no controle M+F (possíveis produtos de biotransformação).

Após serem reunidos, todos os extratos de acetato M+F+S foram submetidos a fracionamento por coluna filtrante e em seguida a isolamento por cromatografia líquida de média pressão.

5.2.1 – Substância Q4A_F2_15

Outro produto de biotransformação de Q4 bastante interessante pela coloração ao ser revelado em solução de vanilina/ H_2SO_4 (em destaque na placa de CCD na FIGURA 5.4) também foi isolado, porém, em quantidade aquém daquela suficiente para se realizar análise de RMN.

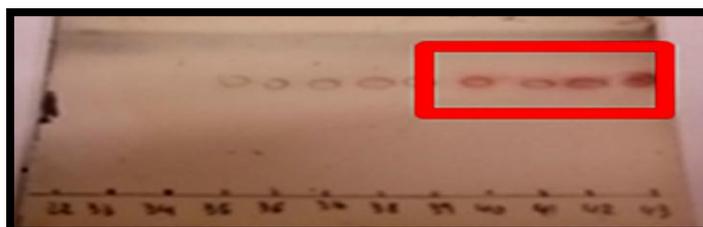


FIGURA 5.4 – Análise por CCD da fração Q4A_F2_15

A fim de obter mais informações sobre essa substância, fez-se a análise por CLA-EM, cujo cromatograma de íons totais segue mostrado na FIGURA 5.5A. O processamento da banda mais intensa destacada em vermelho ($t_R = 33,05$ min) gerou o espectro de massas mostrado na FIGURA 5.5B.

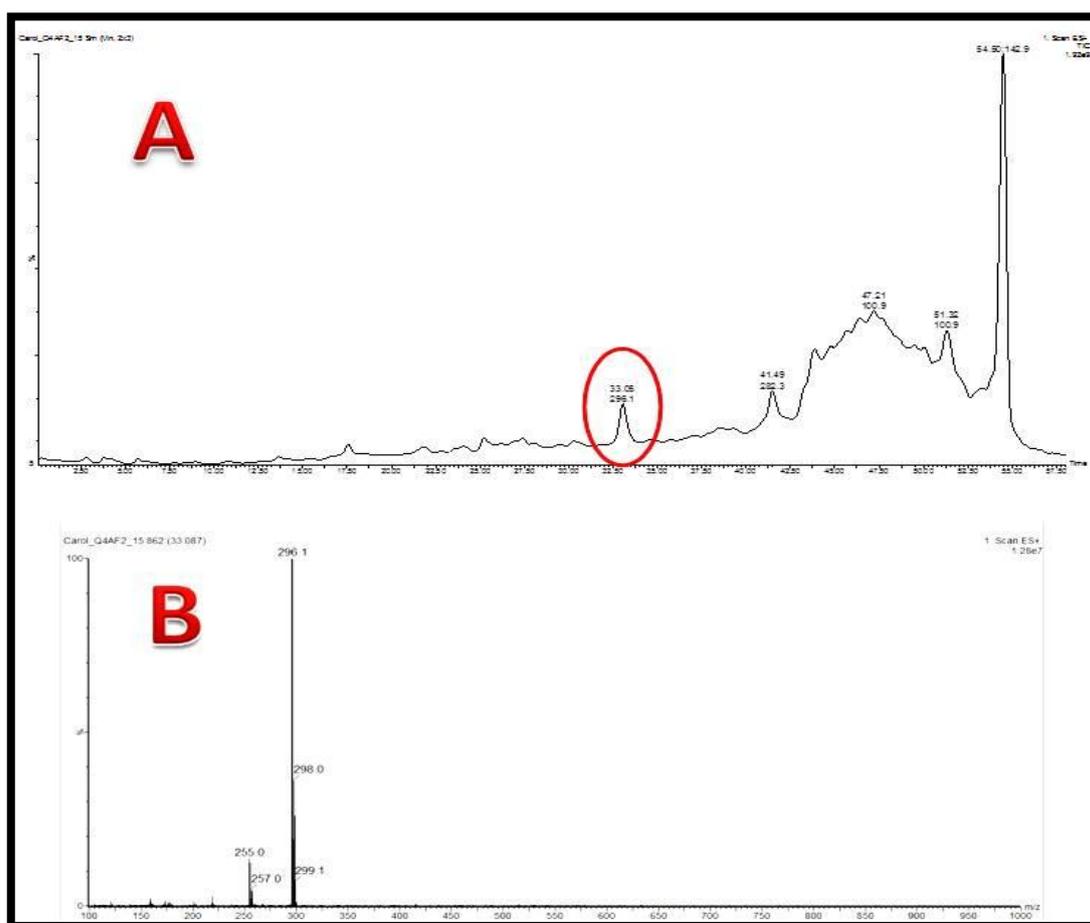


FIGURA 5.5 – A) Cromatograma de íons totais da amostra Q4_F2_15 e B) Espectro de massas da banda em destaque em A ($t_R = 33,05$ min)

Através da proporção isotópica dos íons de m/z 255, m/z 257, m/z 296 e m/z 298 (proporção 3:1, respectivamente) no espectro de massas (FIGURA 5.5B) é possível observar a presença de um átomo de cloro na molécula. Também é possível notar que os últimos dois íons (m/z 296 e m/z 298) são referentes ao aduto de acetonitrila ($[M+H+ACN]^+$) devido a diferença de 41 unidades entre os íons m/z 255 e

m/z 296 e entre os íons m/z 257 e m/z 298. Aferindo-se a massa molecular da molécula desprotonada de ambos os isótopos ($C_{14}H_{19}O_2^{35}Cl$ e $C_{14}H_{19}O_2^{37}Cl$) é possível que esta seja um produto de biotransformação reduzido e clorado (mesma quantidade de átomos de carbonos e um átomo de hidrogênio a mais que aqueles observados para o substrato Q4 – $C_{14}H_{18}O_2$). Esse fato é muito interessante, pois ainda não foram reportadas reações de halogenações por esta espécie fúngica, o que o torna inédito. Este experimento está sendo repetido a fim de isolar maiores quantidades deste produto para que os experimentos de elucidação estrutural sejam realizados.

A fim de confirmar a presença do átomo de halogênio, os íons de m/z 255 e m/z 257 foram submetidos ao experimento de íons filhos, como mostrado abaixo. O substrato Q4 (m/z 219, FIGURA 5.6A) também foi submetido ao experimento de íons filhos para que se pudessem comparar os perfis espectrais.

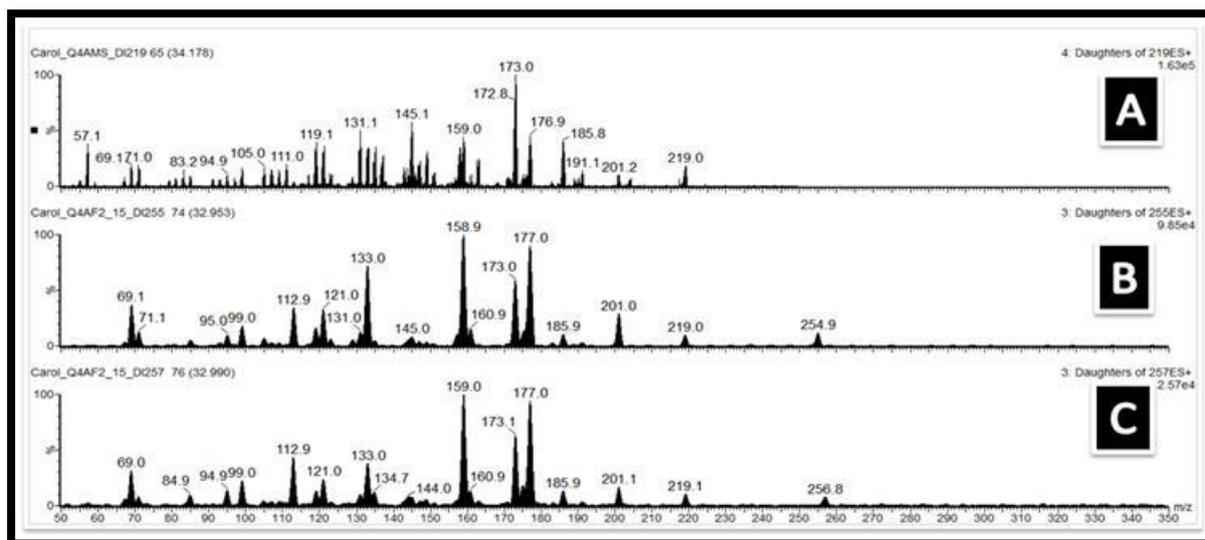


FIGURA 5.6 – Espectro de massas obtido nos experimentos de íons filhos de A) m/z 219 (substrato), B) m/z 255 e C) m/z 257

O primeiro espectro (FIGURA 5.6A) é referente ao substrato administrado ao micro-organismo. Ao comparar-se o perfil de fragmentação deste com aquele obtido para o produto de biotransformação, observa-se que estes são bastante semelhantes. Tal fato reforça a possibilidade da obtenção do produto de biotransformação e não um metabólito secundário.

Assim como esperado, os espectros obtidos para os íons de m/z 255 e m/z 257 apresentam-se semelhantes, exceto pela diferença da corrente iônica de m/z

257 ser 1/3 daquela para m/z 255 (o que também é esperado para moléculas cloradas dada a proporção isotópica dos átomos de cloro).

A amostra também foi submetida à análise por CLAE-EM de alta resolução (FIGURA 5.7). Os dados obtidos foram bastante conclusivos, confirmando a hipótese proposta anteriormente. A massa exata calculada para o suposto produto de biotransformação era de 254,1075 Da, sendo a massa protonada de 255,1153 Da. A massa (protonada) obtida para este composto através desta análise foi de 255,1155, sendo o erro experimental de 3 ppm, levando à seguinte fórmula molecular: $C_{14}H_{19}O_2Cl$. Essa fórmula é referente à redução e cloração do substrato administrado ao micro-organismo.

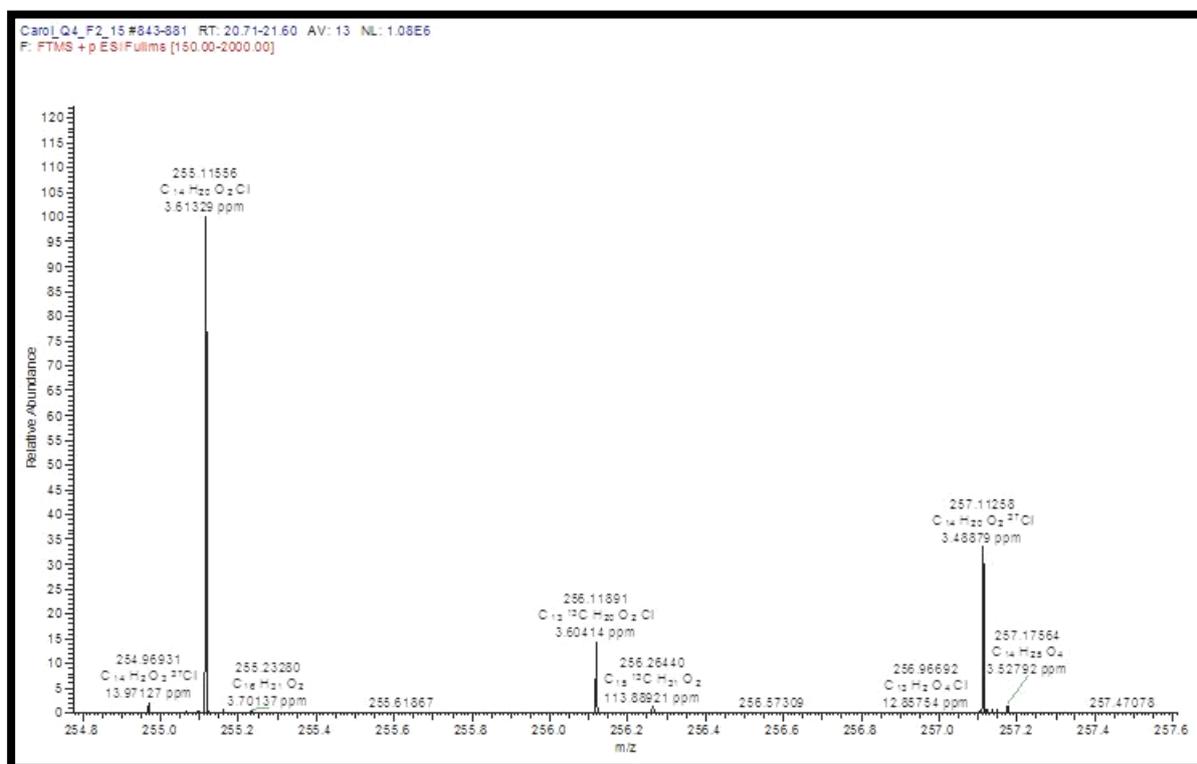


FIGURA 5.7 – Espectro de massas de alta resolução da amostra Q4A_F2_15

Ao comparar os espectros de UV do produto de biotransformação e do seu substrato correspondente, observa-se que há uma pequena diferença de 10 nm na absorção máxima de ambos, indicando que o grupo cromóforo permaneceu intacto. Desta forma é possível afirmar que a halogenação ocorreu na dupla isolada, sendo então um dos dois possíveis isômeros.

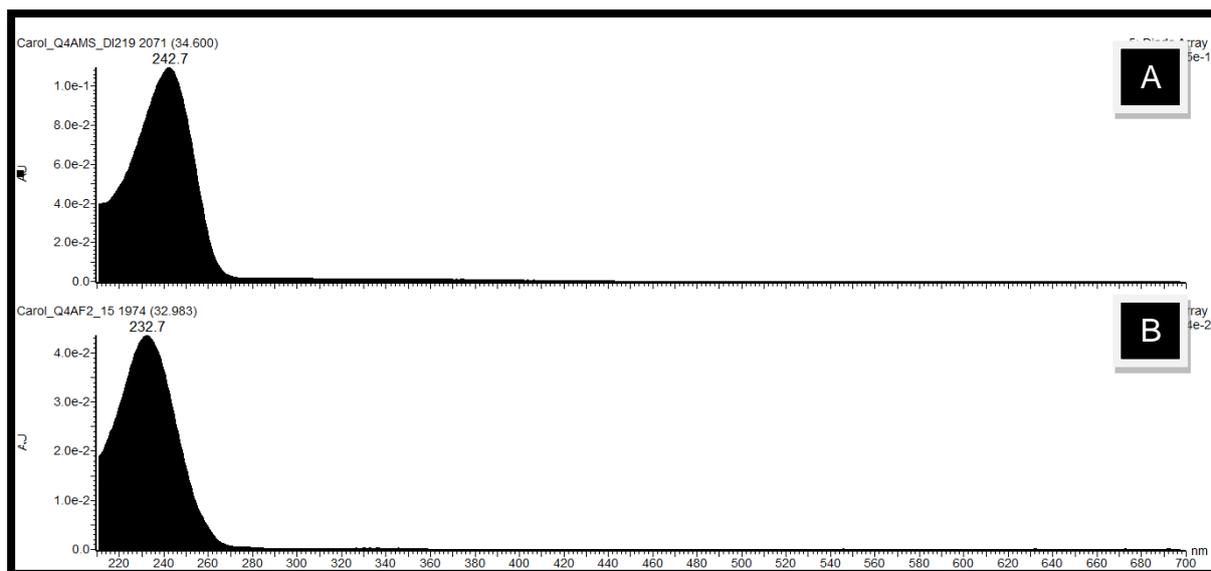


Figura 5.8 – Espectros de UV das substâncias A) substrato Q4 e B) produto de biotransformação Q4_F2_15

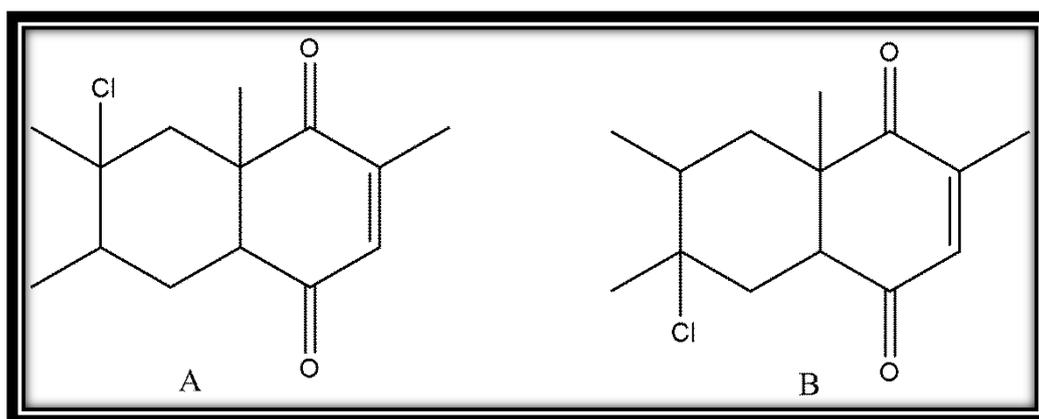


Figura 5.9 – Possibilidades de halogenação do substrato Q4 para a formação do produto de biotransformação

Baseado nos dados de massas obtidos para o experimento de íons filhos para o produto de biotransformação halogenado e valendo-se da informação de que a halogenação ocorreu na olefina isolada proveniente do dieno, propôs-se a seguinte proposta de fragmentação para alguns íons observados mostrados na figura a seguir.

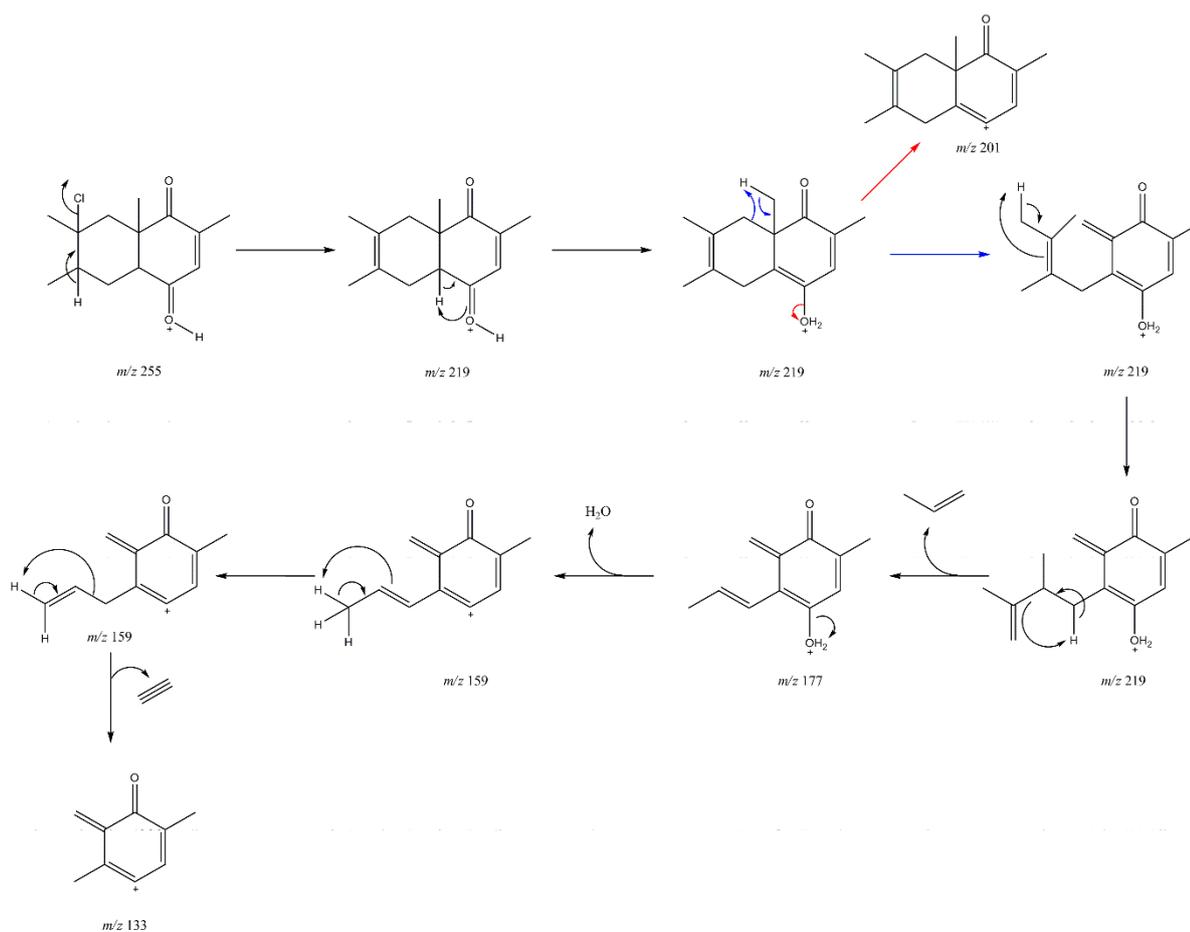


Figura 5.10 - Proposta de fragmentação do íon m/z 255 (pico do íon *quasi* molecular encontrado para Q4_F2_15)

Primeiramente ocorre a protonação da substância Q4_F2_15 levando a formação do íon de m/z 255. Em seguida, há perda de HCl através de uma eliminação (-36 u) e formação do íon de m/z 219. Após alguns rearranjos de hidrogênio 1,3, ocorre a perda de um fragmento neutro de 42 unidades de massa, 1,2-propeno, levando a formação do íon de m/z 177. Por último, a perda de uma molécula de água forma então o íon de m/z 159. Novamente, através de rearranjos de hidrogênio 1,3, há a perda neutra de uma molécula de etino, formando o íon de m/z 133.

Embora a proposta tenha sido feita utilizando-se um dos isômeros, os mesmos fragmentos podem ser obtidos com o outro. Desta forma, a elucidação completa da estrutura molecular de Q4_F2_15 só pode ser obtida através de análises de ressonância magnética nuclear uni- e bidimensional. Assim, maiores quantidades desta substância necessitam ser isoladas para que os experimentos possam ser executados.

5.2.2 – Caracterização dos metabólitos secundários isolados

Apesar de não terem sido isolados produtos de biotransformação a partir dos substratos Q1, Q3, Q5 e Q6, foi observado que a presença destes no meio de cultura é responsável pela indução da biossíntese de alcaloides, sendo estes os compostos majoritários no extrato. Assim, foram isolados e identificados os metabólitos verruculogenina, brevianamida F, 12,13-dihidroxi-fumitremorgina C e ácido penicílico.

5.2.2.1 – Caracterização da substância verruculogenina

A partir do cultivo do fungo *P. brasilianum* com o substrato Q3 isolou-se a substância verruculogenina de acordo com o procedimento descrito na seção 3.5.2. Esta substância foi analisada por RMN ^1H e ^{13}C e teve seus dados comparados com a literatura. O espectro de RMN ^1H encontra-se na FIGURA 5.11 abaixo.

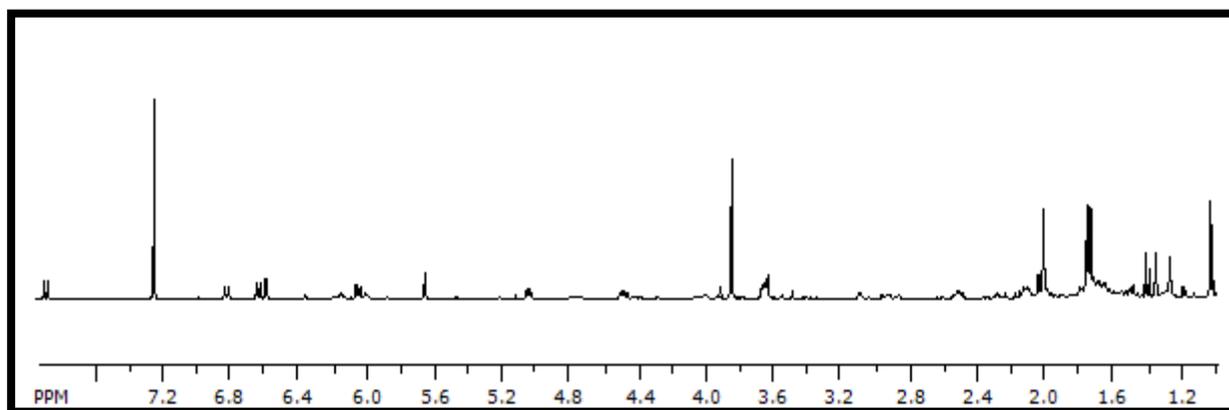


FIGURA 5.11 – Espectros de RMN ^1H obtido para a substância verruculogenina (400 MHz, CDCl_3)

Os dados obtidos a partir dos experimentos de RMN ^1H assim como a comparação com os dados da literatura levaram a identificação do composto como sendo o alcaloide verruculogenina, isolado anteriormente por SANTOS (2003) a partir deste mesmo micro-organismo. Os dados estão sumarizados na TABELA 5.1 a seguir.

TABELA 5.1 – Dados de deslocamento químico de ^1H (δ em ppm) para a substância verruculogenina

Posição	δ (ppm) e multiplicidade - observado	δ (ppm) e multiplicidade - literatura
4	7,89 (d)	7,89 (d)
5	6,83 (dd)	6,82 (dd)
7	6,59 (d)	6,59 (d)
10	5,65 (s)	5,65 (s)
14	4,47 (dd)	4,48 (dd)
15	2,49 (m)	2,49 (m)
	2,06 (m)	2,06 (m)
16	2,09 (m)	2,09 (m)
	1,96 (m)	1,96 (m)
17	3,64 (dt)	3,64 (dt)
20	6,05 (d)	6,05 (d)
21	2,03 (sl)	2,03 (sl)
	1,68 (dd)	1,68 (dd)
23	1,72 (s)	1,72 (s)
24	1,01 (s)	1,01 (s)
25	6,65 (d)	6,65 (d)
26	5,04 (dt)	5,04 (dt)
28	2,00 (d)	2,00 (d)
29	1,72 (d)	1,73 (d)
O-CH ₃	3,84 (s)	3,84 (s)

A partir dos dados de RMN ^1H e comparação com os dados da literatura, a estrutura molecular da verruculogenina foi proposta e, pela coincidência dos sinais observados no espectro obtido comparado aos sinais visualizados na literatura chegou-se na estrutura mostrada na FIGURA 5.12 a seguir.

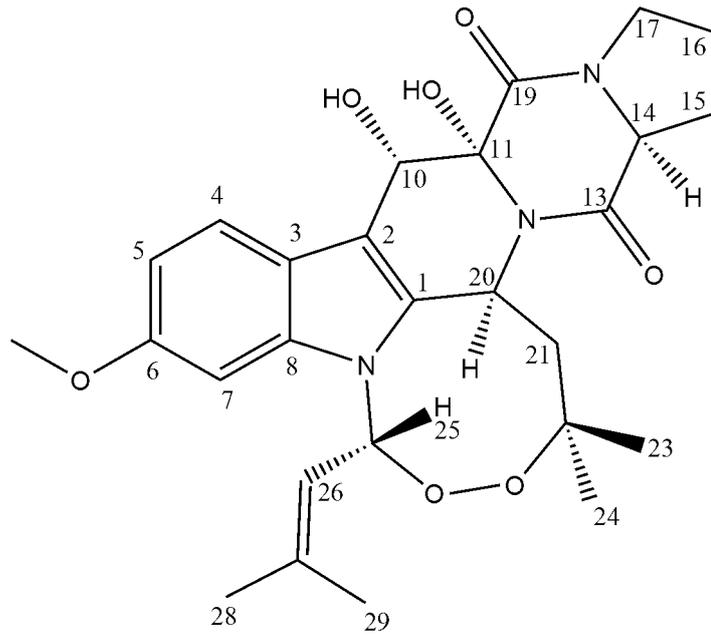


FIGURA 5.12 – Estrutura molecular da substância verruculogenina

5.2.2.2 – Caracterização da substância brevianamida F

O alcaloide brevianamida F foi isolado a partir dos extratos de acetato de etila de Q1 e Q3. Seu espectro de RMN de ^1H está mostrado na FIGURA 5.13 e sua estrutura molecular na FIGURA 5.14.

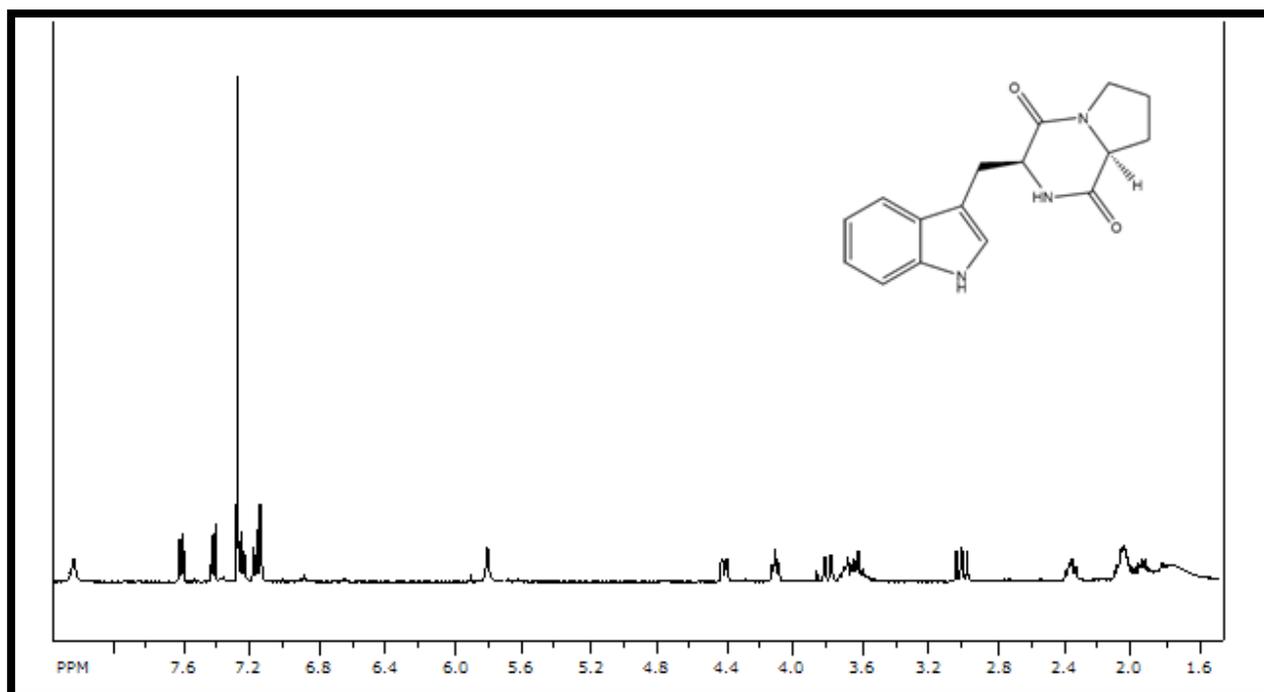


FIGURA 5.13 – Espectro de RMN de ^1H para a dicetopiperazina brevipamida F (CDCl_3 , 400 MHz)

Através de comparação com dados da literatura (GRUNDMANN e LI, 2005) pôde-se determinar a estrutura referente ao espectro mostrado na FIGURA 5.13 como sendo a brevipamida F. Os dados seguem sumarizados na tabela a seguir.

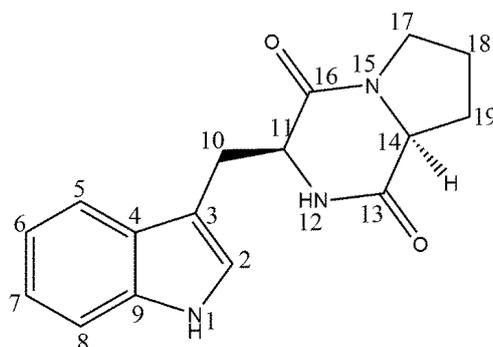


FIGURA 5.14 – Estrutura molecular da substância brevipamida F

TABELA 5.2 – Dados de deslocamento químico de ^1H para a substância brevipamida F

Posição	δ (ppm) e multiplicidade – observado	δ (ppm) e multiplicidade - literatura
1	8,25 (sl)	8,15 (sl)
2	7,14 (d)	7,10 (d)
5	7,61 (d)	7,57 (d)

6	7,18 (td)	7,14 (td)
7	7,25 (td)	7,22 (td)
8	7,42 (d)	7,38 (d)
10	2,99 (dd)	2,95 (dd)
	3,78 (ddd)	3,75 (ddd)
11	4,41 (dd)	4,63 (dd)
12	5,80 (sl)	5,68 (sl)
14	4,09 (t)	4,06 (t)
17	3,64 (m)	3,63 (m)
18	1,94, m	1,91, m
19	2,35 (m)	2,30 (m)
	2,04 (m)	1,99 (m)

A brevianamida F é um alcaloide pertencente à rota biossintética da verruculogenina (LI, 2011). Ele é formado pela reação entre uma molécula de triptofano e uma de prolina através de uma reação de substituição nucleofílica carboxílica, em que o nitrogênio de um aminoácido faz um ataque nucleofílico à carboxila de outro aminoácido, levando à formação de uma ligação peptídica.

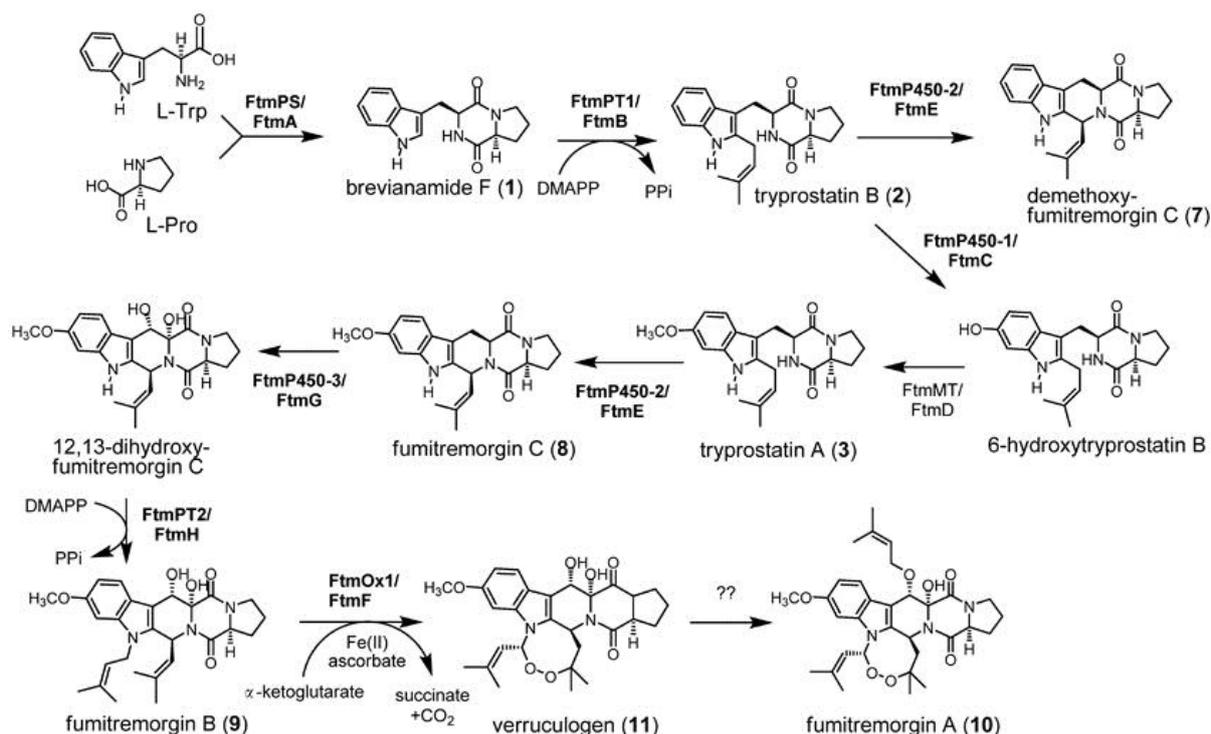


FIGURA 5.15 – Biossíntese da verruculogenina em ascomicetos (retirado de LI (2011))

Até o momento, não existem relatos desta substância para o fungo *P. brasilianum*, sendo este o primeiro relato.

5.2.2.3 – Caracterização do alcaloide 12,13-dihidroxi-fumitremorgina C

A substância isolada a partir dos extratos de acetato de Q5 apresentou um espectro de RMN de ^1H (FIGURA 5.16) muito semelhante àquele pertencente a substância 12,13-dihidroxi-fumitremorgina C (FIGURA 5.17).

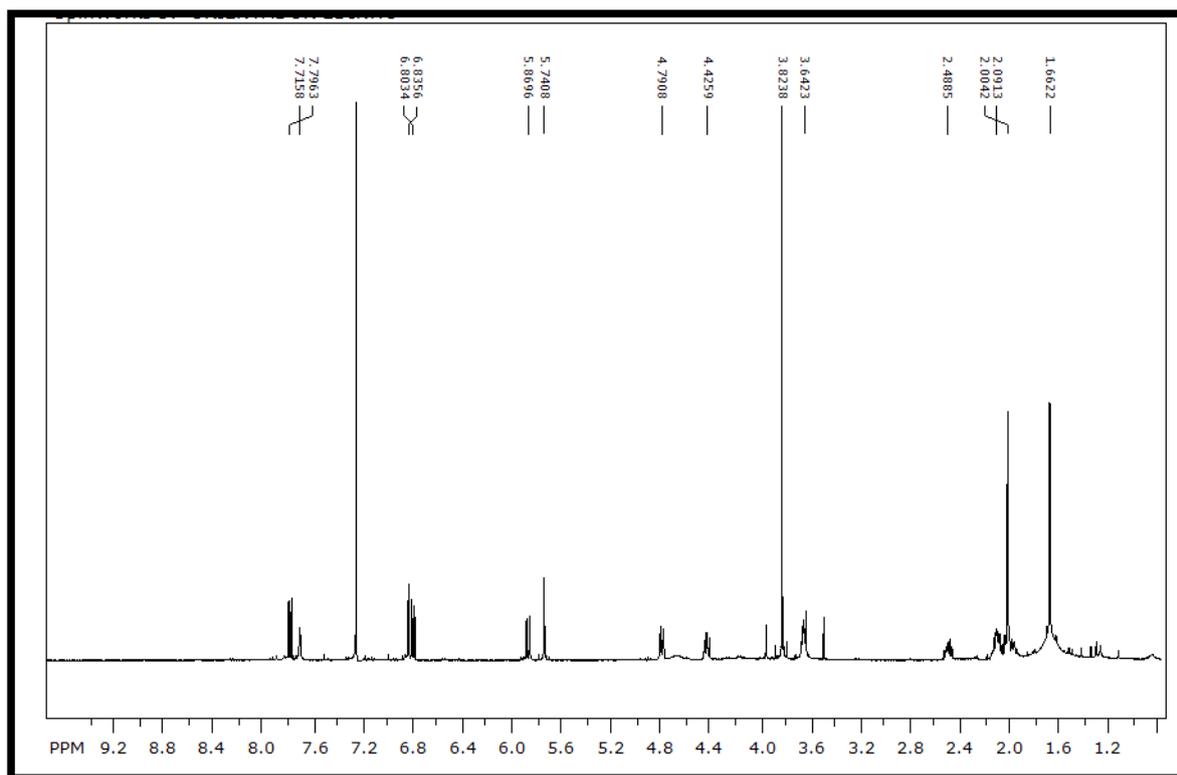


FIGURA 5.16 – Espectro de RMN de ^1H para a substância 12,13-dihidroxi-fumitremorgina C (400 MHz, CDCl_3)

A análise comparativa dos dados obtidos com os dados da literatura (TABELA 5.3) (ABRAHAM e ARFMANN, 1990) confirmou que o composto é a micotoxina 12,13-dihidroxi-fumitremorgina C, um metabólito secundário ainda não reportado para o micro-organismo em estudo.

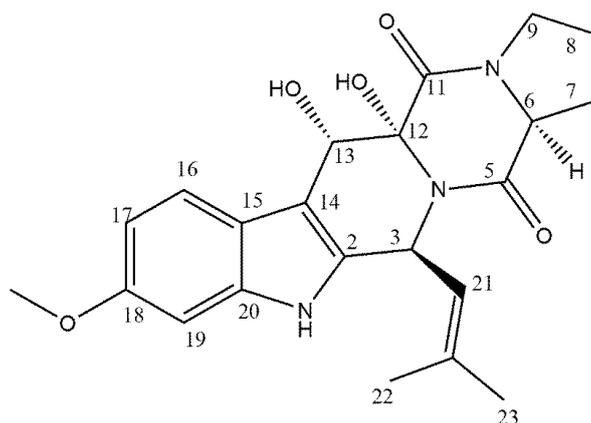


FIGURA 5.17 – Estrutura molecular da substância 12,13-dihidroxi-fumitremorgina C

TABELA 5.3 – Dados de deslocamento químico de ^1H (δ em ppm) para a substância 12,13-dihidroxi-fumitremorgina C

Posição	δ (ppm) e multiplicidade - observado	δ (ppm) e multiplicidade - literatura
1	7,68 (s)	-
3	5,86 (dd)	5,85 (dd)
6	4,42 (dd)	4,41 (dd)
7	2,48 (m)	2,47 (m)
7'	2,16 (m)	2,10 (m)
8	2,16 (m)	2,10 (m)
8'	1,95 (m)	2,00 (m)
9	3,64 (m)	3,63 (m)
13	5,74 (d)	5,73 (d)
16	7,79 (d)	7,78 (d)
17	6,80 (dd)	6,79 (dd)
19	6,84 (d)	6,82 (d)
21	4,79(dq)	4,78(dqq)
23	2,00 (d)	2,00 (d)
24	1,66 (d)	1,66 (d)
25	3,82 (s)	3,82 (s)

A 12,13-dihidroxi-fumitremorgina C (FIGURA 5.17) também é um dos intermediários biossintéticos da rota da verruculogenina. Como seu próprio nome diz, este alcaloide afeta o sistema nervoso central, causando tremores.

5.2.2.4 – Caracterização da substância ácido penicílico

Outro metabólito secundário foi isolado a partir das frações obtidas no item 3.5.2 e analisado por RMN ^1H . Os dados foram comparados com os dados da literatura. O espectro de RMN ^1H obtido segue mostrado na figura abaixo.

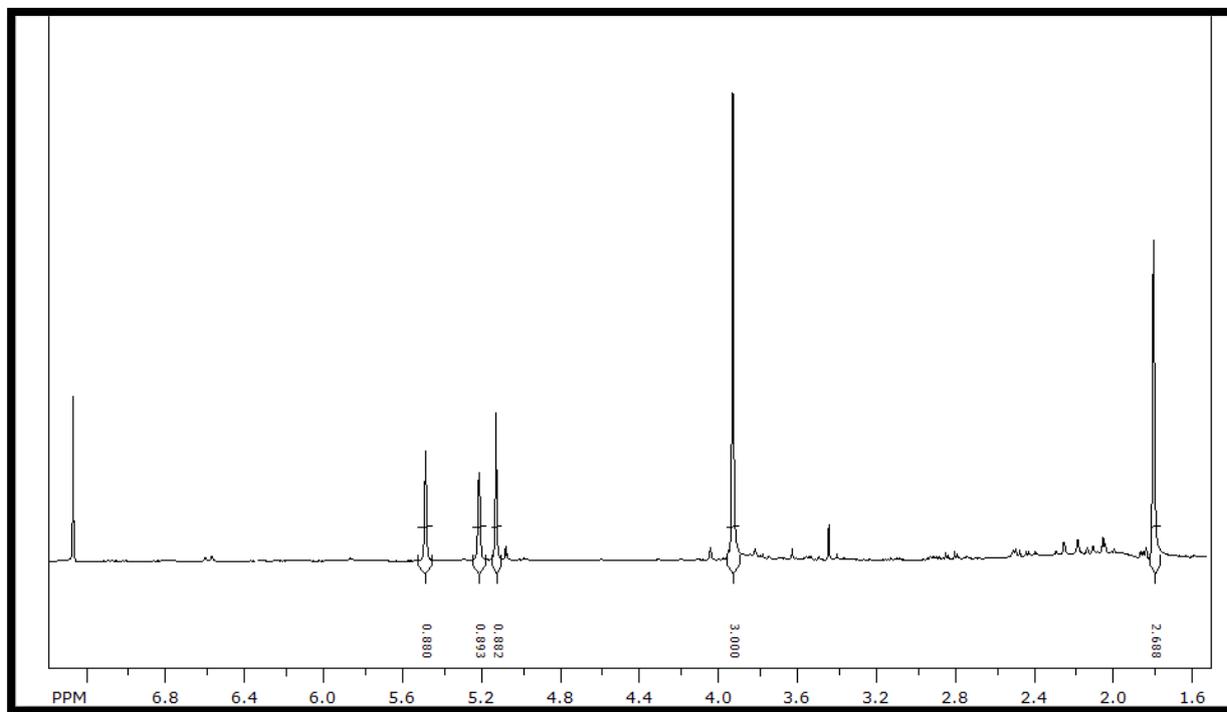


FIGURA 5.18 – Espectro de RMN ^1H obtido para o ácido penicílico (400 MHz, CDCl_3)

A análise comparativa dos dados obtidos com os dados da literatura (TABELA 5.4) indicou que o composto é uma micotoxina e pôde ser identificado como o composto ácido penicílico (ácido 3-metoxi-5metil-4-oxo-2,5-hexadienóico em equilíbrio tautomérico com a sua lactona), um metabólito secundário também isolado de *P. brasilianum* em estudos anteriores por SANTOS (2003).

TABELA 5.4 – Dados de deslocamento químico de ^1H (δ em ppm) para o metabólito ácido penicílico

Posição	δ (ppm) e multiplicidade - observado	δ (ppm) e multiplicidade - literatura
2		
3	5,49 (s)	5,49 (s)
4		
5		
6		
7	5,13 (s)	5,11 (s)
	5,13 (s)	5,11 (s)

6-Me	1,79 (s)	1,75 (s)
O-Me	3,93 (s)	3,89 (s)
OH	5,22 (sl)	5,22 (sl)

O ácido penicílico foi isolado inicialmente em 1913 de *P. puberillum*, e é um produto natural com atividade carcinogênica (COLE e COX), que apresenta também atividade antibiótica e anti-HIV. A estrutura molecular do ácido penicílico pode ser observada na FIGURA 5.19 abaixo.

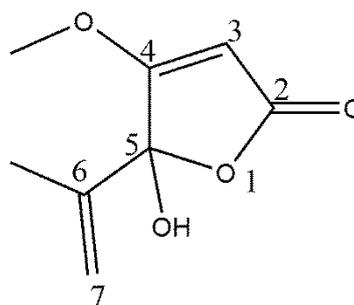


FIGURA 5.19 – Estrutura molecular do ácido penicílico

5.3 – Experimento de biotransformação utilizando células residuais

Tendo em vista que o experimento utilizando-se células em crescimento gerou apenas um produto de biotransformação passível de ser elucidado através de técnicas espectroscópicas, decidiu-se utilizar uma nova abordagem. Tal abordagem foi primeiro testada a fim de estabelecer protocolos para realização dos experimentos. Primeiramente, realizou-se um ensaio em diferentes tampões (fosfato e tris-HCl) em dois pH distintos a fim de observar se haveria diferença entre estes. Isto é, se alguma das variáveis influenciara na quantidade (em massa e em número de compostos) de produtos de biotransformação.

A escolha dos tampões foi feita baseado nos reagentes contidos no laboratório para preparo do mesmo. Já a escolha do pH foi feita baseada em pesquisa literária. Dado que um dos objetivos consistia em avaliar a enantiosseletividade dos processos enzimáticos na redução da olefina do sistema α,β -insaturado, escolheu-se tais pH baseado no pH ótimo das possíveis enzimas que catalisam esse tipo de

processo, como por exemplo, enzimas do tipo enoato redutase. (CHAPARRO-RIGGERS et al., 2007; LIU et al., 2012).

Diferentemente da primeira abordagem, neste caso, utilizar células residuais gerou resultados satisfatórios. Este tipo de abordagem mostrou-se bastante viável, uma vez que a presença de metabólitos secundários é bastante diminuída, facilitando o isolamento dos produtos de biotransformação.

5.3.1 – Ensaio com tampões fosfato 10 mM e tris-HCl em dois pH distintos (7,2 e 8,5) utilizando-se Q1 como substrato

Os extratos obtidos a partir dos diferentes ensaios realizados foram analisados por CLAE-UV a fim de verificar possíveis diferenças no perfil cromatográfico. Os cromatogramas obtidos seguem mostrados na figura abaixo.

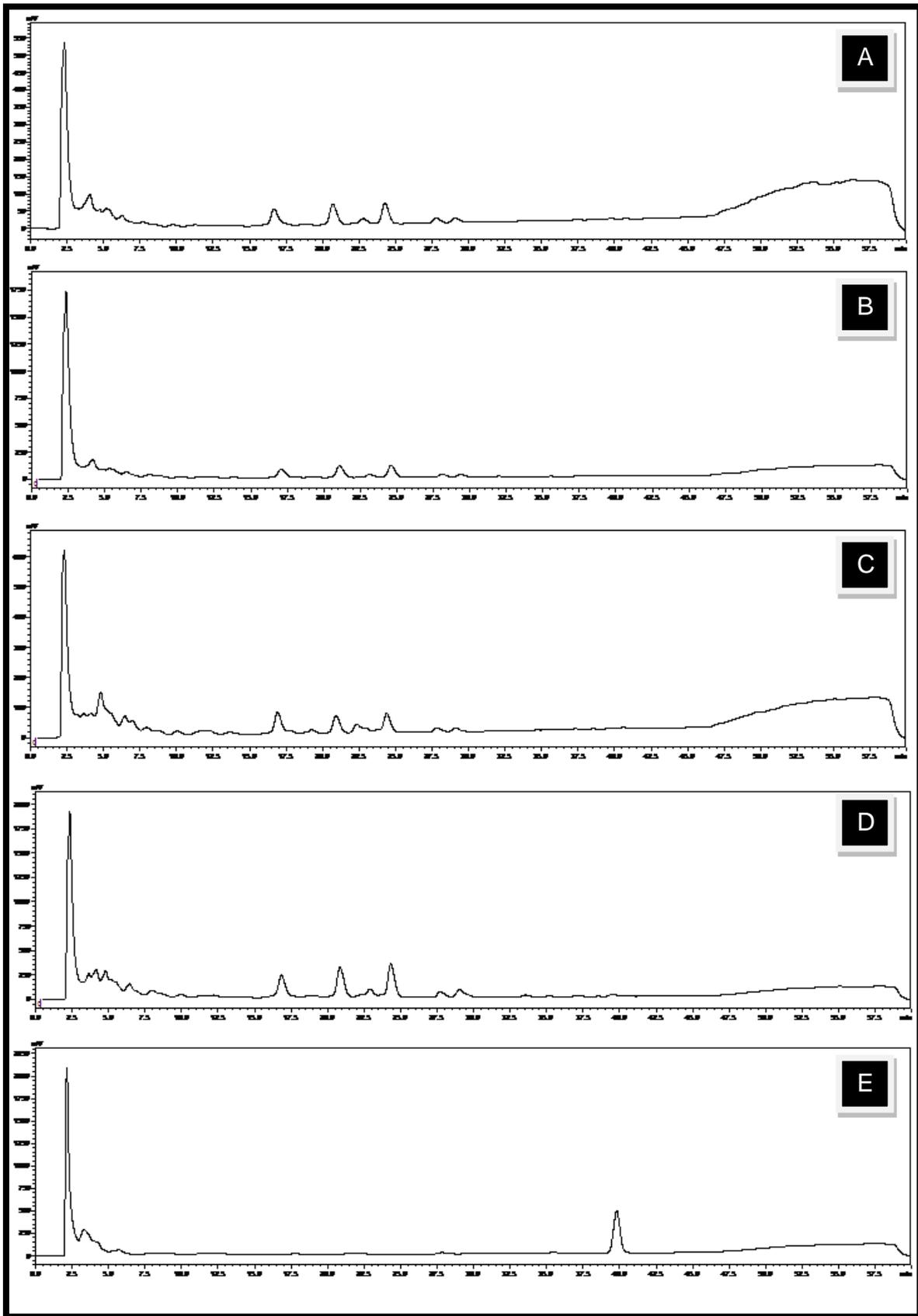


FIGURA 5.20 – Cromatogramas dos extratos de acetato do ensaio do experimento de células residuais em que A) tampão fosfato pH = 7,2, B) tampão fosfato pH = 8,4, C) tampão tris-HCl pH = 7,2 e D) tampão tris-HCl pH = 8,4.

Como pode-se notar, não houve diferença significativa entre os perfis cromatográficos para cada tipo de experimento. Assim sendo, por maior robustez, adotou-se o tampão fosfato pH 7,2 (10 mM) como tampão a ser utilizado para realizar os experimentos em larga escala.

5.3.2 – Biotransformação de Q1, Q2, Q3, Q4, Q5 por *P. brasilianum* utilizando-se o protocolo de células residuais

As biotransformações com os substratos Q1 – Q5 geraram produtos de biotransformações diversos: redução da dupla conjugada, redução de carbonila, epoxidação, oxidação de metila à álcool e éter.

Dentre os produtos obtidos, destacam-se aqueles referentes à redução da olefina do sistema α,β - insaturado. Como citado na seção 0, é conhecido que o fungo *P. brasilianum* possui um sistema enzimático capaz de realizar reações de oxidação. No entanto, não há estudos reportados na literatura do seu potencial em realizar reações de redução C=C. Assim, através de nossos estudos, pudemos comprovar a habilidade do micro-organismo em realizar reações de redução e oxidação.

Os produtos de biotransformação obtidos foram caracterizados por RMN (uni- e bidimensional). Além disso, fez-se análises de rotação ótica, análise por espectrometria de massas de alta resolução, cromatografia quiral e experimentos NOEDIFF para determinação das configurações dos centros estereogênicos. Os resultados de todas as análises estão descritos nas próximas seções.

A identificação dos produtos por RMN se fez por comparação com o substrato (material de partida a ser biotransformado).

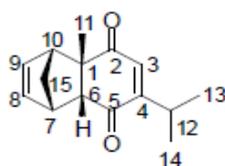
Todos os produtos foram submetidos a análise por cromatografia quiral, espectrometria de massas de alta resolução e rotação ótica.

5.3.2.1– Biotransformação de Q1 por células residuais de *P. brasilianum*

O experimento de biotransformação de Q1 por células residuais gerou um extrato de acetato de etila cuja massa era 337,1 mg. Após ser submetido à análise por CLAE-UV, este foi submetido ao isolamento por CLAE preparativo.

No total foram isolados quatro compostos, dos quais dois eram produtos de biotransformação (Q1A_CR_16 e Q1A_CR_26) e os outros dois, metabólitos secundários já isolados anteriormente: verruculogenina e ácido penicílico. A identificação dos produtos foi feita em comparação com os dados do substrato Q1 (TABELA 5.5).

TABELA 5.5 – Dados de RMN (^{13}C e ^1H) de Q1



Nº (H e C)	^{13}C - δ (ppm)	^1H - δ (ppm); multiplicidade; integral e J (Hz)
1	52,7	---
2	199,3	---
3	135,9	6,36; d; 1H; 1,2
4	160,2	---
5	203,4	---
6	57,4	2,84; d; 1H; 3,8
7	49,4	3,39-3,44; m; 1H
8	134,1	5,94; dd; 1H; $J_1=5,5$ e $J_2=2,7$
9	138,0	6,11; dd; 1H; $J_1=5,4$ e $J_2=2,9$
10	53,6	3,04-3,08; m; 1H
11	26,2	1,45; s; 3H
12	26,5	2,99; dtd; 1H; $J_1=13,8$, $J_2=6,8$ e $J_3=0,8$
13	20,8	1,06; d; 3H; 6,8
14	21,4	1,02; d; 3H; 6,9
15	46,4	1,68; dt; 1H; $J_1=9,6$ e $J_2=1,2$
15	46,4	1,53; dt; 1H; $J_1=8,8$ e $J_2=1,6$

5.3.2.1.1 – Substância Q1A_CR_16

O produto de biotransformação Q1A_CR_16 ($[\alpha]_D^{30} = -34,2^\circ$) foi isolado numa quantidade de 7,7 mg, o que representa um rendimento de 2,75%. A análise por espectrometria de massas de alta resolução resultou em um íon em m/z 247,1337 ($[M+H]^+$), que corresponde a fórmula $C_{15}H_{18}O_3$ (calculado: 246,1256 Da). Em comparação com o substrato ($C_{15}H_{18}O_2$), o produto possui um átomo de oxigênio a mais, porém o mesmo grau de insaturação (7), o que nos levou a crer que este se tratava de um produto de oxidação de Baeyer-Villiger. No entanto, tal hipótese foi descartada ao analisar o espectro de ^{13}C , uma vez que não houve alteração significativa no deslocamento químico das carbonilas (~200 ppm) para deslocamento típicos de carboxilas de ésteres (180 ppm).

Assim em comparação com Q1 (FIGURA 5.21), pelo espectro de 1H , observou-se o aparecimento de um sinal em 4,16 ppm (t; 1,81Hz) típico de hidrogênio carbinólico e o desaparecimento dos sinais olefínicos em 5,94 e 6,11 ppm evidenciando uma modificação estrutural na dupla não conjugada do dieno. Além disso, pelos espectros de ^{13}C e HSQC foi possível observar a presença de dois carbonos quaternários em δ_c 41,5 e 55,7, que dois carbonos olefínicos em δ_c 133,6 δ_c 160,8, um metileno em δ_c 27,1 (δ_H 1,81 e 2,09), três grupos metínicos em 20,3 (δ_H 2,55), 34,5 (δ_H 1,72) e 43,5 ppm (δ_H 2,33); um carbono carbinólico em δ_c 73,8; (δ_H 4,16), e dois carbonos carbonílicos em δ_c 193,5 e 203,9.

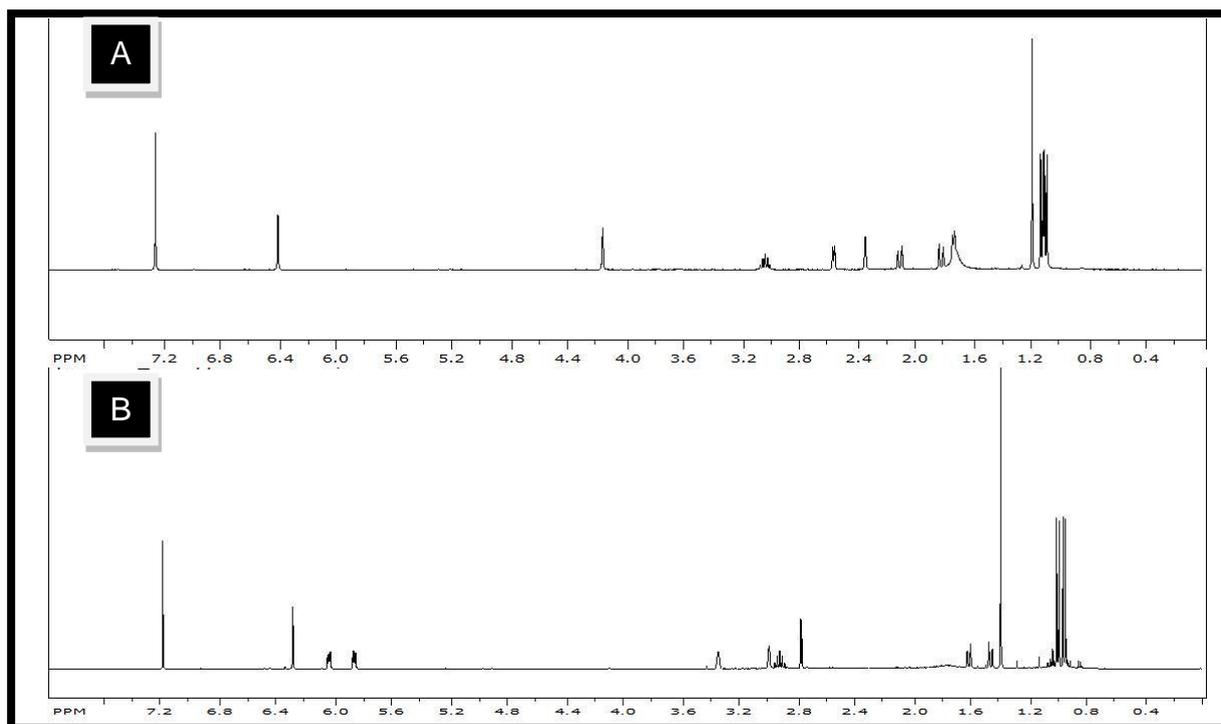


FIGURA 5.21 – Espectros de ^1H RMN de A) Q1A_CR_16 e B) substrato Q1. (CDCl_3 , 400 MHz)

O espectro de COSY mostrou correlações entre os hidrogênios 6,40 e 3,03 ppm; 3,03 e 1,08, 1,11 e 6,40 ppm – indicando um sistema isopropílico ligado à dupla ligação. Através dos espectros de HMBC foi possível observar as seguintes correlações ^1H - ^{13}C : hidrogênio olefínico em 6,40 ppm com os carbonos 26,7; 43,5; 55,7; 160,8 e 193,5; hidrogênio metínico em 3,03 e os carbonos 21,2, 21,60; 133,6; 160,8 e 193,5; hidrogênios isopropílicos em 1,08 e 1,11 e os carbonos 41,5; 43,5; 55,7; 202,91 e hidrogênios metílicos 1,18 com os carbonos 41,5, 43,5; 55,7 e 202,9 - permitindo assim fechar o primeiro sistema de spin, como mostrado na FIGURA 5.22.

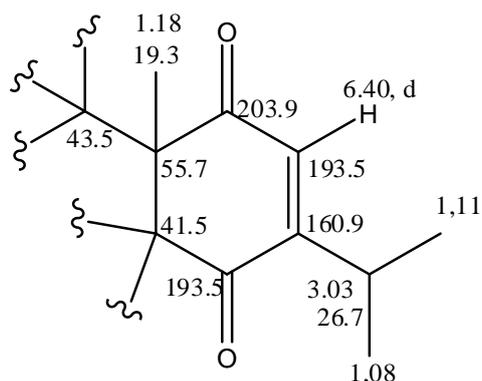


FIGURA 5.22 – Estrutura parcial da substância Q1A_CR_16

Novamente, pelos espectros de COSY foi possível observar os acoplamentos ^1H - ^1H dos seguintes hidrogênios: metilênico em 1,81 ppm com os hidrogênios 2,09; 2,33 e 2,55 ppm, metilênico em 2,09 ppm com o hidrogênio 1,81 ppm, metínico em 2,33 ppm com os hidrogênios 1,72; 2,09 e 4,16 ppm, metínico em 2,55 ppm com os hidrogênios 1,72 e 2,09 ppm, metínico em 1,72 ppm com os hidrogênios 2,33; 2,55 e 4,16; metínico em 4,16 ppm com os hidrogênios 1,72 e 2,33. Assim, uma nova estrutura parcial pôde ser proposta:

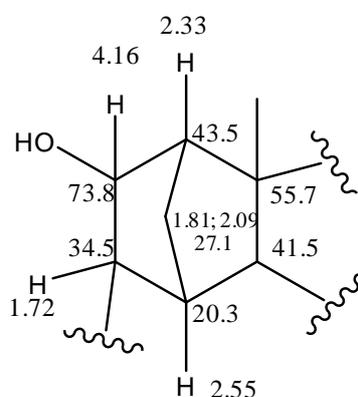


FIGURA 5.23 – Segunda parte da estrutura parcial de Q1A_CR_16

Como dito anteriormente, sabe-se que o carbono δ_c 41,5 é um carbono quaternário e o carbono em δ_c 34,5 possui apenas um hidrogênio. Então, para que estes os carbonos tenham sua valência completa, é necessário que haja uma ligação entre eles. Assim, a estrutura proposta para Q1A_CR_16 segue mostrada na figura a seguir.

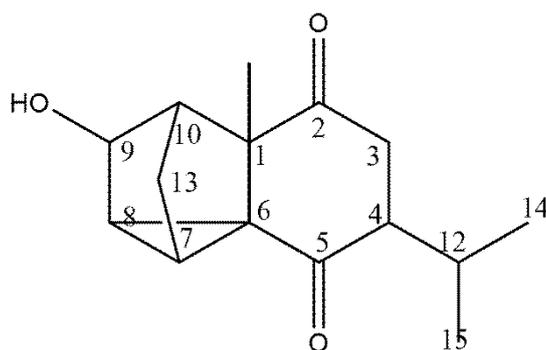


FIGURA 5.24 – Estrutura molecular de Q1A_CR_16

Os dados de RMN obtidos para Q1A_CR_ 16 estão resumidos na TABELA 5.6.

TABELA 5.6 – Dados de RMN obtidos para a substância Q1A_CR_16

N°	¹ H (ppm),l nt.	Mult, J (Hz)	¹³ C	COSY	HMBC
1			55,7		
2			203,9		
3	6,40, 1H	d; 1,05	133,6	3,03	26,69/43,47/55,7/160,80/193,46
4			160,8		
5			193,5		
6			41,5		
7	2,55, 1H	d; 5,17	20,3	1,72; 2,09 2,33;	26,69/27,13/41,54/43,47/55,71/7 3,82/193,46
8	1,72, 1H	dt; 5,17 e 1,40	34,5	2,55 4,16;	26,69/43,47/55,71 /73,82/193,46
9	4,16, 1H	t; 1,80	73,8	1,72; 2,33 1,72;	20,34/27,13
10	2,33, 1H	m	43,5	2,09; 4,16	20,34/34,55/41,54
11	1,18, 3H	s	19,3	-	41,54/43,47/55,71/202,91
12	1,08, 3H	d; 6,83	21,2	3,03	21,22/21,60/26,69/160,80
13	1,11, 3H	d; 6,83	21,6	3,03	21,22/21,60/26,69/160,80
14	3,03, 1H	septd; 6,80 e 1,05	26,7	1,09; 1,11; 6,40	21,22/21,60/133,64/160,80/193, 46

15	1,81, 1H	dt; 11,5 e 1,40	27,1	2,09; 2,33; 2,55	20,34/34,55/41,54/43,47/55,71/7 3,82
	2,09, 1H	dt; 11,5 e 1,40	27,1	1,81	20,34/34,55/41,54/43,47/55,71/7 3,82

Para determinar a configuração do novo centro quiral gerado, a amostra foi submetida a análises por NOE-diff. A irradiação de H-15 (1,81 ppm) ocasionou aumento da intensidade do sinal de H-11, indicando que eles possuem configuração *cis*. A irradiação de H-9 não mostrou acoplamento espacial com H-11 ou H-15, o que levou a estabelecer sua posição em equatorial (FIGURA 5.26A). Desta forma, propõe-se a estrutura abaixo como sendo referente a substância Q1A_CR_16:

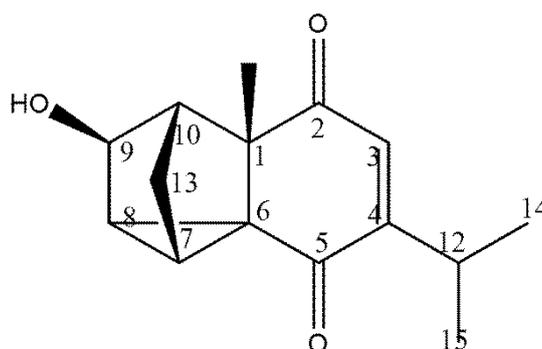


Figura 5.25 – Substância Q1A_CR_16

Fez-se também a otimização estrutural utilizando o nível de teoria B3LYP/6-31+G(d,p). Foram calculadas as frequências vibracionais no mesmo nível de teoria e não foram observados valores negativos de frequência, caracterizando a estrutura como mínimo local.

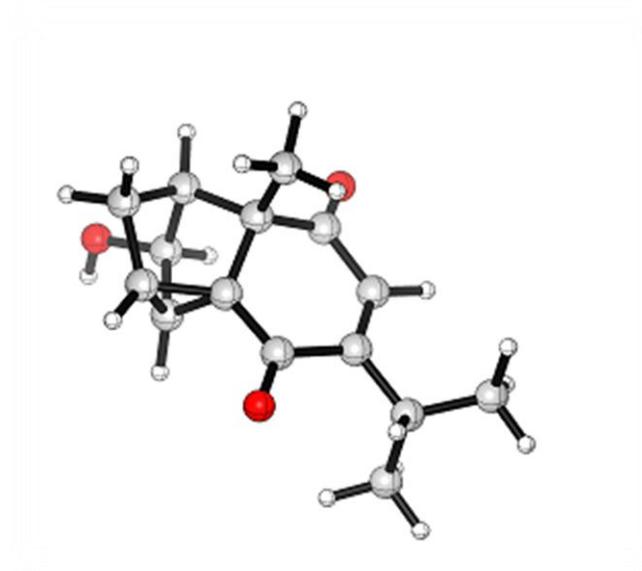


FIGURA 5.26 – Representação das estruturas de Q1A_CR_16 otimizada por simulação computacional

5.3.2.1.2 – Substância Q1A_CR_26

A substância Q1A_CR_26 ($[\alpha]_D^{30} = +23,8^\circ$) foi isolada numa quantidade de 0,5 mg, o que dificultou a aquisição de dados espectroscópicos. Através dos dados de ^1H RMN foi possível observar a ausência de sinais olefínicos presentes no substrato, indicando a completa redução das duplas ligações conjugada e não-conjugada. Além disso, foi observado o aparecimento de sinais em regiões de alcanos saturados (2 – 3 ppm), confirmando assim a completa redução do sistema olefínico.

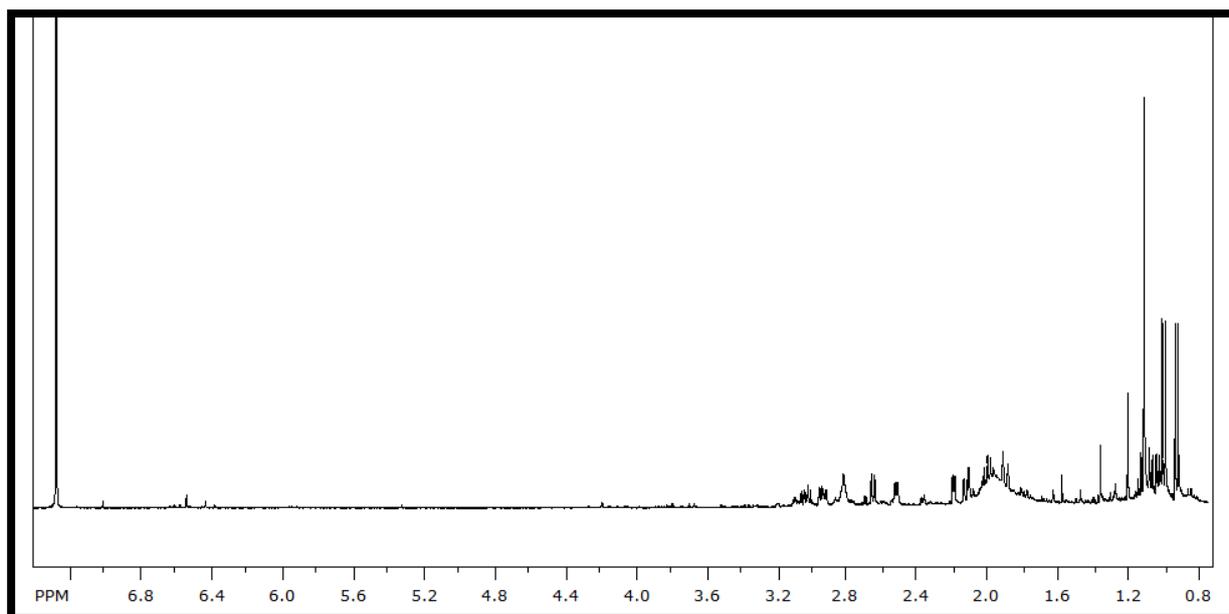


Figura 5.27 – Espectro de ^1H da substância Q1A_CR_26 (400 MHz, CDCl_3)

O espectro de COSY revelou correlações entre o hidrogênio metínico em 1,97 e as metilas 0,90, 0,97 ppm, indicando a presença do sistema isopropílico. Através dos espectros de HMBC e HSQC foi possível aferir a presença de 2 carbonilas e 2 carbonos quaternários na molécula, sendo que um destes era um carbono quaternário adicional na molécula (δ_c 56,5) quando comparado ao substrato Q1 que correlacionava-se com os hidrogênios em 0,90; 0,97 e 2,62 ppm, indicando alguma transformação no carbono α -carbonílico (C-4).

Também pelo espectro de COSY foi possível observar correlações entre o hidrogênio 2,17 e os hidrogênios 2,80 e 1,87/2,10 ppm. Além destas, observou-se correlações entre os hidrogênios em 2,49, 3,00 e 2,62 ppm.

.Embora todos os experimentos bidimensionais tenham sido realizados, o experimento de HMBC não forneceu dados relevantes para a elucidação estrutural completa de Q1A_CR_26 pois muitos acoplamentos ^1H - ^{13}C não puderam ser observados (vide tabela abaixo). Além disso, não foi possível realizar a atribuição dos sinais com infabilidade.

Tabela 5.7 – Dados de RMN obtidos para a substância Q1A_CR_26

Posição	¹ H (ppm),Int.	Mult, J (Hz)	¹³ C	COSY	HMBC
1			58,8		
3	2,90, 2H	m	40,2	2,80	?
4			56,5		
6	2,62, 1H	dd, 1,27; 6,80	45,5	3,00	26,9; 56,5; 58,8
7	3,00, 1H	m	35,4	2,49; 2,62	?
8	2,49, 1H	m	50,1	3,00	40,2; 63,4
9	2,80, 2H(?)	m	43,5	2,17	?
10	2,17, 1H	dd, 1,75; 4,24	63,4	2,80	39,7; 58,8
11	1,09, 3H	s	16,8		26,9; 50,1; 58,8; 63,4; 214,8
12	1,97, 1H	m	26,9	0,90; 0,97	17,1
13	0,90, 3H	d, 6,80	17,1	1,97	16,8; 17,2; 26,9; 56,5
14	0,97, 3H	d, 6,80	17,1	1,97	16,8; 17,2; 26,9; 56,5
15	2,10, 1H	dt, 1,55; 11,2	39,7	2,10; 2,17	35,4; 40,2; 39,7; 50,1
15	1,87, 1H	dt, 1,55; 11,2	39,7	2,10; 2,17	39,7; 58,8; 63,4
?			214,8		
?			213,9		

Como o carbono C-8 possuía apenas um hidrogênio e o carbono C-4 consistia em um carbono quaternário, a presença de uma ligação simples entre estes poderia explicar tais dados. Baseando-se nos dados obtidos, propõe-se a seguinte estrutura parcial Q1A_CR_26:

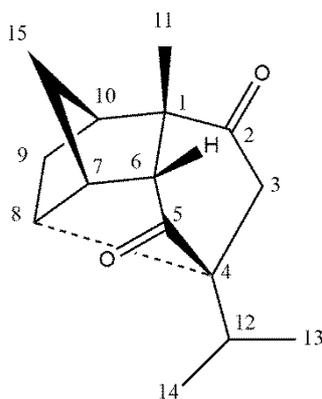


Figura 5.28 – Estrutura parcial da substância Q1A_CR_26

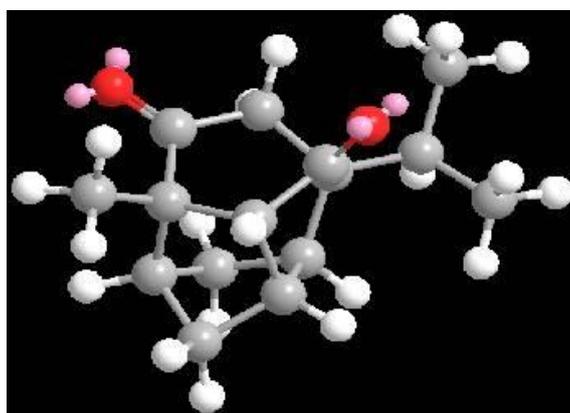
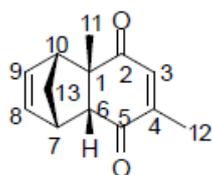


Figura 5.29 - Estrutura tridimensional da substância Q1A_CR_26

Assim sendo, maiores quantidades deste produto de biotransformação necessitam ser isoladas para que se possa realizar a elucidação completa da mesma.

5.3.2.2– Biotransformação de Q2 por células residuais de *P. brasilianum*

A biotransformação de Q2 por células residuais levou ao isolamento de quatro produtos de biotransformação, sendo que destes, dois encontram-se em mistura. Os produtos foram caracterizados por RMN e comparados com os dados do substrato Q2. A descrição dos dados encontra-se nos itens a seguir.

TABELA 5.8 – Dados de RMN (^{13}C e ^1H) de Q2

Nº (H e C)	$^{13}\text{C}-\delta$ (ppm)	$^1\text{H}-\delta$ (ppm); multiplicidade; integral e J (Hz)
1	53,2	---
2	200,0	---
3	138,2	6,45; q; 1H; 1,4
4	151,0	---
5	202,8	---
6	57,0	2,83; d; 1H; 3,9
7	49,3	3,40-3,44; m; 1H
8	134,3	5,96; dd; 1H; $J_1= 5,7$ e $J_2= 2,8$
9	139,2	6,12; dd; 1H; $J_1= 5,7$ e $J_2= 2,9$
10	53,5	3,05-3,08; m; 1H
11	26,3	1,45; s; 3H
12	16,1	1,93; d; 1H; 1,4
13	46,3	1,67; dt; 1H; $J_1= 9,1$ e $J_2= 1,4$
13	46,3	1,53; dt; 1H; $J_1= 9,1$ e $J_2= 1,8$

5.3.2.2.1 – Substância Q2A_CR_5

A substância Q2A_CR_5 ($[\alpha]_D^{30} = -23,4^\circ$) foi obtida como um óleo amarelo (3,4 mg, R= 1,01%). A análise por HRMS forneceu um íon *quase* molecular $[\text{M}+\text{H}]^+$ em m/z 221,11669, correspondente a fórmula molecular $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{O}_3$, indicando a incorporação de um átomo de oxigênio e dois átomos de hidrogênio (redução).

Por sua vez, o espectro de ^1H RMN para a substância Q2A_CR_5 (FIGURA 5.30) não apresentou sinais de hidrogênios olefínicos, indicando a ausência das duplas ligações. Além disso, também foi observado o aparecimento de um hidrogênio carbinólico em δ 4,04 (t, $J = 1,7$ Hz) e um sinal em δ 2,89 (sepd, $J = 1,4$ e 6,6 Hz).

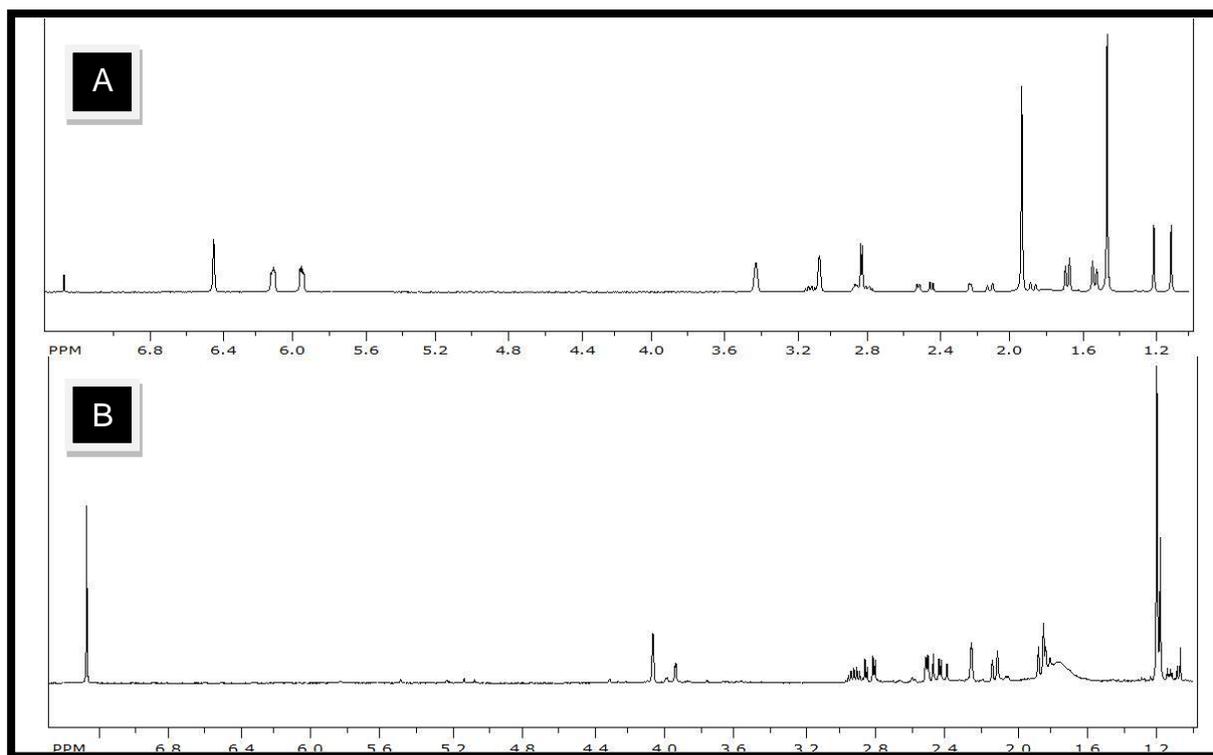


FIGURA 5.30 – Espectros de ^1H RMN de A) substrato Q2 e B) Q2A_CR_5. (CDCl_3 , 400 MHz)

Os espectros de ^{13}C HSQC confirmaram a ausência das olefinas e indicaram a presença de dois grupos metilênicos em δ_c 47,1 (δ_H 2,40 e 2,80) e δ_c 28,0 (δ_H 1,83 e δ 2,23); quatro grupos metínicos em δ_c 21,0 (δ_H 2,48), 34,9 (δ_H 1,80), 41,9 (δ_H 2,89) e 44,9 (δ_H 2,23); um carbono carbinólico em δ_c 73,4; dois carbonos quaternários em δ_c 40,7 e 54,5 e duas carbonilas em δ_c 207,5 e 211,4.

Como os perfis espectrais para esta substância é muito semelhante àquele observado para Q1A_CR_16 (exceto pela ausência da ligação $\text{C}=\text{C}$ do sistema α,β -insaturado), logo levantou-se a hipótese de que esse produto teria as mesmas características daquele com que foi comparado. Assim, buscou-se pelos “sinais-chaves” a fim de que se pudesse fazer a sua determinação estrutural.

Através do espectro de COSY, foi possível observar a correlações dos hidrogênios metílicos em 1,16 ppm com um hidrogênio em 2,89 ppm, confirmando a redução da dupla ligação. O hidrogênio em 2,89 ppm mostrou correlações com os hidrogênio em 2,40 e 2,80 ppm, fechando-se assim o sistema enodiona.

A posição das carbonilas foi definido pelo acoplamento ^{13}C - ^1H no espectro de HMBC dos hidrogênios metilênicos 1,16 ppm com o carbono em 211,5 ppm e 1,17 ppm com o carbono em 207,5 ppm.

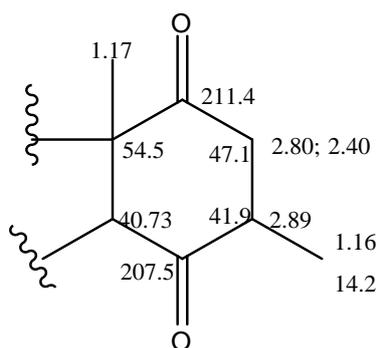


FIGURA 5.31 – Estrutura parcial da substância Q2A_CR_5

Também observou-se correlações do hidrogênio metilênico em δ 1,83 com os hidrogênios em δ 2,09, 2,48, 2,23 e do hidrogênio δ 2,23 com o hidrogênio em δ 1,83. Além disso, o tripleto δ 4,04 mostrou correlações com os hidrogênios em δ 1,80 e δ 2,23. Por sua vez, os hidrogênios em δ 2,23 e 2,48 mostraram correlações ^1H - ^1H com os hidrogênios δ 2,09, 2,48, 2,23; e 1,80, 2,23, respectivamente. Novamente, a fim de completar as 4 ligações para todos os carbonos, foi necessário que houvesse uma ligação entre os carbonos δ 35,0 (1,80) e δ 40,7.

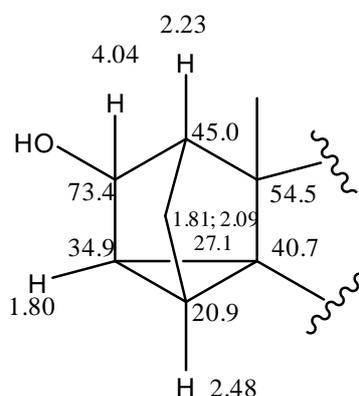


FIGURA 5.32 – Segunda parte da estrutura parcial de Q2A_CR_5

Assim, a estrutura proposta para essa substância é aquela mostrada na figura abaixo.

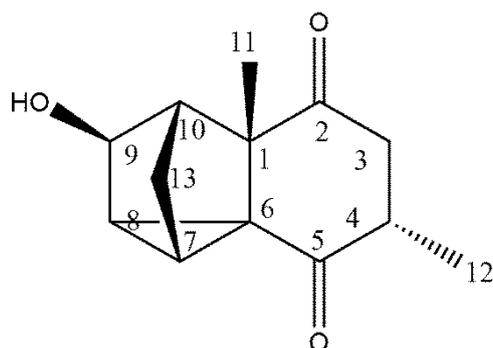


FIGURA 5.33 – Estrutura molecular da substância Q2A_CR_5

Os dados de RMN estão sumarizados na TABELA 5.9.

TABELA 5.9 – Dados de RMN obtidos para a substância Q2A_CR_5

N°	¹ H (ppm),Int	Mult, J (Hz)	¹³ C	COSY	HMBC
1			54,5		
2			211,5		
3	2,40, 1H	dd; 13,28; 17,85	47,1	2,80	14,2; 41,9; 207,5 (fraco); 211,4
	2,80, 1H	dd; 5,23; 18,59	47,1	2,89	41,9; 54,5; 207,5; 211,4
4	2,89, 1H	sepd; 1,37; 6,65	41,9	1,16; 2,40	14,2; 47,1; 207,5
5			207,5		
6			40,7		
7	2,48, 1H	dq; 5,23; 0,88	21,0	1,80; 2,23	28,0; 44,9
8	1,80, 1H	dt; 1,36; 5,56	34,9	2,48; 4,04	28,0; 44,9; 207,5(fraco)
9	4,04, 1H	t; 1,70	73,4	1,80; 2,23	21,0; 28,0
10	2,23, 1H	m	44,9	4,04	21,0; 34,9; 40,7
11	1,17, 3H	s	17,4		40,7; 54,5; 211,4; 44,9
12	1,16, 3H	d; 6,67	14,2	2,89 2,09; 2,48;	41,9; 47,1; 207,5
13	1,83, 1H	dt; 1,26; 11,55	28,0	2,23	21,0; 34,9; 73,4
	2,09, 1H	dt; 1,34; 11,47	28,0	1,83	21,0; 40,7; 44,9 (fraco); 54,5

A amostra foi submetida a análises por NOE-diff a fim de determinar a configuração dos centros estereogênicos. A irradiação de H-4 levou ao aumento da intensidade de H-3 e H-11, mostrando estes possuem configuração *cis*, e portanto, a metila C-12 encontra-se em *trans* em relação a H-4 e H-11, estando, portanto na posição pseudo-equatorial. Já a irradiação de H-9 levou ao aumento dos sinais de H-

8 e H-10 e não mostrou correlações espaciais com H-11 ou H-13. Assim, sua posição foi estabelecida como equatorial (FIGURA 5.34).

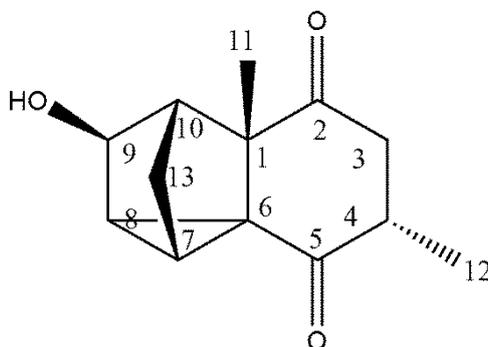


FIGURA 5.34 – Estrutura molecular de Q2A_CR_5

Fez-se também a otimização estrutural (FIGURA 5.35) utilizando o nível de teoria B3LYP/6-31+G(d,p). Foram calculadas as frequências vibracionais no mesmo nível de teoria e não foram observados valores negativos de frequência, caracterizando a estrutura como mínimo local.

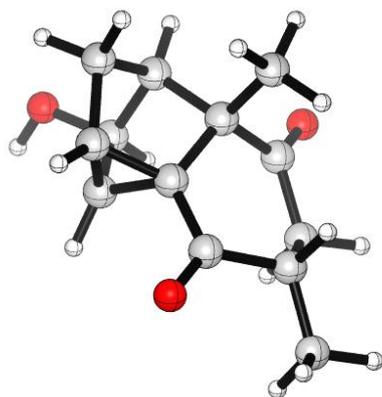


FIGURA 5.35 – Estrutura tridimensional de Q2A_CR_5

5.3.2.2.2 – Substância Q2A_CR_6

O composto Q2A_CR_6 ($[\alpha]_D^{30} = -28,3^\circ$) apresentou aspecto oleoso e coloração amarelada. Ele foi obtido numa quantidade de 8,2 mg, o que representa um rendimento de 2,35%. Através da análise por espectrometria de massas de alta resolução, foi obtida uma fórmula molecular de $C_{13}H_{14}O_3$ (obs. 218,1006 Da, calc: 218,0943 Da), que indica a incorporação de um átomo de oxigênio.

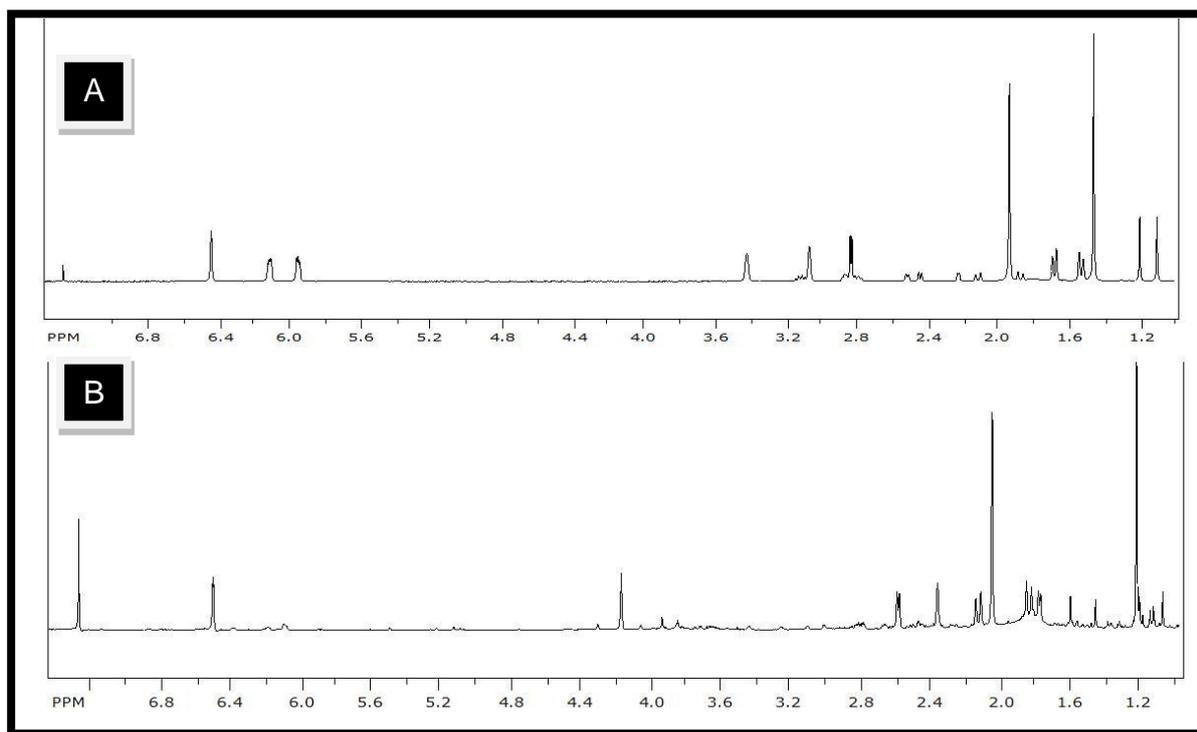


FIGURA 5.36 – Espectros de 1H RMN de A) substrato Q2 e B) Q2A_CR_6. ($CDCl_3$, 400 MHz)

A análise por RMN (uni e bidimensional) revelou espectros muitíssimos semelhantes àqueles obtidos para o composto Q1A_CR_16 (FIGURA 5.21), sendo as únicas diferenças a ausência de sinais de metilas isopropílicas e a pequena diferença de deslocamentos químicos.

Assim, através da análise dos espectros de ^{13}C e HSQC foi possível observar a presença da olefina conjugada em δ_c 137,0 (C-3) e δ_c 151,4 (C-4). Além disso, assim como observado para Q1A_CR_16, foi possível observar a presença de um grupo metilênico δ_c 27,1 (δ 1,81 e 2,09), três grupos metínicos em δ_c 20,34 (δ 2,55), 34,78 (δ 2,09) e 43,51 (δ 2,33); um carbono carbinólico em δ_c 73,57; dois carbonos quaternários em δ_c 41,12 e 55,71 e duas carbonilas em δ_c 194,2 e 202,5.

O espectro de COSY mostrou correlações de δ 6,49 com δ 2,01, δ 2,55 com δ 1,75; δ 1,75 com δ 2,55 com δ 4,19; δ 4,19 com δ 1,75 e δ 2,33; δ 2,33 com δ 1,75. O espectro de HMBC indicou a presença de um sistema enodiona (δ_c 41,1, 55,7, 137,0, 151,4, 194,2 e 202,5) unido a um triciclo (δ_c 20,3, 27,1, 34,8, 41,1, 43,5, 55,7 e 73,6) através dos carbonos δ_c 55,71 e C-6 δ_c 41,12. Assim, a estrutura proposta para Q2A_CR_6 está mostrada na FIGURA 5.37 – Estrutura molecular de Q2A_CR_6

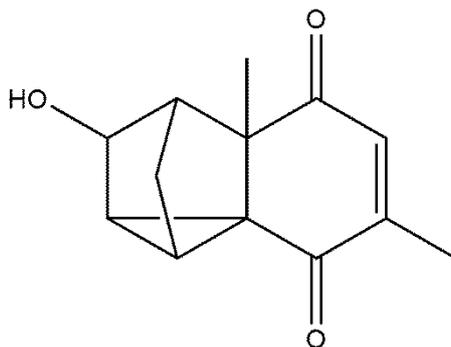


FIGURA 5.37 – Estrutura molecular de Q2A_CR_6

Após a irradiação de H-9 no experimento de NOEDIFF, pôde-se observar o aumento de intensidade apenas dos sinais de H-8 e H-10. Além disso, observou-se o aumento do sinal de Me-11 através da irradiação de H-13. Assim, estabeleceu-se a configuração *trans* entre os hidrogênios H-9 e Me-13.

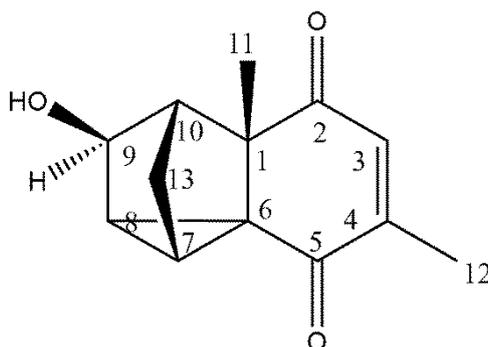


FIGURA 5.38 – Estrutura molecular de Q2A_CR_6 estabelecida após experimentos de NOE-diff

Os dados de RMN obtidos para esta substância estão sumarizados na TABELA 5.10.

TABELA 5.10 – Dados de RMN obtidos para a substância Q2A_CR_6

N°	¹ H (ppm),Int.	Mult, J (Hz)	¹³ C	COSY	HMBC
1			55,7		
2			202,5		
3	6,49, 1H	dd	137,0	2,01	16,1; 55,71; 194,2
4			151,4		
5			194,2		
6			41,1		
7	2,55, 1H	d	20,3	1,75	27,1; 43,5; 194,2(f)
8	1,75, 1H	dt; 1,23; 5,30	34,8	2,55; 4,19	43,5; 194,2
9	4,19, 1H	t	73,6	1,75; 2,33	20,3; 27,1
10	2,33, 1H	s,l; m	43,5	4,19	20,3; 34,8; 41,1
11	1,18, 3H	s	19,2		41,1; 43,5; 55,7; 202,5
12	2,01, 3H	d; 1,50 dt; 1,37;	16,1	6,49	137,0; 151,4; 194,2
13	1,81, 1H	11,50 dt; 1,37;	27,1	2,09; 2,33	20,3; 34,8; 43,5; 73,6
	2,09, 1H	11,50	27,1	1,81; 2,33; 2,55	19,6; 41,1; 55,7

Determinadas as configurações, fez-se a otimização da estrutura tridimensional da molécula utilizando o nível de teoria B3LYP/6-31+G(d,p). Foram calculadas as frequências vibracionais no mesmo nível de teoria e não foram observados valores negativos de frequência, caracterizando a estrutura como mínimo local.

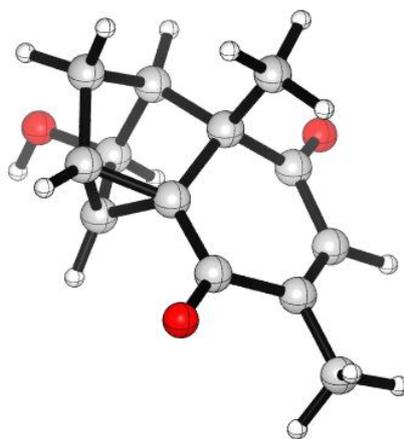


FIGURA 5.39 – Estrutura tridimensional de Q2A_CR_6

5.3.2.2.3 – Amostra Q2A_CR_9

A amostra Q2A_CR_9 (10,9 mg, R= 3,6%) apresentou uma atividade ótica de $[\alpha]_D^{30} = -18,7^\circ$ e foi isolada como uma mistura de 2 compostos que estavam em proporção 3:2, cujo espectro de RMN possuía sinais duplicados com uma pequena diferença de deslocamento químico dos sinais. Este tipo de espectro é característico de diastereoisômeros. Sua coloração era amarela e aspecto oleoso.

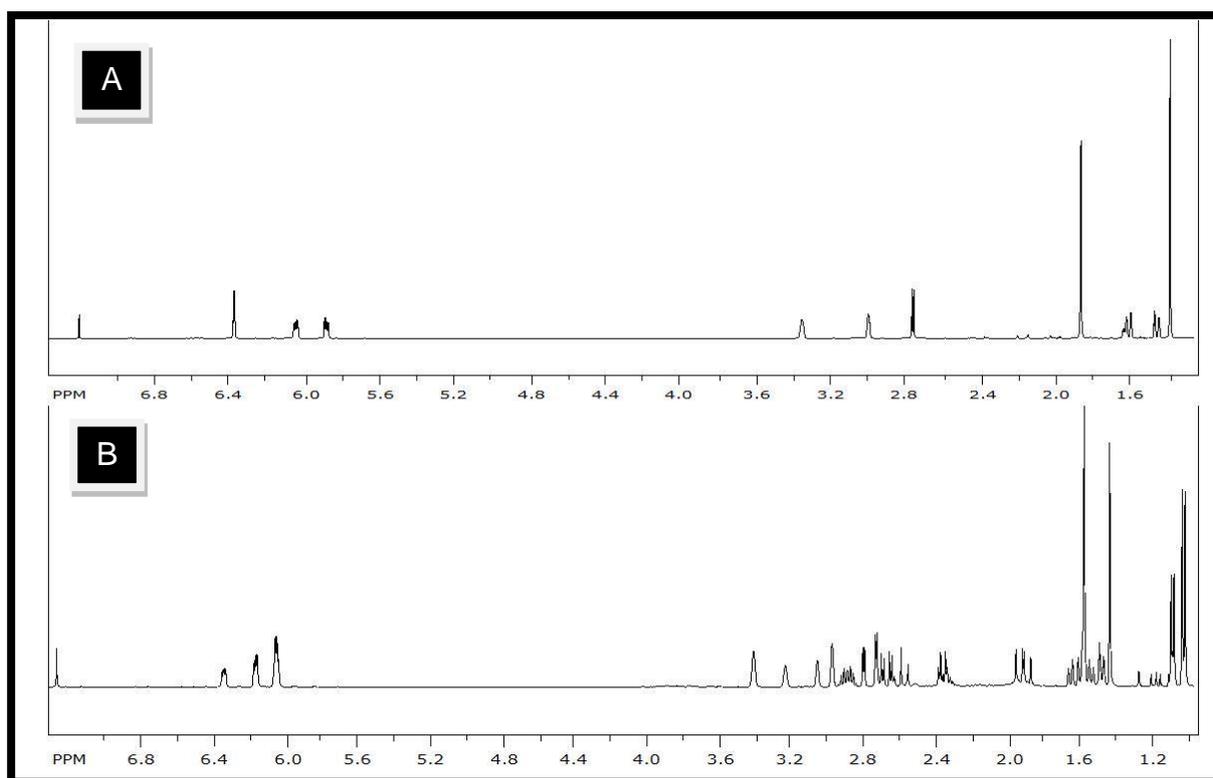


FIGURA 5.40 – Espectros de ^1H RMN de A) substrato Q3 e B) Q2A_CR_9. (CDCl_3 , 400 MHz)

A análise de HRMS de ambas as substâncias apresentou um íon em m/z 205,12254 ($[\text{M}+\text{H}]^+$) correspondente a fórmula molecular $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{O}_2$ (calc. 204,1150 Da, obs. 204,1216Da), indicando 6 graus de insaturação (um a mais do que aquele observado para o substrato Q2) e a incorporação de dois átomos de hidrogênio (redução). Estes dados juntamente com os dados de RMN indicaram que o fungo realizou apenas uma redução da dupla conjugada que contém um centro pró-quiral, gerando uma mistura de epímeros. Os dados de RMN dessa amostra mostrou-se muito semelhante àquele observado para o substrato Q2, exceto pela ausência da do

sinal do hidrogênio olefínicos da dupla conjugada. Com relação ao restante da molécula, os sinais de ^1H permaneceram praticamente idênticos.

A fim de facilitar a compreensão do leitor, a discussão dos dados será dividida em 2 partes, sendo que a primeira será referente aos dados obtidos para o composto majoritário e a segunda, ao composto minoritário. Em ambos os casos, serão discutidos apenas os dados que diferiram daqueles observados em Q2.

Composto majoritário da amostra Q2A CR 9: Em comparação com o espectro de ^{13}C de Q2, observou-se sinais adicionais em δ_c 13,3, 40,4, 45,5 para o composto majoritário e o desaparecimento dos carbonos olefínicos de C-3 (δ_c 138,2) e C-4 (δ_c 151,0) presentes no espectro de Q2.

O espectro de COSY mostrou as correlações entre os hidrogênios do sistema enodiona em δ 0,99 com δ 2,88, δ 2,88 com δ 0,99, δ 1,88 com δ 2,71 e 2,88; δ 2,65 com δ 1,88. Foram observadas as seguintes correlações ^1H - ^{13}C no espectro de HMBC: hidrogênio em 0,99 ppm com os carbonos δ_c 13,3; hidrogênio em 1,88 ppm com carbonos δ_c 13,3 e 40,3; hidrogênio em 2,88 ppm com carbonos em δ_c 13,3; 45,3; 45,5; 210,2; 60,5; hidrogênio em 2,65 ppm com carbonos em δ_c 40,4, 57,1 e 210,2.

(Os demais dados de RMN para o Q2A_CR_9_majoritário estão sumarizados na TABELA 5.11.)

TABELA 5.11 – Dados de RMN obtidos para a substância Q2A_CR_9_maioritário

N°	¹ H (ppm),Int.	Mult, J (Hz)	¹³ C	COSY	HMBC
1			57,1		
2			210,2		
3	1,89, 1H	dd; 3,6; 18,0	45,5	2,71; 2,88	13,3; 40,3
	2,65, 1H	dd; 5,9; 18,0	45,5	1,89	13,3; 40,3 13,3; 45,3; 45,5; 210,2;
4	2,88, 1H	m	40,4	0,99; 1,89	60,5
5			213,1		
6			60,4		
7	3,39, 1H	m	45,3	2,71; 6,15	53,3; 137,3; 137,5
8	6,15, 1H	dd; 2,8; 5,9	137,5	3,40; 6,04	137,3; 137,5 43,5; 45,5; 53,3; 137,3;
9	6,04, 1H	dd; 2,9; 5,8	137,3	2,95; 6,15	137,5 45,3; 60,4(fraco); 137,3;
10	2,95, 1H	m	53,3	1,45; 3,39	137,5
11	1,55, 3H	s	27,6	0,99	53,3; 57,1; 60,4; 213,1
12	0,99, 3H	d; 6,5	13,3	2,88	40,4; 45,5
13	1,45, 1H	dt; 1,6; 8,9	45,3	2,95; 3,39	60,4
	1,58, 1H	dd; 1,6; 8,9	45,3	2,95; 3,39	137,3; 137,5

A irradiação de H-6 aumentou a intensidade dos sinais H-7 e H-11, indicando que eles possuem configuração *cis*. Ao irradiar H-4, não se observou interação com o sinal de H-11. Este resultado estabeleceu a posição da Me-12 como pseudo-equatorial (*trans* em relação a H-11).

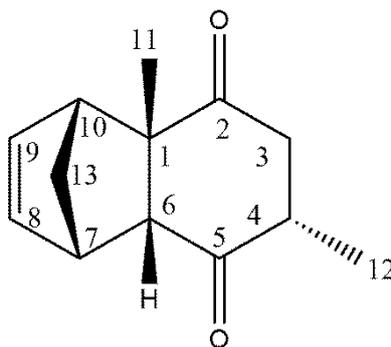


FIGURA 5.41 – Estrutura de molecular de Q2A_CR_9_maioritário estabelecida após experimentos de NOE-diff

Determinadas as configurações, fez-se a otimização da estrutura tridimensional da molécula. utilizando o nível de teoria B3LYP/6-31+G(d,p). Foram

calculadas as frequências vibracionais no mesmo nível de teoria e não foram observados valores negativos de frequência, caracterizando a estrutura como mínimo local .

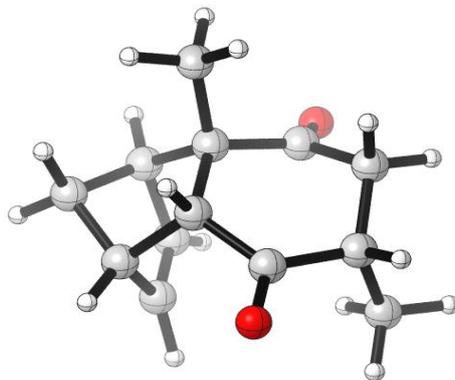


FIGURA 5.42 – Estrutura tridimensional de Q2A_CR_9_maioritário

Composto minoritário da amostra Q2A CR 9: Dado que Q2A_CR_9 é um epímero (diastereoisômero) de Q2A_CR_9_maioritário, seus sinais aparecem com uma pequena diferença de deslocamento químico, porém, mesma multiplicidade e integral.

Para a substância Q2A_CR_9_minoritário, o espectro de ^1H mostrou dois sinais olefínicos em δ 6,03 (dd, $J= 2,9$ e $5,8$) e δ 6,33 (dd, $J= 2,9$ e $5,8$) enquanto o espectro de ^{13}C mostrou o aparecimento de quatro novos sinais em δ_c 14,6, 41,5, 44,7 e o desaparecimento dos sinais de C-3 (δ_c 138,2) e C-4 (δ_c 151,0) presentes no substrato Q2. O espectro de COSY mostrou correlações entre os hidrogênios H-12 (δ 1,05) com H-4 (δ 2,29) e H-4 com H-12 e H_A-3 (δ 2,57). O espectro de HMBC exibiu correlações de H-3 com δ_c 14,6; 41,5; 211,9 e 212,1; H-4 com δ_c 14,6; 41,5; 57,7; 211,9 e 212,1; H-7 com δ_c 52,2; H-8 com δ_c 47,1; 49,7 e 140,3; H-9 com δ_c 49,7; 52,2 e 134,5; H-10 com δ_c 49,7 e 134,5; H-11 com δ_c 52,2; 57,7; 60,1; 211,9 e 212,1, H-12 com δ_c 41,5; 44,7; 211,9 e 212,1 e por fim, H-13 com δ_c 57,7; 60,1; 41,5; 134,5 e 140,3.

Os experimentos de NOE-Diff foram muito importantes para a diferenciação dos dois epímeros. Pela irradiação de H-6 pôde-se observar o aumento na intensidade do sinal de H-11, indicando sua configuração *cis*. Também observou-se o aumento de intensidade de sinal de H-12 ao irradiar H-6. Como H-6 está em *cis* em relação a H-11, logo H-12 deve estar na mesma configuração que H-6 e H-11, como mostrado na FIGURA 5.43).

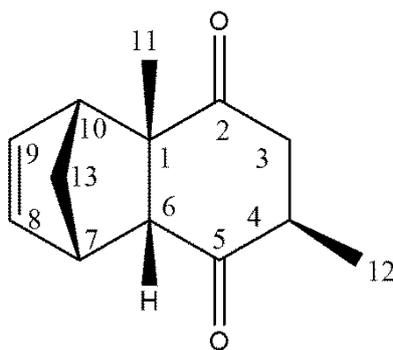


FIGURA 5.43 – Estrutura de molecular de Q2A_CR_9_minoritário estabelecida após experimentos de NOE-diff

(Os demais dados de RMN para o Q2A_CR_9_minoritário estão sumarizados na TABELA 5.12).

TABELA 5.12 – Dados de RMN obtidos para a substância Q2A_CR_9_minoritário

Nº	¹ H (ppm),Int.	Mult, J (Hz)	¹³ C	COSY	HMBC
1			57,7		
2			211,9		
3	2,29, 1H	m	41,5	1,05; 2,57	14,6; 41,5; 211,9; 212,1
	2,57, 1H	d; 15,0	44,7	2,33	14,6; 41,5; 211,9; 212,1
4	2,33, 1H	m	44,7	1,05; 2,57	14,6; 41,5; 57,7; 211,9; 212,1
5			212,1		
6			60,1		
7	3,21, 1H	m	49,7	1,62; 2,77	52,2
8	6,03, 1H	dd; 2,9; 5,7	134,5	3,21; 6,33	47,1; 49,7; 140,3
9	6,33, 1H	dd; 2,9; 5,7	140,3	3,03; 6,33	49,7; 52,2; 134,5
10	3,03, 1H	m	52,2	6,33	49,7; 134,5
11	1,40, 3H	s	27,4		52,2; 57,7; 60,1; 211,9; 212,1
12	1,05, 3H	d; 6,46	14,6	2,33	41,5; 44,7; 211,9; 212,1
13	1,51, 1H	dt; 1,7; 9,1	47,1	1,62	57,7; 60,1
	1,62, 1H	d; 9,0	47,1	1,51	41,5; 134,5; 140,3

Determinadas as configurações, fez-se a otimização da estrutura tridimensional da molécula. utilizando o nível de teoria B3LYP/6-31+G(d,p). Foram calculadas as frequências vibracionais no mesmo nível de teoria e não foram

observados valores negativos de frequência, caracterizando a estrutura como mínimo local

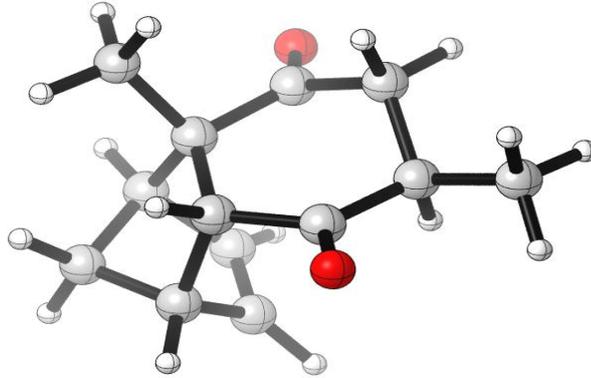


FIGURA 5.44 – Estrutura tridimensional de Q2A_CR_9_minoritáro

Assim, a biotransformação de Q2 pode ser resumida da seguinte forma:

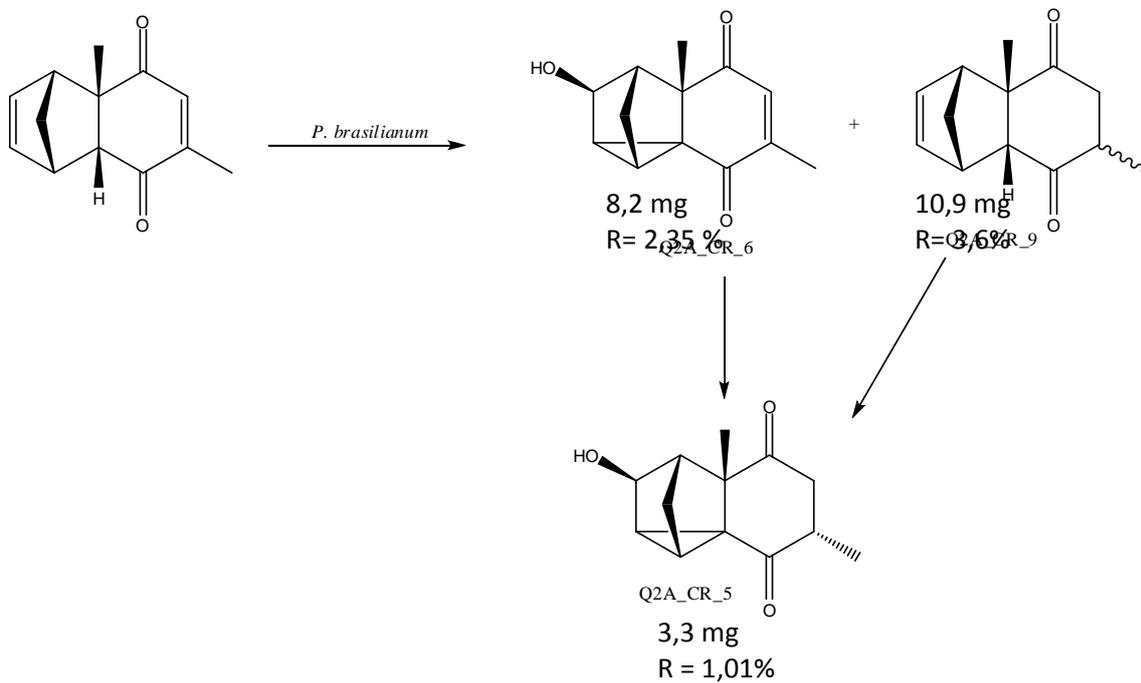
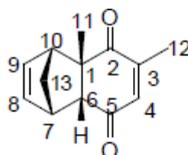


FIGURA 5.45 – Biotransformação de Q2 através da metodologia de células residuais

5.3.2.3 – Biotransformação de Q3 por células residuais de *P. brasilianum*

A biotransformação de Q3 por células residuais levou ao isolamento de cinco produtos de biotransformação a partir de um extrato de acetato M+F+S de 351,2 mg, sendo que destes, apenas um não encontrava-se em mistura. Os produtos foram caracterizados por RMN. Sua identificação foi feita baseada nos demais produtos de biotransformação obtidos anteriormente (produtos de Q1 e Q2) e em comparação aos dados de Q3. A descrição encontra-se nos itens a seguir.

TABELA 5.13 – Dados de RMN (^{13}C e ^1H) do substrato Q3



Nº (H e C)	^{13}C - δ (ppm)	^1H - δ (ppm); multiplicidade; integral e J (Hz)
1	52,3	---
2	203,0	---
3	151,1	---
4	137,6	6,42; dq; 1H; $J_1= 1,4$ e $J_2= 0,7$
5	199,2	---
6	57,6	2,83; d; 1H; 3,8
7	48,8	3,39-3,44; m; 1H
8	134,8	5,99; dd; 1H; $J_1= 5,7$ e $J_2= 2,9$
9	138,9	6,09; dd; 1H; $J_1= 5,7$ e $J_2= 2,9$
10	53,6	3,07-3,10; m; 1H
11	26,5	1,46; s; 3H
12	16,5	1,94; d; 1H; 1,5
13	46,2	1,68; dt; 1H; $J_1= 9,1$ e $J_2= 1,4$
13	46,2	1,53; dt; 1H; $J_1= 9,1$ e $J_2= 1,7$

5.3.2.3.1 – Substância Q3A_CR_5

A substância Q3A_CR_5 ($[\alpha]_D^{30} = -12,3^\circ$) foi obtida como um óleo amarelado (12.2 mg, R= 3,77%). A análise por massas de alta resolução revelou uma íon em m/z 219,1011 ($[M+H]^+$) correspondente a fórmula molecular $C_{13}H_{14}O_3$ (calc. 218,0943, obs. 218,1002), indicando a incorporação de um átomo de oxigênio.

Os espectros de RMN obtidos para a substância Q3A_CR_5 são muito semelhantes àqueles obtidos para a substância Q1A_CR_16 e Q2A_CR_6, em especial ao último. As diferenças observadas referem-se exclusivamente a pequena diferença nos deslocamentos químicos.

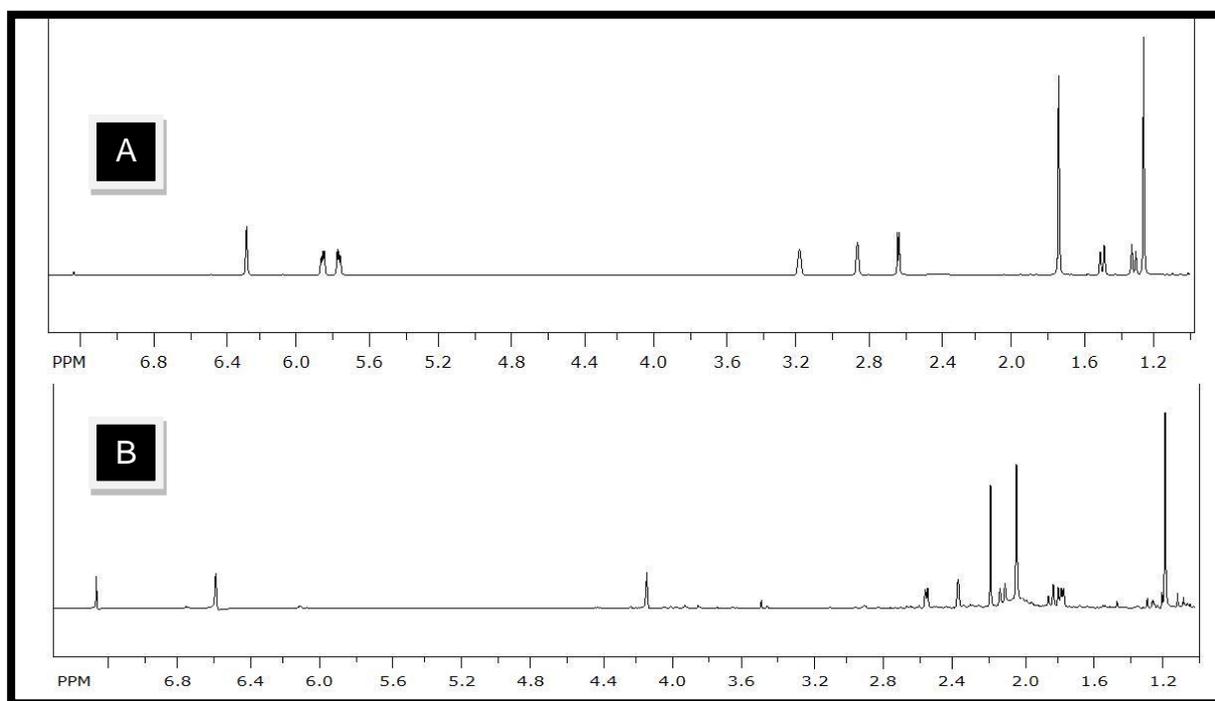


FIGURA 5.46 – Espectros de 1H RMN de A) substrato Q3 e B) Q3A_CR_5. ($CDCl_3$, 400 MHz)

Assim como para Q2A_CR_5, o espectro de 1H RMN para a substância Q2A_CR_5 não apresentou sinais de hidrogênios olefínicos, indicando a ausência das duplas. Além disso, também foi observado o aparecimento de um hidrogênio carbinólico em δ 4,04 (t, $J = 1,7$ Hz). Os espectros de ^{13}C e HSQC indicaram a presença da olefina conjugada em C-3 (δ_c 140,0) e C-4 (δ_c 151,4), um grupo metilênico em δ_c 27,05 (δ 1,79 e 2,09), três grupos metínicos em δ_c 20,29 (δ 2,53), 34,36 (δ 1,75) e 43,46 (δ 2,35); um carbono carbinólico em δ_c 73,67 (δ 4,13); dois quaternários em δ_c 41,4 e 55,0 e dois carbonos carbinólicos em δ_c 194,25 e 202,52. O espectro de

COSY mostrou correlações de H-3 (δ 6,58) com H-12 (δ 2,01), H-7 (δ 2,53) com H-8 (δ 1,75); H-8 com H-7 e H-9 (4,13); H-9 com H-8 e H-10 (δ 2,35); H-10 com H-9.

Através do espectro de HMBC foi possível confirmar o sistema enodiona (δ_c 41,39, 55,05, 136,26, 149,97, 194,25 e 202,52) ligado a um triciclo (δ_c 20,29, 27,05, 34,36, 41,39, 43,46, 55,05 e 73,67) através dos carbonos C-1 (δ_c 55,05) e C-6 (δ_c 41,39). Ao contrário dos compostos Q1A_CR_16 e Q2A_CR_5, em Q3A_CR_5, os hidrogênios H-9 e H-11 parecem estar em configuração *trans*. O aumento da intensidade dos sinais de H-11 e H-13 após a irradiação de H-9 nos experimentos NOE-Diff suportam tal afirmação.

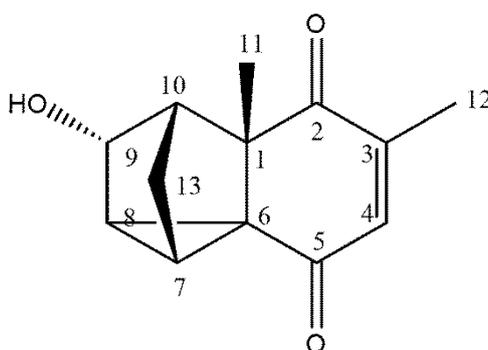


FIGURA 5.47 – Estrutura molecular de Q3A_CR_5

Fez-se também a otimização estrutural (FIGURA 5.35) utilizando o nível de teoria B3LYP/6-31+G(d,p). Foram calculadas as frequências vibracionais no mesmo nível de teoria e não foram observados valores negativos de frequência, caracterizando a estrutura como mínimo local.

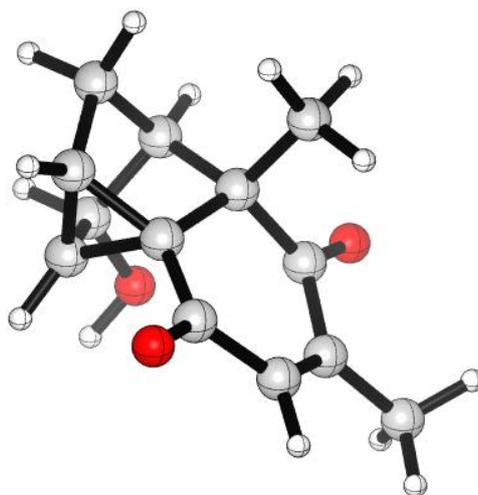


FIGURA 5.48 – Estrutura tridimensional de Q3A_CR_5

5.3.2.3.2 – Amostra Q3A_CR_7

A substância Q3A_CR_7 ($[\alpha]_D^{30} = -35,5^\circ$) foi isolada inicialmente como uma mistura epimérica de duas substâncias. Sua aparência era de um sólido amarelo-amarronzado (17,5 mg, R= 5,82%).

Uma vez que o espectro obtido mostrou-se um tanto quanto complexo para ser interpretado, a amostra foi submetida à separação cromatográfica em um equipamento de CLAE-EFS/RMN. No total foram coletadas duas bandas, que foram identificadas como sendo Q3A_CR_7_pico1 e Q3A_CR_7_pico2.

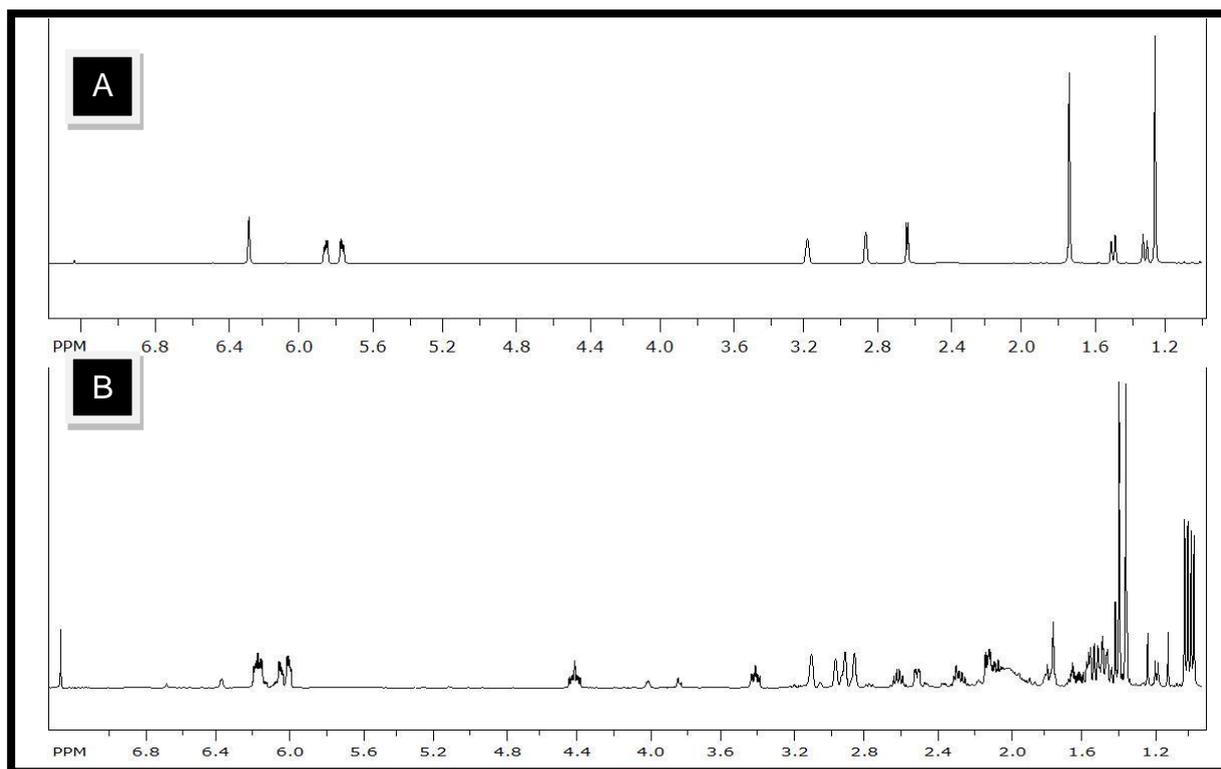


FIGURA 5.49 – Espectros de ¹H RMN de A) substrato Q3 e B) Q3A_CR_7. (CDCl₃, 400 MHz)

Ao passo que a segunda amostra (Q3A_CR_7_pico2) foi analisada e gerou dados passíveis de serem interpretados, a amostra Q3A_CR_7_pico1 não. Assim sendo, segue a descrição dos dados da substância Q3A_CR_7_pico2.

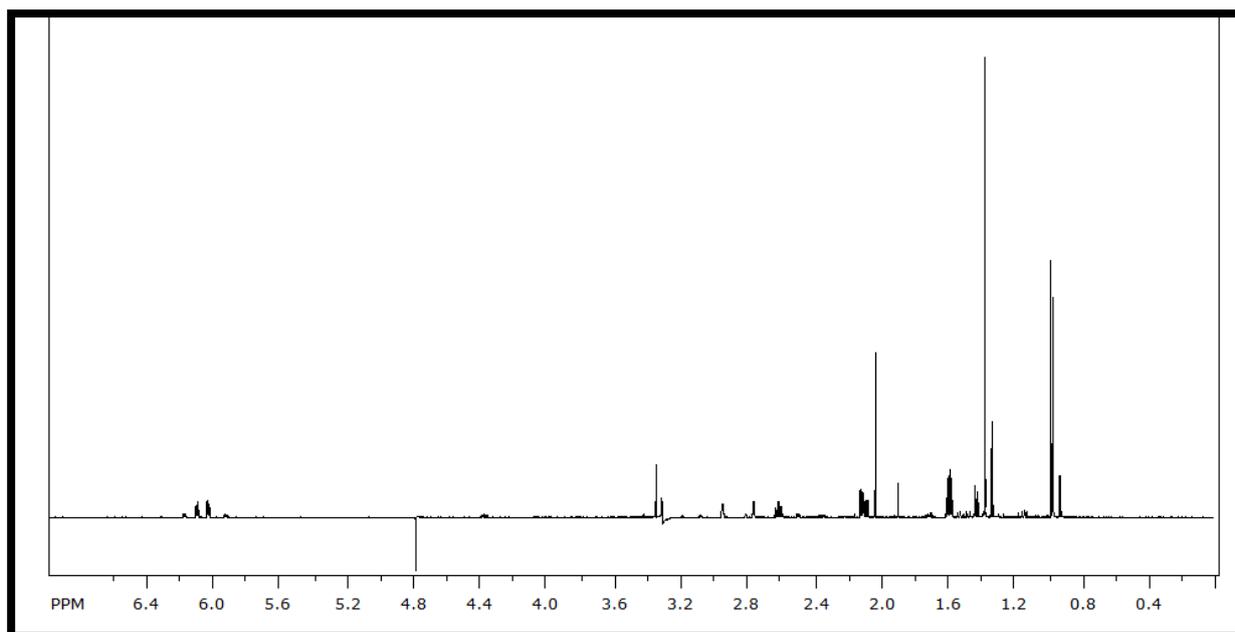


FIGURA 5.50 – Espectros de ^1H RMN Q3A_CR_7_pico2. (CDCl_3 , 600 MHz)

Assim como para Q2A_CR_5 e Q3A_CR_5, os dados de RMN obtidos para a substância Q3A_CR_7_pico2 e de HRMS são bastante semelhantes àqueles obtidos para Q2A_CR_9, sendo que a única diferença entre os espectros de RMN são as pequenas diferenças de deslocamento químico dos sinais.

Para o composto Q3A_CR_7_pico2 foi obtida uma $[\text{M}+\text{H}]^+ = m/z$ 205,1221, cuja fórmula molecular é $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{O}_3$ (calc. 204,1150 Da, obs. 204,1212 Da) e mostra que dois átomos de hidrogênio foram incorporados (redução).

Como já se sabe, para Q2A_CR_9, houve a redução da dupla ligação do sistema α,β -insaturado, gerando um centro quiral no carbono C-4. Como os espectros são bem semelhantes entre si, pode-se afirmar que a mesma reação aconteceu para a substância Q3A_CR_7_pico2 e, portanto, esta e Q2A_CR_9 são isômeros estruturais.

O espectro de ^1H (FIGURA 5.50) mostrou dois sinais olefínicos em δ 6,03 e δ 6,10 enquanto o espectro de ^{13}C revelou o desaparecimento dos sinais de C-3 (δ_c 138,2) e C-4 (δ_c 151,0) presentes no substrato Q3.

O espectro de COSY mostrou correlações entre os hidrogênios H-12 (δ 0,97) com H-3 (δ 2,60); H-3 com H-4 (δ 1,58) e H-12 (δ 2,57). Além destas, foram observadas correlações entre H-6 (δ 2,11) com H-7 (δ 2,94) e H-4; H-7 com H-6; H-8

(δ 6,03) com H-9 e H-7; H-9 com H-8 e H-10 (δ 2,76) e por fim, H-10 com H-9 e H-13 (δ 4,57).

O experimento de HMBC confirmou a presença do sistema enodiona (δ_c 39,8, 48,3, 60,3, 70,4, 220,8 e 221,7) ligado a um biciclo (δ_c 40,1, 48,2, 53,8, 136,2, 141,6) através dos carbonos C-1 (δ_c 70,4) e C-6 (δ_c 60,3).

Os experimentos de NOE-Diff mostraram que a metila Me-12 está em *cis* com a metila M-11 através da irradiação de H-11 que ocasionou um aumento na intensidade do sinal de H-12. Por sua vez, H-6 está em *trans* em relação a H-11 e H-12 uma vez que este não mostrou correlação com os demais.

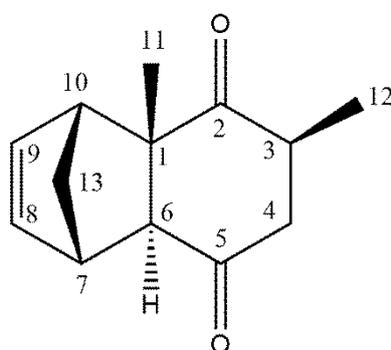


FIGURA 5.51 – Estrutura molecular de Q3A_CR_7_pico2

A otimização estrutural foi feita utilizando-se o nível de teoria B3LYP/6-31+G(d,p). Foram calculadas as frequências vibracionais no mesmo nível de teoria e não foram observados valores negativos de frequência, caracterizando a estrutura como mínimo local.

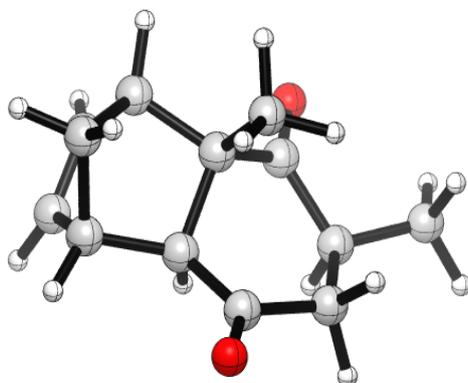


FIGURA 5.52 – Estrutura tridimensional de Q3A_CR_7_pico2

5.3.2.3.3 – Amostra Q3A_CR_8

A amostra Q3A_CR_8 ($[\alpha]_D^{30} = -32,7^\circ$) foi isolada numa quantidade de 8.8 mg (R= 2,91%) e também era constituída de uma mistura de dois epímeros em proporções 3,5:1, dada as características de seu espectro de RMN com sinais duplicados e pequenas diferenças de deslocamento químico entre eles. Além disso, observou-se também que havia grande semelhança entre os espectros desta amostra e de Q3A_CR_7_pico2, sugerindo que estes também sejam epímeros.

Desta forma, a caracterização foi feita de modo análogo àquela feita para Q3A_CR_7_pico2 e, portanto, os dados de RMN uni- e bidimensional serão apresentados resumidos em tabela. Além disso, os dados obtidos foram comparados com dados reportados por CHUNJIAN & BURNELL (1997) e estes se mostraram idênticos. Serão apresentados nesta seção somente os dados de HRMS e NOE-Diff.

Substância Q3A CR 8 majoritário: Através da análise de HRMS exibiu uma relação massa/carga para o pico do íon *quasi* molecular ($[M+H]^+$) de m/z 205,12211 – valor idêntico àquele obtido para Q3A_CR_7_pico2. Este dado associado aos dados de RMN comprova que esta substância é de fato um epímero A atribuição dos sinais segue descrita na tabela a seguir.

TABELA 5.14 – Dados de RMN obtidos para a substância Q3A_CR_8_majoritário

N°	¹ H (ppm),Int.	Mult, J (Hz)	¹³ C	COSY	HMBC
1			57,1		
2			210,3		
3	2,85, 1H	m	39,5	2,02; 2,52	14,2; 46,0; 213,5; 210,3
4	2,02, 1H	dd; 1,66; 17,0	46,0	2,52; 2,85	14,2; 39,5; 210,3; 213,5
	2,52, 1H	ddd; 1,75; 5,28; 15,10	46,0	2,02; 2,77	39,5; 60,9; 210,3
5			213,5		
					49,2; 134,3; 213,5;
6	2,77, 1H	dd; 1,64; 3,81	60,9	3,21	210,3
7	3,22, 1H	m	49,2	2,77	51,5
8	6,01, 1H	dd; 2,89; 5,66	134,3	3,22; 6,28	43,01; 49,2; 51,5; 140,5
9	6,28, 1H	dd; 3,12; 5,78	140,5	3,05; 6,01	49,2; 51,5; 134,3
10	3,05, 1H	m	51,5	6,28	49,2; 134,3
11	1,41, 3H	s	28,0		57,1; 60,9; 213,5
12	0,99, 3H	d; 6,55	14,2	2,85	39,5; 46,0; 213,5
13	1,46, 1H	dt; 1,77; 8,65	46,5	3,04; 3,22	57,1; 60,9; 134,3; 140,5
	1,60, 1H	dt; 1,58; 9,03	46,5	3,04; 3,22	134,3; 140,5; 28,0

A fim de verificar qual centro estereogênico diferia entre estes dois compostos, a substância em questão foi submetida à análise por NOE-diff. A irradiação de H-6 ocasionou um aumento de intensidade de H-11, porém, ao irradiar H-3, este não mostrou interação espacial com nenhum hidrogênio – indicando que está em configuração *trans* em relação aos hidrogênios H-6 e H-11.

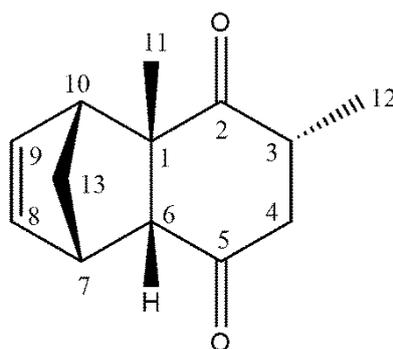


FIGURA 5.53 – Estrutura molecular de Q3A_CR_8_majoritário

A otimização estrutural foi feita utilizando-se o nível de teoria B3LYP/6-31+G(d,p). Foram calculadas as frequências vibracionais no mesmo nível de teoria e não foram observados valores negativos de frequência, caracterizando a estrutura como mínimo local.

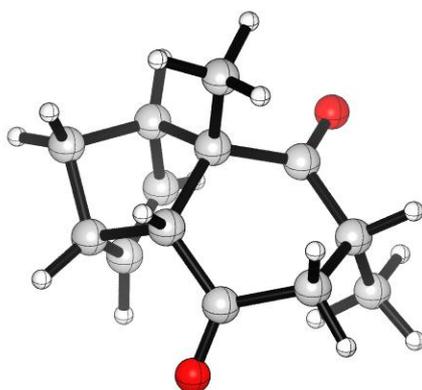


FIGURA 5.54 – Estrutura tridimensional de Q3A_CR_8_majoritário

Substância Q3A CR 8 minoritário: De modo idêntico àquele realizado para Q3A_CR_8_majoritário, a análise de HRMS exibiu uma relação massa/carga para o pico do íon *quasi* molecular ($[M+H]^+$) em m/z 205,12211.

Novamente, estes dados associados aos dados de RMN comprovam que esta substância é de fato um epímero daquela outra.

TABELA 5.15 – Dados de RMN para a substância Q3A_CR_8_minoritário

N°	¹ H (ppm),Int.	Mult, J (Hz)	¹³ C	COSY	HMBC
1			55,8		
2			215,1		
3	2,22, 1H	m	43,1	1,14	16,6; 45,1
4	2,39, 1H	d; 5,00	45,1	2,43	16,6; 43,1; 60,7
	2,43, 1H	d; 5,00	45,1		16,6; 43,1; 60,7
5			208,9		
6	2,73, 1H	d; 3,68	60,7	3,35	27,9; 55,8; 137,0; 208,9
7	3,35, 1H	m	46,6	2,73	53,9
8	6,17, 1H	dd; 2,88; 5,77	138,0	3,35	46,5; 53,9
9	6,09, 1H	dd; 2,88; 5,77	137,0	2,97	46,2; 53,8; 208,9
10	2,97, 1H	m	53,9	6,09	46,5; 137,0
11	1,50, 3H	s	27,9		53,9; 55,8; 60,7; 215,1
12	1,14, 3H	d; 6,26	16,6	2,22	43,1; 215,1
13	1,44, 1H	dt; 1,82; 7,50	38,3	1,92	46,5
	1,91, 1H	m	38,3	1,44	38,3; 43,1

A fim de verificar qual centro estereogênico diferia entre estes dois compostos, a substância em questão foi submetida a análise por NOE-diff. A irradiação de H-3 e H-6 ocasionaram um aumento de intensidade de H-11, indicando que estes possuem configuração *cis*, como mostrado na figura abaixo.

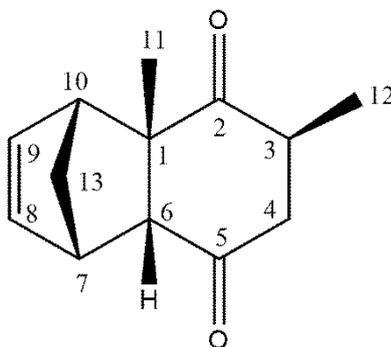


FIGURA 5.55 – Estrutura molecular de Q3A_CR_8_minoritário

A otimização estrutural foi feita utilizando-se o nível de teoria B3LYP/6-31+G(d,p). Foram calculadas as frequências vibracionais no mesmo nível de teoria e não foram observados valores negativos de frequência, caracterizando a estrutura como mínimo local.



FIGURA 5.56 – Estrutura tridimensional de Q3A_CR_8_minoritário

Através destes resultados, pode-se afirmar que a formação da substância Q3A_CR_7_pico2 é resultado da enolização do hidrogênio H-7, levando à epimerização deste centro estereogênico.

Assim, a biotransformação de Q3 por células residuais de *P. brasilianum* pode ser resumida em:

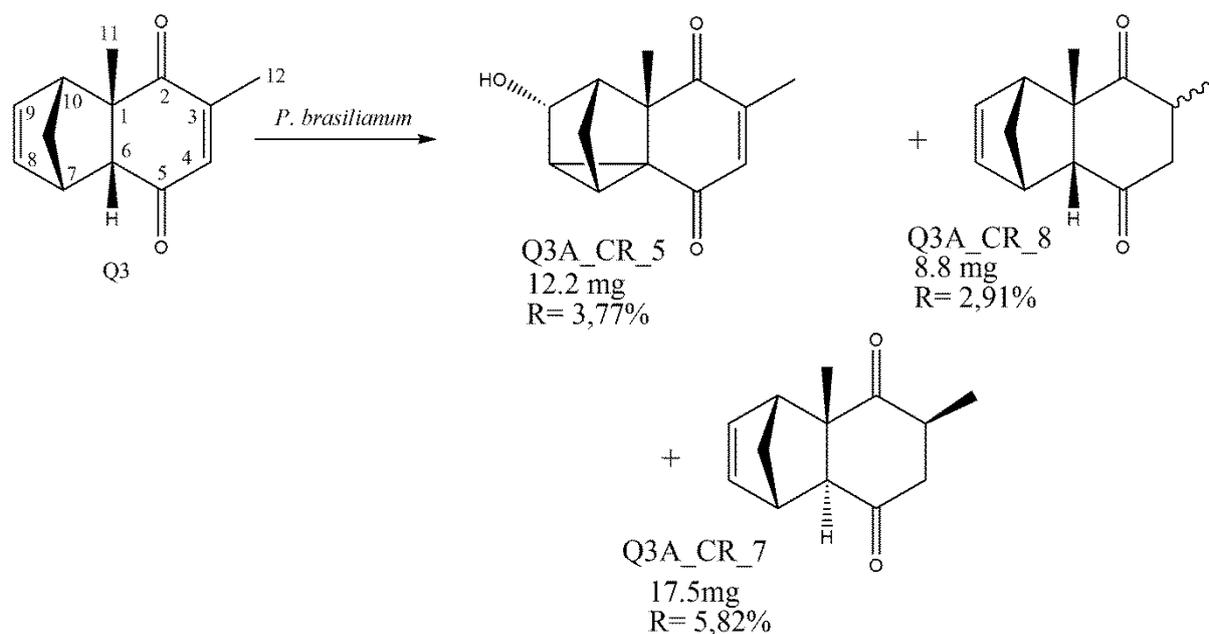
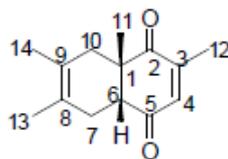


FIGURA 5.57 – Resumo da biotransformação de Q3 por células residuais de *P. brasilianum*

5.3.2.4 – Biotransformação de Q4 por células residuais de *P. brasilianum*

A biotransformação de Q4 por *P. brasilianum* levou ao isolamento de quatro substâncias: Q4A_CR_10 (8,2 mg), Q4A_CR_15 (4,5 mg), Q4A_CR_20 (2,0 mg) e Q4A_CR_23 (2,8 mg). Estes produtos consistiram em redução da dupla conjugada, redução de carbonila e oxidação alílica.

A elucidação estrutural foi feita comparando-se os dados dos produtos obtidos com aqueles referentes ao substrato Q4. A descrição dos dados encontra-se na tabela a seguir.

TABELA 5.16 – Dados de ^1H e ^{13}C do substrato Q4

Nº (H e C)	^{13}C - δ (ppm)	^1H - δ (ppm); multiplicidade; integral e J (Hz)
1	48,2	---
2	203,0	---
3	147,5	---
4	135,5	6,50; q; 1H; 1,5
5	199,8	---
6	52,7	2,80; t; 1H; 5,8
7	29,6	2,45-2,55; m; 1H
7	29,6	2,04-2,15; m; 1H
8	123,0	---
9	122,6	---
10	38,8	2,39-2,48; m; 1H
10	38,8	1,63-1,71; m; 1H
11	22,7	1,29; s; 3H
12	16,5	1,99; d; 3H; 1,5
13	18,8	1,58; s; 3H
14	18,5	1,63; s; 3H

5.3.2.4.1 – Substância Q4A_CR_10

A substância Q4_CR_10 ($[\alpha]_D^{30} = +26,3^\circ$) foi obtida como um sólido amarelo (8.2 mg, R= 3,31%). Seu espectro de massas de alta resolução exibiu um pico do íon *quasi* molecular em m/z 237,483, que é referente à fórmula molecular $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{O}_3$ (calc. 236,1412, obs. 236,1474), indicando 5 graus de insaturação (um a menos do que o substrato Q4) e a incorporação de um átomo de oxigênio, sugerindo que houve uma redução e uma oxidação.

Através da comparação dos espectros de ^1H de Q4 e Q4A_CR_10 (FIGURA 5.58), algumas diferenças puderam ser observadas. Dentre estas, destacam-se a ausência do sinal olefínico em 6,50 (δ_c 135,5) e dos hidrogênios

metílicos em 1,58 ppm (δ_c 18,8). Ademais, observou-se a presença de sinais adicionais tais em δ 3,02 (δ_c 39,8), δ 2,23 (δ_c 42,5) e 2,80 (δ_c 42,5), indicando a redução da dupla conjugada (como já observado em outros produtos de biotransformação); e sinais em 4,08 (δ_c 62,2) e 4,25 ppm (δ_c 62,2) – um par de dubletos, indicando uma oxidação alílica.

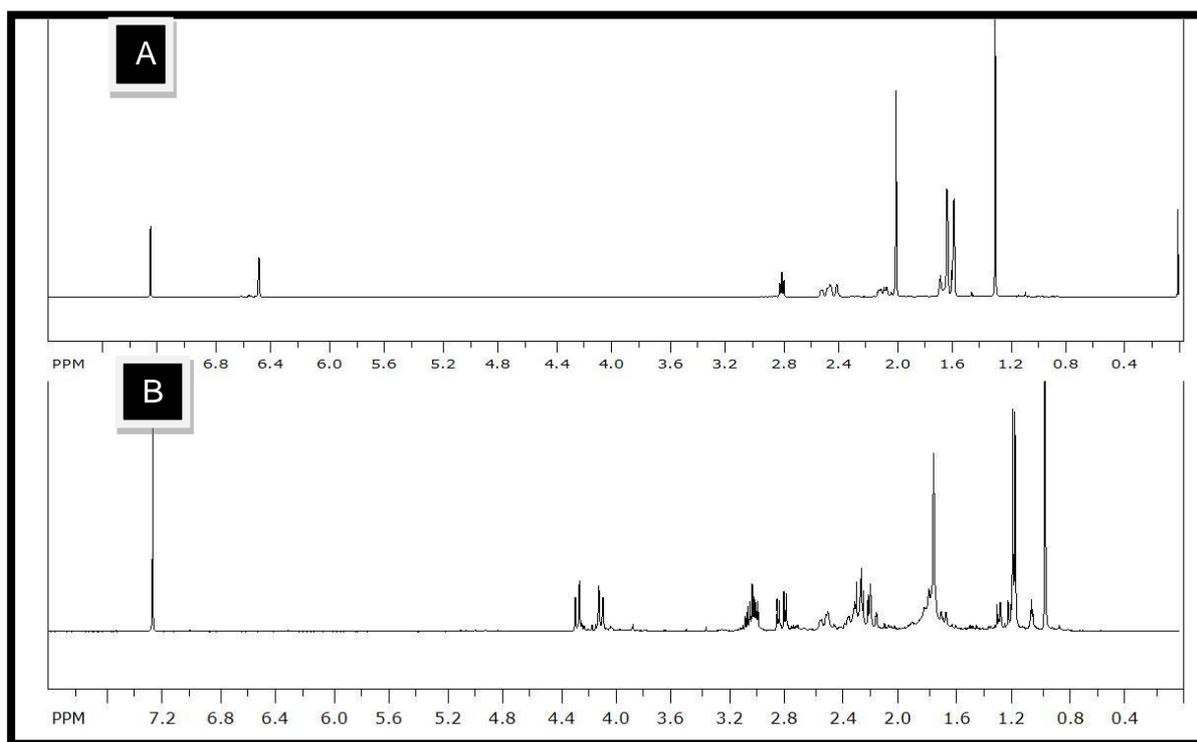


FIGURA 5.58 – Espectros de ^1H RMN de A) substrato Q4 e B) Q4A_CR_10. (CDCl_3 , 400 MHz)

Através das correlações ^1H - ^1H observadas no espectro de COSY pôde-se observar correlação entre os hidrogênios δ 3,02 com δ 1,15; δ 2,23 com δ 2,80 e δ 3,03. As correlações ^{13}C - ^1H nos espectros de HSQC e HMBC permitiram fechar o primeiro sistema de spin. Assim, para as correlações de HBMC se observou: hidrogênio δ 1,15 com os carbonos 39,8; 42,5 e 215,3; hidrogênio δ 2,23 com os carbonos 13,9; 39,8; 209,4 e 215,3; hidrogênio δ 2,80 com os carbonos δ_c 39,8; 209,4 e 215,3; hidrogênio δ 3,02 com os carbonos δ_c 13,9; 42,5 e 215,3.

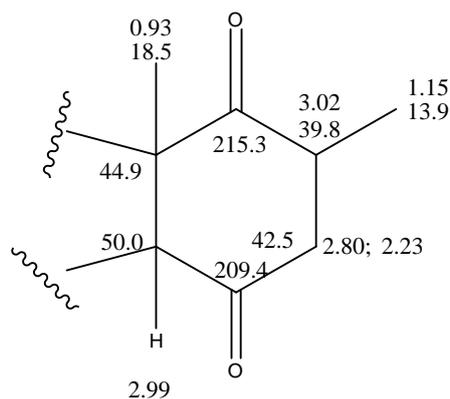


FIGURA 5.59 – Estrutura parcial da substância Q4A_CR_10 (sistema enodiona)

O segundo sistema de spin apresentou-se bastante semelhante àquele presente em Q4, exceto pela ausência de um sinal referente aos hidrogênios metílicos em 1,58 ppm (δ_c 18,8), evidenciando que a oxidação alílica teria ocorrido na metila Me-13. Neste sistema de spin, observou-se ^1H - ^1H entre os seguintes hidrogênios: δ 2,29 com o hidrogênio δ 2,48, δ 2,48 com hidrogênio δ 2,29, δ 2,99 com hidrogênio 2,48, δ 4,08 com o hidrogênio δ 4,25.

A hipótese criada foi corroborada através das correlações ^{13}C - ^1H no espectro de HMBC. A correlação entre os hidrogênios em δ 4,08 e 4,25 ppm com o carbono δ_c 24,1 e os hidrogênios metílicos em 1,72 ppm com o carbono δ_c 41,2 permitiram confirmar a oxidação alílica no carbono C-13, como proposto na FIGURA 5.60:

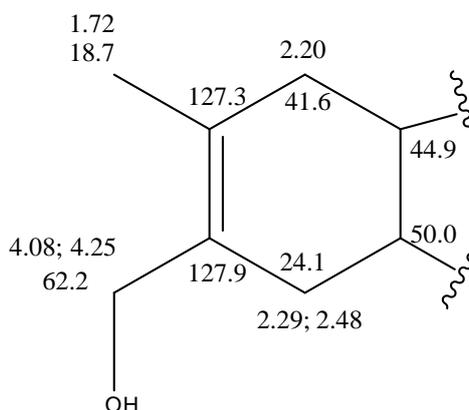


FIGURA 5.60 – Estrutura parcial da substância Q4A_CR_10 – parte 2

TABELA 5.17 – Dados de RMN da substância Q4A_CR_10

N°	¹ H (ppm),Int.	Mult, J (Hz)	¹³ C	COSY	HMBC
1			44,9		
2			215,3		
3	3,02, 1H	m	39,8	1,15	13,9; 42,5; 215,3
4	2,23, 1H	m	42,5	2,80; 3,03	13,9; 39,8; 209,4; 215,3
	2,80, 1H	dd; 19,00; 6,60	42,5	2,23; 3,03	39,8; 209,4; 215,3
5			209,4		
6	2,99, 1H	m	50	2,29; 2,48	18,5; 24,1; 41,6; 44,9; 209,4
7	2,29, 1H	m	24,2	2,48	41,6; 127,3; 127,9
	2,48, 1H	m	24,1	2,29	44,9; 50,0
8			127,9		
9			127,3		
10	2,20, 2H	m	41,6		18,5; 44,9; 50,0; 127,3; 127,9
11	0,93, 3H	s	18,5	2,24	41,6; 44,9; 50,0; 215,3
12	1,15, 3H	d; 6,5	13,9	3,02	39,8; 42,5; 215,3
13	4,08, 1H	d; 11,6	62,2	4,25	24,1; 127,3; 127,9
	4,25, 1H	d; 11,6	62,2	4,08	24,1; 127,3; 127,10
14	1,72, 3H	s	18,7		41,6; 127,3; 127,9

Desta forma, propôs-se a estrutura abaixo mostrada.

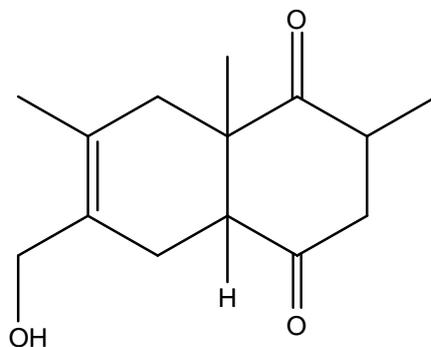


FIGURA 5.61 – Estrutura molecular de Q4A_CR_10

Através do experimento de NOE-Diff, foi possível estabelecer a configuração do novo centro estereogênico. A intensidade do sinal H-12 foi afetada ao irradiar-se o hidrogênio H-6. A irradiação H-11 aumentou a intensidade dos sinais de H-4 ad H-6, indicando sua configuração *cis*. Estes resultados permitiram estabelecer a posição da Me-12 como axial.

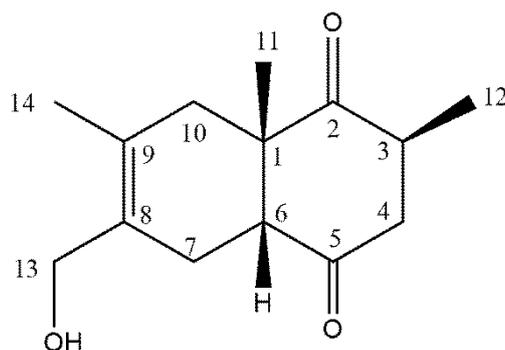


FIGURA 5.62 Estrutura de molecular de Q4A_CR_10 estabelecida após experimentos de NOE-diff

A otimização estrutural foi feita utilizando-se o nível de teoria B3LYP/6-31+G(d,p). Foram calculadas as frequências vibracionais no mesmo nível de teoria e não foram observados valores negativos de frequência, caracterizando a estrutura como mínimo local.

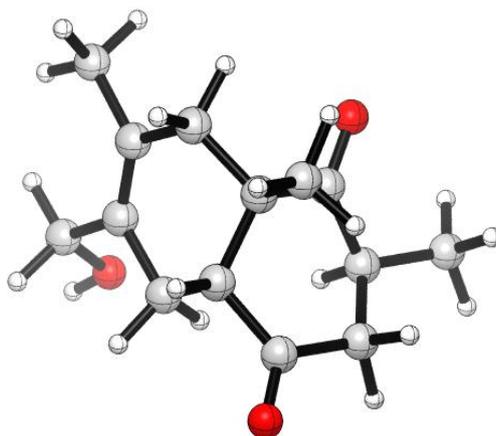


FIGURA 5.63 – Estrutura tridimensional de Q4A_CR_10

5.3.2.4.2 – Substância Q4A_CR_15

A substância Q4A_CR_15 (4.5 mg, R= 1,95%) foi obtida como um sólido marrom-amarelado ($[\alpha]_D^{30} = -30,1^\circ$). Seu espectro de massas de alta resolução revelou um pico de íon *quasi* molecular em m/z 221,1531, referente à fórmula molecular $C_{14}H_{20}O_2$ (calc. 220,1463 Da; obs. 220,1522), indicando 5 graus de insaturação e, portanto, uma redução.

Essa mesma fórmula foi obtida para (4 α ,4 $\alpha\beta$,8 $\alpha\beta$)- 4,4 α ,5,8,8 α -Pentahidro-4-hidroxi-3,4 α ,6,7-tetrametilnaftalen-1-ona por Liu & Burnell. Os dados obtidos para este composto são coincidentes com aqueles reportados, confirmando a sua identificação.

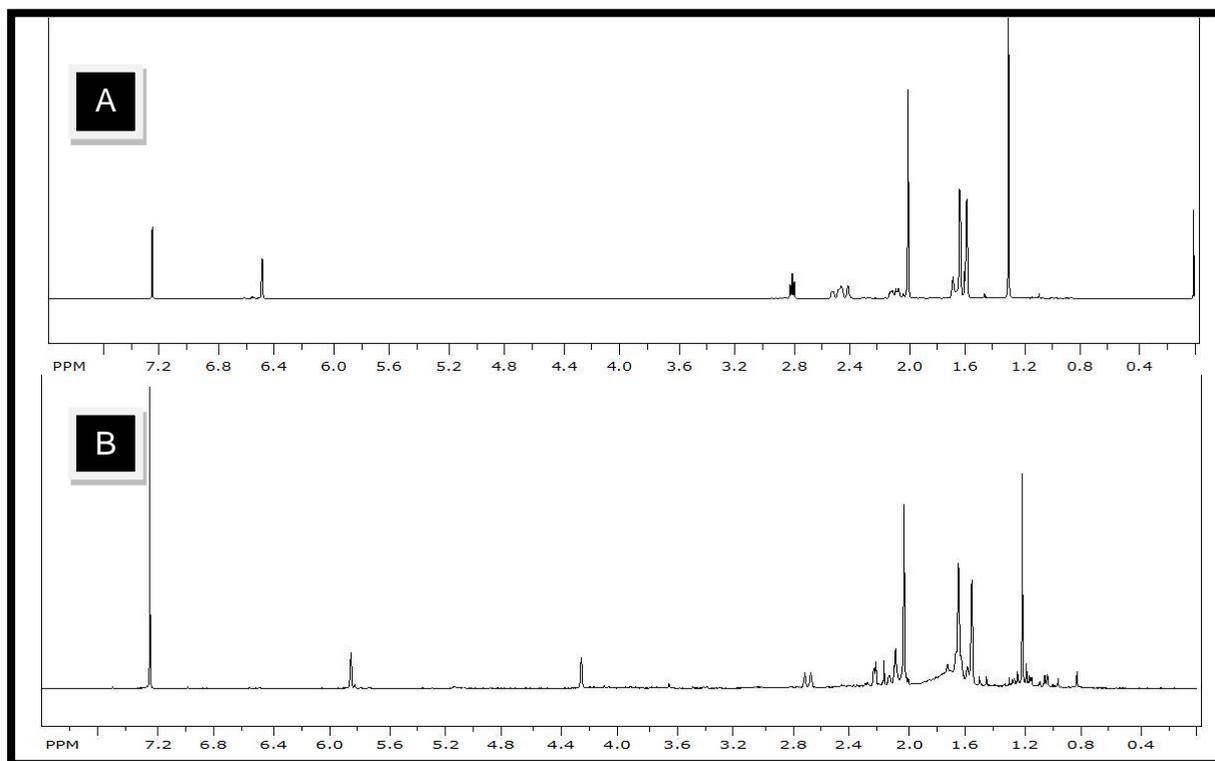


FIGURA 5.64 – Espectros de ^1H RMN de A) substrato Q4 e B) Q4A_CR_15. (CDCl_3 , 400 MHz)

Para confirmar tal hipótese e determinar em qual das carbonilas haveria ocorrido a redução (C-2 ou C-5), observou-se as correlações ^1H - ^1H e ^1H - ^{13}C do hidrogênio carbinólico δ 4,26 no espectro de COSY e HMBC, respectivamente. Para as correlações ^1H - ^1H , observou-se que esse hidrogênio correlacionava com os hidrogênios em δ 2,01 e 5,87. Já no HBMC, observou-se o acoplamento deste com o carbono δ_c 159,8. Desta forma, estabeleceu-se que a redução ocorreu na carbonila C-2.

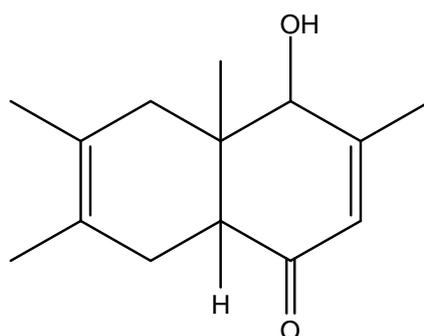


FIGURA 5.65 – Estrutura molecular de Q4A_CR_15

A irradiação de H-11 (δ 1,19) foi suficiente para estabelecer a configuração de H-2, pois esta resultou no aumento da intensidade dos sinais de H-2 e H-6, indicando que sua configuração é *cis*.

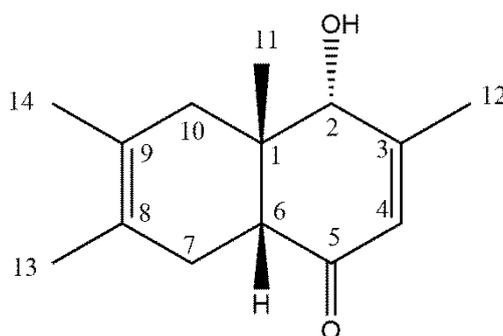


FIGURA 5.66 – Estrutura de molecular de Q4A_CR_15 estabelecida após experimentos de NOE-diff

A otimização estrutural foi feita utilizando-se o nível de teoria B3LYP/6-31+G(d,p). Foram calculadas as frequências vibracionais no mesmo nível de teoria e não foram observados valores negativos de frequência, caracterizando a estrutura como mínimo local.

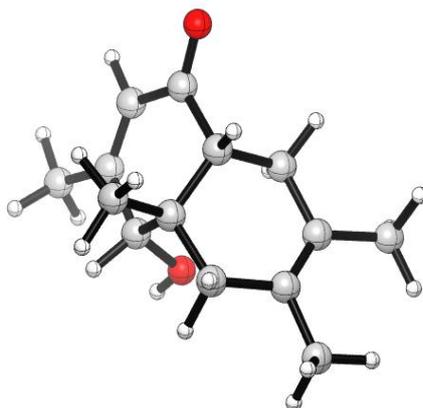


FIGURA 5.67 – Estrutura tridimensional de Q4A_CR_15

5.3.2.4.3 – Substância Q4A_CR_20

A substância Q4A_CR_20 (2.0 mg, R=0,86%) foi obtida como um sólido amarelado ($[\alpha]_D^{30} = -21,2^\circ$). Seu espectro de massas de alta resolução revelou um pico de íon *quasi* molecular em m/z 223.1699 e como fórmula molecular $C_{14}H_{22}O_2$ (calc. 222,1620 Da; obs. 222,1690), indicando 4 graus de insaturação e portanto, duas reduções.

Os espectros de 1H e ^{13}C obtidos para esta amostra eram muito similares àqueles obtidos para Q4_CR_15, exceto pela ausência do sinal do sinal em 5,87 (δ_c 126,2) e a ausência de um sinal carbonílico em C-2 (δ_c 203,0), e a presença de sinais em 3,21 (δ_c 34,7), 1,63 e 2,18 ppm (ambos ligados ao δ_c 43,0), indicando uma provável redução enzimática do grupo carbonila e da dupla conjugada.

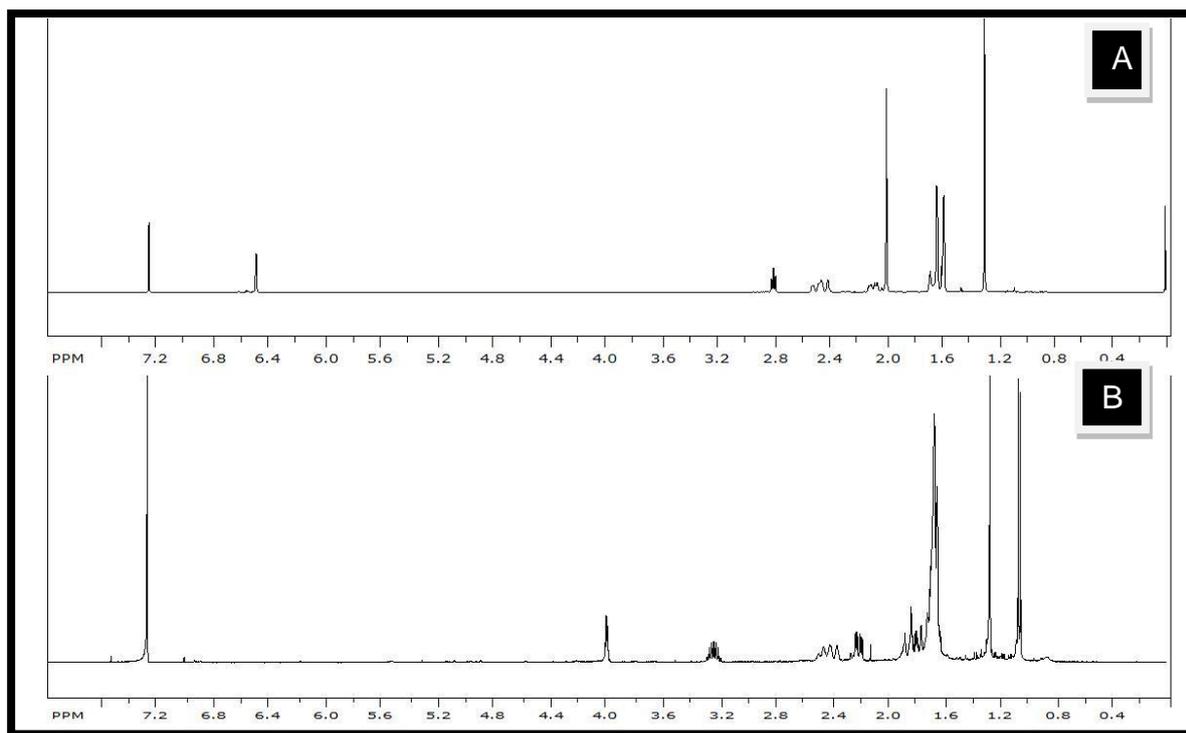


FIGURA 5.68 – Espectros de ^1H RMN de A) substrato Q4 e B) Q4A_CR_20. (CDCl_3 , 400 MHz)

A redução da olefina foi confirmada pelo espectro de COSY devido ao acoplamento entre os hidrogênios em δ 3,21 com δ 1,03 e δ 1,63 com δ 2,18. Além disso, o espectro de COSY foi fundamental para determinar em qual carbonila houve redução: pela correlação entre os hidrogênios δ 3,97 e os hidrogênios em δ 1,78 e δ 2,18.

O espectro de HBMC mostrou correlações do tipo J^3 entre o hidrogênio carbinólico e os carbonos δ_c 47,0 e C-3 δ_c 34,7. Também observou-se a correlação dos hidrogênios metílicos (1,17 ppm) com os carbonos 34,7; 43,0 e 217,3. Através destes resultados, é possível aferir que a redução carbonílica ocorreu no carbono C-5.

TABELA 5.18 – Dados de RMN para a substância Q4A_CR_20

N°	¹ H (ppm),Int.	Mult, J (Hz)	¹³ C	COSY	HMBC
1			47,0		
2			217,3		
3	3,21, 1H	sepd; 6,05; 1,12	34,7	1,03; 1,63; 2,18	14,4; 217,3
4	1,63, 1H	m	43,0	3,22; 2,18; 3,97	34,7
	2,18, 1H	ddd; 14,0; 5,38; 2,51	43,0	1,63; 3,97	34,7; 45,9; 69,2; 217,3
5	3,97, 1H	quad; 2,73	69,2	1,78; 2,18	34,7; 47,0
6	1,78, 1H	m	45,9	2,40; 3,97	45,9; 123,0; 124,2
7	1,83 (1,80-1,83), 2H	m	32,1	2,40	123,0; 124,2
8			124,2		
9			123		
10	1,71, 1H	d	41,6	2,40	45,9; 123,0; 124,2
	2,40, 1H	m	41,6	1,71; 1,83	123,0; 124,2
11	1,24, 3H	d; 0,83	19,9	2,40	41,6; 47,0; 217,3
12	1,03, 3H	d; 6,52	14,4	3,21	34,7; 43,0; 217,3
13	1,62, 3H	s,l	19,2	2,18	41,6; 123,0; 124,2
14	1,64, 3H	s,l	18,6	2,40	32,1; 123,0; 124,2

A configuração relativa foi determinada através dos experimentos de NOE-Diff. A irradiação de H-3 promoveu o aumento da intensidade dos sinais de H-11 e H-4. Por sua vez, ao irradiar H-6, observou-se aumento das intensidades de H-5 e H-7, indicando que todos esses hidrogênios estão em configuração axial. Por fim, ao irradiar H-7, observou-se o acoplamento deste com o H-5 indicando que este deve estar em *cis* com H-7 para que seja observado acoplamento espacial.

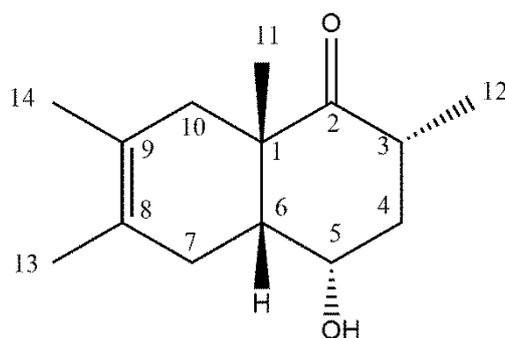


FIGURA 5.69 – Estrutura molecular de Q4A_CR_20 após experimentos de NOE-Diff

A otimização estrutural foi feita utilizando-se o nível de teoria B3LYP/6-31+G(d,p). Foram calculadas as frequências vibracionais no mesmo nível de teoria e não foram observados valores negativos de frequência, caracterizando a estrutura como mínimo local.

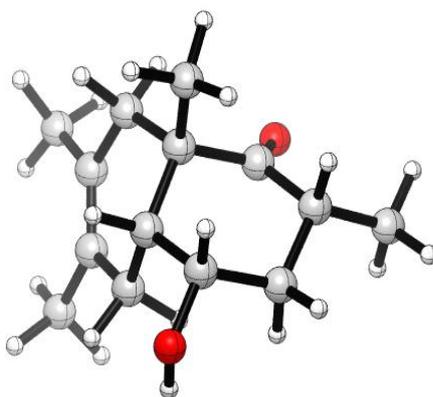


FIGURA 5.70 – Estrutura tridimensional de Q4A_CR_20

5.3.2.4.4 – Substância Q4A_CR_23

A substância Q4A_CR_23 (2.8 mg, R= 1,21%) foi obtida como um sólido amarelado ($[\alpha]_D^{30} = -141,2^\circ$). Seu espectro de massas de alta resolução revelou um íon *quasi* molecular em m/z 221,1544, referente a fórmula molecular $C_{14}H_{20}O_2$ (220,1463 Da; obs. 220,1535), indicando 5 graus de insaturação (um a menos do que aquele calculado para o substrato) e portanto, uma redução ocorreu.

Os espectro de 1H obtido para esta substância mostrou-se muito similar a Q4 (FIGURA 5.71), exceto pela presença de um sinal em δ 5,87 (δ_c 126,2) e pela presença de sinais em 3,03 (δ_c 39,8), 2,21 e 2,78 ppm (ambos ligados ao carbono δ_c 42,6). Tal perfil já for a observado anteriormente em outros produtos de biotransformação e indica que houve redução da dupla conjugada.

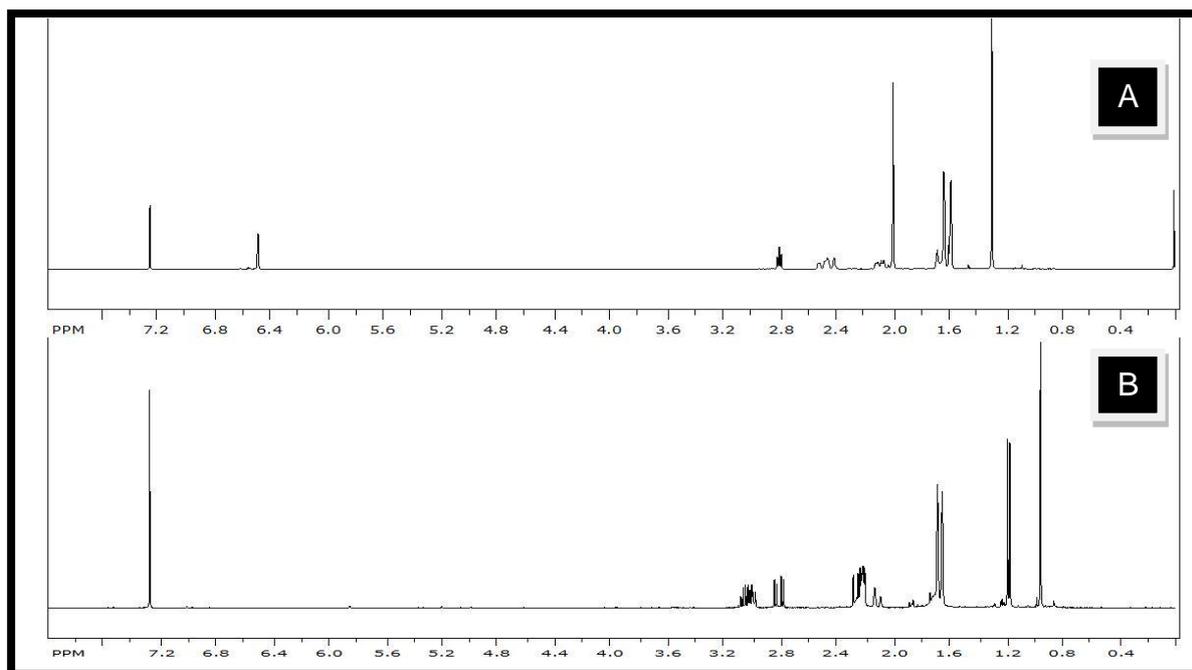


FIGURA 5.71 – Espectros de ^1H RMN de A) substrato Q4 e B) Q4A_CR_23. (CDCl_3 , 400 MHz)

Para confirmar esta hipótese, bastou observar as correlações ^1H - ^1H no espectro dos hidrogênios δ 3,03 com δ 1,15 e δ 2,21 com δ 2,78 e 3,03. O espectro de HBMC também confirmou a hipótese inicial através das correlações entre os hidrogênios em 3,03 ppm e os carbonos δ_c 45,15, δ_c 209,8 e δ_c 18,4; hidrogênios em 2,21 e 2,78 e os carbonos δ_c 215,9, δ_c 39,8, δ_c 209,8 e 13,8. A fim de estabelecer a configuração do centro quiral gerado pela redução, irradiou-se o hidrogênio H-11 (0,93 ppm) e observou-se o aumento do sinal de H-4. A irradiação de H-6 também ocasionou o aumento do sinal de H-4 e H-12, indicando estarem os todos na mesma face. Desta forma, propôs-se a estrutura mostrada a seguir.

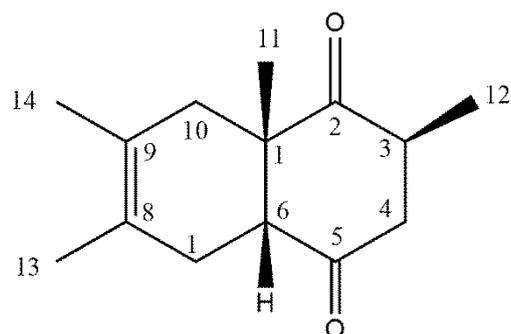


FIGURA 5.72 – Estrutura molecular de Q4A_CR_23

A otimização da estrutura tridimensional de Q4A_CR_23 segue mostrada na figura a seguir.

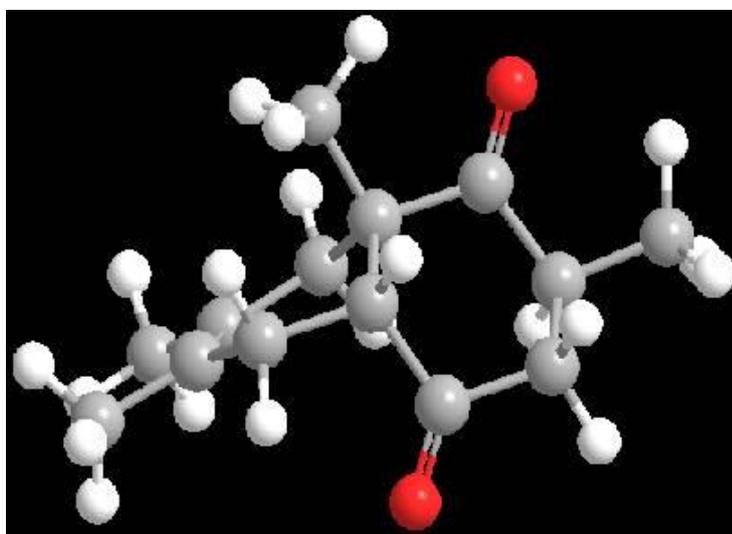


Figura 5.73 - Estrutura tridimensional de Q4A_CR_23

Assim, a biotransformação de Q4 por células residuais de *P. br.* pode ser resumida em:

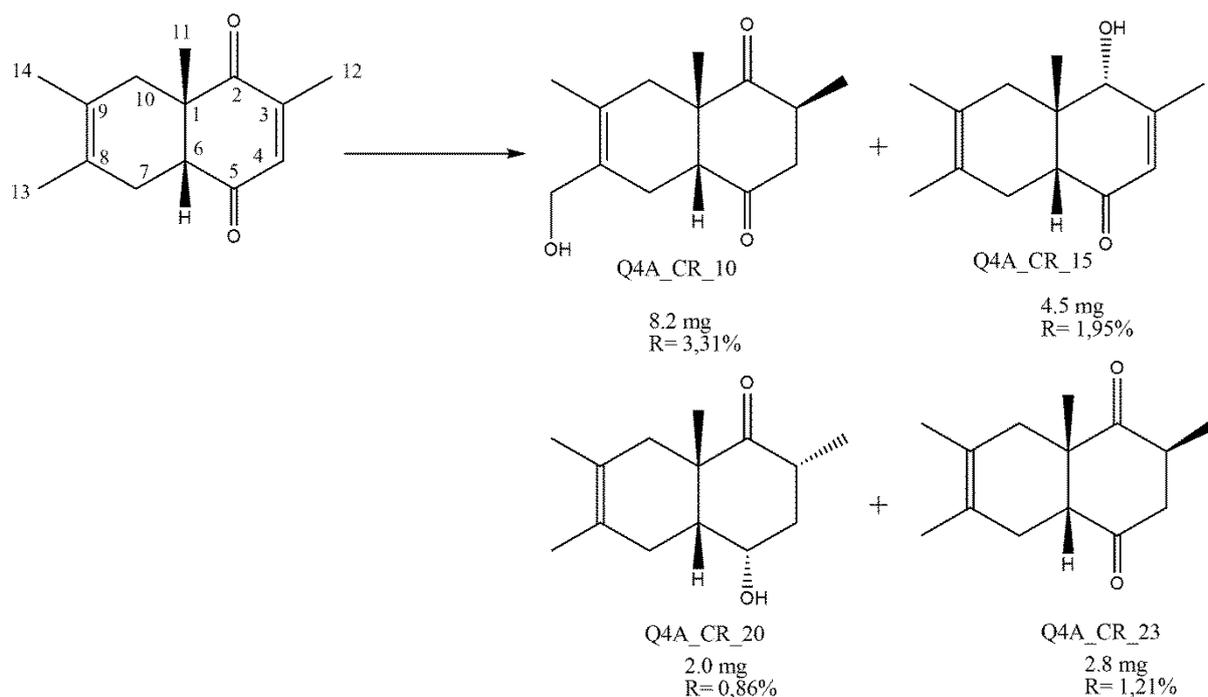


FIGURA 5.74 – Resumo da biotransformação de Q4 por células residuais de *P. brasilianum*

5.3.2.5 – Biotransformação de Q5 por células residuais de *P. brasilianum*

A biotransformação de Q5 por *P. brasilianum* levou ao isolamento de duas substâncias: Q5A_CR_15 (3,2 mg) e Q5A_CR_18 (26,1 mg).

A elucidação estrutural foi feita comparando-se os dados dos produtos obtidos com aqueles referentes ao substrato Q4. A descrição dos dados encontra-se na tabela a seguir.

5.3.2.5.1 - Substância Q5A_CR_15

A substância Q5A_CR_15 ($[\alpha]_D^{30} = +25,4^\circ$) foi obtida como um sólido amarelo (3,2 mg, R= 1,83%). A sua fórmula molecular $C_{14}H_{18}O_3$ (calc. 218,1307 Da, obs. 218,1474 Da) foi obtida através da análise de HRMS, indicando seis graus de insaturação. Por comparação com os espectros de 1H de Q5, foi possível verificar que a porção relativa ao dieno permaneceu intacta. Os espectros de RMN de 1H e ^{13}C mostraram a presença de sinais de hidrogênios carbinólicos em δ 4,47 (δ_c 77,1) e δ

4,27 (δ_c 61,0) e a presença da ligação dupla conjugada em δ_c (6,65 ppm) e δ_c 137,3. Através do espectro de COSY, foi possível observar as correlações de δ 4,47 com δ 4,27 e 6,65. O espectro HMBC mostrou correlações de δ 4,27 com δ_c 137,3, 146,1 e 200,9 ; δ 4,47 com δ_c 11,6 , 43,3 , 137,3 e 146,1 ; δ 6,65 com δ_c 43,3 , 61,0 e 200,9 Estes dados indicaram a presença da função éter, ligado entre os hidrogênios δ 4,27 (H-12) e 4,47 (H-5). A configuração relativa de H-5 foi determinada através de experimentos NOE-Diff. A irradiação de H-5 no experimento NOE-Diff promoveu o aumento da intensidade do sinal de H-6, no entanto a intensidade de H -11 não foi afetada. Este fato indica que H-5 e H-6 têm a mesma configuração (*cis*), mas H -11 não. Assim, H-5 e H-6 são *cis* e H-11 e H-5 (ou H- 11 e H-6) são *trans* .

TABELA 5.19 – Dados de RMN para a substância Q5A_CR_15

N°	¹ H (ppm),Int.	Mult, J (Hz)	¹³ C	COSY	HMBC
1			43,3		
2			201,4		
3			146,1		
4			137,3		
5	4,47, 1H	q; 1,8	77,1	4,27; 6,65	11,6; 43,3; 137,3; 146,1
6	2,40, 1H	dd; 6,2; 10,8	49,7	2,05; 2,40	11,6; 27,9; 43,3; 77,1; 200,9
7	2,05, 1H	m	44,5	1,66; 2,20	49,7; 11,6; 43,3
	2,20, 1H	m	44,5	2,05; 2,40	49,7
8			123,5		
9			122,5		
10	2,24, 2H	m	27,9	1,61; 2,40	49,7
11	0,81, 3H	s,l	11,6	2,20; 2,40	44,5; 49,7; 77,1
12	4,27, 2H	dt; 1,4; 11,4	61,0	4,47; 6,65	137,3; 146,1; 200,9
13	1,66, 3H	s,l	18,8	2,20	27,9; 122,5; 123,4
14	1,61, 3H	s,l	19,0	2,24	44,5; 122,5; 123,4

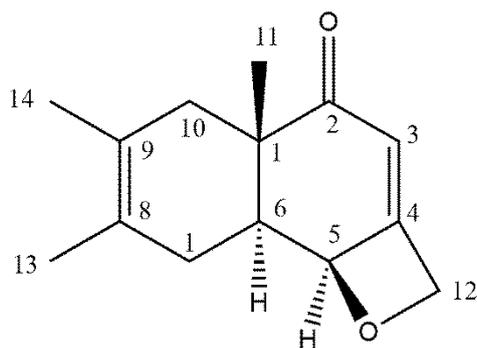


FIGURA 5.75 – Estrutura química da substância Q5A_CR_15

A estrutura tridimensional de Q5A_CR_15 foi otimizada utilizando-se o *software* ChemBioDraw® gerando a estrutura abaixo mostrada.

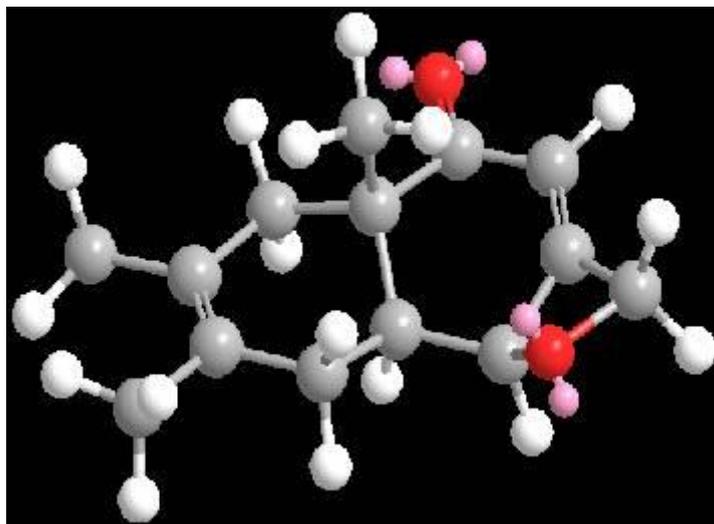


Figura 5.76 - Estrutura tridimensional de Q5A_CR_15

A estrutura molecular de Q5A_CR_15 é bastante interessante do ponto de vista da química orgânica, uma vez que a formação de oxetano (éter cíclico de 4 membros) ocorre a partir de uma cicloadição fotoquímica [2+2] entre um composto carbonílico e um alceno (reação de Paterno-Büchi). A síntese de oxetano também pode ser feita através de uma reação intramolecular do tipo Williamsoms. (BURKHARD, 2010)

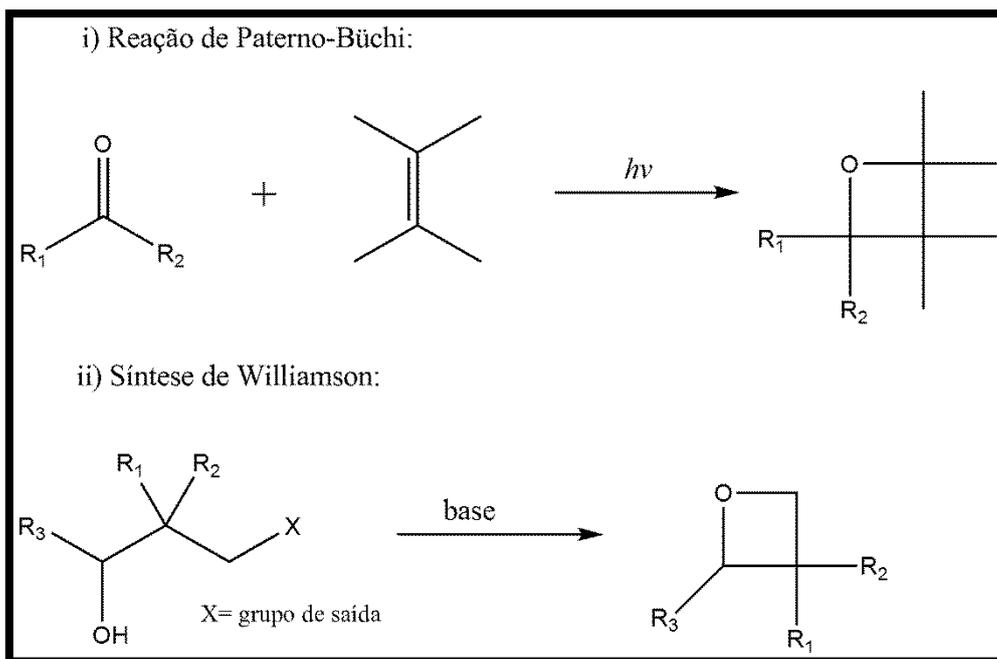


Figura 5.77 - Reações de formação de éter

Através do estudo de retrosíntese da substância Q5A_CR_15, pode-se observar que o mecanismo da síntese de Williamson pode explicar a formação deste produto de biotransformação, uma vez que a reação ocorre entre o álcool do carbono C-1 e o carbono C-3 que contém o grupo de saída. Primeiramente, deve ocorrer a redução da carbonila C-5, levando à formação do álcool correspondente. Também deve ocorrer a oxidação alílica da metila Me-12 e em seguida, a fosforilação desta para a formação de um bom grupo de saída. Em seguida, através de um ataque nucleofílico da hidroxila ao carbono C-12 ocorre a ciclização e formação do éter.

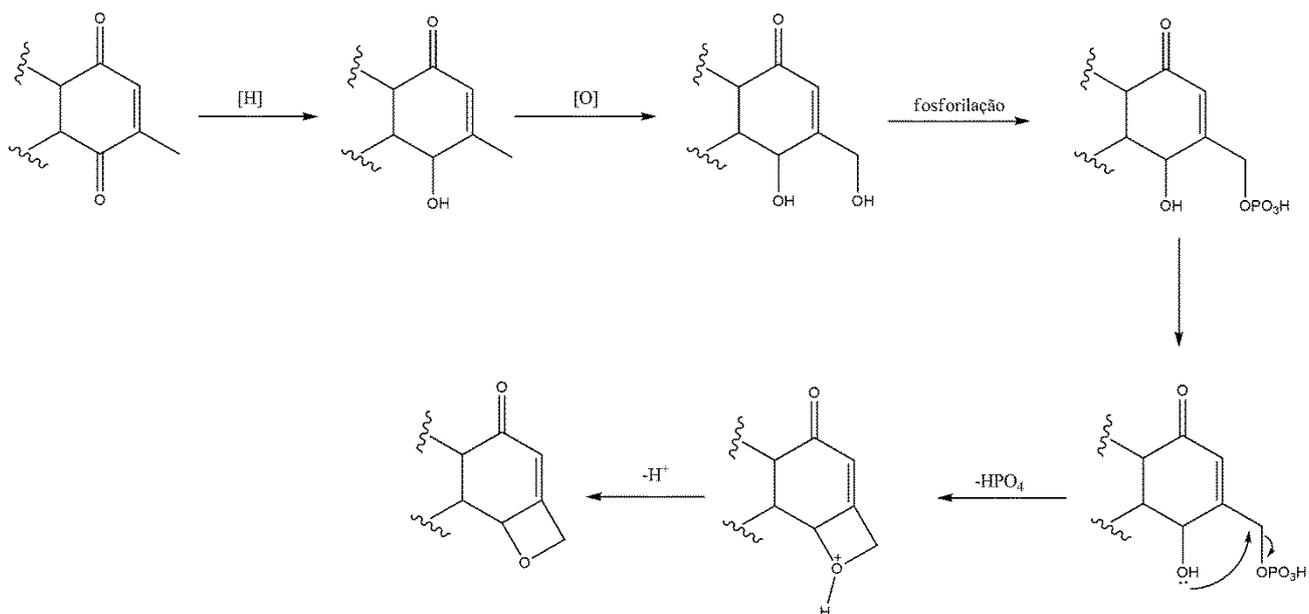


Figura 5.78 - Proposta mecanística para a formação do produto de biotransformação Q5A_CR_15

Outra proposta mecanística pertinente que pode explicar a formação do mesmo produto de biotransformação é aquela em que há redução da carbonila C-5 à álcool e formação de radicais na hidroxila e na metila C-12, como mostrado a seguir. Então, através de uma reação radicalar, ocorre a formação do éter oxetano.

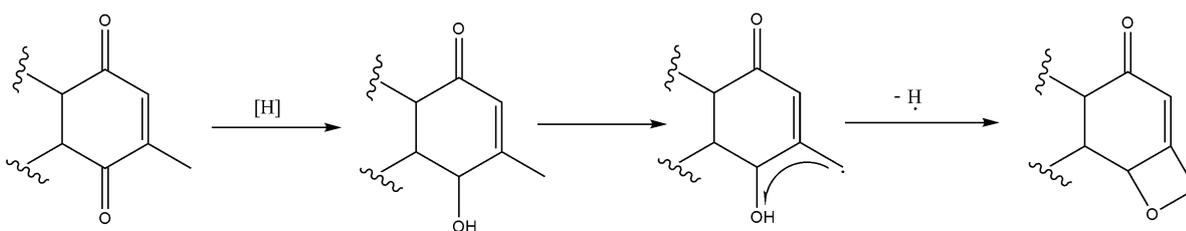


Figura 5.79 - Formação da substância Q5A_CR_15 via reação radicalar

A formação do radical metilênico é facilitada pela presença do sistema α,β -insaturado que permite a delocalização eletrônica radicalar conferindo maior estabilidade ao radical formado.

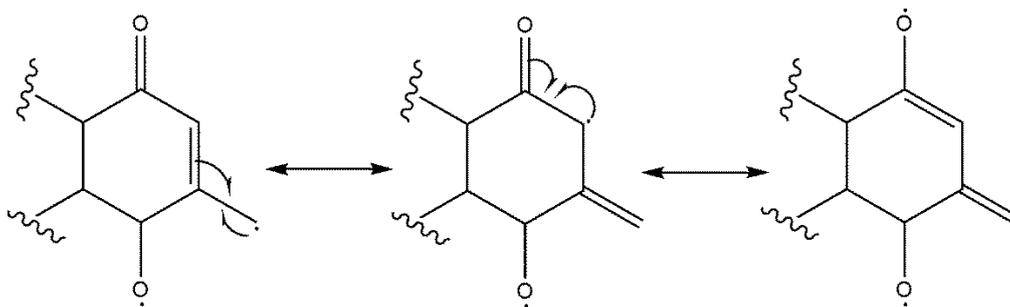


Figura 5.80 - Estruturas de ressonância do intermediário radicalar de Q5A_CR_15

5.3.2.5.2 - Substância Q5A_CR_18

A substância Q5A_CR_18 ($[\alpha]_D^{30} = -41,1^\circ$) foi obtida como um sólido amarelo (26.1 mg, R= 14,82%). Através da análise de HRMS, observou-se um pico de íon *quasi* molecular em m/z 221.1531 correspondente a fórmula $C_{14}H_{20}O_2$ (calc. 220.1463). Essa mesma fórmula foi obtida para (4 α ,4 $\alpha\beta$,8 $\alpha\beta$)-4,4 α ,5,8,8 α -Pentahidro-4-hidroxi-2,4 α ,6,7-tetrametilnaftalen-1-ona por Liu & Burnell. Os dados obtidos para este composto são coincidentes com aqueles reportados, confirmando a sua identificação.

Tabela 5.20 – Dados de RMN para a substância Q5A_CR_18

N°	¹ H (ppm),Int.	Mult, J (Hz)	¹³ C	COSY	HMBC
1			42,1		
2	4,36, 1H	quint; 2,17	75,4	1,76	23,6; 33,4; 134,7; 144,7
3	6,45, 1H	quint; 1,66	144,7	1,76; 4,35	15,6; 42,1; 199,4
4			134,7		
5			199,4		
6	2,18, 1H	dt; 3,40; 1,15	50,2	2,04	23,6; 27,4; 33,4; 42,1; 75,4; 123,5; 199,4
7	2,04, 1H	m	27,4	1,55; 2,70	50,2; 199,4
	2,70, 1H	d; 16,0	27,4	2,04	18,8; 42,1; 50,2; 123,5; 199,4
8			123,5		
9			122,6		
10	1,55, 1H	d; 7,79	33,4	2,09	42,1; 50,2; 122,6; 123,5
	2,09, 1H	m	33,4	1,55	23,6; 122,6; 123,5
11	1,17, 3H	s	23,6		33,4; 42,1; 50,2; 144,7; 199,4
12	1,76, 3H	dd; 1,48; 2,24	15,6	4,36; 6,45	134,7; 144,7; 199,4
13	1,64, 3H	s,l	18,8	1,53; 2,09	27,4; 122,6; 123,5
					19,5; 33,4; 45,17; 50,2; 122,6;
14	1,53, 3H	s,l	19,5	2,09; 2,70	123,5

Assim, a estrutura de Q5A_CR_18 com a devida estereoquímica segue mostrada abaixo.

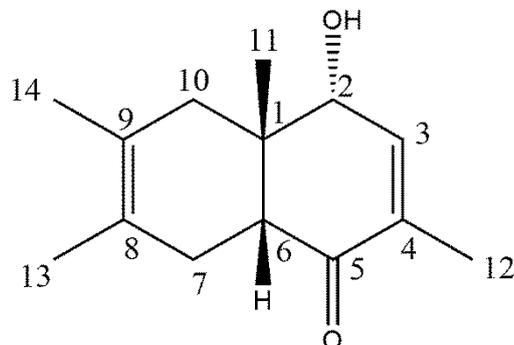


Figura 5.81 – Estrutura química de Q5A_CR_18

A biotransformação de Q5 segue resumida na figura a seguir.

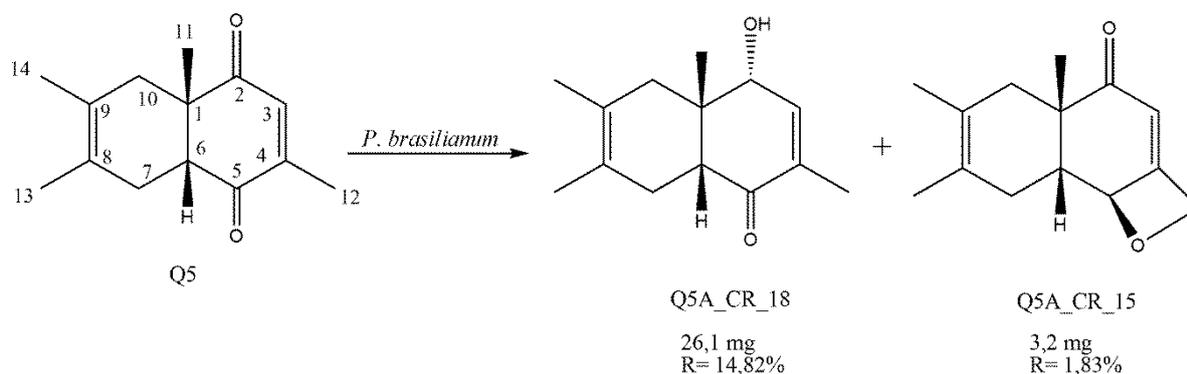


Figura 5.82 – Biotransformação de Q5 por *P. brasilianum*

5.4 – Considerações sobre os produtos de biotransformações

Ao analisar os diferentes produtos de biotransformações obtidos, pode-se observar que a ponte presente nos substratos Q1, Q2 e Q3 é responsável por dirigir as reações de epoxidação das duplas isoladas, fato não observado para os substratos que não continham a ponte. Deste modo, é possível afirmar que a presença da ponte permite a atuação de enzimas responsáveis pela epoxidação, enquanto que a ausência desta não promove tais reações.

Ainda com relação a ausência da ponte (substratos Q4 e Q5), é possível observar que este fato dirige a redução das carbonilas C-5, o que não é observado para os substratos que contem a ponte. Assim, a atuação de enzimas do tipo álcool desidrogenase só foi possível em substratos cuja ponte se fazia ausente. Além disso, é possível afirmar que a redução leva à formação de um álcool *trans* em relação à metila da junção de anel, de forma que a reação é estereosseletiva.

Com relação a redução da dupla conjugada, observou-se que esta pôde ser reduzida em substratos que continham ou não a ponte, indicando que as enzimas envolvidas neste processo – possivelmente enzimas do tipo enoato redutase, OYE – aceitam ambos os tipos de substratos.

5.5 -Ensaio de fitotoxicidade dos substratos Q1-Q5

O teste de fitotoxicidade revelou a possível potencialidade dos substratos frente aos coleótilos de trigo. A tabela abaixo resume os resultados obtidos.

Tabela 5.21 – Tamanho dos coleótilos de trigo (cm) do ensaio de fitotoxicidade dos substratos Q1-Q5

Tratamento	10^{-5} M	3×10^{-5} M	10^{-4} M	3×10^{-4} M	10^{-3} M
Q1	0,440 ± 0,052 a	0,454 ± 0,008 a	0,458 ± 0,058 b	0,460 ± 0,006 c	0,369 ± 0,029 ab
Q2	0,477 ± 0,077 a	0,455 ± 0,019 a	0,443 ± 0,006 b	0,417 ± 0,002 abc	0,396 ± 0,030 b
Q3	0,498 ± 0,089 a	0,495 ± 0,072 a	0,432 ± 0,089 b	0,405 ± 0,084 bc	0,391 ± 0,072 b
Q4	0,417 ± 0,090 a	0,438 ± 0,096 a	0,403 ± 0,052 ab	0,361 ± 0,037 ab	0,340 ± 0,058 ab
Q5	0,477 ± 0,037 a	0,438 ± 0,096 a	0,423 ± 0,019 ab	0,395 ± 0,072 bc	0,320 ± 0,020 a
Goal®	0,455 ± 0,008 a	0,434 ± 0,017 a	0,350 ± 0,006 a	0,332 ± 0,013 a	0,300 ± 0,007 a

Como pode ser observado, nas concentrações de 10^{-5} M e $3 \cdot 10^{-5}$ M, os substratos não apresentaram diferença significativa nos testes estatísticos indicando que estes possuem o mesmo potencial fitotóxico que o herbicida Goal®. O mesmo também foi observado para o substrato Q5 na concentração de 10^{-3} M. Assim,

observa-se que estas substâncias apresentam um possível potencial fitotóxico, porém, mais estudos precisam ser realizados a fim de confirmar tal potencialidade.

5.6 – Reações de redução e epoxidação

As reações de redução *in vitro* foram realizadas a fim de obter os produtos reduzidos da dupla conjugada de Q2, Q3, Q4 e Q5 – substratos cujos produtos de biotransformação tiveram tal dupla reduzida em pelo menos um de seus produtos. Isso foi feito para que se pudesse avaliar a enantiosseletividade do processo enzimático frente a enantiosseletividade dos processos realizados *in vitro*.

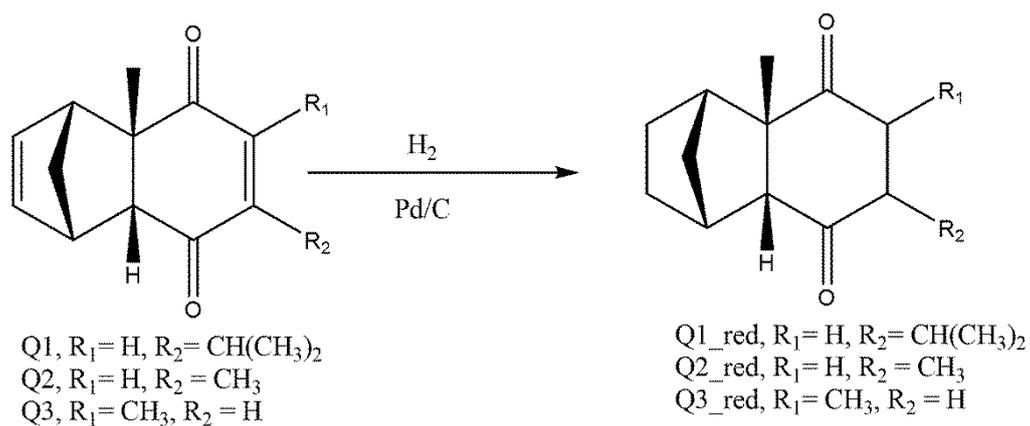
Por sua vez, as reações de oxidação com MCPBA foram realizadas com a finalidade de obter os respectivos epóxidos dos substratos Q2 e Q3 para que se pudesse avaliar a sua abertura em meio tamponado (fosfato, 10 mM, pH 7,2).

Assim, dois procedimentos foram testados para realizar as reações de redução: 1) utilizando-se H₂ com catálise por Pd e 2) reação de ácido acético com catálise por Zn_(s). Como buscava-se uma metodologia seletiva, optou-se por dar continuidade às reações utilizando-se zinco e ácido acético.

As reações de redução *in vitro* da dupla carbonila também foram feitas valendo-se do mesmo das reações de redução da carbonila: busca por uma metodologia seletiva para a redução de carbonilas.

5.6.1 – Redução química de Q1, Q2 e Q3 utilizando-se H₂/Pd

A fim de buscar uma metodologia eficiente para a redução da dupla ligação do sistema α,β -insaturado, testou-se a redução utilizando-se H_{2(g)} como agente redutor e Pd_(s) como catalisador.

ESQUEMA 5.1 – Esquema reacional de redução com H₂/Pd

Os produtos obtidos foram analisados por ¹H e o que se observou foi que esta metodologia não era seletiva para a redução da dupla conjugada, pois ambas as duplas presentes no material de partida foram reduzidas levando ao desaparecimento dos sinais olefínicos situados entre 6,0 – 6,5 ppm.

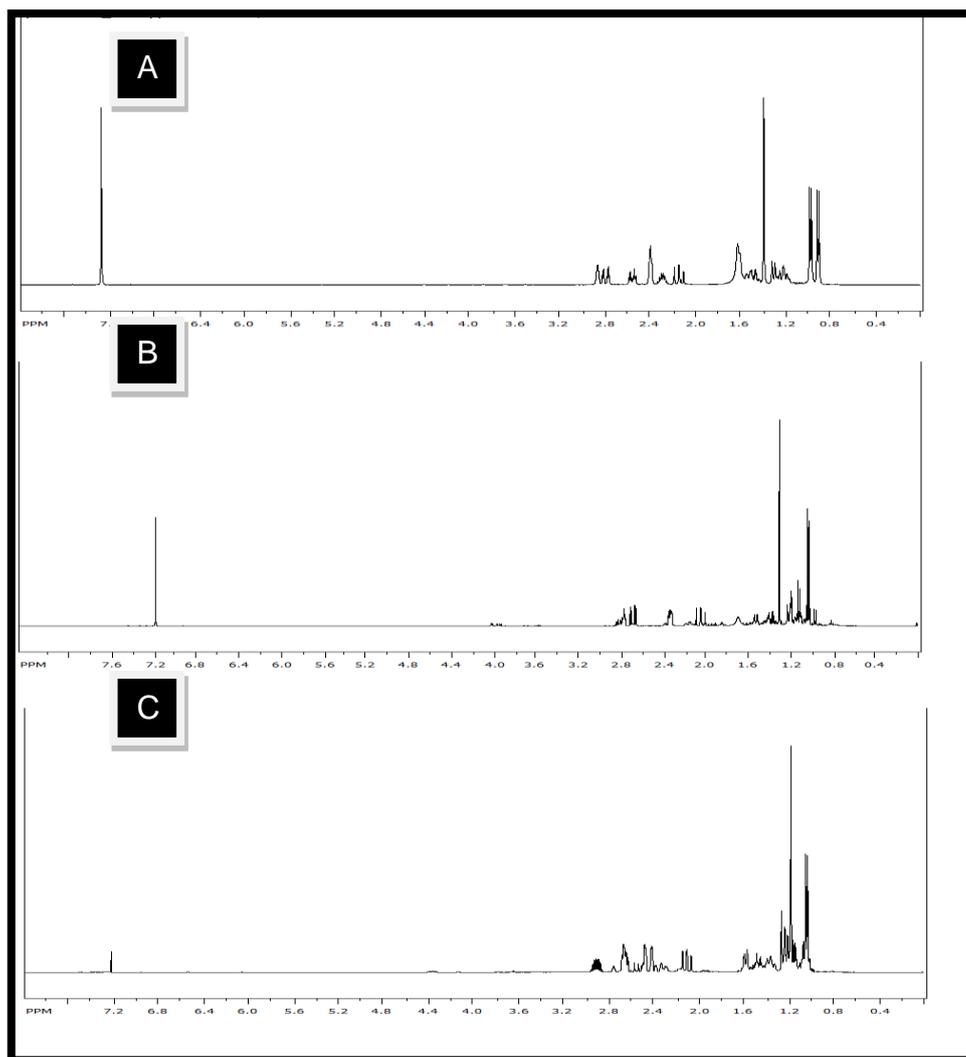
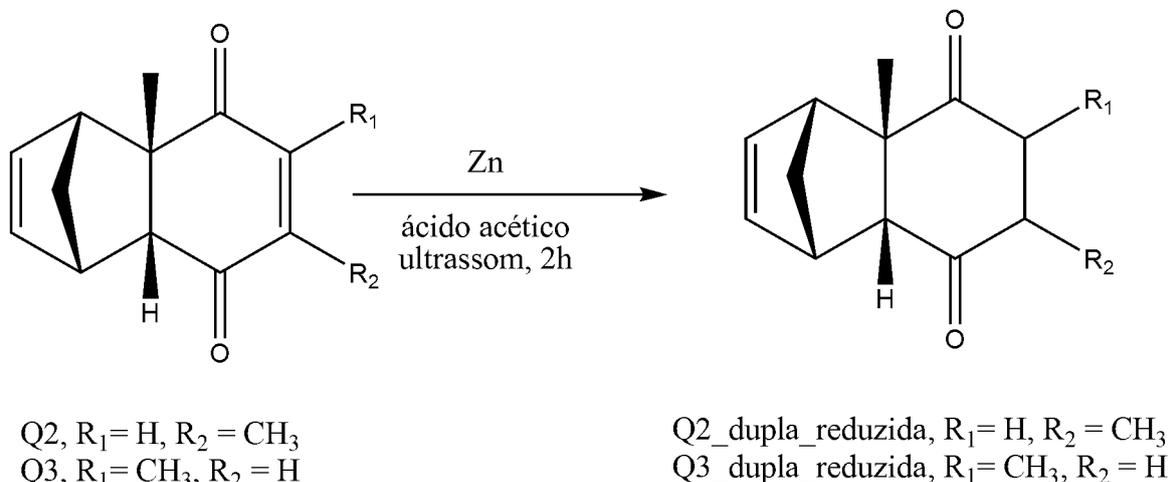


FIGURA 5.83 – Espectros de ¹H dos produtos reduzidos utilizando-se como material de partida A) Q1, B) Q2 e C) Q3

Como pode-se observar pelos espectros da FIGURA 5.83, não há sinais característicos de hidrogênios olefínicos, o que comprova a redução de ambas as duplas ligações. Assim, testou-se uma nova metodologia utilizando-se Zn_(s) e ácido acético. Além disso, não se obteve bons rendimentos quando comparado àqueles obtidos para a reação com zinco e ácido acético (~10%).

5.6.2 – Redução química seletiva de Q2, Q3 e Q4 utilizando-se Zn/Ácido acético

Ao contrário da reação de redução com $H_{2(g)}$ e $Pd_{(s)}$, a reação com $Zn_{(s)}$ e ácido acético glacial foi seletiva à redução da dupla conjugada, reduzindo apenas esta ligação, como pode ser visualizado no esquema a seguir.



ESQUEMA 5.2 – Reação de redução dos substratos Q2-Q4 utilizando-se Zn e ácido acético

O sucesso da reação foi evidenciado pela análise de 1H dos produtos obtidos, em que se observou a ausência do sinal referente à dupla conjugada em aproximadamente 6,5 ppm e o aparecimento de sinais mais blindados referente aos hidrogênios metínicos e metilênicos provenientes da redução da dupla conjugada. Além de robusta, a reação gerou produtos praticamente puros e com excelentes rendimentos (aprox. 90%).

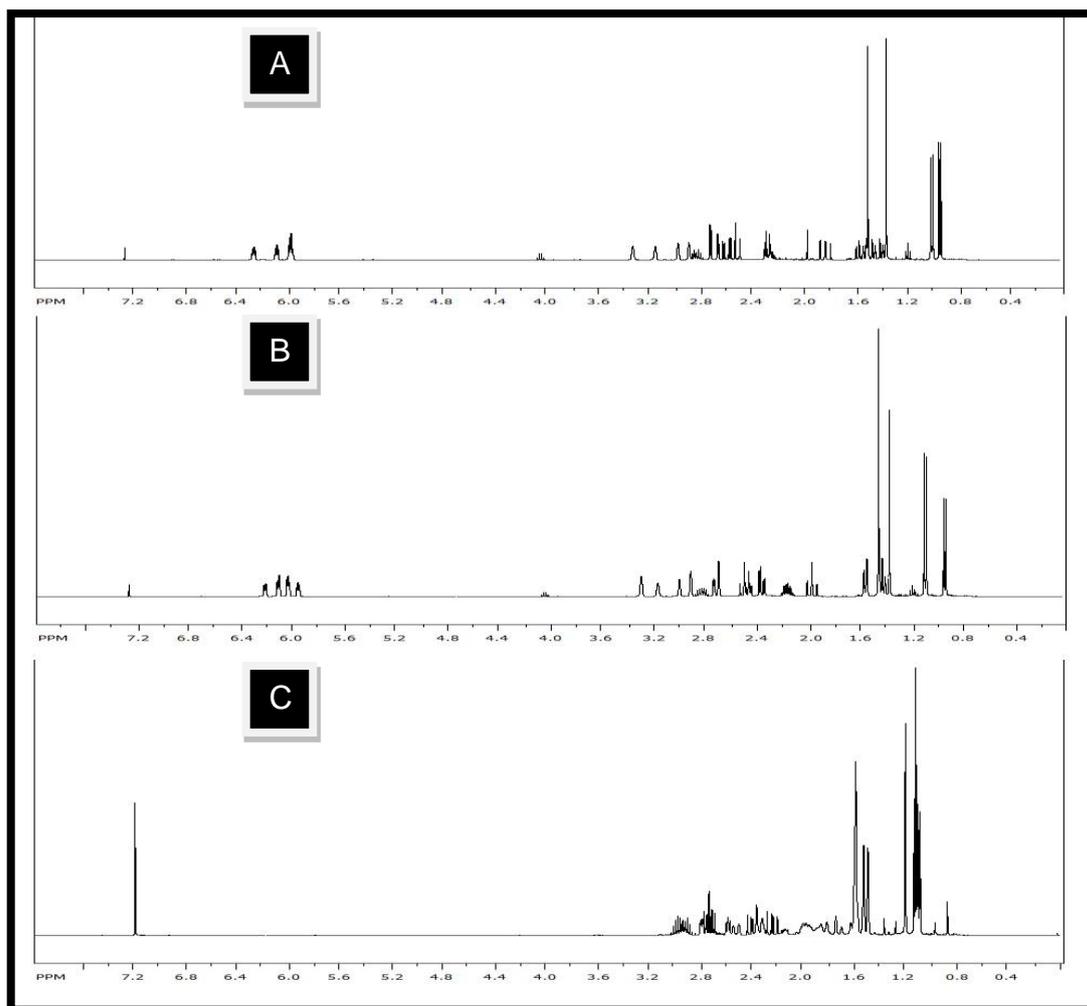


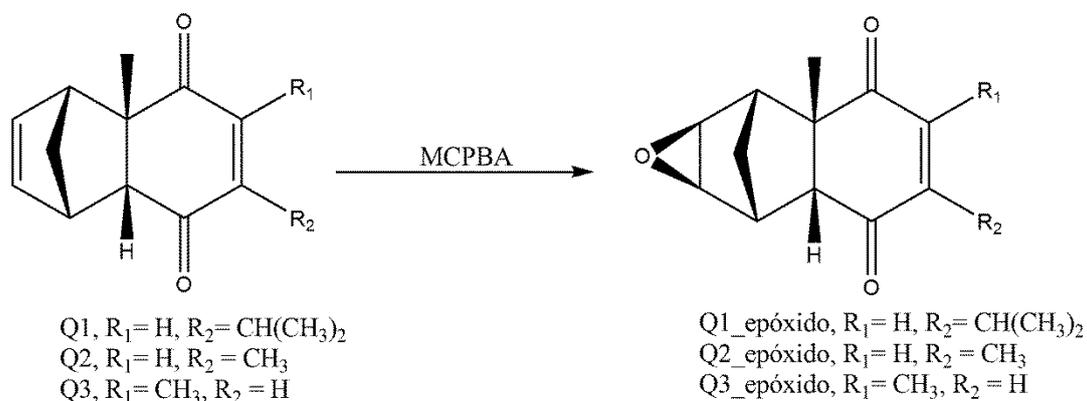
FIGURA 5.84 – Espectros dos compostos reduzidos com zinco e ácido acético: A) Q2, B) Q3 e C) Q4 (CDCl_3 , 400 MHz)

Em todos os casos, pode-se observar que a redução do centro pró-quiral levou a uma mistura de diastereoisômeros de proporção 1:1 (mistura inseparável), indicando a não-enantiosseletividade do processo.

Através da análise computacional, foi possível aferir que os produtos de redução *cis* são mais estáveis que os produtos *trans*. No entanto, a diferença de energia entre os isômeros é de aproximadamente 2 kcal.mol⁻¹, um valor consideravelmente pequeno, levando a uma mistura racêmica.

5.6.3 – Epoxidação química de Q1, Q2 e Q3 com MCPBA e abertura do epóxido em tampão fosfato pH 7,6 (10 mM)

A epoxidação dos substratos Q1, Q2 e Q3 foi realizada com agente oxidante ácido *meta*-cloroperbenzóico (MCPBA).



ESQUEMA 5.3 – Reação de epoxidação dos substratos Q1, Q2 e Q3

A síntese dos epóxidos de Q1-Q3 foi realizada a fim de observar se haveria abertura do mesmo com conseqüente formação do triciclo pela formação do ciclopropano.

Os produtos obtidos da reação foram analisados ¹H RMN, que levou a a confirmação da formação do epóxido. Embora representassem quase todo o extrato reacional, o sistema de extração ácido-base adotado não foi eficiente, permitindo que ficasse resto do subproduto (ácido benzoico) na amostra.

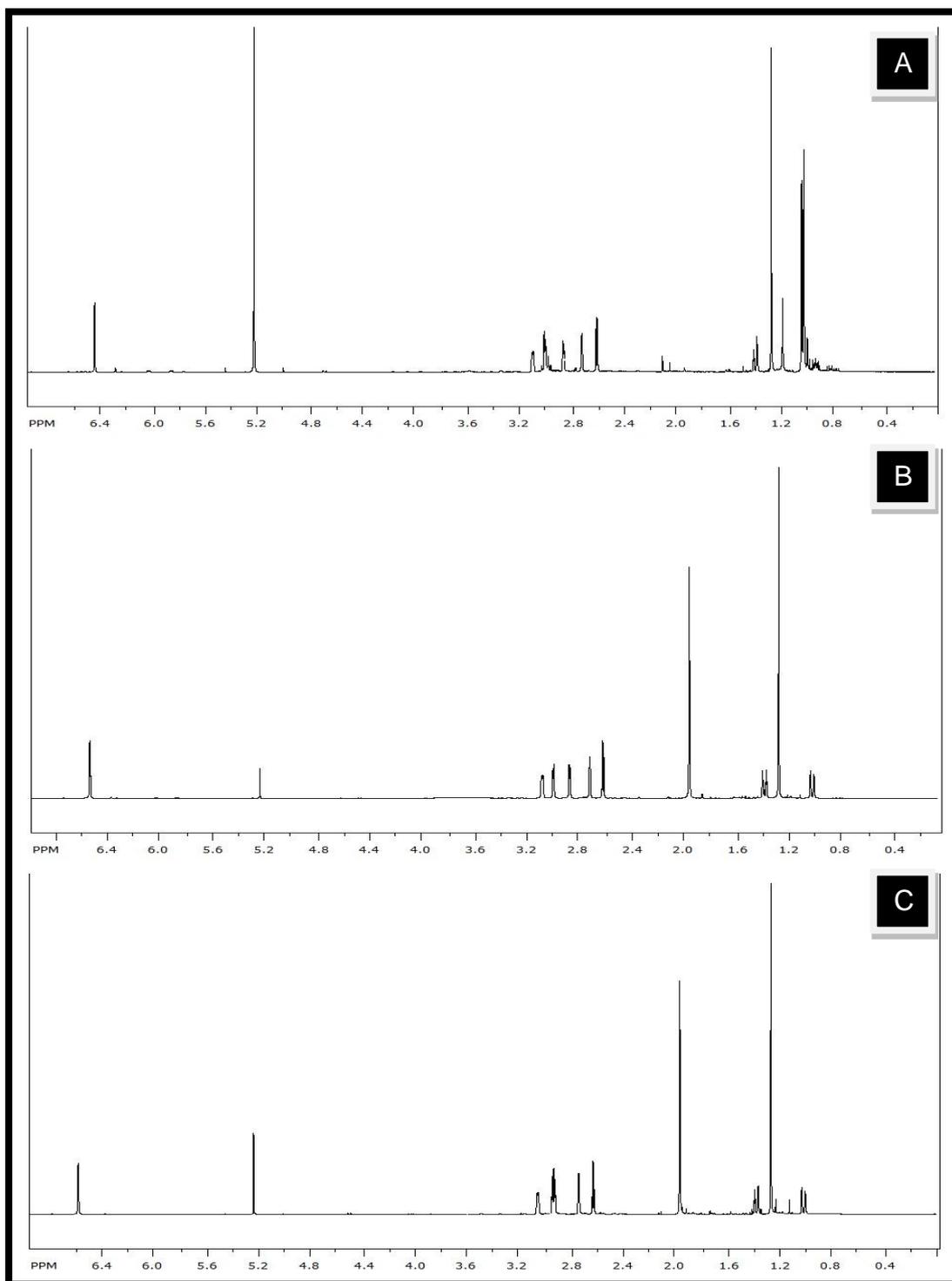


FIGURA 5.85 – Espectros dos compostos oxidados com MCPBA: A) Q1, B) Q2 e C) Q3 (CDCl₃, 400 MHz)

Os derivados epoxidados de Q1, Q2 e Q3 foram deixados em tampão fosfato (10 mM) pH 7,2 estéril por 15 dias, em agitação e no escuro. Esse ensaio teve por objetivo verificar se haveria abertura do epóxido nas condições de crescimento do

micro-organismo. Cessado este período, fez-se a extração dos compostos através de partição líquido-líquido e a caracterização dos produtos obtidos por RMN.

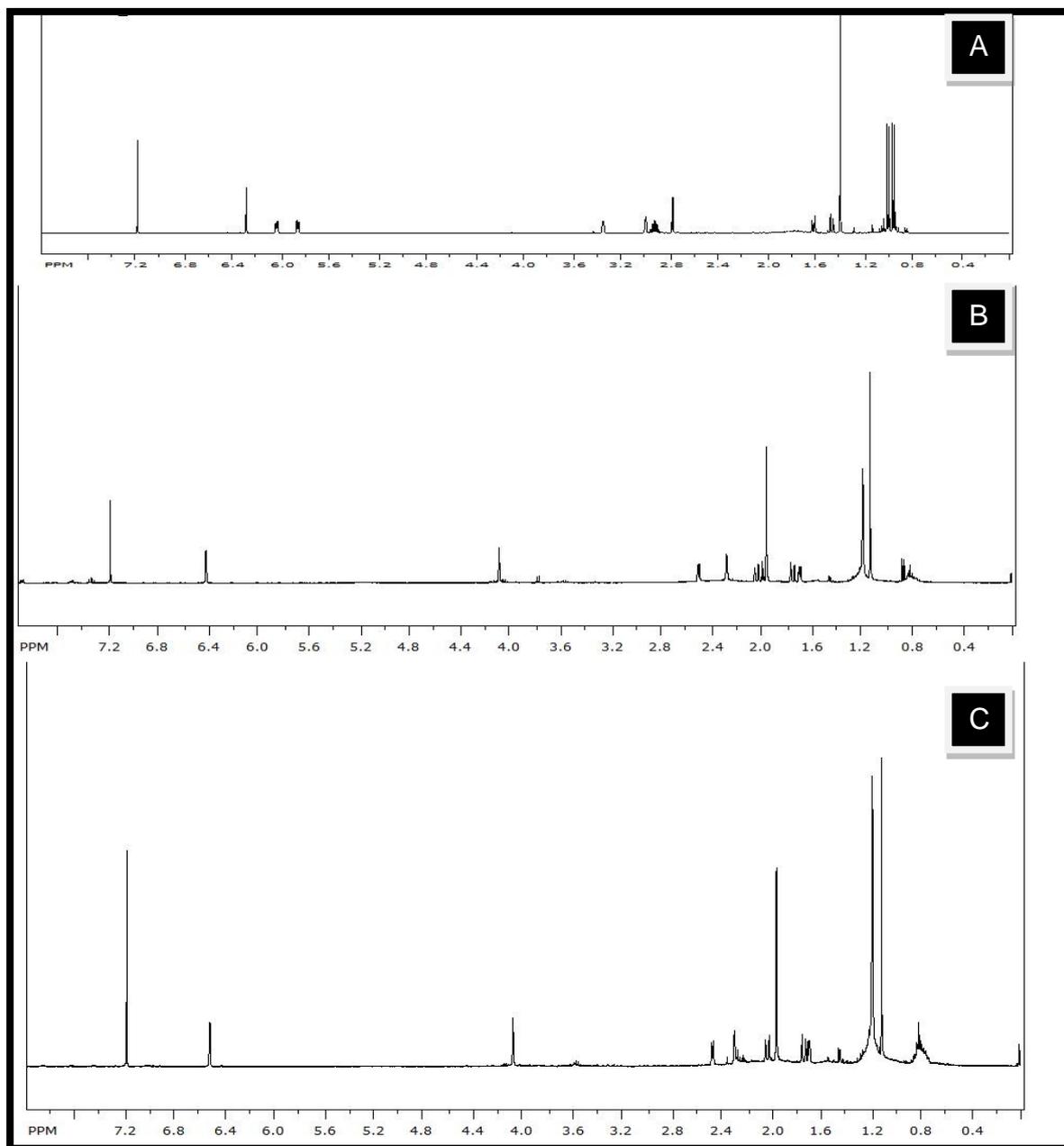


FIGURA 5.86 – Espectros dos compostos obtidos após incubação em tampão fosfato obtidos a partir de: A) Q1, B) Q2 e C) Q3 (CDCl₃, 400 MHz)

Ao analisar os espectros de ¹H RMN, observou que o meio ocasionou abertura do epóxido levando à formação de produtos idênticos à Q1A_CR_16, Q2A_CR_6 e Q3A_CR_5 (todos os dados espectroscópicos foram comparados e

estes se mostraram idênticos). A proposta mecanística para formação do triciclo segue mostrada na figura abaixo.

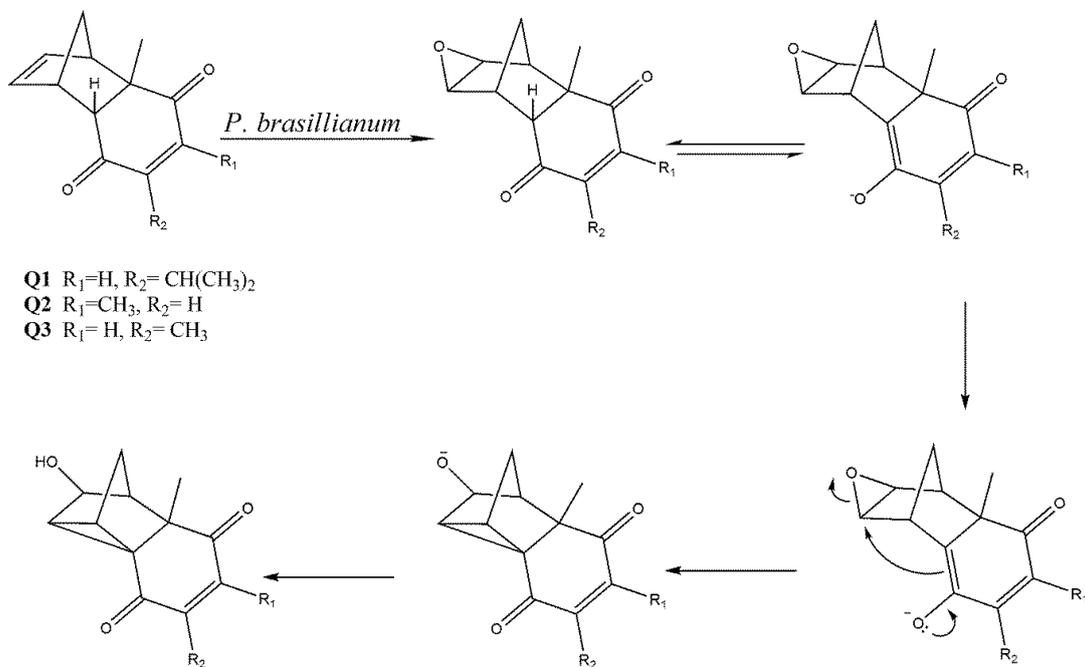


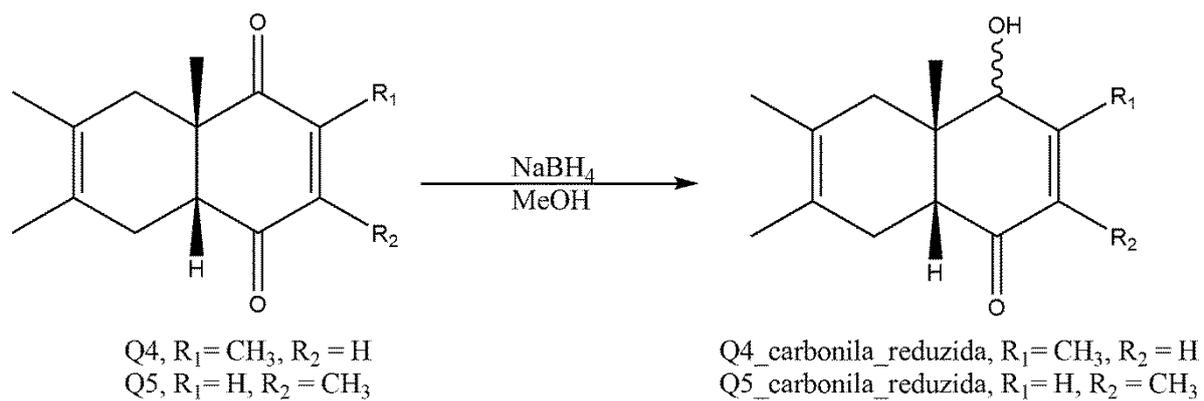
FIGURA 5.87 – Proposta mecanística para formação do triciclo a partir do norborneno

Este é um fato um tanto quanto interessante, pois ao medir o pH do tampão após os 15 dias de experimento, este encontrava-se em torno de 7,6, o que representa um valor de pH levemente básico e que foi suficiente para realizar a enolização do hidrogênio da junção de anel (H-6).

Isso se deve à presença da cabeça de ponte da molécula, que permite que esta tenha uma conformação tal que seja possível que o enol faça um ataque nucleofílico ao epóxido, levando à formação do triciclo.

5.6.4 – Redução química de carbonila de Q4 e Q5 com $NaBH_4$

A reação com $NaBH_4$ visou a redução química da carbonila a fim de obter produtos análogos àqueles obtidos pela biotransformação de Q4 e Q5:



ESQUEMA 5.4 – Reação de redução carbonílica com NaBH₄

Os produtos obtidos apresentavam alto grau de pureza e foram submetidos à análise por ¹H RMN. De acordo com os dados, os produtos obtidos foram iguais àqueles observados na biotransformação de Q4 e Q5.

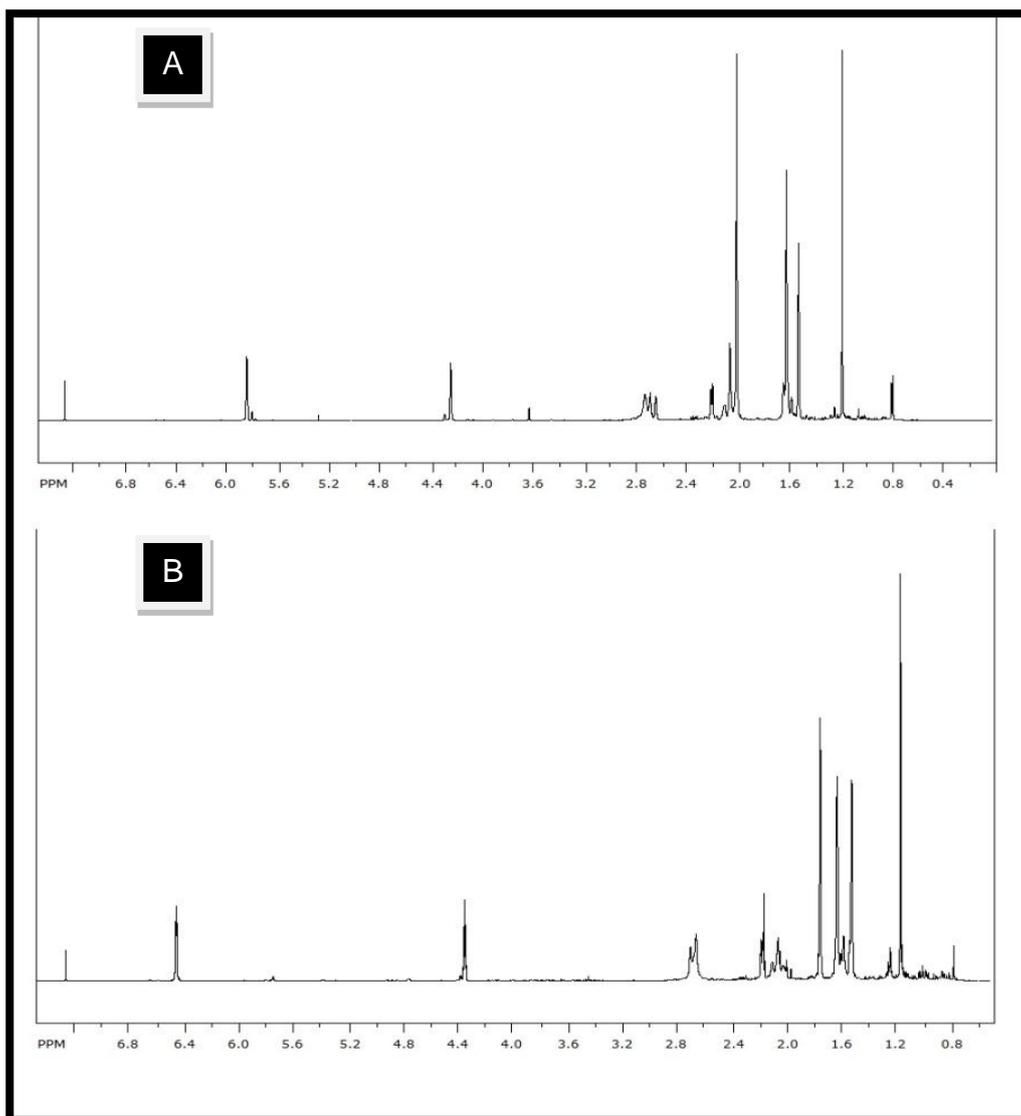


FIGURA 5.88 – Espectros dos compostos reduzidos com NaBH_4 : A) Q4, B) Q5 (CDCl_3 , 400 MHz)

Segundo CHUNJIAN & BURNELL (1997), os produtos obtidos são referentes ao ataque (b) do hidreto mostrado na Figura. Cálculos realizados com os dois ataques (a) e (b), indicaram que a diferença de energia entre eles é de apenas 0,45 kcal/mol mais estável do que o produto de outro ataque axial sobre a face convexa de 28, de modo que a razão para a regioseletividade deve ser o resultado de um fenômeno que é consideravelmente mais regioquímico nos estados de transição do que nos produtos. Este fenômeno pode ser impedimento estérico entre o agente redutor (hidreto) e o substrato ou uma presença de torção no interior da molécula de substrato.

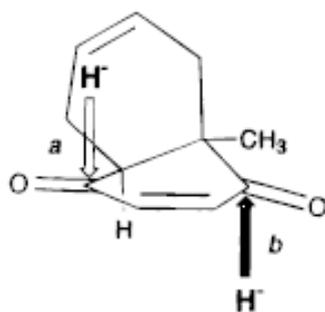


Figura 5.89 – Possibilidades de ataque do hidreto em *a* e *b*. A seta em destaque representa o modo predominante de ataque. [Figura retirada de CHUNJIAN & BURNELL (1997)]

5.6.5 – Análise da quiralidade

Os produtos e os substratos recuperados a partir do fungo foram analisados por cromatografia quiral para verificar a enantiosseletividade enzimática do micro-organismo. Os resultados obtidos estão sumarizados na tabela abaixo.

TABELA 5.22 – Resultado das análises por cromatografia quiral

Substâncias	Razão entre as áreas	Excesso enantiomérico
Substrato Q1	1:1	0
Substrato Q2	1:1	0
Substrato Q3	1:1	0
Substrato Q4	1:1	0
Substrato Q5	1:1	0
Substrato Q3 recuperado	53:47	6
Substrato Q2 recuperado	48:52	4
Q1A_CR_16	41:59	18
Q1A_CR_26	87:13	74
Q2A_CR_5	35:65	30
Q2A_CR_6	54:46	8
Q2A_CR_9	74:26	48
Q3A_CR_5	32:68	36
Q3A_CR_7	57:43	14
Q3A_CR_8	30:70	40
Q4A_CR_10	48:52	4
Q4A_CR_15	19:81	62
Q4A_CR_20	74:26	48
Q4A_CR_23	67:33	34
Q5A_CR_15	74:26	58
Q5A_CR_18	66:34	28
Q2_dupla_reduzida	1:1	0
Q3_dupla_reduzida	1:1	0
Q4_dupla_reduzida	1:1	0
Q4 - carbonila reduzida	1:1	0
Q5 - carbonila reduzida	1:1	0

Através destes resultados, é possível verificar que o micro-organismo *P. brasilianum* não é específico para o consumo dos substratos 1 e 2 porque estes mantiveram-se em uma mistura racêmica.

Por outro lado, por meio da comparação dos resultados obtidos para a abordagem sintética e redução microbiológica ficou claro que o fungo é mais enantiosseletivo em todos os casos. Através destes resultados, conclui-se que o uso do micro-organismo para realizar reação de redução de ligação dupla α,β -insaturadas

é melhor do que a utilização de metodologias convencionais, quando o processo requer enantiosseletividade.

Tal seletividade pode ser atribuída às enzimas da classe enoato redutases pertencentes à família das “Old Yellow Enzymes”. Tais enzimas já foram reportadas tanto para fungos quanto bactérias e são responsáveis por catalisar reações de redução de sistemas α,β -insaturados. Diversos substratos já foram testados frente a estas enzimas, dentre os quais, destacam-se a ciclohexanona e a duroquinona devido à suas semelhanças estruturais com os substratos utilizados (WILLIAMS, 2002).

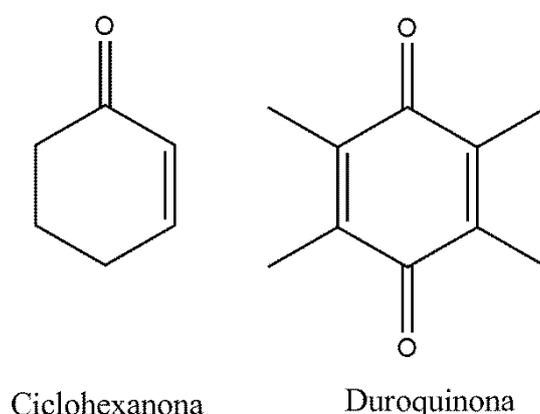


Figura 5.90 – Estrutura química das substâncias ciclohexanona e duroquinona

As enzimas do tipo enoato redutase são enzimas NADPH-dependentes e produzem, em geral, produtos de hidrogenação com configuração *trans*. Isso ocorre devido a transferência de um hidreto proveniente de FMNH₂ ao carbono β , enquanto o carbono α recebe um próton de um resíduo de tirosina em face oposta. Por sua vez, o produto *cis* ocorre raramente e foi observado apenas para uma enzima do tabaco (*Nicotiana tabacum*). (STUERMER *et al*, 2007)

6. - Conclusões

Ao realizar experimentos de biotransformação com células em crescimento foram isolados e identificados apenas metabólitos secundários, dos quais três (verruculogenina, brevianamida F e 12,13-dihidroxi-fumitremorgina C) são pertencentes à rota metabólica da fumitremorgina C. Estes compostos foram produzidos em meios contendo diferentes substâncias exógenas (substratos), o que indica que essa rota biossintética pode sofrer influência destas substâncias.

A metodologia de biotransformação por células residuais foi mais eficaz para o estudo em questão, uma vez que através dela puderam ser isolados 17 produtos de biotransformação. Os cromatogramas obtidos são “limpos”, contendo, uma menor quantidade de metabólitos secundários e substâncias provenientes do meio de cultura.

Com relação à capacidade de biotransformação de *P. brasilianum*, ficou claro que o micro-organismo possui um sistema enzimático capaz de aceitar os substratos propostos. As reações observadas para os produtos de biotransformação foram: redução de olefinas, redução de carbonila, oxidação alílica e epoxidação.

Através dos experimentos realizados com os epóxidos sintetizados, foi possível notar que a abertura do epóxido e formação deste pode ser realizada em meio tamponado levemente básico, mostrando que esta reação é não-enzimática.

As diversas reações realizadas foram, em geral, reações bem sucedidas em que se obtinham os produtos praticamente puros (mesmo quando se tratavam de extratos reacionais), porém em mistura racêmica.

Por sua vez, a análise por coluna quiral mostrou que em todos os casos, houve maior enantiosseletividade nas reações químicas ao se utilizar o sistema enzimático fúngico.

Referências bibliográficas

ABRAHAM, W. R. & ARFMANN, H. A. "12,13-dihydroxy-fumitremorgin C from *Aspergillus fumigatus*". *Phytochemistry*, 29 (3): 1025, 1990.

ADELIN, E.; SERVY, C.; CORTIAL, S.; LÉVAIGUE, H.; GALLARD, J. F.; MARTIN, M. T.; RETAILLEAU, P.; BUSSABAN, B.; LUMYONG, S. & OUAZZANI, J. "Biotransformation of natural compounds. Oxido-reduction of Sch-642305 by *Aspergillus ochraceus* ATCC 1009". *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 21 (8): 2456, 2011.

BLASER, H.; MALAN, C.; PUGIN, B.; SPINDLER, F.; STEINER, H. & STUDER, M. "Selective hydrogenation for fine chemicals: recent trends and new developments.". *Adv. Synth. Catal.* 345: 103, 2003.

BOMMARIUS, A. S. & RIEBEL, B. R. "Introduction to biocatalysis". IN: *Biocatalysis – Fundamentals and Applications*. BOMMARIUS, A. S. & RIEBEL, B. R. (Eds.). Weinheim, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2004, p. 1-18.

BROCKSOM, T. J. & SANTOS, R. B. "An efficient synthesis of monoterpene α -methylene- γ -butyrolactones". *Synthetic. Commun.* 18 (12): 1403, 1988.

BROCKSOM, T. J.; DONATONI, M. C.; ULIANA, M. P. & VIEIRA, Y. W. "A reação de Diels-Alder no início do século vinte um". *Quim. Nova*, 33 (10), 2211, 2010.

Burkhard, J. A.; Wuitschik, G.; Rogers-Evans, M.; Müller, K.; Carreira, E. M. "Oxetanes as Versatile Elements in Drug Discovery and Synthesis", *Angew. Chem. Int. Ed.* 2010, 49, 9052 – 9067

CARVALHO, P. O.; OLIVEIRA, J. G. & PASTORE, G. M. "Enhancement of gamma-linolenic acid production by the fungus *Mucor sp.* LB-54 by growth temperature". *Rev. Microbiol.*, 30 (2): 170, 1999.

CHAPARRO-RIGGERS, J. F.; ROGERS, T. A.; VASQUEZ-FIGUEROA, E.; POLIZZI, K. M. & BOMMARIUS, A. S. "Comparison of three enoate reductases and their potential use for biotransformations". *Adv. Synth. Catal.*, 349 (8-9): 1521, 2007.

CHUNJIAN, L. & BURNELL, J. "Regio- and stereoselectivity in the reductions of cyclic enedione systems". *J. Org. Chem.*, 62 (11): 3683, 1997.

COMINS, D. L.; BROOKS, C. A. & INGALLS, C. L. "Reduction of *N*-acyl-2,3-dihydro-4-pyridones to *N*-acyl-4-piperidones using zinc/acetic acid". *J. Org. Chem.*, 66 (6): 2181, 2001.

CRHYSTAL, E. J. T.; WRIGLEY, S. K.; THOMAS, R.; NICHOLSON, N. & HAYES, M. (Eds.). Cambridge, The Royal Society of Chemistry, 2000, p. 66-72.

DEMIRJIAN, D. C.; SHAH, P. C. & MORÍS-VARAS, F. "Screening for novel enzymes". IN: *Biocatalysis – From Discovery to Application*. FESSNER, W.; ARCHELAS, A.; DEMIRJIAN, D. C.; FURSTOSS, R.; GRIENGL, H.; JAEGER, K. –E.; MORÍS-VARAS, E.; ÖHRLEIN, R.; REETZ, M. T.; REUMOND, J. –L.; SCHMIDT, M.; SERVI, S.; SHAH, P. C.; TISCHER, W. & WEDEKIND, F. (Eds.). Berlin, Springer Berlin Heidelberg, 1999, p. 1-29.

DONATONI, M. C. A Reação de Diels-Alder de *p*-benzoquinonas sob Condições de Catálise por Ácidos de Lewis e sob Efeito de Micro-ondas. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2013. Tese de doutorado.

FABER, K. *Biotransformations in Organic Chemistry: A Textbook*. 3a ed. Heidelberg, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1997, p.403.

FABER, K. *Biotransformations in Organic Chemistry: A Textbook*. 5a ed. Heidelberg, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2004, p.454.

FILL, T. P.; SILVA, J. V. da; OLIVEIRA, K. T.; SILVA, B. F. da; RODRIGUES-Fo, E. "Oxidative potential of some endophytic fungi using 1-indanone as a substrate". *J. Microbiol. Biotechnol.*, 22 (6): 832, 2012.

FRAGA, B. M.; ALVAREZ, L. & SUAREZ, S. "Biotransformation of the diterpenes epicandicandiol and candicandiol by *Mucor plumbeus*". J. Nat. Prod., 66 (3): 327, 2003.

GOSS, R. J.; SHANKAR, S. & FAYAD, A. A. "The generation of "unnatural" products: synthetic biology meets synthetic chemistry". Nat. Prod. Rep., 29 (8): 870, 2012.

GRUNDMANN, A. & LI, S. M. "Overproduction, purification and characterization of FtmPT1, a brevianamide F prenyltransferase from *Aspergillus fumigatus*". Microbiology, 151 (7): 2199, 2005.

HANSON, J. R. The Chemistry of Fungi. Cambridge, The Royal Society of Chemistry, 2008, p. 221.

HARVEY, C. J. B.; PUGLISI, J. D.; PANDE, V. S.; CANE, D. E. & KHOSLA, C. "Precursors directed biosynthesis of a orthogonally functional erythromycin analogue: selectivity in the ribosome macrolide binding pocket". J. Am. Chem. Soc., 134 (29): 12259, 2012.

HIROSE, Y. "Production and isolation of enzymes". IN: Enzyme Catalysis in Organic Synthesis: A Comprehensive Handbook, Second Edition. DRAUZ, K. & WALDMANN, H. (Eds.). Weinheim, Wiley-VCH Verlag GmbH, 2008, p. 41-66.

HOLLMANN, F.; ARENDS, I. W. C. E. & HOLTSMANN, D. "Enzymatic reductions for the chemist". Green Chem., 13: 2285, 2011.

HONDA, K.; ISHIGE, T. & SHIMIZU, S.. "Microbial and enzymatic processes for the production of chiral compounds". IN: Biocatalysis in the Pharmaceutical and Biotechnology Industries. RAMESH, N. P. (Ed.). Boca Raton, CRC Press, 2006, p. 529-546.

HUANG, L. H.; LI, J.; XU, G.; ZHANG, X. H.; WANG, Y. G.; YIN, Y. L. & LIU, H. M. "Biotransformation of dehydroepiandrosterone (DHEA) with *Penicillium griseopurpureum* Smith and *Penicillium glabrum* (Wehmer) Westling". Steroids, 75 (13-14): 1039, 2010.

ITO, F. M.; MENA, A. E.; MARQUES, M. R.; LIMA, D. P. de; BEATRIZ, A. "Biotransformation of a cage-like Diels-Alder adduct and derivatives by *Mucor ramosissimus samutsevitsch*". Braz. J. Microbiol., 40 (3): 563, 2009.

KELLY, D. R. "Biotransformations – practical aspects". IN: Biotechnology: Biotransformations I, Vol. 8a, Second Edition. REHM, H. –J. & REED, G. (Eds.). Weinheim, Wiley-VCH Verlag GmbH, 2008, p. 25-34.

KENNEDY, J. "Mutasythesis, chemobiosynthesis, and back to semi-synthesis: combining synthetic chemistry and biosynthetic engineering for diversifying natural products". Nat. Prod. Rep., 25 (1): 25, 2008.

KIRSCHNING, A.; TAFT, F. & KNOBLOCH, T. "Total synthesis approaches to natural product derivatives based on the combination of chemical synthesis and metabolic engineering". Org. Biomol. Chem., 5 (20): 3245, 2007.

LI, S. M. "Genome mining and biosynthesis of fumitremorgin-type alkaloids in ascomycetes". J. Antibiot., 64 (1): 45, 2011.

LIU, Y. J.; PEI, X. Q.; LIN, H.; GAI, P.; LIU, Y. C. & WU, Z. L. "Asymmetric bioreduction of activated alkenes by a novel isolate of *Achromobacter* species producing enoate reductase". Appl. Microbiol. Biotechnol., 95 (3): 635, 2012.

MARCHAND, A. P.; DONG, E. Z. & BOTT, S. G. "Synthesis and acid- and base-promoted ring opening of polycarbocyclic oxiranes". Tetrahedron, 54 : 4459, 1998.

MARCOS, I. S.; CASTANEDA, L.; BASABE, P.; DIEZ, D. & URONES, J. G. "Labdane diterpenes with highly functionalized B rings". Mini-Rev. Org. Chem., 9 (1): 54, 2012.

MAURS, M.; AZERAD, R.; CORTÉS, M.; ARANDA, G.; DELAHAYE, M. B.; RICARD, L. "Microbial hydroxylation of natural drimenic lactones". Phytochemistry, 52 (2): 291, 1999.

MIHOVILOVIC, M. D.; RUDROFF, F.; WINNINGER, A.; SCHNEIDER, T.; SCHULZ, F. & REETZ, M. T. "Microbial Baeyer-Villiger oxidation: stereopreference and substrate acceptance of cyclohexanone monooxygenase mutants prepared by directed evolution". *Org. Lett.*, 8 (6): 1221, 2006.

MIHOVILOVIC, M. D. "Enzyme mediated Baeyer-Villiger oxidations". *Curr. Org. Chem.*, 10 (11): 1265, 2006.

NAKAMURA, K. & TOMOKO, M. "Reduction of ketones". IN: *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis: A Comprehensive Handbook, Second Edition*. DRAUZ, K. & WALDMANN, H. (Eds.). Weinheim, Wiley-VCH Verlag GmbH, 2008, p. 991-1033.

PANAGIOTOU, G.; OLAVARRIA, R. & OLSSON, L. "*Penicillium brasilianum* as an enzyme factory; the essential role of feruloyl esterases for the hydrolysis of the plant cell wall". *J. Biotechnol.*, 130 (3): 219, 2007.

PETERS, R. J. "Two rings in them all: the labdane-related diterpenoids". *Nat. Prod. Rep.*, 27 (11): 1521, 2010.

SANTOS, R. M. G. "Metabolismo Secundário dos Fungos *Penicillium sp.* e *Fusarium moniliforme* Isolados como Endofíticos de *Melia azedarach* (Meliaceae)". São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2003, 432 p.

SCHUBERT, M. & METZ, P. "Enantioselective total synthesis of the diterpenes kempene-2, kempene-1 and 3-*epi*-kempene-1 from the defense secretion of higher termites". *Angew. Chem. Int. Edit.*, 50 (13): 2954, 2011.

SILVA, B. F. da. Estudo do Potencial Enzimático de Micro-organismos Endofíticos para a Biotransformação de Produtos Naturais e Análogos Sintéticos. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2009. Tese de doutorado, 187 p.

STUERMER, R.; BENHARD, H.; HALL, M.; FABER, K.; "Asymmetric bioreduction of activated C=C bonds using enoate reductases from the old yellow enzyme family", *Current Opinion in Chemical Biology* 2007, 11:203–213.

THIERICKE, R. & ROHR, J. "Biological variation of microbial metabolites by precursor-directed biosynthesis". *Nat. Prod. Rep.*, 10: 265, 1993.

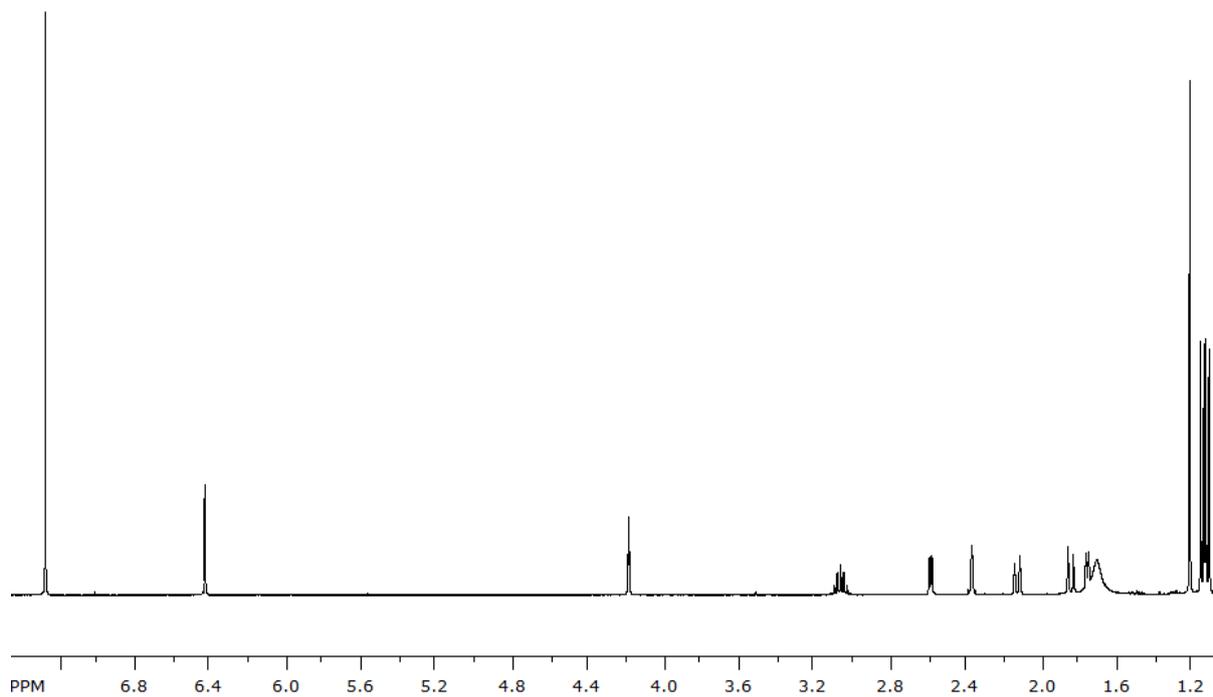
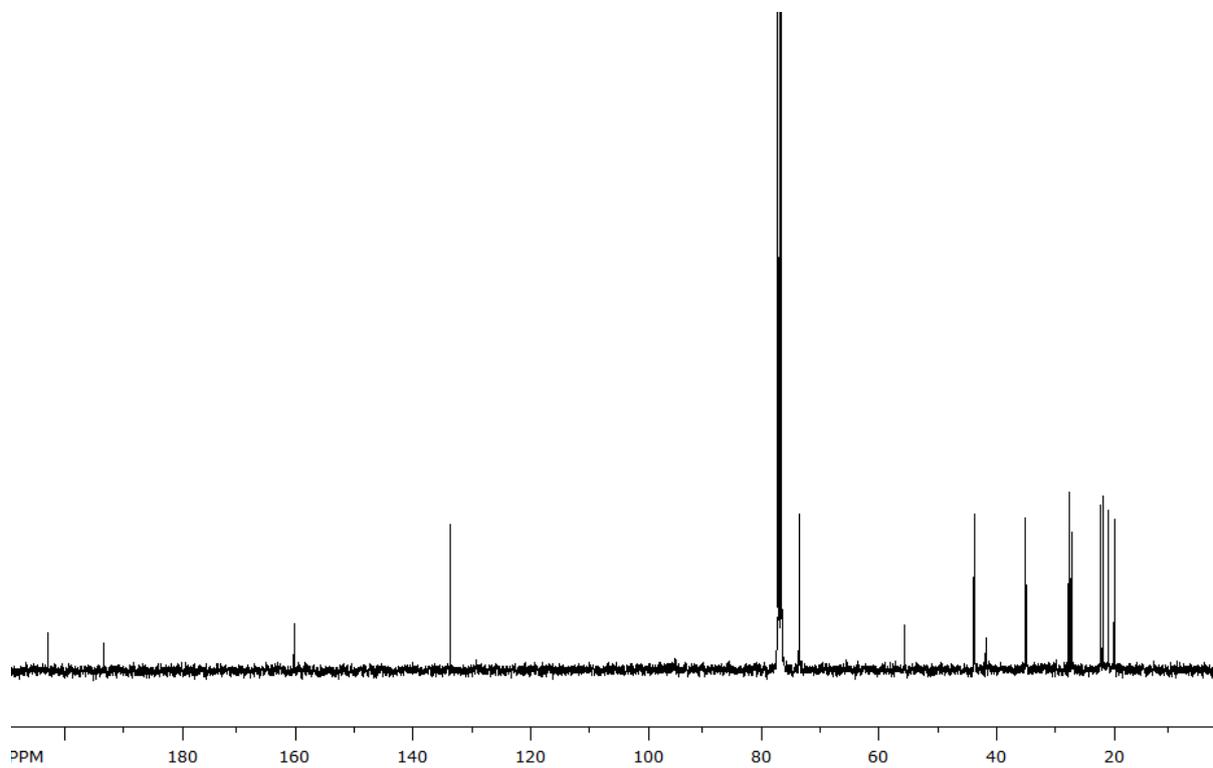
TROST, B. M. "The atom economy – a search for synthetic efficiency". *Science*, 254 (5037): 1417, 1991.

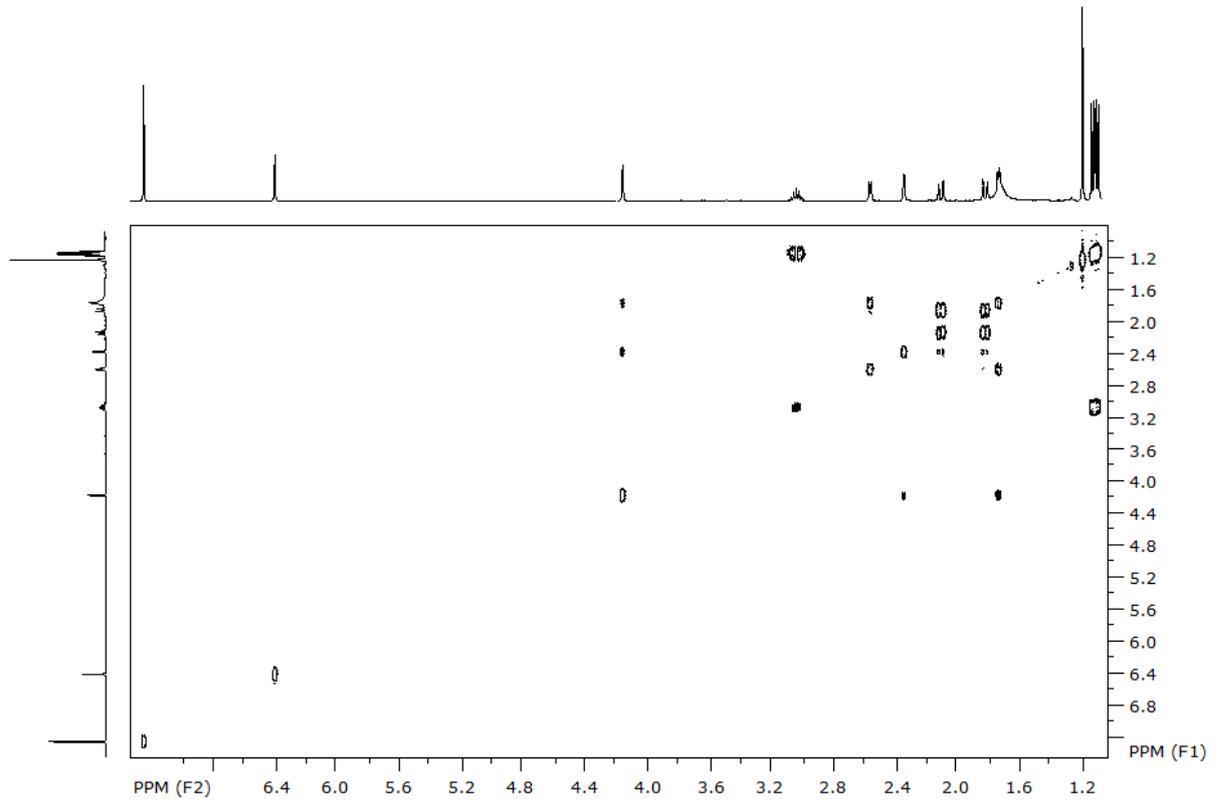
WENDER, P. A. "Introduction: frontiers in organic synthesis". *Chem. Rev.*, 96 (1): 1, 1996.

WRIGLEY, S. K.; HAYES, M. A.; THOMAS, R.; CHRYSTAL, E. J. T.; NICHOLSON, N.; BAKER, D.; MOCEK, U. & GARR, C. "Natural products vs. combinatorials: a case study". IN: *Biodiversity: New Leads for the Pharmaceutical and Agrochemical Industries*.

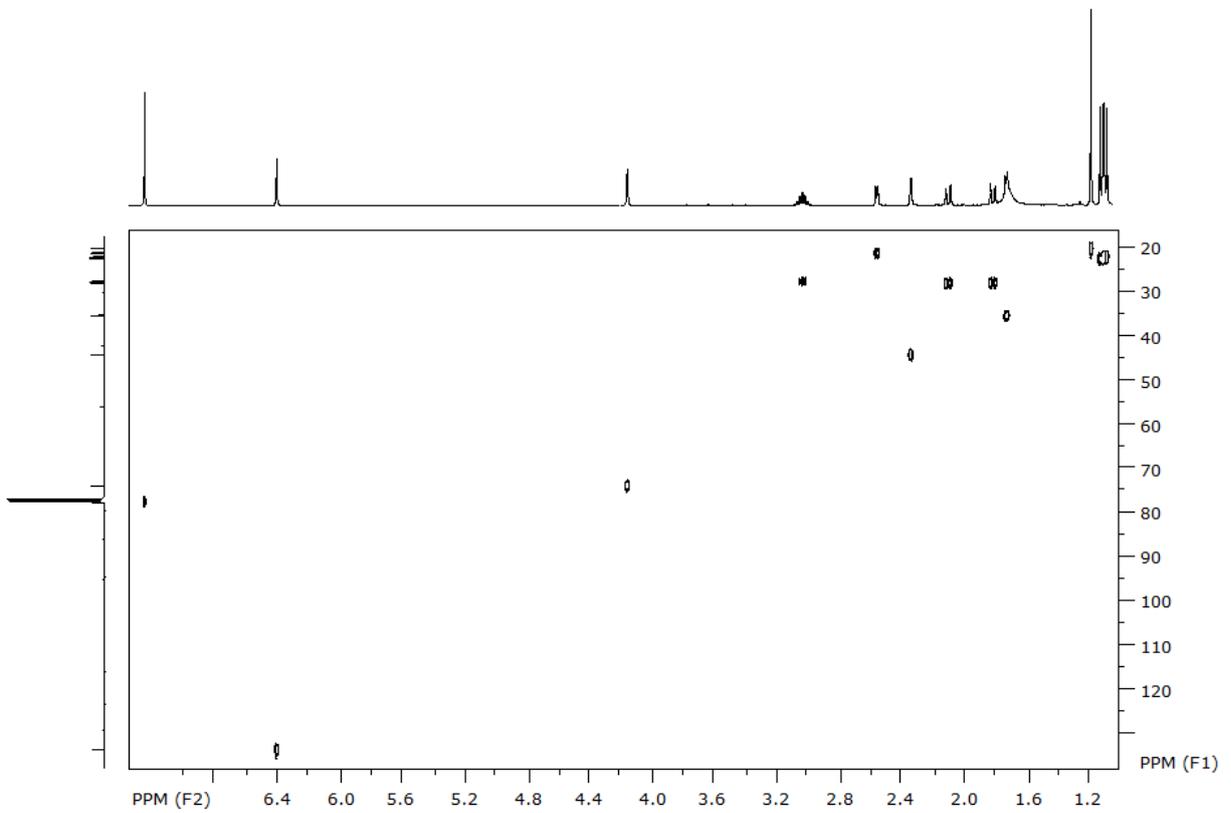
WILLIAMS, R. E.; BRUCE, N. C.; "New uses for an Old Enzyme' – the Old Yellow Enzyme family of flavoenzymes", *Microbiology* (2002), 148, 1607–1614

APÊNDICE

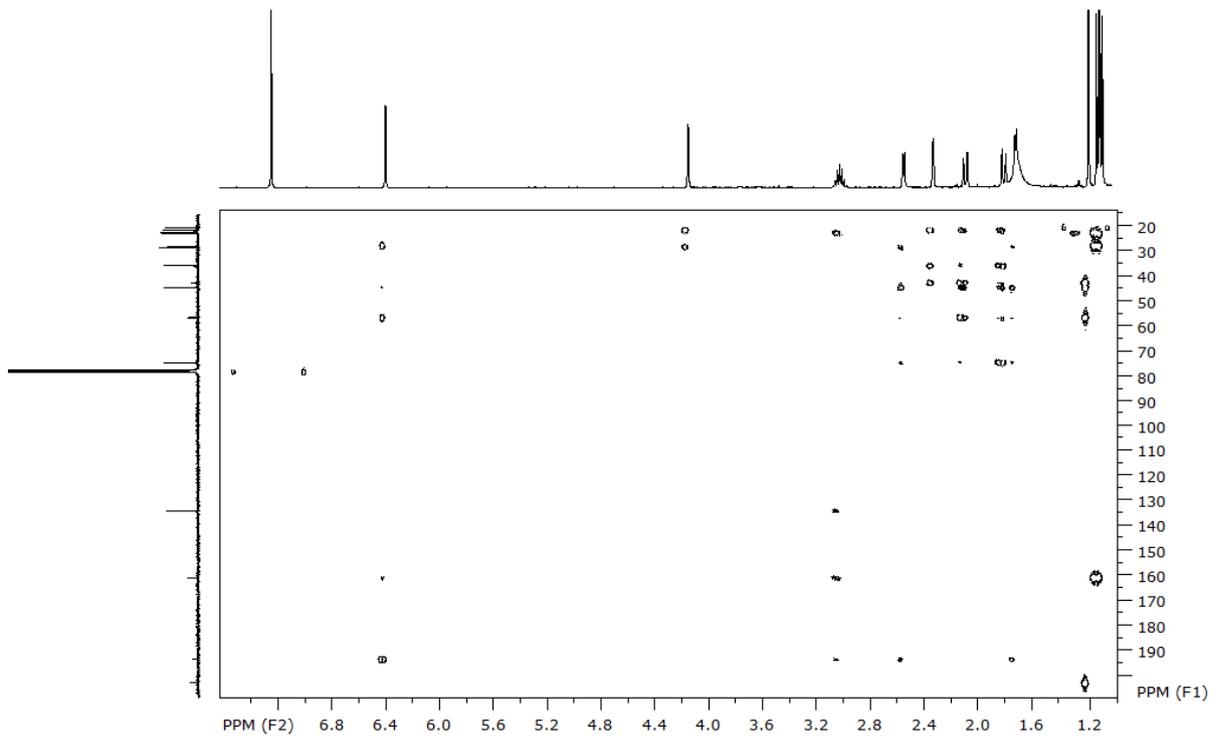
1. - Espectros da substância Q1A_CR_16Espectro de ^1H da substância Q1A_CR_16 (400 MHz, CDCl_3)Espectro de ^{13}C da substância Q1A_CR_16 (100 MHz, CDCl_3)



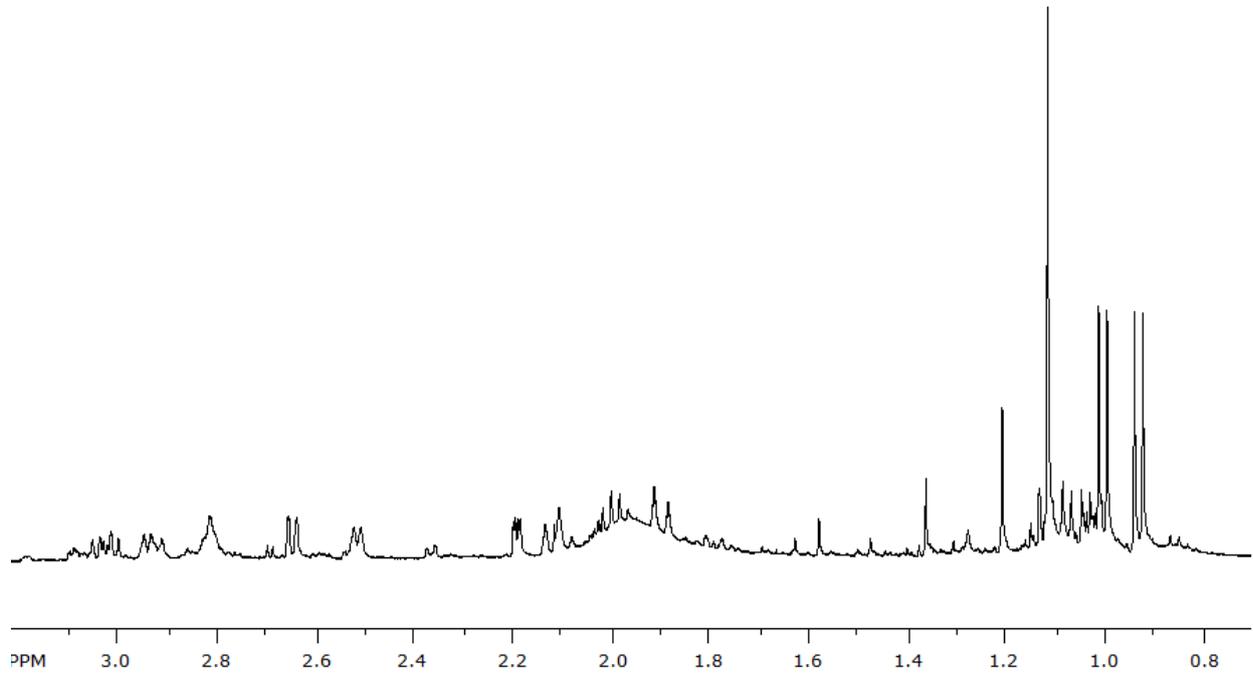
Espectro de COSY da substância Q1A_CR_16



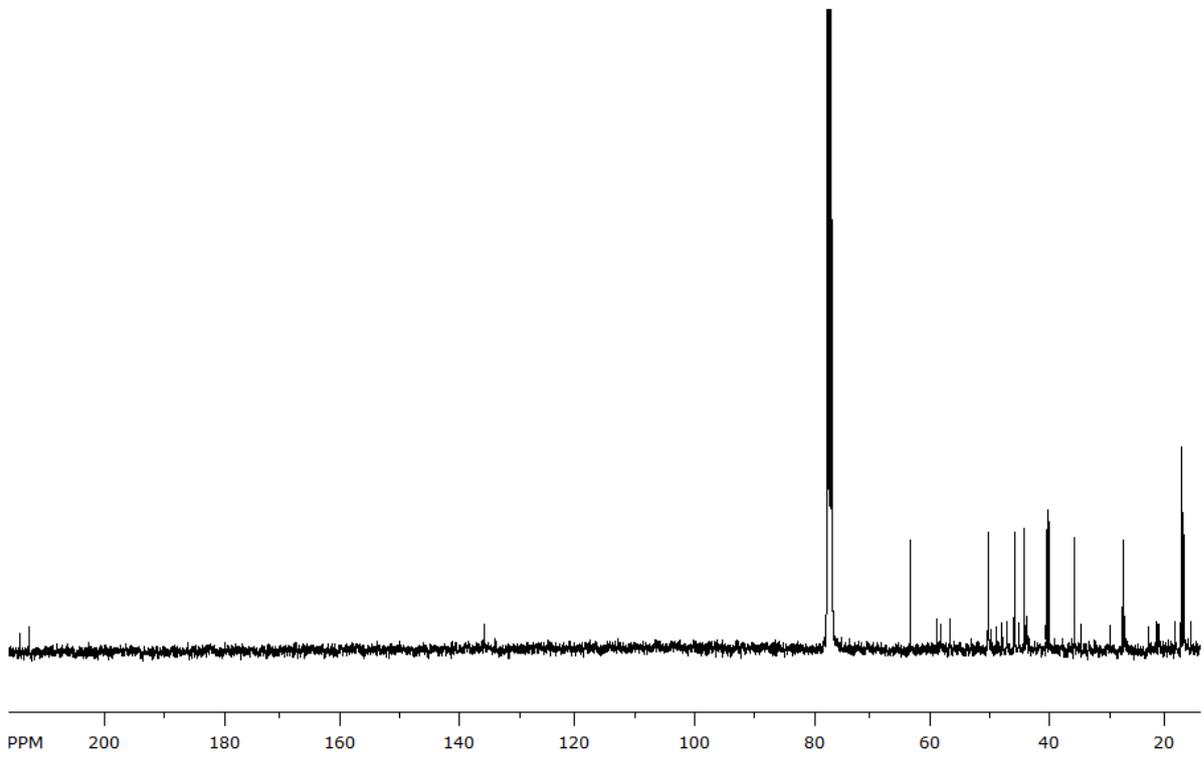
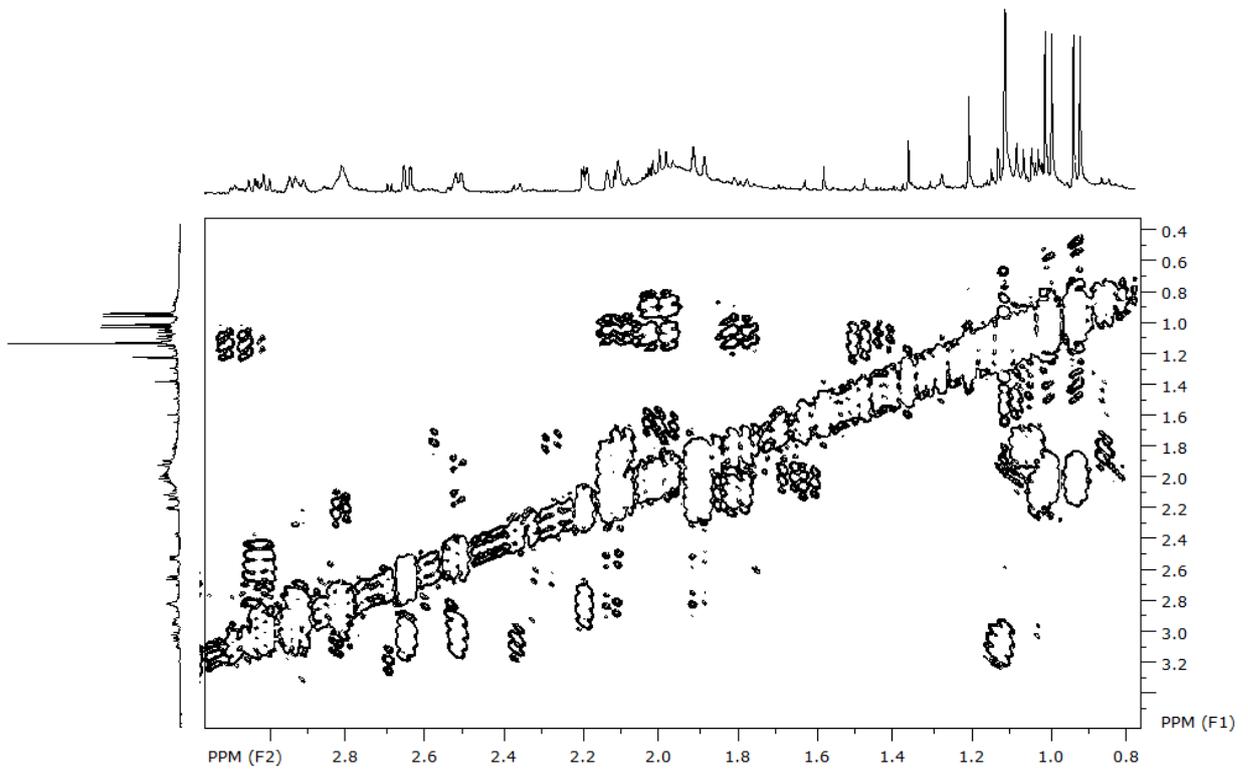
Espectro de HSQC da substância Q1A_CR_16

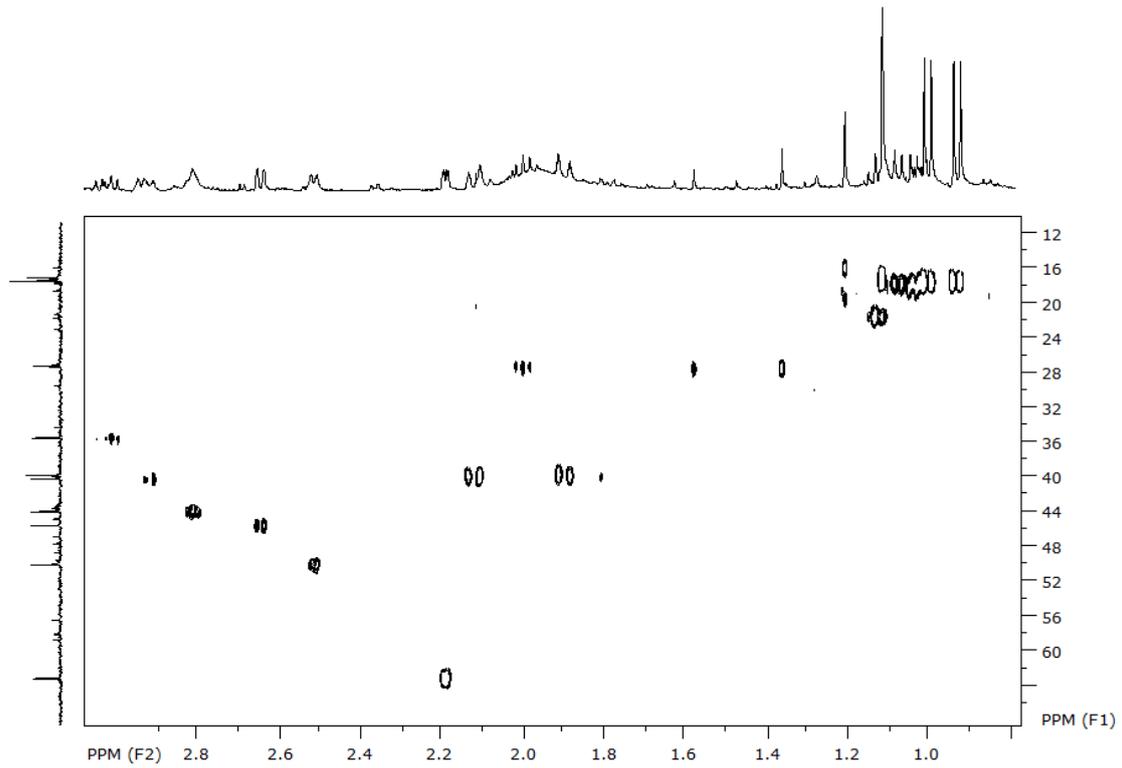
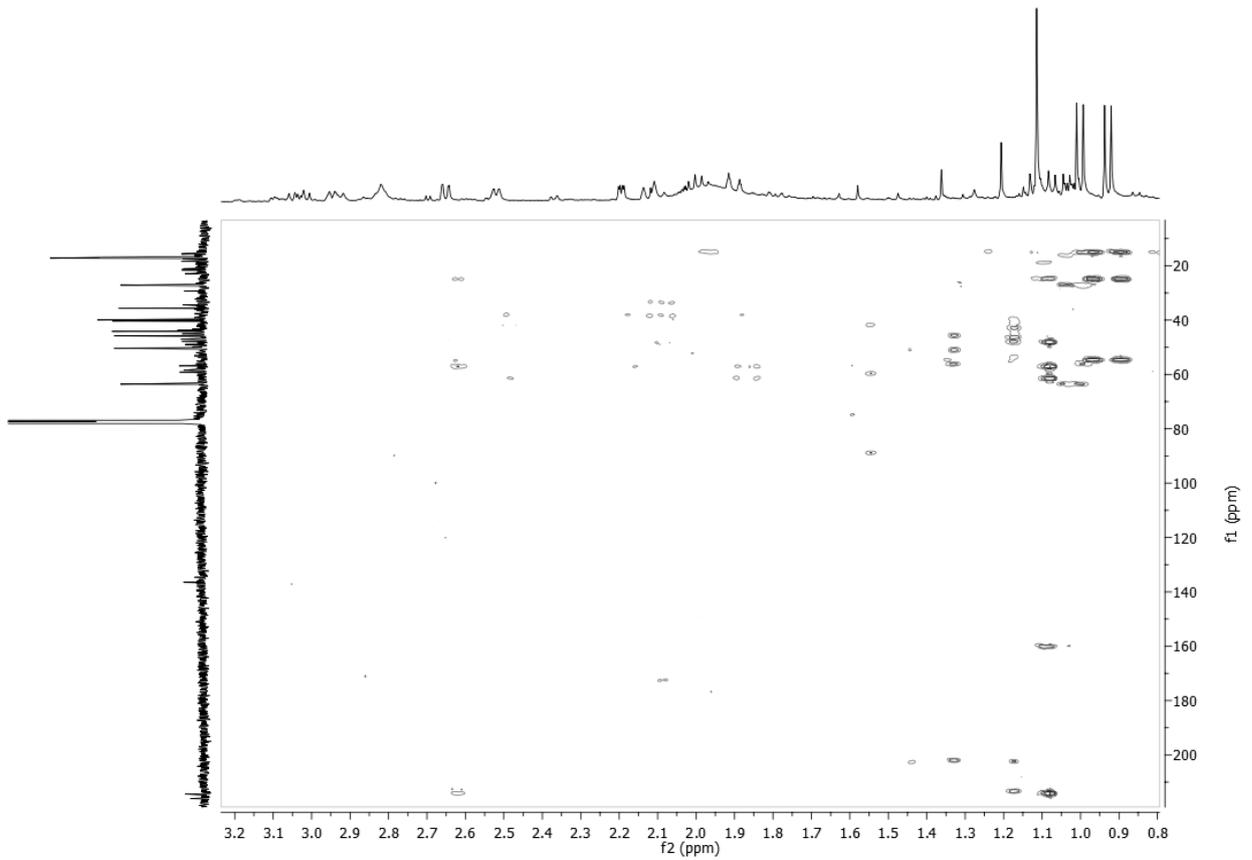


Espectro de HMBC da substância Q1A_CR_16

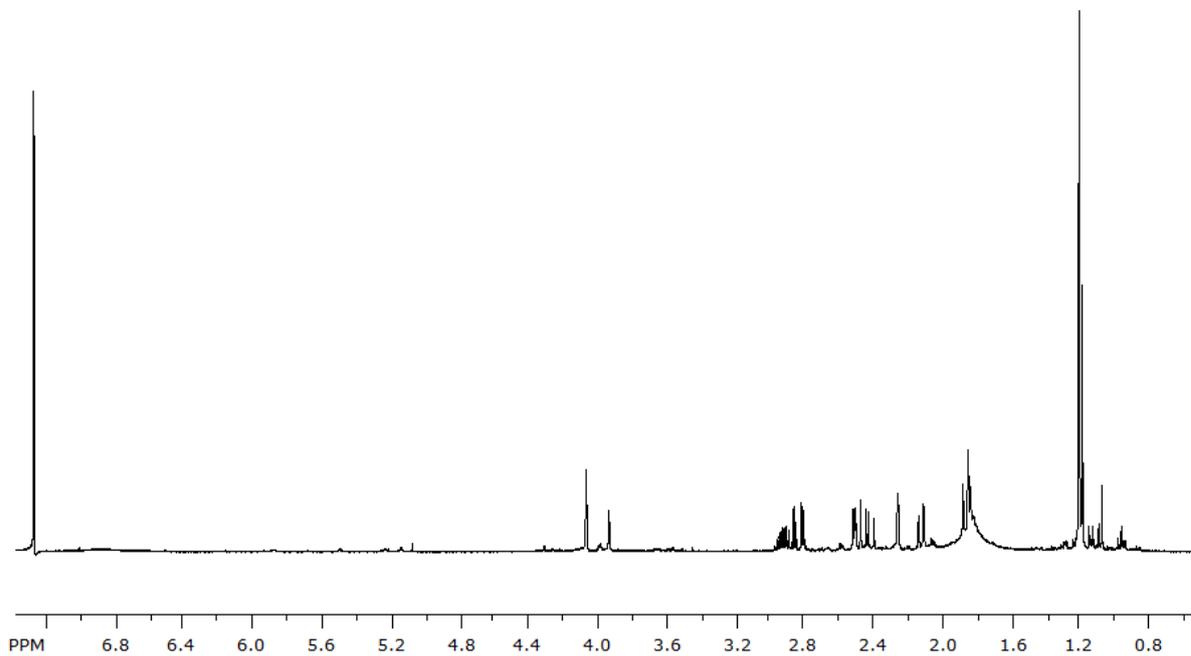
2. - Espectros da substância Q1A_CR_26

Espectro de ^1H da substância Q1A_CR_26 (400 MHz, CDCl_3)

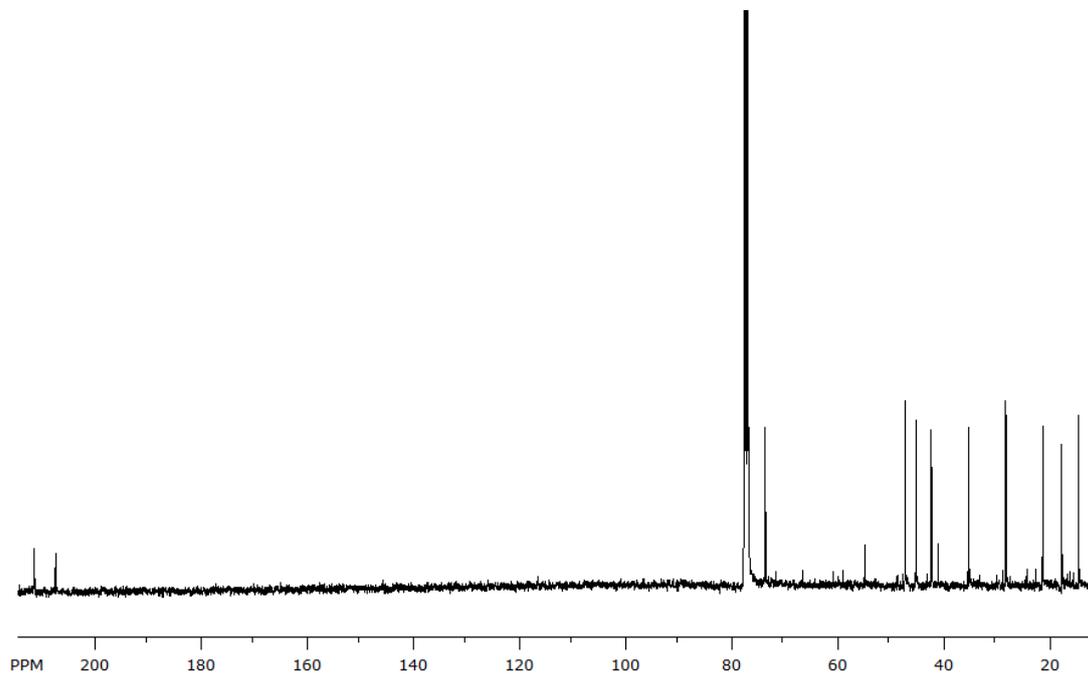
Espectro de ^{13}C da substância Q1A_CR_26 (100 MHz, CDCl_3)Espectro de COSY da substância Q1A_CR_26 (CDCl_3)

Espectro de HSQC da substância Q1A_CR_26 (CDCl₃)Espectro de HMBC da substância Q1A_CR_26 (CDCl₃)

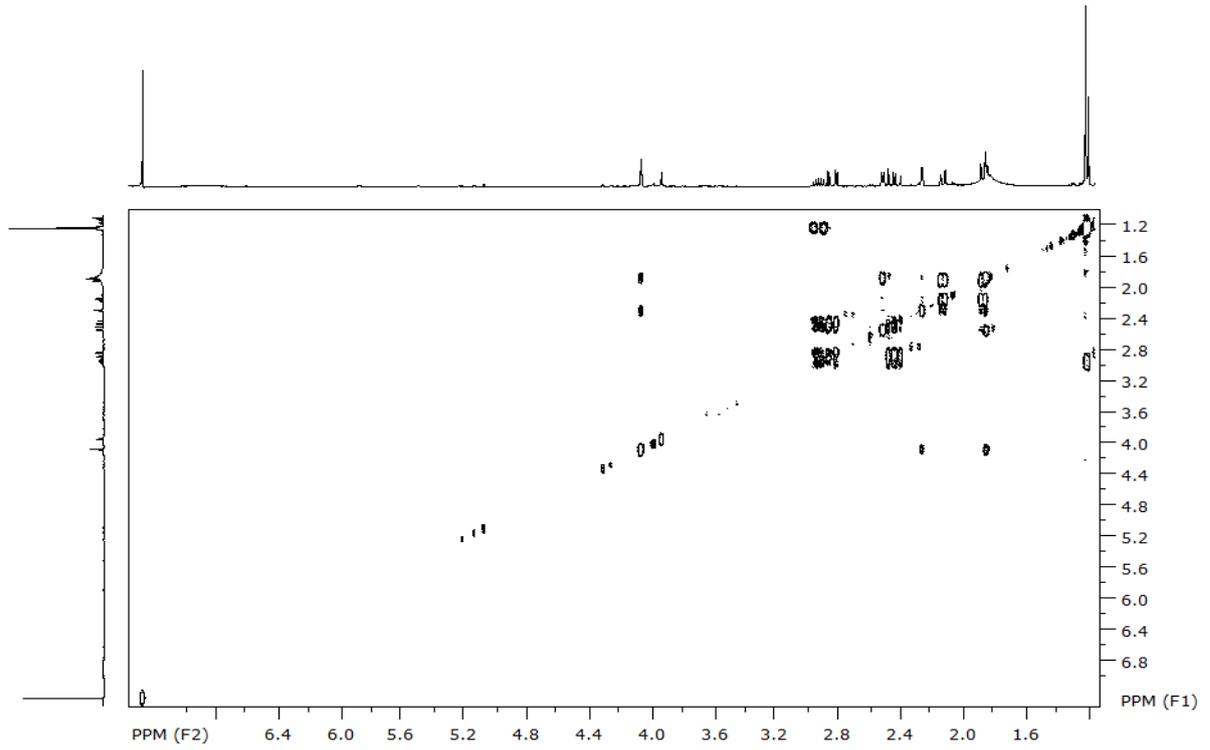
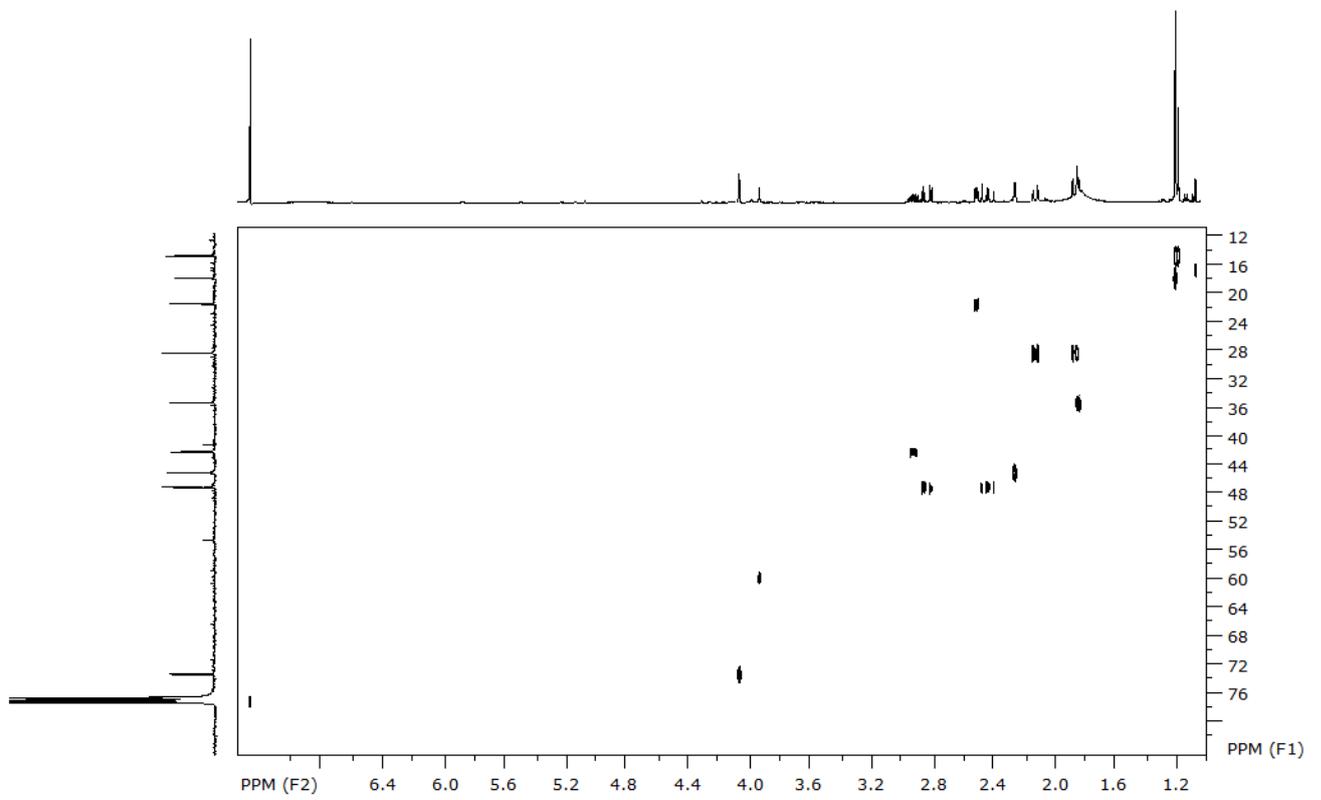
3. - Espectros da substância Q2A_CR_5

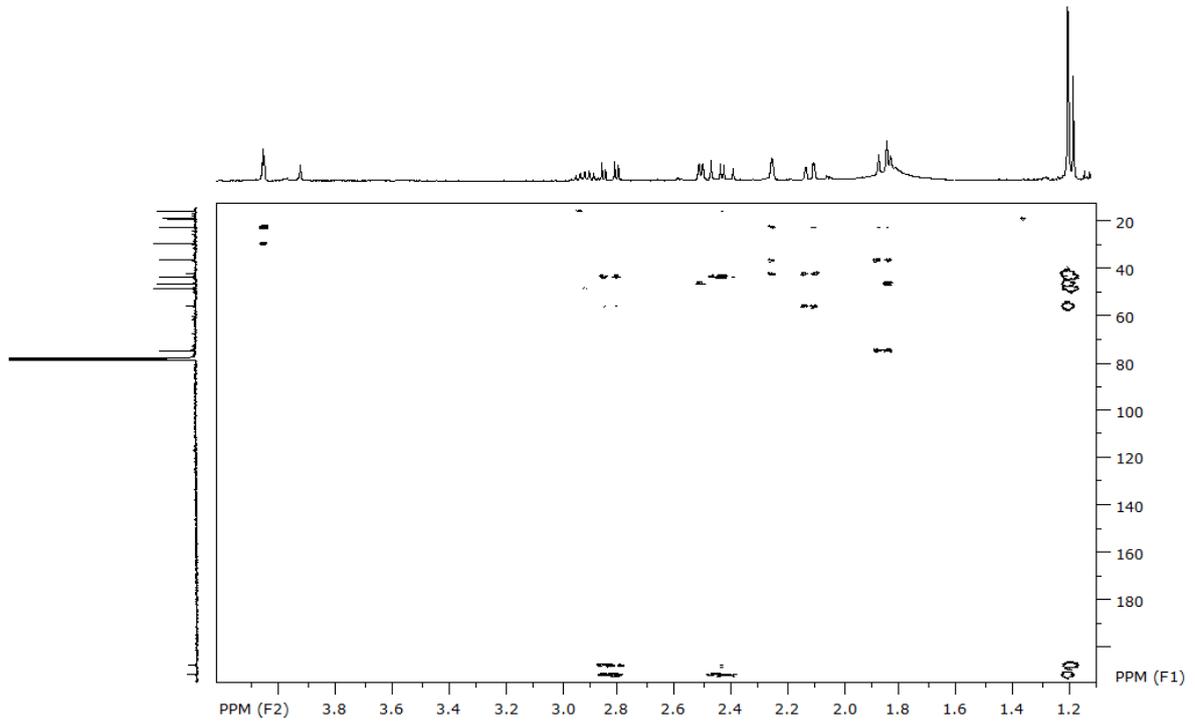


Espectro de ^1H da substância Q2A_CR_5 (400 MHz, CDCl_3)

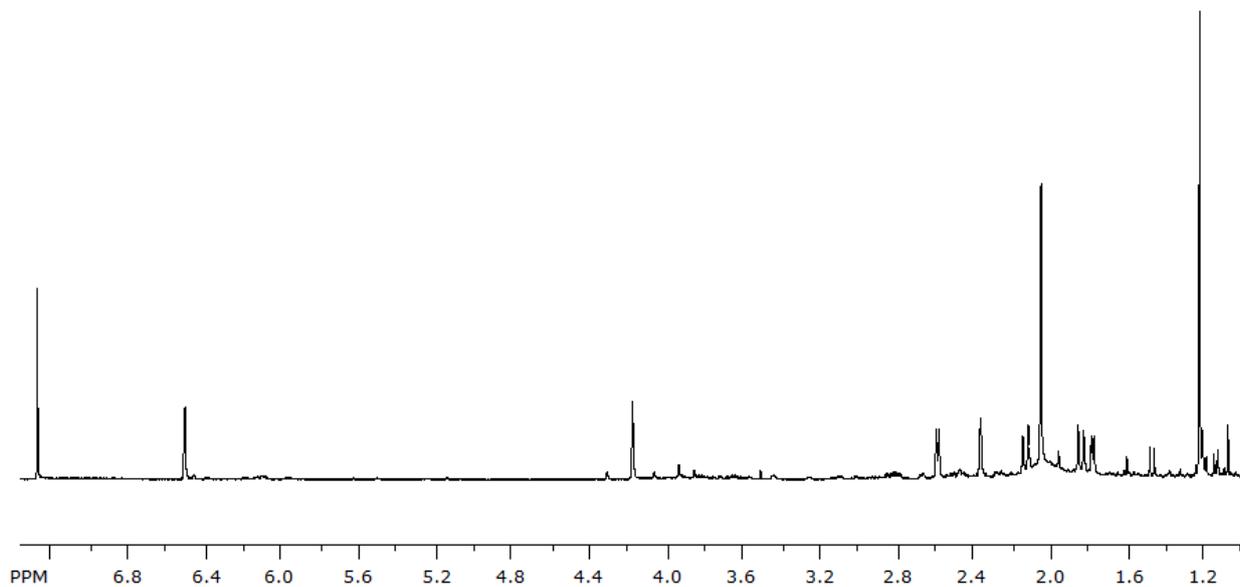
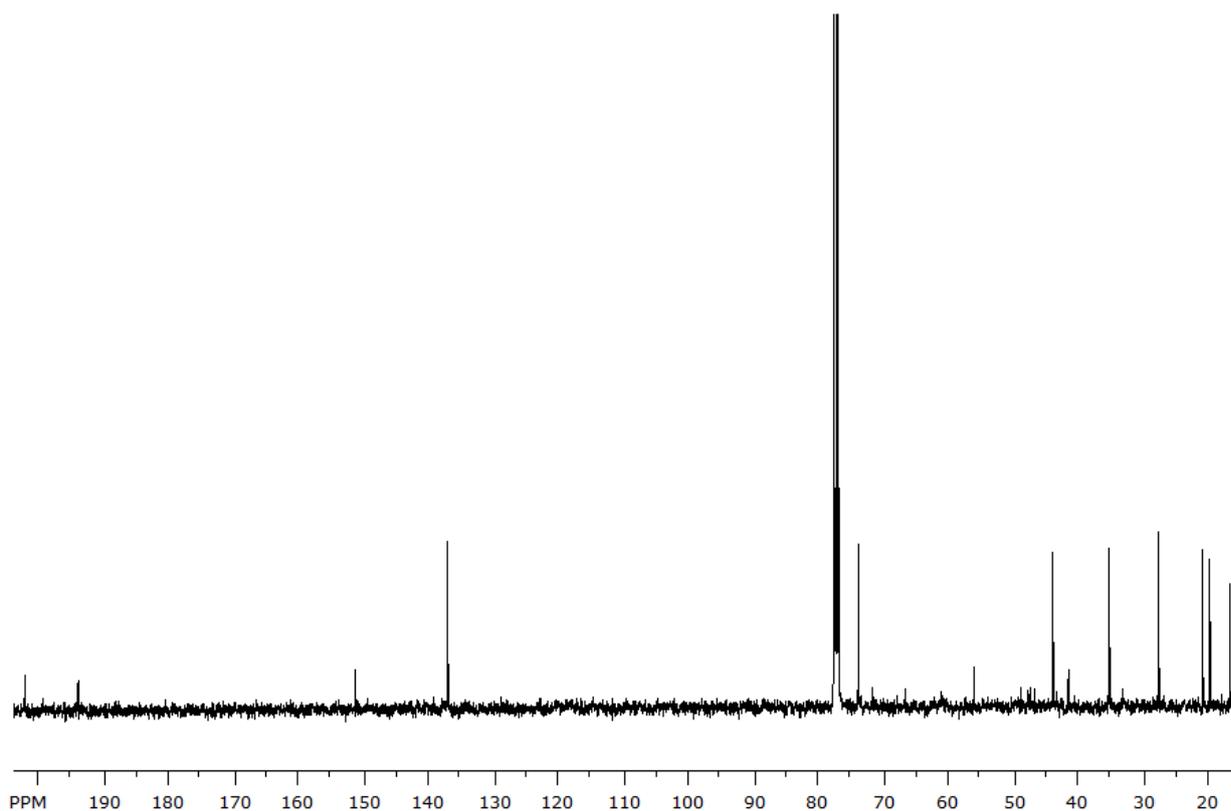


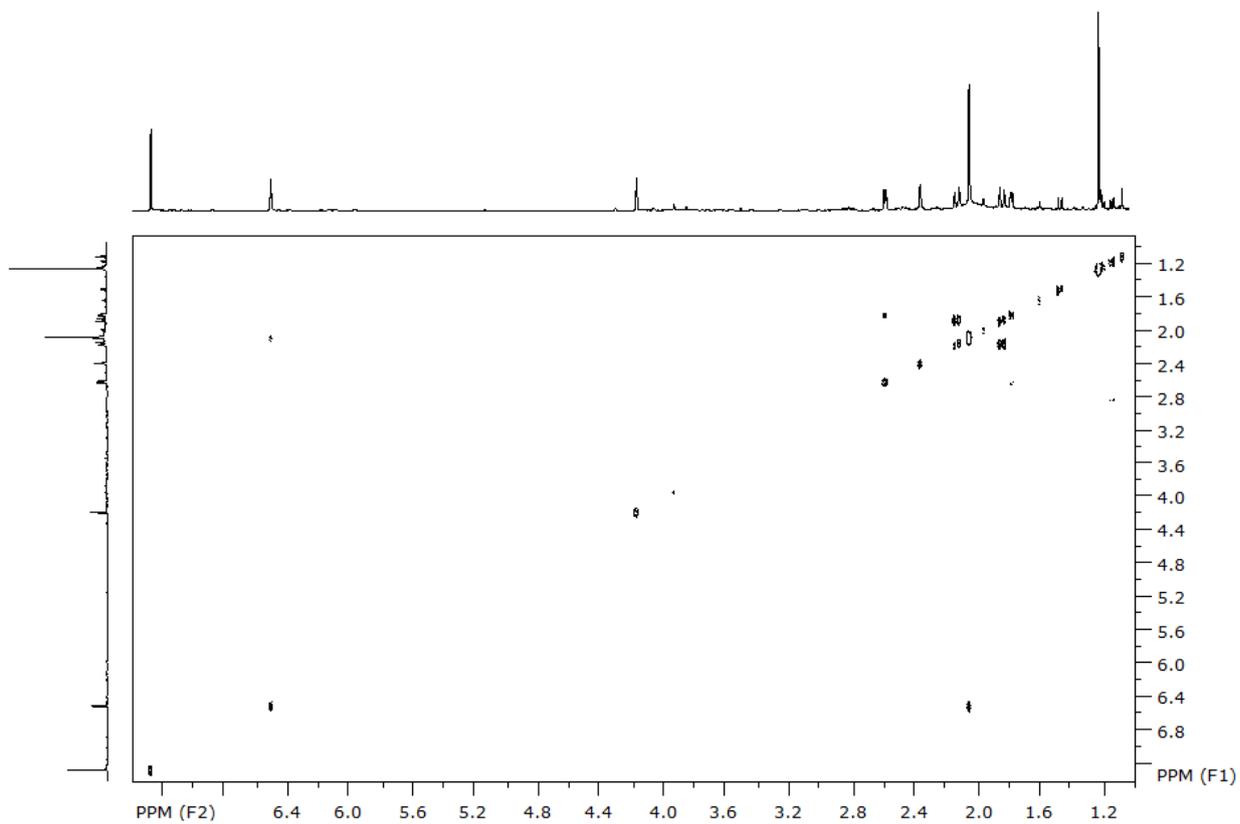
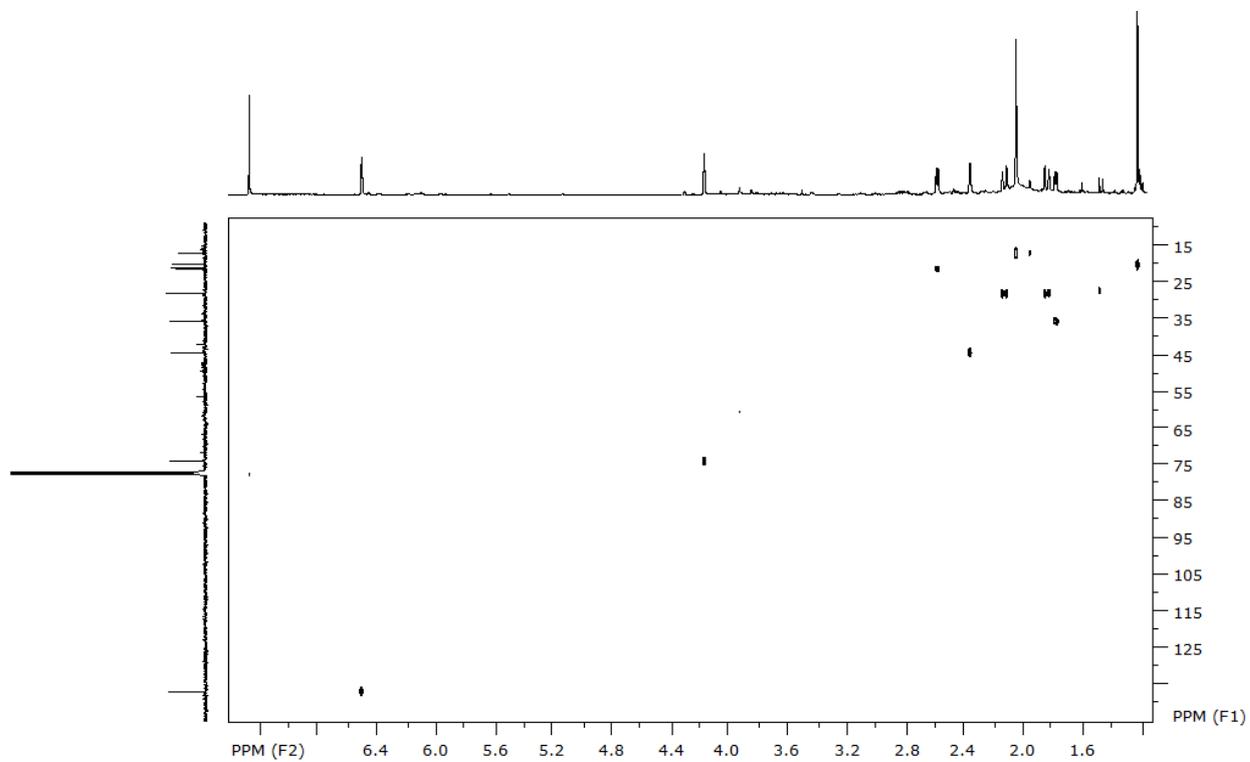
Espectro de ^{13}C da substância Q2A_CR_5 (100 MHz, CDCl_3)

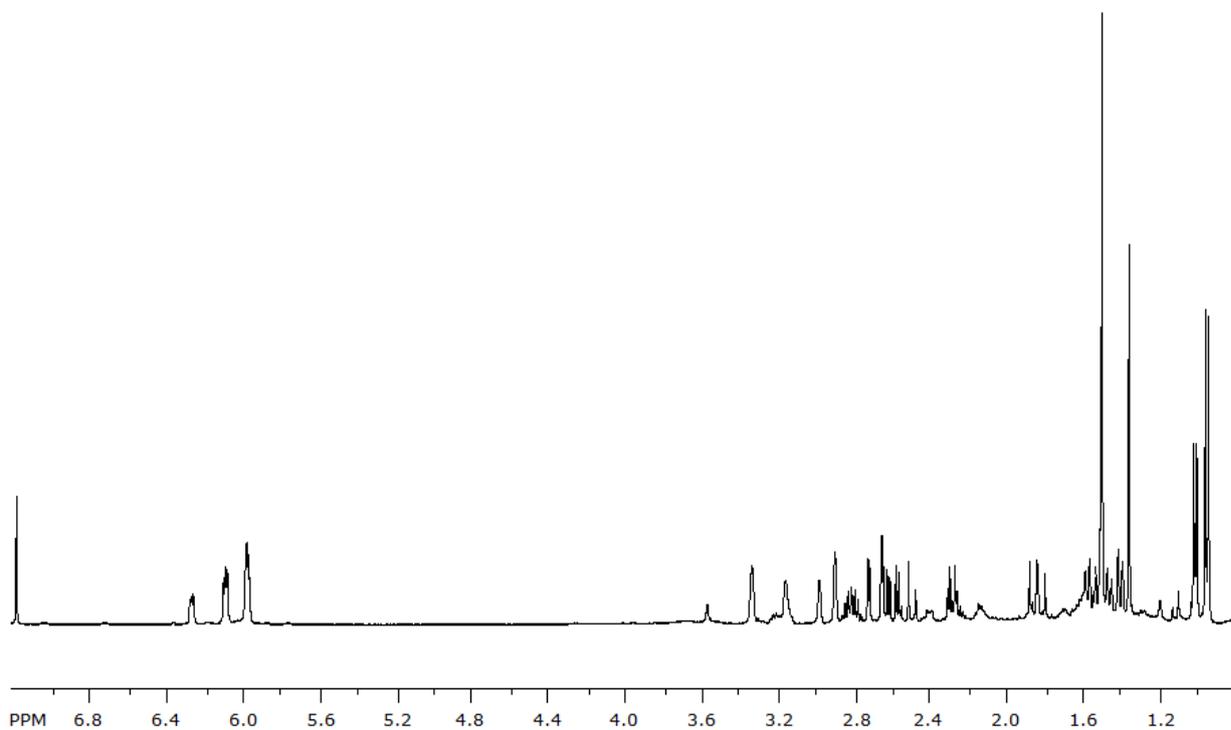
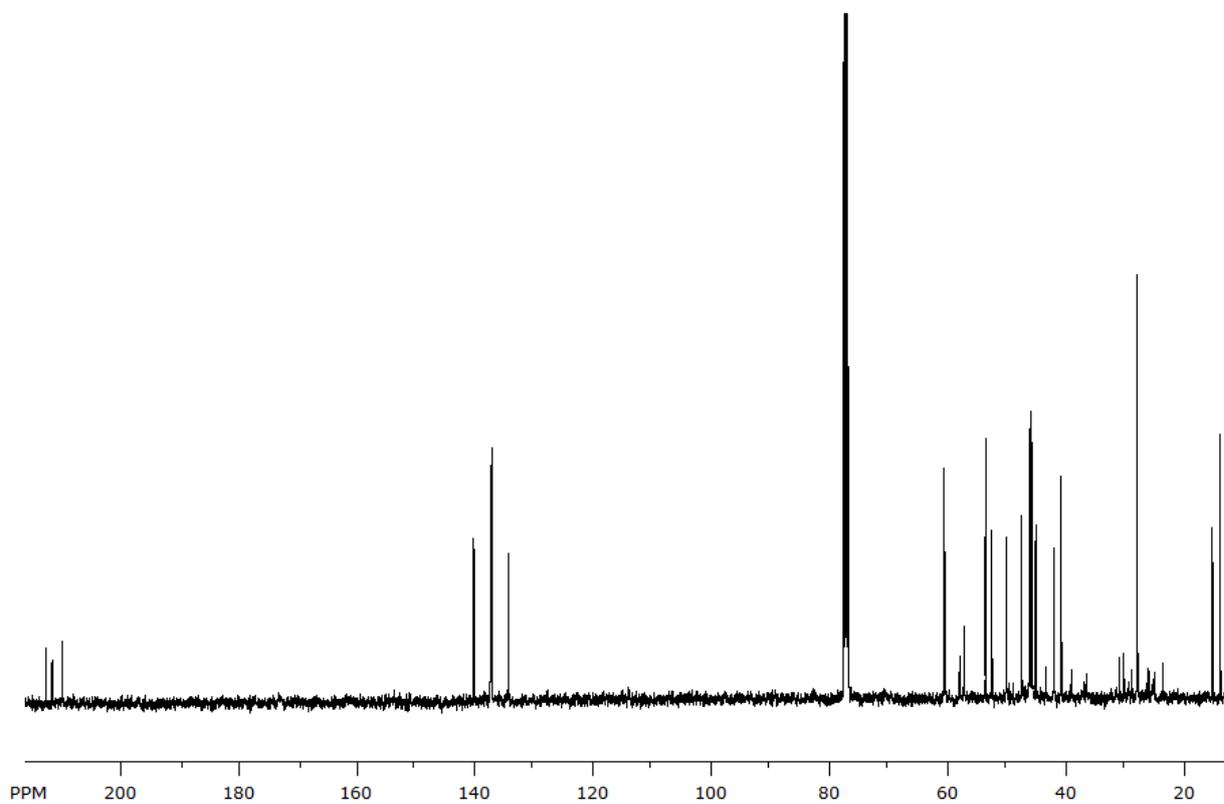
Espectro de COSY da substância Q2A_CR_5 (CDCl₃)Espectro de HSQC da substância Q2A_CR_5 (CDCl₃)

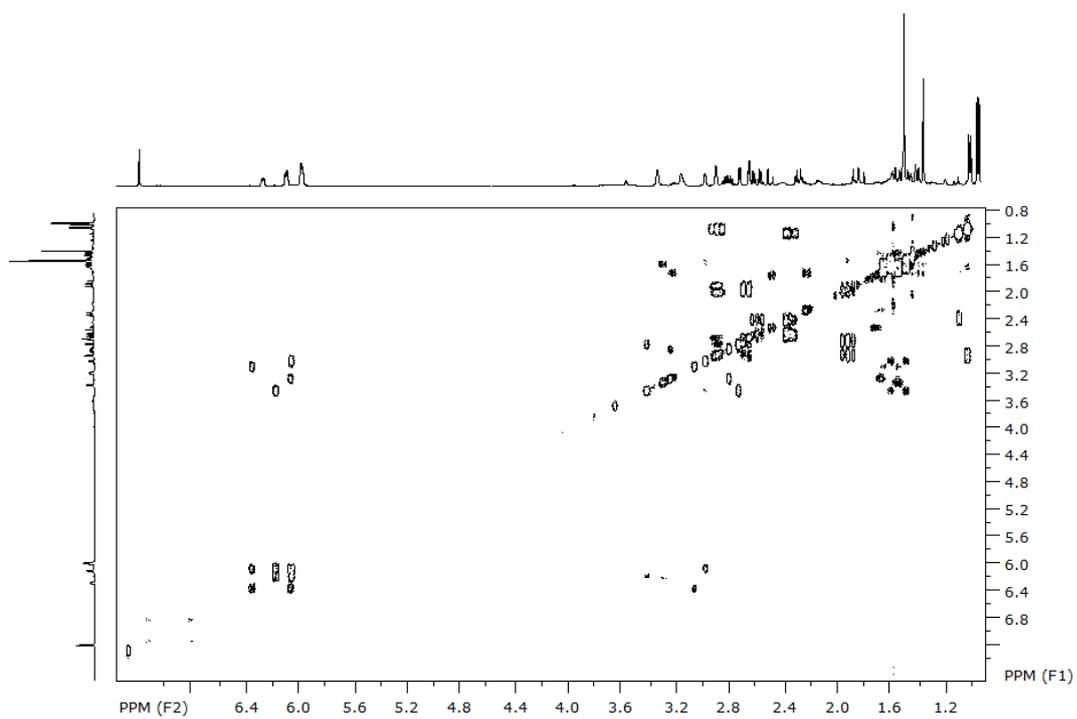
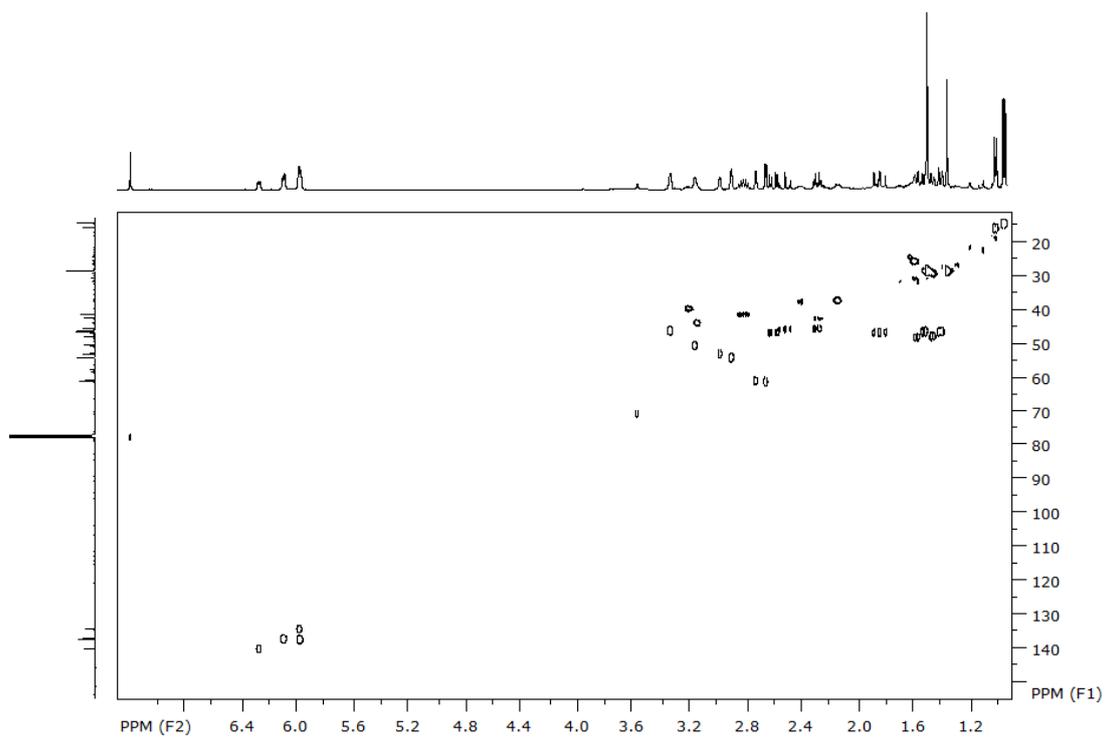


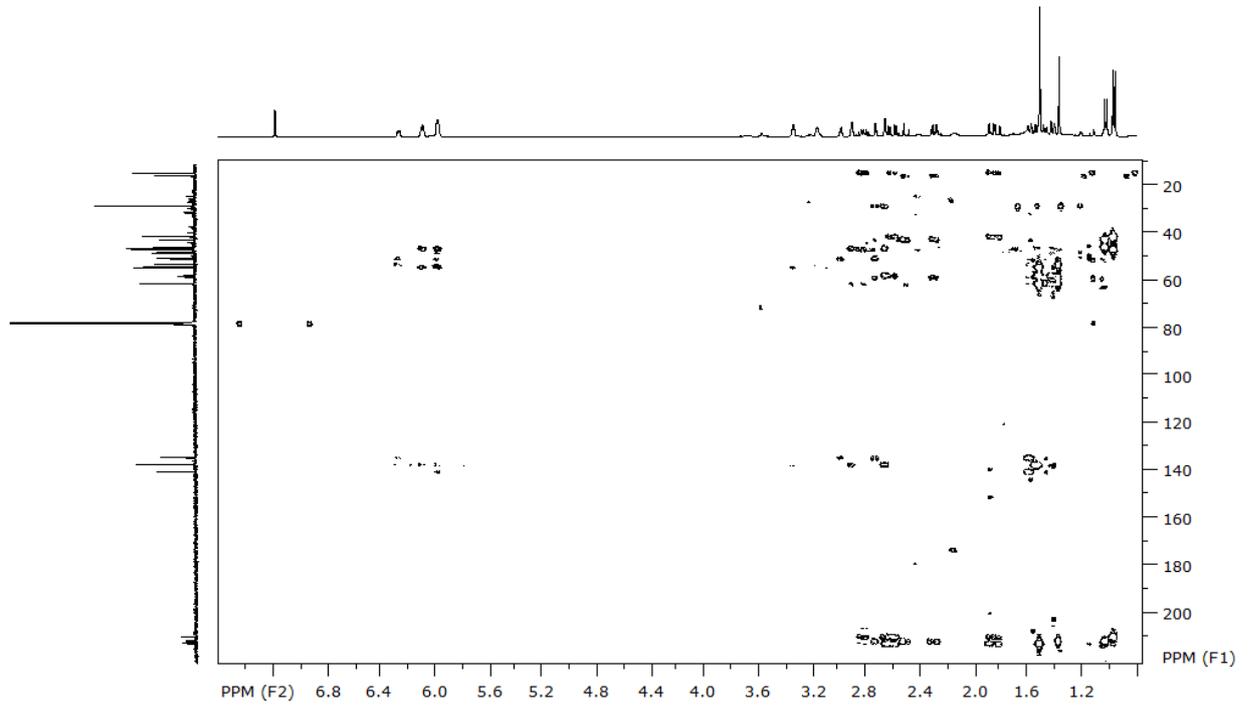
Espectro de HMBC da substância Q2A_CR_5 (CDCl₃)

4. - Espectros da substância Q2A_CR_6Espectro de ^1H da substância Q2A_CR_6 (400 MHz, CDCl_3)Espectro de ^{13}C da substância Q2A_CR_6 (100 MHz, CDCl_3)

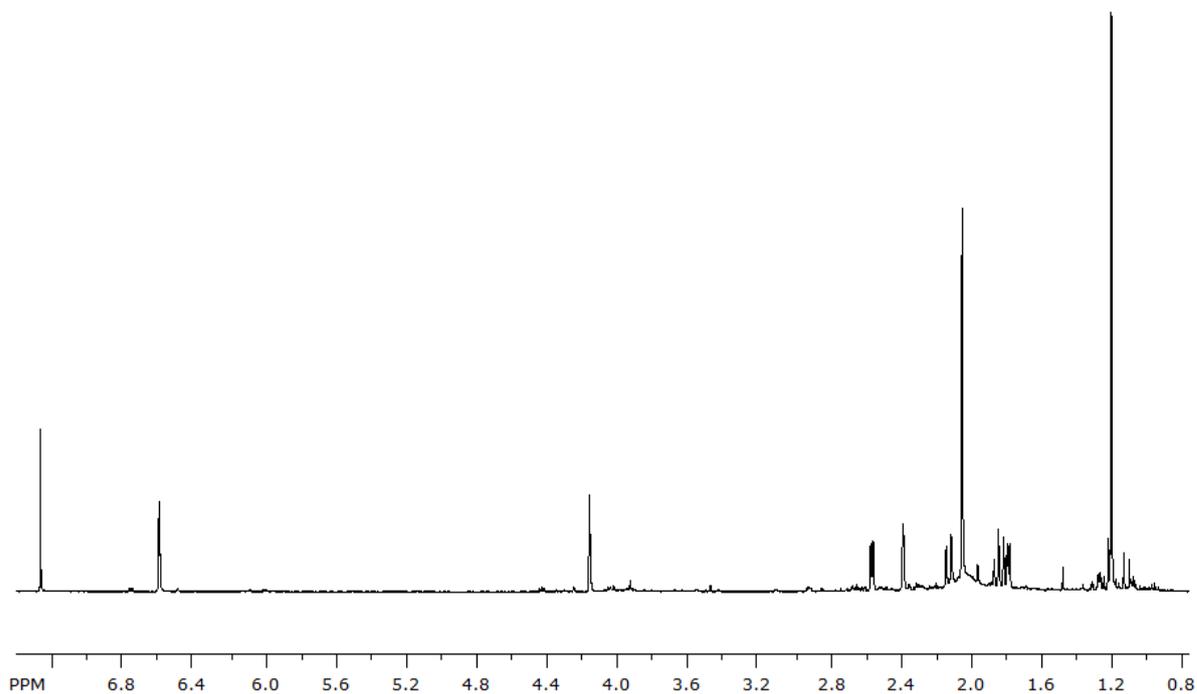
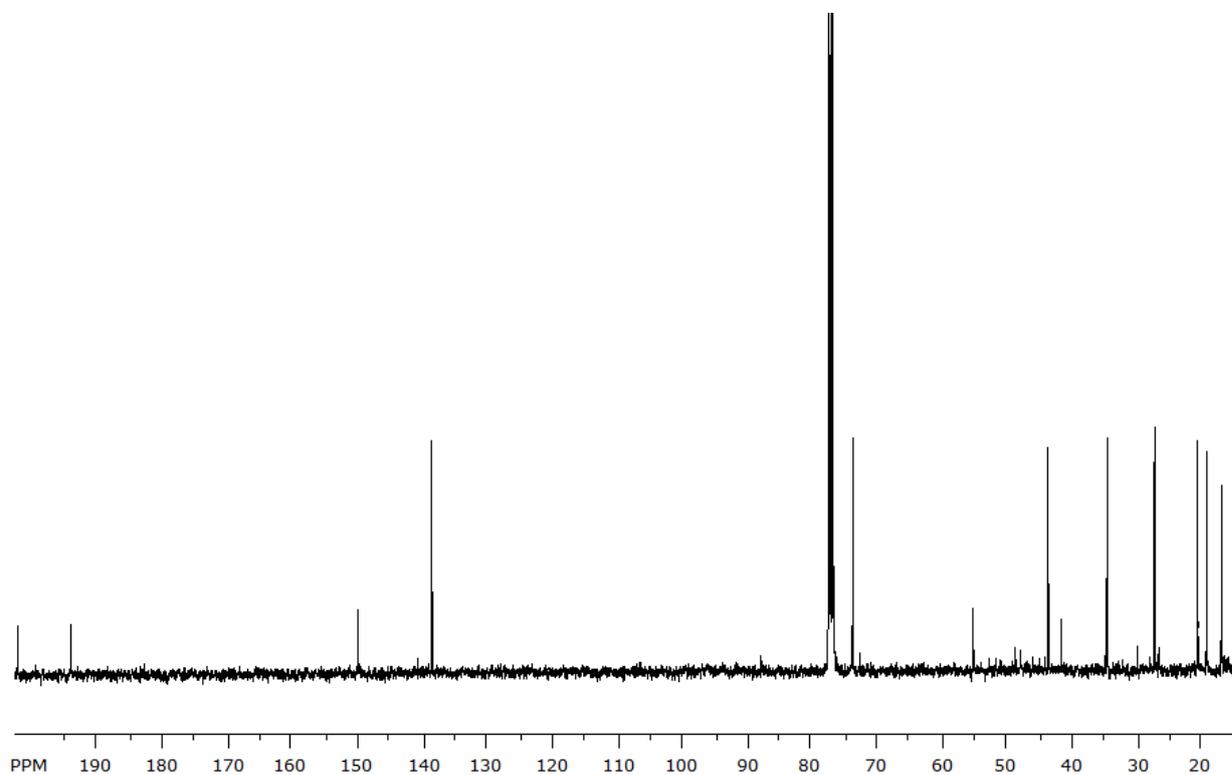
Espectro de COSY da substância Q2A_CR_6 (CDCl₃)Espectro de HSQC da substância Q2A_CR_6 (CDCl₃)

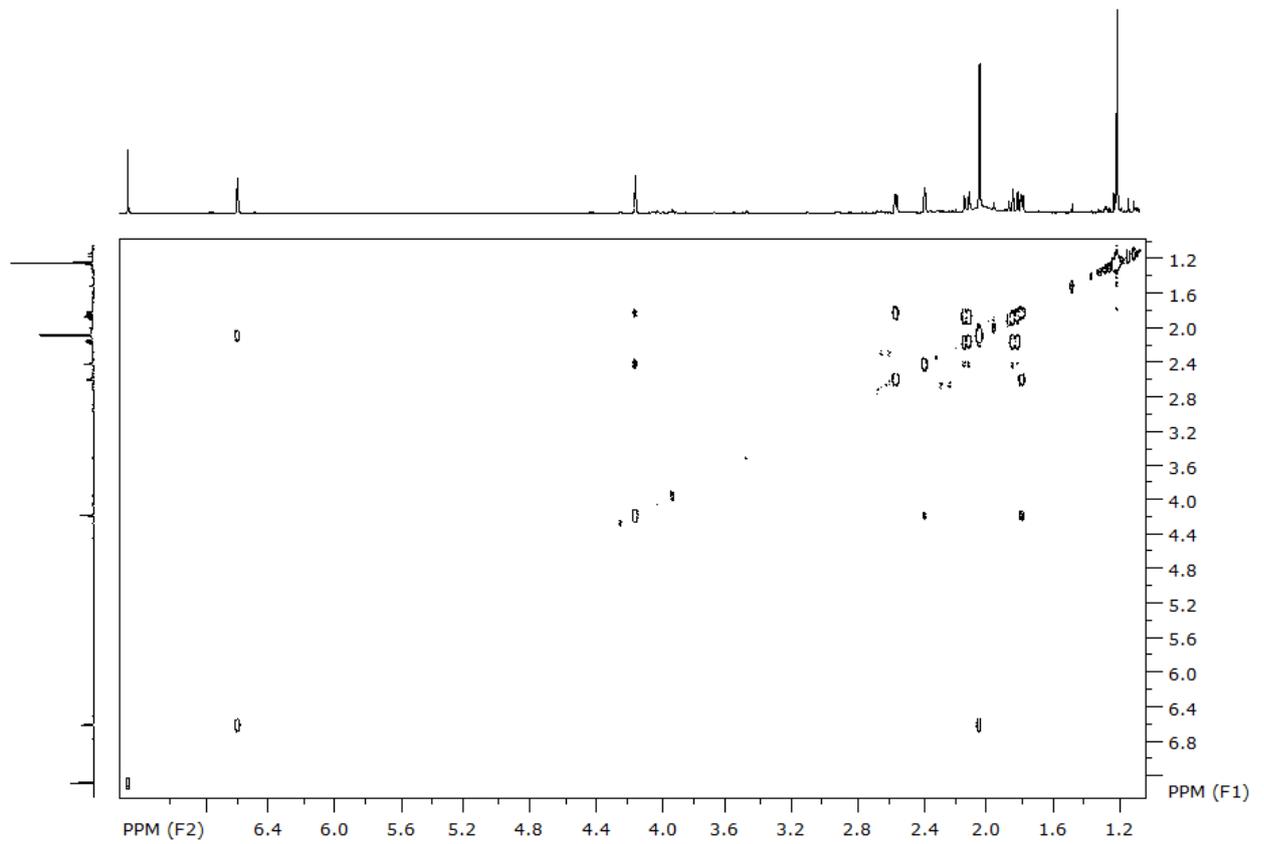
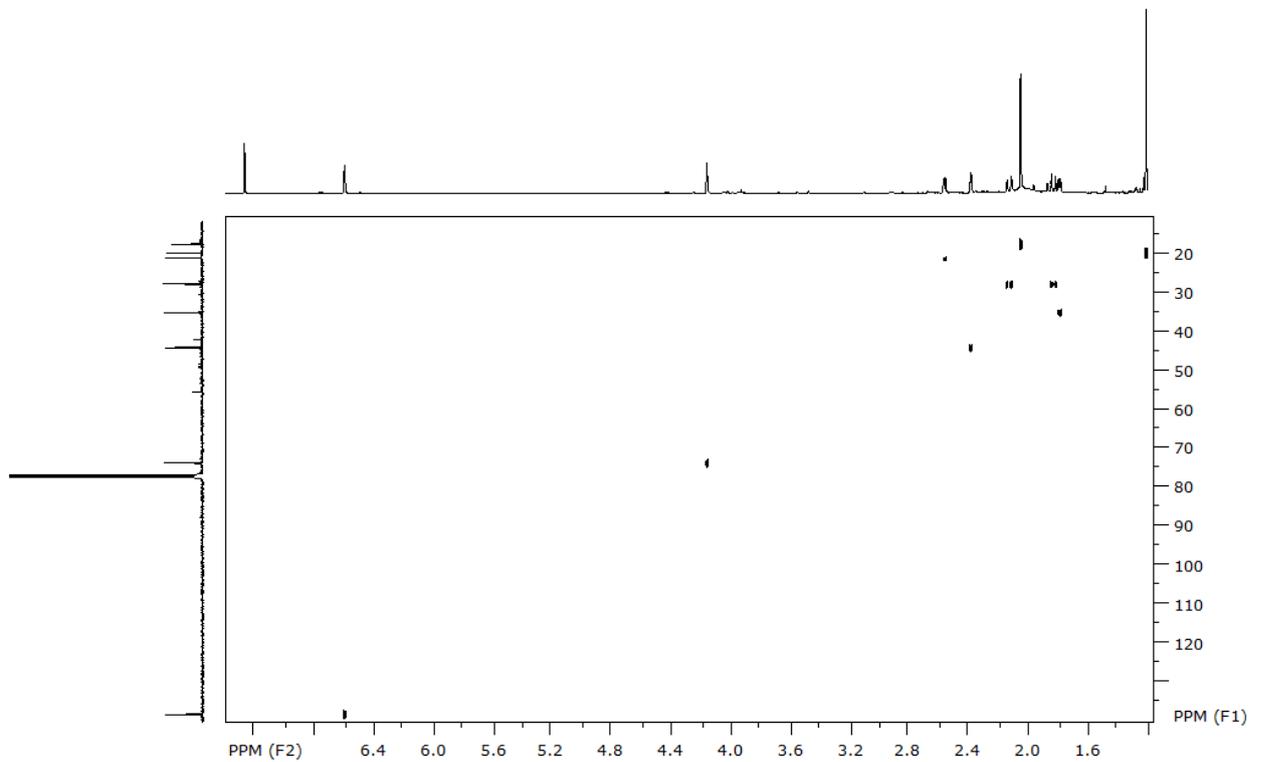
5. - Espectros da substância Q2A_CR_9_majoritárioEspectro de ¹H da substância Q2A_CR_9 (400 MHz, CDCl₃)Espectro de ¹³C da substância Q2A_CR_9 (100 MHz, CDCl₃)

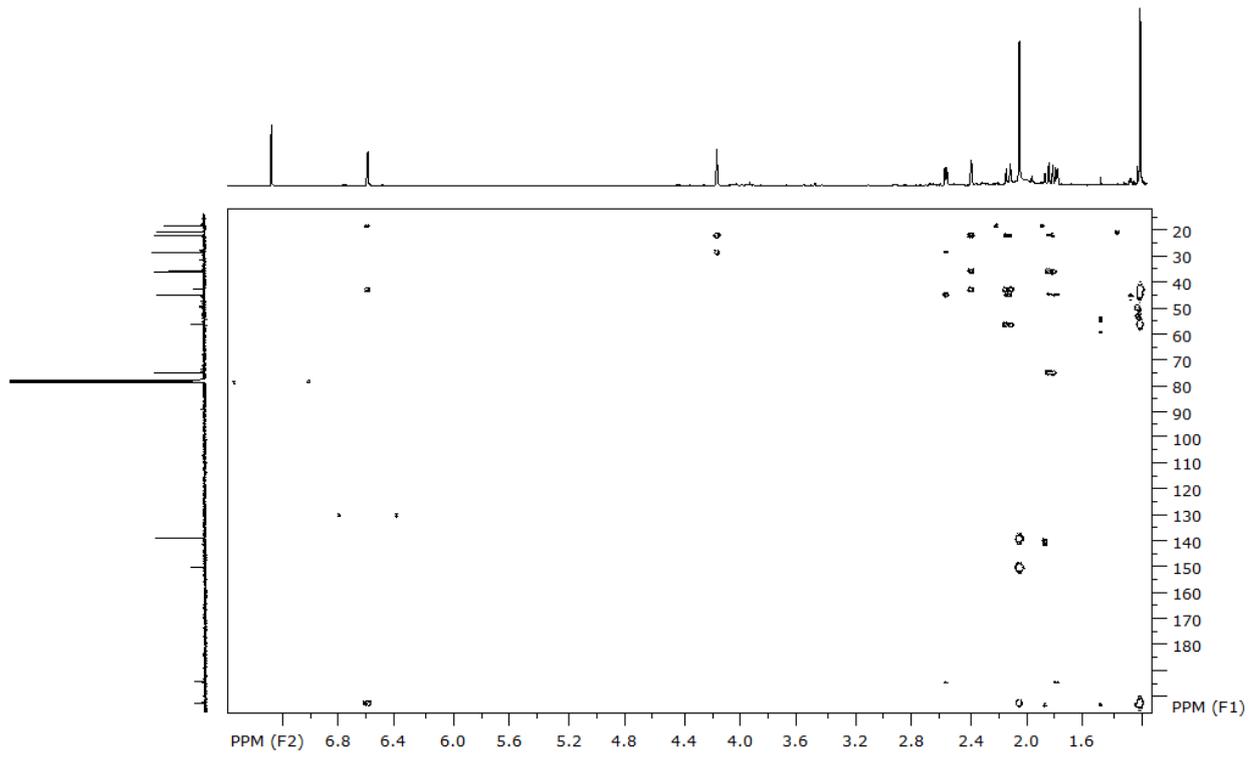
Espectro de COSY da substância Q2A_CR_9 (CDCl₃)Espectro de HSQC da substância Q2A_CR_9 (CDCl₃)



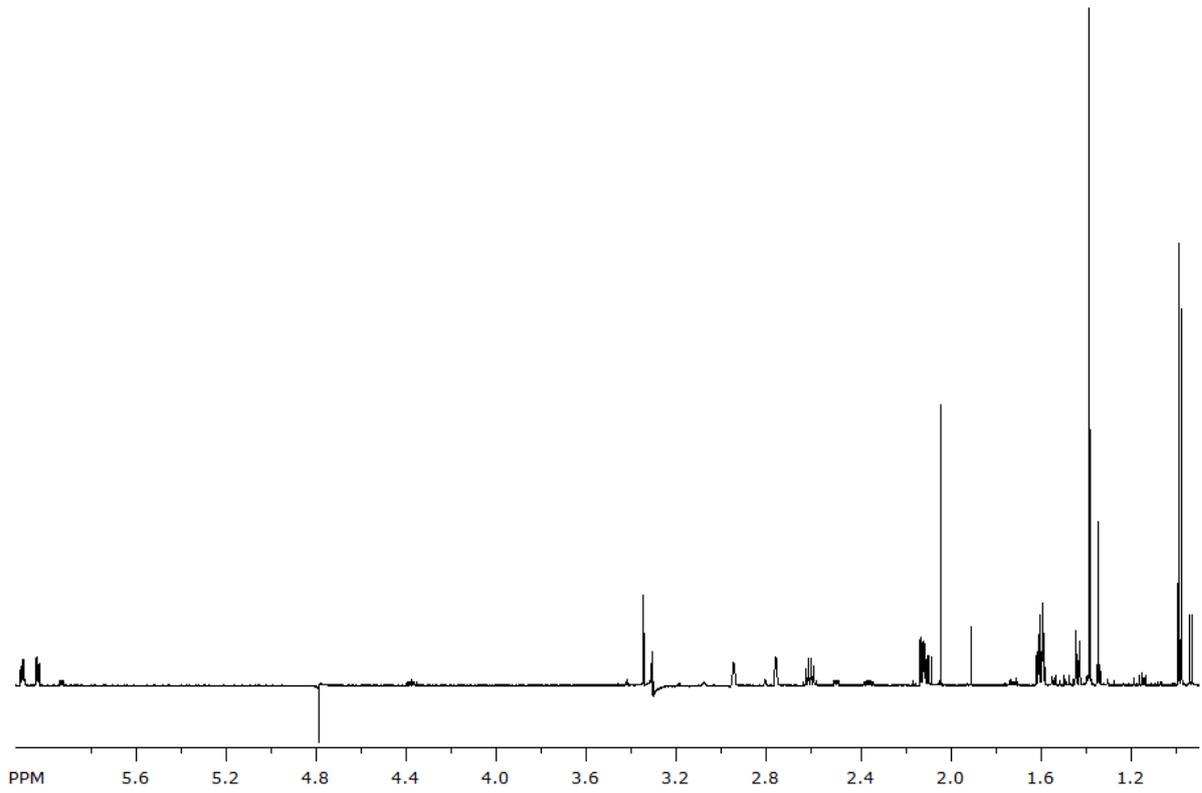
Espectro de HMBC da substância Q2A_CR_9 (400 MHz, CDCl₃)

6. - Espectros da substância Q3A_CR_5Espectro de ^1H da substância Q3A_CR_5 (400 MHz, CDCl_3)Espectro de ^{13}C da substância Q3A_CR_5 (100 MHz, CDCl_3)

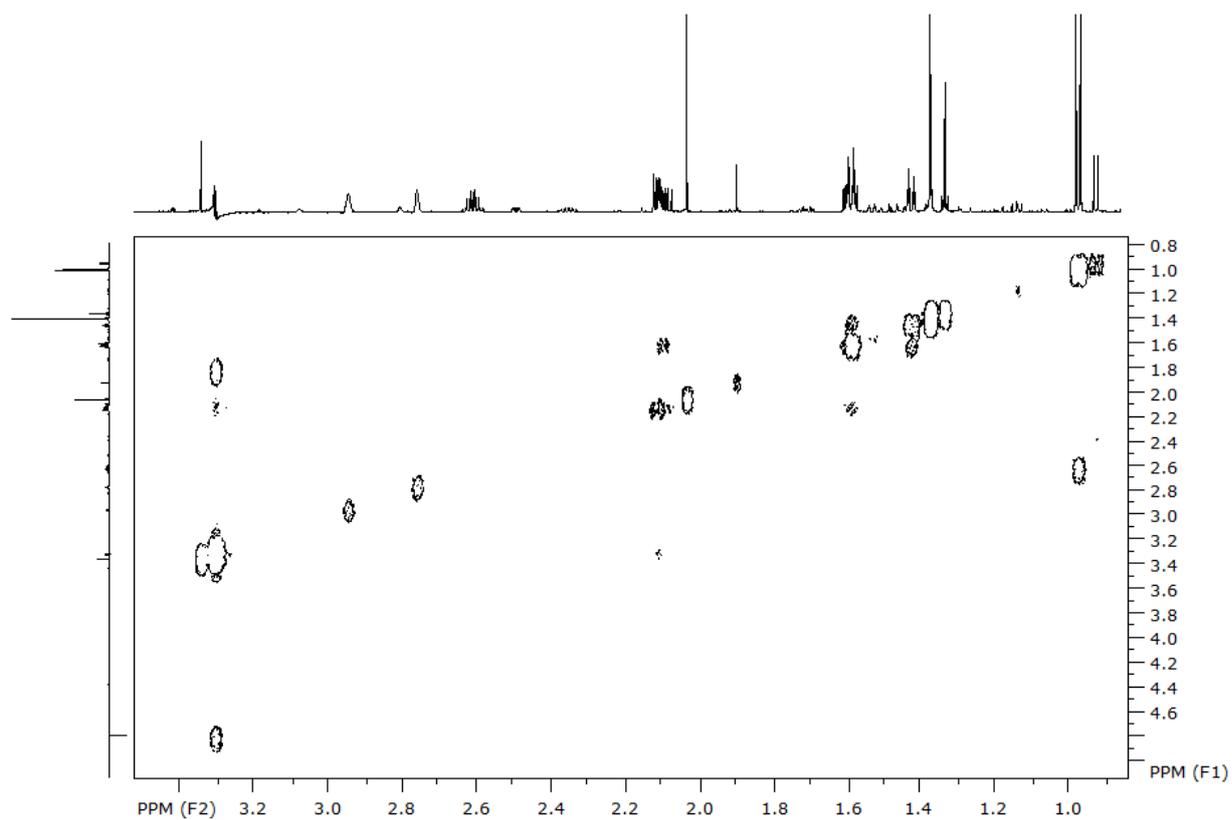
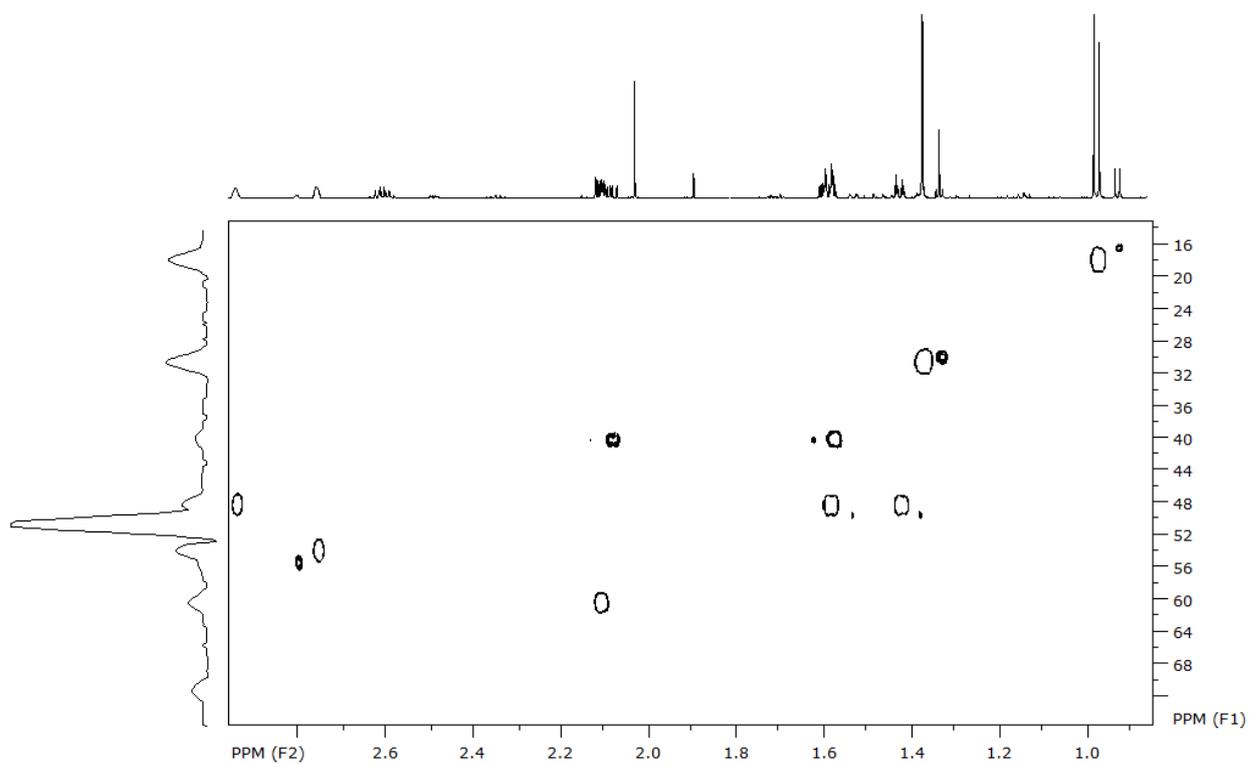
Espectro de COSY da substância Q3A_CR_5 (CDCl_3)Espectro de HSQC da substância Q3A_CR_5 (CDCl_3)

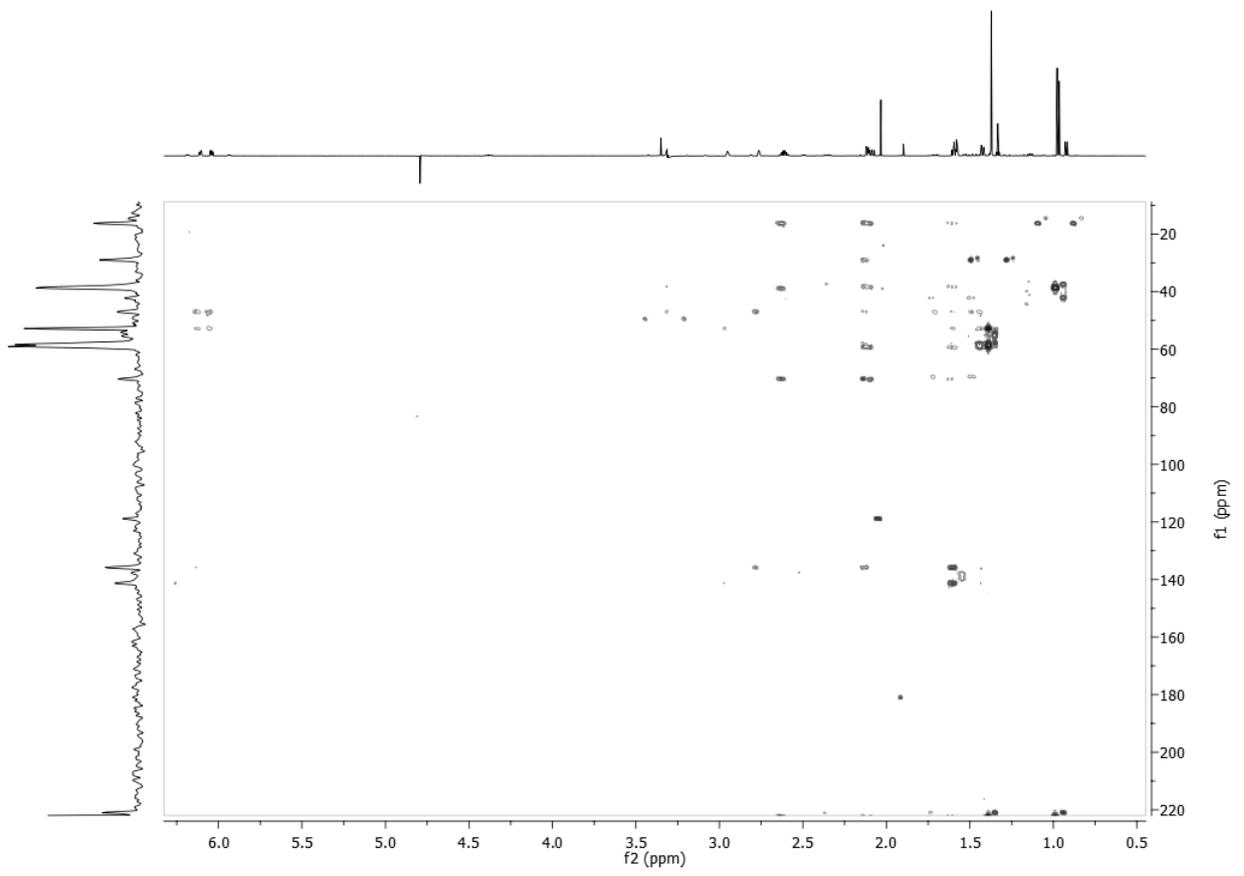


Espectro de HMBC da substância Q3A_CR_5 (CDCl₃)

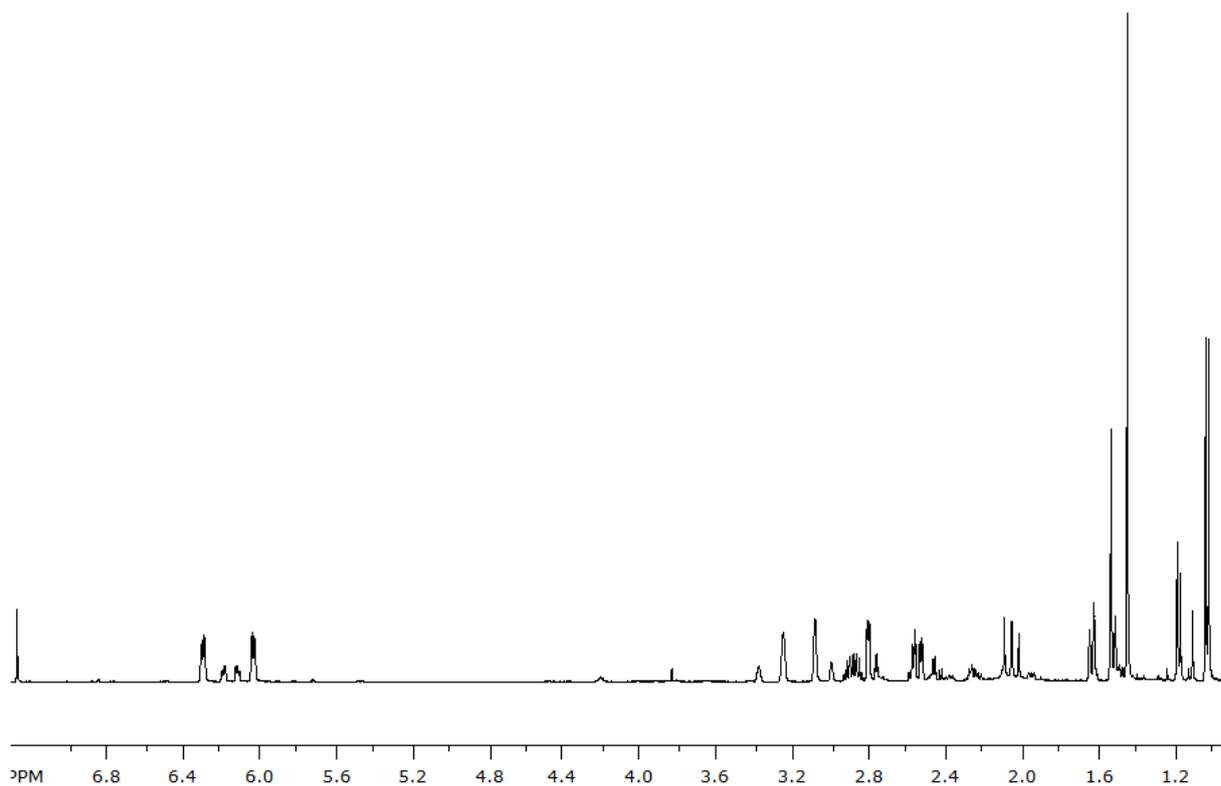
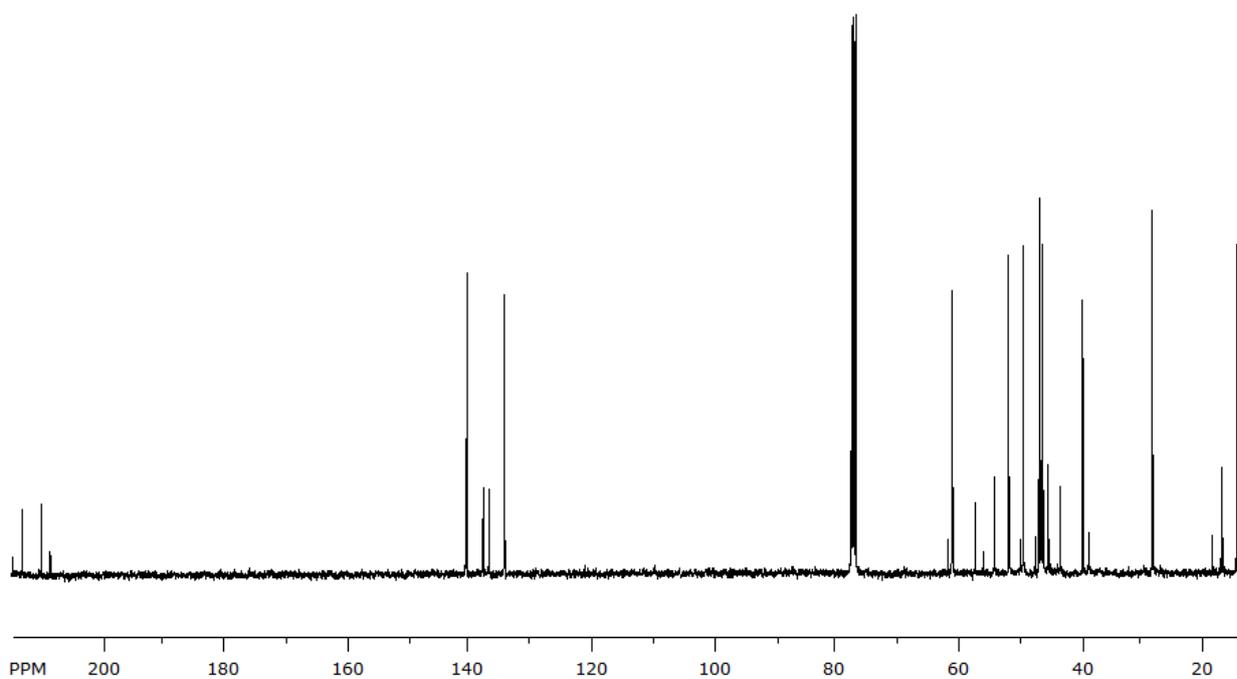
7. - Espectros da substância Q3A_CR_7_pico

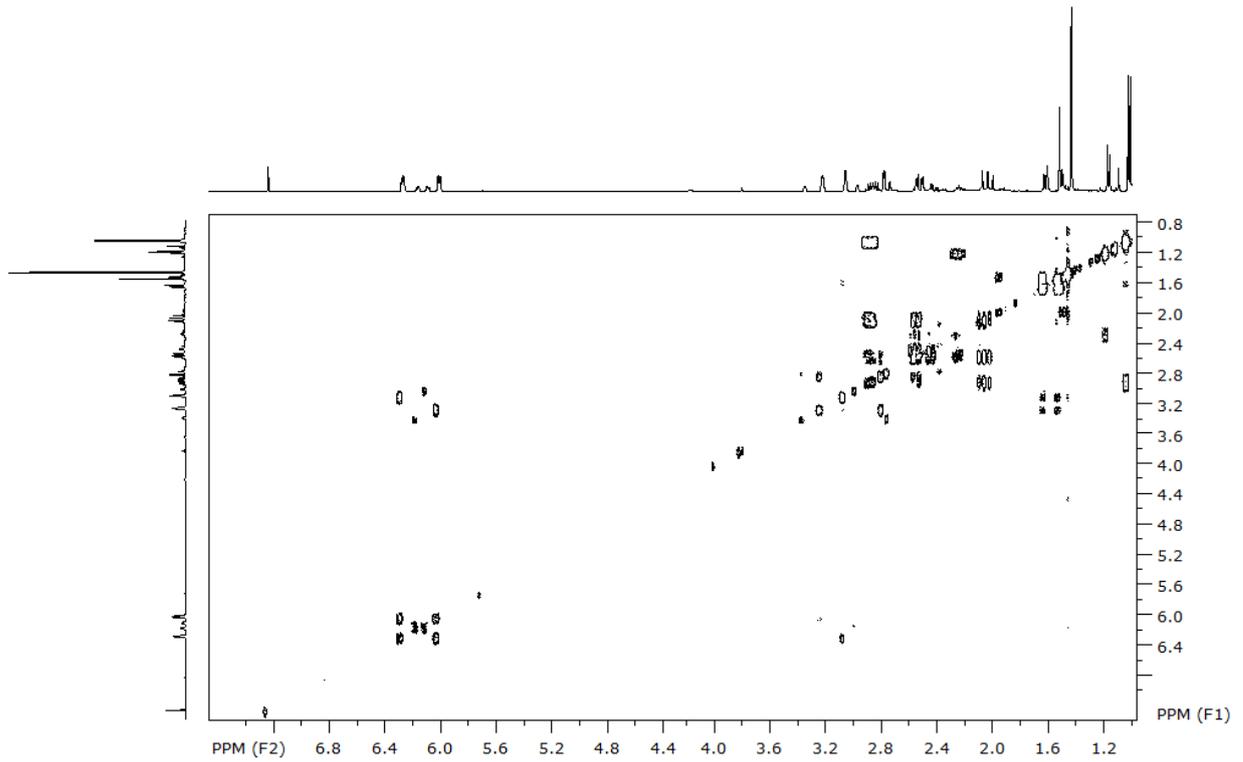
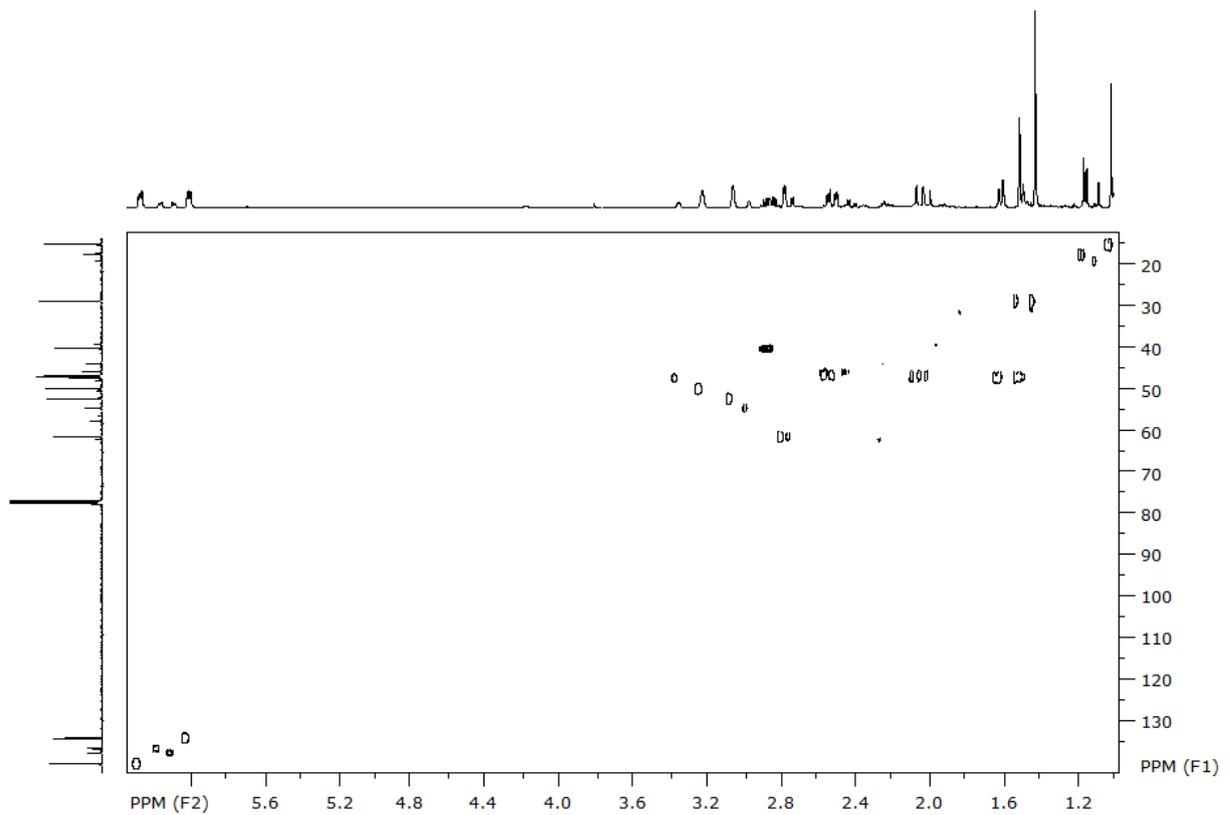
Espectro de ^1H da substância Q3A_CR_7_pico2 (600 MHz, CDCl_3)

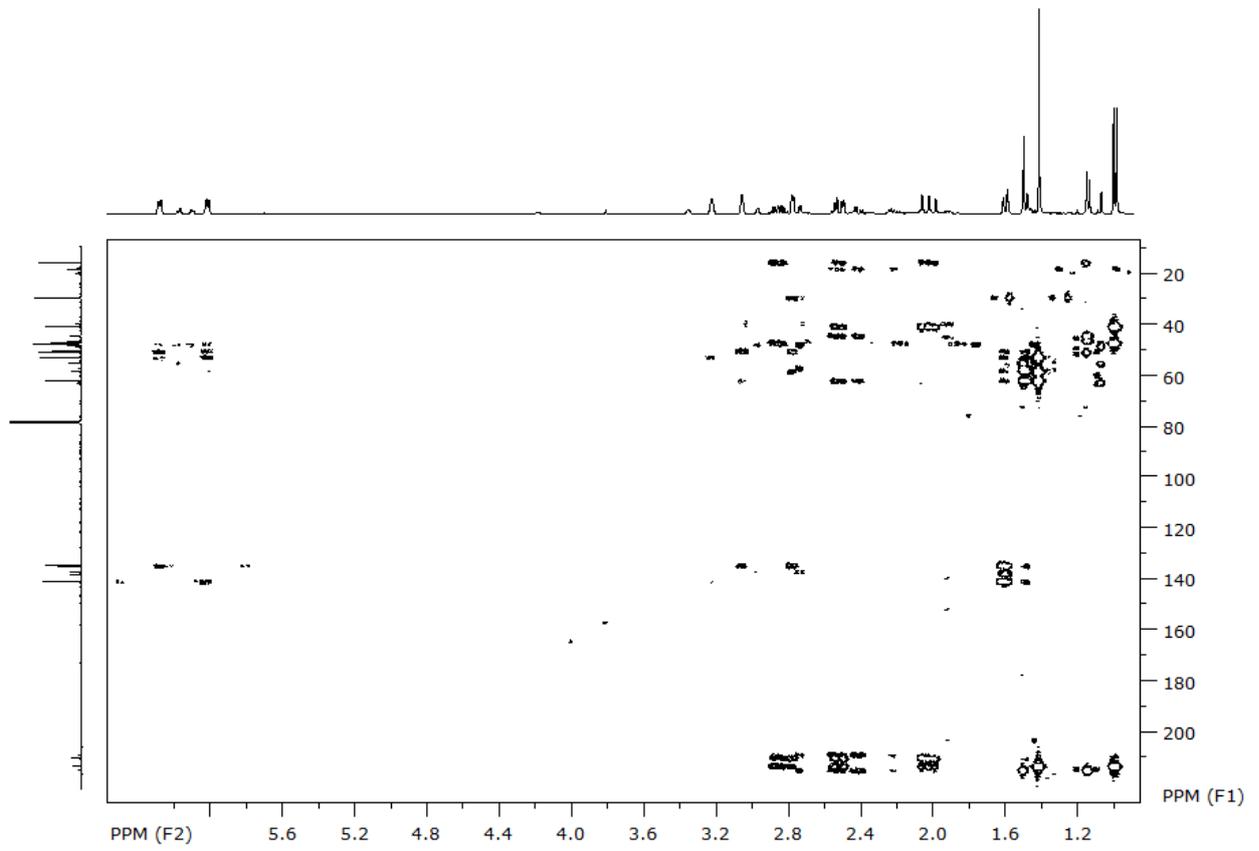
Espectro de COSY da substância Q3A_CR_7_pico2 (CDCl₃)Espectro de HSQC da substância Q3A_CR_7_pico2 (CDCl₃)



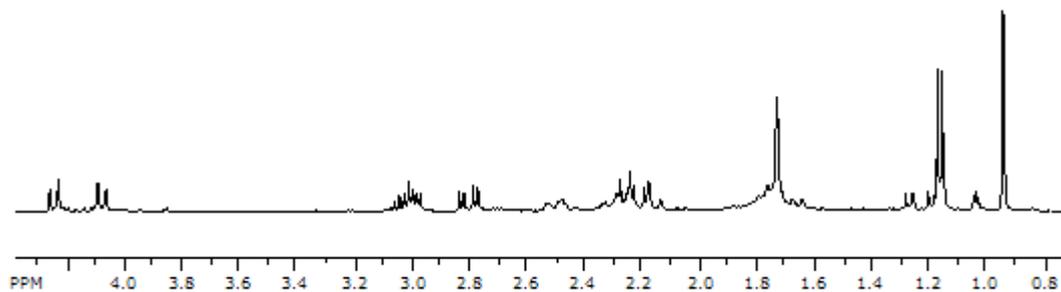
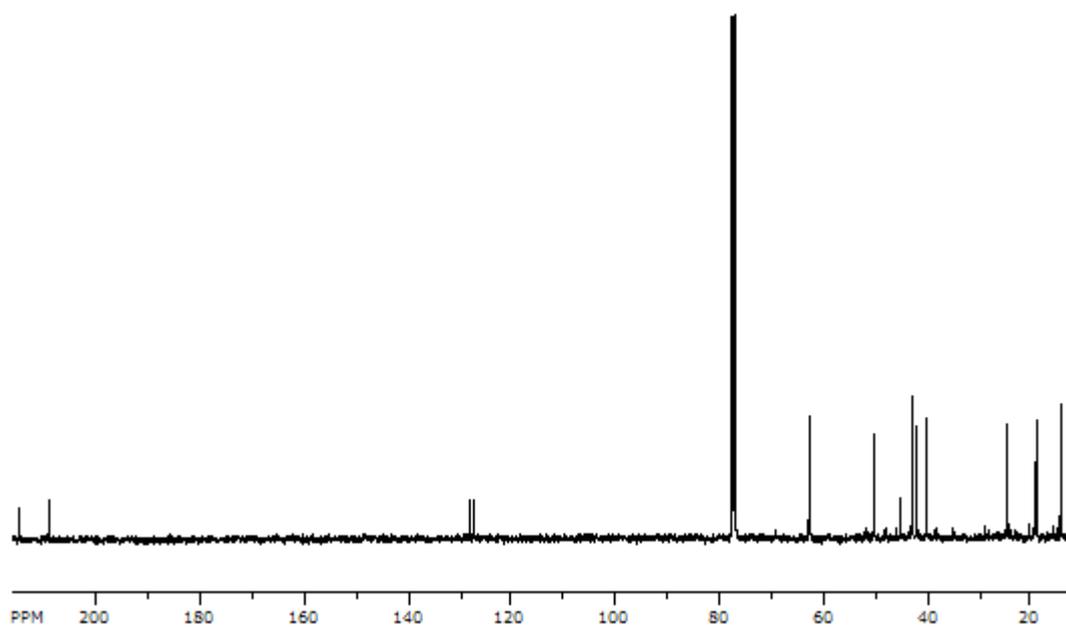
Espectro de HMBC da substância Q3A_CR_7_pico2 (CDCl₃)

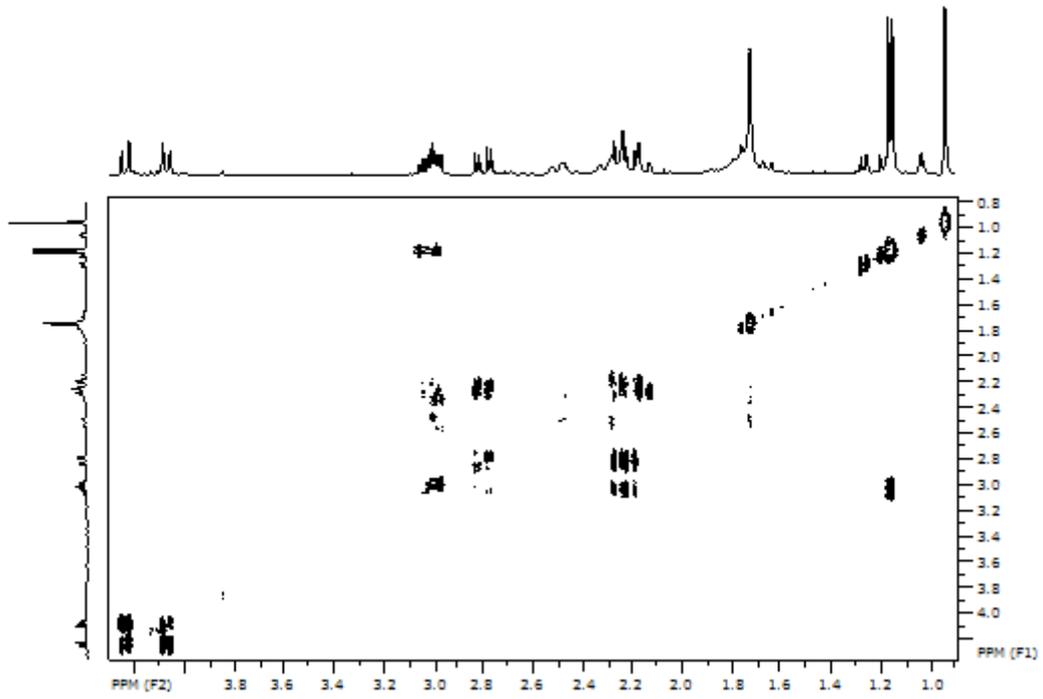
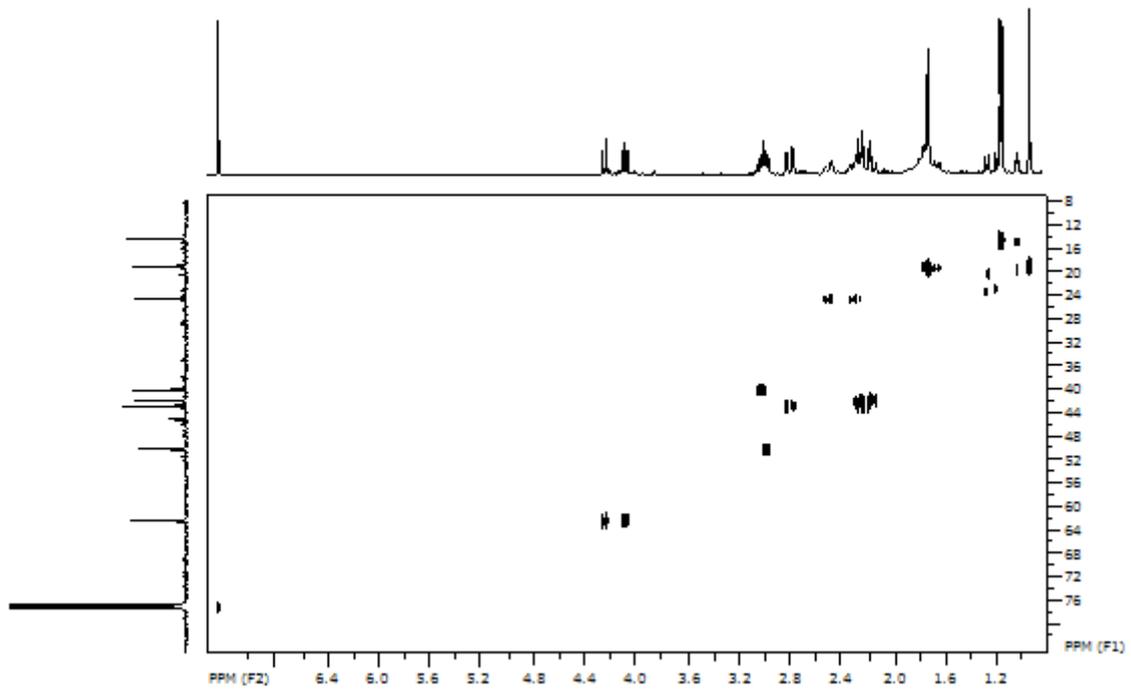
8. - Espectros da substância Q3A_CR_8Espectro de ¹H da substância Q3A_CR_8 (400 MHz, CDCl₃)Espectro de ¹³C da substância Q3A_CR_7_pico2 (100 MHz, CDCl₃)

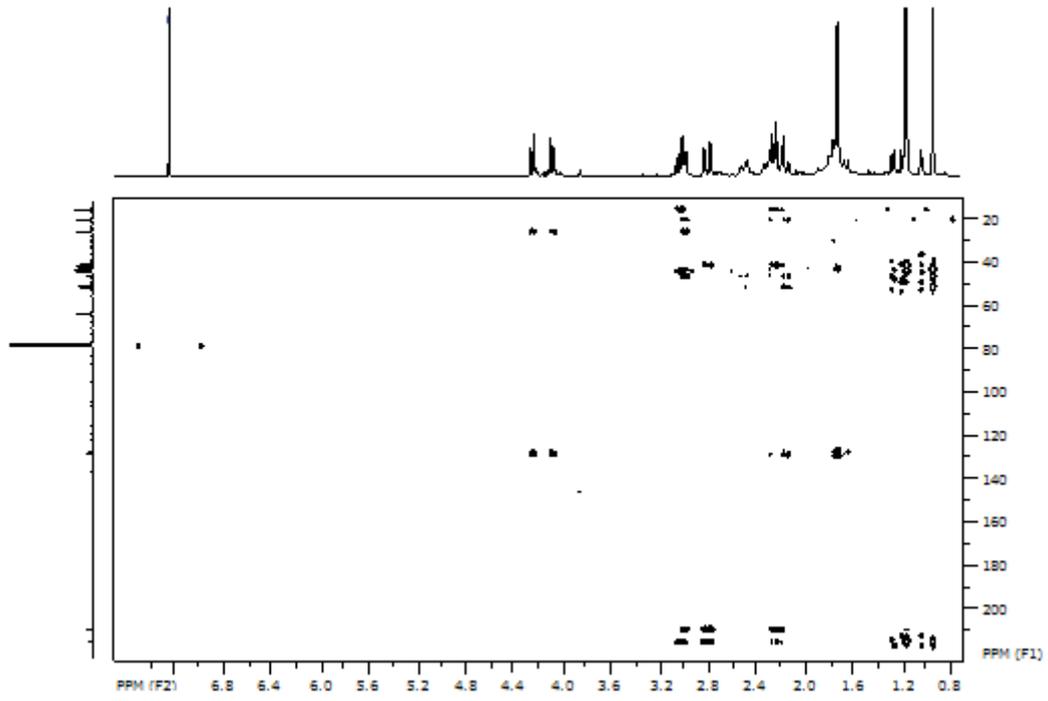
Espectro de COSY da substância Q3A_CR_8 (CDCl₃)Espectro de HSQC da substância Q3A_CR_8 (CDCl₃)



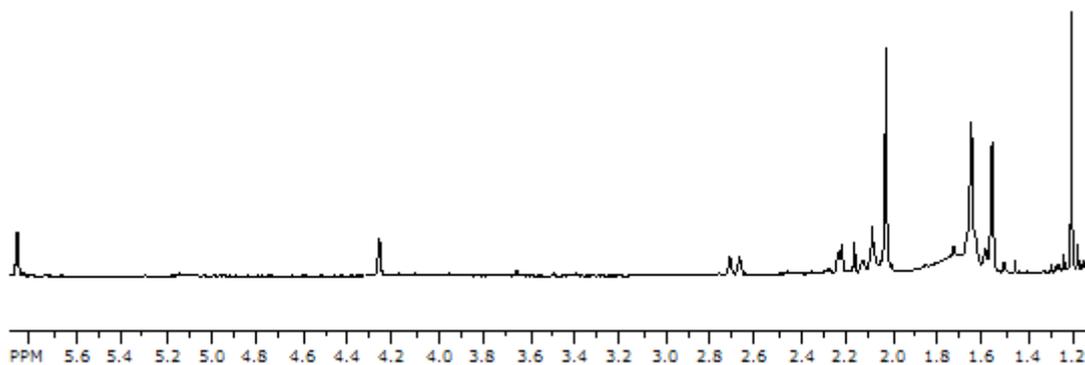
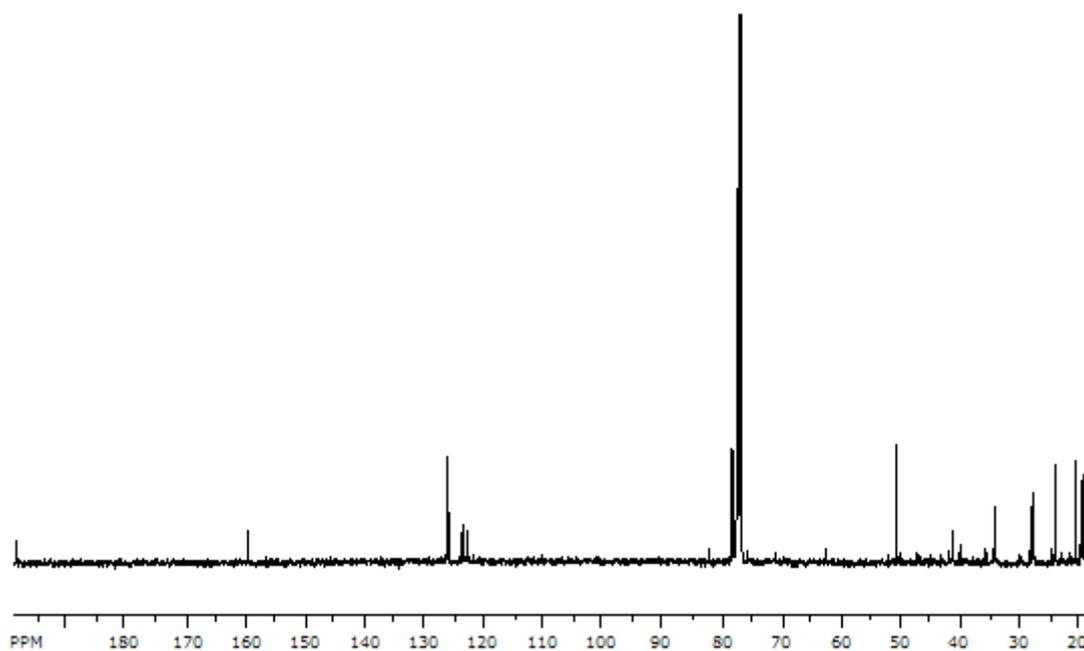
Espectro de HMBC da substância Q3A_CR_8 (CDCl_3)

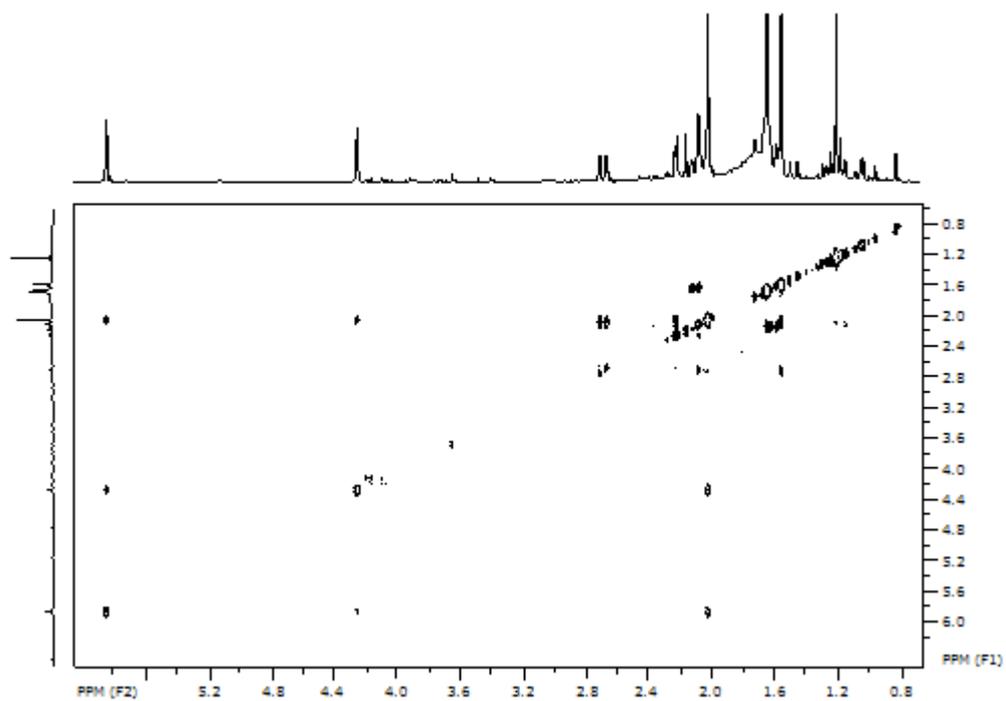
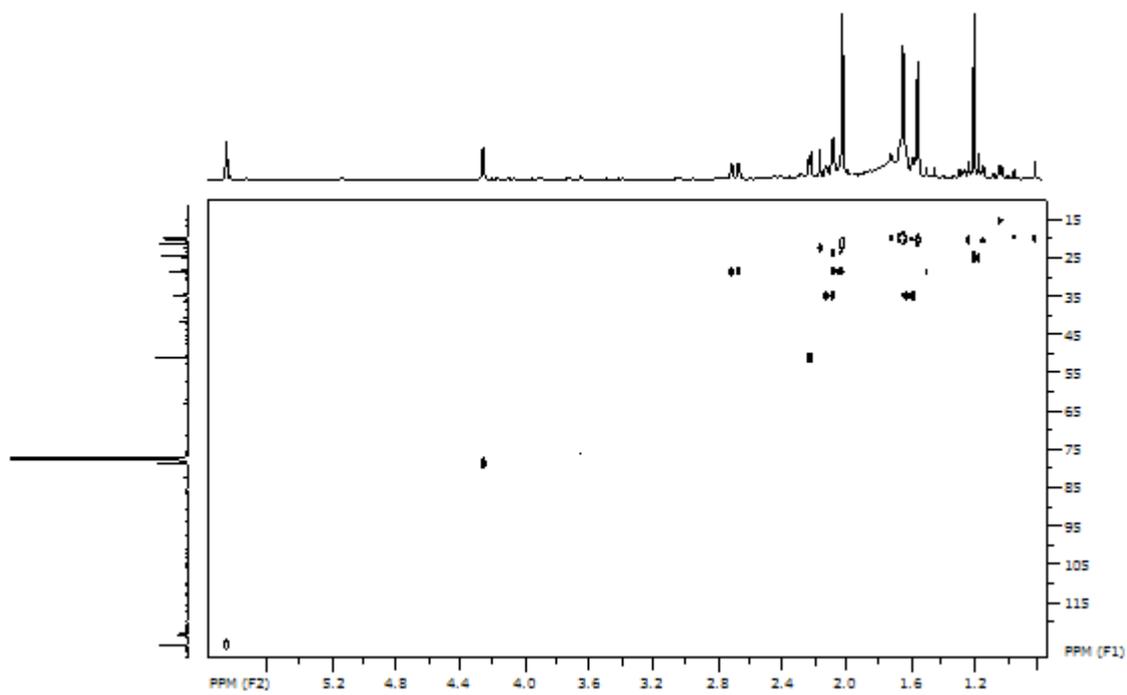
9. - Espectros da substância Q4A_CR_10Espectro de ^1H da substância Q4A_CR_10 (400 MHz, CDCl_3)Espectro de ^{13}C da substância Q4A_CR_10 (100 MHz, CDCl_3)

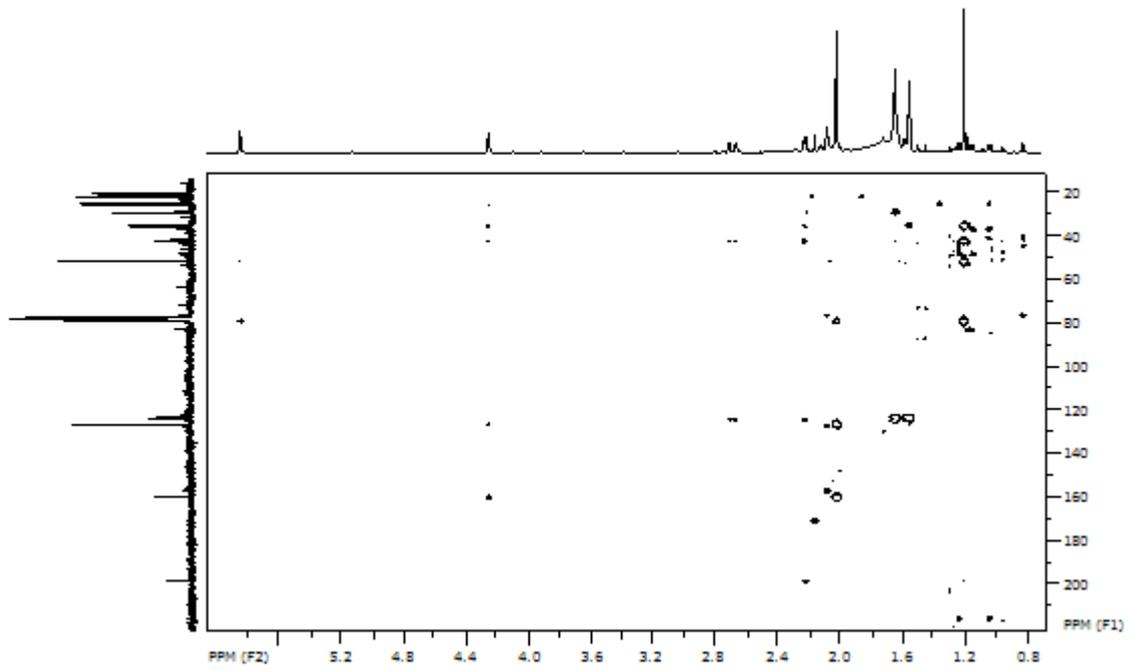
Espectro de COSY da substância Q4A_CR_10 (CDCl₃)Espectro de HSQC da substância Q4A_CR_10 (CDCl₃)



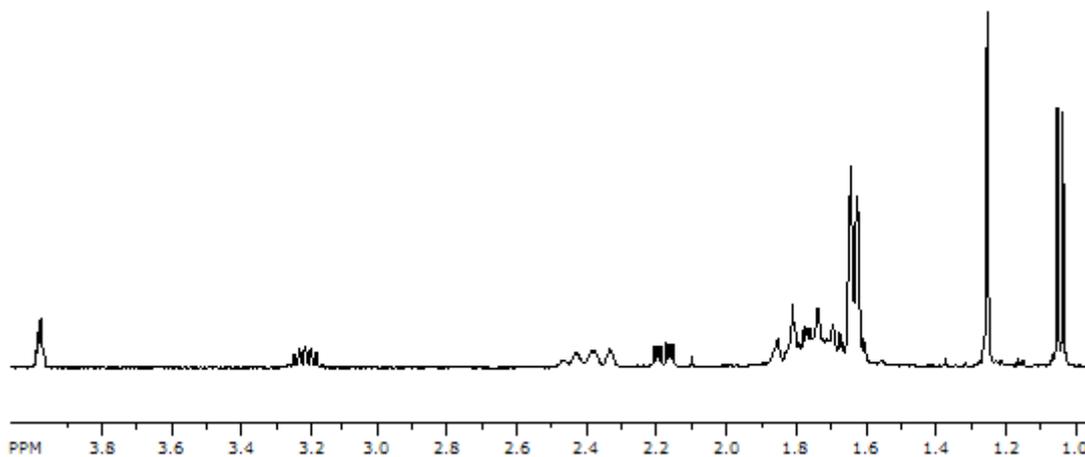
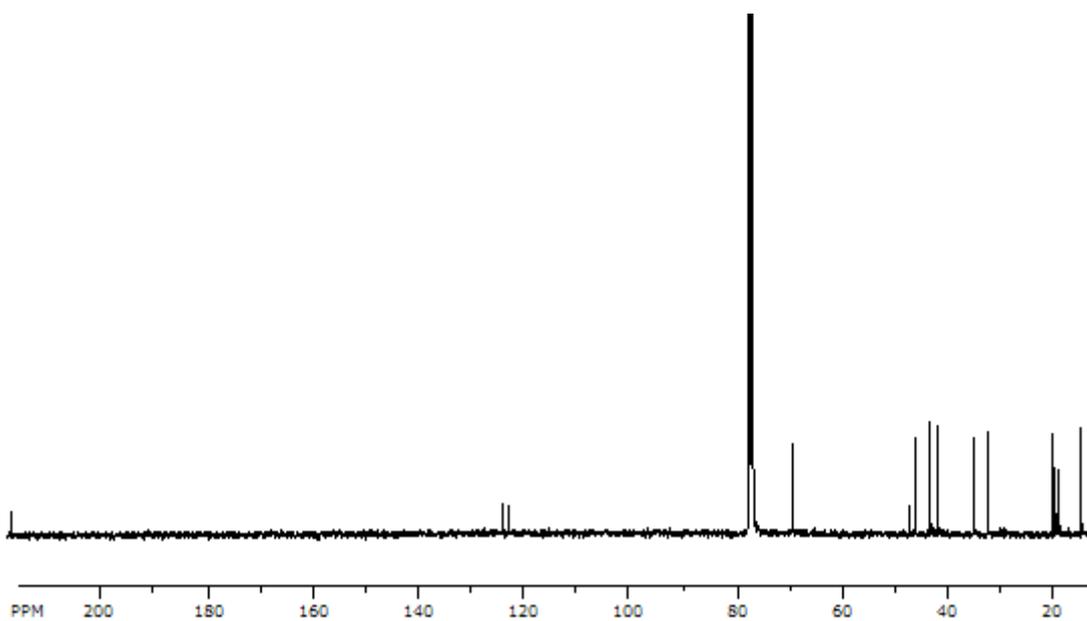
Espectro de HMBC da substância Q4A_CR_10 (CDCl₃)

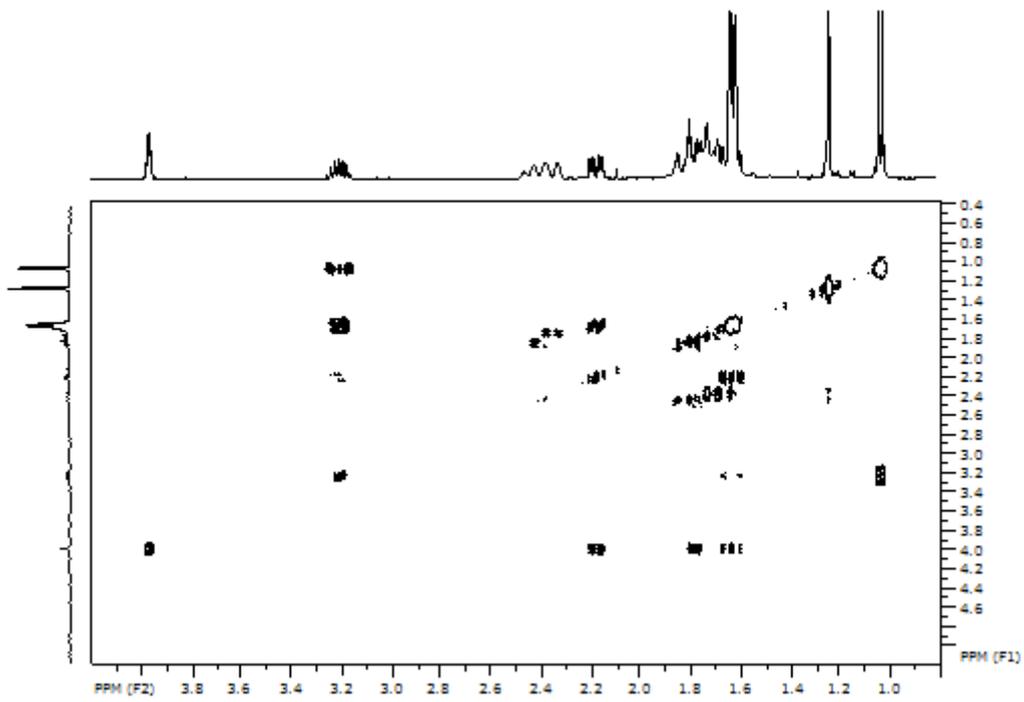
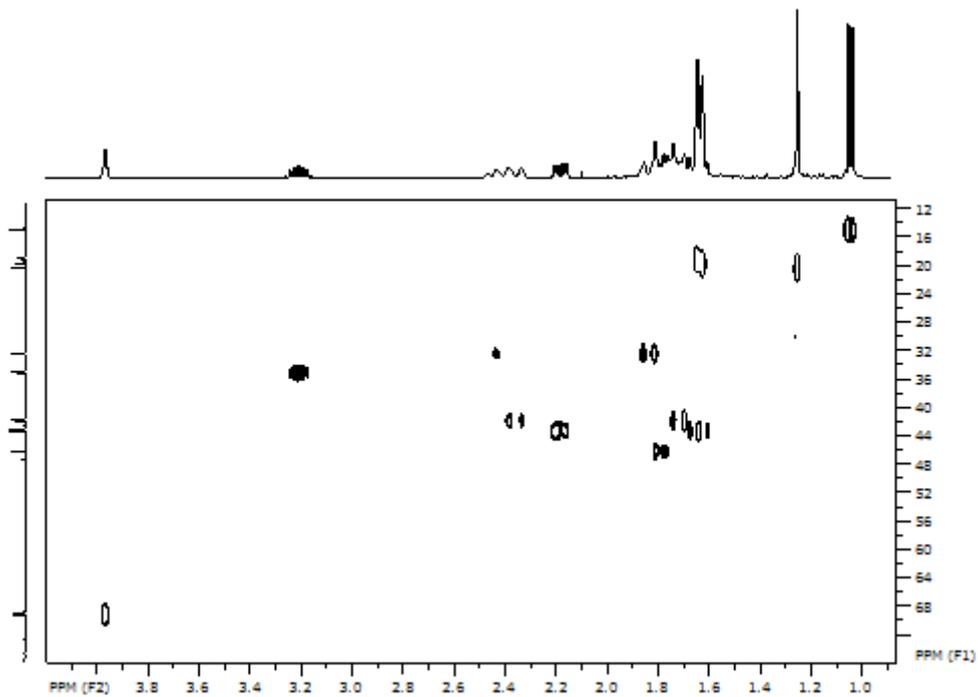
10. - Espectros da substância Q4A_CR_15Espectro de ^1H da substância Q4A_CR_15 (400 MHz, CDCl_3)Espectro de ^{13}C da substância Q4A_CR_15 (100 MHz, CDCl_3)

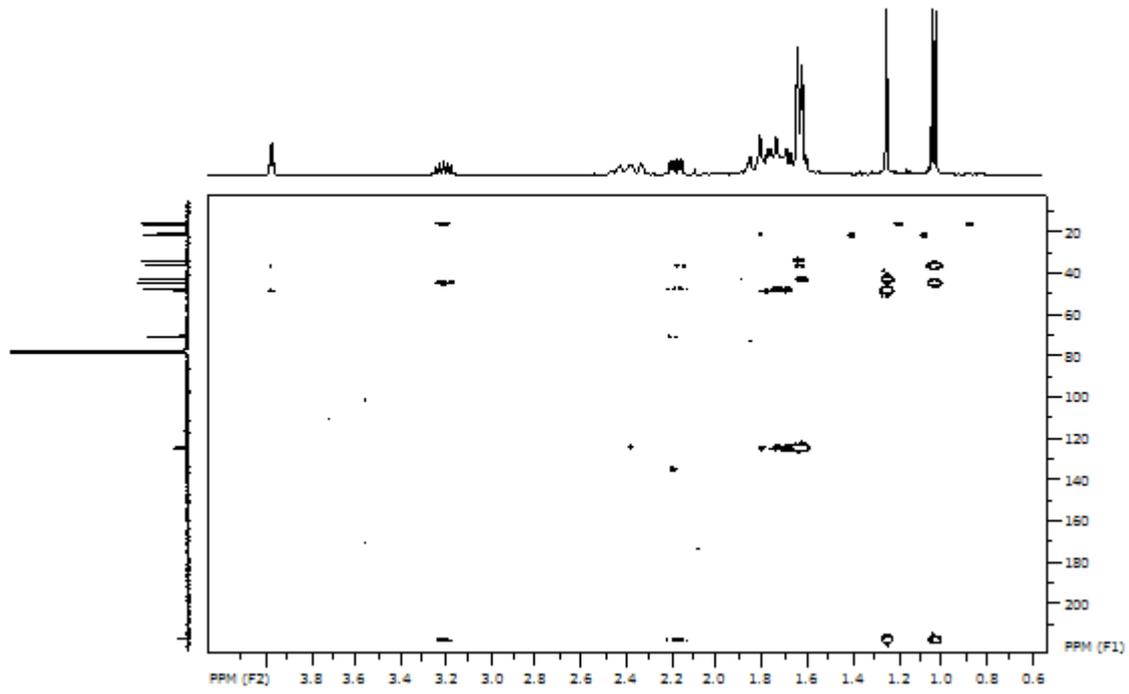
Espectro de COSY da substância Q4A_CR_15 (CDCl₃)Espectro de HSQC da substância Q4A_CR_15 (CDCl₃)



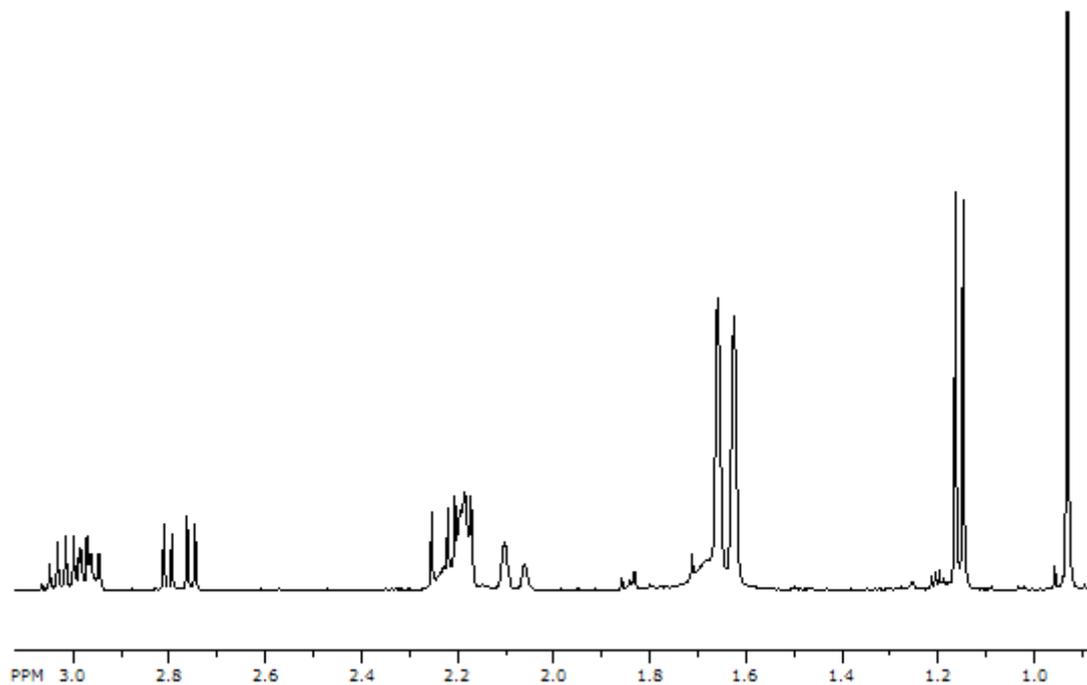
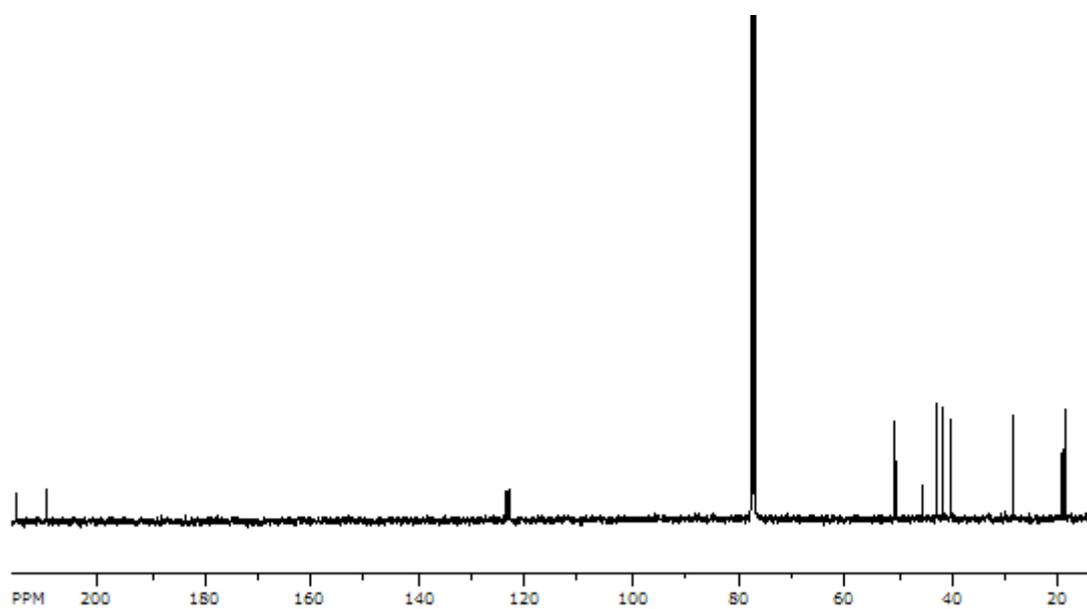
Espectro de HMBC da substância Q4A_CR_15 (CDCl₃)

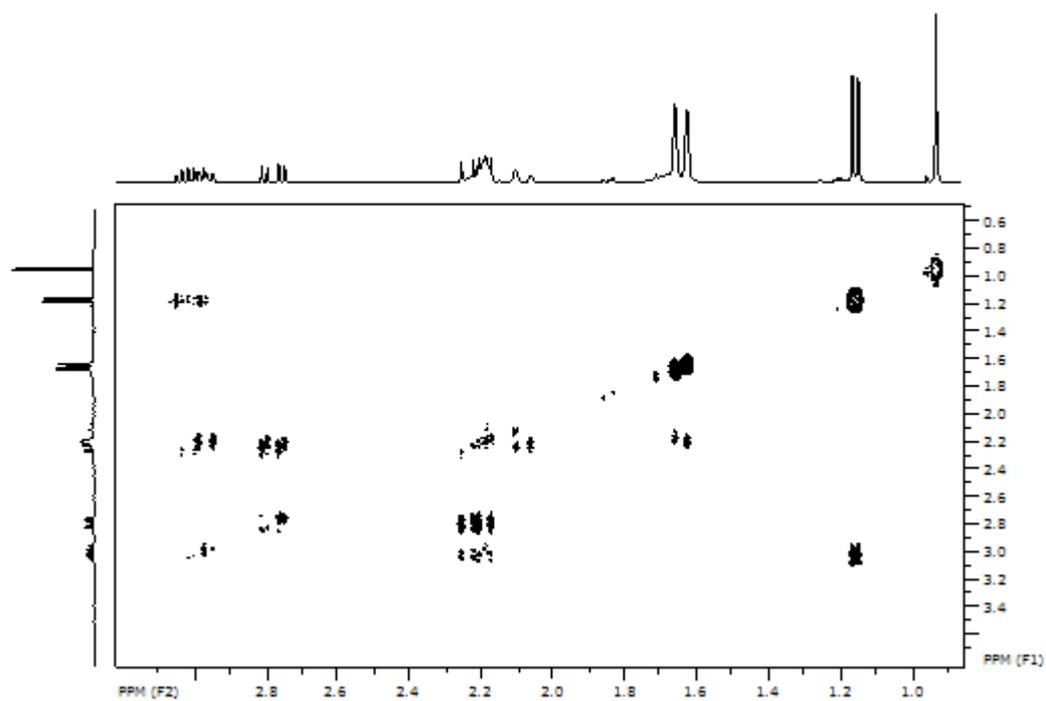
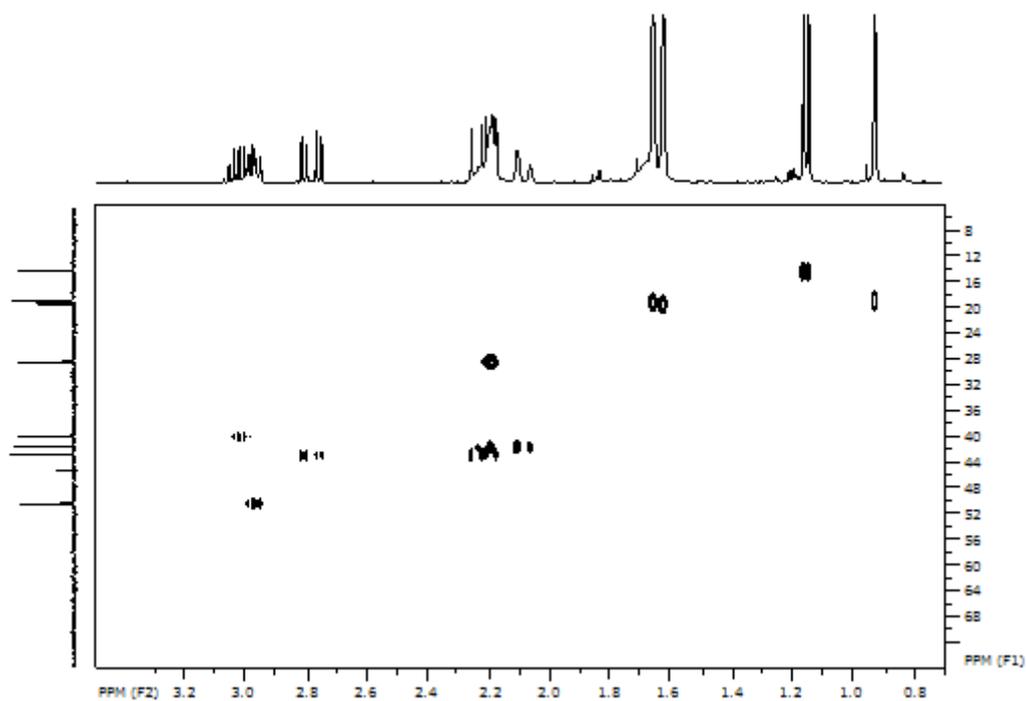
11. - Espectros da substância Q4A_CR_20Espectro de ¹H da substância Q4A_CR_20 (400 MHz, CDCl₃)Espectro de ¹³C da substância Q4A_CR_15 (100 MHz, CDCl₃)

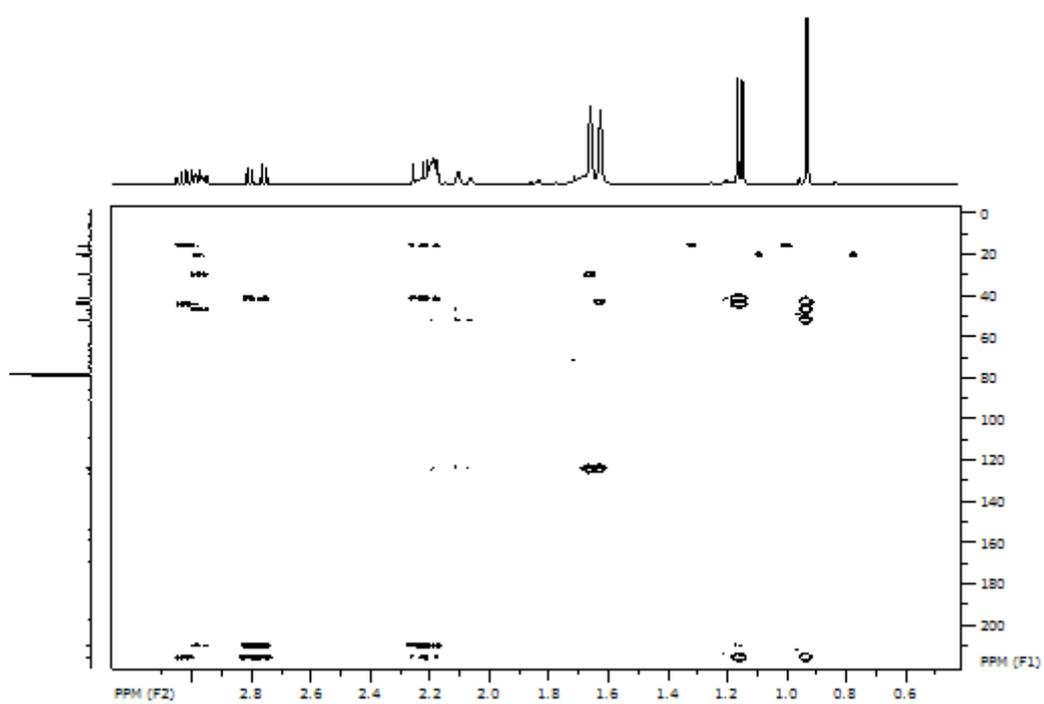
Espectro de COSY da substância Q4A_CR_15 (CDCl₃)Espectro de HSQC da substância Q4A_CR_15 (CDCl₃)



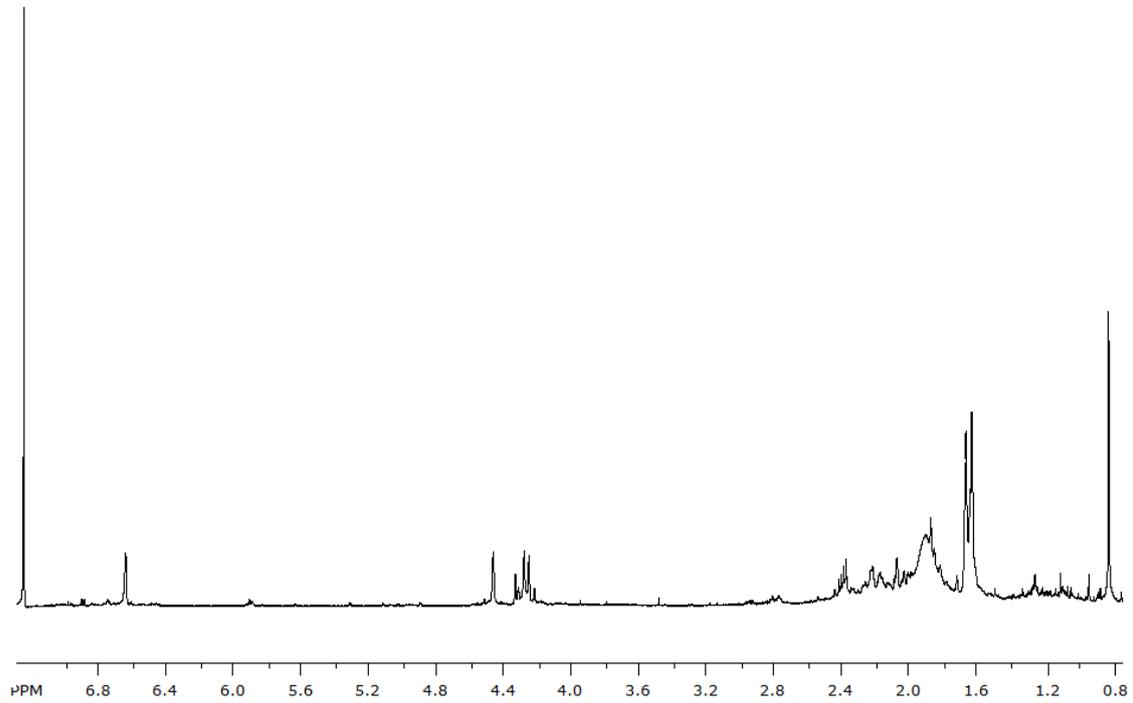
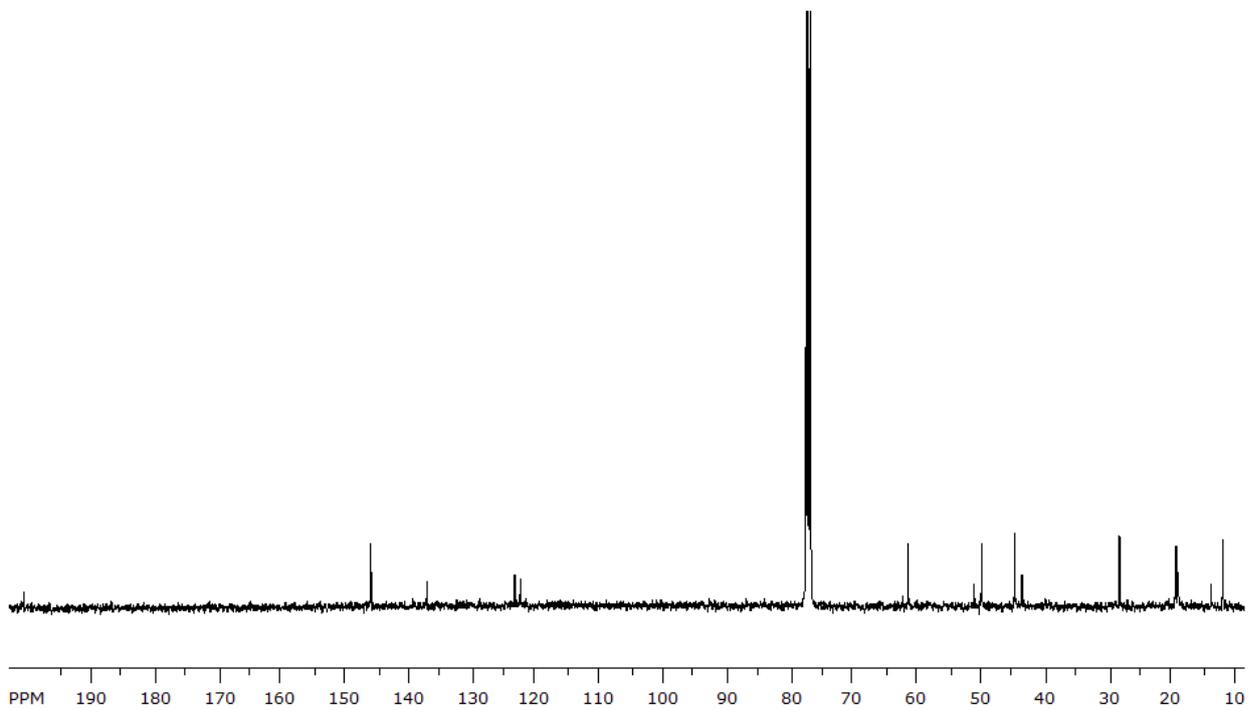
Espectro de HMBC da substância Q4A_CR_15 (CDCl₃)

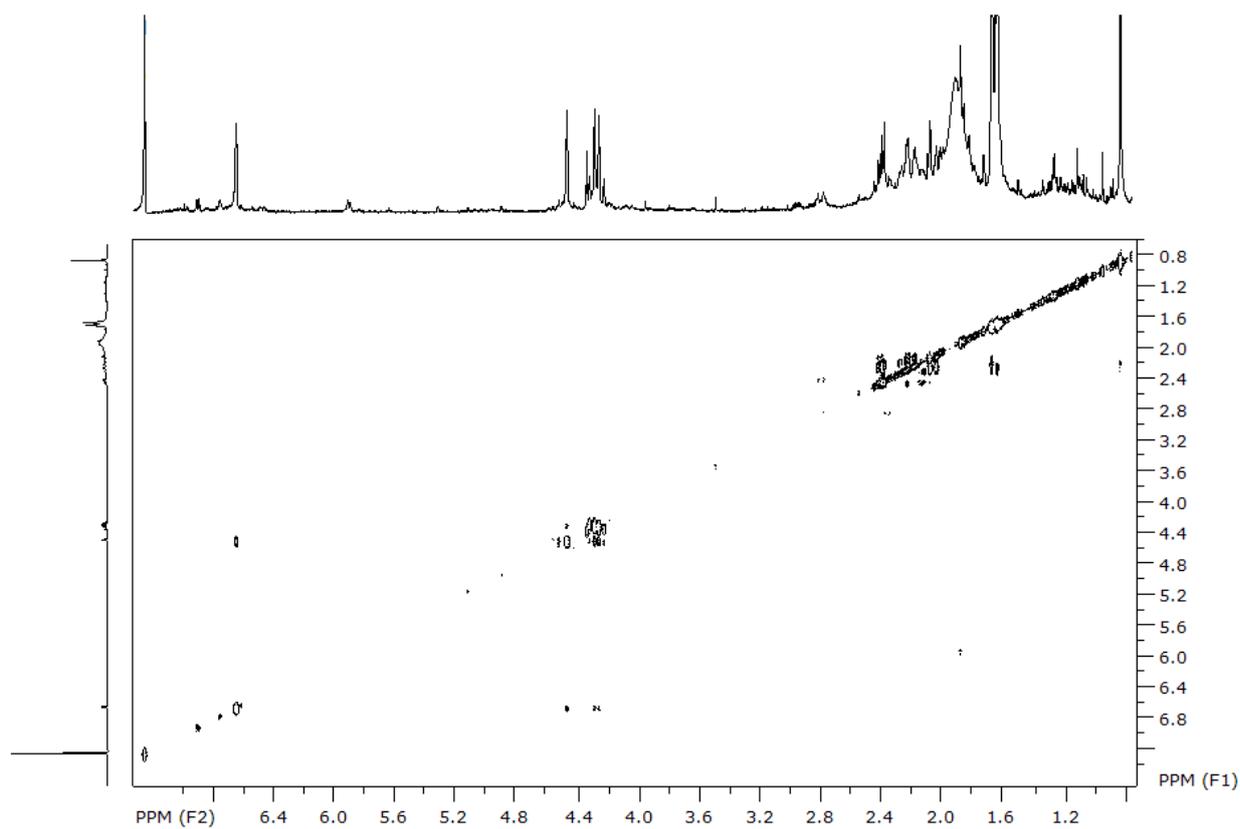
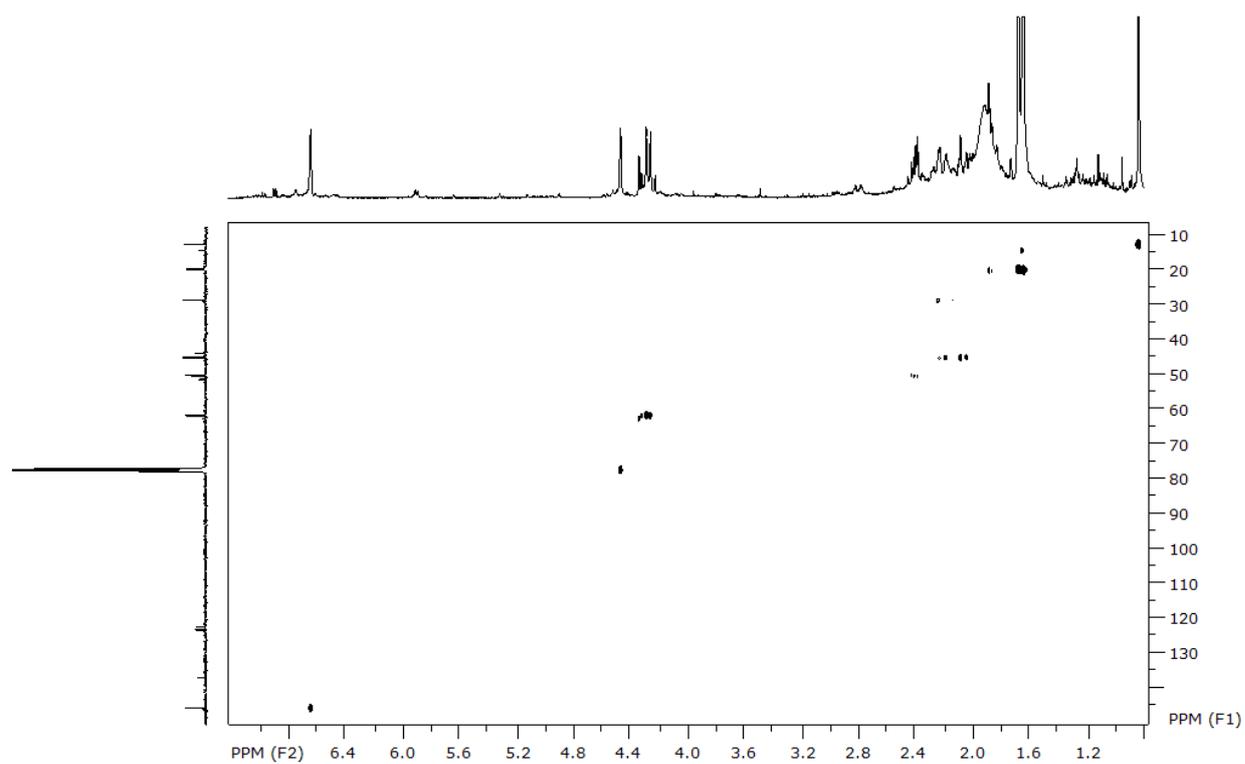
12. - Espectros da substância Q4A_CR_23Espectro de ^1H da substância Q4A_CR_23 (400 MHz, CDCl_3)Espectro de ^{13}C da substância Q4A_CR_23 (100 MHz, CDCl_3)

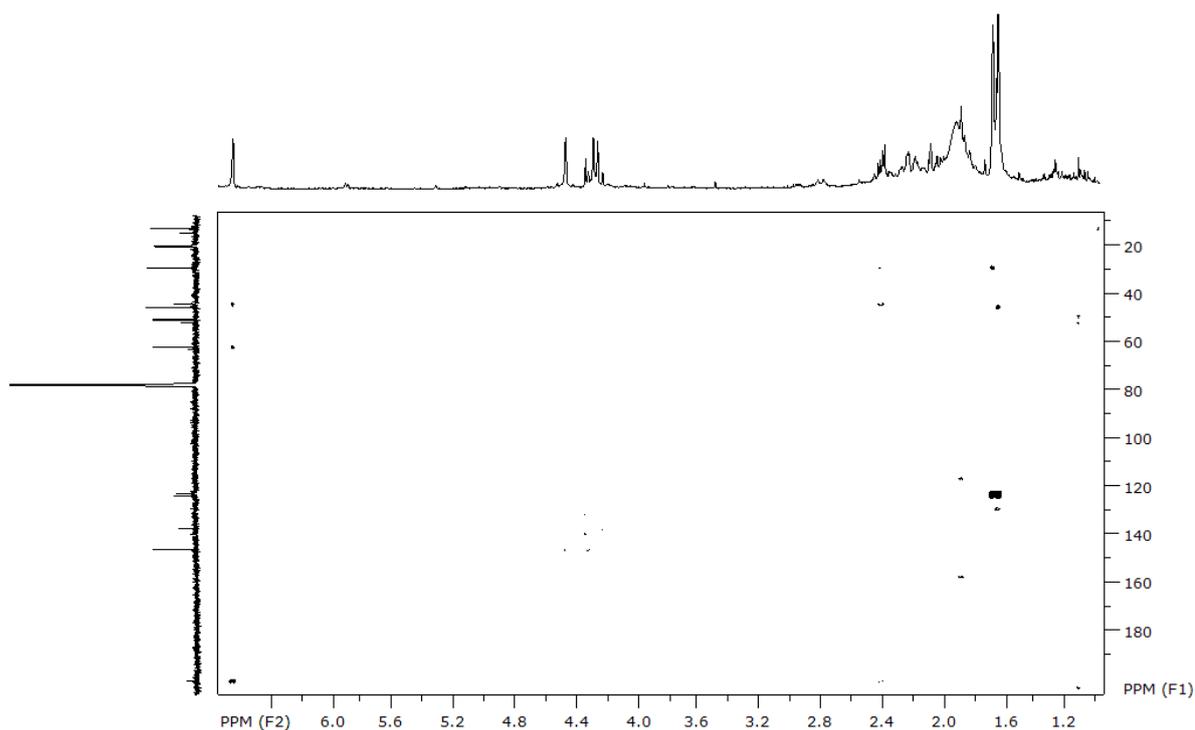
Espectro de COSY da substância Q4A_CR_23 (CDCl₃)Espectro de HSQC da substância Q4A_CR_23 (CDCl₃)



Espectro de HMBC da substância Q4A_CR_23 (CDCl₃)

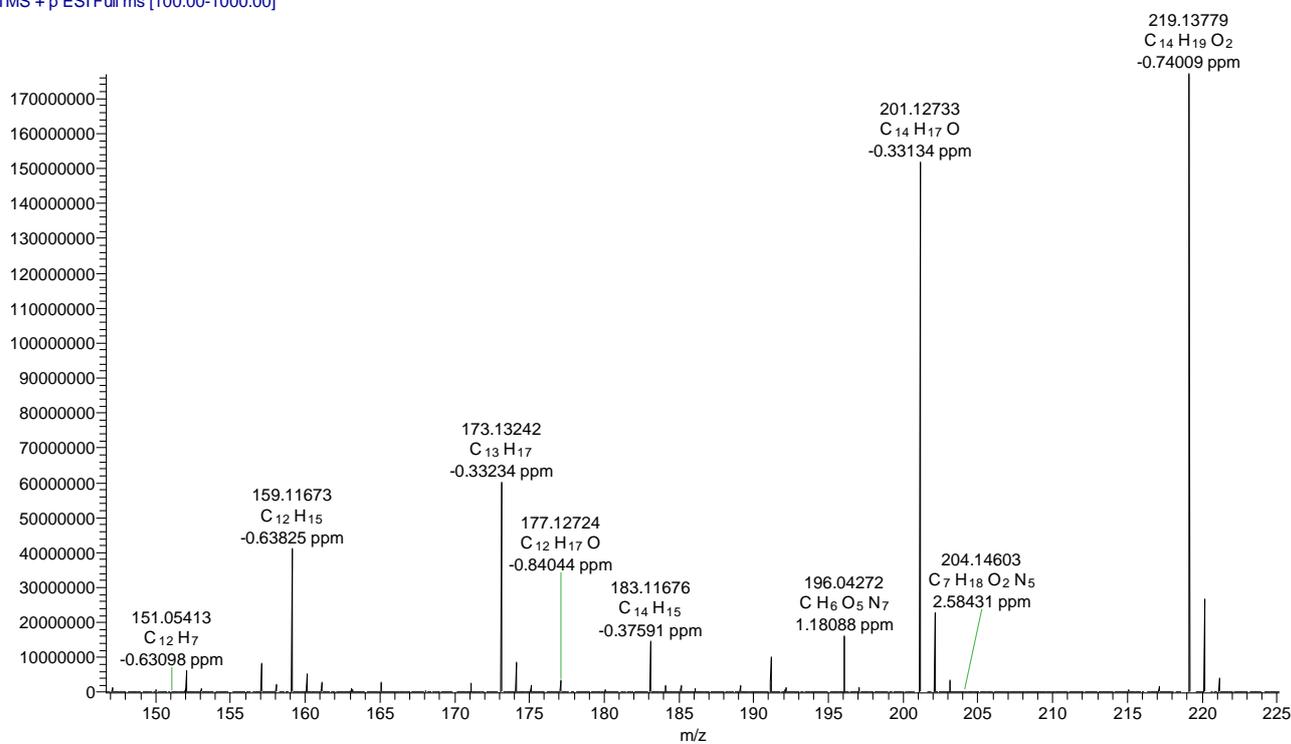
13. - Espectros da substância Q5A_CR_15Espectro de ^1H da substância Q5A_CR_15 (400 MHz, CDCl_3)Espectro de ^{13}C da substância Q5A_CR_15 (100 MHz, CDCl_3)

Espectro de COSY da substância Q5A_CR_15 (CDCl₃)Espectro de HSQC da substância Q5A_CR_15 (CDCl₃)

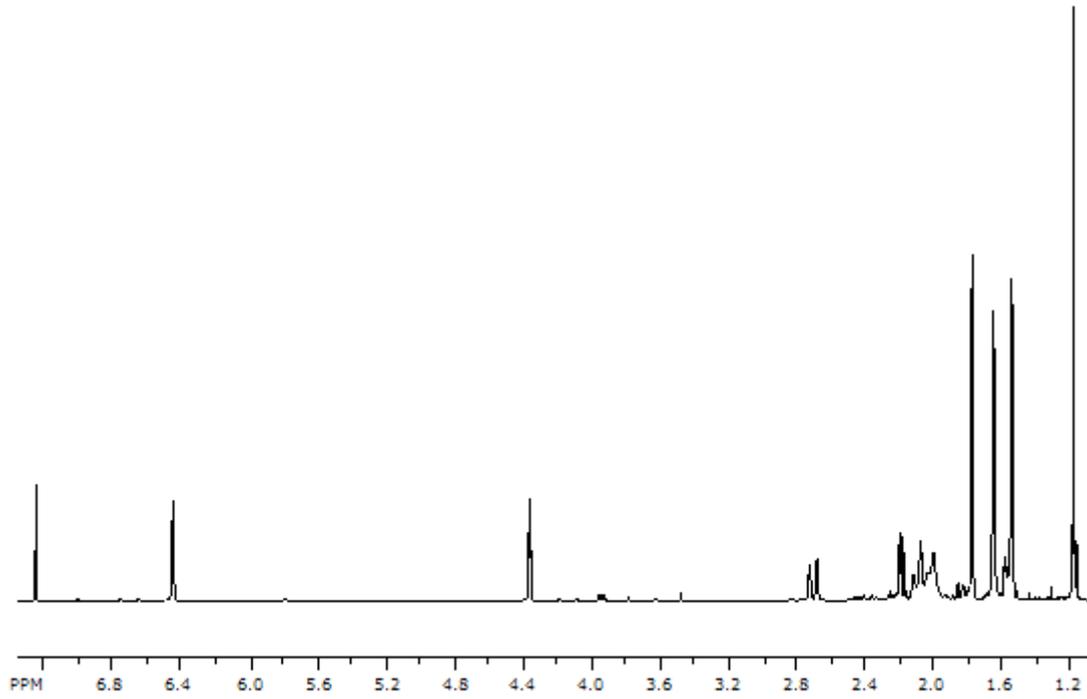
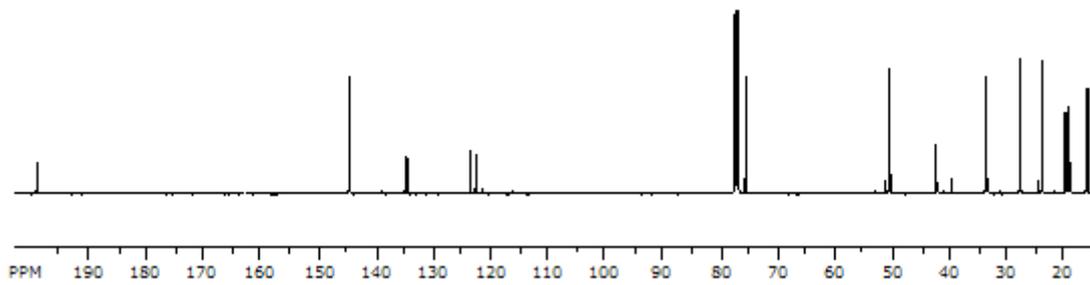


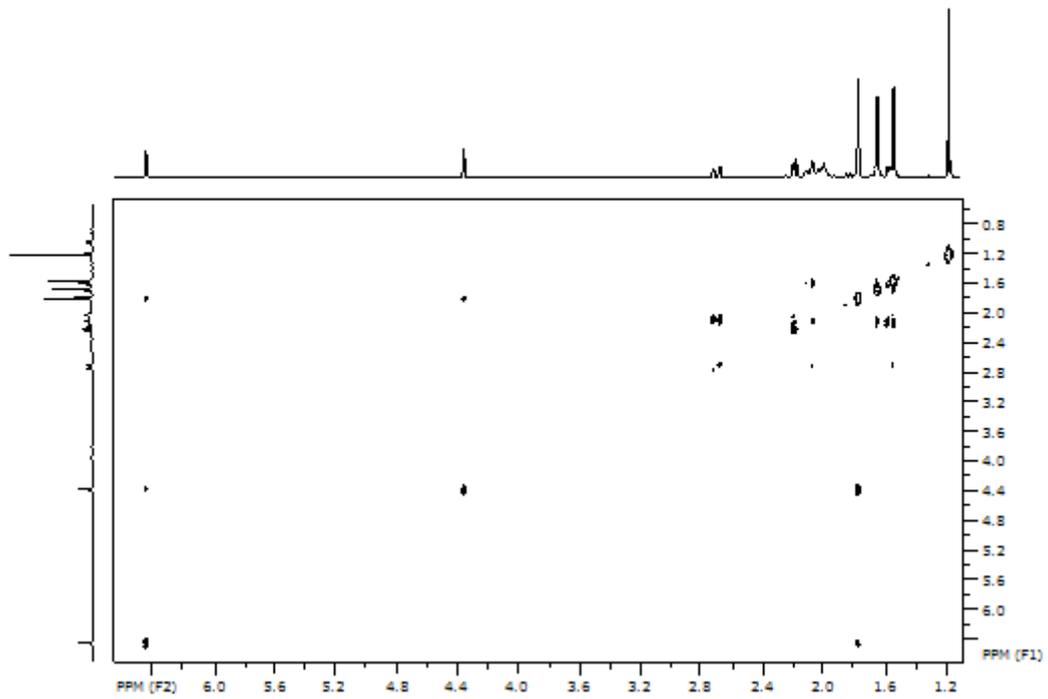
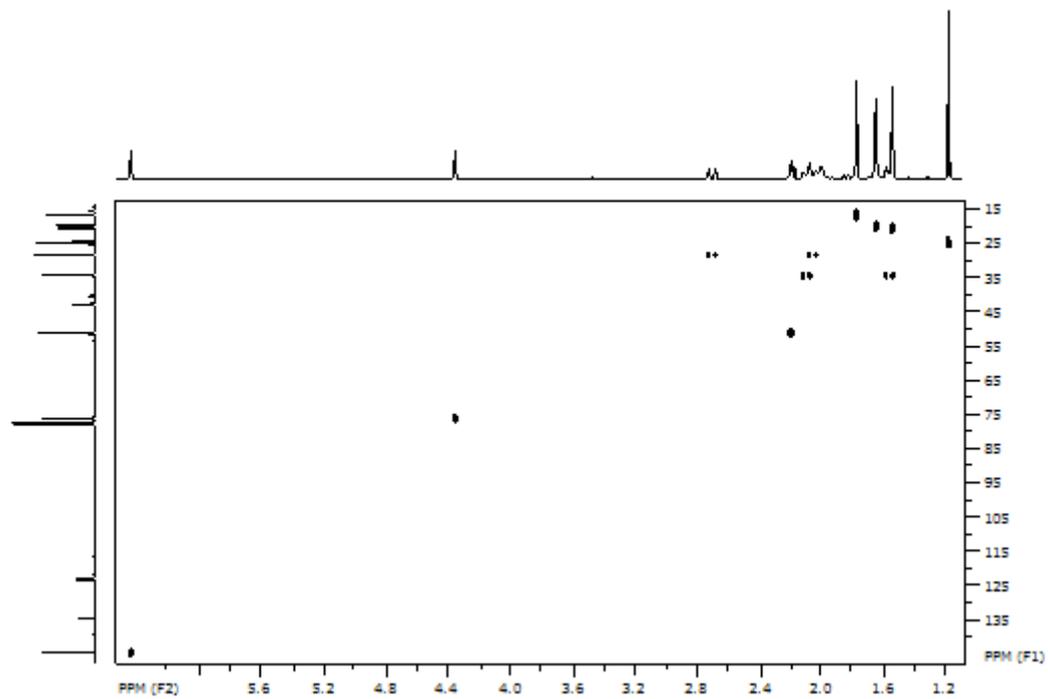
Espectro de HMBC da substância Q5A_CR_15 (CDCl₃)

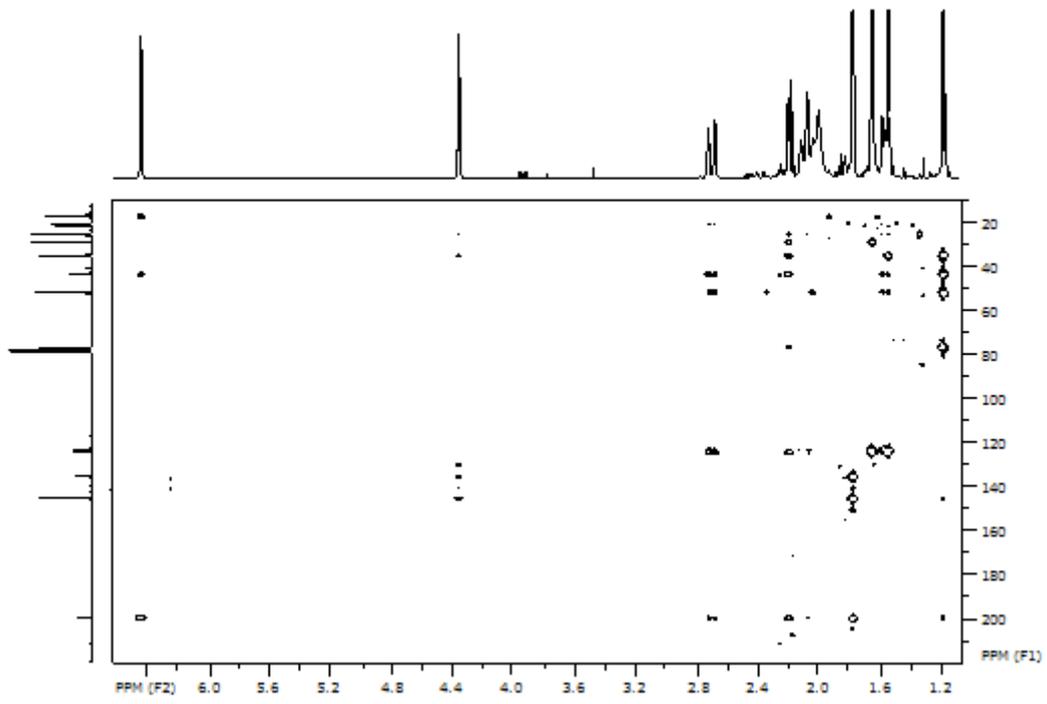
Q5A_CR_15 #107-111 RT: 4.44-4.61 AV: 5 NL: 1.77!
T: FTMS + p ESI Full ms [100.00-1000.00]



Espectro de massas de alta resolução da substância Q5A_CR_15

14. - Espectros da substância Q5A_CR_18Espectro de ^1H da substância Q5A_CR_18 (400 MHz, CDCl_3)Espectro de ^{13}C da substância Q5A_CR_18 (100 MHz, CDCl_3)

Espectro de COSY da substância Q5A_CR_18 (CDCl₃)Espectro de HSQC da substância Q5A_CR_18 (CDCl₃)



Espectro de HMBC da substância Q5A_CR_18 (CDCl_3)