

**Universidade Federal de Minas Gerais  
Instituto de Ciências Exatas  
Departamento de Química**

**Adriana de Almeida Pinto Bracarense**

**Produção otimizada de substâncias antimicrobianas, a partir de biossíntese dirigida, por *Aspergillus parasiticus* esíntese de derivados clovânicos ativos contra o fitopatógeno *Botrytis cinerea***

**Belo Horizonte  
2013**

UFMG/ICEX/DQ. 995<sup>a</sup>  
T. 453<sup>a</sup>

**Adriana de Almeida Pinto Bracarense**

**Produção otimizada de substâncias antimicrobianas, a partir de biossíntese dirigida, por *Aspergillus parasiticus* esíntese de derivados clovânicos ativos contra o fitopatógeno *Botrytis cinerea***

Tese apresentada ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências - Química

Belo Horizonte  
2013

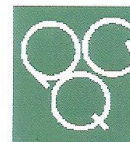
B796p Bracarense, Adriana de Almeida Pinto  
2013 Produção otimizada de substâncias antimicrobianas,  
T a partir de biossíntese dirigida, por *Aspergillus*  
*parasiticus* e síntese de derivados clovânicos ativos  
contra o fitopatógeno *Botrytis cinerea* [manuscrito] /  
Adriana de Almeida Pinto Bracarense. 2013.  
xviii, 235 f.; il.

Orientadora: Jacqueline Aparecida Takahashi.  
Coorientador: Geraldo Magela de Lima.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas  
Gerais. Departamento de Química.  
Inclui bibliografia.

1. Química orgânica - Teses 2. *Botrytis cinerea* -  
Teses 3. *Aspergillus* - Teses 4. Síntese orgânica -  
Teses 5. Atividade antifúngica - Teses I. Takahashi,  
Jacqueline Aparecida, Orientadora II. Lima, Geraldo  
Magela de, Coorientador III. Título.

CDU 043



"Produção Otimizada de Substâncias Antimicrobianas, a Partir de Biossíntese  
Dirigida, por *Aspergillus parasiticus* e Síntese de Derivados Clovânicos Ativos  
Contra o Fitopatógeno *Botrytis cinerea*"

Adriana de Almeida Pinto Bracarense

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Profa. Jacqueline Aparecida Takahashi - Orientadora  
UFMG

Profa. Patrícia Machado de Oliveira  
UFVJM

Prof. Antônio Jacinto Demuner  
UFV

Profa. Lucienir Pains Duarte  
UFMG

Profa. Dorila Piló Veloso  
UFMG

Belo Horizonte, 03 de dezembro de 2013.



Este trabalho foi elaborado  
sob orientação da Professora Dra. Jacqueline  
Aparecida Takahashi e Co-orientação do Professor Dr.  
Geraldo Magela de Lima do Departamento de Química  
do Instituto de Ciências Exatas  
da Universidade Federal de Minas Gerais.

“Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível, e de repente você estará fazendo o impossível.”

São Francisco de Assis

“Na natureza nada se cria, nada se perde, tudo se transforma.”

Antoine Laurent de Lavoisier

Dedico...  
À minha família

## AGRADECIMENTOS

A Deus por tornar possível o desenvolvimento deste trabalho, já que sempre esteve ao meu lado cuidando da minha vida, permitindo que eu tenha saúde e determinação para alcançar meus objetivos.

À minha família pelo apoio e amor incondicional, e por terem participado efetivamente deste trabalho: Meu filho Lucas, pelo simples fato de existir, tornando minhas dificuldades diárias mais fáceis de serem enfrentadas; meu marido e amigo Felipe, por acreditar em mim e apoiar as minhas escolhas; meus pais, José Antônio e Iracy, por me receberem de braços abertos quando eu mais precisei de ajuda e, acima de tudo, por me oferecerem carinho e amor, renovando as minhas energias para conclusão deste trabalho; minhas irmãs queridas, Andreza e Andréia, que sempre estiveram ao meu lado, aconselhando, apoiando e torcendo pelo meu sucesso; meus sobrinhos, Júlia e Guilherme, por encherem minha vida de alegria. Agradeço a vocês por tudo que fizeram por mim, amo vocês!!!

À professora Doutora Jacqueline Aparecida Takahashi, que por muitas vezes, eu tive a certeza de ser um anjo que Deus colocou na minha vida. Obrigada Jac pela amizade, ensinamentos, orientação e por acreditar na minha capacidade.

Ao professor Doutor Geraldo Magela Lima que sempre se mostrou receptivo durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores Doutores Isidro Gonzalez Collado e Antônio José Macias Sánchez, pelos ensinamentos, orientação e por me acolherem tão bem em seu grupo de pesquisa durante meu estágio de Doutorado Sanduíche realizado na Universidade de Cádiz.

Aos professores do departamento que acompanharam a minha jornada acadêmica.

Aos meus amigos da pós-graduação, que muitas vezes se transformaram em verdadeiros conselheiros durante esta jornada, em especial ao Bruno Potter, Dhionne, Isabela, Ligiane, Raquel, Renata, Sheila Rodrigues e Thiago Borgati.

Aos colegas de laboratório, 210/218, que proporcionaram momentos agradáveis durante todo o período de doutorado.

Aos colegas que conheci durante o desenvolvimento do meu trabalho na Espanha, Alejandro, Antonio Ruano, Beth, Fracys, Guillermo, Maria Eugenia, Javier Barua, Javier Moraga e principalmente a Michelli Massaroli, pela agradável convivência dentro e fora do laboratório, sempre muito prestativos.

Às secretarias da pós-graduação deste departamento: Paulete, Lilian, Kátia e Marluce.

Aos órgãos financiadores: CNPq, CAPES e FAPEMIG que arcaram financeiramente com o desenvolvimento desta pesquisa.

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS .....	v
LISTA DE FIGURAS .....	vi
LISTA DE GRÁFICOS .....	xii
LISTA DE EQUAÇÕES .....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS .....	xiii
RESUMO.....	xv
ABSTRACT .....	xvii
INTRODUÇÃO GERAL .....	1
PARTE I .....	8
1 REFERENCIAL TEÓRICO .....	8
1.1 Fungos .....	8
1.2 O filo ascomycota .....	8
1.3 Gênero <i>Aspergillus</i> .....	9
1.3.1 Taxonomia .....	10
1.3.2 Histórico .....	10
1.3.3 Características gerais da espécie <i>A. parasiticus</i> .....	12
1.3.4 Ácido kójico ( <b>51</b> ) .....	14
1.4 OSMAC: “ <i>one strain many compounds</i> ” (“um micro-organismo e muitos compostos ativos”) .....	15
1.5 Estatística aplicada a bioensaios .....	17
2 OBJETIVOS .....	19
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	20
3.1 Avaliação dos efeitos provocados pelas alterações nas condições de cultivo do fungo <i>A. parasiticus</i> .....	20
3.2 Otimização da produção de ácido kójico ( <b>51</b> ) por <i>A. parasiticus</i> .....	29
3.3 Otimização das condições de fermentação para diversificação metabólica pelo fungo <i>A. parasiticus</i> .....	33
3.4 Estudo das condições de fermentação para produção de metabólitos bioativos a partir do fungo <i>A. parasiticus</i> .....	39
4 METODOLOGIA .....	46
4.1 Manutenção e cultivo fúngico .....	46
4.2 Preparo do material utilizado nos testes biológicos .....	47

4.3 Testes antibacterianos e antifúngicos .....	48
4.4 Solventes, ácidos orgânicos e reagentes utilizados .....	49
4.5 Análises físico-químicas .....	49
4.5.1 Temperatura de fusão .....	49
4.5.2 Determinação do pH .....	49
4.5.3 Ressonância magnética nuclear (RMN) .....	49
4.5.4 Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) .....	49
4.6 Cultivo fúngico .....	50
4.7 Preparo dos extratos .....	50
4.8 Análise estatística .....	51
5 CONCLUSÕES .....	53
PARTE II .....	54
1 REFERENCIAL TEÓRICO .....	54
1.1 Fungos do gênero <i>Botrytis</i> .....	54
1.2 Características gerais das toxinas excretadas por <i>B. cinerea</i> .....	56
2 OBJETIVOS .....	62
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	63
3.1 Síntese dos 2-ariloxiclovanos <b>82</b> , <b>87-89</b> .....	63
3.2 Síntese de derivados clovânicos com funções nitrogenadas em C-2 .....	65
3.2.1 Clovanofenilaminas .....	67
3.2.2 Clovanofenilamidinas .....	69
3.2.3 Fenilaminocariolanos .....	69
3.2.4 Produtos secundários .....	70
3.3 Bioensaios .....	72
4 CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS SINTETIZADOS .....	76
4.1 Identificação dos 2-ariloxiclovanos <b>82</b> , <b>87-89</b> sintetizados a partir do óxido de cariofileno ( <b>72</b> ) e dos produtos secundários <b>73</b> , <b>110</b> e <b>111</b> .....	76
4.1.1 $2\beta$ -[2-(2'- <i>p</i> -nitrofenoxi)etoxi]clovan-9 $\alpha$ -ol ( <b>82</b> ).....	76
4.1.2 $2\beta$ -[2-( <i>p</i> -nitrofenil)etoxi]clovan-9 $\alpha$ -ol ( <b>87</b> ) .....	77
4.1.3 $2\beta$ -[2-(2'-fenoxi)etoxi]clovan-9 $\alpha$ -ol ( <b>88</b> ) .....	81
4.1.4 $2\beta$ -(2-feniletoksi)clovan-9 $\alpha$ -ol ( <b>89</b> ) .....	84
4.1.5 5 $\alpha$ -hidroxicariofil-3,8(13)-dieno ( <b>110</b> ) .....	87
4.1.6 clov-2-en-9 $\alpha$ -ol ( <b>111</b> ) .....	88

4.1.7	clovan-2 $\beta$ -9 $\alpha$ -diol ( <b>73</b> ) .....	88
4.2	Identificação dos derivados clovânicos <b>96-105, 113</b> e cariolânicos <b>106-108</b> .....	89
4.2.1	2 $\beta$ -fenilaminoclovan-9 $\alpha$ -ol ( <b>96</b> ) .....	93
4.2.2	2 $\beta$ -( <i>p</i> -metoxifenilamino)clovan-9 $\alpha$ -ol ( <b>97</b> ) .....	94
4.2.3	2 $\beta$ -( <i>p</i> -nitrofenilamino)clovan-9 $\alpha$ -ol ( <b>98</b> ) .....	95
4.2.4	2 $\beta$ -( <i>N</i> -metilnilina)clovan-9 $\alpha$ -ol ( <b>99</b> ), 2 $\beta$ -[ <i>o</i> -( <i>N</i> -metilamino)fenil]clovan-9 $\alpha$ -ol ( <b>100</b> ) e 2 $\beta$ -[ <i>p</i> -( <i>N</i> -metilamino)fenil]clovan-9 $\alpha$ -ol ( <b>101</b> ) .....	98
4.2.5	2 $\beta$ -( <i>N</i> -pirimidin)clovan-9 $\alpha$ -ol ( <b>102</b> ) .....	104
4.2.6	<i>N</i> -(fenil)- <i>N'</i> -(9 $\alpha$ -hidroxiclovan-2 $\beta$ -il)-benzamidina ( <b>103</b> ) .....	107
4.2.7	<i>N</i> -( <i>p</i> -nitrofenil)- <i>N'</i> -(9 $\alpha$ -hidroxiclovan-2 $\beta$ -il)-benzamidina ( <b>104</b> ) .....	111
4.2.8	<i>N</i> -( <i>p</i> -bromofenil)- <i>N'</i> -(9 $\alpha$ -hidroxiclovan-2 $\beta$ -il)-benzamidina ( <b>105</b> ) .....	114
4.2.9	2 $\beta$ -( <i>N</i> -benzamido)clovan-9 $\alpha$ -ol ( <b>113</b> ) .....	117
4.2.10	1 $\beta$ -( <i>p</i> -metoxifenilamino)cariolan-9 $\alpha$ -ol ( <b>106</b> ) .....	120
4.2.11	1 $\beta$ -( <i>p</i> -bromofenilamino)cariolan-9 $\alpha$ -ol ( <b>107</b> ) .....	124
4.2.12	2 $\beta$ -( <i>N</i> -pirimidin)cariolan-9 $\alpha$ -ol ( <b>108</b> ) .....	127
5	METODOLOGIA .....	131
5.1	Meios de cultura, soluções e suspensão de esporos utilizados para os ensaios biológicos.	131
5.2	Teste antifúngico .....	132
5.3	Solventes, ácidos orgânicos e reagentes utilizados .....	132
5.4	Métodos físico-químicos de análise .....	132
5.4.1	Temperatura de fusão .....	132
5.4.2	Atividade ótica ( $[\alpha]_D$ ) .....	132
5.4.3	Ressonância magnética nuclear .....	132
5.4.4	Espectroscopia no infravermelho .....	133
5.4.5	Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) .....	133
5.4.6	Espectrometria de massas (EM) .....	133
5.4.7	Cromatografia em camada delgada .....	133
5.4.8	Cromatografia em coluna .....	133
5.5	Síntese dos 2-ariloxiclovanos <b>82, 87-89</b> a partir do óxido de cariofileno ( <b>72</b> ) .....	134
5.5.1	Síntese do 2 $\beta$ -[2-(2'- <i>p</i> -nitrofenoxi)etoxi]clovan-9 $\alpha$ -ol ( <b>82</b> ).....	134
5.5.2	Síntese do 2 $\beta$ -[2-( <i>p</i> -nitrofenil)etoxi]clovan-9 $\alpha$ -ol ( <b>87</b> ) .....	135
5.5.3	Síntese do 2 $\beta$ -[2-(2'-fenoxi)etoxi]clovan-9 $\alpha$ -ol ( <b>88</b> ) .....	135
5.5.4	Síntese do 2 $\beta$ -(2-feniletoxi)clovan-9 $\alpha$ -ol ( <b>89</b> ) .....	136
5.6	Síntese dos derivados clovânicos <b>96-105, 113</b> e cariolânicos <b>106-108</b> .....	136

5.6.1	Síntese dos compostos 2β-fenilaminoclovan-9α-ol ( <b>96</b> ) e N-(fenil)-N'-(9α-hidroxiclovan-2β-il)-benzamidina ( <b>103</b> ) .....	136
5.6.2	Síntese dos compostos 2β-(p-metoxifenilamino)clovan-9α-ol ( <b>97</b> ) e 1β-(p-metoxifenilamino)cariolan-9α-ol ( <b>106</b> ) .....	137
5.6.3	Síntese dos compostos 2β-(p-nitrofenilamino)clovan-9α-ol ( <b>98</b> ) e 1β-[p-N-(p-nitrofenil)-N'-(9α-hidroxiclovan-2β-il)]-benzamidina ( <b>104</b> ) .....	138
5.6.4	Síntese dos compostos N-(p-bromofenil)-N'-(9α-hidroxiclovan-2β-il)-benzamidina ( <b>105</b> ) e 1β-(p-bromofenilamino)cariolan-9α-ol ( <b>107</b> ) .....	138
5.6.5	Síntese dos compostos 2β-(N-metil-N-fenil)clovan-9α-ol ( <b>99</b> ) .....	139
5.6.6	Síntese dos compostos 2β-(N-pirimidin)clovan-9α-ol ( <b>102</b> ) e 2β-(N-pirimidin)cariolan-9α-ol ( <b>108</b> ) .....	139
6	CONCLUSÕES .....	141
	CONCLUSÃO GERAL .....	143
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	144
	APÊNDICES .....	155

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Modelo de tabela para análise de variância .....	18
Tabela 2-	Dados encontrados e descritos de RMN de <sup>1</sup> H e de <sup>13</sup> C ambos em CD <sub>3</sub> OD, para o ácido kójico ( <b>51</b> ) .....	20
Tabela 3-	Número médio de metabólitos observados através do relatório de picos gerado pelo programa CLASS LC10 PROGRAM durante as análises por CLAE-DAD dos extratos brutos do fungo <i>A. parasiticus</i> cultivados nos meios LC (LCG20, LCG150, LCS20 e LCS150), CYA e YES .....	24
Tabela 4-	Tempos de cultivo, interações entre as variáveis que apresentaram influência significativa ( $p \leq 0,05$ ), melhor condição encontrada para o cultivo e porcentagem de ácido kójico ( <b>51</b> ) determinada no extrato .....	30
Tabela 5-	Tempos de cultivo, interações entre as variáveis que apresentaram influência significativa ( $p \leq 0,05$ ) e melhor condição encontrada para a diversificação metabólica .....	37
Tabela 6-	Tempos de cultivo, interações entre as variáveis que apresentaram influência na atividade biológica, micro-organismos para os quais esta influência foi significativa ( $p \leq 0,05$ ) e melhor condição encontrada para o cultivo .....	40
Tabela 7-	Porcentagens de inibição contra <i>A. flavus</i> , <i>C. albicans</i> , <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i> para os extratos, com suas respectivas porcentagens de ácido kójico ( <b>51</b> ) .....	42
Tabela 8-	Níveis das variáveis estudadas no planejamento fatorial 2 <sup>2</sup> aplicado à produção de ácido kójico ( <b>51</b> ) .....	51
Tabela 9-	Níveis das variáveis estudadas no planejamento fatorial 2 <sup>3</sup> aplicado à produção de ácido kójico ( <b>51</b> ) .....	52
Tabela 10-	Espécies do gênero <i>Botrytis</i> associadas a plantas oleráceas, frutíferas e ornamentais	55
Tabela 11-	Dados encontrados e descritos de RMN <sup>1</sup> H, em CDCl <sub>3</sub> (400 MHz) para os compostos <b>82</b> , <b>96</b> e <b>97</b>	90



.....		
Tabela 12-	Dados de RMN de <sup>13</sup> C encontrados para os derivados clovânicos, em CDCl <sub>3</sub> (100 MHz) e descritos para os compostos <b>82</b> , <b>96</b> e <b>97</b>	91
.....		
Tabela 13-	Dados encontrados e descritos de RMN <sup>1</sup> H, em CDCl <sub>3</sub> (400 MHz) para os compostos <b>73</b> , <b>110</b> e <b>111</b>	92
.....		
Tabela 14-	Dados encontrados e descritos de RMN de <sup>13</sup> C, em CDCl <sub>3</sub> (100 MHz) para os compostos <b>73</b> e <b>111</b>	92
.....		

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Fórmula estrutural da penicilina G ( <b>1</b> ) .....	1
Figura 2-	Fórmulas estruturais e atividades biológicas dos alcaloides isolados da papoula do ópio .....	2
Figura 3-	Embalagem comercial do medicamento Acheflan, fórmula estrutural do alfa-humuleno ( <b>7</b> ) e imagem da erva baleeira ( <i>Cordia verbenacea</i> ) .....	2
Figura 4-	Fórmula estrutural dos metabólitos secundários isolados a partir de espécies do fungo <i>P. sclerotiorum</i> (isocromofilona <b>8</b> ), <i>P. brasilianum</i> (meroterpenos <b>9</b> e <b>10</b> ) e <i>Cytospora</i> (citosporinas <b>11</b> a <b>14</b> ) .....	4
Figura 5-	Fórmula estrutural dos derivados heterocíclicos 1,3,4-oxadiazolínicos ( <b>15-34</b> ) .....	6
Figura 6-	Fórmula estrutural da toxina botridial ( <b>37</b> ), produzida pelo fungo <i>B. cinerea</i> .....	7
Figura 7-	Fórmula estrutural da Cefalosporina ( <b>38</b> ), princípio ativo deste medicamento.....	9
Figura 8-	Aspecto microscópico das estruturas de frutificação do <i>Aspergillus</i> sp. (Fonte: SAMSON <i>et al.</i> , 2007) .....	10
Figura 9-	Metabólitos secundários isolados a partir de fungos do gênero <i>Aspergillus</i> e respectivas atividades biológicas.....	12
Figura 10-	Aspecto das colônias de <i>A. parasiticus</i> cultivadas nos meios (a) MEA a 25 °C e (b) CYA a 37 °C .....	13
Figura 11-	Metabólitos secundários com atividade anticancerígena produzidos pelo fungo <i>A. parasiticus</i> .....	13
Figura 12-	Fórmula estrutural do ácido kójico ( <b>51</b> ), metabólito secundário produzido por <i>A.</i>	13

	<i>parasiticus</i> .....	
Figura 13-	Biossíntese do ácido kójico ( <b>51</b> ) .....	14
Figura 14-	Fórmulas estruturais das citocalasinas isoladas a partir do fungo <i>S. elegans</i> , sendo <b>56</b> a espicocalasina A e <b>57 a 61</b> uma classe de aspocalasinas .....	16
Figura 15-	Esquema da triagem de metabólitos secundários a partir do fungo <i>A. parasiticus</i> .....	19
Figura 16-	Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD em comprimento de onda de 270 nm, referentes ao extrato fúngico proveniente do cultivo nos meios LCG20 ( <b>A</b> ) e LCS150 ( <b>B</b> ). A fermentação foi conduzida sob agitação de 150 rpm por 3 dias .....	25
Figura 17-	Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD em comprimento de onda de 270 nm, referentes ao extrato fúngico proveniente do cultivo nos meios LCG20 (A) e LCS20 (B). A fermentação foi conduzida na ausência de agitação por 18 dias .....	26
Figura 18-	Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD em comprimento de onda de 270 nm, referente ao extrato fúngico proveniente do meio de cultivo LCS20 sem agitação(A) e com agitação de 150 rpm (B). A fermentação foi conduzida por 18 dias .....	27
Figura 19-	Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD em comprimento de onda de 270 nm, referentes aos extratos fúngicos provenientes do cultivo nos meios LCS20 (A) e YES (B). A fermentação foi conduzida por 27 dias, sem agitação .....	28
Figura 20-	Gráficos de superfície de resposta para a porcentagem de ácido kójico ( <b>51</b> ) produzida em 12 dias de cultivo em função das variáveis agitação, tipo de carboidrato e concentração .....	31
Figura 21-	Cromatograma obtido por CLAE-DAD em um comprimento de onda de 270 nm, referente ao extrato fúngico proveniente do meio de cultivo LCG20, no qual a fermentação foi conduzida por 12 dias sob agitação de 150 rpm .....	33
Figura 22-	Gráficos referentes à produção dos metabólitos M1, M2 e M3 em função do tempo de cultivo, quando se empregou o meio LCG .....	34
Figura 23-	Gráficos referentes à produção dos metabólitos M1, M2 e M3 em função do tempo de cultivo, quando se empregou o meio LCS .....	35
Figura 24-	Gráficos referentes à produção dos metabólitos M1, M2 e M3 em função do tempo de cultivo, quando se empregaram os meios CYA e YES .....	36
Figura 25-	Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD em comprimento de onda de 270 nm, referente aos extratos fúngicos preparado a partir do cultivo no meio YES, sem agitação durante 21 dias (A- PMS08) e 27 dias (B- PMS09) .....	37
Figura 26-	Cromatograma obtido por CLAE-DAD em comprimento de onda de 270 nm,	38

	referente ao extrato fúngico proveniente do cultivo no meio LCG150 por 27 dias, sem agitação (PMS02) .....	
Figura 27-	Fórmula estrutural do dipeptídio Azonazina ( <b>65</b> ), metabólito isolado a partir do fungo <i>A. isulicola</i> .....	38
Figura 28-	Cromatograma obtido por CLAE-DAD em comprimento de onda de 270 nm, referente ao extrato fúngico proveniente do cultivo no meio CYA, no qual a fermentação foi conduzida por 12 dias, sem agitação (PMS05) .....	39
Figura 29-	Superfície de resposta para atividade biológica apresentada pelos extratos frente aos micro-organismos <i>E. coli</i> (GRAF. A) e <i>S. aureus</i> (GRAF. B) em função do meio e da agitação, para o tempo de 6 dias de cultivo .....	41
Figura 30-	Cromatograma obtido por CLAE-DAD em comprimento de onda de 270 nm, referente ao extrato fúngico proveniente do cultivo no meio YES por seis dias, sob agitação (PMB01) .....	43
Figura 31-	Cromatograma obtido por CLAE-DAD em comprimento de onda de 270 nm, referente ao extrato fúngico proveniente do cultivo no meio LCG, sem agitação, durante 24 dias (A- PMB11) e 27 dias (B- PMB12) .....	44
Figura 32-	Combinações de diferentes condições de cultivo para o fungo <i>A. parasiticus</i> , gerando quatro tratamentos (T1 A T4). T <sub>X</sub> = tempo de extração, sendo x variando de três em três até o máximo de 30 dias; M <sub>CYA</sub> = Meio de cultura CYA; M <sub>YES</sub> = Meio de cultura YES; A <sub>150</sub> = Agitação de 150 rpm; A <sub>0</sub> = sem agitação .....	51
Figura 33-	Combinações de diferentes condições de cultivo para o fungo <i>A. parasiticus</i> , gerando oito tratamentos (T1 A T8). T <sub>X</sub> = tempo de extração, sendo x variando de três em três até o máximo de 30 dias; M <sub>L</sub> = Meio líquido complexo; G <sub>1</sub> = Glicose 20 g L <sup>-1</sup> ; G <sub>2</sub> = Glicose 150 g L <sup>-1</sup> ; S <sub>1</sub> = Sacarose 20 g L <sup>-1</sup> ; S <sub>2</sub> = Sacarose 150 g L <sup>-1</sup> A <sub>150</sub> = Agitação de 150 rpm; A <sub>0</sub> = sem agitação .....	52
Figura 34-	Aspecto microscópico das estruturas de frutificação do <i>Botrytis sp.</i> (Fonte: <a href="http://www.isidrocollado.es/">http://www.isidrocollado.es/</a> . Acesso em 06/09/2013) .....	54
Figura 35-	Aspecto de diferentes cultivos infectados por fungos do gênero <i>Botrytis</i> (Fonte: TOFOLLI <i>et al.</i> , 2011) .....	55
Figura 36-	Fórmulas estruturais de compostos com esqueleto botriano, botridial ( <b>37</b> ) e dihidrobotridial ( <b>66</b> ) e esqueleto de boticinina ( <b>67</b> ) .....	56
Figura 37-	Rota biossintética das toxinas botridial ( <b>37</b> ) e di-hidrobotridial ( <b>LVII</b> ). Esquema adaptado de COLLADO <i>et al.</i> , 2007 .....	57
Figura 38-	Fórmula estrutural do cariofileno ( <b>71</b> ) .....	58

Figura 39-	Esquema da síntese do clovan-2 $\beta$ ,9 $\alpha$ -diol ( <b>73</b> ) e alcoxiclovanóis <b>74-79</b> a partir do óxido de cariofileno ( <b>72</b> ) .....	58
Figura 40-	Fórmula estrutural do intermediário <b>69</b> da síntese do botridial ( <b>37</b> ), e do clovan-2 $\beta$ ,9 $\alpha$ -diol ( <b>73</b> ) .....	59
Figura 41 -	Fórmula estrutural do resveratrol ( <b>80</b> ) .....	59
Figura 42-	Esquema para obtenção de 2-ariloxiclovanos ( <b>82, 87-89</b> ), derivados dos álcoois ( <b>83-86</b> ) a partir do óxido de cariofileno ( <b>72</b> ).....	62
Figura 43-	Esquema para obtenção de clovanofenilaminas <b>96-101</b> , clovanoaminopirimidina <b>102</b> clovanofenilamidinas <b>103-105</b> , fenilaminocariolanos <b>106-107</b> e o fenilaminopirimidinacariolano <b>108</b> derivados das fenilaminas <b>90-94</b> e da 2-aminopirimidina ( <b>95</b> ) a partir do óxido de cariofileno ( <b>72</b> ) .....	62
Figura 44 -	Fórmula estrutural dos 2-ariloxiclovanos <b>82, 87-89</b> sintetizados a partir do óxido de cariofileno ( <b>72</b> ).....	63
Figura 45-	Mecanismo do rearranjo do óxido de cariofileno ( <b>72</b> ) catalisado por TCNE (COLLADO <i>et al.</i> , 1996).....	64
Figura 46-	Fórmula estrutural dos produtos secundários <b>73, 110 e 111</b> .....	64
Figura 47-	Esquema com as diferentes rotas reacionais para obtenção dos derivados <b>82, 87-89</b> e dos produtos secundários <b>73, 110 e 111</b> .....	65
Figura 48-	Fórmula estrutural das as clovanofenilaminas <b>96-101</b> , a clovanoaminpirimidina <b>102</b> e as clovanofenilamidinas <b>103-105</b> .....	66
Figura 49-	Fórmula estrutural dos fenilaminocariolanos <b>106-107</b> e o fenilaminopirimidinacariolano <b>108</b> .....	66
Figura 50-	Produto secundário inédito ( <b>113</b> ) obtidos a partir da reação do óxido de cariofileno ( <b>72</b> ) com fenilaminas.....	67
Figura 51-	Esquema geral para síntese das clovanoaminas, sendo R <sup>2</sup> =CH <sub>3</sub> ou H, dependendo da fenilamina utilizada na reação .....	67
Figura 52-	Proposta para formação dos produtos <i>orto-para</i> substituídos além da amina correspondente .....	68
Figura 53-	Mecanismo geral para síntese das clovanofenilamidinas <b>103-105</b> .....	69
Figura 54-	Mecanismo geral para a síntese de derivados cariolânicos .....	70
Figura 55-	Mecanismo proposto para a formação do clovanobenzamido <b>113</b> a partir do cátion clovanobenzonitrila ( <b>115</b> ) .....	71
Figura 56-	Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do composto <b>87</b> .....	78
Figura 57-	Espectro de RMN de <sup>13</sup> C (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do composto <b>87</b> .....	79

Figura 58-	Correlações visualizadas no mapa de contornos HMBC (→) e no mapa de contornos NOESY (↔) referentes ao composto 2β-(2-( <i>p</i> -nitrofenil)etoxi)clovan-9α-ol ( <b>87</b> ) .....	80
Figura 59-	Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do composto <b>88</b> .....	82
Figura 60-	Espectro de RMN de <sup>13</sup> C (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do composto <b>88</b> .....	82
Figura 61-	Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do composto <b>89</b> .....	85
Figura 62-	Espectro de RMN de <sup>13</sup> C (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do composto <b>89</b> .....	86
Figura 63-	Correlações visualizadas no mapa de contornos NOESY referentes ao composto 2β-(2-feniletóxi)clovan-9α-ol ( <b>89</b> ).....	86
Figura 64-	Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (400MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do composto <b>98</b> .....	96
Figura 65-	Espectro de RMN de <sup>13</sup> C (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do composto <b>98</b> .....	97
Figura 66-	Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) dos derivados clovânicos <b>99, 100 e 101</b> .....	100
Figura 67-	Espectro de RMN de <sup>13</sup> C (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) dos derivados clovânicos <b>99, 100 e 101</b> .....	101
Figura 68-	Espectros de n.O.e (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) dos compostos <b>99, 100 e 101</b> .....	102
Figura 69-	Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do composto <b>102</b> .....	105
Figura 70-	Espectro de RMN de <sup>13</sup> C (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do composto <b>102</b> .....	106
Figura 71-	Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do composto <b>103</b> à -20 °C.....	108
Figura 72-	Espectro de RMN de <sup>13</sup> C (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do composto <b>103</b> à -20 °C.....	109
Figura 73-	Algumas correlações da <i>N</i> -(fenil)- <i>N'</i> -(9α-hidroxiclovan-2β-il)-benzamidina ( <b>103</b> ) visualizadas no mapa de contornos HMBC .....	110
Figura 74-	Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do composto <b>104</b> .....	112
Figura 75-	Espectro de RMN de <sup>13</sup> C(100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do composto <b>104</b> .....	113
Figura 76-	Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do composto <b>105</b> .....	115
Figura 77-	Espectro de RMN de <sup>13</sup> C (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do composto <b>105</b> .....	115
Figura 78-	Algumas correlações da <i>N</i> -( <i>p</i> -bromofenil)- <i>N'</i> -(9α-hidroxiclovan-2β-il)-benzamidina ( <b>105</b> ) visualizadas no mapa de contornos HMBC .....	116
Figura 79-	Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do composto <b>113</b> .....	118
Figura 80-	Espectro de RMN de <sup>13</sup> C (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do composto <b>113</b> .....	119
Figura 81-	Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do composto <b>106</b> .....	121
Figura 82-	Espectro de RMN de <sup>13</sup> C (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do composto <b>106</b> .....	122
Figura 83-	Algumas correlações visualizadas no mapa de contornos COSY (↔) e mapa	

	de contornos HMBC ( $\rightarrow$ ) do derivado <b>106</b> .....	123
Figura 84-	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do composto <b>107</b> .....	125
Figura 85-	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (100MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do composto <b>107</b> .....	125
Figura 86-	Algumas correlações visualizadas no mapa de contornos HMBC do derivado <b>107</b> .....	126
Figura 87-	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do composto <b>108</b> .....	128
Figura 88-	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (100MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do composto <b>108</b> .....	129
Figura 89-	Correlações entre hidrogênios de $2\beta$ -( <i>N</i> -pirimidin)cariolan- $9\alpha$ -ol ( <b>108</b> ) visualizadas no mapa de contornos NOESY .....	129
Figura 90-	Esquema para obtenção dos 2-arilclovanos <b>82, 87-89</b> .....	134
Figura 91-	Fórmula estrutural do composto <b>110</b> .....	134
Figura 92-	Fórmula estrutural do composto <b>111</b> .....	135
Figura 93-	Esquema para obtenção dos derivados clovânicos <b>96-105</b> e cariolânicos <b>106-108</b> .....	136
Figura 94-	Fórmula estrutural do composto <b>113</b> .....	137
Figura 95-	Fórmula estrutural dos compostos <b>100</b> e <b>101</b> .....	139

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1-	Curvas referentes à massas extraídas dos extratos LCG20, LCG150, LCS20, LCS150, YES e CYA (item 4.1, p. 46), ao decorrer de 30 dias .....	21
Gráfico 2-	Curvas referente às variações médias de pH dos meios de cultivo LCG20, LCG150, LCS20, LCS150, YES e CYA (item 4.1, p. 37), ao decorrer de 30 dias	23
Gráfico 3-	Curva de calibração obtida a partir da relação entre área sob a curva dos picos presentes nos cromatogramas e concentração ([ ]) de ácido kójico ( <b>51</b> ) em mg mL <sup>-1</sup> .....	30
Gráfico 4-	Representação gráfica da porcentagem de inibição apresentada pelo ácido kójico ( <b>51</b> ) na concentração de 250 µg mL <sup>-1</sup> frente aos micro-organismos <i>A. flavus</i> , <i>C. albicans</i> , <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i> .....	41
Gráfico 5-	Porcentagem de inibição dos compostos sintetizados, <b>102</b> , <b>103</b> , <b>106</b> e <b>107</b> contra <i>B. cinerea</i> .....	73
Gráfico 6-	Porcentagem de inibição dos compostos sintetizados, <b>97</b> , <b>98</b> , <b>102</b> , <b>101</b> , <b>103</b> e <b>106</b> frente ao <i>P. crustosum</i> .....	74

## LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1-	Biossíntese da quitina ( <b>36</b> ) .....	6
Equação 2-	Proposta de biossíntese do ácido kójico ( <b>51</b> ), utilizando glicose como fonte de carbono glicose ( <b>62</b> ) .....	29
Equação 3-	Conversão da sacarose ( <b>59</b> ) em D-glicose ( <b>58</b> ) e D-frutose ( <b>60</b> ) catalisada pela enzima invertase .....	29
Equação 4-	Equação para determinação da porcentagem de inibição obtida nos ensaios biológicos (EC = absorbância do composto avaliado; CM = absorbância do controle do meio de cultura; CH = absorbância do controle de crescimento do micro-organismo; CC = absorbância do controle do composto) .....	48
Equação 5-	Síntese do 2β-[2-( <i>p</i> -nitrofenoxi)etoxi]clovan-9α-ol ( <b>82</b> ) .....	60

## LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	análise de variância
BHI	infuso de cérebro e coração
CCD	cromatografia em camada delgada
CLAE-DAD	cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
CYA	extrato de levedura Czapek
d	duplete
dd	duplete duplo
ddd	duplo duplete duplo
ddt	duplo duplete triplo
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
EM	Espectrometria de massas
ESI	ionização do tipo <i>eletrospray</i>
FIG.	figura
GL	graus de liberdade
GRAF.	gráfico
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Quantum Coherence</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i>
IV	infravermelho
<i>J</i>	constante de acoplamento escalar
LC	meio de cultura líquido complexo
LCG	meio de cultura líquido complexo com glicose
LCS	meio de cultura líquido complexo com sacarose
m	multiplete
<i>m/z</i>	relação massa carga
MEA	extrato de malte
min	minuto
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy</i>
OSMAC	<i>one strain many compounds</i>
p.	página
PAK	produção de ácido kójico



PMB	produção de metabólitos bioativos
PMS	produção de metabólitos secundários
RMN	ressonância magnética nuclear
rpm	rotações por minuto
sl	simpleto largo
t	triplete
TAB.	tabela
TCNE	tetracianoetileno
TOF	analisador de tempo de voo
YES	extrato de levedura e sacarose

## RESUMO

O fungo *Aspergillus parasiticus* é conhecido por produzir aflatoxinas, metabólitos secundários tóxicos a animais e/ou homens. Apesar de produzir metabólitos tóxicos à saúde humana, importantes metabólitos com atividade anticancerígena (sequoiamonascinas A-D) e com atividades antimicrobianas e despigmentantes(ácido kójico) já foram isolados dessa espécie. A primeira parte deste trabalho teve por objetivo determinar as condições operacionais ótimas para a produção de ácido kójico, para promover diversificação metabólica, bem como para modular a biossíntese de metabólitos antimicrobianos a partir do fungo *A. parasiticus*. Este fungo foi cultivado em 120 condições diferentes. Para a avaliação dos parâmetros operacionais foi utilizado análise de variância, cujos planejamentos fatoriais foram 2<sup>2</sup> e 2<sup>3</sup>. As variáveis estudadas foram meio de cultura, agitação, carboidrato e concentração de carboidrato e, como resposta, foi monitorado o número de picos obtidos por CLAE-DAD. Para avaliar a atividade antimicrobiana, foram usadas cepas da coleção do LABB (Laboratório de Biotecnologia e Bioensaios) de bactérias (Gram-positiva *Staphylococcus aureus* e Gram-negativa *Escherichia coli*), de um fungo leveduriforme (*C. albicans*) e de um fungo filamentoso (*A. flavus*). Foram estabelecidas quatro condições ótimas para produção de ácido kójico, sete condições para diversificação metabólica e treze condições que levaram à modulação da produção de metabólitos antimicrobianos. Entre os meios avaliados, destacaram-se o meio de cultivo LCS150 que na ausência de agitação e com 12 dias de fermentação (PAK02), proporcionou o melhor rendimento (65,4%) de ácido kójico a partir do extrato bruto analisado; o meio de cultivo YES, na ausência de agitação e 27 dias de fermentação (PMS09), que forneceu 21 metabólitos detectados por CLAE-DAD; e o meio LCG20, na ausência de agitação e 15 dias de cultivo (PMB06) que mostrou ser a condição mais adequada para a produção de metabólitos ativos contra *E. coli* (69,8 ± 1,1% de inibição). As treze condições de cultivo encontradas para modulação de metabólitos antimicrobianos forneceram extratos que apresentaram atividade biológica com IC<sub>40</sub> para pelo menos um dos micro-organismos testados.

A segunda parte deste trabalho envolveu o fungo *Botrytis cinerea*, responsável pela doença denominada “podridão cinza”, conhecida por provocar grandes perdas e prejuízos econômicos em culturas de hortaliças e frutas. Sua grande capacidade de se adaptar a condições extremas juntamente com a resistência apresentada aos diversos fungicidas fazem do *B. cinerea* um dos fungos mais temidos pelos agricultores. Esta parte teve, como objetivo, empregar a metodologia de desenho biossintético de fungicidas, a fim de preparar derivados específicos para o combate deste fitopatógeno. Foram sintetizadas quinze substâncias com esqueleto clovânico (quatro ariloxiclovanos, seis clovanofenilaminas, uma clovanoaminopirimidina, três clovanofenilamidinas e um clovanobenzamido)

e três com esqueleto cariolânico, a partir do óxido de cariofileno. Dentre as substâncias preparadas, quinze são inéditas. Todas as substâncias preparadas foram testadas frente ao fungo *B. cinera*. Destas, apenas duas não foram ativas na concentração avaliada ( $250 \mu\text{g L}^{-1}$ ), demonstrando a eficiência da metodologia empregada. Todas as clovanofenilaminas apresentaram inibição superior a 90 %. A fim de avaliar a especificidade de inibição frente a este fitopatógeno, realizaram-se ensaios antifúngicos com *Penicillium crustosum*. Os compostos preparados foram menos ativos frente a este fungo, confirmando um mecanismo de inibição específico contra *B. cinerea*.

## ABSTRACT

The fungus *Aspergillus parasiticus* is known for producing aflatoxins, secondary metabolites toxic to animals and to humans. Despite producing toxic metabolites to human health, important metabolites with anticancer (sequoiamonascins A-D), antimicrobial and skin lightening activities (kojic acid) have been isolated from this species. The first part of this study aimed to determine the optimal operating conditions for the production of kojic acid, to promote metabolic diversification, as well as to modulate the biosynthesis of antimicrobial metabolites from the fungus *A. parasiticus*. This fungus was cultivated in 120 different conditions. For the evaluation of operational parameters analysis of variance was used, with factorial planning  $2^2$  and  $2^3$ . The variables studied were the culture medium, agitation, carbohydrate type and carbohydrate concentration and, in response, the number of peaks obtained by HPLC-DAD has been monitored. To evaluate antimicrobial activity, the following strains from Biotechnology and Bioassays Laboratory (LABB) collection were used: Gram-positive *Staphylococcus aureus* and Gram-negative *Escherichia coli* (bacteria), *Candida albicans* (yeast) and *A. flavus* (filamentous fungus). Four optimum conditions were established for production of kojic acid, seven conditions for metabolic diversification and thirteen conditions led to the modulation of antimicrobial metabolites production. Among the culture medium evaluated, is possible to highlight the medium LCS150 that, in the absence of agitation and with 12 days of fermentation, provided the best yield of kojic acid (65.4%) from crude extract; the culture medium YES, in the absence of agitation and with 27 days of fermentation, provided 21 metabolites as detected by HPLC-DAD; the culture medium LCG20, in the absence of agitation and after 15 days of cultivation, proved to be the most suitable condition for the production of metabolites active against *E. coli* ( $69.8 \pm 1.1\%$  inhibition). The thirteen growing conditions found for modulation of antimicrobial metabolites provided extracts that showed biological activity with  $IC_{40}$  for at least one of the microorganisms tested. The second part of this work involved the *Botrytis cinerea* fungus, responsible for the condition called "grey rot", known to cause great economic losses in crops of vegetables and fruits. Its great ability to adapt to extreme conditions, along with the resistance presented to various fungicides make *B. cinerea* a fungi feared by farmers. This part of the work aimed to employ the methodology of fungicides biosynthetic design, in order to prepare specific derivatives for the combat of this phytopathogen. Fifteen substances were synthesized having clovane skeleton (four ariloxyclovane, six clovanophenylamine, a clovaneaminopyrimidin, three clovanephenylamidine and one clovanebenzamide) and three with cariolane skeleton, from caryophyllene oxide. Among the substances prepared, fifteen are novel. All substances prepared were tested against the fungus *B. cinerea*. Of these, only two have not been active in the concentration evaluated ( $250 \mu\text{g L}^{-1}$ ), demonstrating the efficiency of the methodology

employed. All clovanephenylamine presented more than 90% inhibition. In order to evaluate the specificity of inhibition against this phytopathogenic fungus, antifungal assays were conducted with *Penicillium crustosum*. The compounds prepared were less active against this fungus, confirming a specific inhibition mechanism against *B. cinerea*.

---

### INTRODUÇÃO GERAL

Ao longo dos séculos, muitas substâncias foram descobertas, a partir das mais variadas fontes naturais, tais como plantas superiores, micro-organismos ou animais. Muitas dessas substâncias apresentaram atividades farmacológicas com ações antiangiogênica, antidiabética, antiviral, antiasmática, anti-inflamatória, anticoagulante, antibacteriana, antifúngica e forneceram, ainda, agentes para o tratamento de doenças neurológicas, osteoporose, entre outras (NEWMAN; CRAGG, 2012). Uma das substâncias mais marcantes já obtidas de fonte natural é a penicilina G (**1**), antibiótico isolado do fungo *Penicillium crysogenum* que revolucionou o século XX (FIG. 1). A penicilina proporcionou um aumento de 10 anos na expectativa de vida da população, além de propiciar o desenvolvimento científico do estudo de outros antibióticos, o que incentivou o isolamento de novos metabólitos secundários produzidos por fungos (KARDOS; DAMAIN, 2011).

Figura 1- Fórmula estrutural da penicilina G (**1**)

As substâncias produzidas por fungos podem ser classificadas como metabólitos primários - fundamentais para o desenvolvimento do organismo - e metabólitos secundários - encontrados em organismos específicos, cuja individualidade da espécie é demonstrada mediante estímulos externos como competição, mudanças nutricionais e infecções por agressores. Dentre as substâncias naturais que apresentam atividades biológicas, os metabólitos secundários compõem a maioria das bioativas (DEWICK, 2011).

O trabalho dos químicos orgânicos na busca de metabólitos bioativos foi guiado, muitas vezes, por registros de civilizações antigas e conhecimentos populares. Registros da época dos Sumérios, 4000 A.C, por exemplo, indicavam a utilização do ópio, produzido a partir dos bulbos da *Papaver somniferum*, como calmante e analgésico. Na mitologia grega há relatos que atribuem à papoula do ópio, o simbolismo de Morfeu, o Deus do sono. Assim, destes registros foi possível a descoberta dos alcaloides. As estruturas de alguns alcaloides bioativos, isolados a partir da papoula do ópio, assim

## *Introdução*

como a imagem da *Papaver somniferum* apresentadas na FIG. 2 (p. 2) (BARREIRO; BOLZANI, 2009).

Figura 2- Fórmulas estruturais e atividades biológicas dos alcaloides isolados da papoula do ópio



Por meio do conhecimento popular foi possível o lançamento do primeiro fitoterápico 100 % brasileiro, Acheflan, que tem como princípio ativo o alfa-humuleno (7). Pescadores do litoral sul e sudeste do estado de São Paulo já utilizavam a *Cordia verbenacea* - conhecida popularmente como Erva-Baleeira, Erva-da-Praia e Maria Milagrosa - em forma de chá e efusões. Em 1980, pesquisadores da UNICAMP, USP, UFSC e UFRJ iniciaram pesquisas com a *Cordia verbenacea* e isolaram seu princípio ativo, alfa-humuleno (7) (FIG. 3). Em junho de 2005, o Acheflan foi lançado no mercado pelo laboratório ACHÉ e, em setembro do mesmo ano, já era líder no receituário médico em sua categoria (ALVES, 2006).

Figura 3- Embalagem comercial do medicamento Acheflan, fórmula estrutural do alfa-humuleno (7) e imagem da *Cordia verbenacea*. Fonte: <<http://www.ufpi.br/lapnex/materias/index/mostrar/id/5651>>. Acesso em: 3 set. 2013.

Apesar do sucesso dos produtos naturais como fonte de fármacos, muitas indústrias farmacêuticas diminuíram ou até mesmo encerraram sua utilização em projetos de pesquisa. Tal fato foi atribuído às limitações da triagem de produtos naturais e à introdução da química combinatória, tendo esta levado muitas empresas farmacêuticas a acreditarem que a existência de grandes bibliotecas de compostos sintéticos possibilitaria inúmeras combinações a curto prazo, permitindo, por consequência, a descoberta de novas drogas (LAM, 2007).

A prospecção química de qualquer extrato de origem natural exige tratamentos laboriosos, o que faz com que seja considerada demasiadamente lenta para se enquadrar no ritmo de triagens de grande porte, pois aumenta muito o tempo de exploração das fontes naturais disponíveis (HARVEY, 2007). Todavia, se o foco passar para uma única, mas prolífera e confiável fonte natural, os resultados da investigação podem maximizar o sucesso na busca de novos fármacos.

Dentre as fontes naturais disponíveis, os micro-organismos destacam-se por apresentarem características que viabilizam sua utilização para pesquisas, pois se multiplicam rapidamente e apresentam ciclo de vida curto, sendo organismos quimio-organotróficos de fácil controle em processos operacionais (TAKAHASHI *et al.*, 2013). No entanto, o método tradicional, por meio do qual se realiza o estudo de um extrato proveniente de um único cultivo de um dado micro-organismo, nem sempre resulta na expressão de novos metabólitos.

Recentemente, uma nova abordagem chamou a atenção por entender serem necessárias várias técnicas para diversificar a produção de metabólitos de uma determinada espécie microbiana, propondo, assim, a manipulação da biossíntese para a produção de substâncias bioativas. Essa abordagem é denominada OSMAC (“*one strain many compounds*” ou “um micro-organismo e muitos compostos ativos”) e baseia-se no pressuposto de que a produção de metabólitos secundários ocorra como uma resposta específica a ambientes diferentes. Desta forma, uma simples variação das condições de cultivo - tais como tempo de incubação, composição do meio de cultura, temperatura, pH - pode levar à modificação do perfil qualitativo e quantitativo dos metabólitos secundários produzidos, podendo até mesmo haver a otimização das condições de produção de um metabólito específico (WANG *et al.*, 2013). A aplicação dessa abordagem é uma ótima oportunidade para que os produtos



## *Introdução*

---

naturais, principalmente proveniente de micro-organismos, possam voltar a ser uma das principais fontes para a descoberta de fármacos (LAM, 2007).

Assim, por meio da estratégia OSMAC, é possível produzir e investigar um grande número de extratos brutos obtidos a partir de um único micro-organismo. Os extratos podem ser obtidos em pequena ou micro escala, o que permite a triagem de dezenas a centenas de amostras em pouco tempo. Métodos cromatográficos, como CLAE-DAD (cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos), podem ser empregados para triagem dos metabólitos secundários presentes nestes extratos brutos, sendo possível analisar a diversidade química dos extratos obtidos usando-se diferentes meios de cultura e diversas condições de cultivo.

Em nosso grupo de pesquisa, metabólitos interessantes têm sido isolados, tais como, isocromofilona VI (**8**), metabólito secundário isolado a partir do fungo *Penicillium sclerotiorum* (LUCAS *et al.*, 2007), meroterpenos isolados a partir do fungo *Penicillium brasillianum* (**9** e **10**) (SHURMANN; TAKAHASHI, 2010) e citosporonas isoladas a partir espécies do fungo *Cytospora* (**11** a **14**) (ABREU *et al.*, 2010) (FIG. 4). Porém, como estes metabólitos foram isolados em baixos rendimentos, a utilização da estratégia OSMAC pode ser importante para maximizar a produção de substâncias como estas, possibilitando seu uso para realização de semi-síntese, bioensaios e biotransformações.

Figura 4- Fórmula estrutural dos metabólitos secundários isolados a partir de espécies do fungo *P. sclerotiorum* (isocromofilona**8**), *P. brasillianum* (meroterpenos**9** e **10**) e *Cytospora* (citosporinas**11** a **14**)



Apesar de produzirem importantes metabólitos bioativos, algumas espécies fúngicas são conhecidas por causarem doenças em humanos e vegetais. Em humanos, uma das principais doenças causadas por fungos são as micoses, que afetam a pele, unha e cabelos. Quando atacam os vegetais, podem causar a morte da planta infectada ou contaminá-las com toxinas. Sérios prejuízos em plantações agrícolas são provocadas por contaminações fúngicas, uma vez que a dispersão desses micro-organismos ocorre pela ação do vento, levando muitas vezes à perda de culturas inteiras, sendo necessário o uso de agrotóxicos para combater estes fitopatógenos (VEIGA, 2007).

A produção agrícola tem crescido em todo o mundo nos últimos anos, reflexo da crescente demanda por alimento. Porém, dados fornecidos pela FAO (Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação) preveem uma diminuição na taxa de crescimento anual, que foi de 2,1 % entre 2003 a 2012 para 1,5 % para a próxima década. Este fato se deve, entre outros fatores, ao alto custo de produção já que, menos de 0,1 % dos agrotóxicos aplicados por pulverização atingem seu alvo. Além disso o restante pode causar impactos negativos ao ecossistema, tal como o acúmulo de resíduos químicos nos lençóis freáticos e no solo (KNIGHT *et al.*, 1997; ELAD *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2013). Alguns agrotóxicos representam riscos à saúde dos aplicadores e consumidores, podendo causar intoxicações, mutações gênicas e até a morte (PORTO; SOARES, 2012).

Desta forma, o conhecimento das vias metabólicas envolvidas na produção das toxinas responsáveis pela infecção e propagação dos fungos fitopatógenos possibilita a investigação e posterior

## *Introdução*

---

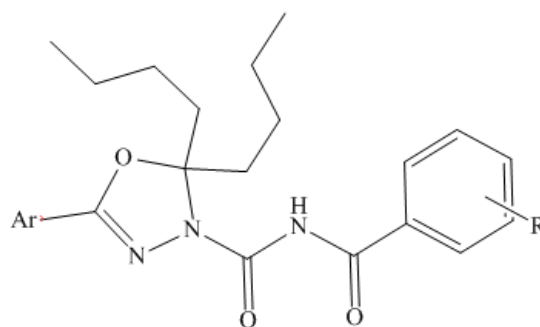
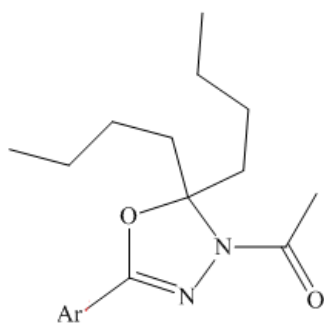
síntese de compostos que possam combater estes patógenos, contribuindo para a diminuição ou até mesmo a abolição do uso de agrotóxicos (ACERO *et al.*, 2011). Atualmente é possível identificar genes responsáveis pela biossíntese de toxinas e interferir em suas funções (CHIANG *et al.*, 2010; ARNAUD *et al.*, 2012). As pesquisas envolvendo o sequenciamento genético, identificação de vias metabólicas e das toxinas excretadas em um mecanismo de infecção possibilitam trilhar caminhos diferentes daqueles tradicionalmente estabelecidos.

A síntese de substâncias químicas produzidas aleatoriamente vem sendo substituída pela síntese dos compostos “inteligentes”, ou seja, compostos sintetizados, a partir de estudos químicos e biológicos capazes de identificar as características químicas que estes compostos devem possuir, para apresentar determinada atividade biológica (PUPO *et al.*, 2007). A metodologia envolvida na síntese desses compostos “inteligentes” é denominada por alguns pesquisadores como desenho biossintético (RACERO *et al.*, 2004).

O desenho biossintético de fungicidas consiste na síntese de moléculas capazes de inibir as principais rotas biossintéticas, que conduzem ao desenvolvimento do fungo ou à formação das toxinas envolvidas no mecanismo de infecção, mediante o uso de análogos dos intermediários biossintéticos (ALEU *et al.*, 1999). A aplicação desta metodologia pode contribuir no combate aos fitopatógenos que causam danos nas plantas e nos frutos que os hospedam, causando diversos prejuízos ao setor agroindustrial em função do comprometimento de várias plantações.

Kee colaboradores (2009), utilizando esta metodologia, prepararam duas séries de derivados heterocíclicos 1,3,4-oxadiazolínicos (**15-34**) (FIG. 5) a fim de impedir que a quitina sintase interagisse com o substrato **35** (Equação 1).

Figura 5- Fórmula estrutural dos derivados heterocíclicos 1,3,4-oxadiazolínicos (**15-34**)



Composto Nº	Substituinte Ar
15	<i>o</i> -Cl-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>
16	3,4,5-(MeO) <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>2</sub>
17	3-MeO-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>
18	<i>p</i> -Cl-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>
19	<i>p</i> -F-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>
20	3,5-Me <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>3</sub>
21	<i>p</i> -Et-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>
22	3,4-OCH <sub>2</sub> O-C <sub>6</sub> H <sub>3</sub>
23	Naftalen-2-ila
24	Furan-2-ila

Composto Nº	Substituintes	
	Ar	R
25	<i>o</i> -Cl-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	2,6-F <sub>2</sub>
26	3,4,5-(MeO) <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>2</sub>	2,6-F <sub>2</sub>
27	3-MeO-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	<i>o</i> -Cl
28	<i>p</i> -Cl-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	<i>o</i> -Cl
29	<i>p</i> -F-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	<i>o</i> -Cl
30	3,5-Me <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>3</sub>	2,6-F <sub>2</sub>
31	<i>p</i> -Et-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	2,6-F <sub>2</sub>
32	3,4-OCH <sub>2</sub> O-C <sub>6</sub> H <sub>3</sub>	2,6-F <sub>2</sub>
33	Naftalen-2-ila	2,3,5-F <sub>3</sub> -4-MeO
34	Furan-2-ila	2,6-F <sub>2</sub>

Equação 1- Biossíntese da quitina (36)

A biossíntese da quitina (36), composto essencial na síntese da parede celular, bem como para desenvolvimento e formação de esporos em fungos, ocorre através da interação do grupo funcional oxina do substrato 35 com a enzima quitina sintase (KEet *al.*, 2009). Por isso, apesar de não apresentarem o mesmo grupo funcional que o substrato 35 todos os derivados 15-34 (FIG. 5, p.6)

## *Introdução*

---

preparados continham distribuição espacial similar a este substrato e todos inibiram a síntese da quitinina (**36**), sugerindo uma nova classe de inibidores.

O grupo de pesquisa “Diseño Biosintético de Fungicidas” da Universidade de Cádiz (Cádiz/Espanha), do qual fiz parte durante o doutorado sanduíche, tem sintetizado derivados análogos de intermediários da biossíntese da toxina botridial (**37**), identificada como responsável pelo mecanismo de infecção do *B. cinerea*, fitopatógeno responsável pela contaminação de cultivos de uva, morango, tomate, entre outros (FIG. 6).

Figura 6- Fórmula estrutural da toxina botridial (**37**), produzida pelo fungo *B. cinerea*

Desta forma, esta investigação foi dividida em duas partes. A primeira parte envolveu a triagem de metabólitos secundários produzidos pelo fungo *Aspergillus parasiticus*, que foi submetido a diferentes condições de cultivo. Realizou-se a extração de seus metabólitos secundários em pequena escala, seguida por triagem CLAE-DAD dos extratos obtidos e testes biológicos. A segunda parte abrangeu a síntese de moléculas bioativas que mimetizassem parcialmente intermediários envolvidos na biossíntese da toxina botridial (**37**) e a avaliação biológica dos compostos preparados.

## PARTE I

### 1 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 1.1 Fungos

O Reino fungi foi dividido em quatro filos distintos: Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota e Basidiomycota (ALEXOPOULOS *et al.*, 1996). Em 2001, o filo Glomeromycota foi incluído como uma nova classificação dentro do reino Fungi (SCHUBLER *et al.*, 2001).

Os fungos podem ser encontrados em diferentes habitats, como ambientes tropicais, temperados e glaciais. Um dos fatores fundamentais para o desenvolvimento dos fungos é a presença de água, ainda que na forma de vapor (BAYARAM; BRAUS, 2012). Os fungos necessitam de matéria orgânica para o seu metabolismo, por isso, são sempre encontrados associados a materiais orgânicos como decompositores, simbiontes, comensais ou parasitas. Dependendo da associação, são úteis ou prejudiciais (BAYARAM; BRAUS, 2012). A partir do seu habitat natural, os fungos espalham-se na natureza, utilizando várias vias de dispersão, como ar atmosférico, água, insetos, homem e animais (BLACKWELL, 2011).

Uma das propriedades mais importantes dos fungos, em especial fungos do filo Ascomycota e Basidiomycota, está associada à sua capacidade metabólica de produzir uma diversidade de moléculas bioativas, destacando-se várias classes de antibióticos, redutores de colesterol, antitumorais, antifúngicos, imunossupressores, antiprotozoários, anti-inflamatórios e antivirais (SHU, 2007). Dentre os medicamentos com maior repercussão atualmente, destaca-se a lovastatina, um agente redutor de colesterol, detentor de um mercado mundial em torno de um bilhão de dólares por ano (GOSWAMI *et al.*, 2012).

Outros metabólitos importantes produzidos por fungos abrangem esteroides, hormônios vegetais, enzimas, utilizadas em processos biotecnológicos envolvidos na fabricação de sucos de frutas e substâncias inseticidas, que auxiliam no controle de pragas (BAYARAM; BRAUS, 2012).

Estima-se que existam cerca de 5,1 milhões de espécies fúngicas, indicando que uma quantidade enorme de espécies ainda deve ser descoberta e, por sua vez, cultivada e estudada (BLACKWELL, 2011).

#### 1.2 O filo Ascomycota

Entre os filos que compõem o Reino Fungi, o filo Ascomycota compreende cerca de 64% das espécies de leveduras e fungos filamentosos conhecidos. Estes são caracterizados por apresentarem

uma estrutura membranosa que contém esporos derivados da reprodução sexuada, denominada asco, o que os diferem dos demais filós (CARLILE *et al.*, 2004). Esses fungos podem ser encontrados nos mais variados habitats, englobando muitas espécies patogênicas (BERGOLD; GEORGIADIS, 2004). Dentre os patógenos que compõem este filo, a maior parte trata-se de patógenos de plantas, enquanto uma pequena porcentagem causa danos que acometem o homem ou outros animais (BLACKWELL, 2011). Muitas espécies fúngicas pertencentes a este filo apresentam importante valor nas indústrias alimentícia e farmacêutica (BRAKHAGE, 2013). Fungos Ascomycotas denominados “morchelas” e trufas são muito apreciados como alimento. O fungo morchela (*Morchella esculenta*) é geralmente misturado com arroz e legumes e pode ser considerado tão nutritivo quanto a carne ou peixe (PRASAD *et al.*, 2002). A trufa é um fungo da espécie *Tuber melanosporum* muito apreciada pelo sabor e aroma característicos. Trata-se de um fungo subterrâneo constituído de uma grande porcentagem de proteína e que apresenta baixo teor calórico, o que o torna um alimento nutritivo e saudável (DÍAZ *et al.*, 2003).

Dos antibióticos conhecidos até 1995, aproximadamente 22 % foram produzidos por fungos Ascomycota, com um mercado combinado com antibióticos semi-sintéticos de 11 bilhões de dólares (DEMAIN, 2000). Destacam-se abaixo as cefalosporinas (FIG. 7) (GUIMARÃES *et al.*, 2010).

Figura 7-Fórmula estrutural da Cefalosporina (38), princípio ativo deste medicamento

Um número grande de doenças que na década de 80 e 90 eram tratadas apenas por medicamentos de origem sintética, atualmente já são tratadas por medicamentos de origem microbiana, destacando-se os agentes anti-tumorais, tal como o taxol que pode ser obtido a partir de fungos (DEMAIN; VAISHNAV, 2011).

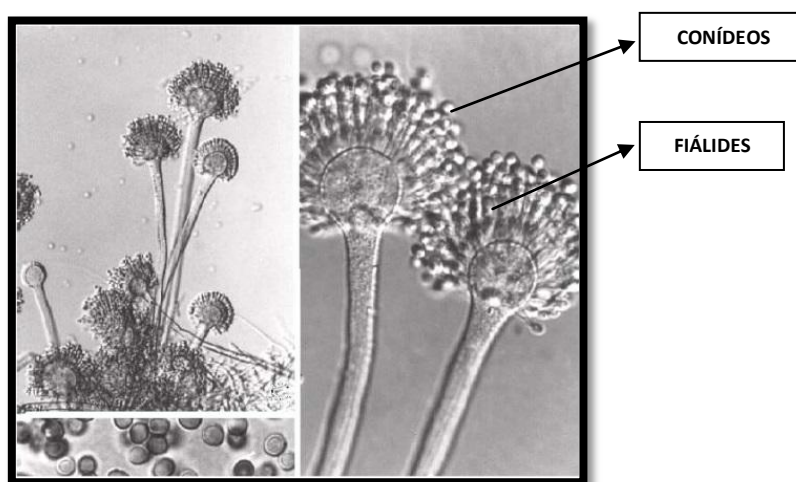
### 1.3 Gênero *Aspergillus*

Os fungos do gênero *Aspergillus* são classificados como filamentosos, ou seja, apresentam filamentos ou hifas que podem ser visualizadas microscopicamente. Ao conjunto de filamentos apresentado por estes fungos dá-se o nome de micélio. O gênero *Aspergillus* apresenta algumas

## Referencial teórico

características gerais, tais como, crescimento rápido, em torno de três dias e, durante o crescimento, apresentam área superficial branca que, ao passar do tempo, fica amarelada, verde, castanha ou preta, dependendo da espécie em questão. A textura das colônias é aveludada. No microscópio podem ser observadas hifas septadas com vesículas em sua extremidade, que dão origem aos esporos externos alongados chamados de fiáldes. As fiáldes apresentam, em sua extremidade, estruturas chamadas de conídios (KLICH, 2002) (FIG. 8).

Figura 8- Aspecto microscópico das estruturas de frutificação do *Aspergillus* sp. (Fonte: SAMSONet al., 2007)



### 1.3.1 Taxonomia

O enquadramento taxonômico, segundo KLICH(2002), é apresentado a seguir:

Reino: Fungi

Ordem: Eurotiales

Filo: Ascomycota

Família: Trichocomaceae

Subclasse: Eurotiomycetidae

Gênero: *Aspergillus*

Classe: Ascomycetes

### 1.3.2 Histórico

O gênero *Aspergillus* foi descrito pela primeira vez em 1729, pelo padre e micologista Micheli, que o nomeou de *Aspergillus* devido à estrutura característica dos esporos deste gênero, que se assemelhava um dispositivo usado pela Igreja Católica para aspergir água benta, conhecido como aspergillum (KLICH, 2002). Esses micro-organismos estão entre os organismos mais abundantes e amplamente distribuídos na terra. Esse gênero engloba mais de 200 espécies fúngicas. Para se



adaptarem aos diversos nichos que ocupam, produzem uma grande variedade de metabólitos, muitos dos quais são explorados pelo ser humano (PITT, 2000; KLICH, 2006).

Um número elevado de patentes tem sido publicado envolvendo testes biológicos realizados com metabólitos secundários produzidos por diferentes espécies de *Aspergillus* (TAKAHASHI; LUCAS, 2008).

Algumas espécies de *Aspergillus* causam impacto negativo, pois são responsáveis pela degradação de grãos antes e depois da colheita (SAMSON *et al.*, 2007). Além disso, produzem micotoxinas, metabólitos secundários altamente tóxicos para humanos e animais (HEDAYATI *et al.*, 2002).

Muitas doenças associadas à imunossupressão são causadas por espécies deste gênero. Um exemplo é a aspergilose, doença pulmonar que, em alguns casos, pode ser fatal (FILHO *et al.*, 2005). Entretanto, espécies do gênero *Aspergillus* apresentam um repertório químico vasto, encontrando importantes utilizações nas indústrias alimentícia e farmacêutica. Excelentes impactos econômicos foram alcançados a partir da exploração de enzimas e ácidos produzidos por diversas espécies de *Aspergillus*. Como exemplos, tem-se importantes metabólitos produzidos atualmente em escala industrial: a enzima amilase e os ácidos cítrico e glucônico (ACOURENE; AMMOUCHE, 2012).

As amilases são produzidas por uma variedade de fungos, dentre os quais destaca-se a espécie *Aspergillus oryzae*. Na indústria de alimentos, as amilases são empregadas na degradação do amido para obtenção de glicose (MACHIDA; GOMI, 2010). O ácido cítrico era obtido, inicialmente, a partir de frutas cítricas. Em 1916, descobriu-se que o fungo *Aspergillus niger* era capaz de sintetizar este metabólito. Em 1920, aproximadamente 75% do ácido cítrico produzido já provinha de fermentação fúngica e, em 1987, o processo de fermentação produzia cerca de 500.000 toneladas de ácido cítrico por ano (ROEHR *et al.*, 1987). Outro importante metabólito produzido por esta espécie trata-se do ácido glucônico, utilizado para tratamentos de deficiência de cálcio e ferro (MACHIDA; GOMI, 2010).

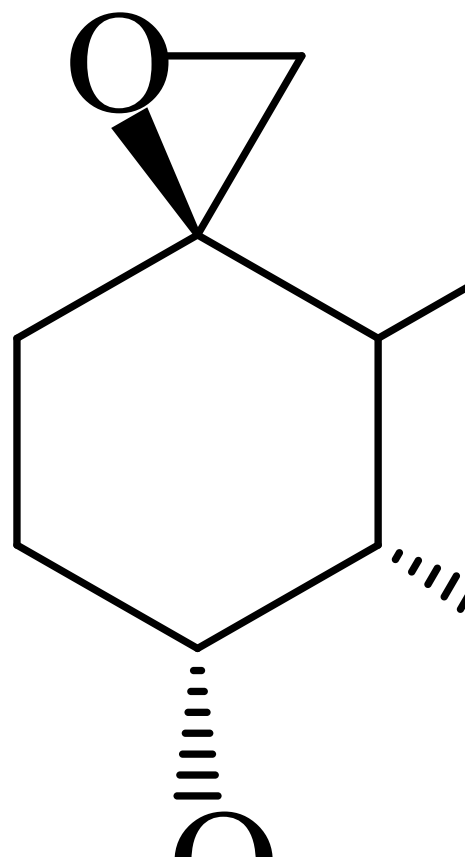
O gênero *Aspergillus* também é reconhecido pela sua habilidade em produzir vários metabólitos bioativos para indústria farmacêutica. Alguns destes são mostrados na FIG. 9(p. 12) assim como as respectivas atividades biológicas.

Trabalhos recentes realizados por Awaade colaboradores (2012), a partir da fermentação de *A. terreus*, utilizando meio de cultura YES, contendo sacarose como fonte de carbono, levaram ao isolamento de novos compostos antifúngicos (45 e 46) (FIG. 9, p. 12).

## Referencial teórico

Muitos outros metabólitos secundários já foram isolados a partir de diferentes espécies do gênero *Aspergillus*, apesar de fazerem parte de um grupo de micro-organismo amplamente estudado, a excelente versatilidade apresentada por estes, podendo crescer sob condições diversas, possibilita que um constante fluxo de moléculas inéditas possam ser produzidas por seus representantes (WU *et al.*, 2010).

Figura 9- Metabólitos secundários isolados a partir de fungos do gênero *Aspergillus* e respectivas atividades biológicas



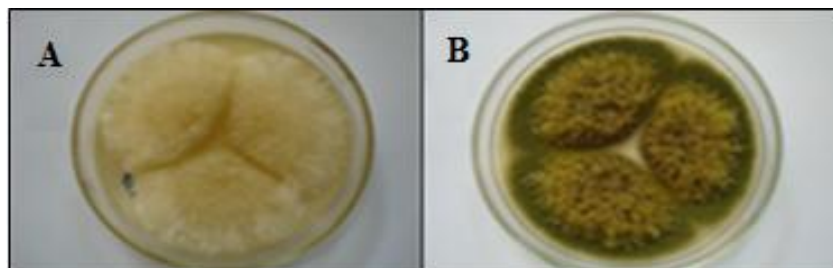
### 1.3.3 Características gerais da espécie *A. parasiticus*

O fungo *A. parasiticus* é isolado frequentemente de sementes e de outras partes de plantas, insetos e ocasionalmente pode ser encontrado no solo. Quando cultivado em meio MEA (extrato de

## Referencial teórico

malte), as colônias não apresentam coloração ou são de coloração amarelo pálido, conforme ilustrado na FIG. 10- a (p. 13). Quando cultivada em meio CYA (Czapek), a textura e cor das colônias vão de oliva a verde escuro profundo, conforme ilustrado na FIG. 10- b (p. 13).

Figura 10- Aspecto das colônias de *A. parasiticus* cultivadas nos meios (a) MEA a 25 °C e (b) CYA a 37°C



Esta espécie é conhecida por produzir aflatoxinas, mas importantes metabólitos com atividade anticancerígena já foram isolados de *A. parasiticus* (STIERLE *et al.*, 2003)(FIG. 11).

Figura 11-Metabólitos secundários com atividade anticancerígena produzidos pelo fungo *A. parasiticus*

Lin e colaboradores, em 1976, pesquisando a produção de aflatoxinas por esta espécie constataram na cultura a presença de uma grande quantidade de cristais amarelos. Análises de espectros de ressonância magnética nuclear e de infravermelho levaram à identificação deste metabólito como 5-hidroximetil-4-piranona, ácido kójico (**51**), FIG. 12(LIN *et al.*, 1976).O ácido kójico (**51**) apresenta muitas atividades biológicas, tais como antifúngica, antineoplásica, antibacteriana, anti-inflamatória, inseticida, entre outras (MOHAMAD *et al.*, 2010).

Figura 12- Fórmula estrutural do ácido kójico (**51**), metabólito secundário produzido por *A. parasiticus*

#### 1.3.4 Ácido kójico (51)

Durante muitos anos, alimentos tradicionais da cultura japonesa foram obtidos a partir de processos fermentativos, tais como *oshoyu* (molho de soja), *omissô* (pasta de arroz/soja) e *osake* (bebida fermentada de arroz) (BARRETT *et al.*, 2001). O preparo destes alimentos consiste no cozimento da matéria prima arroz e posterior inoculação do fungo *A. oryzae*, formando uma pasta denominada *koji*. Durante muitos anos, trabalhadores japoneses envolvidos no processo de homogeneização desta pasta perceberam que suas mãos estavam perdendo a pigmentação com o passar do tempo (RAKU; TOKIWA, 2003). Pesquisadores interessados em encontrar o composto responsável pela despigmentação nas mãos dos trabalhadores japoneses iniciaram estudos com a pasta *koji* e, em 1907, o pesquisador Saito isolou um ácido orgânico a partir do fungo *A. Oryzae* (BENTLEY, 2006). No entanto, naquela ocasião não o nomeou e tão pouco determinou sua massa molecular ou temperatura de fusão. Somente em 1924 o pesquisador Yabuta, estudando fermentações a partir de *A. oryzae*, isolou e caracterizou este ácido nomeando-o de ácido kójico (51) (BENTLEY, 2006). O ácido kójico (51) é biossintetizado por várias espécies fúngicas de *Aspergillus* e *Penicillium* e por algumas espécies de bactérias. A biossíntese proposta para o ácido kójico (51) consiste na condensação do piruvato de fosfoenol (52) com uma tetrose, D-eritrose-4-fosfato (53), formando o 3-desoxi-arabinoheptulonato-7-fosfato (54), que por sua vez sofre uma condensação intramolecular e descarboxilação dando origem ao intermediário 55 que com subseqüentes oxidações forma o ácido kójico (51), conforme apresentado na FIG. 13 (EYONG *et al.*, 2012).

Figura 13- Biossíntese do ácido kójico (51)

-207

Vários estudos foram realizados a fim de confirmar a atividade despigmentante do ácido kójico (51), como o experimento de Mishima (2001), que consistiu em adicionar peixes de coloração preta em aquários contendo solução aquosa de ácido kójico (51) (0,15%). Após um período de 49 dias os peixes apresentaram coloração marrom amarelada, confirmando a ação despigmentante do ácido kójico (51).

O potencial biológico deste metabólito vem sendo bastante explorado e importantes atividades já foram descobertas, como despigmentante, anti-inflamatória, antifúngica, antibacteriana, antineoplásica, inseticida e, recentemente, vem sendo aplicado também em tratamentos para redução de marcas de expressão em torno da área dos olhos (SANFELICE; TRUITI, 2010). O uso de formulações cosméticas que apresentam o ácido kójico (51) como princípio ativo tem aumentado bastante nos últimos anos, devido a importantes características apresentadas por este metabólito, tais como, não ser fotossensível, apresentar efeito despigmentante, atuar como antisséptico impedindo a proliferação de micro-organismos na pele, proporcionar ação antioxidante, ajudando na prevenção do envelhecimento cutâneo. Atualmente existem cerca de 600 patentes relacionadas à utilização e produção de ácido kójico (51), porém nenhuma delas é de autoria brasileira (EPA, 2013).

O rendimento de ácido kójico (51) chega a 8,5-9,5 g kg<sup>-1</sup> (KHARCHENKO; KUTS, 1999), um rendimento alcançado em uma fermentação em estado sólido utilizando grãos e cereais, tais como milho, aveia e grãos de cevada, com alto teor de proteínas e carboidratos (MOHAMAD *et al.*, 2010). Diferentes condições de cultivo foram descritas na literatura para produção deste metabólito. Rosfarizan e Ariff (2008) alcançaram maior produção de ácido kójico (51) a partir do fungo *A. flavus* utilizando meio de cultivo composto por glicose e extrato de levedura, sob agitação, com rendimentos de 45,3 g L<sup>-1</sup>. Ferreira e colaboradores (2010) também trabalhando com este fungo obtiveram um

rendimento de 26 g L<sup>-1</sup> a partir de meios de cultivo contendo sacarose, como fonte de carbono, e nitrato de sódio como única fonte de nitrogênio. Wei e colaboradores, em 1991, relataram rendimentos de 45,1 g L<sup>-1</sup> a partir do fungo *A. candidus*, utilizando meio de cultivo composto por sacarose e extrato de levedura, na ausência de agitação (MOHAMAD *et al.*, 2010).

### 1.4 OSMAC: “one strain many compounds” (“um micro-organismo e muitos compostos ativos”)

A otimização dos processos de produção de metabólitos bioativos é de grande importância na biotecnologia, uma vez que são desejados altos rendimentos a partir de matéria prima abundante e barata. Almeja-se, também, a utilização de metodologias que não gerem resíduos tóxicos e que apresentem boa viabilidade comercial (LAM, 2007). É neste contexto que novas estratégias têm sido avaliadas, destacando-se a abordagem OSMAC, uma ferramenta indireta para obtenção de metabólitos ativos (TAKAHASHI *et al.*, 2013). Esta técnica baseia-se em características apresentadas pelos micro-organismos, tais como ciclo de vida curto e a fácil adaptação ao meio externo, para, através de diversas manipulações, proporcionar a otimização da produção de metabólitos secundários (GROSS, 2007).

A produção de metabólitos secundários está diretamente relacionada a respostas específicas proporcionadas pelas diferentes condições ambientais a que os organismos se expõem. Desta forma, as vias de biossíntese podem ser ativadas ou até mesmo reguladas em consequência dos diferentes estímulos recebidos (BODE *et al.*, 2002; EL-AASAR, 2006; BILLS *et al.*, 2008).

A técnica OSMAC propõe variações das condições de cultura que podem ser relacionadas a parâmetros físicos ou químicos, como alterações nos valores de temperatura, salinidade, pH, radiação UV, taxa de aeração, variação dos componentes no meio de cultura, da concentração das fontes de nutrientes e adição de precursores e inibidores (RATEB *et al.*, 2011). De forma semelhante, a adição de um segundo micro-organismo também pode estimular a expressão de metabólitos bioativos. A fermentação do fungo marinho *Pestalotia sp.*, na presença de uma bactéria gram-negativa, levou ao isolamento da pestalona, uma nova benzofenona com potentes atividades antibióticas (GROSS, 2007).

A alteração sistemática nos parâmetros de cultivo, segundo a abordagem OSMAC, ocorrem de maneira aleatória, portanto não permitem a criação de regras que poderiam ser comuns a todos os micro-organismos, uma vez que cada organismo apresenta uma resposta particular por se tratar de um indivíduo diferente (BJORN *et al.*, 2002).

Usando esta técnica, Lin e colaboradores (2010) identificaram a partir do fungo *Spicaria elegans* a presença de novas e diversificadas citocalasinas (**56-61**), grupos de metabólitos secundários conhecidos por suas variadas atividades biológicas (agentes antibacterianos, antivirais, anti-inflamatórios e antitumorais) (FIG. 14).

Figura 14- Fórmulas estruturais das citocalasinas isoladas a partir do fungo *S. elegans*, sendo **56** a espicocalasina A e **57** a **61** uma classe de aspocalasinas

Neste sentido, estudos de otimização podem revelar o potencial biossintético de diferentes micro-organismos, através de investigações direcionadas para o aumento da diversidade estrutural, com produção de novos metabólitos secundários em decorrência da ativação de genes silenciosos (ASAI *et al.*, 2012).

### 1.5 Estatística aplicada a bioensaios

Métodos estatísticos são essenciais quando se deseja medir ou avaliar um experimento. As análises estatísticas possibilitam comparar amostras, tal como o rendimento de um determinado metabólito, obtido do cultivo fúngico em condições variadas; detectar variáveis interferentes e analisar as variáveis predominantes na resposta obtida no experimento (SOARES; SIQUEIRA, 2002).

As análises e interpretações dos dados experimentais estão ligadas principalmente aos cálculos que vão descrever os procedimentos realizados (RODRIGUES; LEMMA, 2009).

Muitos procedimentos de análise química, tais como CLAE, CG, IV, RMN, entre outros, fornecem uma grande quantidade de informações e o uso do método estatístico adequado pode desbloquear as informações contidas nestes dados analíticos. Nestes estudos deve-se levar em consideração o tipo de tratamento ou condição a ser imposta a uma determinada amostra, o número de vezes que o procedimento será repetido e a quantidade de variáveis envolvidas no processo (NETO *et al.*, 2006).

Para diminuir erros experimentais deve-se planejar como o procedimento será instalado e conduzido, por meio de um delineamento experimental (NETO *et al.*, 2006). Os dados obtidos devem ser analisados estatisticamente, de forma a se obter um nível de significância. A probabilidade dos resultados observados, devido aos diferentes tratamentos, ser devido aos fatores estudados e não ao acaso é representado pelo valor de  $p$ . A escolha do valor de  $p$  é arbitrária, mas usualmente utiliza-se  $p$

## *Referencial teórica*

---

= 0,05, ou seja, para que os dados sejam considerados significativos, estes devem apresentar no mínimo 95% de confiança (VIEIRA, 2006).

As análises estatísticas testam hipóteses que permitem ampliar as conclusões obtidas a partir dos resultados obtidos para os tratamentos. Normalmente são consideradas duas hipóteses: primeira, as médias dos tratamentos obtidos são iguais; segunda, as médias dos tratamentos realizados são diferentes. Para que uma hipótese possa ser aceita ou rejeitada, calcula-se a probabilidade de que ela ocorra, ou seja,  $p$  iguais indicam que os fatores estudados (fonte de carbono, agitação, etc) não influenciaram os resultados dentro do  $p$  adotado.

A ferramenta estatística denominada ANOVA é utilizada para análise de dados com objetivo de comparar mais do que dois grupos experimentais com relação a uma variável quantitativa. Através da ANOVA é possível verificar diferenças significativas entre as médias e a influência da modificação de determinados fatores em variáveis dependentes (BURKE, 1997). A comparação é realizada através do teste  $F$ , que consiste em se calcular a razão das variâncias amostrais e comparar com o valor  $F$  crítico tabelado para um determinado  $p$ . Se o  $F$  calculado for maior que o  $F$  crítico, deve-se rejeitar a hipótese de que as médias de tratamentos sejam iguais, o que significa que os fatores estudados (fonte de carbono, agitação, etc) influenciaram nos resultados dentro do valor de  $p$  adotado. Quando os cálculos são realizados em computadores, os programas calculam o  $p$  dos dados experimentais, de forma que não há necessidade de se recorrer à tabela  $F$ . Neste caso, se o  $p$  destes dados forem inferiores ao  $p$  adotado (0,05), rejeita-se a hipótese de as médias dos tratamentos serem iguais (VIEIRA, 2006).

Para que a análise ANOVA seja realizada, deve-se comparar a variação devido aos tratamentos com a variação devido ao acaso (resíduo). Para isso, alguns valores devem ser determinados, tais como:

Graus de liberdade (GL), de tratamentos (k-1), do total (n-1), do resíduo (n-k); k refere-se aos números de tratamentos; n refere-se a k multiplicado pela soma dos números de repetições de cada tratamento;

$C = (\sum \text{Total dos tratamentos})^2/n$ . A soma dos resultados das repetições de um mesmo tratamento constitui o total desse tratamento; o valor C é conhecido como correção;

$SQT = \sum \text{Total dos tratamentos}^2 - C$ . SQT refere-se à soma de quadrados total;

$SQTr = (\sum \text{Tratamento}^2 / \text{Número de repetições do tratamento}) - C$ . SQTr refere-se à soma de quadrados de tratamentos;

$SQR = SQT - SQTr$ . SQR refere-se a soma de quadrados de resíduo;

$QMTr = SQTr/(k-1)$ . QMTr refere-se ao quadrado médio de tratamentos;

$QMR = SQR/(n-1)$ . QMR refere-se ao quadrado médio de resíduo;



## *Referencial teórico*

$F = \text{QMTr}/\text{QMR}$ .

Os cálculos obtidos durante a análise de variância normalmente são resumidos em uma tabela (TAB. 1) que tem, como objetivo, permitir uma avaliação rápida e prática dos resultados (DANIEL, 1999).

Tabela 1-Modelo de tabela para análise de variância

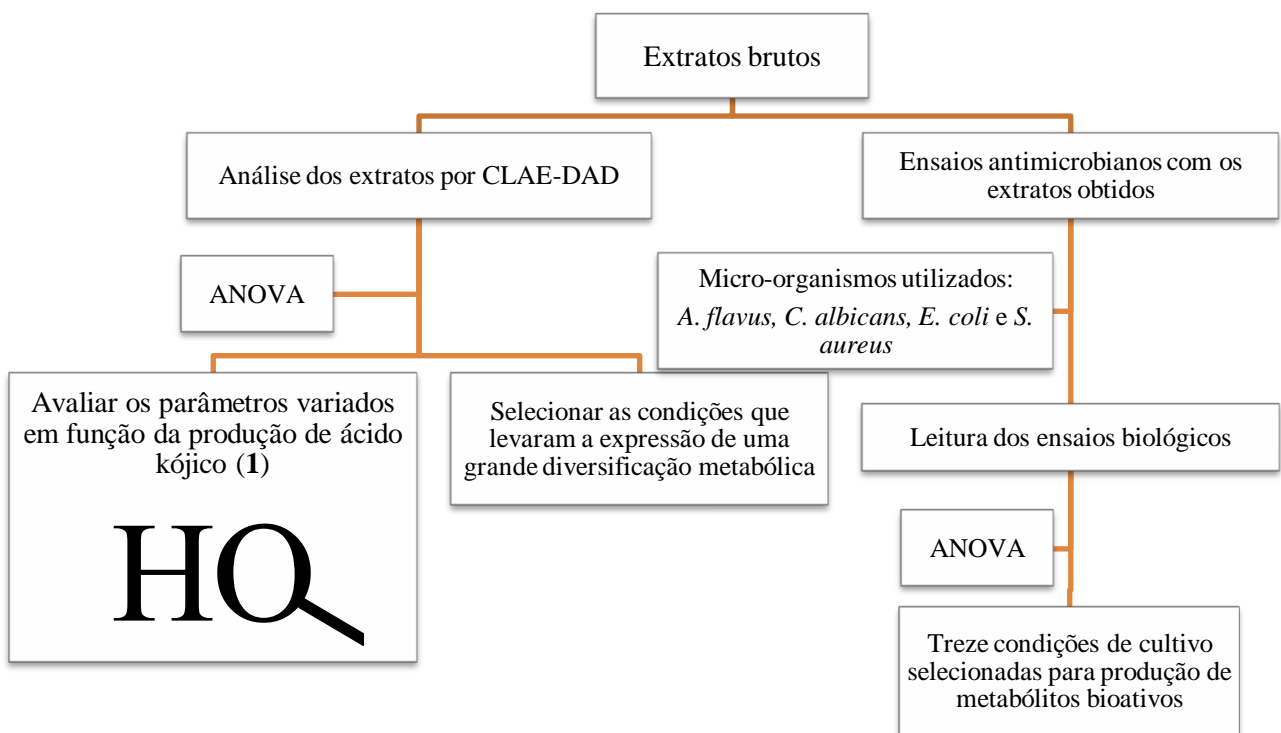
Causa de variação	Graus de Liberdade (GL)	Soma de quadrado total (SQ)	Quadrados médios (QM)	Teste $F$	$p$
Tratamentos	(k-1)	SQTr	QMTr	$F$	$p$
Resíduo	(n-k)	SQR	QMR		
Total	(n-1)	SQT			

Os tratamentos podem envolver dois ou mais fatores (fonte de carbono, agitação, etc). As diferentes categorias de um fator são denominadas níveis, ou seja no caso de um tratamento, cuja temperatura avaliada foi 30 e 70°C e a agitação foi de 0 e 150 rpm (rotações por minuto), cada fator mostrado apresenta dois níveis. Experimentos que apresentam dois ou mais níveis são chamados de fatoriais (VIEIRA, 2006).

## 2 OBJETIVOS

Esta parte do trabalho teve como objetivo a triagem de metabólitos secundários produzidos pelo fungo *A. parasiticus*, sob 120 condições de fermentação distintas. Desta forma, a triagem de metabólitos foi realizada sob três perspectivas, definição do melhor meio de cultura para produção de ácido kójico (51), para diversificação metabólica e para produção de substâncias bioativas, conforme esquema apresentado na FIG. 15.

Figura 15- Esquema da triagem de metabólitos secundários a partir do fungo *A. parasiticus*



### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A prospecção química do fungo *A. parasiticus* foi realizada anteriormente a partir do extrato obtido em meio LCS20, após 30 dias de cultivo sem agitação. O único metabólito isolado a partir do extrato obtido foi o ácido kójico (**51**), com um rendimento de 61,3 % m/m (BRACARENSE, 2008).

Desta forma, visando à aplicação da abordagem OSMAC, o fungo *A. parasiticus* foi submetido a fermentação sob diferentes condições experimentais. Os dados obtidos a partir destas condições foram analisados no intuito de encontrar processos fermentativos que propiciassem uma maior produção de ácido kójico (**51**), biossíntese de um maior número de metabólitos secundários e aumento da biossíntese de metabólitos bioativos.

O fungo *A. parasiticus* apresentou crescimento rápido e baixo índice de contaminação bacteriana, indicando a possibilidade de este micro-organismo produzir metabólitos secundários capazes de impedir a proliferação de bactérias e de outras espécies fúngicas. O cultivo se processou em meios distintos por 30 dias, com extrações realizadas de três em três dias, fornecendo 240 extratos, conforme delineamento experimental apresentado no item 4.8 (p.51). Observou-se a presença de cristais em alguns extratos brutos, desta forma pesaram-se 500 mg de um dos extratos, LCS150 (4.1, p. 46), na ausência de agitação, cultivado por 12 dias, afim de submetê-lo a um processo de recristalização. Os cristais obtidos apresentaram temperatura de fusão na faixa entre 151-152 °C (Lit 151 °C, EYONG *et al.*, 2012). Análises espectrométricas comparadas aos dados da literatura mostraram que estes cristais tratavam-se do metabólito secundário ácido kójico (**51**) (TAB. 2) (APÊNDICE A-B, p.155).

Tabela 2- Dados encontrados e descritos de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  ambos em  $\text{CD}_3\text{OD}$ , para o ácido kójico (**51**)

Nº	RMN de $^1\text{H}$ , $\delta$		RMN de $^{13}\text{C}$ , $\delta$	
	Encontrado (400 MHz)	Lit* (500 MHz)	Encontrado (100 MHz)	Lit* (125 MHz)
1	7,96	7,95	141,0	140,8
2	-	-	147,4	147,2
3	-	-	176,9	176,7
4	6,50	6,50	110,7	110,6
5	-	-	170,4	170,2
6	4,41	4,41	61,2	61,1

\* EYONG *et al.*, 2012

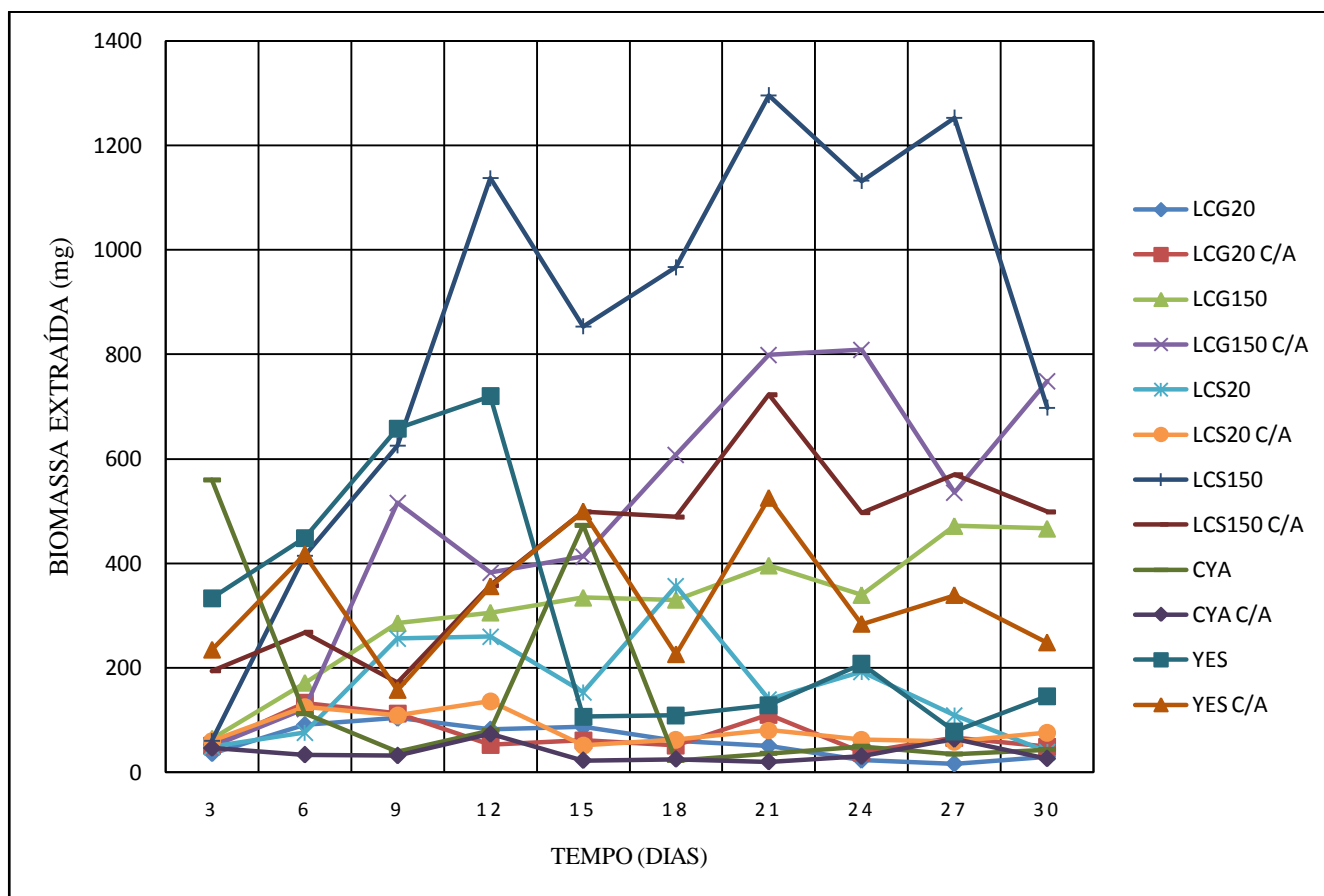
#### 3.1 Avaliação dos efeitos provocados pelas alterações nas condições de cultivo do fungo *A. parasiticus*

As condições de cultivo que o micro-organismo é submetido interferem diretamente na produção de biomassa, pH do meio e, principalmente, na produção de metabólitos secundários. A fonte e a concentração de carbono e nitrogênio estão diretamente ligadas à produção de substâncias bioativas (LAM, 2007).

Neste trabalho foram avaliadas 120 condições de cultivo distintas, nas quais foram variadas a aeração, o tempo de cultivo, o meio de cultura, a fonte de carbono e nitrogênio. Os experimentos foram realizados em duplicata e os extratos foram analisados individualmente por CLAE-DAD, a fim de se obterem informações sobre o perfil cromatográfico destas e sua relação com os efeitos provocados pelas alterações na fermentação do fungo *A. parasiticus*. Os cromatogramas obtidos por CLAE-DAD foram avaliados nos comprimentos de onda de 270 nm. Estes comprimentos foram selecionados por apresentarem o maior número de picos e melhor resolução.

Os extratos brutos foram pesados a fim de avaliar a influência dos tratamentos na produção de biomassa fúngica. A partir das médias das massas dos extratos traçaram-se curvas de variações da biomassa extraída (GRAF. 1). Estas mostram a proporção direta entre a massa em mg e o tempo de cultivo, nos diferentes tratamentos.

Gráfico 1- Curvas referentes à massas extraídas dos extratos LCG20, LCG150, LCS20, LCS150, YES e CYA (item 4.1, p. 46), ao decorrer de 30 dias



\*C/A - com agitação de 150 rpm.

Verificou-se que o meio de cultura influenciou significativamente na quantidade de biomassa produzida pelo fungo *A. parasiticus*. A maior quantidade de massa foi obtida a partir do cultivo no meio LCS150, na ausência de agitação por 21 dias ( $1296,4 \pm 28,4$  mg).

A utilização da sacarose em meios de cultura estimula o crescimento celular, devido à necessidade de este carboidrato ser decomposto em glicose e frutose antes de ser assimilado pelo micro-organismo. Desta maneira, a taxa de catabolismo é mais lenta quando comparada com adição de glicose. Geralmente, as fontes de carbono metabolizadas lentamente favorecem a produção de metabólitos secundários (JIAet al., 2009).

Muitos metabólitos com atividades biológicas importantes e de grande interesse econômico foram isolados com alto rendimento, a partir de micro-organismos fermentados em meios de cultura contendo sacarose como fonte de carbono. Dentre estes metabólitos destacam-se o ácido cítrico, conservante natural isolado a partir do *A. niger* (SOCCOLet al., 2006), a lovastatina, agente redutor de colesterol isolada a partir do *A. terreus* (JIAet al., 2009), fruto-oligossacarídeos, que promovem a integridade gastrointestinal, sendo utilizados na prevenção de cáries dentárias, redução dos níveis séricos de colesterol total e lipídeos isolados a partir de espécies de *Aspergillus* (DRIOUCHet al., 2010).

O meio de cultura CYA (contendo 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose), assim como o meio LCS20 (contendo 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose) apresentaram as menores quantidades de massa extraída em todos os tempos de cultivo. Esse fato indica que não só a presença de sacarose é importante para a produção de metabólitos mas, também, a concentração deste carboidrato no meio de cultura.

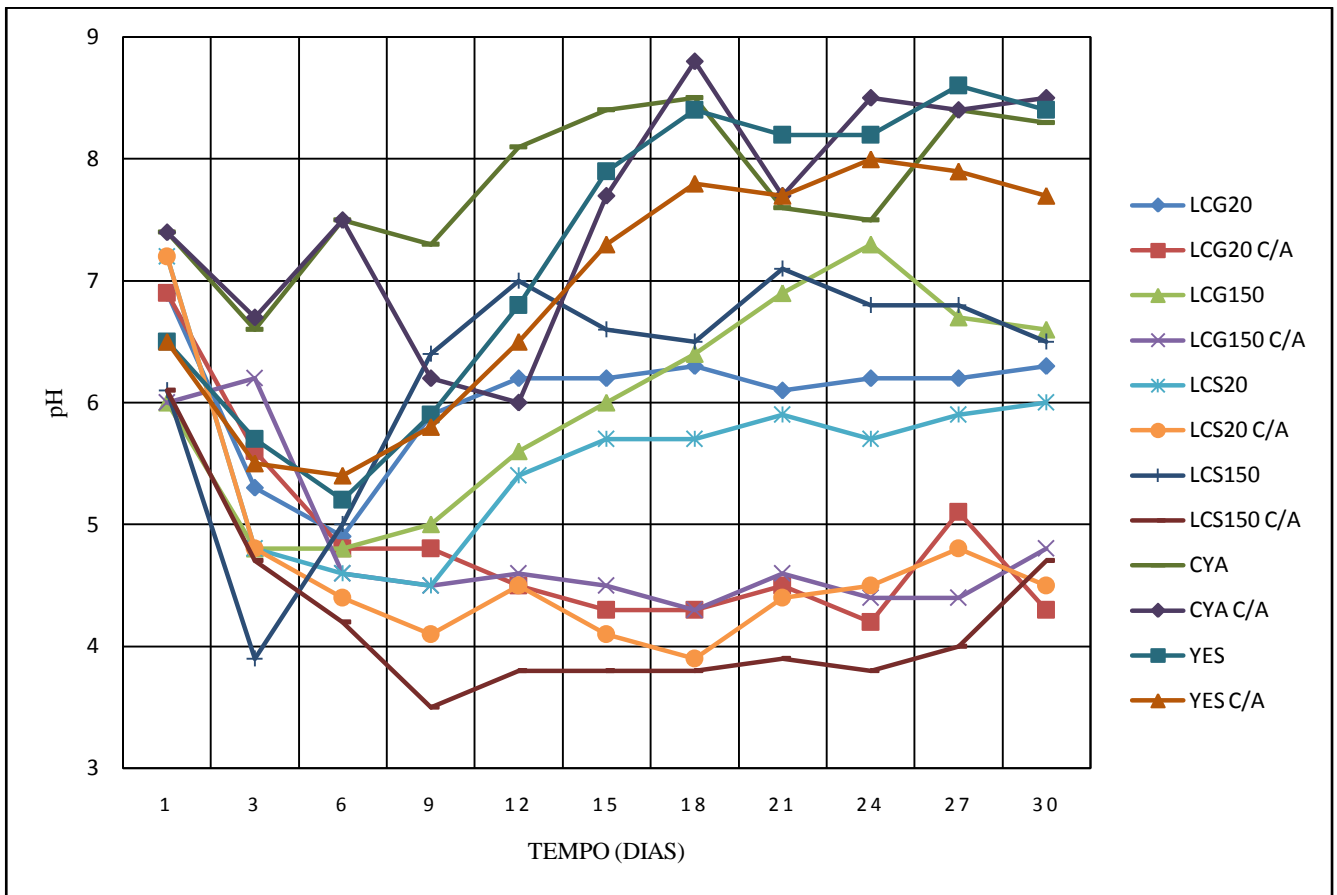
A aeração e a agitação podem ser benéficas para o desenvolvimento de células microbianas, uma vez que propiciam aumento da disponibilidade de oxigênio e transferência de calor, promovendo a homogeneização do sistema. A agitação foi importante quando se utilizou glicose como carboidrato, apresentando maior influência com 21-24 dias de cultivo. Este resultado indica que a disponibilidade de oxigênio, aliada à glicose como fonte de carbono, foi importante para a produção de metabólitos, comportamento não observado quando esta foi associada à sacarose como fonte de carbono. Este resultado confirma que *A. parasiticus* não foge à regra. Quando submetido a diversas condições de cultivo, produziu respostas distintas, em conformidade com a abordagem OSMAC, adotada a fim de propiciar diversificação dos perfis metabólitos a partir da utilização de componentes e técnicas distintas durante o processo fermentativo.

O pH é outro parâmetro de grande relevância na produção de metabólitos secundários. Alterações do pH interferem diretamente na solubilidade de algumas substâncias e, desta forma, comprometem a utilização das mesmas pelo micro-organismo, modificando o metabolismo fúngico (YANG *et al.*, 2003). Além disso, as enzimas desempenham suas funções em faixas ótimas de pH e temperatura, o que influencia a produção de metabólitos (EL-AASAR, 2006).

Uma importante característica apresentada por fungos do filo Ascomycota é a capacidade de apresentarem uma versatilidade fisiológica notável, característica que permite aos fungos deste filo crescer em uma vasta faixa de pH (2,5 a 10,5) (ESPESOL *et al.*, 1993).

O crescimento do fungo *A. parasiticus* nos meios LC (na ausência de agitação), CYA e YES proporcionou, nesses meios, um aumento do pH. Já a agitação dos experimentos utilizando o meio LC levou à diminuição do pH (GRAF. 2). A disponibilidade de oxigênio no meio de cultivo foi relatada como um dos fatores que contribuíram para produção de ácidos orgânicos, tais como ácido tacônico e ácido cítrico a partir do fungo *A. niger* (MOHAMAD *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2013). Tal fato está em conformidade com os resultados obtidos, indicando que a aeração, combinada com os constituintes do meio LC, foram fatores determinantes na diminuição do pH pelo fungo (LI *et al.*, 2013).

Gráfico 2- Curvas referente às variações médias de pH dos meios de cultivo LCG20, LCG150, LCS20, LCS150, YES e CYA (item 4.1, p. 46), ao decorrer de 30 dias



\*C/A - com agitação de 150 rpm.

A produção de metabólitos secundários por uma espécie fúngica específica está atrelada aos fatores que afetam a rota metabólica deste micro-organismo (IMHOFF *et al.*, 2011). O número de metabólitos presentes nos extratos brutos de *A. parasiticus* foi determinado a partir de relatórios de picos e cromatogramas gerados pelo programa CLASS LC10 PROGRAM durante as análises por CLAE-DAD (TAB. 3).

Tabela 3- Número médio de metabólitos observados através do relatório de picos gerado pelo programa CLASS LC10 PROGRAM durante as análises por CLAE-DAD dos extratos brutos do fungo *A. parasiticus* cultivados nos meios LC (LCG20, LCG150, LCS20 e LCS150), CYA e YES

T <sub>cultivo</sub> (dias)	LCG20		LCG150		LCS20		LCS150		CYA		YES	
	Agitação (rpm)		Agitação (rpm)		Agitação (rpm)		Agitação (rpm)		Agitação (rpm)		Agitação (rpm)	
	0	150	0	150	0	150	0	150	0	150	0	150
3	9	4	9	5	9	12	7	4	5	8	6	14
6	7	2	8	11	9	5	6	3	5	9	8	5

## Resultados e discussão

---

9	5	4	5	7	6	5	4	2	10	12	7	7
12	7	10	5	5	5	8	4	2	16	7	8	11
15	7	8	4	6	6	13	3	3	10	10	10	7
18	5	10	4	3	7	10	3	2	14	10	14	13
21	6	12	3	4	7	10	5	3	8	10	20	9
24	7	12	4	5	7	6	3	4	12	9	14	11
27	12	11	4	5	8	11	4	3	14	10	21	6
30	9	7	5	3	8	14	4	6	12	8	17	9

---

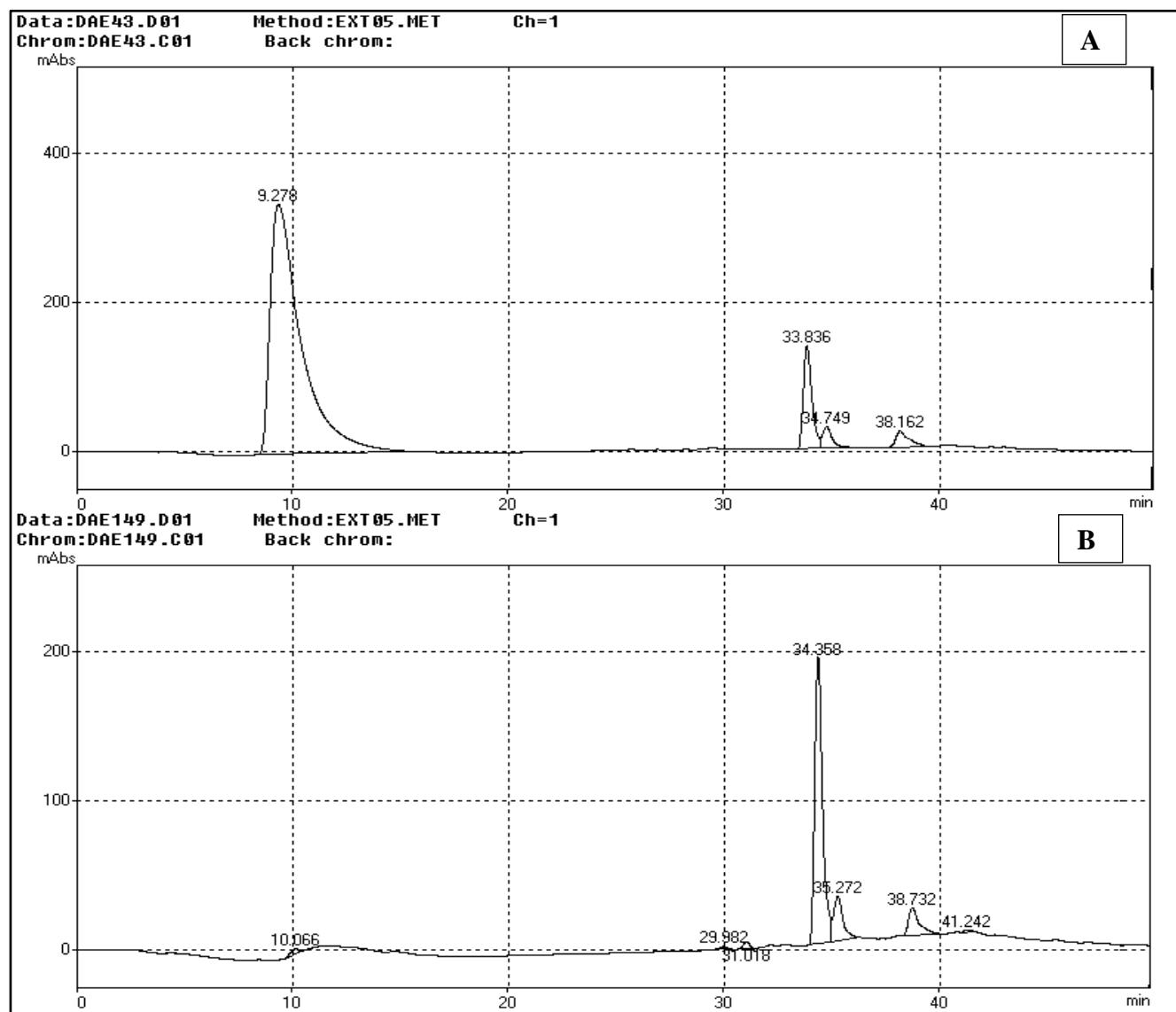
T<sub>cultivo</sub>= tempo de cultivo fúngico.

Por meio da análise dos cromatogramas, foi possível verificar que as alterações realizadas no processo fermentativo levaram a uma produção diferenciada de metabólitos secundários, modificando o perfil cromatográfico dos extratos, conforme apresentado nas FIGs 16-19 (p. 25). Os cromatogramas obtidos por CLAE-DAD foram avaliados no comprimento de onda de 270 nm. Este comprimento foi selecionado por apresentar o maior número de picos e melhor resolução.

Os cromatogramas apresentados na FIG. 16 (p.25) foram obtidos a partir de extratos fúngicos provenientes dos meios de cultivo LCG20 (A) e LCS150 (B), compostos por diferentes fontes de carbono, glicose e sacarose respectivamente. O extrato obtido a partir do meio de cultivo LCG20 produziu um metabólito com tempo de retenção de 9,28 min (FIG. 16-A, p. 25), não detectado no extrato obtido a partir do meio de cultivo LCS150 (FIG. 16-B, p. 25). O catabolismo dos microorganismos quando submetidos a uma fonte de carbono como a sacarose é mais lento quando comparado com um monossacarídeo (glicose) (JIA *et al.*, 2009). Desta maneira foi possível observar que, em um curto período de tempo a glicose foi metabolizada antes da sacarose, mesmo esta última estando em alta concentração. Pimenta e colaboradores (2010) avaliaram a produção de metabólitos secundários por fungos do gênero *Penicillium* por um período de 7 e 14 dias, utilizando meio de cultivo contendo glicose como fonte de carbono. Estes também detectaram, por CLAE, a formação de diferentes metabólitos secundários com o menor tempo de cultivo avaliado.

Figura 16- Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD em comprimento de onda de 270 nm, referentes ao extrato fúngico proveniente do cultivo nos meios LCG20(A) e LCS150 (B). A fermentação foi conduzida sob agitação de 150 rpm por 3 dias

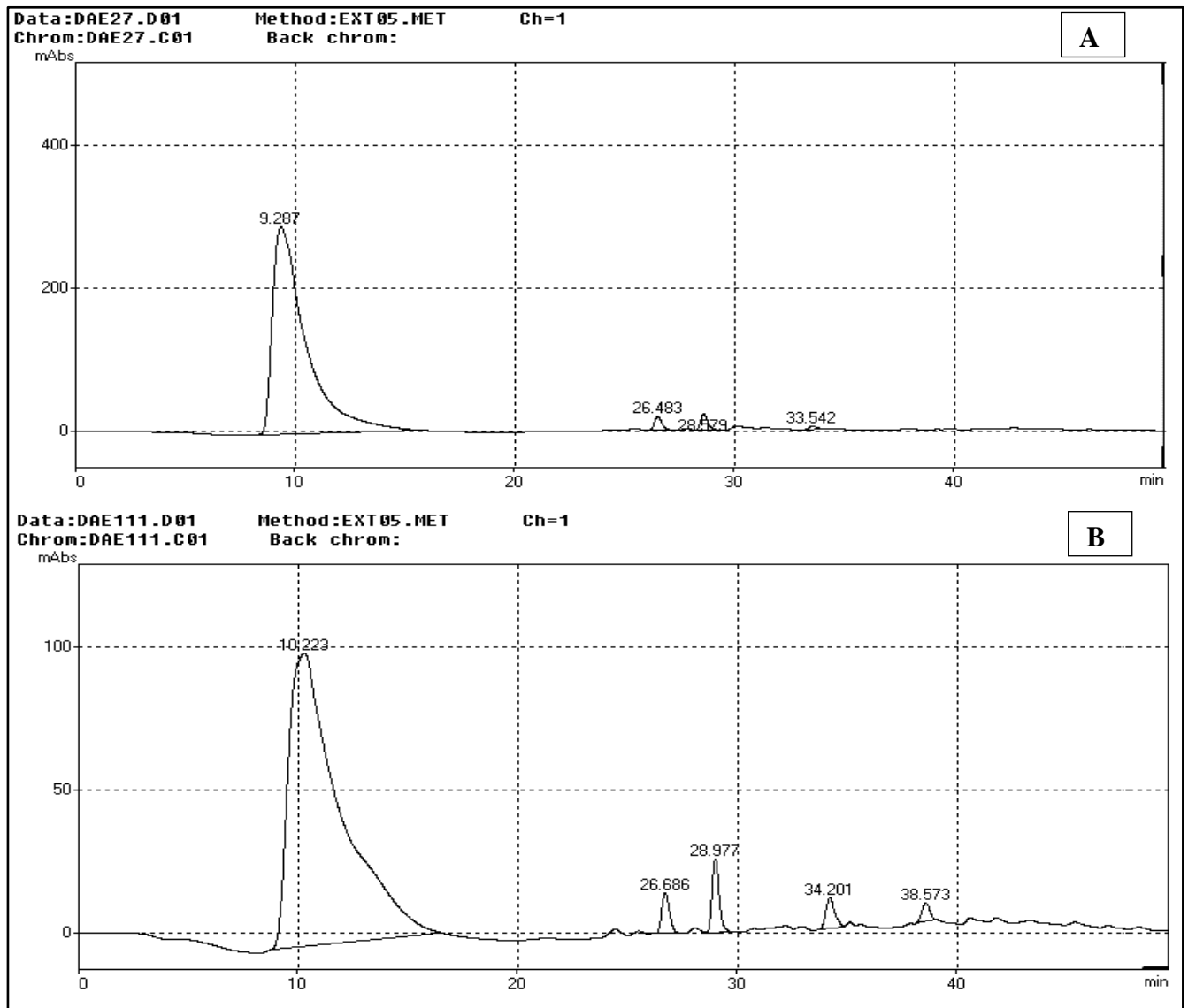




Porém, quando os extratos obtidos a partir dos meios LCG20 e LCS20, após 18 dias de fermentação, foram analisados (FIG. 17, p. 26), o extrato proveniente do meio de cultivo composto por sacarose apresentou maior produção de metabólitos secundários com tempos de retenção de 10,22; 26,69; 28,98; 34,20; 38,57 min (FIG. 17-B). Desta forma, concluiu-se que a utilização da glicose como fonte de carbono nos meios de cultivo proporcionou maior produção de metabólitos secundários em fermentações realizadas em curtos períodos quando comparada com o uso da sacarose (FIG. 16, p. 25), e esta proporciona maior produção de metabólitos em períodos de fermentação mais longos (FIG. 17).

Figura 17- Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD em comprimento de onda de 270 nm, referentes ao extrato fúngico proveniente do cultivo nos meios LCG20(A) e LCS20 (B). A fermentação foi conduzida na ausência de agitação por 18 dias

## Resultados e discussão

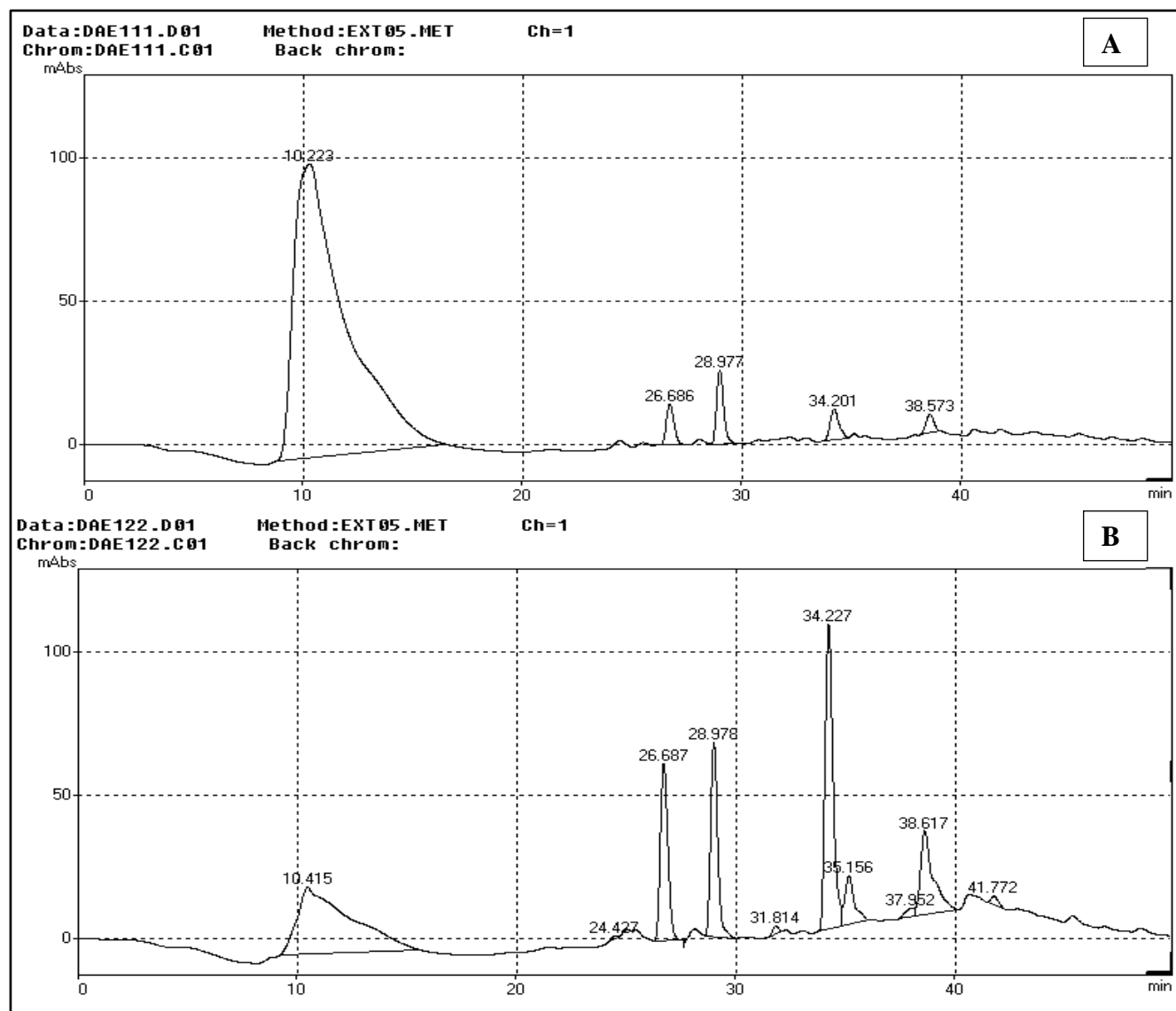


Ao analisar a produção de metabólitos secundários a partir de extratos provenientes de cultivos sem aeração, deve-se levar em consideração que os meios de cultura após esterilização apresentam baixo teor de oxigênio. Desta forma, ao se inocular o micro-organismo no meio de cultura, este tende a crescer na superfície para captar oxigênio diretamente do ar (CARLILE *et al.*, 2004). A aeração do meio de cultura aumenta a disponibilidade de oxigênio e, em consequência, ocorre aumentada biomassa micelial e do metabolismo fúngico (KIM *et al.*, 2003).

Os cromatogramas obtidos por CLAE exibidos na FIG. 18 foram obtidos a partir de extratos, provenientes de cultivos no meio LCS20, com e sem aeração. Ao observar os cromatogramas, constatou-se que a agitação proporcionou maior produção metabólica conforme proposto por Kim e colaboradores (2003).

## Resultados e discussão

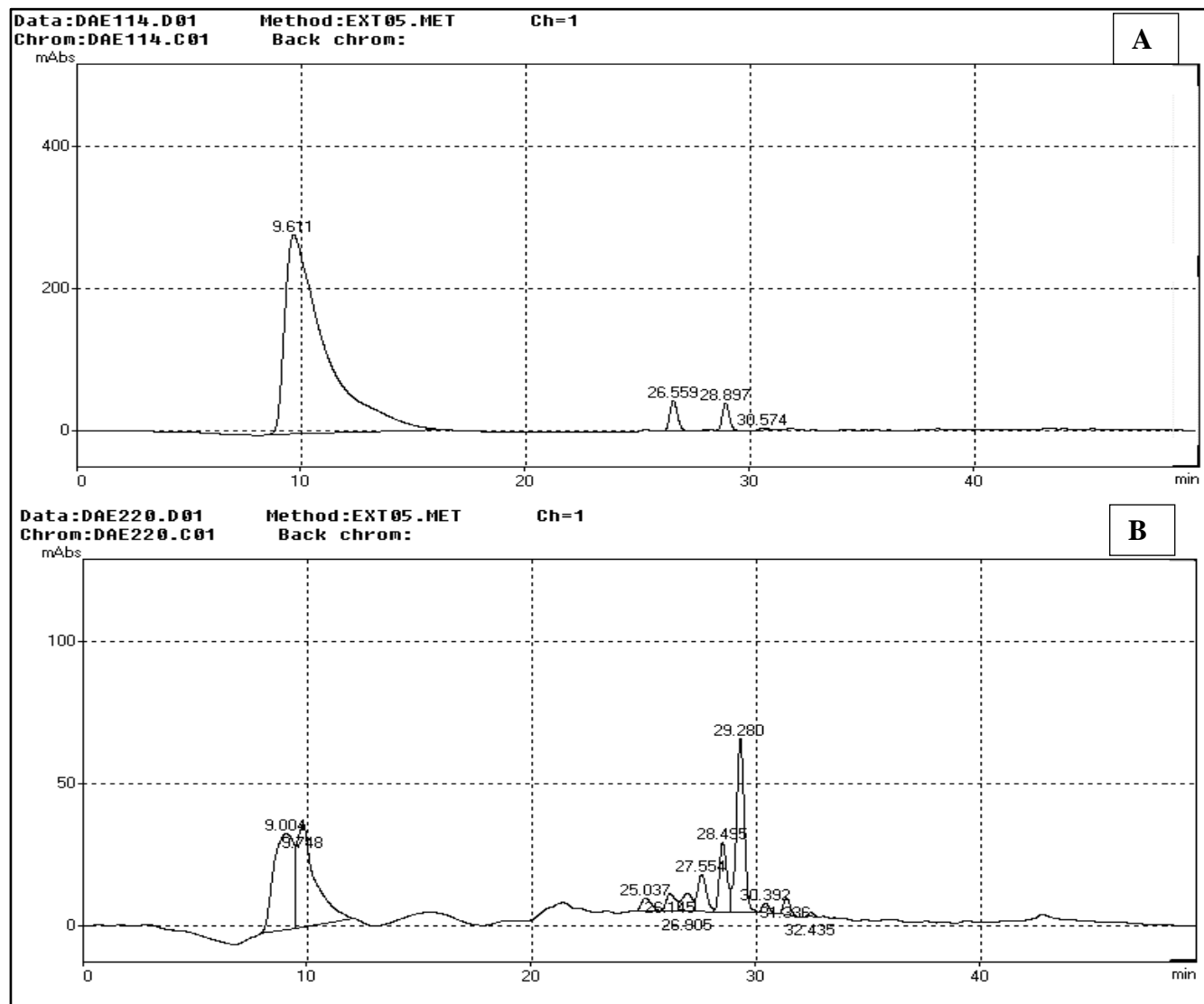
Figura 18- Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD em comprimento de onda de 270 nm, referente ao extrato fúngico proveniente do meio de cultivo LCS20 sem agitação(A) e com agitação de 150 rpm (B). A fermentação foi conduzida por 18 dias



O nitrogênio, assim como o carbono, representa um importante nutriente para os micro-organismos. As fontes orgânicas de nitrogênio foram relatadas como melhores para produção de metabólitos secundários quando comparadas com as fontes inorgânicas (MOHAMAD *et al.*, 2010). As fontes de nitrogênio utilizadas neste trabalho foram orgânicas (peptona, extrato de malte e extrato de levedura). O extrato de malte tem sido relatado como uma fonte melhor para produção de metabólitos quando comparado com a peptona em fungos do gênero *Aspergillus* (EL-AASAR, 2006).

Com 27 dias de cultivo na ausência de agitação verificou-se maior produção de metabólitos no meio de cultura YES, demonstrando a superioridade do extrato de malte (FIG. 19-B) em relação a peptona (FIG. 19-A) como fonte de nitrogênio para produção de metabólitos por *A. parasiticus*.

Figura 19- Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD em comprimento de onda de 270 nm, referentes aos extratos fúngicos provenientes do cultivo nos meios LCS20 (A) e YES (B). A fermentação foi conduzida por 27 dias, sem agitação



### 3.2 Otimização da produção de ácido kójico (51) por *A. parasiticus*

Experimentos realizados por Bentley (2006) com três cepas de *A. oryzae-flavus* e sete cepas de *A. oryzae*, nos quais foi utilizada glicose (62), com um carbono do anel pirano marcado com o isótopo radioativo natural  $^{14}\text{C}$ , mostraram que o ácido kójico (51) produzido pelos fungos apresentou a mesma quantidade de carbonos marcados que a glicose (62). Estes resultados indicaram a existência de uma rota biossintética de conversão direta da glicose(62)em ácido kójico (51), sem que seja necessária a quebra do anel pirano, conforme pode ser visualizado na Equação 2(BENTLEY, 2006).

Equação 2-Proposta de biossíntese do ácido kójico (51), utilizando glicose (62) como fonte de carbono

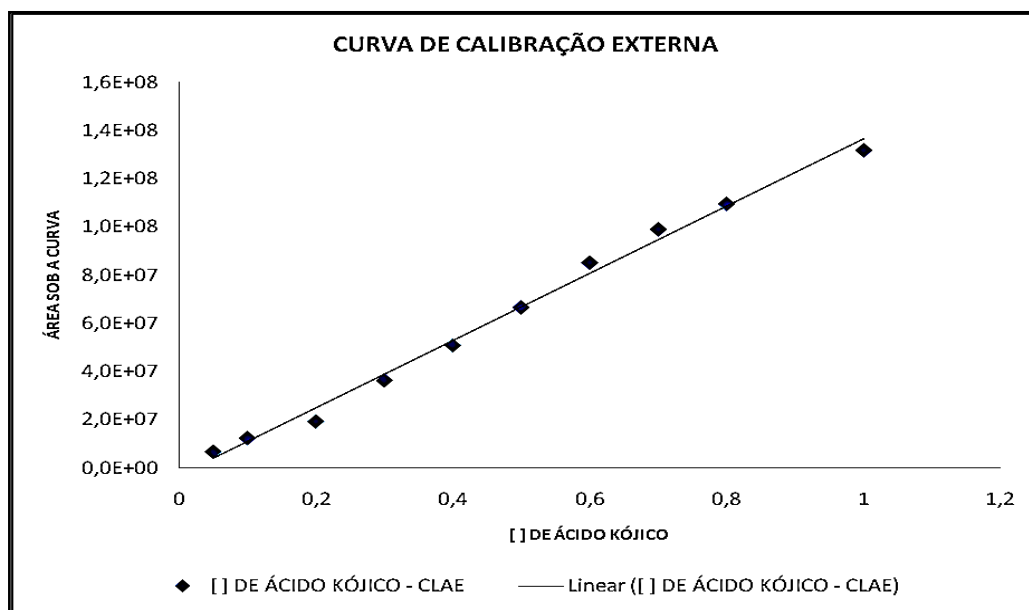
Visto que esta rota biossintética do ácido kójico (**51**) parte da glicose (**62**), a quantidade deste reagente disponível no meio pode afetar qualitativa e quantitativamente a produção de ácido kójico (**51**). Este efeito foi estudado pela substituição da glicose (**62**) pela sacarose (**63**) em alguns experimentos. A conversão de **63** em **62** pela ação da enzima invertase é mostrada na Equação 3.

Equação 3- Conversão da sacarose (**63**) em D-glicose (**62**) e D-frutose (**64**) catalisada pela enzima invertase

O ácido kójico (**51**) foi identificado nos extratos a partir da comparação do tempo de retenção observado no cromatograma (9,28 min) e do espectro no ultravioleta armazenados no aplicativo Class LC-10, com os picos dos cromatogramas dos extratos fúngicos, no comprimento de onda de 270 nm.

A porcentagem de ácido kójico (**51**) presente nos extratos foi determinada utilizando o método de padronização externa. A curva de calibração construída pode ser visualizada no GRAF. 3 (p.30). O procedimento de ajuste da reta foi realizado pelo método de regressão linear. A equação da reta determinada foi  $y=139.419.507,07x - 2.992.550,64$  e o coeficiente de correlação  $r^2 = 0,99$ .

Gráfico 3- Curva de calibração obtida a partir da relação entre área sob a curva dos picos presentes nos cromatogramas e concentração ([ ]) de ácido kójico (**51**) em  $\text{mg mL}^{-1}$



Uma vez quantificado o rendimento de ácido kójico (51) nos extratos, realizaram-se cálculos estatísticos (item 4.8, p.51), a fim de determinar a melhor condição de cultivo para sua produção. Os tempos de cultivo, nos quais as interações entre as variáveis (tipo de meio de cultura e agitação) apresentaram influência na produção de ácido kójico (51), estão representados na TAB. 4.

Tabela 4- Tempos de cultivo, interações entre as variáveis que apresentaram influência significativa ( $p \leq 0,05$ ), melhor condição encontrada para o cultivo e porcentagem de ácido kójico (51) determinada no extrato

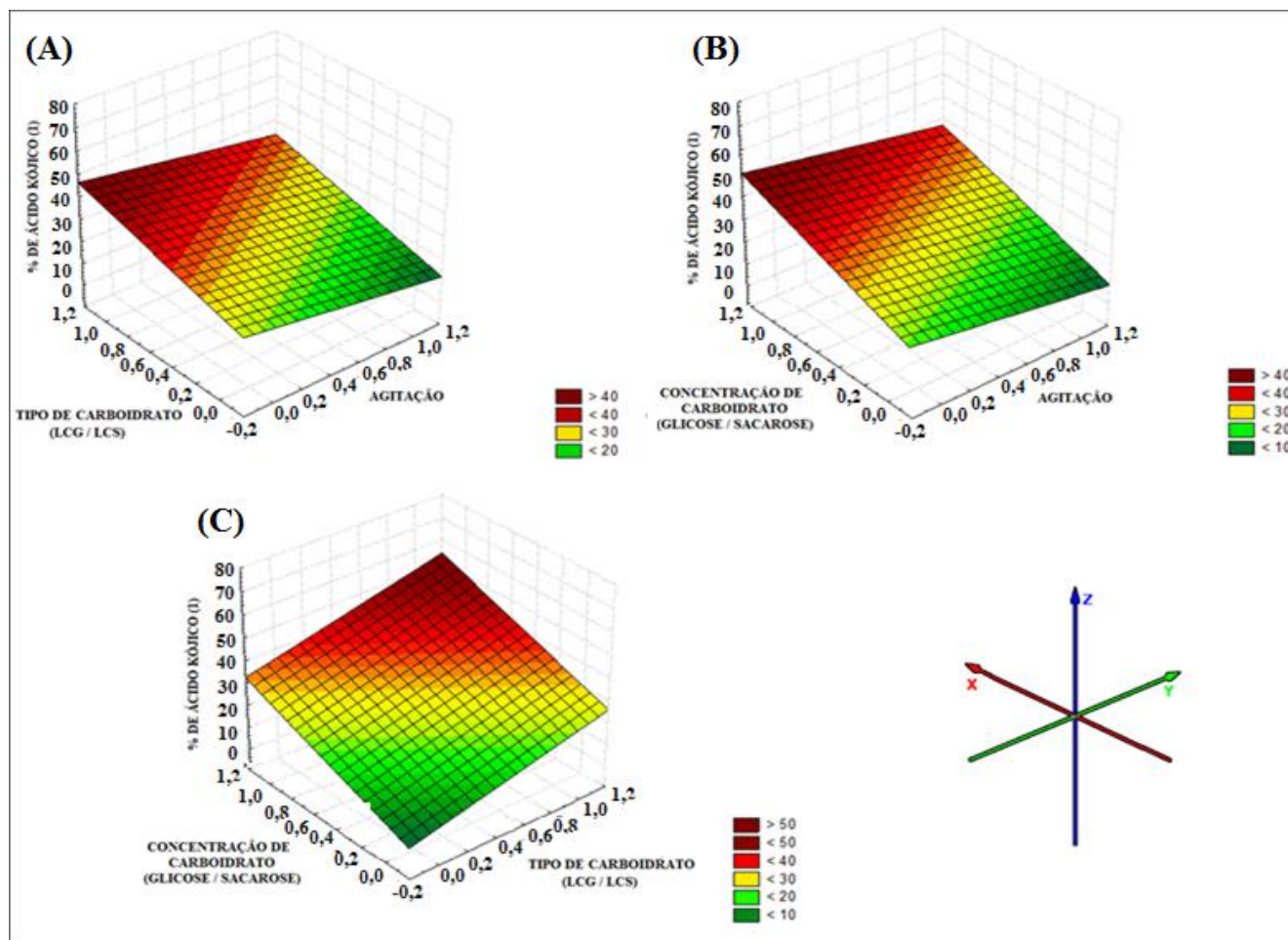
Tempo de cultivo (dias)	Interação estudada	Melhor condição encontrada	Ácido kójico (%)	Códigos
6	Agitação x Meio (CYA / YES)	YES sem agitação	61,4	PAK01
12	Agitação x concentração do carboidrato x Meio (LCS / LCG)	LCS150 sem agitação	65,4	PAK02
15	Concentração do carboidrato x Meio (LCG / LCS)	LCS150 sem agitação	65,2	PAK03
		LCS150 com agitação	46,6	PAK04
30	Agitação x Meio (LCG / LCS)	LCG20 sem agitação	16,6	PAK05
		LCG150 sem agitação	46,9	PAK06

Para as interações que apresentaram resultados significativos foram traçados gráficos de superfície de resposta referentes à alterações realizadas nas condições de cultivo, a fim de analisar o efeito destas sobre a produção de ácido kójico (51) nos diferentes extratos fúngicos obtidos (APÊNDICE C-E, p. 156-157), conforme metodologia descrita no item 4.8 (p. 51).

## Resultados e discussão

A FIG. 20 apresenta gráficos de superfície de resposta para o planejamento fatorial  $2^3$ , no qual as interações entre a fonte de carbono utilizada *versus* agitação (GRAF. A), a concentração do carboidrato *versus* agitação (GRAF. B) e a concentração do carboidrato *versus* o tipo de carboidrato (GRÁF. C), em cultivos processados em 12 dias, apresentaram resultados significativos.

Figura 20- Gráficos de superfície de resposta para a porcentagem de ácido kójico (51) produzida em 12 dias de cultivo em função das variáveis agitação, tipo de carboidrato e concentração



Observou-se que, a produção de ácido kójico (51) é crescente no sentido da coloração verde-vermelha visualizadas nos gráficos de superfície de resposta (FIG. 20), sendo a produção de ácido kójico (51) indicada nas legendas com as respectivas colorações. Os valores máximos referentes aos eixos Y e X, foram previamente selecionados a partir do planejamento fatorial  $2^3$ , conforme pode ser visualizado na TAB. 8 (p. 51). Observou-se ainda que, no gráfico A (FIG. 20, p. 31) quando a sacarose (valores altos para o eixo X) foi utilizada em cultivos na ausência de agitação (valores baixos para o eixo Y), houve um aumento na produção de ácido kójico (51), já o gráfico B (FIG. 20, p. 31) indicou que os carboidratos presentes no meio de cultivo devem apresentar altas concentrações

(valores altos para o eixo X) para maximizar a produção de ácido kójico (51). Através do gráfico C (FIG. 20, p. 31) foi possível verificar que a produção de ácido kójico (51) foi favorecida quando empregou-se sacarose em altas concentrações (valores altos para o eixo Y e X). Portanto, os melhores rendimentos de ácido kójico (51) no tempo de 12 dias devem associar altas concentrações de sacarose à ausência de agitação, situação descrita pela condição PAK02 (TAB. 4, p. 30). A glicose é essencial para a produção do ácido kójico (51) (EL-AASAR, 2006; BENTLEY, 2006) e realmente o meio de cultura LCS disponibiliza maior quantidade de glicose (a partir da hidrólise da sacarose) para o fungo.

Entre os meios de cultura avaliados (YES, CYA e LC) pode-se concluir que o melhor meio para a produção de ácido kójico (51) foi o meio LCS150 (65,4 % de rendimento m/m), descrito pela condição PAK02 (TAB. 4, p. 30). Todos os meios de cultivo que apresentaram produção de ácido kójico (51) superior a 60 %, empregaram sacarose (alta concentração - 150 g L<sup>-1</sup>) como fonte de carbono, sem aeração durante a fermentação. Não foi constatada produção de ácido kójico (51) na maioria dos extratos obtidos quando se empregou o meio de cultura CYA, o que está em conformidade com os dados da literatura, que indicam uma produção ótima deste metabólito em um faixa de pH entre 2-7 (MOHAMAD *et al.*, 2010). Conforme pode ser visualizado no GRAF. 2 (p. 23), o meio de cultivo CYA, tanto na ausência quanto na presença de agitação, apresentou pH > 7 durante a maioria dos tempos de cultivo.

Utilizando *A. parasiticus* El-Aasar, em 2006 obteve o melhor rendimento (34,4 g L<sup>-1</sup>) na produção de ácido kójico (51), empregando glicose em detrimento da sacarose, e extrato de malte em detrimento da peptona, na presença de agitação. No presente estudo, a utilização de peptona como fonte de nitrogênio mostrou-se mais eficiente que a utilização de extrato de levedura e extrato de malte. Dentre os meios com melhor rendimento (>60%) o meio YES, em que se utilizou extrato de malte como fonte de nitrogênio, apresentou a menor produção de ácido kójico (51) (61,4 %), conforme pode ser visualizado na TAB. 4 (p. 30).

O melhor rendimento de ácido kójico (51) alcançado neste trabalho foi aproximadamente 65 % m/m, superior ao rendimento encontrado, aproximadamente 1 %, por Kharchenko e Kuts (1999) na produção deste composto a partir de espécies de *Aspergillus*, utilizando grãos como meio de cultivo. Alguns trabalhos relatam excelentes rendimentos em g L<sup>-1</sup>, aproximadamente 40 g L<sup>-1</sup> (WAN *et al.*, 2005; EL-AASAR, 2006; ROSFARIZAN; ARIFF, 2007; MOHAMAD *et al.*, 2010; FERREIRA *et al.*, 2010). Porém nestes casos, o meio foi analisado como um todo, enquanto que, no presente trabalho, o ácido kójico (51) foi quantificado apenas na fase orgânica. Sendo o ácido kójico

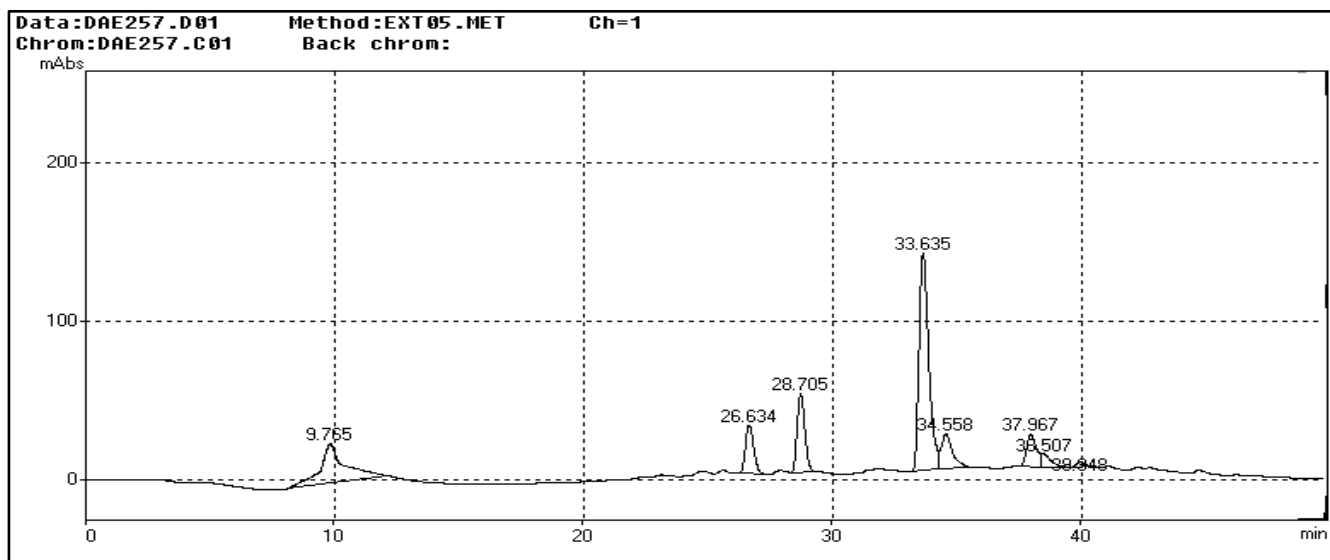


(51) solúvel em água, é de se esperar que o rendimento obtido para este metabólito tenha sido subestimado no presente trabalho ( $7,4 \text{ g L}^{-1}$ ).

### 3.3 Otimização das condições de fermentação para diversificação metabólica pelo fungo *A. parasiticus*.

Foram feitos experimentos para estimular *A. parasiticus* desenvolver uma diversificação metabólica ao invés de produzir somente ácido kójico (51) em grande quantidade. De fato, as alterações realizadas durante a fermentação, tais como tipo de meio, concentração de carboidrato e aeração, induziram um aumento da produção de metabólitos secundários, conforme foi apresentado na TAB. 3 (p. 24). A variedade de metabólitos produzidos foi associada ao número de picos detectados nos relatórios dos cromatogramas, uma vez que na maioria das vezes diferentes compostos apresentam diferentes tempos de retenção (TR). Dentre os metabólitos secundários identificados nos extratos, aqueles correspondentes aos tempos de retenção de 26,63 (M1); 28,71 (M2) e 33,64 (M3) min foram detectados em praticamente todas as condições de cultivo e apresentaram alto rendimento sempre que o ácido kójico (51) (TR = 9,28 min) estava em baixa concentração ou ausente (FIG. 21).

Figura 21- Cromatograma obtido por CLAE-DAD em comprimento de onda de 270 nm, referente ao extrato fúngico proveniente do meio de cultivo LCG20, no qual a fermentação foi conduzida por 12 dias sob agitação de 150 rpm

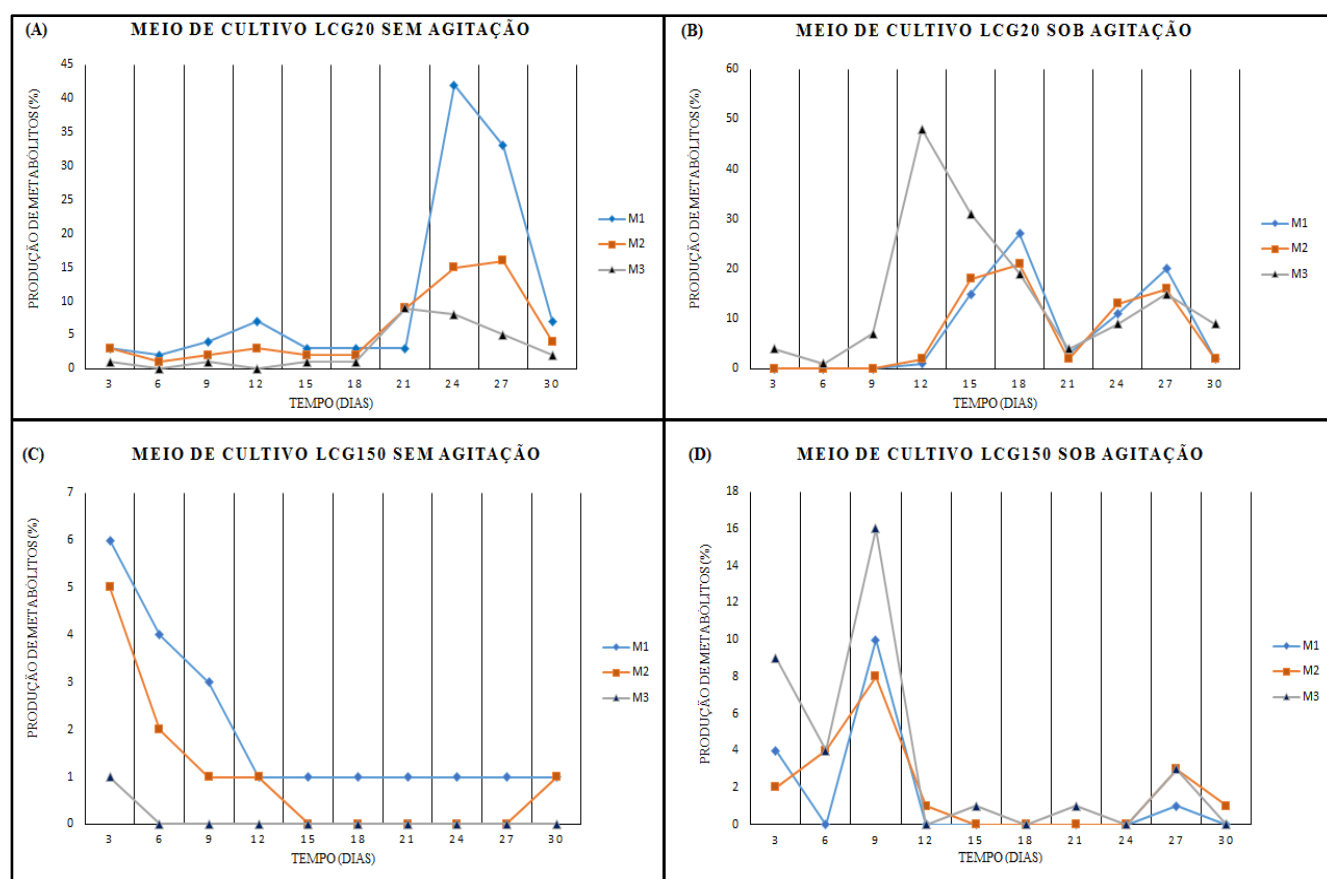


Ao analisar os gráficos (FIG. 22, p. 34) pode-se observar que o metabólito M1 foi produzido em maior quantidade quando se utilizou glicose na concentração de  $20 \text{ g L}^{-1}$  (LCG20) e tempo de fermentação entre 21 e 30 dias, na ausência de agitação (FIG 22- A). Este resultado não foi observado

## Resultados e discussão

quando o meio de cultivo foi submetido a uma agitação de 150 rpm, no qual o metabólito M3 alcançou maior rendimento entre nove e 15 dias de fermentação (FIG 22- B). Estes dados indicam que a biossíntese de M3 está diretamente relacionada à disponibilidade de oxigênio, fato que também pode ser observado na FIG 22- D, na qual sob agitação e na presença de maior concentração de glicose (LCG150), os três metabólitos foram produzidos em maior quantidade entre seis e 12 dias de cultivo. Ao se combinar as condições de cultivo, ausência de agitação e concentração alta de glicose (150 g L<sup>-1</sup>), a produção de ácido kójico (**51**) foi favorecida (PK06 - TAB. 4, p. 30), inibindo a produção dos metabólitos M1, M2 e M3 (FIG. 22- D).

Figura 22- Gráficos referentes à produção dos metabólitos M1, M2 e M3 em função do tempo de cultivo, quando se empregou o meio LCG

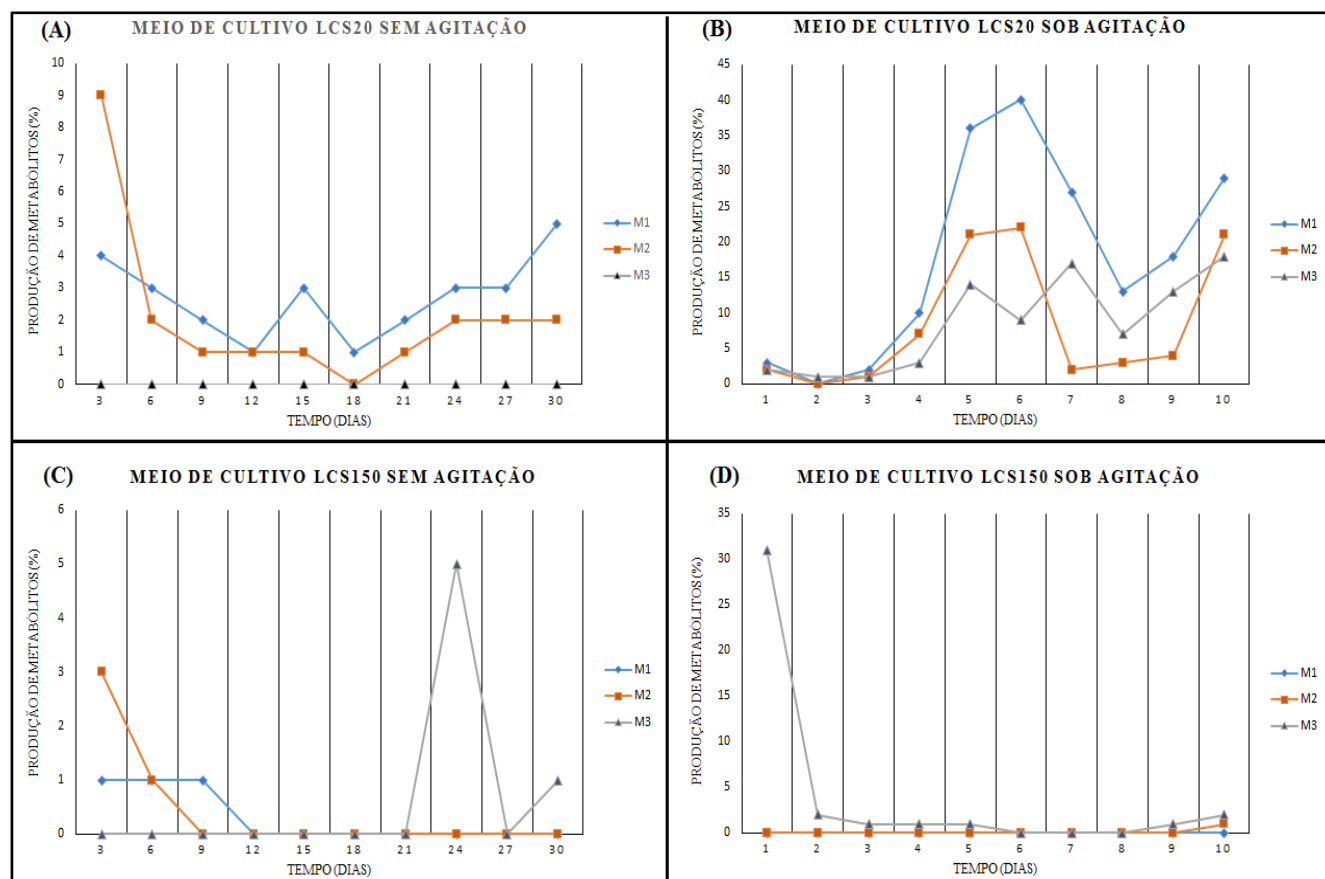


Ao alterar a fonte de carbono disponível no meio de cultivo, de glicose para sacarose, foi possível observar uma alteração na biossíntese dos metabólitos (M1, M2 e M3) (FIG. 23, p. 35). As maiores produções de ácido kójico (**51**) foram alcançadas em meios de cultura contendo sacarose como fonte de carbono (TAB. 4, p. 30). Desta forma, os meios de cultivo que apresentam maior disponibilidade desta fonte vão proporcionar maior produção do ácido kójico (**51**) em detrimento da

## Resultados e discussão

diversificação metabólica (FIG 23). Este fato pode ser observado na FIG. 23- B, no qual a maior produção dos metabólitos M1, M2 e M3, foi alcançada quando se utilizou uma concentração baixa de sacarose (20 g L<sup>-1</sup>) sob agitação, condição não avaliada como ótima para produção de ácido kójico (51).

Figura 23- Gráficos referentes à produção dos metabólitos M1, M2 e M3 em função do tempo de cultivo, quando se empregou o meio LCS



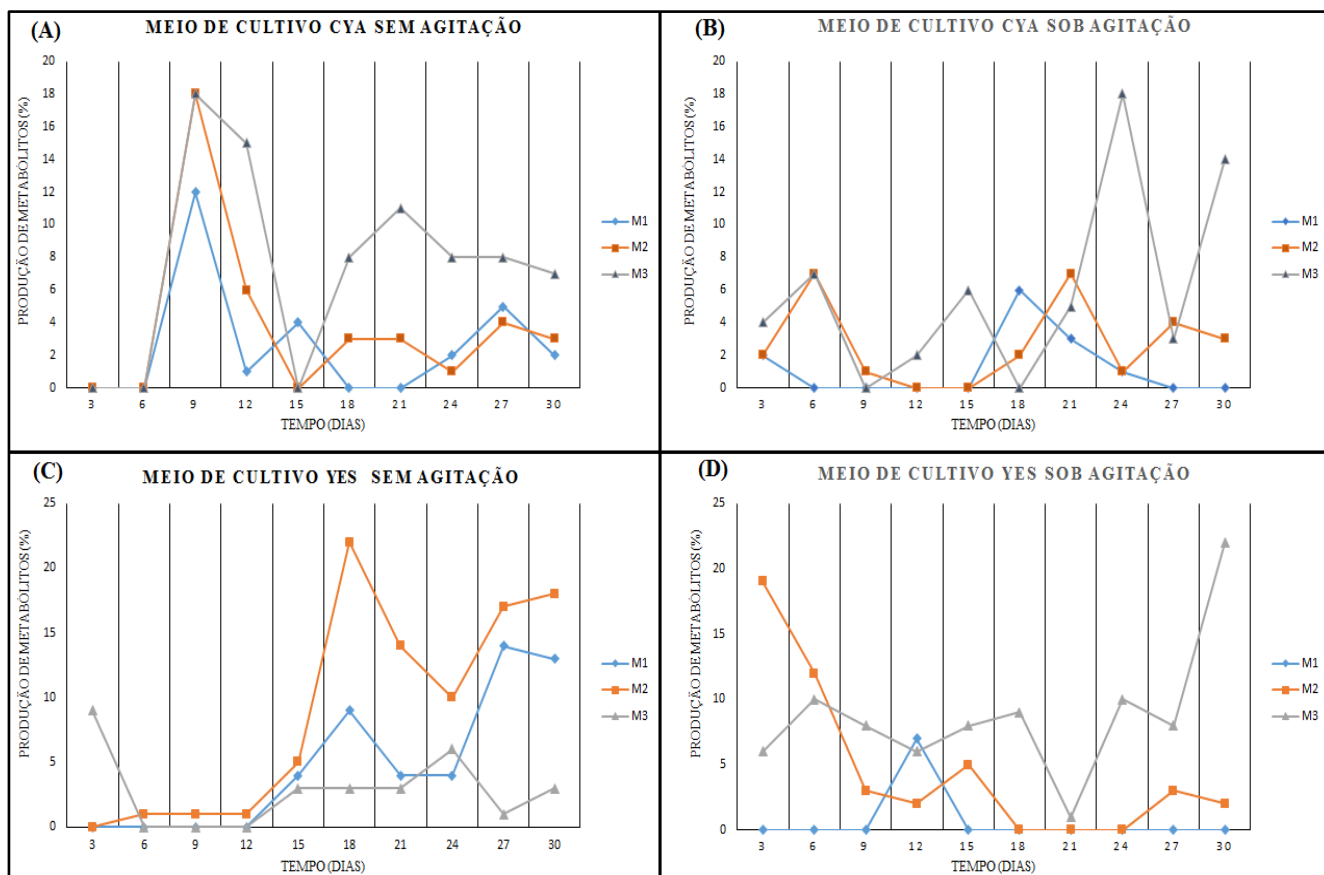
A biossíntese do metabólito M2 foi melhor avaliada quando o *A. parasiticus* foi cultivado nos meios de cultura CYA e YES, nos quais empregaram-se extrato de levedura e extrato de malte como fontes de nitrogênio respectivamente, indicando que estas fontes estão diretamente relacionadas à produção deste metabólito (FIG. 24, p. 36). Nos meios de cultivo CYA e YES foi possível observar uma produção significativa dos metabólitos M1, M2 e M3, em todas as condições de aeração analisadas, no qual esta produção se mostrou dependente do tempo de cultivo (FIG. 24, p. 36), fato não observado quando os meios de cultivo LCG e LCS foram utilizados (FIGs. 22 e 23, p. 34 e 35).

A produção de outros metabólitos também foi constatada nos diferentes meios de cultivo e a fim de determinar as condições que mais favoreceram uma diversidade metabólica, foram realizados

## Resultados e discussão

cálculos estatísticos (item 4.8, p.51). Os gráficos de superfície de resposta construídos para avaliar os meios de cultivos LC, CYA e YES nos diferentes tempos de cultivo do fungo *A. parasiticus* estão relacionados no APÊNDICE F-M (p. 157-161).

Figura 24- Gráficos referentes à produção dos metabólitos M1, M2 e M3 em função do tempo de cultivo, quando se empregaram os meios CYA e YES



Muitos pesquisadores, ao analisarem extratos do fungo *A. parasiticus*, isolaram principalmente ácido kójico (**51**) e micotoxinas. Desta forma, o cultivo fúngico em condições que permitam expandir a expressão de metabólitos é uma ótima estratégia para produção de metabólitos ainda não isolados desta fonte natural. O meio de cultura avaliado como ótimo para produção de metabólitos diversos (YES), apresentou a sacarose como fonte de carbono (PMS08 e PMS09, TAB. 5, p. 37). Provavelmente, o fungo utiliza não só a glicose para a síntese de metabólitos, mas também a frutose, resultante da hidrólise da sacarose possibilitando, desta forma, rotas diferenciadas de biossíntese.

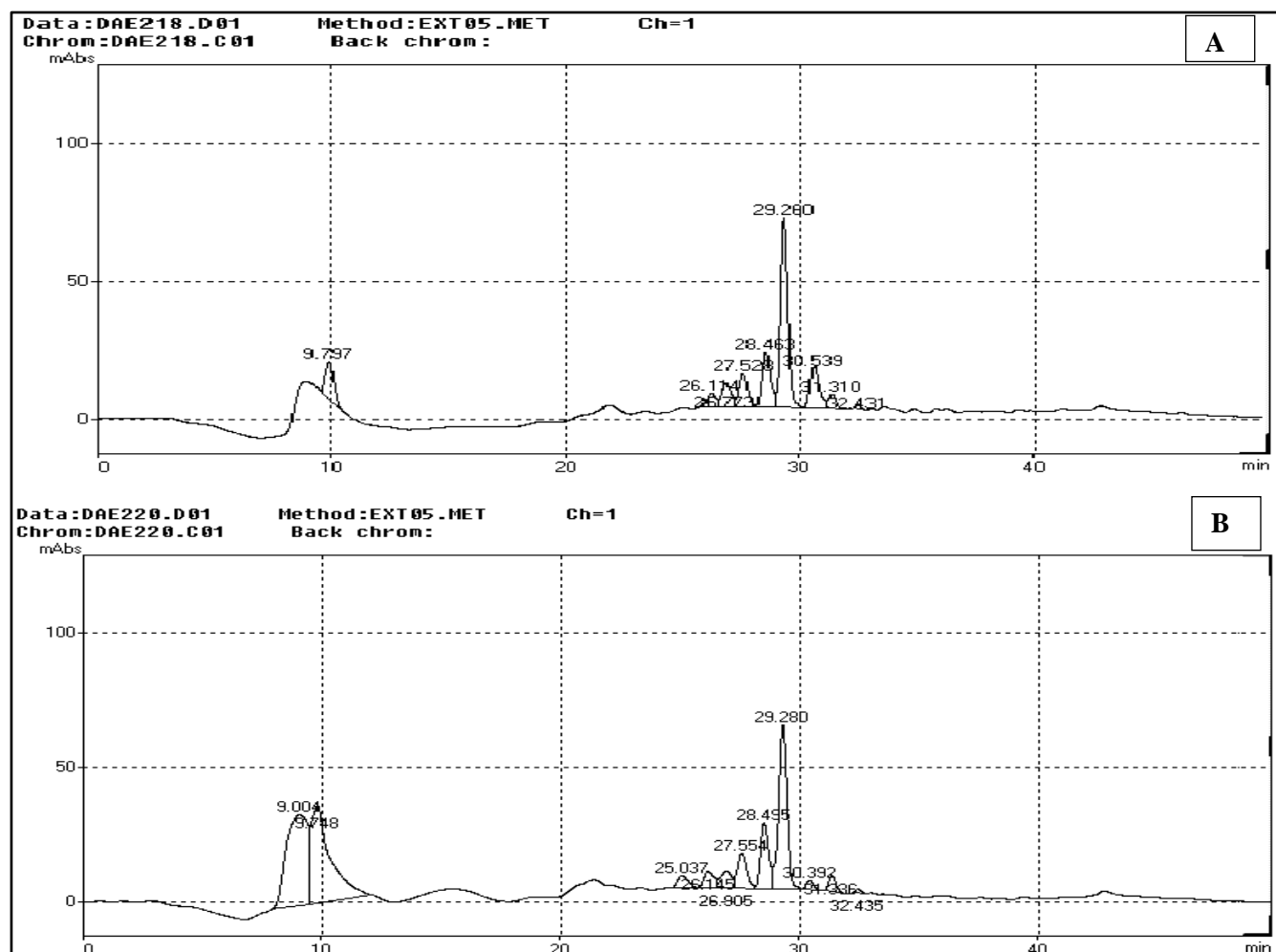
Os cromatogramas dos extratos preparados utilizando o meio de cultivo YES nas condições PMS08 e PMS09 apresentaram como um dos metabólitos majoritários aquele representado pelo tempo de retenção 29,28 min (FIG. 25, p. 37).

## Resultados e discussão

Tabela 5- Tempos de cultivo, interações entre as variáveis que apresentaram influência significativa ( $p \leq 0,05$ ) e melhor condição encontrada para a diversificação metabólica

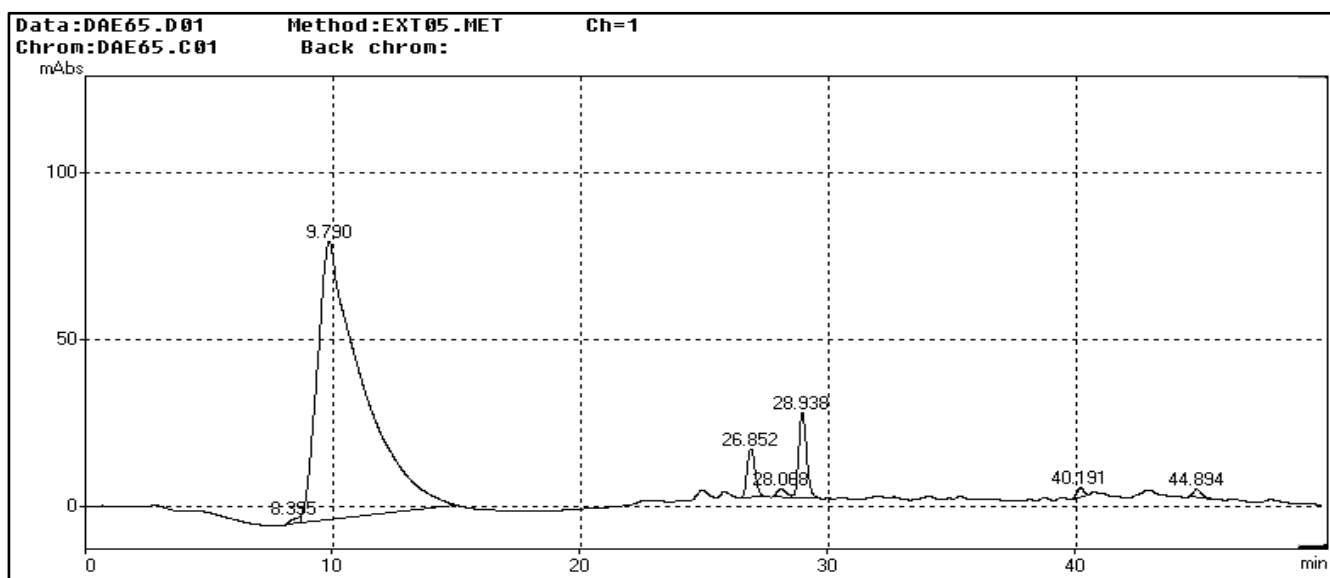
Tempo de cultivo (dias)	Interação estudada	Melhor condição encontrada	N <sup>os</sup> médios de metabólitos	Códigos
3	Agitação x meio (LCG / LCS)	LCG150 sob agitação	5,0	PMS01
		LCG150 sem agitação	9,0	PMS02
6	Concentração x meio(LCG / LCS)	LCG150 sem agitação	8,0	PMS03
		LCG150 com agitação	10,5	PMS04
12	Agitação x meio (CYA / YES)	CYA sem agitação	15,5	PMS05
21	Agitação x concentração do carboidrato	LCS20 com agitação	10,0	PMS06
		LCG20 com agitação	11,5	PMS07
27	Agitação x meio (CYA / YES)	YES sem agitação	19,5	PMS08
		YES sem agitação	21,0	PMS09
30	Agitação x concentração do carboidrato x meio (LCG / LCS)	LCS20 sob agitação	14,0	PMS10

Figura 25- Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD em comprimento de onda de 270 nm, referente aos extratos fúngicos preparada a partir do cultivo no meio YES, sem agitação durante 21 dias (A- PMS08) e 27 dias (B- PMS09)



As melhores condições encontradas para diversificação metabólica apresentaram perfis metabólicos distintos. Por exemplo, na condição PMS02 (TAB. 5, p. 37), uma das menores produções de metabólitos entre as condições otimizadas, houve produção de metabólitos secundários com tempos de retenção de 8,40; 40,20 e 44,89 min (FIG. 26), não produzidos nas condições PMS08 e PMS09 (FIG 25, p. 37). Este fato indica que a alteração nas condições de cultivo possibilitou que o fungo utilizasse diferentes rotas biossintéticas para a produção de metabólitos secundários.

Figura 26- Cromatograma obtido por CLAE-DAD em comprimento de onda de 270 nm, referente ao extrato fúngico proveniente do cultivo no meio LCG150 por três dias, sem agitação (PMS02)

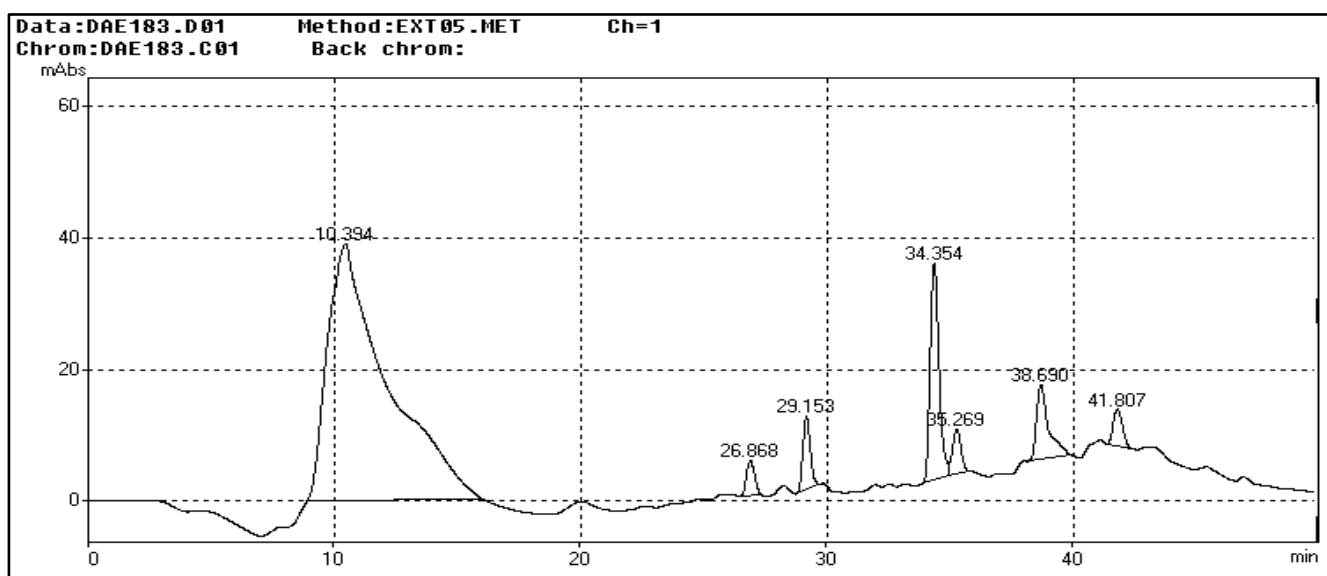


Wu e colaboradores, em 2010, isolaram um novo dipeptídeo (FIG. 27) a partir do *A. isulicola* utilizando o meio de cultura CYA, indicando o potencial das espécies do gênero *Aspergillus* em biossintetizar metabólitos diversos, dependendo dos meios de cultivo aos quais são submetidos.

Figura 27- Fórmula estrutural do dipeptídeo Azonazina (**65**), metabólito isolado a partir do fungo *A. isulicola*

Neste trabalho, foi possível identificar por CLAE a produção de metabólitos, a partir do meio de cultivo CYA sem agitação, com 12 dias de fermentação, não observados nos cromatogramas adquiridos dos extratos obtidos sob outras condições de fermentação. Alguns destes metabólitos apresentaram tempos de retenção de 10,39; 38,69 e 41,81 min (FIG. 28). É portanto, surpreendente a diversidade metabólica alcançada neste trabalho utilizando diferentes meios de cultivo LC, CYA e YES.

Figura 28- Cromatograma obtido por CLAE-DAD em comprimento de onda de 270 nm, referente ao extrato fúngico proveniente do cultivo no meio CYA, no qual a fermentação foi conduzida por 12 dias, sem agitação (PMS05)



### 3.4 Estudo das condições de fermentação para produção de metabólitos bioativos a partir do fungo *A. parasiticus*

Atualmente, muitos antibióticos e antifúngicos estão se tornando ineficazes para o tratamento de infecções e o número de fármacos disponíveis no mercado para tratá-las é bastante limitado. A resistência apresentada por micro-organismos também impulsionaram pesquisas na busca por agentes microbianos mais eficientes (FERREIRA *et al.*, 2012).

Fungos do gênero *Aspergillus* têm uma sólida contribuição na produção de metabólitos biologicamente ativos, tais como antifúngicos, anticolinesterásicos, anticancerígenos, entre outros (WU *et al.*, 2010; NEWMAN; CRAGG, 2012; MATHAN *et al.*, 2013). Além de determinar condições ótimas para produção de ácido kójico (**51**) e para diversificação metabólica, outra perspectiva de

## Resultados e discussão

estudo neste trabalho consistiu em encontrar condições para a produção de extratos fúngicos com atividades biológicas.

Os extratos obtidos foram testados frente aos micro-organismos *C. albicans*, *A. flavus*, *S. aureus* e *E. coli*. Com os resultados dos testes realizaram-se cálculos estatísticos (item 4.8, p.51) a fim de encontrar os parâmetros relacionados à atividade biológica apresentada.

Gráficos de superfície de resposta referentes ao planejamento fatorial  $2^2$  (Meios de cultivo CYA e YES) e  $2^3$  (Meios de cultivo LCG e LCS) foram traçados em função da atividade antimicrobiana e permitiram selecionar as melhores condições de cultivo que apresentaram atividade e o respectivo micro-organismo contra o qual este extrato foi ativo (TAB. 6).

Tabela 6-Tempos de cultivo, interações entre as variáveis que apresentaram influência na atividade biológica, micro-organismos para os quais esta influência foi significativa ( $p \leq 0,05$ ) e melhor condição encontrada para o cultivo

Códigos dos experimentos	Tempo de cultivo (dias)	Interação estudada	Micro-organismo	Melhor condição encontrada*
PMB01	6	Agitação x meio (CYA / YES)	<i>E. coli</i> <i>S. aureus</i>	YES sob agitação
PMB02	9	Agitação x concentração do carboidrato	<i>C. albicans</i>	LCG150 sem agitação
PMB03				LCS150 sem agitação
PMB04	12	Agitação x concentração do carboidrato	<i>E. coli</i>	LCG150 sob agitação
PMB05				LCS150 sob agitação
PMB06	15	Agitação x Meio (LCG / LCS)	<i>E. coli</i>	LCG20 sem agitação
PMB07				LCG150 sem agitação
PMB08	21	Agitação x concentração do carboidrato	<i>S. aureus</i>	LCG150 sem agitação
PMB09				LCS150 sem agitação
PMB10	24	Agitação x concentração do carboidrato x Meio (LCG / LCS)	<i>A. flavus</i>	LCG20 sem agitação
PMB11			<i>E. coli</i> <i>C. albicans</i>	LCG20 sob agitação
PMB12	27	Agitação x Meio (LCG / LCS)	<i>A. flavus</i>	LCG20 sob agitação
PMB13			<i>C. albicans</i> <i>S. aureus</i>	LCG150 sob agitação

\*itens 4.3 (p. 48) e 4.8 (p. 51)

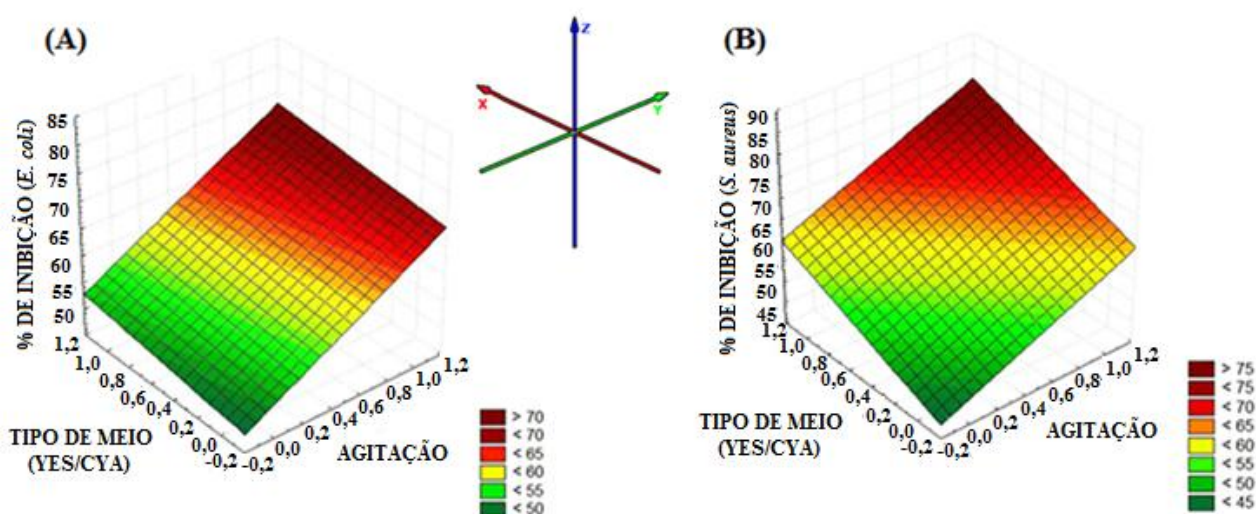
A FIG. 29 (p. 41) ilustra o gráfico de superfície de resposta (planejamento fatorial  $2^2$ ) para atividade antimicrobiana, no qual foi avaliada a interação entre o tipo de meio e a agitação, de extratos preparados após seis dias de cultivo (PMB01, TAB. 6). Os valores máximos referentes aos eixos Y e X, foram previamente selecionados a partir do planejamento fatorial  $2^2$ , conforme pode ser visualizado na



## Resultados e discussão

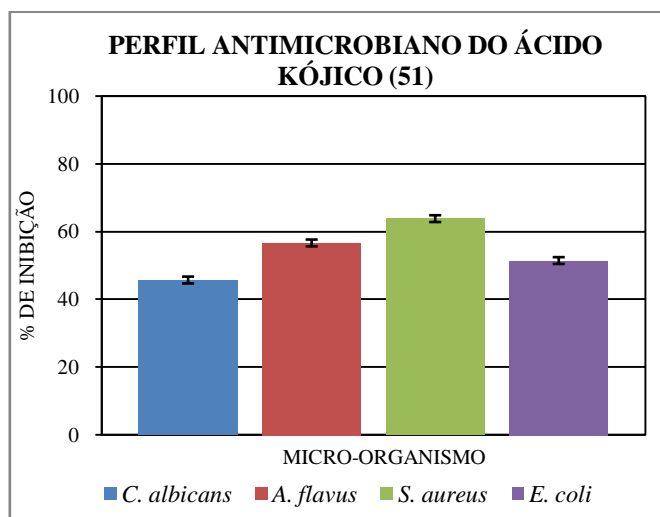
TAB. 9 (p. 52). Nos gráficos A e B (FIG.29, p.41) observou-se um aumento na porcentagem de inibição contra *E. coli* e *S. aureus*, demonstrado pela coloração no sentido verde-vermelho, sendo possível visualizar nas legendas as porcentagens de inibição e suas respectivas colorações. Os demais gráficos encontram-se no (APÊNDICE N-X, p. 162-168). Pode-se notar que as condições ótimas encontradas nesta fase do processo fermentativo ocorreram com o meio de cultivo YES (valores altos para eixo Y) na presença de agitação (valores altos para X).

Figura 29- Superfície de resposta para atividade biológica apresentada pelos extratos frente aos micro-organismos *E. coli* (GRAF. A) e *S. aureus* (GRAF. B) em função do meio e da agitação, para o tempo de 6 dias de cultivo



Como grandes quantidades de ácido kójico (**51**) foram obtidas através da fermentação do *A. parasiticus*, a atividade deste metabólito foi determinada contra todos os micro-organismos alvos deste estudo (GRAF. 4) e quantificadas em todos os extratos (TAB. 7, p. 42).

Gráfico 4- Representação gráfica da porcentagem de inibição apresentada pelo ácido kójico (**51**) na concentração de  $250\mu\text{g mL}^{-1}$  frente aos micro-organismos *A. flavus*, *C. albicans*, *E. coli* e *S. aureus*



O ácido kójico (51) apresentou atividade moderada contra todos os micro-organismos testados nas condições utilizadas neste estudo, variando de  $45,6 \pm 0,1\%$  contra *C. albicans* até  $63,7 \pm 3,8\%$  em relação a *S. aureus* (GRAF. 4, p. 41). Por conseguinte, se a atividade biológica dos extratos estivesse relacionada apenas com a presença de ácido kójico (51), o extrato que apresentasse maior porcentagem deste metabólito, também deveria apresentar maior porcentagem de inibição de crescimento microbiano, quando comparado com os extratos que contivessem quantidades mais baixas de ácido kójico (51). No entanto, os ensaios com os extratos brutos mostraram que a maioria deles apresentou taxas de inibição superior à de ácido kójico (51), como mostrado na TAB. 7.

Tabela 7- Porcentagens de inibição contra *A. flavus*, *C. albicans*, *E. coli* e *S. aureus* para os extratos, com suas respectivas porcentagens de ácido kójico (51)

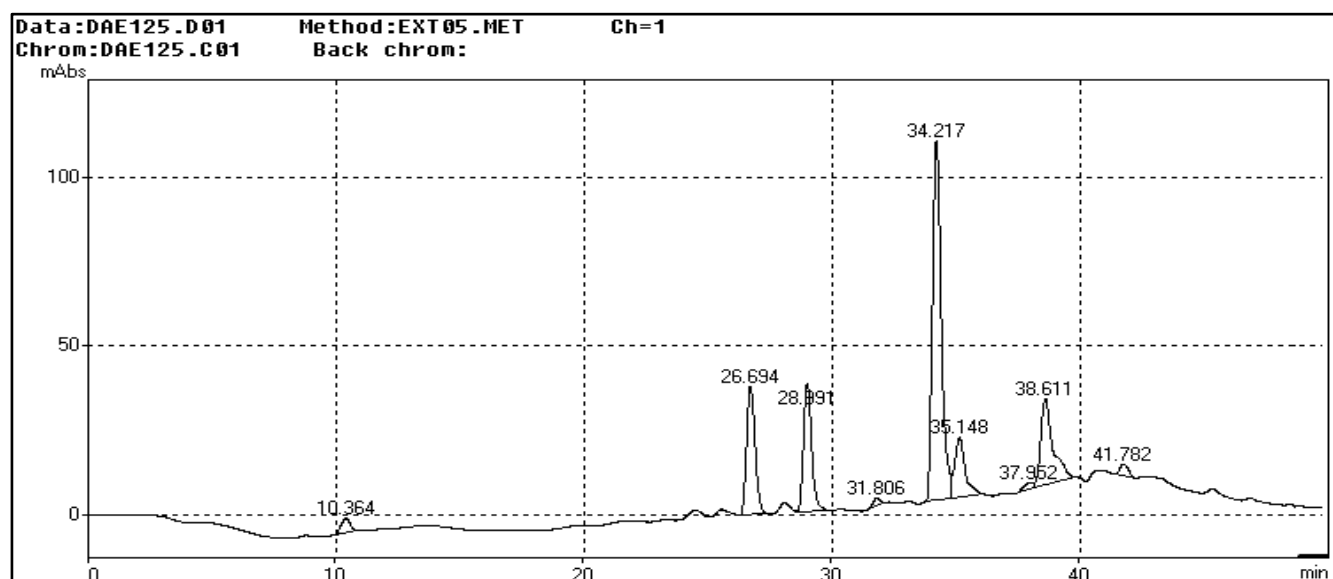
Código	Micro-organismo	Porcentagem de inibição (%)	Ácido kójico (51) (%)
PMB01	<i>E. coli</i>	$50,4 \pm 0,9$	0,04
	<i>S. aureus</i>	$50,6 \pm 4,7$	
PMB02	<i>C. albicans</i>	$53,0 \pm 0,1$	26,30
PMB03		$54,7 \pm 7,5$	37,94
PMB04	<i>E. coli</i>	$64,0 \pm 0,8$	35,38
PMB05		$64,2 \pm 6,6$	34,55
PMB06	<i>E. coli</i>	$69,8 \pm 1,0$	18,52
PMB07		$54,6 \pm 1,8$	29,28
PMB08	<i>S. aureus</i>	$52,2 \pm 2,3$	34,14
PMB09		$49,2 \pm 0,5$	57,70
PMB10	<i>A. flavus</i>	$41,1 \pm 0,7$	15,53
PMB11	<i>E. coli</i>	$53,6 \pm 4,9$	10,23

## Resultados e discussão

	<i>C. albicans</i>	62,7 ± 1,4	
	<i>A. flavus</i>	49,8 ± 3,2	
PMB12	<i>C. albicans</i>	60,2 ± 0,7	7,66
	<i>S. aureus</i>	57,7 ± 1,0	
	<i>A. flavus</i>	49,7 ± 3,2	
PMB13	<i>C. albicans</i>	58,4 ± 4,3	41,10
	<i>S. aureus</i>	64,0 ± 1,7	

O extrato obtido a partir da condição PMB01(TAB. 7) mostrou atividade contra os micro-organismos *E. coli* e *S. aureus* ( $50,4 \pm 0,9\%$  e  $50,6 \pm 4,7\%$ , respectivamente) a níveis que não estão consistentes com a porcentagem de ácido kójico (**51**)(0,04%) presente no extrato, demonstrando a presença de outros metabólitos antimicrobianos. A presença de diferentes metabólitos nos extratos foi confirmada no seu perfil cromatográfico (FIG. 30).

Figura 30- Cromatograma obtido por CLAE-DAD em comprimento de onda de 270 nm, referente ao extrato fúngico proveniente do cultivo no meio YES por seis dias, sob agitação (PMB01)

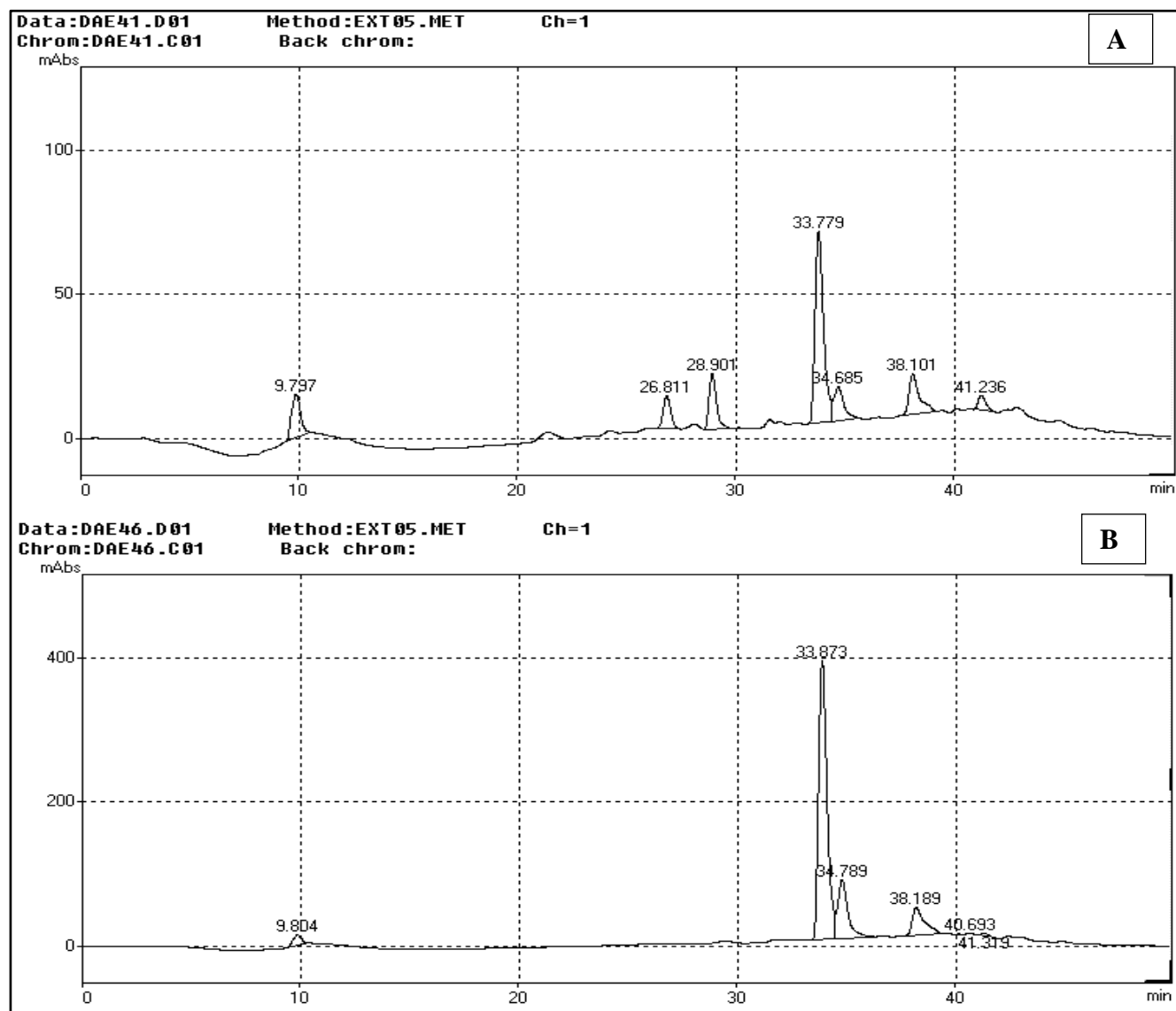


O mesmo ocorreu para os extratos obtidos nas condições PMB11 e PMB12 que, apesar de produzirem pequenas quantidades de ácido kójico (**51**) (10,23 e 7,66%, respectivamente) apresentaram alta inibição dos micro-organismos testados (TAB. 7, p. 42). Através do cromatograma ilustrado na FIG. 31 (p. 44), referente aos extratos obtidos sob estas condições, foi possível verificar a presença de diferentes metabólitos secundários. Esses podem ser responsáveis pela atividade apresentada pelo extrato. A presença de metabólitos diferentes nos dois extratos está condizente, uma vez que estes extratos apresentaram atividades antimicrobianas distintas (TAB. 7, p. 42).

A literatura corrobora que a alteração da fonte de carbono no meio produz variação da atividade biológica. Por exemplo, extratos obtidos utilizando sacarose como fonte de carbono apresentaram atividade biológica mais elevada contra os micro-organismos, tais como *E. coli* e *Fusarium oxysporum*, quando comparado com extratos de meios de cultura contendo apenas glicose ou frutose (EL-AASAR, 2006). Fungos endófitos *Apiospora montagnei* e *Arthrinium statet* também produziram extratos com elevada atividade biológica, quando cultivadas em meios contendo sacarose como fonte de carbono (RAMOS; SAID, 2011). Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que a atividade biológica foi influenciada não só pela fonte de carbono disponível mas por outros fatores, tal como o tempo de cultivo (TAB. 6, p. 40).

Figura 31- Cromatograma obtido por CLAE-DAD em comprimento de onda de 270 nm, referente ao extrato fúngico proveniente do cultivo no meio LCG, sem agitação, durante 24 dias (A- PMB11) e 27 dias (B- PMB12)

## Resultados e discussão



Os extratos obtidos PMB02 e PMB08 foram preparados utilizando o mesmo meio de cultivo, porém com durações diferentes, sendo nove e 21 dias, respectivamente. Estes extratos apresentaram atividade biológica diferenciada (*C. albicans* e *S. aureus*, respectivamente) indicando que os metabólitos responsáveis pela atividade biológica referente no extrato obtido da fermentação com nove dias de duração são diferentes daqueles presentes no extrato com 21 dias de cultivo. Este fato também foi observado para os extratos obtidos sob as condições PMB03 e PMB09.

Os resultados dos ensaios biológicos foram muito encorajadores, especialmente aquele obtido pela fermentação do *A. parasiticus* sob condição PMB01 que, além de apresentar atividade relevante contra as bactérias *E. coli* e *S. aureus*, foi o que apresentou a menor produção de ácido kójico (51). Utilização do meio LCG20, sem agitação, mostrou ser a condição mais adequada ( $69,8 \pm 1,1\%$  de inibição) para a produção de metabólitos ativos contra *E. coli*. Entre as condições fúngicas avaliadas para a produção de metabólitos bioativos, o extrato produzido sob a condição PMB10 mostrou

## *Resultados e discussão*

---

seletividade para o fungo *A. flavus* ( $41,1 \pm 0,7\%$  de atividade). As condições PMB02 e PMB03 forneceram extratos seletivos contra o fungo *C. albicans* ( $53,0 \pm 0,1$  e  $54,7 \pm 7,5\%$ , respectivamente). Estes resultados demonstram o grande potencial para a produção de metabólitos bioativos sob condições específicas.

## 4 METODOLOGIA

Para atender aos objetivos da primeira parte deste trabalho, os experimentos foram divididos em dois grupos (A e B), o que facilitou as análises estatísticas. Para o grupo A aplicou-se um planejamento fatorial com dois fatores (meio de cultura e agitação) em dois níveis (meio de cultura – CYA e YES; agitação – 0 e 150 rpm). Para o grupo B utilizou-se um planejamento fatorial com três fatores (tipo de carboidrato, concentração e agitação) em dois níveis (tipo de carboidrato – glicose e sacarose; concentração – 20 e 150 g L<sup>-1</sup>; agitação – 0 e 150 rpm).

Todos os procedimentos que envolveram cultivo e manipulação de micro-organismos foram conduzidos em capela de fluxo laminar (Capela VECO, modelo JLF 912, série FL 5799). Os materiais utilizados na manipulação dos micro-organismos foram esterilizados em autoclave vertical Fanen, modelo 415/3, série J03610.

### 4.1 Manutenção e cultivo fúngico

Para o preparo dos meios sólidos dissolveram-se os respectivos componentes em água, sob agitação e a solução obtida foi aquecida até a formação de um líquido translúcido que foi esterilizado em autoclave a 120 °C por 15 min. Para manutenção dos fungos utilizaram-se os seguintes meios de cultura sólidos, preparados em q.s.p. de água destilada:

Ágar malte (GAMSet *al.*, 1998).

- Extrato de malte - 24,0 g L<sup>-1</sup>
- Ágar bacteriológico - 20,0 g L<sup>-1</sup>

Ágar batata (GAMSet *al.*, 1998).

- Ágar batata dextrosado (Biobrás S.A.) – 39,0 g L<sup>-1</sup>

Para o cultivo dos fungos utilizaram-se os seguintes meios de cultura líquidos:

YES – Extrato de levedura e sacarose (KLICH, 2002)

- Sacarose - 150,0 g L<sup>-1</sup>
- Extrato de malte (Acumedia) - 20,0 g L<sup>-1</sup>
- MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O - 0,5 g L<sup>-1</sup>

CYA – Extrato de levedura Czapek (KLICH, 2002):

- Caldo Czapek (Himedia) - 35,0 g L<sup>-1</sup>
- Extrato de levedura (Biobrás diagnósticos) - 5,0 g L<sup>-1</sup>
- Sacarose - 30,0 g L<sup>-1</sup>

Meio líquido complexo glicose:

LCG20

- D-Glicose - 20,0 g L<sup>-1</sup>
- Peptona bacteriológica - 5,0 gL<sup>-1</sup>
- K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - 1,0 g L<sup>-1</sup>
- MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O - 0,5 g L<sup>-1</sup>
- NaCl - 5,0 g L<sup>-1</sup>

LCG150

- D-Glicose - 150,0 g L<sup>-1</sup>
- Peptona bacteriológica - 5,0 gL<sup>-1</sup>
- K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - 1,0 g L<sup>-1</sup>
- MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O - 0,5 g L<sup>-1</sup>
- NaCl - 5,0 g L<sup>-1</sup>

Meio líquido complexo sacarose (TAKAHASHI *et al.*, 2008)

LCS20

- Sacarose - 20,0 g L<sup>-1</sup>
- Peptona bacteriológica - 5,0 gL<sup>-1</sup>
- K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - 1,0 g L<sup>-1</sup>
- MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O - 0,5 g L<sup>-1</sup>
- NaCl - 5,0 g L<sup>-1</sup>

LCS150

- Sacarose 150,0 g L<sup>-1</sup>
- Peptona bacteriológica - 5,0 gL<sup>-1</sup>
- K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - 1,0 g L<sup>-1</sup>
- MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O - 0,5 g L<sup>-1</sup>
- NaCl - 5,0 g L<sup>-1</sup>

Preparou-se uma suspensão de esporos a fim de garantir a homogeneidade do inóculo a ser distribuído nos vários erlenmeyers, submetidos a diferentes condições de cultivo. O fungo *A. parasiticus* foi incubado por sete dias a 28 °C em tubos de ensaio inclinados contendo ágar batata. Posteriormente, com auxílio de uma alça estéril, retiraram-se os esporos que foram transferidos para um erlenmeyer de 125 mL contendo água esterilizada. Os esporos presentes na suspensão foram contados em câmara de Neubauer e realizou-se a diluição adequada para que a concentração final fosse de aproximadamente 10<sup>6</sup> esporos mL<sup>-1</sup> (EL-AASAR, 2006).

#### 4.2 Preparo do material utilizado nos testes biológicos

Para manutenção das bactérias utilizou-se caldo BHI, infuso de cérebro e coração (37 g L<sup>-1</sup>) (LANNA *et al.*, 2006).

Para a preparação dos inóculos bacterianos e do fungo *C. albicans*, as cepas foram incubadas por 24 h a 37 °C em meio BHI. A turbidez foi ajustada com auxílio de espectrofotômetro modelo SP – 22, marca BIOSPECTRO, sendo adicionada água estéril até que fosse possível realizar a leitura de 75 - 76 % de transmitância em um comprimento de onda fixo de 530 nm.

Para a preparação da suspensão de esporos dos fungos filamentosos, estes foram incubados por sete dias a 28 °C em ágar batata. Posteriormente, com auxílio de uma alça estéril, transferiram-se os esporos para um erlenmeyer de 125 mL contendo água esterilizada. Os esporos fúngicos foram



contados em uma câmara de Neubauer e realizou-se a diluição adequada para que a concentração final fosse de  $5 \times 10^3$  esporos  $\text{mL}^{-1}$ .

Para o preparo das soluções estoque em DMSO (dimetilsufóxido) utilizaram-se 50 mg  $\text{mL}^{-1}$  de extrato. Para o preparo das soluções trabalho diluíram-se 40  $\mu\text{L}$  da solução estoque em 960  $\mu\text{L}$  de meio de cultura BHI.

### 4.3 Testes antibacterianos e antifúngicos

Para avaliar a atividade antibacteriana e antifúngica dos extratos obtidos do fungo *A. parasiticus* foram usadas cepas depositadas na coleção do LABB (Laboratório de Biotecnologia e Bioensaios) de fungos (Filamentoso *A. flavus* CCT 4952, e o leveduriforme *C. albicans* ATCC 18804) e de bactérias (Gram-positiva *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e a Gram-negativa *Escherichia coli* ATCC 25723).

Foram usadas microplacas constituídas por 96 poços (oito linhas e 12 colunas)

- Pipetaram-se 100  $\mu\text{L}$  da solução trabalho nos poços e, a seguir, 100  $\mu\text{L}$  do inóculo do micro-organismo ou da suspensão de esporos;
- Pipetaram-se 100  $\mu\text{L}$  da solução trabalho nos poços e, a seguir, 100  $\mu\text{L}$  de água destilada estéril para o controle dos extratos.
- Pipetaram-se 100  $\mu\text{L}$  do meio de cultura BHI nos poços e, a seguir, 100  $\mu\text{L}$  do inóculo do micro-organismo ou da suspensão de esporos para o controle dos micro-organismos.
- Pipetaram-se 100  $\mu\text{L}$  do meio de cultura BHI nos poços e, a seguir, 100  $\mu\text{L}$  de água destilada estéril para o controle da esterilidade do meio de cultura.

Os extratos foram avaliados na concentração fixa de 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e o ácido kójico (**51**) a 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

As microplacas preparadas foram incubadas em estufa Quimis Q-316.12, série 807.131 a 37 °C durante 48 h. Realizaram-se leituras em leitora de ELISA (Thermoplate, modelo: TP-READER), em comprimento de onda fixo de 492 nm, com 24 e 48 h para as bactérias e para a levedura *C. albicans* e 48 h para o fungo *A. flavus*.

A porcentagem de inibição proporcionada por cada extrato foi calculada conforme a equação abaixo:

Equação 4- Equação para determinação da porcentagem de inibição obtida nos ensaios biológicos (EC = absorvância do composto avaliado; CM = absorvância do controle do meio de cultura; CH = absorvância do controle de crescimento do micro-organismo; CC = absorvância do controle do composto).

$$\% \text{INIBIÇÃO} = 100 - \frac{(\text{EC} - \text{CC}) \times 100}{\text{CH} - \text{CM}}$$

#### 4.4 Solventes, ácidos orgânicos e reagentes utilizados

Foram utilizados metanol com pureza para CLAE da JT Backer, acetato de etila, DMSO, hexano, álcool metílico, diclorometano, acetona, éter etílico, terc-butanol, clorofórmio, e ácido fórmico PA, das marcas Synth, CRQ, Quimex, Nuclear, Vetec, Dinâmica e Merk. ácido kójico (**51**) da marca Acros Organics. A água purificada foi obtida em aparelho Milli-Q (Millipore, Billerica, US).

#### 4.5 Análises físico-químicas

##### 4.5.1 Temperatura de fusão

A faixa de fusão do ácido kójico (**51**) foi determinada a partir do aparelho de ponto de fusão Gehaka modelo PF 1000, série 0530/06001020.

##### 4.5.2 Determinação do pH

O pH de todos os meios de cultivo foi medido com auxílio de um pHmetro (modelo pH100) com resolução pH 0,1 e precisão de  $\pm 0,1$ , a fim de verificar as alterações de pH produzidas pelo fungo no meio de cultura.

##### 4.5.3 Ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  foram obtidos a partir do espectrômetro BRUKER AVANCE DRX400 (Departamento de Química, UFMG) utilizando como solventes  $\text{CD}_3\text{OD}$ , da marca Aldrich.

##### 4.5.4 Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD)

As amostras foram devidamente filtradas com unidades filtrantes MILLEX LCR (0,45 $\mu\text{m}$ ) PTFE modificadas para solventes orgânicos (Millipore). Os extratos fúngicos obtidos a partir do cultivo do *A. parasiticus* foram analisados em um cromatógrafo líquido (SHIMADZU LC10AD series) equipado com amostrador automático (SIL-10AF SHIMADZU) auto injetor e detector de arranjo de diodos SPDM10avp. As separações foram realizadas em uma coluna de fase reversa Supelcosil<sup>TM</sup> LC18 (250 x 4,6 mm; 5  $\mu\text{m}$ ; Col: 93937-02). O volume de amostra injetado foi de 20  $\mu\text{L}$  (1 mg  $\text{mL}^{-1}$ ). O sistema cromatográfico foi operado pelo programa CLASS LC10 PROGRAM.

O método empregado na corrida cromatográfica apresentou as seguintes características: A fase móvel consistiu de uma mistura de  $\text{H}_2\text{O}$  contendo 0,05 % de ácido fórmico e metanol. O gradiente

linear de eluição usado foi H<sub>2</sub>O-Metanol 70:30 a 0:100 em 30 min, com mais 10 min mantidos na última concentração. O gradiente foi retornado ao valor inicial em 5 min e mantido por mais 5 min, para equilíbrio do sistema, antes da injeção da próxima amostra. O fluxo do eluente foi de 0,5 mL min<sup>-1</sup>. A fase móvel (H<sub>2</sub>O – Metanol) utilizada foi desgaseificada por 30 min em banho de ultra-som antes do experimento.

Para gerar a curva de produção de ácido kójico (**51**) nos diferentes meios de cultura utilizou-se, como metodologia, a padronização externa. Preparou-se uma solução metanólica de ácido kójico (**51**) comercial (Acros Organics, lote:A0217045001) com concentração conhecida (1 mg mL<sup>-1</sup>). A partir desta solução foram realizadas diluições e dez soluções com concentrações distintas foram preparadas. Injetaram-se estas soluções e uma curva de calibração foi gerada por análise de regressão (modelo linear) interpolando a concentração nominal dos padrões usados com a área do pico cromatográfico obtido. A análise estatística dos dados e os cálculos de retorno foram realizados pelo software Microsoft Office Excel 2007. Este procedimento foi realizado em quadruplicata.

### 4.6 Cultivo fúngico

O fungo *A. parasiticus* ATCC 15517 utilizado neste trabalho foi obtido da coleção de micro-organismos da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ – RJ, Brazil). Para o cultivo fúngico foram usados os meios CYA e YES (Grupo A), LCG e LCS (Grupo B), cujas composições foram descritas no item 4.1 (p. 46).

Uma suspensão de esporos de *A. parasiticus* (item 4.1, p. 46) (10 mL) foi vertida em erlenmeyer de 500 mL, contendo 100 mL de meio de cultura. O desenvolvimento do fungo e a consequente produção de metabólitos se processou por um período de três 30 dias, com extrações a cada três dias, sendo os ensaios realizados em duplicata.

### 4.7 Preparo dos extratos

Após o cultivo fúngico, os meios de cultivo obtidos (total de 240 frascos) foram filtrados a vácuo e os metabólitos foram extraídos com acetato de etila (três porções de 50 mL para cada 100 mL de filtrado), em funil de separação. O solvente orgânico foi retirado com auxílio de rotaevaporador (Büchi Waterbath, modelo B – 480 e Fisaton modelo 802, série 531782) sob pressão reduzida e temperatura controlada. O extrato resultante foi pesado em balança analítica Quimis (modelo Q-ILA2104, 210 g/ 0,1 mg). Foram obtidos 240 extratos brutos.

Alíquotas de 10 mg destes extratos foram submetidas a ensaios biológicos e analisadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência com detector de arranjo de diodos, totalizando 240 injeções cromatográficas.

O extrato LCS150 obtido na ausência de agitação e com 12 dias de cultivo apresentou grande quantidade de cristais, também detectados em outros extratos. Desta forma, pesaram-se 500 mg deste extrato a fim de submetê-lo a um processo de recristalização, utilizando metanol como solvente. Após recristalização, os cristais formados foram coletados e lavados com hexano a fim de retirar possíveis impurezas. Estes cristais foram submetidos a análises espectrométricas e identificados como sendo o ácido kójico (**51**).

### 4.8 Análise estatística

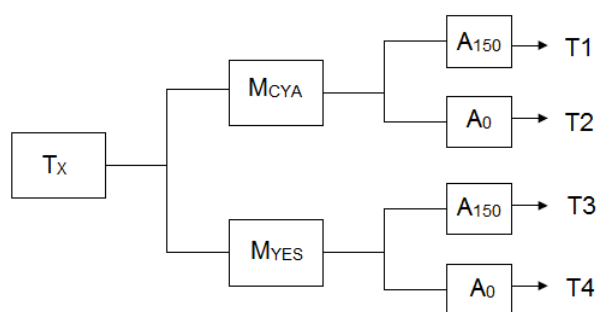
As variáveis estudadas para a produção de ácido kójico (**51**), diversidade de metabólitos secundários e produção de metabólitos bioativos nos experimentos do grupo A foram o meio de cultura e a agitação, cujos níveis estão apresentados na TAB. 8.

Tabela 8- Níveis das variáveis estudadas no planejamento fatorial 2<sup>2</sup> aplicado à produção de ácido kójico (**51**)

Variáveis	Níveis	
	Inferior (-)	Superior (+)
Agitação, rpm	0	150
Tipo de meio de cultura (CYA ou YES)	CYA	YES

As diferentes combinações de condições geraram quatro tratamentos para cada tempo de extração (FIG.32).

Figura 32- Combinações de diferentes condições de cultivo para o fungo *A. parasiticus*, gerando quatro tratamentos (T1 a T4). T<sub>x</sub> = tempo de extração, sendo x variando de três em três até o máximo de 30 dias; M<sub>CYA</sub> = Meio de cultura CYA; M<sub>YES</sub> = Meio de cultura YES; A<sub>150</sub>= Agitação de 150 rpm; A<sub>0</sub>= sem agitação



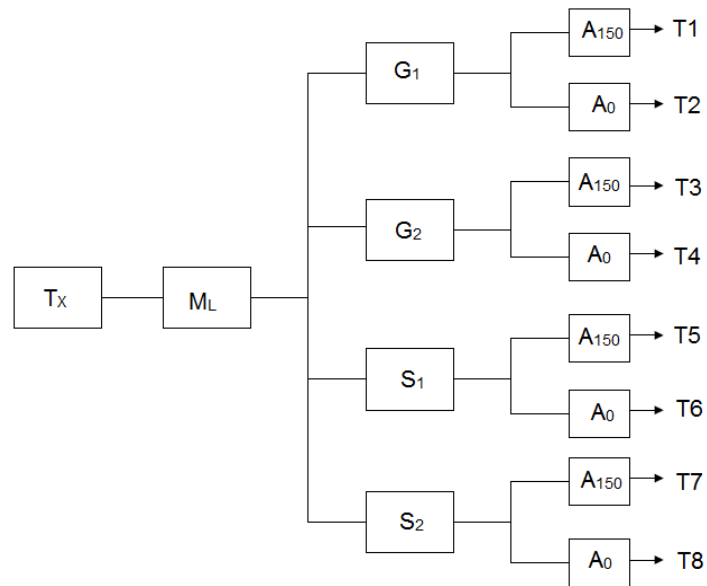
Para os ensaios do grupo B, as variáveis estudadas foram o tipo de carboidrato, a concentração de carboidrato e a agitação, cujos níveis estão apresentados na TAB. 9 (p. 52).

Tabela 9- Níveis das variáveis estudadas no planejamento fatorial  $2^3$  aplicado à produção de ácido kójico (51)

Variáveis	Níveis	
	Inferior (-)	Superior (+)
Agitação, rpm	0	150
Tipo de carboidrato	Glicose	Sacarose
Concentração do carboidrato	20 g L <sup>-1</sup>	150 g L <sup>-1</sup>

Estes parâmetros foram avaliados em diferentes combinações, gerando oito tratamentos para cada tempo de extração (FIG. 33).

Figura 33- Combinações de diferentes condições de cultivo para o fungo *A. parasiticus*, gerando oito tratamentos (T1 a T8). T<sub>x</sub> = tempo de extração, sendo x variando de três em três até o máximo de 30 dias; M<sub>L</sub> = Meio líquido complexo; G<sub>1</sub>= Glicose 20 g L<sup>-1</sup>; G<sub>2</sub>= Glicose 150 g L<sup>-1</sup>; S<sub>1</sub>= Sacarose 20 g L<sup>-1</sup>; S<sub>2</sub>= Sacarose 150 g L<sup>-1</sup> A<sub>150</sub>= Agitação de 150 rpm; A<sub>0</sub>= sem agitação



Os resultados dos ensaios dos grupos A e B foram analisados estatisticamente por planejamentos fatoriais distintos, uma vez que apresentaram diferentes variáveis, um planejamento fatorial (ANOVA) completo em dois fatores ( $2^2$ ) para o grupo A e três fatores ( $2^3$ ) para o grupo B. Os efeitos isolados de cada variável do processo, assim como as possíveis interações entre elas foram calculadas utilizando-se o software Statistica for Windows versão 8.0. Após a definição das melhores condições para produção de ácido kójico (**51**) no grupo A e B, estes foram comparados e analisados a fim de ser selecionado o melhor meio.

## 5 CONCLUSÕES

Neste trabalho foram preparadas e analisadas estatisticamente 120 condições de cultivo distintas, das quais foram selecionadas seis condições ótimas para produção de ácido kójico (**51**), dez condições que promoveram maior diversidade de metabólitos secundários e treze condições que levaram à modulação de metabólitos antimicrobianos a partir do fungo *A. parasiticus*.

Os parâmetros escolhidos como variáveis neste trabalho (fonte de carbono, concentração de carboidrato, agitação e tempo de cultivo) promoveram a produção de diferentes metabólitos secundários para os diferentes cultivos realizados, evidenciando a importância da abordagem OSMAC.

Entre os meios avaliados, o meio de cultivo LCS150 (PAK02) proporcionou o melhor rendimento (65,42%) de ácido kójico (**51**) a partir do extrato bruto analisado. O período ótimo de fermentação foi de 12 dias, na ausência de agitação. A produção de ácido kójico (**51**), a partir de uma condição que utiliza a sacarose como fonte de carbono, mostrou-se de grande importância para o desenvolvimento de metodologias para produção em grande escala deste metabólito no Brasil, uma vez que a sacarose pode ser obtida a partir da cana de açúcar, matéria prima abundante neste país.

A diversificação metabólica do fungo *A. parasiticus* foi maximizada ao utilizar o meio de cultura YES, sem agitação em um período de 27 dias de fermentação (PMS09), 21 metabólitos foram detectados por CLAE-DAD. As demais condições encontradas também foram significativas, uma vez que, mesmo não tendo produzido um grande número de metabólitos secundários como a condição PMS09, foi possível detectar uma produção diferenciada de metabólitos, dado confirmado através dos diferentes perfis cromatográficos obtidos por CLAE-DAD para cada condição encontrada.

O meio LCG20, na ausência de agitação e com 15 dias de cultivo (PMB06), mostrou ser a condição mais adequada ( $69,8 \pm 1,1\%$  de inibição) para a produção de metabólitos ativos contra *E. coli*. Entre as condições fúngicas avaliadas para a produção de metabólitos bioativos, o extrato produzido a partir do meio LCG20, na ausência de agitação e 24 dias de cultivo (PMB10), mostrou seletividade para o fungo *A. flavus* ( $41,1 \pm 0,7\%$  de atividade). A partir dos meios LCG150 e LCS150, na ausência de agitação e 9 dias de cultivo (PMB02 e PMB03, respectivamente), obtiveram-se extratos seletivos contra o fungo *C. albicans* ( $53,0 \pm 0,1$  e  $54,7 \pm 7,5\%$  de atividade, respectivamente).

## PARTE II

### 1 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 1.1 Fungos do gênero *Botrytis*

Os fungos do gênero *Botrytis* encontram-se amplamente distribuídos em todo o mundo (desde zonas frias como Alasca até países tropicais como o Brasil) sendo classificados como fungos filamentosos. Fungos deste gênero produzem grande quantidade de micélio acinzentado, composto por hifas e conidióforos ramificados que possuem conídios unicelulares no ápice que são liberados em climas úmidos (FIG. 34).

Figura 34- Aspecto microscópico das estruturas de frutificação do *Botrytis sp.* (Fonte: <http://www.isidrocollado.es/>. Acesso em 06/09/2013)



Este gênero foi descrito pela primeira vez em 1729 por Micheli. Atualmente é constituído por 22 espécies e um híbrido (STAATS *et al.*, 2005). Seu nome provem da palavra grega “*botrys*”, que significa cacho de uva, devido ao formato adquirido por seus conídios no conidióforo (HORNSEY, 2007).

O gênero *Botrytis* é composto por fungos fitopatogênicos responsáveis por graves prejuízos econômicos (COLLADO *et al.*, 2007). Esses micro-organismos podem ser encontrados no solo associado a alguma matéria orgânica, infectando um grande número de plantas frutíferas, oleráceas e ornamentais (TAB. 10, p. 55).

O fungo *B. cinerea* foi identificado como patógeno de mais de 235 espécies de plantas (COLLADO *et al.*, 2007). O mofo cinza pulverulento que cobre culturas de hortaliças e frutas, contaminadas por este fitopatogêno é característico de uma doença denominada “podridão cinza”. O ciclo desta doença consiste no crescimento de micélio em plantas doentes e posterior produção de



## Referencial teórico

conídios que serão dispersos para novos hospedeiros (AMSELEM *et al.*, 2011). Após a penetração nestes hospedeiros, o patógeno coloniza rapidamente os tecidos, esporulando e iniciando novos ciclos da doença.

Tabela 10- Espécies do gênero *Botrytis* associadas a plantas oleráceas, frutíferas e ornamentais

Espécie	Cultivo
<i>B. scamosa</i> , <i>B. allii</i> , <i>B. byssoidea</i>	Oleráceas (Cebola e alho)
<i>B. cinerea</i>	Oleráceas (Tomate, pimentão, berinjela, etc); Frutíferas (Uva, morango, kiwi, maçã, etc); Ornamentais (Rosa, amarílis, violeta, etc)
<i>B. elliptica</i> , <i>B. hyacinthi</i> , <i>B. paeoniae</i> , <i>B. tulipae</i>	Ornamentais (Liláceas, ranúnculo e tulipa)

Muitas plantações agrícolas, tais como de tomates, uvas, morangos, podem ser infectadas pelo fungo *B. cinerea*, levando asérias perdas econômicas (FIG 35). Estas infecções requerem o emprego intensivo de fungicidas de amplo espectro. O controle racional das enfermidades causadas por este fitopatógeno é uma das maiores dificuldades enfrentadas pela indústria agro-alimentar. Sua grande capacidade de se adaptar a condições extremas, juntamente com a resistência apresentada aos diversos fungicidas, fazem do *B. cinerea* um dos fungos mais temidos pelos agricultores (COPPING; HEWITT, 1998).

Figura 35- Aspecto de diferentes cultivos infectados por fungos do gênero *Botrytis*(Fonte: TOFOLI *et al.*, 2011)



Desta forma, torna-se necessário o desenvolvimento de fungicidas que apresentem um novo mecanismo no combate a esse micro-organismo, agindo de forma específica sem causar efeitos

negativos, tais como contaminar o solo ou persistir na cadeia alimentar (LEROUX, 1996; HUTER, 2011).

## 1.2 Características gerais das toxinas excretadas por *B. cinerea*

O fungo *B. cinerea* é um micro-organismo essencialmente saprófita, que infecta plantas provocando lesões necróticas nas folhas. O mecanismo de infecção é mediado por várias enzimas extracelulares e metabólitos, que desempenham diferentes funções neste processo. Algumas enzimas excretadas proporcionam a degradação da parede celular, facilitando a entrada do fitopatógeno na superfície do hospedeiro, enquanto toxinas, oxalatos e espécies de oxigênio ativas contribuem para matá-lo (ELAD *et al.*, 2004).

As toxinas podem afetar os processos fisiológicos da planta hospedeira, causando manchas ou necroses e, desta forma, alteram o metabolismo do organismo atacado, já que suprimem seu mecanismo de defesa (SCHEFFER, 1983). O papel que algumas toxinas exercem no processo inicial de infecção ainda é pouco conhecido.

Atualmente existem muitas pesquisas direcionadas ao estudo dos metabólitos sintetizados por *B. cinerea*, principalmente das fitotoxinas que participam do mecanismo de infecção deste patógeno (DEIGHTON *et al.*, 2001). *B. cinerea* utiliza duas classes de toxinas em seu processo de infecção, sendo uma composta por metabólitos que apresenta esqueleto policetídeo (boticinina) e, a outra, por esqueletos sesquiterpênico, denominados botrianos (FIG. 36) (COLLADO *et al.*, 2007).

Figura 36- Fórmulas estruturais de compostos com esqueleto botriano, botridial (**37**) e dihidrobotridial (**66**) e esqueleto de boticinina, boticinina A (**67**)

Os metabólitos com esqueleto de boticininas apresentam em sua estrutura um biciclo com um lactona de seis membros, fundido a um anel pirano esterificado em uma das hidroxilas com um ácido graxo de oito a dez átomos de carbono, conforme pode ser visualizado na estrutura da boticinina A (**67**), FIG. 36.

Os compostos com esqueleto botriano são sesquiterpenos cujo esqueleto é um biciclo não isoprenoide. Os representantes mais característicos desse grupo são os compostos botridial (**37**) e dihidrobotridial (**66**) (FIG. 36, p. 56). Estes metabólitos foram isolados pela primeira vez por Fehlhaber e colaboradores em 1974 em um meio de cultivo de *B.cinerea* (REINO *et al.*, 2004).

Várias pesquisas realizadas com o fungo *B. cinerea* mostraram que a toxina botridial (**37**) está diretamente ligada aos sintomas das enfermidades causadas por esse patógeno. O grupo de pesquisa Diseño Biosintético da Universidade de Cádiz na Espanha propôs um mecanismo para a biossíntese do botridial (**37**) e di-hidrobotridial (**66**) a partir do pirofosfato de farnesila (**68**) (FIG. 37) (COLLADO *et al.*, 2007).

Figura 37- Rota biossintética das toxinas botridial (**37**) e di-hidrobotridial (**66**). Esquema adaptado de COLLADO *et al.*, 2007

Atualmente o mapeamento de fragmentos genéticos responsáveis pela produção das enzimas policetídeo sintases PKSs e peptídeos não ribossomais NRPSs possibilitam estimar o potencial biossintético de diversas espécies fúngicas. Desta forma, o estudo dos mecanismos que levam à supressão da transcrição biossintética, assim como o desenvolvimento de metodologias para induzir a expressão desses genes, representam um papel importante para compreensão do processo de infecção realizado pelo fungo.

Um fator importante na fitotoxicidade de algumas toxinas produzidas por este fungo consiste no nível de oxidação dos carbonos C-10 e C-15. Observou-se que os compostos que possuem a função

aldeído nas posições C-10 e C-15 apresentaram atividades mais elevadas, enquanto compostos com as funções ésteres e álcoois apresentaram baixa atividade ou foram inativos (COLLADO *et al.*, 2007).

A produção deste metabólito durante a idiofase de crescimento fúngico pode limitar seu desenvolvimento (PATRÓN *et al.*, 2004). Desta forma, a utilização de um análogo não fitotóxico desta toxina ou um intermediário biossintético proporciona um efeito restritivo sobre o crescimento do fungo. Outra forma de evitar que o fungo possa exercer sua patogenicidade consiste em inibir a síntese do botridial (**37**).

Tendo em vista que o cariofileno (**71**), (FIG 38), apresenta precursores intermediários biossintéticos semelhantes aos intermediários biossintéticos da toxina botridial (**37**) e que este sesquiterpeno natural produzido por *Eugenia caryophyllata* não exibe toxicidade humana significativa, compostos com este esqueleto devem apresentar grande potencial na síntese de compostos antifúngicos específicos e não citotóxicos (COLLADO *et al.*, 2007).

Figura 38- Fórmula estrutural do cariofileno (**71**)

Uma série de compostos semelhantes aos intermediários botrianos foram sintetizados e testados contra o fungo *B. cinerea* (COLLADO *et al.*, 2007; SOUZA *et al.*, 2012). Nestes experimentos foi utilizado o óxido de cariofileno (**72**) que, em solução ácida, conduz à formação do clovan-2 $\beta$ ,9 $\alpha$ -diol (**73**). Porém, se o ácido for substituído pelo catalisador tetracianoetileno (TCNE) e o solvente utilizado for um álcool, formam-se produtos da alcoólise do óxido de cariofileno (**72**), conduzindo aos alcoxilclovanóis **74-79** (FIG. 39).

Figura 39- Esquema da síntese do clovan-2 $\beta$ ,9 $\alpha$ -diol (**73**) e alcoxilclovanóis **74-79** a partir do óxido de cariofileno (**72**)

Todos os derivados apresentaram atividades contra o fungo *B. cinerea*. O composto **73** foi mais ativo (80% de inibição), enquanto os demais foram fracamente ativos (COLLADO *et al.*, 2007).

Pode-se observar que os intermediários **69** e **70** (FIG. 37, p. 57) apresentam uma distribuição espacial semelhante ao clovan-2 $\beta$ ,9 $\alpha$ -diol (**73**), conforme pode ser observado na FIG. 40.

Figura 40- Fórmula estrutural do intermediário **69** da síntese do botridial (**37**), e do clovan-2 $\beta$ ,9 $\alpha$ -diol (**73**)

A sobreposição dessas estruturas ocorre de tal forma que o carbono C-15 do esqueleto botriano sobrepõe a hidroxila ligada ao carbono C-2 do esqueleto clovânico. Durante a biossíntese do botriano, a clivagem oxidativa ocorre entre as posições C-10 e C-15. Os derivados do alcóxilclovanois **74-79** (FIG. 39, p. 58) são metabolizados pelo fungo *B. cinerea* por clivagem da cadeia lateral em C-2, portanto a natureza da cadeia lateral está diretamente relacionada com a capacidade de inibir o crescimento deste fungo (COLLADO *et al.*, 1998).

Compostos aromáticos, tal como o resveratrol (**80**) (FIG. 41) são descritos na literatura como bons inibidores do crescimento do fitopatógeno *B. cinerea* (ADRIAN *et al.*, 1997). Desta forma, o preparo de derivados do óxido de cariofileno (**72**) contendo grupos fenólicos na posição C-2 poderiam inibir o *B. cinerea*.

Figura 41 - Fórmula estrutural do resveratrol (**80**)

Saiz-Urra e colaboradores, (2009), sintetizaram o composto  $2\beta$ -[2-(*p*-nitrofenoxi)etoxi]clovan- $9\alpha$ -ol (**82**) a partir do  $2\beta$ -[2-(bromoetoxi)]clovan- $9\alpha$ -ol (**81**), preparado por solvólise do óxido de cariofileno (**72**) em bromoetanol, conforme Equação 5, e realizaram testes biológicos contra *B. cinerea*. O derivado **82** apresentou uma inibição de  $80\pm 2$  % durante seis dias de observação.

Equação 5- Síntese do  $2\beta$ -[2-(*p*-nitrofenoxi)etoxi]clovan- $9\alpha$ -ol (**82**)

Tendo em vista que a cadeia lateral do derivado clovânico formado influencia diretamente na atividade antifúngica, um estudo da atividade antifungistática contra o *B. cinerea* revelou que os compostos mais ativos apresentavam em sua estrutura funções nitrogenadas (DELIGEORGPOULOU *et al.*, 2004; SAIZ-URRA *et al.*, 2009). Uma atividade interessante apresentada pelos derivados clovânicos foi verificada quando o nitrogênio estava diretamente ligado ao esqueleto clovânico na posição C-2.

As amidinas fazem parte de uma família de compostos orgânicos que apresentam um amplo espectro de atividades biológicas, destacando-se em áreas como desenho biossintético, materiais, química médica e recentemente foram investigadas por apresentarem capacidade de fixar dióxido de carbono (PHAN *et al.*, 2008; DESSET *et al.*, 2009; GUILÉ *et al.*, 2009; EDELMANN, 2012).

O método clássico de obtenção de amidinas trata-se da síntese de Pinner, proposta no final do século XIX, no qual a nitrila forma, em uma primeira etapa, sais de nitrila, que posteriormente reagem com aminas para formar amidinas. Uma restrição a esta metodologia consiste nas características químicas apresentadas pelo grupo nitrila, uma vez que se este não estiver substituído por um grupo retirador de elétrons, a reação não ocorre (SÁNCHEZ *et al.*, 2003). As amidinas *N,N'* dissustituídas podem ser preparadas a partir de métodos suaves ou por reação de amidas com aminas primárias ou

secundárias utilizando bases como BuLi, NaNH<sub>2</sub>, NaH, alcóxido de sódio ou, ainda, pela adição de anilinas a nitrilas catalisadas por ácidos de Lewis (SZCZEPANKIEWICZ *et al.*, 2003; PAN *et al.*, 2003). Porém a síntese de amidinas *N,N'*-assimetricamente substituída não é facilmente obtida a partir destas metodologias, uma vez que amidinas simétricas podem ser formadas como produto secundário. Pesquisadores integrantes do grupo de pesquisa Desenho Biossintético/UCA tentaram a utilização do TCNE como catalisador, utilizando a mesma metodologia aplicada aos álcoois, porém todas as tentativas fracassaram. Desta forma, fez-se necessário desenvolver novas metodologias aplicáveis a esta situação.

Mancillae colaboradores (2008) utilizaram em seus experimentos Sn(OTf)<sub>2</sub> como catalisador em reações com óxido de estireno, constatando a eficiência e versatilidade deste para abertura altamente regio-seletiva do óxido de estireno com aminas aromáticas, as quais permitiram a síntese de quatorze 2-amilamino-2-feniletanol, sendo cinco inéditas. A utilização do Sn(OTf)<sub>2</sub> como catalisador em um sistema de três componentes (amilaminas, nitrilas e óxido de cariofileno) possibilitou a síntese catalítica de *N*-(hidroxiclovanil)-*N'*-acetamidinas, mediante uma reação dominó, em uma extensão da metodologia de Fuks (SÁNCHEZ *et al.*, 2003).





## 2 OBJETIVOS

Esta parte do trabalho teve como objetivo sintetizar moléculas bioativas que mimetizassem parcialmente intermediários envolvidos na biossíntese da toxina botridial (**37**), (FIG. 37, p. 57), e a avaliação biológica dos derivados preparados frente aos fungos *B. cinerea* e *Penicillium crustosum*. As FIGs. 42 e 43 apresentam um resumo das reações de síntese realizadas neste trabalho.

Figura 42- Esquema para obtenção de 2-ariloxiclovanos (**82, 87-89**), derivados dos álcoois (**83-86**) a partir do óxido de cariofileno (**72**)

Figura 43- Esquema para obtenção de clovanofenilaminas **96-101**, clovanoaminopirimidina **102**, clovanofenilamidinas **103-105**, fenilaminocariolanos **106-107**, efenilaminopirimidinacariolano **108**, derivados das fenilaminas **90-94** e da 2-aminopirimidina (**95**) a partir do óxido de cariofileno (**72**)



### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este capítulo foi dividido em três seções. Na primeira e segunda seções foram discutidos os resultados obtidos da síntese dos 2-ariloxiclovanos **82**, **87-89**, (FIG. 42, p. 62), e dos derivados obtidos a partir da reação do óxido de cariofileno (**72**) com as fenilaminasclovano (**90-94**) e a 2-aminopirimidina (**95**) (FIG. 43, p. 62). Na terceira parte foram discutidos os resultados dos bioensaios realizados com os derivados sintetizados.

#### 3.1 Síntese dos 2-ariloxiclovanos **82**, **87-89**.

Foram sintetizados os compostos **82**, **87-89** (FIG. 44) a partir da reação do óxido de cariofileno com os álcoois **83-86** utilizando TCNE como catalisador (FIG. 42, p.62).

Figura 44 - Fórmula estrutural dos 2-ariloxiclovanos **82**, **87-89** sintetizados a partir do óxido de cariofileno (**72**)



A metodologia aplicada nesta reação envolveu a solvólise do óxido de cariofileno (**72**), utilizando TCNE como catalisador. O TCNE é um aceptor  $\pi$  ácido, bastante utilizado na abertura de epóxidos. Com relação ao mecanismo envolvendo a abertura do óxido de cariofileno, Collado e colaboradores (1996) propuseram a ativação da ligação carbono-oxigênio do epóxido seguida pelo rearranjo de Wagner-Meerwein, devido à transferência de um elétron do epóxido ao sistema  $\pi$  do TCNE, conforme esquema apresentado na FIG 45 (p. 64). Desta forma a reação de obtenção dos 2-ariloxiclovanos **82**, **87-89** pode ser explicada por um mecanismo que envolve a transformação catalisada

por TCNE do óxido de cariofileno (**72**) em um carbocátion clovanila (**109**) e posterior ataque do álcool, que atua como nucleófilo.

Figura 45- Mecanismo do rearranjo do óxido de cariofileno (**72**) catalisado por TCNE (COLLADO *et al.*, 1996)

Além dos produtos **82**, **87-89**, foram obtidos produtos clovan-2 $\beta$ -,9 $\alpha$ -diol (**73**), cariofil-3,8(13)dien-5 $\alpha$ -ol (**110**) e clov-2-en-9 $\alpha$ -ol (**111**), (FIG. 46), já conhecidos, resultantes de competitivas reações de substituição e novos rearranjos (HEYMANN *et al.*, 1994; COLLADO *et al.*, 1996; TSUI; BROWN, 1996).

Figura 46- Fórmula estrutural dos produtos secundários **73**, **110** e **111**

Os produtos **73** e **111** foram formados devido à atuação da ligação dupla exocíclica como nucleófilo interno. Mesmo os experimentos sendo realizados em meio anidro observou-se a obtenção de **73** devido ao ataque nucleofílico de uma molécula de água, já os produtos **110** e **111** foram formados a partir da perda dos hidrogênios, localizados nos carbonos C-7, de **112** e C-3 de **109**, dando origem as respectivas duplas ligações entre C8 e C9 no composto **110** e C2 e C3, no composto **111**. O

esquema da FIG. 47, mostra as diferentes rotas reacionais para obtenção dos derivados **82**, **87-89** e os produtos secundários **73**, **110** e **111**.

Esta metodologia consistiu em uma reação catalítica em uma única etapa, na qual foram obtidas moléculas mistas opticamente ativas a partir do precursor enantiomericamente puro, óxido de cariofileno (**72**). A identificação dos produtos obtidos foi realizada por métodos espectroscópicos de análise e a caracterização encontra-se detalhada na seção 4 (p. 76).

Figura 47- Esquema com as diferentes rotas reacionais para obtenção dos derivados **82**, **87-89** e dos produtos secundários **73**, **110** e **111**

### 3.2 Síntese de derivados clovânicos com funções nitrogenadas em C-2

Foram sintetizados as clovanofenilaminas **96-101**, a clovanoaminpirimidina **102** e as clovanofenilamidinas **103-105** (FIG. 48, p. 66) a partir da reação do óxido de cariofileno (**72**) com as fenilaminas **90-94** e  $\alpha$ -2-aminopirimidina (**95**), em benzonitrila, utilizando  $\text{Sn}(\text{OTf})_2$  como catalisador (FIG. 43, p.62). Além destes derivados clovânicos também foram obtidos como produtos desta reação os compostos **106-108**, com esqueleto cariolânico (FIG. 49, p. 66), que despertou grande interesse devido à vasta atividade biológica descrita para esta família de sesquiterpenos (CHEN *Get al.*, 2012).

Figura 48- Fórmula estrutural das as clovanofenilaminas **96-101**, a clovanoaminpirimidina **102**e as clovanofenilamidinas **103-105**

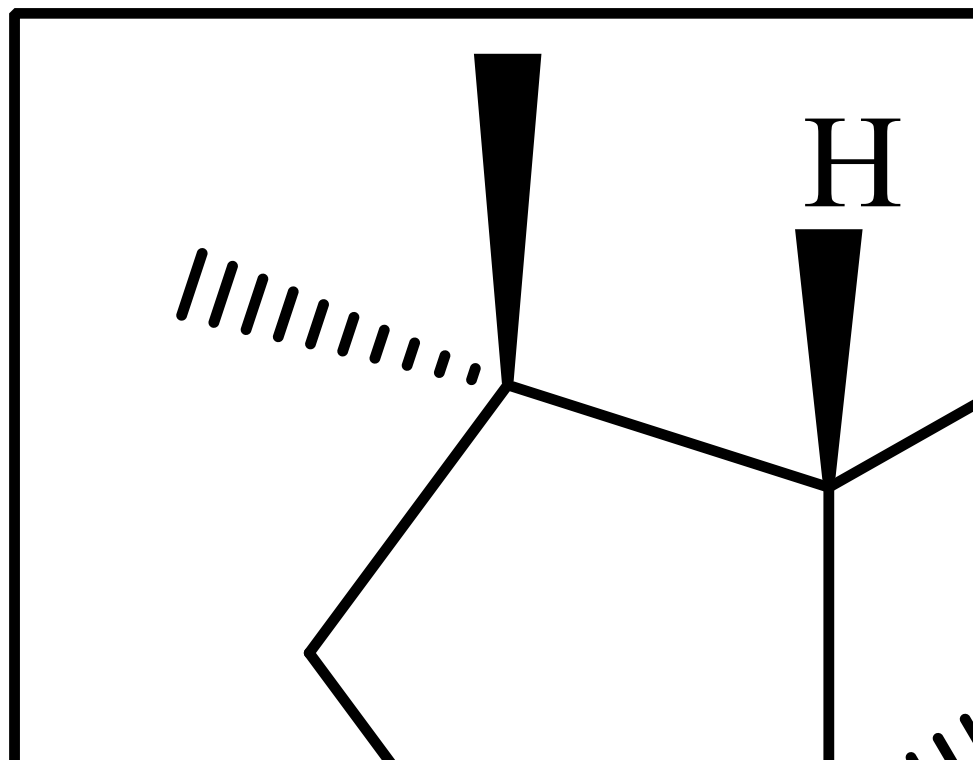
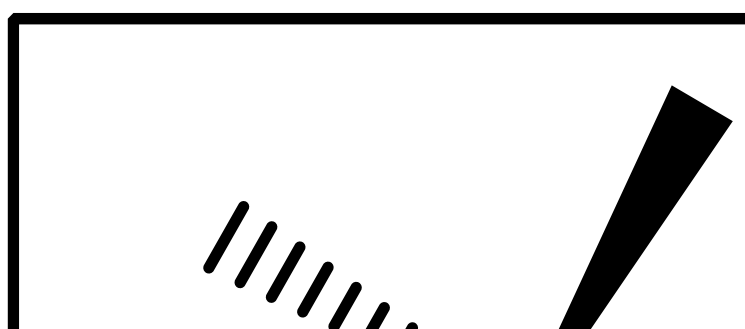


Figura 49- Fórmula estrutural dos fenilaminocariolanos **106-107** e o aminopirimidinacariolano **108**



Além dos derivados **96-108**, foram obtidos os produtos secundários **110** e **111**, já relatados neste trabalho como produtos secundários das reações de obtenção dos 2-arilclovanos **82**, **87-89** (HEYMAN *et al.*, 1994; COLLADO *et al.*, 1996; TSUI; BROWN, 1996; YAROVAYA *et al.*, 2004). Um produto inédito foi obtido a partir da reação entre o solvente benzonitrila, o cátion clovanila (**109**), (FIG. 47, p. 65), e a água, formando o 2 $\beta$ -(N-benzamido)clovan-9 $\alpha$ -ol(**113**) (FIG. 50, p. 67).

Figura 50- Produto inédito (**113**) obtido a partir da reação do óxido de cariofileno (**72**) com fenilaminas

### 3.2.1 Clovanofenilaminas

As reações realizadas para obtenção das clovanofenilaminas **96-101** e a clovanoaminpirimidina **102** (FIG. 48, p. 66) se processaram em um mecanismo semelhante ao descrito para a obtenção dos 2-ariloxiclovanos. Em uma primeira etapa, o óxido de cariofileno formou o carbocátion **112**, sendo este processo auxiliado pelo catalisador triflato de estanho. Em seguida, ocorreu uma ciclização transanular com posterior rearranjo de Wagner-Meerwein e ataque da amina (nucleófilo) ao carbocátion clovanila **109**, originando a clovanofenilamina correspondente (FIG. 51).

Figura 51- Esquema geral para síntese das clovanoaminas, sendo  $R' = \text{CH}_3$  ou H, dependendo da fenilamina utilizada na reação

Dentre as clovanofenilaminas sintetizadas, apenas **96** e **97** já foram relatadas (SÁNCHEZ *et al.*, 2003), sendo as demais produtos inéditos. As clovanofenilaminas foram caracterizadas e identificadas

a partir de análises espectrométricas (Item 4.2, p. 89). Foi possível observar durante as reações das fenilaminas com óxido de cariofileno (**72**) que, ao se utilizar a amina *N*-metil-*N*-anilina(**94**) como reagente, além da clovanofenilamina **99** formada a partir da ligação direta do N com o carbono C-2 do esqueleto clovânico, observaram-se produtos da reação de Friedel-Craft, conforme o esquema abaixo (FIG. 52).

Figura 52- Proposta para formação dos produtos *orto-para* substituídos além da amina correspondente

A formação das clovanofenilaminas **100** e **101** podem ser justificadas devido a presença do grupo substituinte metila na estrutura de **94**, o que dificulta o ataque rápido e direto dos elétrons do nitrogênio da *N*-metil-*N*-fenilamina (**94**), devido ao impedimento estérico. Ao mesmo tempo, devido o efeito indutivo, à doação do par de elétrons por ressonância, atua como um nucleófilo *orto-para* dirigente, possibilitando, assim, a formação de três clovanoaminas distintas (**99**, **100** e **101**).

### 3.2.2 Clovanofenilamidinas

As clovanofenilamidinas **103-105**, inéditas, foram sintetizadas a partir da reação entre o óxido de cariofileno (**72**) e as fenilaminas **90**, **92** e **93**, utilizando triflato de estanho como catalisador, em benzonitrila. Estes derivados foram purificados por cromatografia em coluna e caracterizados por análises espectroscópicas (Item 4.2, p. 89).

A obtenção destes produtos consiste em um mecanismo de reação semelhante ao proposto por Fucks, no qual o  $\text{Sn}(\text{OTf})_2$  (ácido de Lewis) catalisa a ciclização transanular, possibilitando a formação do carbocátion clovanila (**109**), que é atacado pela benzonitrila. Esta por sua vez, sofre um ataque da fenilamina formando as clovanofenilamidinas **103-105** (FIG. 53) em uma reação dominó (SÁNCHEZ *et al.*, 2003).

Figura 53- Mecanismo geral para síntese das clovanofenilamidinas **103-105**

### 3.2.3 Fenilaminocariolanos

Os derivados fenilaminocariolanos **106-107** e o aminopirimidinacariolano **108**, inéditos, foram isolados a partir das reações entre o óxido de cariofileno (**72**) e as fenilaminas **91** e **93**, e a 2-aminopirimidina (**95**). Análises espectroscópicas dos produtos levaram à identificação de esqueletoscariolânico em detrimento do esqueleto clovânico. A formação deste foi proposta a partir de um ataque exocíclico, no qual o alqueno atua como nucleófilo interno para formar o carbocátion **114**, (YAROVAYA *et al.*, 2004), conforme pode ser visualizado no esquema apresentado na FIG. 54.



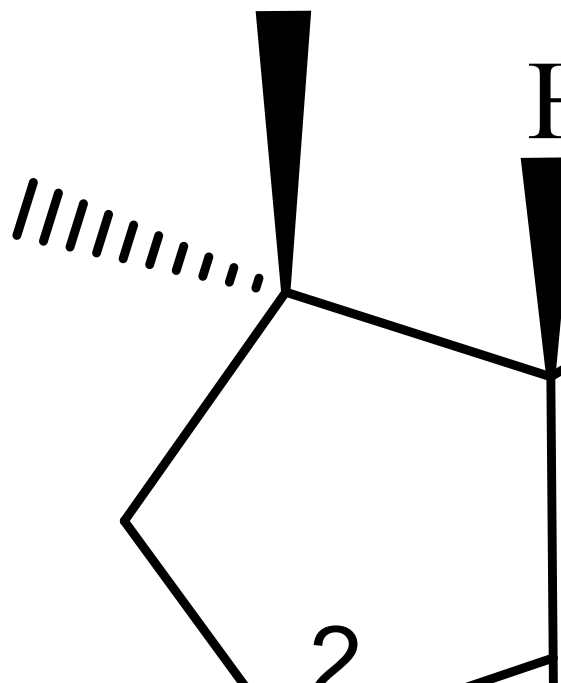
Figura 54- Mecanismo geral para a síntese de derivados cariolânicos

Na maioria das reações entre óxido de cariofileno (**72**) e fenilaminas formaram preferencialmente produtos com esqueleto clovânico, clovanofenilaminas e clovanofenilamidinas. Este fato pode ser explicado devido a instabilidade do anel de quatro membros presente no óxido de cariofileno (**72**). Devido à tensão angular existente neste anel, a ruptura do mesmo com a conversão de **112** para **109** (FIG. 53, p. 69), ocorre preferencialmente. Porém com excesso de fenilaminas no meio reacional, estas conseguem reagir mesmo que em pequena quantidade antes que ocorra uma expansão do anel de quatro membros, através de um ataque nucleofílico ao C-1 e auxiliando a formação da ligação intramolecular de C-12 com C-8, formando assim o esqueleto cariolânico (FIG. 54).

#### 3.2.4 Produtos secundários

Assim como nas reações com ariloxiclovanos foram obtidos produtos de isomerização e rearranjo do óxido de cariofileno (compostos **110** e **111**), também isolou-se, durante a purificação dos produtos, uma benzamida, composto inédito obtido a partir do ataque nucleofílico da molécula de água ao cátion clovanobenzonitrila (**115**) proposto como intermediário da reação de obtenção das clovanofenilamidinas **103-105** (FIG. 55).

Figura 55- Mecanismo proposto para a formação do clovanobenzamido**113** a partir do cátion clovanobenzonitrila (**115**)



As reações realizadas com óxido de cariofileno (**72**) e fenilaminas, em benzonitrila, a partir da catálise por  $\text{Sn}(\text{OTf})_2$ , forneceram compostos com esqueletos cariolano e clovano, resultantes de dois rearranjos distintos do anel de nove membros do óxido de cariofileno (**72**), evidenciando a flexibilidade conformacional do anel cariofileno (COLLADO *et al.*, 1997).

As reações realizadas possibilitaram a síntese catalítica em uma única etapa, obtendo-se derivados clovânicos e cariolânicos oticamente ativos a partir do precursor óxido de cariofileno (**72**) e álcoois **82**, **84-86**, fenilaminas **90-94** ou 2-aminopirimidina (**95**), a fim de permitir um estudo de estrutura atividade contra o fungo *B. cinerea*.

Foram sintetizados quatro 2-ariloxiclovanos (**83**, **87-89**), a partir de álcoois aromáticos dissustituídos e monossustituídos; seis clovanofenilaminas (**96-101**), a partir de fenilaminas substituídas por grupos retiradores de elétrons, como Br e  $\text{NO}_2$  e doadores de elétrons como  $\text{OCH}_3$  e  $\text{NCH}_3$ ; uma clovanoaminopirimidina **102**; um clovanobenzamido **113**; três clovanofenilamidinas **103-105**, a partir da anilina e fenilaminas dissustituídas por Br e  $\text{NO}_2$ ; dois fenilaminocariolanos **106** e **107**, a partir de fenilaminas dissustituídas, por  $\text{OCH}_3$  e Br, e uma cariolanoaminopirimidina **108**.

### 3.3 Bioensaios

Para a realização dos ensaios de atividade antifúngica na Universidade de Cádiz contra o fungo *B. cinerea*, a metodologia utilizada no LaBB/Departamento de Química - ICEX/UFGM foi validada naquela instituição a fim de encontrar as melhores condições para o teste, tais como, meio de cultura, concentração de esporos e tempo de incubação.

Os derivados clovânicos, **96-105** e **113**, e os derivados cariolânicos **106-108**, foram avaliados na concentração fixa de 250 µg mL<sup>-1</sup> quanto à inibição de *B. cinerea* e *P. crustosum*. O bioensaio realizado com o fungo *P. crustosum* teve como objetivo testar a seletividade dos compostos sintetizados, de forma que, se os derivados preparados apresentarem maior inibição contra o fungo *B. cinerea* do que o *P. crustosum*, confirma-se o êxito na utilização da estratégia utilizada neste trabalho, desenho biossintético.

Todas as clovanofenilaminas **96-101**, o 2β-[(2-(*p*-nitrofenil)etoxi)]clovan-9α-ol (**87**) e o 2β-(*N*-benzamido)clovan-9α-ol (**113**) inibiram 100% o fitopatógeno *B. cinerea*.

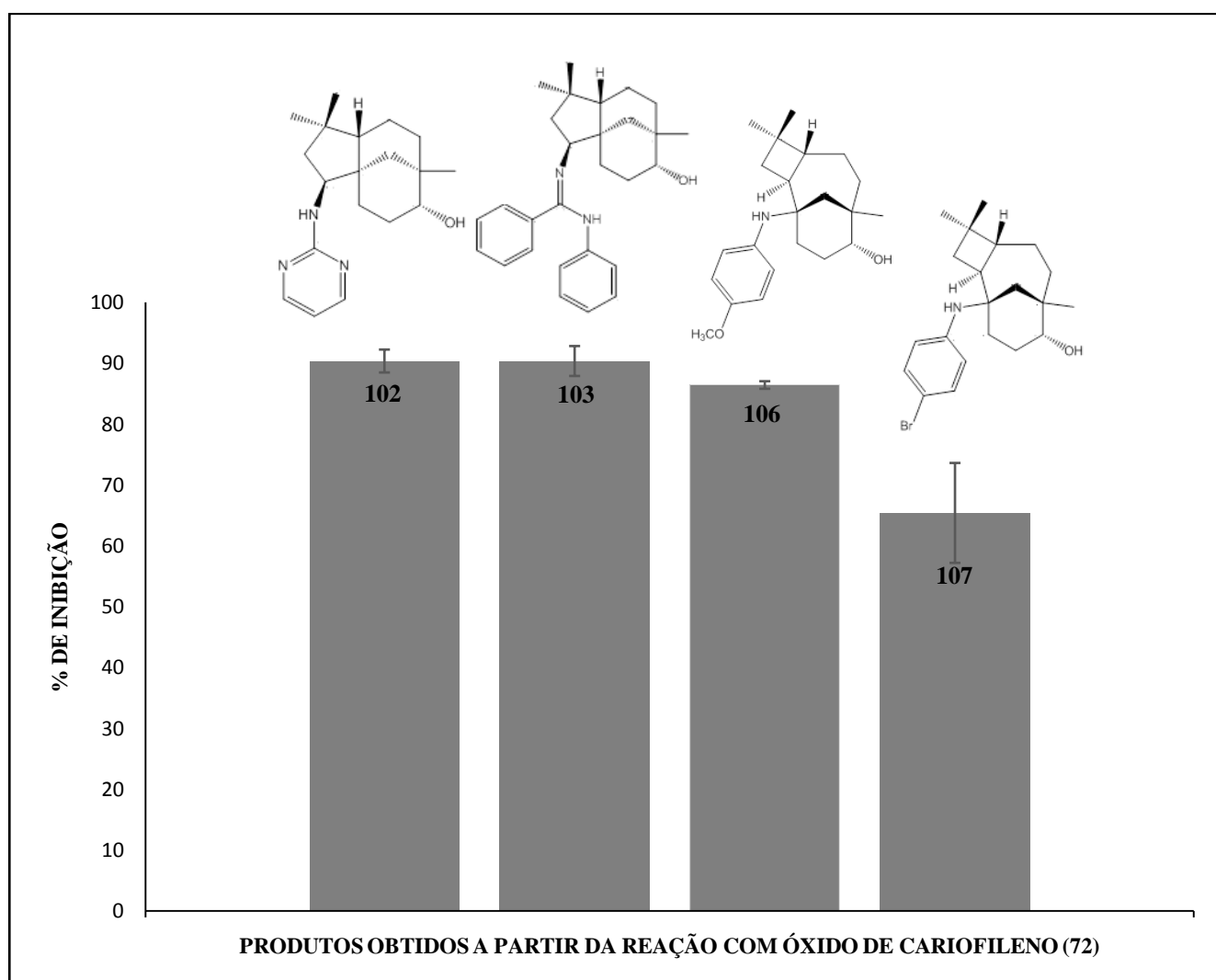
A atividade biológica apresentada pelas clovanofenilaminas **96-101** demonstraram a eficiência do uso de fenilaminas, como cadeia lateral em C-2 do esqueleto clovânico, no processo de inibição, confirmando os relatos encontrados na literatura, que indicam um aumento da atividade antifúngica contra *B. cinerea* quando o derivado clovânico sintetizado apresenta nitrogênio na cadeia lateral (SAIZ-URRA *et al.*, 2009). Cachiba e colaboradores (2012) e Singh e colaboradores (2012) relataram que grupos substituintes como benzamido, *p*-bromofenil e *p*-nitrofenil estão associados a atividades antifúngicas, o que corrobora com a atividade encontrada para os derivados **113**, **87** e **107**.

Pesquisas recentes relatam importantes atividades biológicas, tais como antimicrobiana, antiviral, antituberculose, antimalária e anti-inflamatória, para uma variedade de compostos heterocíclicos, destacando-se compostos que apresentam anel pirimidínico (SUN *et al.*, 2011; ANUPAMA *et al.*, 2012). Neste trabalho foi possível verificar uma inibição de 90,4±1,9 % (GRAF. 5, p. 73) utilizando o composto 2β-(*N*-pirimidin)clovan-9α-ol (**102**) contra *B. cinerea*.

A presença de amidinas como grupos substituintes em diferentes compostos que apresentam atividade antifúngica tem sido relatada como as responsáveis pela atividade biológica avaliada (FRANCO *et al.*, 2011). Laurent e colaboradores (2010) e Stanicki e colaboradores (2013) relataram o uso de monoamidinas e diamidinas como inibidoras do fungo *Pneumocystis jirovecii*, responsável pela pneumonia. *B. cinerea* tem apresentado resistência a muitos fungicidas utilizados em lavouras, desta forma, muitas pesquisas estão sendo realizadas a fim de encontrar compostos que apresentem uma solução para este problema. Hou e colaboradores (2010) realizaram experimentos com a substância propamidina, constatando que este composto apresenta um baixo risco de desenvolvimento à

resistência por parte do fitopatógeno *B. cinerea*. Neste trabalho, as clovanofenilamidinas **103-105** foram testadas contra *B. cinerea*, destacando-se a *N*-(fenil)-*N'*-(9 $\alpha$ -hidroxiclovan-2 $\beta$ -il)-benzamidina (**103**). As clovanoamidinas **104** e **105** não foram ativas contra *B. cinerea*, estes compostos, ao contrário do derivado **103** não substituído, apresentam anéis aromáticos substituídos por grupos retiradores de elétrons, Br e NO<sub>2</sub>, o que resultou na perda da atividade biológica destas clovanoamidinas. Singh e colaboradores (2012) também demonstraram a perda da atividade biológica quando compostos aromáticos foram substituídos pelos grupos retiradores de elétrons Br e NO<sub>2</sub>, em bioensaios contra o fungo *Cryptococcus neoformans*, condizentes com os resultados encontrados neste trabalho.

Gráfico 5- Porcentagem de inibição dos compostos sintetizados, **102**, **103**, **106** e **107** contra *B. cinerea*



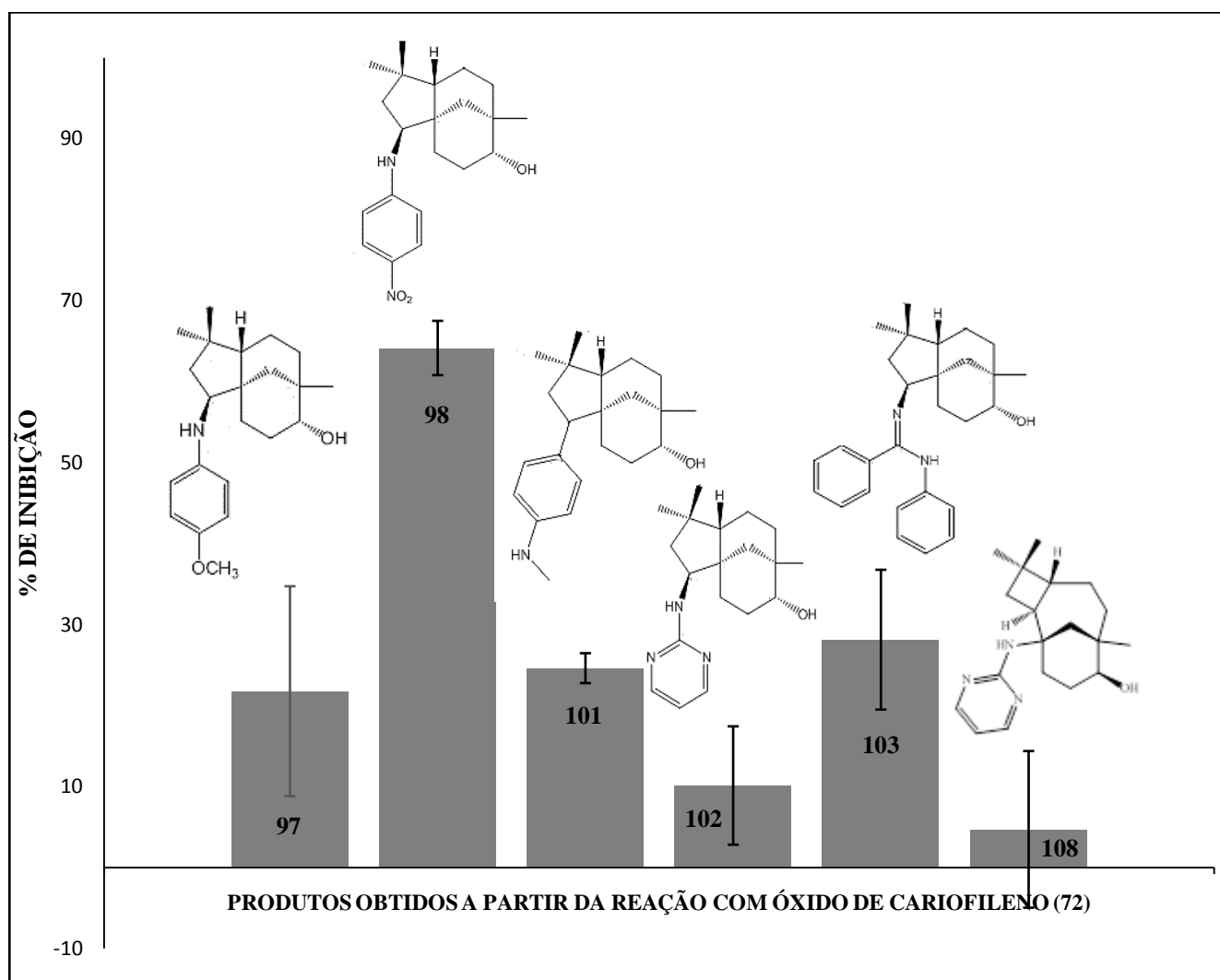
Os fenilcariolanos **106** e **107** inibiram o *B. cinerea* em  $86,4 \pm 0,6$  e  $65,4 \pm 8,2$  % respectivamente (GRAF. 5, p. 73). Bioensaios descritos na literatura indicaram um aumento na atividade biológica frente aos fungos filamentosos *A. flavus* e *A. niger* quando a *p*-anisidina foi utilizada como precursor na síntese dos compostos avaliados (PRASAD *et al.*, 2011). Este resultado

## Resultados e discussão

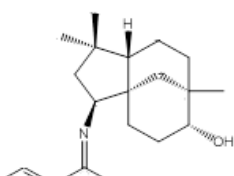
sugeriu que a presença de um grupo substituinte doador de elétrons, OCH<sub>3</sub>, presente no derivado **106**, em detrimento de um grupo retirador de elétrons, Br, presente no derivado **107**, promove um aumento na atividade de inibição contra o fitopatógeno *B. cinerea*.

Afim de verificar a especificidade dos compostos, todos os derivados **96-105**, **106-108** e **113** foram submetidos a testes antifúngicos com *P. crustosum* (GRAF. 6).

Gráfico 6- Porcentagem de inibição dos compostos sintetizados, **97**, **98**, **102**, **101**, **103** e **108** frente ao *P. crustosum*



Entre todos os derivados avaliados contra o *P. crustosum*, apenas  $1\beta$ -(*p*-metoxifenilamino)cariolan-9 $\alpha$ -ol (**106**) e  $1\beta$ -(*p*-bromofenilamino)cariolan-9 $\alpha$ -ol (**107**) inibiram 100% do crescimento fúngico. Estes derivados apresentam esqueleto cariolânico, ou seja, eles não mimetizam os intermediários da biossíntese da toxina botridial (**37**) responsável pela infecção do



fungo *B. cinerea*, e desta forma não se esperava uma atividade seletiva por parte destes compostos. Já dentre os derivados clovânicos, que foram sintetizados a fim de inibir a síntese da toxina botridial (**37**), apenas o  $2\beta$ -(*p*-nitrofenilamino)clovan- $9\alpha$ -ol (**98**) inibiu mais de 50% o crescimento do fungo *P. crustosum* ( $64,1 \pm 3,4$ ). Os demais compostos que foram ativos contra este fungo apresentaram uma porcentagem de inibição menor quando comparados com a atividade apresentada contra o fitopatógeno *B. cinerea*, tal como a clovanofenilamina **101** que inibiu 100 % deste fitopatógeno e contra o *P. crustosum* apresentou apenas  $24,6 \pm 1,8$  % de inibição (GRAF. 6, p. 74).

A ausência de atividade contra o *P. crustosum* apresentada pela maioria dos derivados clovânicos sintetizados mostrou a eficiência da estratégia adotada, desenho biossintético. A síntese de compostos clovânicos que mimetizassem parcialmente intermediários da biossíntese da toxina botridial (**37**) possibilitou a descoberta de uma série de clovanofenilaminas que podem servir como fonte de novos e seletivos fungicidas contra *B. cinerea*.

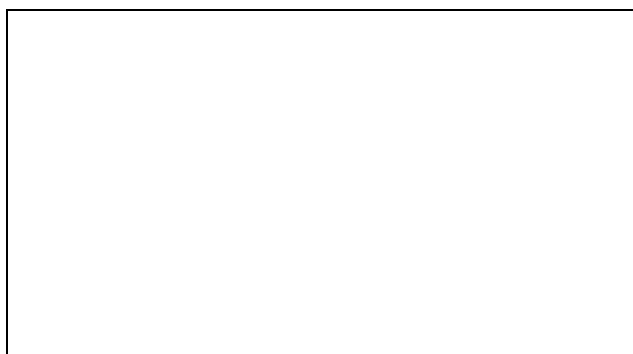
## 4 CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS SINTETIZADOS

Nesta seção apresentam-se as caracterizações dos produtos obtidos a partir da reação de álcoois e compostos nitrogenados com o óxido de cariofileno (**72**). A elucidação estrutural das substâncias sintetizadas foi realizada a partir da análise detalhada dos dados espectroscópicos obtidos nos espectros no IV e de RMN mono e bidimensionais, por espectrometria de massas e por comparação com os dados espectroscópicos de derivados clovânicos já relatados na literatura.

Os espectros obtidos na região do infravermelho, para os compostos sintetizados, apresentaram bandas de absorção entre 2340 e 2360  $\text{cm}^{-1}$ , que se devem ao  $\text{CO}_2$  do ar.

4.1 Identificação dos 2-arylloxyclovanos **82**, **87-89** sintetizados a partir do óxido de cariofileno (**72**) e dos produtos secundários **73**, **110** e **111**

4.1.1  $2\beta$ -[2-(2'-*p*-nitrofenoxi)etoxi]clovan-9 $\alpha$ -ol (**82**)



O composto **82** (FM:  $\text{C}_{23}\text{H}_{33}\text{NO}_5$ ; MM: 403,5141), previamente sintetizado por Saiz-Urra e colaboradores, em 2009 (Equação 5, p. 60) e, neste trabalho, sintetizado a partir de uma metodologia diferente, utilizando TCNE como catalisador, foi obtido como um líquido viscoso de coloração alaranjada. No espectro na região do IV (APÊNDICE Z, p. 168) foram observadas, entre outras absorções, uma banda larga referente ao estiramento de OH em 3446  $\text{cm}^{-1}$ , três bandas fortes de estiramento de C-H de grupo alifático em 2946, 2928 e 2866  $\text{cm}^{-1}$ , duas bandas intensas em 1264 e 1110  $\text{cm}^{-1}$  referente ao estiramento de C-O e uma banda em 1514  $\text{cm}^{-1}$  atribuída ao estiramento de C=C do anel aromático (SILVERSTEIN *et al.*, 2006). Absorções referentes ao grupo  $\text{NO}_2$  foram observadas em 1340  $\text{cm}^{-1}$  e, pôde-se visualizar em 846  $\text{cm}^{-1}$  uma banda referente a dois hidrogênios adjacentes de anéis *para*-substituídos (BIEMANN, 1998).

A atribuição dos sinais no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ , que confirmaram a identificação de **82** como  $2\beta$ -[2-(2'-*p*-nitrofenoxi)etoxi]clovan-9 $\alpha$ -ol, foi realizada utilizando como referência os sinais

já relatados na literatura para o composto  $2\beta$ -[2-(2'-*p*-nitrofenoxi)etoxi]clovan-9 $\alpha$ -ol (TABs. 11 e 12, p. 90 e 91).

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (APÊNDICE A1, p. 169) do composto **82** apresentou um duplete duplo em  $\delta$  3,48 ( $J = 10,0$  e  $5,6$  Hz) atribuído ao hidrogênio H-2 e um simpleto largo em  $\delta$  3,30 atribuído ao hidrogênio H-9, sinais característicos de compostos com esqueleto clovânico (HEYMANN *et al.*, 1994). Observaram-se simpletos referentes aos hidrogênios metílicos em  $\delta$  0,85,  $\delta$  1,01 e  $\delta$  0,93 atribuídos respectivamente aos hidrogênios H-13, H-14 e H-15. Foram também observados um tripleto em  $\delta$  4,18 (t,  $J = 5,0$  Hz) atribuído ao hidrogênio H-1' e um multipeto em  $\delta$  3,89-3,74 atribuído ao hidrogênio H-2'. Sinais referentes à hidrogênios aromáticos foram observados em 6,97 (d,  $J = 9,3$  Hz) e em 8,17 (d,  $J = 9,3$  Hz), sendo atribuídos respectivamente aos hidrogênios, H-2''/H-6'' e H-3''/H-5''.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (APÊNDICE B1, p. 169) mostrou a presença de 21 sinais, sendo cinco referentes a carbonos oxigenados, um em  $\delta$  75,0 atribuído ao carbono C-9 (carbono hidroxilado) equatro em  $\delta$  68,5, em  $\delta$  68,6, em  $\delta$  89,3 e em  $\delta$  141,4 atribuídos respectivamente aos carbonos C-1', C-2', C-2 e C-1'' (carbonos pertencentes ao grupo funcional éter). Observou-se ainda um sinal referente a carbono nitrogenado em  $\delta$  164,0, sendo atribuído ao carbono C-4'' (carbono ligado ao grupo  $\text{NO}_2$ ) e sinais em  $\delta$  114,6 e  $\delta$  125,8, referentes aos carbonos aromáticos C-2''/C-6'' e C-3''/C-5'' respectivamente.

#### 4.1.2 $2\beta$ -[2-(*p*-nitrofenil)etoxi]clovan-9 $\alpha$ -ol (**87**)



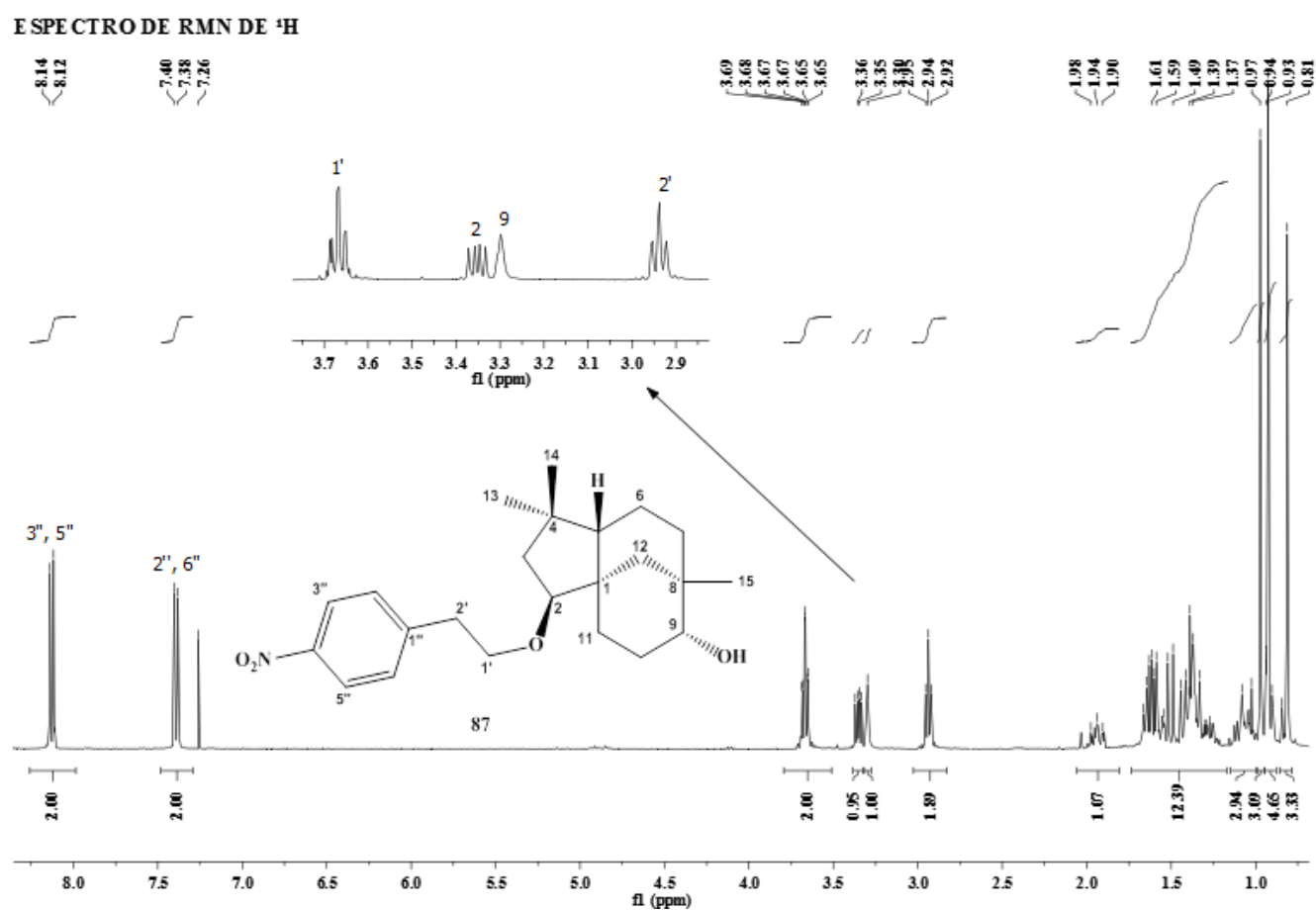
O composto **87** apresentou-se como um líquido viscoso de coloração amarelada. No espectro na região do IV (APÊNDICE C1, p. 170) foram observadas bandas referentes ao estiramento de OH em  $3430\text{ cm}^{-1}$ , estiramento C=C do anel aromático em  $1518\text{ cm}^{-1}$ , estiramento de  $\text{NO}_2$  em  $1344\text{ cm}^{-1}$  e estiramento de C-O em  $1108\text{ cm}^{-1}$  (SILVERSTEIN *et al.*, 2006).



## Caracterização dos compostos sintetizados

As atribuições dos sinais nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ , que confirmaram a formação do anel clovânico, foram realizadas utilizando como referência os sinais relatados na literatura para o composto **82** (TABs. 11 e 12, p. 90 e 91). No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (FIG. 56) observou-se a presença de um duplo duplo em  $\delta$  3,35 atribuído ao hidrogênio H-2 ( $J=9,8$  e  $5,6\text{Hz}$ ) e um simpleto largo em  $\delta$  3,30 devido a H-9, sinais característicos do esqueleto clovânico. Sinais referentes a hidrogênios metílicos foram observados em  $\delta$  0,81,  $\delta$  0,97 e  $\delta$  0,93 atribuídos aos hidrogênios H-13, H-14 e H-15 respectivamente. Foram também observados um triploto em  $\delta$  2,94 ( $J=6,5\text{Hz}$ ) e um multipeto em  $\delta$  3,70-3,64, com integrais referentes a dois hidrogênios cada, atribuídos aos hidrogênios H-2' e H-1', respectivamente. Na região referente a hidrogênios aromáticos observou-se a presença de dois dupletos em  $\delta$  7,39 ( $J=8,8\text{ Hz}$ ) e em  $\delta$  8,13 ( $J=8,8\text{ Hz}$ ) devidos a presença de um substituinte na posição *para* do anel aromático. O sinal mais deslocado ( $\delta$  8,13) foi atribuído aos hidrogênios H-3''/H-5'', uma vez que hidrogênios vizinhos ao substituinte  $\text{NO}_2$  estão mais desblindados do que os H-2''/H-6'', sendo, a estes últimos, atribuído o sinal em  $\delta$  7,39 (BIEMANN, 1998).

Figura 56- Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do composto **87**

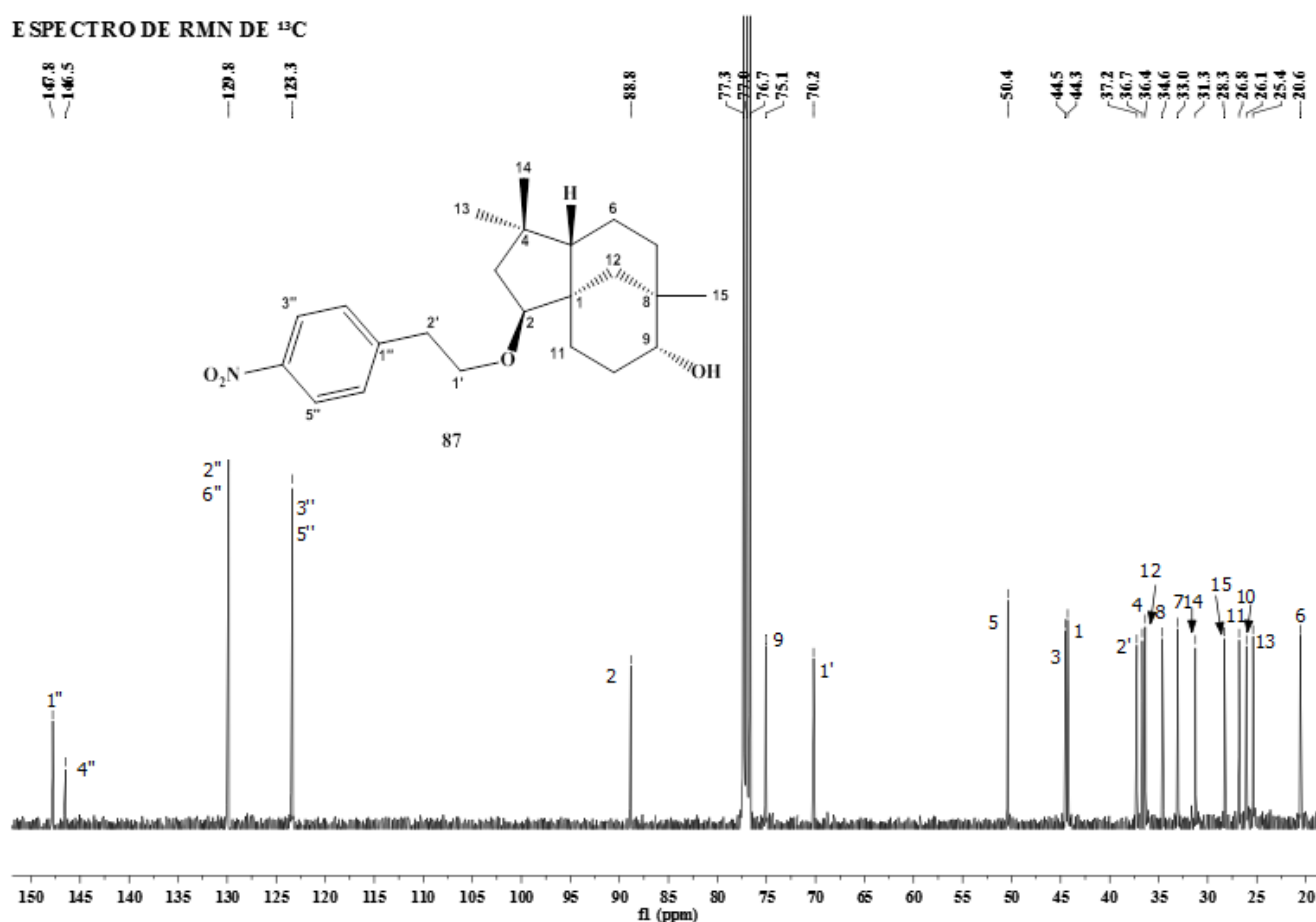


## Caracterização dos compostos sintetizados

A atribuição dos demais sinais de hidrogênio foram realizadas a partir do mapa de contornos COSY (APÊNDICE D1, p. 170), no qual foram observadas as correlações entre os hidrogênios, H-2 e H-3, H-9 e H-10, H-10 e H-11, H-12 $\alpha$  e H-12 $\beta$ , H-1' e H-2', H-3'' e H-2'', H-5'' e H-6''.

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (FIG. 57) foram observados 21 sinais, dos quais três referem-se a carbonos oxigenados, um em  $\delta$  75,1 atribuído ao carbono C-9 (carbono hidroxilado) e dois, em  $\delta$  70,2 e em  $\delta$  88,8, atribuídos respectivamente aos carbonos C-1' e C-2 (carbonos pertencentes ao grupo funcional éter). Observou-se, ainda, um sinal referente a carbono nitrogenado em  $\delta$  146,5, atribuído ao carbono C-4'' (carbono ligado ao grupo  $\text{NO}_2$ ).

Figura 57- Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do composto **87**



A partir do mapa de contornos HSQC (APÊNDICE E1-F1, p. 171) foram estabelecidas as conectividades entre os hidrogênios com os respectivos carbonos, sendo possível atribuir os sinais observados em  $\delta$  129,8 aos carbonos C-2''/C-6'' e, em  $\delta$  123,3, aos carbonos C-3''/C-5''.

Pelo mapa de contornos HMBC (APÊNDICE G1-H1, p. 172) observou-se a correlação  $^3J_{\text{CH}}$  entre o hidrogênio H-1' e o carbono C-2, confirmando a posição relativa destes dois átomos de

carbono do anel clovânico (FIG. 58, p. 80). A disposição tridimensional dos átomos foi determinada pelas correlações observadas entre os hidrogênios no mapa de contornos NOESY (FIG. 58, p. 80)(APÊNDICE II, p. 173).

Figura 58- Correlações visualizadas no mapa de contornos HMBC ( $\rightarrow$ ) e no mapa de contornos NOESY ( $\leftrightarrow$ ) referentes ao composto  $2\beta$ -[2-(*p*-nitrofenil)etoxi]clovan- $9\alpha$ -ol (**87**)

No espectro de massas EM-ESI positivo do composto **87**, obtido num ESI-Q-TOF (APÊNDICE J1, p. 173) foram observados íons referentes aos adutos formados com sódio no processo de ionização,  $[M+Na]^+$  em  $m/z$  410,2300 e  $[2M+Na]^+$  em  $m/z$  797,4708.

### **$2\beta$ -[2-(*p*-nitrofenil)etoxi]clovan- $9\alpha$ -ol (**87**)**



Líquido viscoso de coloração amarelada;  $[\alpha]_{20}^D$ : 26,39 ° (c = 33,8 mg mL<sup>-1</sup>, CHCl<sub>3</sub>); **IV (KBr)  $\nu_{max}$  (cm<sup>-1</sup>):** 3430 ( $\nu_{O-H}$ ), 2948, 2922, 2868 ( $\nu_{C-H}$ ), 1518 ( $\nu_{C=C}$ ), 1344 ( $\nu_{NO_2}$ ), 1108 ( $\nu_{C-O}$ ). **RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm):** 8,13 (d, 2H, H-3'', H-5'',  $J=8,8$ Hz), 7,39 (d, 2H, H-2'', H-6'',  $J=8,8$ Hz), 3,70-3,64 (m, 2H, H-1'), 3,35 (dd, 1H, H-2 $\alpha$ ,  $J=9,8$  e 5,6Hz), 3,30 (sl, 1H, H-9 $\beta$ ), 2,94 (t, 2H, H-2',  $J=6,5$ Hz), 2,01-1,87 (m, 1H, H-10 $\beta$ ), 1,68-1,56 (m, 2H, H-3 $\beta$ , H-11 $\beta$ ), 1,56-1,53 (m, 1H, H-10 $\alpha$ ), 1,50 (d, 1H, H-12 $\beta$ ,  $J=12,7$ Hz), 1,46-1,23 (m, 4H, H-3 $\alpha$ , H-6, H-7 $\beta$ , H-5 $\beta$ ), 1,15-0,99 (m, 2H, H-7 $\alpha$ , H-11 $\alpha$ ), 0,97 (s, 3H, H-14), 0,93 (s, 3H, H-15), 0,92 (d, 1H, H-12 $\alpha$ ,  $J=12,7$ Hz), 0,81 (s, 3H, H-13). **RMN de <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm):** 147,8 (C-1''), 146,5 (C-4''), 129,8 (C-2'', C-6''), 123,3 (C-3'', C-5''), 88,8 (C-2), 75,1 (C-9), 70,2 (C-1'), 50,4 (C-5), 44,5 (C-3), 44,3 (C-1), 37,2 (C-2'), 36,7 (C-4), 36,4 (C-12), 34,6 (C-8), 33,0 (C-7), 31,3 (C-14), 28,3 (C-15), 26,8 (C-11), 26,1 (C-10), 25,4 (C-13), 20,6 (C-6). **HMBC (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** H-2'' (C-2') - <sup>3</sup> $J_{CH}$ , H-3'' (C-4'') - <sup>2</sup> $J_{CH}$ , H-3'' (C-1'', C-5'') - <sup>3</sup> $J_{CH}$ , H-5'' (C-1'', C-3'') - <sup>3</sup> $J_{CH}$ , H-6'' (C-2'') - <sup>3</sup> $J_{CH}$ , H-1' (C-2') - <sup>2</sup> $J_{CH}$ , H-1' (C-2, C-1'') - <sup>3</sup> $J_{CH}$ , H-2 (C-1, C-3) <sup>2</sup> $J_{CH}$ , H-2 (C-11, C-1') - <sup>3</sup> $J_{CH}$ , H-10 (C-9) - <sup>2</sup> $J_{CH}$ , H-12 (C-9) - <sup>3</sup> $J_{CH}$ , H-13 (C-4) - <sup>2</sup> $J_{CH}$ , H-13 (C-3, C-5, C-14) - <sup>3</sup> $J_{CH}$ , H-14 (C-4) - <sup>2</sup> $J_{CH}$ , H-14

(C-3, C-5, C-13) -  $^3J_{CH}$ , H-15 (C-8) -  $^2J_{CH}$ , H-15 (C-7, C-9, C-12) -  $^3J_{CH}$ . **COSY (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** H-1' x H-2', H-3'' x H-2'' e H-5'' x H-6'', H-2 x H-3, H-9 x H-10, H-10 x H-11, H-12 $\alpha$  x H-12 $\beta$ . **NOESY (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** H-2 $\alpha$  x H-13 $\alpha$ , H-2 $\alpha$  x H-12 $\alpha$ , H-9 $\beta$  x H-10 $\beta$ , H-9 $\beta$  x H-15 $\beta$ , H-12 $\beta$  x H-15 $\beta$ . **EM m/z:** 410,2300 [M+Na]<sup>+</sup>; 797,4708[2M+Na]<sup>+</sup>. **MM:** 387,2410. **FM:** C<sub>23</sub>H<sub>33</sub>NO<sub>4</sub>.

#### 4.1.3 2 $\beta$ -[2-(2'-fenoxi)etoxi]clovan-9 $\alpha$ -ol (**88**)



O derivado **88** apresentou-se como um líquido amarelo viscoso. O espectro na região do IV (APÊNDICE L1, p. 174) obtido para este composto apresentou uma banda larga referente ao estiramento de OH em 3436 cm<sup>-1</sup>, três bandas fortes de estiramento C-H de grupo alifático em 2944, 2928 e 2864 cm<sup>-1</sup>, uma banda de estiramento C=C do anel aromático em 1600 cm<sup>-1</sup> e duas bandas intensas referentes aos estiramentos C-O em 1248 e 1114 cm<sup>-1</sup>. Absorções referentes a anel aromático monossustituído foram observadas em 752 e 690 cm<sup>-1</sup> (BIEMANN, 1998).

Este composto difere do derivado **82** apenas pela ausência de substituinte no anel aromático, uma vez que **82** apresenta o grupo NO<sub>2</sub> na posição *para* do anel aromático. Desta forma, a caracterização estrutural de **88** foi realizada a partir da comparação dos dados espectroscópicos encontrados com aqueles apresentados para o derivado **82** (TAB. 11 e 12, p. 90 e 91).

Ao se analisar o espectro de RMN de <sup>1</sup>H (FIG. 59, p. 82) observaram-se sinais em  $\delta$  3,53 (dd,  $J = 10,2$  e  $5,6$  Hz) e em  $\delta$  3,31 (sl) atribuídos respectivamente, aos hidrogênios H-2 e H-9 do esqueleto clovânico. Os simpletos em  $\delta$  0,87, 0,96 e 1,04 foram atribuídos aos grupos metílicos, e devidamente identificados como sendo H-13, H-15 e H-14 respectivamente. Na região de aromáticos foram observados sinais, em  $\delta$  6,97- 6,94 e em  $\delta$  7,32-7,25, sendo o multiplete em  $\delta$  7,32-7,25 atribuído aos hidrogênios H-3'' e H-5'' e em  $\delta$  6,97-6,94 atribuído aos hidrogênios H-2'', H-4'' e H-6''. Com o auxílio do mapa de contornos COSY (APÊNDICE M1, p. 174), foi feita a atribuição dos demais sinais de hidrogênio.

Com relação ao espectro de RMN de <sup>13</sup>C, foram observados 21 sinais, dos quais cinco referem-se a carbonos oxigenados, um em  $\delta$  75,2, foi atribuído ao carbono hidroxilado C-9 e quatro atribuídos a carbonos pertencentes à função éter, em  $\delta$  67,5 (C-1'), em  $\delta$  68,9 (C-2'), em  $\delta$  89,1 (C-2) e em  $\delta$  158,9

## Caracterização dos compostos sintetizados

(C-1''). Sinais compreendidos em uma faixa entre  $\delta$  159 e 114 foram atribuídos aos carbonos do anel aromático (FIG. 60, p. 82).

Figura 59- Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do composto **88**

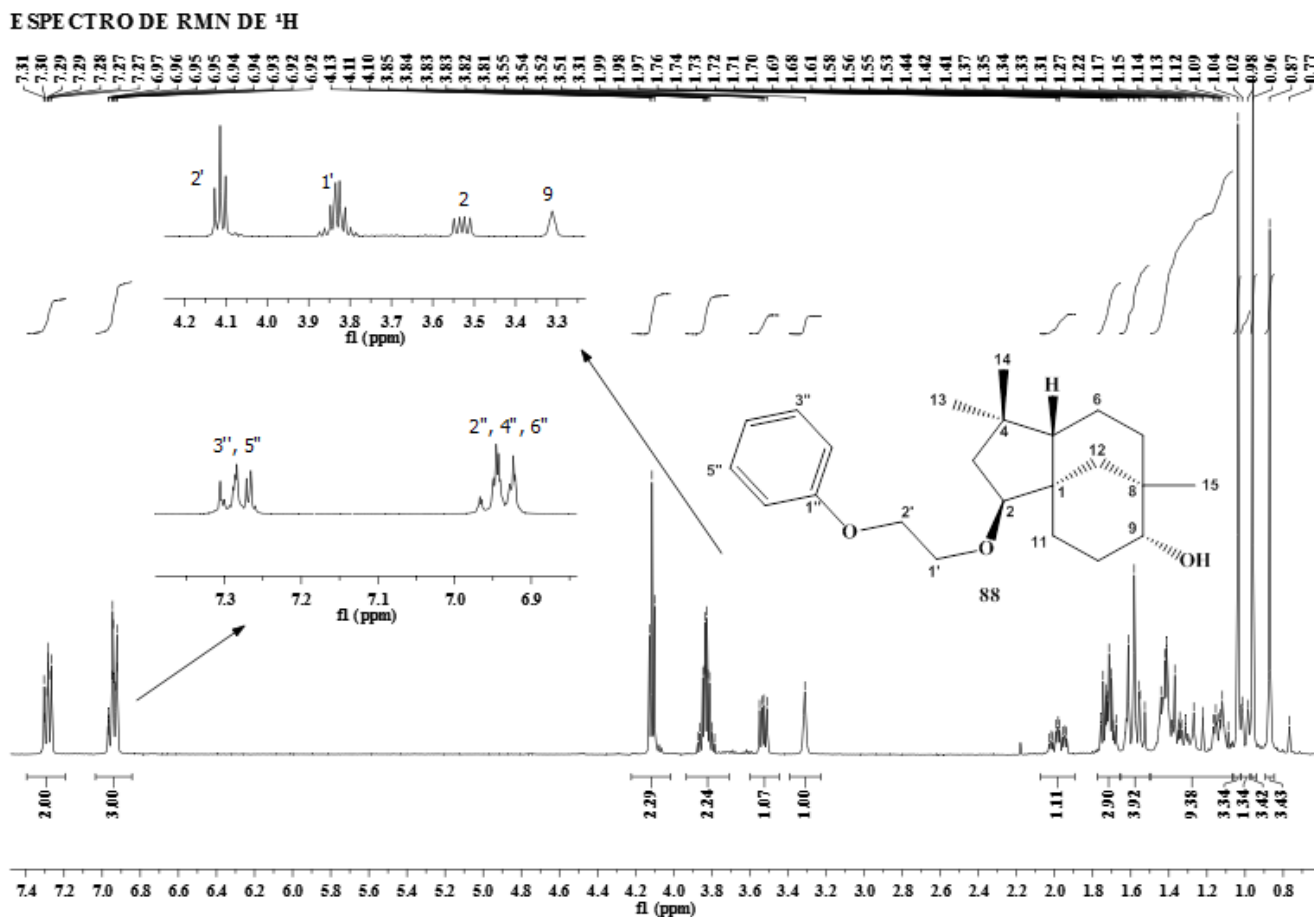
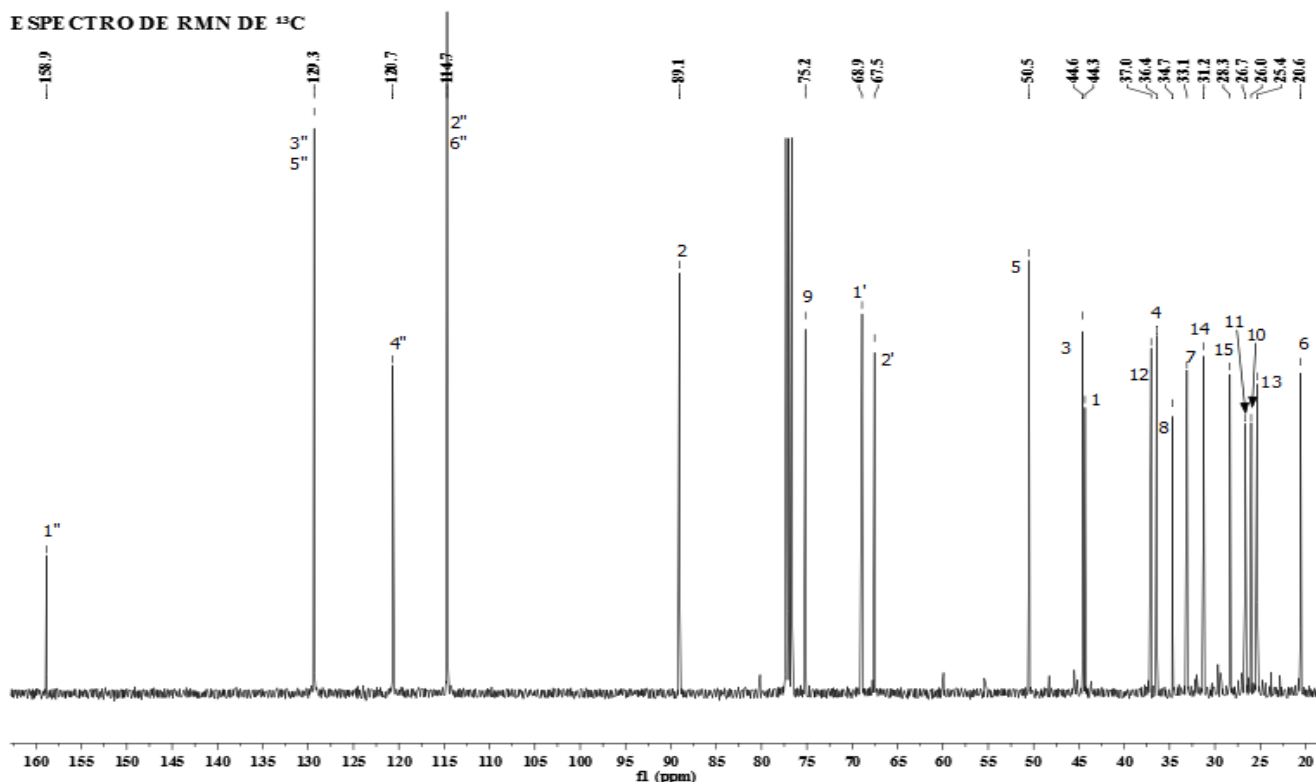


Figura 60- Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do composto **88**



Através do mapa de contornos HSQC foi possível determinar todos os sinais de carbono (APÊNDICE N1-O1, p. 175). A ligação entre o oxigênio da cadeia lateral do esqueleto clovânico e o carbono C-2 foi confirmada através do mapa de contornos HMBC, no qual foram observados os acoplamentos  $^3J_{\text{CH}}$  entre o hidrogênio H-1' e o carbono C-2 e entre o hidrogênio H-2 e o carbono C-1'. Ainda com o auxílio do mapa de contornos HMBC foi possível determinar a ordem de conexão dos demais carbonos (APÊNDICE P1-Q1, p. 176).

No espectro de massas EM-ESI positivo do composto **88**, obtido num ESI-Q-TOF (APÊNDICE R1, p. 177) foram observados íons referentes aos adutos formados com sódio  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  em  $m/z$  381,2404 e  $[2\text{M}+\text{Na}]^+$  em  $m/z$  739,4924.

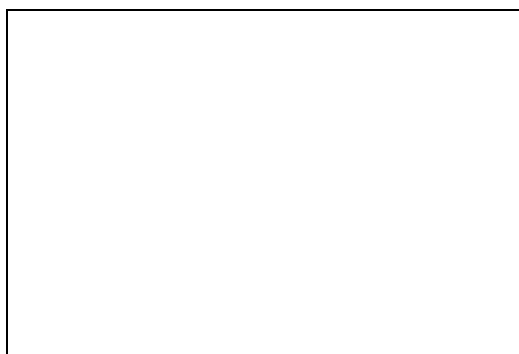
### 2 $\beta$ -[2-(2'-fenoxi)eto]clovan-9 $\alpha$ -ol (**88**)



Líquido viscoso de coloração amarelada;  $[\alpha]_{20}^{\text{D}}$ : 4,70° (c = 33,8 mg mL<sup>-1</sup>, CHCl<sub>3</sub>); **IV (KBr) v<sub>max</sub> (cm<sup>-1</sup>):** 3436 (ν O-H), 2944, 2928 e 2864 (ν C-H), 1600 (ν C=C), 1248 e 1114 (ν C-O), 752 e 690 (δ C<sub>sp<sup>2</sup>-H}). **RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 7,32-7,25 (m, 2H, H-3'', H-5''), 6,97-6,94 (m, 2H, H-2'', H-4'', H-6''), 4,11 (t, 1H, H-2', J=5,2Hz), 3,89-3,75 (m, 1H, H-1'), 3,52 (dd, 1H, H-2 $\alpha$ , J=10,2 e 5,6Hz), 3,31 (sl, 1H, H-9 $\beta$ ), 2,06-1,92 (m, 1H, H-10 $\beta$ ), 1,78-1,66 (m, 2H, H-3 $\beta$ , H-11 $\beta$ ), 1,65-1,50 (m, 3H, H-12 $\beta$ , H-10 $\alpha$ , H-3 $\alpha$ ), 1,47-1,19 (m, 3H, H-6, H-5, H-7 $\beta$ ), 1,18-1,08 (m, 2H, H-11 $\alpha$ , H-7 $\alpha$ ), 1,04 (s, 3H, H-14), 1,0 (d,</sub>

$^1\text{H}$ , H-12 $\alpha$ , 12,9Hz), 0,96 (s, 3H, H-15), 0,87 (s, 3H, H-13). **RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm):** 158,9 (C-1''), 129,3 (C-3'', C-5''), 120,7 (C-4''), 114,7 (C-2'', C-6''), 89,1 (C-2), 75,2 (C-9), 68,9 (C-1'), 67,5 (C-2'), 50,5 (C-5), 44,6 (C-3), 44,3 (C-1), 37,0 (C-12), 36,4 (C-4), 34,7 (C-8), 33,1 (C-7), 31,2 (C-14), 28,3 (C-15), 26,7 (C-11), 26,0 (C-10), 25,4 (C-13), 20,6 (C-6). **HMBC (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):** H-1' (C-2') -  $^2J_{\text{CH}}$ , H-1' (C-2) -  $^3J_{\text{CH}}$ , H-2' (C-1') -  $^2J_{\text{CH}}$ , H-2' (C-1'') -  $^3J_{\text{CH}}$ , H-2'' (C-1'', C-3'') -  $^2J_{\text{CH}}$ , H-2'' (C-6'') -  $^3J_{\text{CH}}$ , H-3'' (C-2'', C-4'') -  $^2J_{\text{CH}}$ , H-3'' (C-1'', C-5'') -  $^3J_{\text{CH}}$ , H-4'' (C-3'', C-5'') -  $^2J_{\text{CH}}$ , H-5'' (C-4'', C-6'') -  $^2J_{\text{CH}}$ , H-5'' (C-1'', C-3'') -  $^3J_{\text{CH}}$ , H-6'' (C-1'', C-5'') -  $^2J_{\text{CH}}$ , H-6'' (C-2'') -  $^3J_{\text{CH}}$ , H-2 (C-1, C-3) -  $^2J_{\text{CH}}$ , H-2 (C-1', C-11, C-12) -  $^3J_{\text{CH}}$ , H-3 (C-2, C-4) -  $^2J_{\text{CH}}$ , H-3 (C-5, C-13) -  $^3J_{\text{CH}}$ , H-12 (C-8) -  $^2J_{\text{CH}}$ , H-12 (C-7) -  $^3J_{\text{CH}}$ , H-13 (C-4) -  $^2J_{\text{CH}}$ , H-13 (C-3, C-5, C-14) -  $^3J_{\text{CH}}$ , H-14 (C-4) -  $^2J_{\text{CH}}$ , H-14 (C-3, C-5, C-13) -  $^3J_{\text{CH}}$ , H-15 (C-8) -  $^2J_{\text{CH}}$ , H-15 (C-7, C-9, C-12) -  $^3J_{\text{CH}}$ . **COSY (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):** H-1' x H-2', H-2'' x H-3'', H-3'' x H-4'', H-4'' x H-5'' e H-5'' x H-6'', H-2 x H-3, H-9 x H-10, H-10 x H-11, H-12 $\alpha$  x H-12 $\beta$ . **EM  $m/z$ :** 381,2404  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ; 739,4924  $[2\text{M}+\text{Na}]^+$ . **MM:** 358,5164. **FM:**  $\text{C}_{23}\text{H}_{34}\text{O}_3$ .

#### 4.1.4 $2\beta$ -(2-feniletoksi)clovan-9 $\alpha$ -ol (**89**)



O produto **89** apresentou-se como um sólido branco, com temperatura de fusão na faixa entre 77,5-80,4°C. O espectro na região do IV (APÊNDICE S1, p. 177) apresentou uma banda larga em 3426  $\text{cm}^{-1}$  referente ao estiramento da ligação O-H, três bandas intensas em 2944, 2926 e 2862  $\text{cm}^{-1}$  referentes a estiramentos de ligações C-H de carbono saturado, uma banda de estiramento C=C do anel aromático em 1456  $\text{cm}^{-1}$  e uma banda em 1106  $\text{cm}^{-1}$  atribuída ao estiramento C-O. As bandas em 698 e 750  $\text{cm}^{-1}$  confirmam a presença de cinco hidrogênios adjacentes referentes à deformação angular em anéis monossustituídos (BIEMANN, 1998).

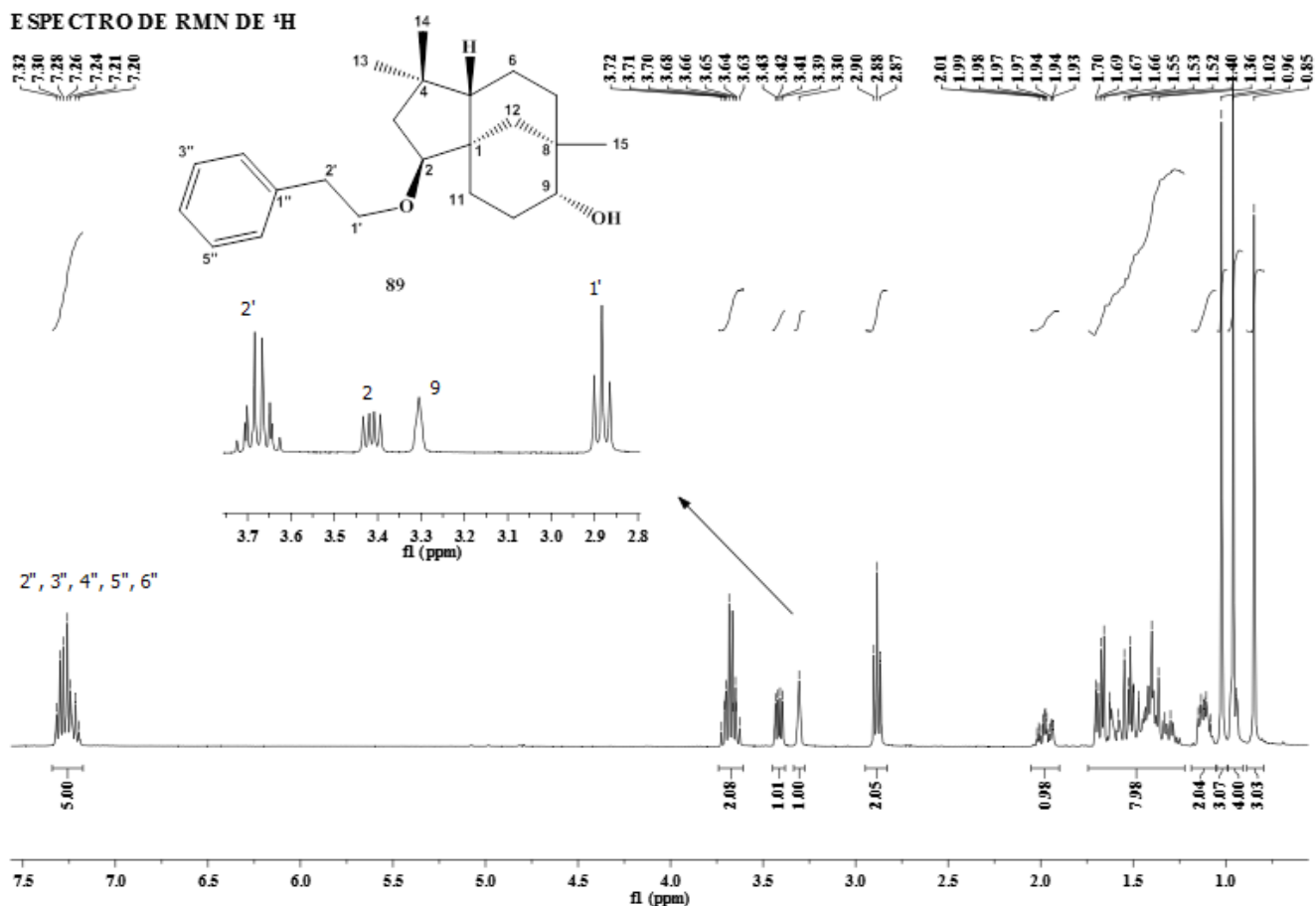
A estrutura de **89** foi elucidada a partir da comparação dos dados espectroscópicos desta substância com os dados encontrados para os 2-arylclovanos **82**, **87** e **88**. No espectro de RMN de  $^1\text{H}$

(FIG. 61, p. 85) foram observados sinais característicos da formação do esqueleto clovânico, tais como um duplete duplo em  $\delta$  3,41 atribuído ao hidrogênio H-2 ( $J = 10,2$  e  $5,6$  Hz) e um simpleto largo em  $\delta$  3,30 atribuído ao hidrogênio H-9. Os simpletos em  $\delta$  0,85, 0,95 e 1,02 foram atribuídos aos grupos metilênicos como sendo H-13, H-15 e H-14 respectivamente.

A diferença entre este produto e o composto **88** deve-se à ausência do oxigênio entre o carbono 1'' do anel aromático e o carbono 2' do grupo alquila da cadeia lateral. Esta modificação pode ser observada no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **89**, pois o sinal dos hidrogênios aromáticos aparece como um único multiplete em  $\delta$  7,38-7,14. Como um grupo alquila está diretamente ligado ao anel aromático e o efeito indutivo que este grupo exerce não é capaz de provocar blindagens muito diferentes nos hidrogênios do anel, todos os hidrogênios absorvem em frequências muito próximas. Também foi possível observar o deslocamento do sinal atribuído ao hidrogênio H-2', que no composto **88** aparece mais desblindado devido a presença do oxigênio, como um tripleto em  $\delta$  4,11 ( $J = 5,2$  Hz), e agora no composto **89** aparece em  $\delta$  2,88 (t,  $J = 7,2$  Hz). A atribuição dos demais sinais de hidrogênio foi feita através do mapa de contornos COSY (APÊNDICE T1, p. 178), que por sua vez apresentou correlações similares às observadas para os derivados **82**, **87** e **88**. Uma vez que todos os sinais de hidrogênios foram atribuídos o mapa de contornos HSQC (APÊNDICE U1-V1, p. 178-179) foi usado para determinar os sinais de carbono.

Figura 61- Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do composto **89**





No espectro de RMN de <sup>13</sup>C (FIG. 62, p. 86), assim como para os 2-arylclovanos previamente sintetizados, foram visualizados 21 sinais, dos quais os sinais em  $\delta$  71,6, em  $\delta$  75,1 e em  $\delta$  88,6 foram atribuídos respectivamente aos carbonos C-1', C-9 e C-2. Os sinais compreendidos em uma faixa entre  $\delta$  125-140 foram atribuídos aos carbonos referentes ao anel aromático. Ainda com o auxílio do espectro de RMN de <sup>13</sup>C, verificou-se que no composto **89** o sinal atribuído ao carbono C-2' se apresentou menos desblindado ( $\delta$  37,0), devido à ausência do oxigênio, quando comparado com os sinais atribuídos ao carbono correspondente nos espectros de RMN de <sup>13</sup>C de **82** ( $\delta$  68,6) e **88** ( $\delta$  67,5).

A ligação entre o oxigênio do reagente feniletanol (**86**) e o carbono C-2 do esqueleto clovânico foi confirmada através do mapa de contornos HMBC (APÊNDICE X1-Z1, p. 179-180), no qual foram observadas as correlações <sup>3</sup>J<sub>CH</sub> entre o hidrogênio H-1' e o carbono C-2 e entre o hidrogênio H-2 e o carbono C-1'; ainda com o auxílio do mapa de contornos HMBC foi possível determinar a ordem de conexão dos demais carbonos. No mapa de contornos NOESY (APÊNDICE A2, p. 180) foram observadas algumas correlações similares às detectadas no mapa de contornos NOESY de **87** (APÊNDICE II, p. 173), mas também foram visualizadas novas correlações que corroboram a

disposição espacial proposta para os 2-arilclovanos sintetizados, tais como H-2 $\alpha$  x H-3 $\alpha$ , H-11 $\beta$  x H-12 $\beta$  e H-12 $\beta$  x H-15 $\beta$ (FIG. 63).

Figura 62-Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do composto **89**

**ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$**

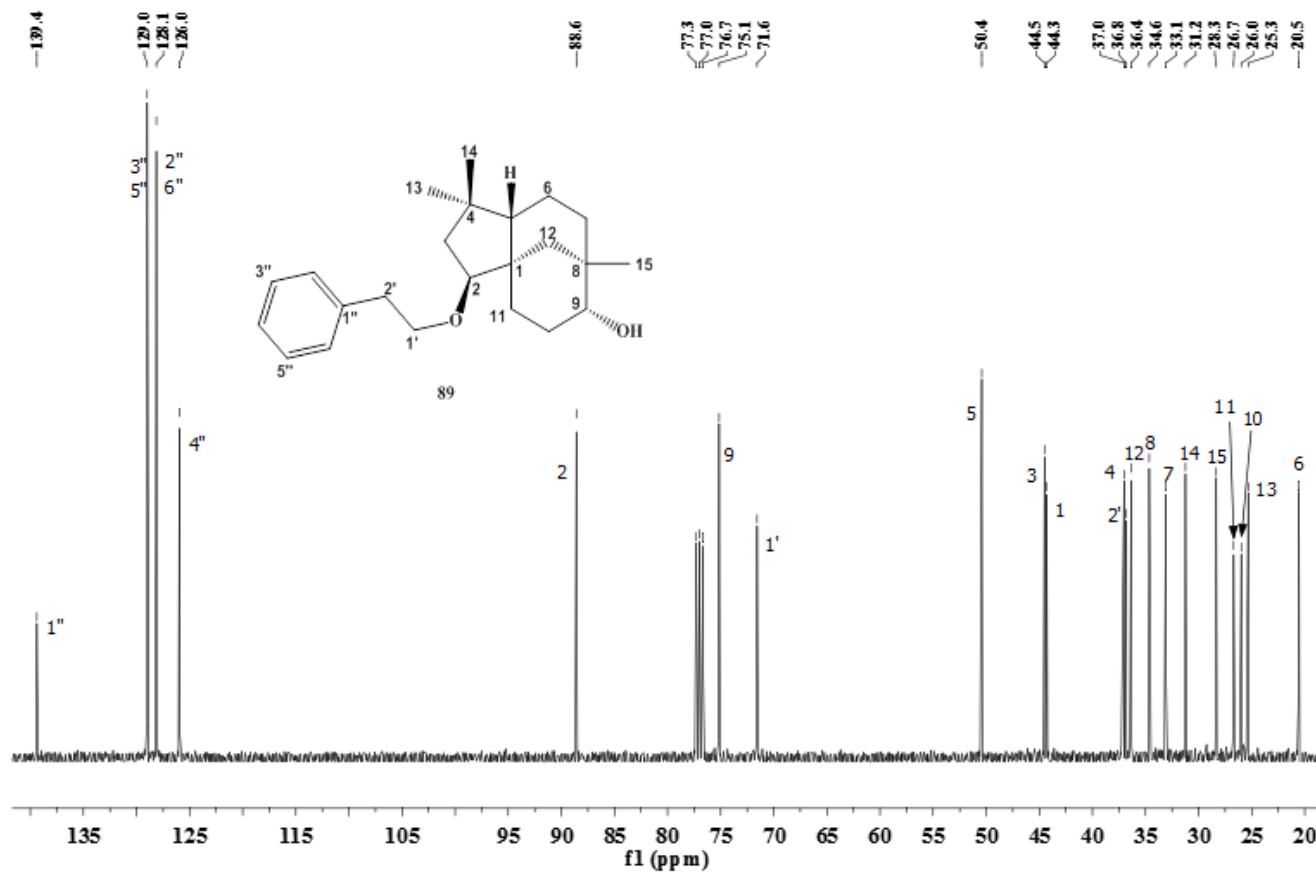
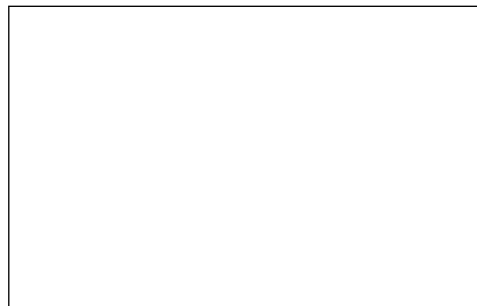


Figura 63- Correlações visualizadas no mapa de contornos NOESY referentes ao composto 2 $\beta$ -(2-feniletoxi)clovan-9 $\alpha$ -ol (**89**)

No espectro de massas EM-ESI positivado composto **89** (APÊNDICE B2, p. 181), obtido em um espectrofotômetro ESI-Q-TOF foi possível visualizar opico referente ao aduto  $[M+Na]^+$  em  $m/z$  365,2467.

**2 $\beta$ -(2-feniletoxi)clovan-9 $\alpha$ -ol (89)**



**Fórmula molecular:** C<sub>23</sub>H<sub>34</sub>O<sub>2</sub>.  $[\alpha]_{20}^D$ : 16,70 ° (c = 33,8 mg mL<sup>-1</sup>, CHCl<sub>3</sub>); **IV (KBr) v<sub>max</sub> (cm<sup>-1</sup>):** 3426 (v O-H), 2944, 2926 e 2862 (v C-H), 1456 (v C=C), 1106 (v C-O), 750 e 698 (δ C<sub>sp<sup>2</sup>-H). **RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 7,38-7,14 (m, 4H, H-2'', H-3'', H-4'', H-5'', H-6''), 3,75-3,59 (m, 1H, H-1'), 3,41 (dd, 1H, H-2, J = 10,2, 5,6Hz), 3,30 (sl, 1H, H-9), 2,88 (t, 1H, H-2', J = 7,2Hz), 2,03-1,90 (m, 1H, H-10β), 1,69 (d, 1H, H-3α, J = 5,6 Hz), 1,66 (d, 1H, H-11β), 1,60 (m, 1H, H-10-α), 1,52 (m, 1H, H-12β), 1,45-1,38 (m, 1H, H-3β), 1,35-1,23 (m, 3H, H-6, H-7β, H-5), 1,18-1,06 (m, 2H, H-11α, H-7α), 1,02 (s, 3H, H-14), 0,95 (s, 3H, H-15), 0,94 (s, 1H, H-12α), 0,85 (s, 3H, H-13). **RMN de <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 139,4 (C-1''), 129,0 (C-3'', C-5''), 128,1 (C-2'', C-6''), 126,0 (C-4''), 88,6 (C-2), 75,1 (C-9), 71,6 (C-1'), 50,4 (C-5), 44,5 (C-3), 44,3 (C-1), 37,0 (C-2'), 36,8 (C-4), 36,4 (C-12), 34,6 (C-8), 33,1 (C-7), 31,2 (C-14), 28,3 (C-15), 26,7 (C-11), 26,0 (C-10), 25,3 (C-13), 20,5 (C-6). **HMBC (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** H-2'' (C-1'', C-3'') - <sup>2</sup>J<sub>CH</sub>, H-2'' (C-2') - <sup>3</sup>J<sub>CH</sub>, H-6'' (C-1'', C-5'') - <sup>2</sup>J<sub>CH</sub>, H-6'' (C-2'), H-3'' (C-1'') - <sup>3</sup>J<sub>CH</sub>, H-5'' (C-1'') - <sup>3</sup>J<sub>CH</sub>, H-1' (C-2') - <sup>2</sup>J<sub>CH</sub>, H-2' (C-1', C-1'') - <sup>2</sup>J<sub>CH</sub>, H-2' (C-2'', C-6'') - <sup>3</sup>J<sub>CH</sub>, H-1' (C-2, C-1'') - <sup>3</sup>J<sub>CH</sub>, H-2 (C-1, C-3) - <sup>2</sup>J<sub>CH</sub>, H-2 (C-1', C-11) - <sup>3</sup>J<sub>CH</sub>, H-3 (C-2) - <sup>2</sup>J<sub>CH</sub>, H-7 (C-9, C-15) - <sup>3</sup>J<sub>CH</sub>, H-10 (C-1) - <sup>3</sup>J<sub>CH</sub>, H-11 (C-2, C-9) - <sup>3</sup>J<sub>CH</sub>, H-12 (C-1) - <sup>2</sup>J<sub>CH</sub>, H-12 (C-2, C-9) - <sup>3</sup>J<sub>CH</sub>, H-13 (C-4) - <sup>2</sup>J<sub>CH</sub>, H-13 (C-3, C-5, C-14) - <sup>3</sup>J<sub>CH</sub>, H-14 (C-4) - <sup>2</sup>J<sub>CH</sub>, H-14 (C-3, C-5, C-13) - <sup>3</sup>J<sub>CH</sub>, H-15 (C-8) - <sup>2</sup>J<sub>CH</sub>, H-15 (C-7, C-9, C-12) - <sup>3</sup>J<sub>CH</sub>. **COSY (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** H-1' x H-2', H-2 x H-3, H-9 x H-10, H-10 x H-11, H-12α x H-12β. **NOESY (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** H-2α x H-3α, H-2α x H-13α, H-9β x H-15β, H-10β x H-10α, H-11β x H-11α, H-11β x H-12β, 12β x H-15β. **EM m/z:** 365,2467 [M+Na]<sup>+</sup>. **MM:** 342,2559. **FM:** C<sub>23</sub>H<sub>34</sub>O<sub>2</sub>.</sub>

4.1.5 9 $\alpha$ -hidroxicariofil-7,1(12)-dieno (**110**)



O composto **110**(FM: C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>O; MM: 220,3519) foi isolado durante a elaboração das reações de obtenção dos 2-arylclovanos, como um sólido branco com temperatura de fusão na faixa entre 64,5-66,0 °C (66-68 °C, COLLADO *et al.*, 1996), sendo identificado a partir da comparação direta com os dados de RMN de <sup>1</sup>H encontrados e os já descritos na literatura (COLLADO *et al.*, 1996). Não foram obtidos espectros de RMN de <sup>13</sup>C para este composto. Na TAB. 13 (p. 92) estão relacionados os sinais de RMN de <sup>1</sup>H encontrados durante o desenvolvimento deste trabalho (APÊNDICE C2, p. 181) e os descritos por Collado e colaboradores (1996)

#### 4.1.6 clov-2-en-9 $\alpha$ -ol (**111**)



Este composto foi obtido como produto secundário das reações de obtenção do 2-arylclovanos. O composto **111**(FM: C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>O; MM: 220,3519) apresentou-se como sólido branco cristalino com temperatura de fusão na faixa entre 77,3-79,1 °C (79-80 °C, HEYMANN *et al.*, 1994) e foi identificado a partir da comparação direta dos dados de RMN de <sup>1</sup>H e RMN de <sup>13</sup>C encontrados (APÊNDICE D2-E2, p. 182) com os já descritos na literatura (TABs. 13 e 14, p. 92). Heymann e colaboradores (1994), em experimentos realizados com extratos da planta *Sindora sumatrana*, isolaram este composto pela primeira vez em 1994.

#### 4.1.7 clovan-2 $\beta$ -9 $\alpha$ -diol (**73**)



O composto **73**(FM: C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>O<sub>2</sub>; MM: 236,3513) foi obtido a partir do ataque nucleofílico de uma molécula de água ao cátion clovanila**109**. O composto **73** apresentou-se como um sólido branco cristalino com temperatura de fusão na faixa entre 150,2-152,8 °C (152-153 °C, HEYMANN *et al.*, 1994). Ainda que a reação para obtenção dos 2-arylclovanos tenham se processado em atmosfera inerte e com reagentes anidros, a presença de água, possivelmente nos álcoois utilizados, proporcionaram essa reação em paralelo com a reação desejada. Este produto foi identificado a partir da comparação direta dos dados de RMN de <sup>1</sup>H e RMN de <sup>13</sup>C encontrados (APÊNDICE F2-G2, p. 183) e os já descritos na literatura (TABs13 e 14, p. 92).

#### 4.2 Identificação dos derivados clovânicos **96-105**, **113** e cariolânicos **106-108**

A elucidação estrutural dos derivados **96-108** e **113** foi realizada a partir da análise detalhada dos dados espectroscópicos obtidos nos espectros no IV e de RMN mono e bidimensionais, por espectroscopia de massas e por comparação com os dados espectroscópicos de derivados clovânicos e cariolânicos já relatados na literatura.

As clovanofenilaminas **96-101**, **113**, a clovanoaminopirimidina **102** e as clovanofenilamidinas **103-105** apresentaram sinais nos espectros de RMN de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C que, por comparação direta com os derivados 2-arylclovanos **83**, **87-89** já descritos neste trabalho, foram devidamente atribuídos ao esqueleto clovânico. Na TAB. 12 (p. 91) estão apresentados as atribuições de todos os sinais observados no RMN de <sup>13</sup>C para os 2-arylclovanos **82**, **87-89**, e os derivados **96-105** e **113**.

Uma vez determinada a presença do esqueleto clovânico nos compostos **96-105** e **113** a caracterização estrutural foi conduzida de forma a confirmar a ligação desejada entre o nitrogênio das fenilaminas **90-94** e 2-aminopirimidina (**95**) como o carbono C-2 do anel clovânico.

*Caracterização dos compostos sintetizados*

Tabela 11- Dados encontrados e descritos de RMN de <sup>1</sup>H, em CDCl<sub>3</sub> (400 MHz) para os compostos **82**, **96** e **97**

Compostos	82		96		97	
H-Nº	δ Encontrado (Multiplicidade)	δ Literatura <sup>1</sup> (Multiplicidade)	δ Encontrado (Multiplicidade)	δ Literatura <sup>2</sup> (Multiplicidade)	δ Encontrado (Multiplicidade)	δ Literatura <sup>2</sup> (Multiplicidade)
H-15	0,93 (s)	0,91 (s)	0,95 (s)	0,94 (s)	0,94 (s)	0,93 (s)
H-14	1,01 (s)	0,98 (s)	1,04 (s)	1,03 (s)	1,03 (s)	1,02 (s)
H-13	0,85 (s)	0,82 (s)	0,94 (s)	0,93 (s)	0,93 (s)	0,91 (s)
H-12α/H-12β	0,97 (d, J= 12,7 Hz)/ 1,58 (d, J= 12,7 Hz)	0,96 (d, J= 12,6 Hz)/ 1,56 (d, J= 12,6 Hz)	1,16-1,05 (m)/ 1,70-1,58 (m)	1,04-1,14 (m)/ 1,56-1,68 (m)	1,01 (s)/ 1,70-1,55 (m)	1,14-1,04 (m)/ 1,68-1,56 (m)
H-11 α/H-11β	1,46-1,19 (m)/ 1,16-1,04 (m)	1,30-1,22 (m)/ 1,08 (m)	1,16-1,05 (m)/ 1,70-1,58 (m)	1,04-1,14 (m)/ 1,56-1,68 (m)	1,01 (s)/ 1,70-1,55 (m)	1,14-1,04 (m)/ 1,68-1,56 (m)
H-10α /H-10β	1,67-1,46 (m)/ 2,01-1,95 (m)	1,50-1,54 (m)/ 1,93 (m)	1,70-1,58 (m)/ 2,07-1,94 (m)	1,68-1,56 (m)/ 2,00 (m)	2,08-1,90 (m)	1,68-1,56 (m) / 1,98 (m)
H-9	3,30 (sl)	3,28 (sl)	3,29 (sl)	3,28 (sl)	3,29 (sl)	3,26 (sl)
H-7α /H-7β	1,16-1,04 (m)/ 1,46-1,19 (m)	1,30-1,22 (m)/ 1,38-1,31 (m)	1,50-1,30 (m)	1,46-1,35(m)	1,36-1,24 (m)/ 1,48-1,36 (m)	1,14-1,04 (m)/1,44-1,34 (m)
H-6α /H-6β	1,16-1,04 (m)/ 1,46-1,19 (m)	1,30-1,22 (m)/ 1,38-1,31 (m)	150-1,30 (m)	1,46-1,35 (m)	1,36-1,24 (m)	1,44-1,34 (m)
H-5	1,46-1,19 (m)	1,38-1,31 (m)	1,39 (m)/ 7,14 (m)	1,46-1,35(m)	1,36-1,24 (m)	1,44-1,34 (m)
H-3α /H-3β	1,67-1,46 (m)	1,54-1,50 (m)	1,16-1,05 (m)/ 1,79 (dd, J= 12,1; 5,5 Hz)	1,34 (t, J= 12)/ 1,77 (J= 12,0; 5,5 Hz)	1,78 (dd, J= 11,9; 5,5 Hz)	1,31 (t, J= 12,0 Hz)/ 1,76 (dd, J= 12,0; 5,5 Hz)
H-2	3,48 (dd, J= 10,0, 5,6 Hz)	3,51 (dd, J= 4,4; 5,6 Hz)	3,61 (dd, J= 12,1; 5,5 Hz)	3,59 (dd, J= 12,0, 5,5 Hz)	3,51 (dd, J= 12,1; 5,5 Hz)	3,48 (dd, J= 12,1; 5,5 Hz)
2'	3,89-3,74 (m)	3,84-3,78 (m)	-	-	-	-
1'	4,18 (t, J= 5,0 Hz)	4,18-4,14 (m)	-	-	-	-
2''/ 6''	6,97 (d, J= 9,3 Hz)	6,95 (d, J= 9,4 Hz)	6,66-6,59 (m)	6,61 (m)	6,59 (d, J= 8,9 Hz)	6,58 (d, J= 8,9 Hz)
3''/ 5''	8,17 (d, J= 9,3 Hz)	8,15 (d, J= 9,4 Hz)	7,19-7,06 (m)	7,12 (t, J= 7,4 Hz)	6,75 (d, J= 8,9 Hz)	6,74 (d, J= 8,9 Hz)
4''	-	-	6,66-6,59 (m)	6,61 (m)	-	-
1'''	-	-	-	-	3,74 (s)	3,72 (s)
Estruturas						

*Caracterização dos compostos sintetizados*

<sup>1</sup> SAIZ-URRA *et al.*, 2009 (Experimento realizado em CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) / <sup>2</sup> SÁNCHEZ *et al.*, 2003 (Experimento realizado em CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)

Tabela 12- Dados de RMN de <sup>13</sup>C encontrados para os derivados clovânicos, em CDCl<sub>3</sub> (100 MHz) e descritos para os compostos **82**, **96** e **97**

C-Nº	<b>82</b>		<b>87</b>		<b>88</b>		<b>89</b>		<b>96</b>		<b>97</b>		<b>98</b>		<b>99</b>		<b>100</b>		<b>101</b>		<b>102</b>		<b>103</b>		<b>104</b>		<b>105</b>		<b>113</b>	
	δ Enc.	δ Lit. <sup>1</sup>	δ Enc.	δ Enc.	δ Enc.	δ Enc.	δ Enc.	δ Lit. <sup>2</sup>	δ Enc.	δ Lit. <sup>2</sup>	δ Enc.	δ Enc.	δ Enc.	δ Enc.	δ Enc.	δ Enc.	δ Enc.	δ Enc.	δ Enc.	δ Enc.	δ Enc.	δ Enc.	δ Enc.	δ Enc.	δ Enc.	δ Enc.	δ Enc.	δ Enc.	δ Enc.	δ Enc.
1	44,4	44,3	44,3	44,3	44,3	44,3	43,8	44,0	43,8	43,7	44,4	46,1	45,5	44,9	43,9	44,0	44,3	44,0	44,2											
2	89,3	89,2	88,8	89,1	88,6	62,1	62,3	63,4	62,5	61,8	67,8	47,4	54,1	59,1	58,8	59,7	58,8	58,2												
3	44,4	44,4	44,5	44,6	44,5	46,3	46,5	46,4	46,3	46,2	42,8	45,9	44,9	46,4	45,9	46,1	45,8	46,2												
4	37,1	37,0	36,7	36,4	36,8	37,1	32,2	37,1	37,1	37,5	37,0	38,9	39,1	37,4	37,5	37,8	37,5	38,0												
5	50,5	50,4	50,4	50,5	50,4	50,5	50,7	50,7	50,6	50,6	50,0	51,5	51,6	50,7	50,4	50,9	50,4	50,9												
6	20,5	20,5	20,6	20,6	20,5	20,6	20,7	20,6	20,6	20,5	20,6	20,9	21,2	20,6	20,5	20,6	20,4	20,8												
7	33,0	32,9	33,0	33,1	33,1	33,1	33,2	33,2	33,1	32,9	33,2	33,2	33,4	33,2	32,7	33,0	32,7	33,3												
8	34,6	34,6	34,6	34,7	34,6	34,8	34,9	34,9	34,8	35,0	34,5	35,3	35,2	34,8	34,7	34,9	34,6	35,1												
9	75,0	75,0	75,1	75,2	75,1	75,0	75,1	75,1	75,0	74,7	74,9	74,9	75,3	75,0	74,9	74,9	74,8	75,1												
10	26,0	25,9	26,1	26,0	26,0	25,6	25,7	25,6	25,6	25,6	25,6	26,0	26,1	25,8	25,3	25,8	25,3	25,7												
11	26,7	26,6	26,8	26,7	26,7	27,2	27,3	27,1	27,1	27,4	28,6	30,1	29,4	27,7	27,6	27,9	27,6	27,9												
12	36,4	36,4	36,4	37,0	36,4	36,5	36,6	36,5	36,4	36,6	36,8	38,2	36,7	35,9	35,9	36,2	35,9	35,9												
13	25,3	25,3	25,4	25,4	25,3	24,8	24,8	24,8	24,8	24,7	24,9	24,4	24,6	24,7	24,7	24,7	24,7	24,8												
14	31,2	31,2	31,3	31,2	31,2	30,9	31,0	31,0	31,0	30,8	31,3	31,1	31,2	30,9	30,9	30,9	30,8	31,1												
15	28,3	28,3	28,3	28,3	28,3	28,3	28,3	28,3	28,3	28,2	28,5	28,5	28,7	29,7	28,2	28,3	28,2	28,3												
1'	68,5	68,4	70,2	68,9	71,6	148,4	148,5	142,8	142,7	153,5	151,6	147,5	147,8	162,5	157,2	158,5	157,6	162,3												
2'	68,6	68,5	37,2	67,5	37,0	112,9	113,0	114,4	114,5	111,2	112,6	125,2	112,4	157,9	-	-	-	-												
3'	-	-	-	-	-	129,1	129,2	114,9	114,8	126,6	128,9	128,5	129,4	110,1	-	-	-	-												
4'	-	-	-	-	-	116,5	116,7	151,6	151,6	137,4	115,9	116,3	130,3	157,9	-	-	-	-												
5'	-	-	-	-	-	129,1	129,2	114,9	114,8	126,6	128,9	126,8	129,4	-	-	-	-	-												
6'	-	-	-	-	-	112,8	113,0	114,4	114,5	111,2	112,6	110,4	112,4	-	-	-	-	-												
1''	141,4	140,2	147,8	158,9	139,4	-	-	55,8	55,8	-	34,9	31,1	31,4	-	135,5	134,6	135,0	135,1												
2''	114,6	114,6	129,8	114,7	128,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	128,1	128,3	128,3	127,0												
3''	125,8	125,7	123,3	129,3	129,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	128,4	128,6	128,3	128,7												
4''	164,0	164,0	146,5	120,7	126,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	128,9	129,9	129,1	131,5												
5''	125,8	125,7	123,3	129,3	129,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	128,4	128,6	128,2	128,7												
6''	114,6	114,6	129,8	114,7	128,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	128,1	128,3	128,2	127,0												
1'''	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	151,1	158,1	150,2	-												
2'''	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	122,9	122,8	124,7	-												
3'''	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	128,1	124,6	131,0	-												
4'''	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	120,7	141,5	113,4	-												
5'''	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	128,1	124,6	131,0	-												
6'''	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	122,9	122,8	124,7	-												

<sup>1</sup> SAIZ-URRA *et al.*, 2009 (Experimento realizado em CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz) / <sup>2</sup> SÁNCHEZ *et al.*, 2003 (Experimento realizado em CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)

*Caracterização dos compostos sintetizados*

Tabela 13- Dados encontrados e descritos de RMN de <sup>1</sup>H, em CDCl<sub>3</sub> (400 MHz) para os compostos **73**, **110** e **111**

Compostos	<b>73</b>		<b>110</b>		<b>111</b>	
H-Nº	δ Encontrado (Multiplicidade)	δ Literatura <sup>1</sup> (Multiplicidade)	δ Encontrado (Multiplicidade)	δ Literatura <sup>2</sup> (Multiplicidade)	δ Encontrado (Multiplicidade)	δ Literatura <sup>2</sup> (Multiplicidade)
H-15	0,95 (s)	0,96 (s)	1,00 (s)	0,99 (s)	0,94 (s)	0,94 (s)
H-14	1,02 (s)	1,04 (s)	0,98 (s)	0,97 (s)	1,06 (s)	1,07 (s)
H-13	0,85 (s)	0,86 (s)	4,84 (s)	4,83 (s)	0,95 (s)	0,96 (s)
H-12α/H-12β	0,90 (d, J= 12,8 Hz)/ 1,55 (d, J= 12,8 Hz)	0,91(d, J= 12,5 Hz) / 1,56 (d, J= 12,5 Hz)	1,68 (s)	1,66 (s)	0,99 (ddd, J= 12,9; 2,2; 1,3)/ 1,43 (d, J= 13,1 Hz)	0,99 (ddd, J= 13,0; 2,0; 1,0 Hz) 1,44 (d, J= 13,0 Hz)
H-11α /H-11β	1,15-1,03 (m) / 1,73-1,64 (m)	1,07 (m) / 1,66 (m)	2,13-1,92 (m)	2,07 (ddd, J=16,2; 7,7; 7,7)	1,10 (m)/ 1,71 (dd, J= 13,2; 4,9 Hz)	1,11 (ddt, J= 13,0; 5,5; 2,0 Hz)/ 1,70 (13,5 Hz)
H-10α /H-10β	1,64-1,59 (m)/ 2,04-1,92 (m)	1,64 (m) / 1,99 (m)	1,65-1,62 (m)	1,56-1,62 (m)	1,67-1,58 (m)/ 2,11-1,98 (m)	1,62 (ddt, J= 14,5; 13,0; 5,5; 3,5 Hz)/ 2,05 (dddd, J= 13,0; 5,5; 2,0 Hz)
H-9β	3,31 (sl)	3,32 (sl)	2,40-2,25 (m)	2,34 (ddd, J=9,5;9,5; 9,5 Hz)	3,35 (sl)	3,35 (sl)
H-7α /H-7β	1,15-1,03 (m)/ 1,46-1,37 (m)	1,11 (m) / 1,50 (m)	1,83-1,69 (m) / 2,40-2,25 (m)	1,70-1,80 (m)/ 2,20-2,40 (m)	1,22-1,15 (m)/ 1,36 (ddd, J= 5,4; 3,8 Hz)	1,18 (ddd, J= 14,0; 11,0; 5,5 Hz)/ 1,38 (14,0; 5,5; 4,0 Hz)
H-6α /H-6β	1,31-1,24 (m)/ 1,37-1,30 (m)	1,32 (m) / 1,35 (m)	1,83-1,69 (m)	1,70-1,80 (m)	1,48-1,45 (m)/ 1,53-1,48 (m)	1,46 (m)/ 1,50 (m)
H-5	1,46-1,37 (m)	1,42 (m)	4,62 (dd, J= 9,6; 5,2 Hz)	4,60 (dd, J=9,6; 5,3 Hz)	1,56-1,53 (m)	1,52 (m)
H-3α/H-3β	1,58-1,46 (m)/ 1,70 (dd, J= 11,9; 5,8 Hz)	1,51 (dd, J= 11,5, 10 Hz) / 1,71 (dd, J= 11,5; 5,5 Hz)	5,43 (t, J= 7,3 Hz)	5,42 (t, J=7,7)	5,35 (d, J= 5,6 Hz)	5,35 (d, J= 5,5 Hz)
H-2α	3,78 (s)	3,79 (s)	2,33 (m)	2,20-2,40 (m)	5,26 (d, J= 5,6 Hz)	5,27 (d, J= 5,5 Hz)

<sup>1</sup>COLLADO *et al.*, 1996 (Experimento realizado em. CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) / <sup>2</sup>HEYMANN *et al.*, 1994 (Experimento realizado em. CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)

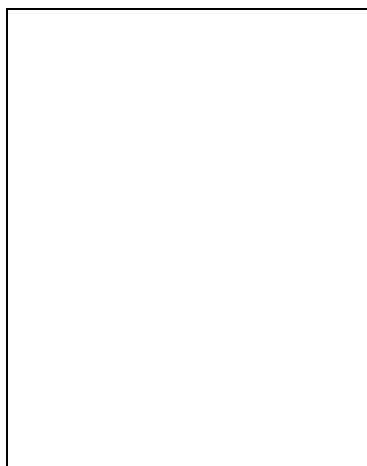
Tabela 14- Dados encontrados e descritos de RMN de <sup>13</sup>C, em CDCl<sub>3</sub> (100 MHz) para os compostos **73** e **111**

Compostos	C-Nº	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
<b>73</b>	δ Enc.	44,1	80,8	47,4	37,1	50,5	20,6	33,1	34,7	75,1	25,9	26,3	35,5	25,4	31,4	28,3
	δ Lit.	44,6	80,8	47,5	37,1	50,6	20,7	33,2	34,7	75,1	26,0	26,4	35,6	25,4	31,4	28,4
<b>111</b>	δ Enc.	50,1	136,6	139,1	48,0	49,7	21,3	33,8	34,4	74,6	27,4	33,6	35,6	25,1	32,9	28,5
	δ Lit.	50,0	136,4	138,9	47,9	49,7	21,2	33,7	34,3	74,4	27,3	33,5	35,5	24,9	32,8	28,4

<sup>1</sup>COLLADO *et al.*, 1996 (Experimento realizado em. CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz) / <sup>2</sup>HEYMANN *et al.*, 1994 (Experimento realizado em. CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)



4.2.1 2 $\beta$ -fenilaminoclovan-9 $\alpha$ -ol (**96**)



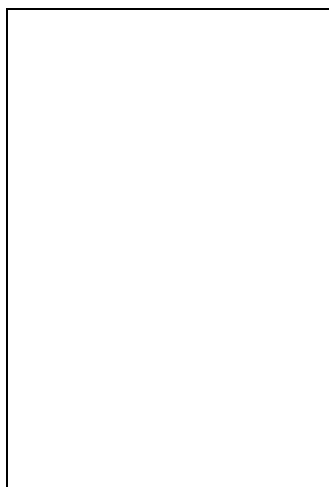
O composto **96**(MM: 313,2406, FM: C<sub>21</sub>H<sub>31</sub>NO) apresentou-se como um sólido branco cristalino, com temperatura de fusão na faixa entre 114,9-116,6°C (115-117°C, SÁNCHEZ *et al.*, 2003). No espectro na região do IV (APÊNDICE H2, p. 184) foram observadas, entre outras absorções, uma banda larga referente ao estiramento de OH e NH em 3435 cm<sup>-1</sup>, duas bandas de estiramento de C-H de grupo alifático em 2947 e 2862 cm<sup>-1</sup>, uma banda em 1602 cm<sup>-1</sup> referente ao estiramento de N-C=C e duas bandas intensas em 1263 e 1033 cm<sup>-1</sup> atribuídas aos estiramentos de C-N e C-O respectivamente.

Os deslocamentos químicos visualizados nos espectros de RMN de <sup>1</sup>H e RMN de <sup>13</sup>C foram atribuídos utilizando como referência os sinais disponíveis na literatura para o composto 2 $\beta$ -fenilaminoclovan-9 $\alpha$ -ol (TAB. 11 e 12, p. 90 e 91), possibilitando a identificação de **96** como 2 $\beta$ -fenilaminoclovan-9 $\alpha$ -ol.

O espectro de RMN de <sup>1</sup>H (APÊNDICE I2, p. 184) do composto **96**, apresentou, além dos sinais em  $\delta$  3,29 (sl) e  $\delta$  3,61 (dd,  $J = 12,1$  e  $5,5$  Hz) atribuídos respectivamente aos hidrogênios H-9 e H-2 do anel clovânico, dois multipletos em  $\delta$  6,66-6,59 e  $\delta$  7,19-7,06 na região de hidrogênios aromáticos atribuídos aos hidrogênios H-2'/H-4'/H-6' e H-3'/H-5' respectivamente.

No espectro de RMN de <sup>13</sup>C (APÊNDICE J2, p. 185) observaram-se 19 sinais, sendo um de carbono oxigenado em  $\delta$  75,0 atribuído ao carbono C-9 (carbono hidroxilado) e dois nitrogenados, sendo um em  $\delta$  62,1 atribuído ao carbono C-2 do esqueleto clovânico e o outro em  $\delta$  148,4 atribuído ao carbono C-1', pertencente ao carbono aromático ligado ao nitrogênio da fenilamina presente na cadeia lateral do anel sesquiterpênico. Observou-se ainda mais três sinais na região de aromáticos, em  $\delta$  112,8, em  $\delta$  116,5 e em  $\delta$  129,1 atribuídos respectivamente aos carbonos C-2'/C-6', C-4' e C-3'/C-5'.

4.2.2 2 $\beta$ -(*p*-metoxifenilamino)clovan-9 $\alpha$ -ol (**97**)

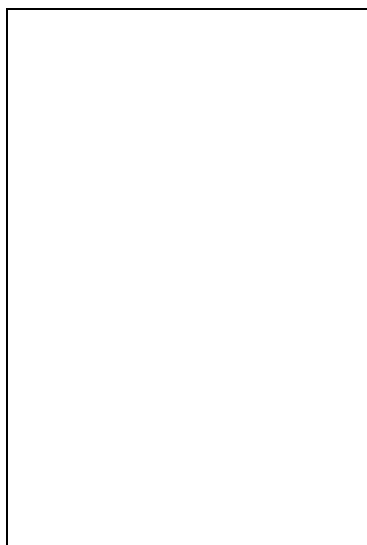


O composto **97** (MM: 343,2511, FM: C<sub>22</sub>H<sub>33</sub>NO<sub>2</sub>) foi obtido como um sólido rosa cristalino com temperatura de fusão na faixa entre 107,5-109,0°C (108-110°C, SÁNCHEZ *et al.*, 2003). No espectro na região do IV (APÊNDICE L2, p. 185) obtido para **97** foram observadas bandas referentes aos estiramentos OH e NH em 3406 cm<sup>-1</sup> e aos estiramentos de C-H de grupo alifático em 2946, 2928 e 2864 cm<sup>-1</sup>. Em 1512 cm<sup>-1</sup> foi possível observar uma banda intensa referente ao estiramento de N-C=C e em 1234 e 1042 cm<sup>-1</sup> bandas referentes aos estiramentos de C-N e C-O respectivamente.

No espectro de RMN de <sup>1</sup>H (APÊNDICE M2, p. 186) do composto **97**, foram observados quatro sinais com integrais para três hidrogênios, sendo os sinais em  $\delta$  0,93, em  $\delta$  0,94 e em  $\delta$  1,03 atribuídos aos hidrogênios metílicos H-13, H-15 e H-14 presentes no anel clovânico, e o sinal em  $\delta$  3,74 atribuído aos hidrogênios metoxílicos H-1''. Na região de hidrogênios aromáticos foram observados dois dupletos em  $\delta$  6,59 e em  $\delta$  6,75, atribuídos respectivamente aos hidrogênios H-2'/H-6' e H-3'/H-5' do anel aromático.

No espectro de RMN de <sup>13</sup>C (APÊNDICE N2, p. 186) foram identificados 20 sinais, sendo o sinal em  $\delta$  55,8 atribuído ao carbono C-1'' da metoxila. Na região referente a carbonos aromáticos observou-se quatro sinais, em  $\delta$  114,4, em  $\delta$  114,9, em  $\delta$  142,8 e em  $\delta$  151,6 atribuídos respectivamente aos carbonos C-2'/C-6', C-3'/C-5', C-1' e C-4'. A identificação de **97** foi realizada pela comparação direta com os dados de RMN de <sup>1</sup>H e RMN de <sup>13</sup>C encontrados para este composto e os dados descritos por Sánchez e colaboradores (2003), conforme TABs 11 e 12 (p. 90 e 91).

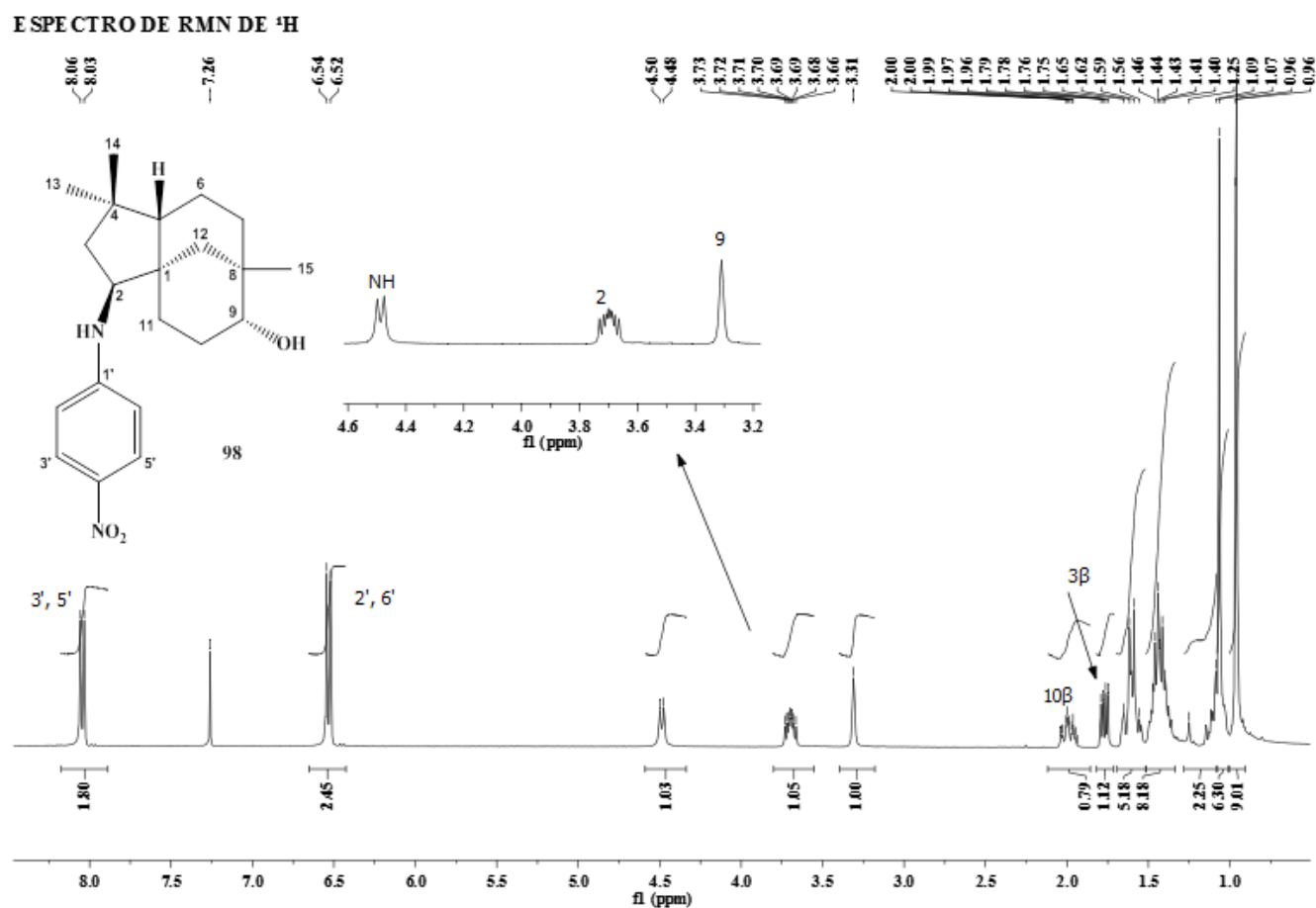
4.2.3 2 $\beta$ -(*p*-nitrofenilamino)clovan-9 $\alpha$ -ol (**98**)



O composto **98** apresentou-se como um sólido amarelo cristalino com temperatura de fusão na faixa entre 179,8-181,6°C. No espectro na região do IV foi possível observar em 3364 cm<sup>-1</sup> uma banda referente aos estiramentos O-H e N-H, em 2946, 2924 e 2862 bandas referentes aos estiramentos C-H de grupo alifático e em 1600 cm<sup>-1</sup> indicando estiramentos de N-C=C. Foi ainda observado em 1308 cm<sup>-1</sup> uma banda intensa referente a estiramento simétrica de NO<sub>2</sub> e em 1284 e 1112 cm<sup>-1</sup> bandas referentes aos estiramentos de C-N e C-O respectivamente (APÊNDICE O2, p. 187).

No espectro de RMN de <sup>1</sup>H (FIG. 64, p. 96) a presença do sinal em  $\delta$  3,70 atribuído ao hidrogênio H-2, além de evidenciar a formação do esqueleto clovano, devido a sua multiplicidade (ddd,  $J=12,0, 9,4$  e  $5,7$ Hz) concluiu-se que a ligação do anel sesquiterpênico com o reagente *p*-nitroanilina (**92**), conforme esperado, ocorreu através do nitrogênio da fenilamina **92**. Também foram observados sinais em  $\delta$  3,31 (sl) atribuído ao hidrogênio H-9 e em  $\delta$  4,49 (d,  $J=9,4$ Hz) atribuído ao hidrogênio do NH da fenilamina. A atribuição do hidrogênio do NH da fenilamina **92** em  $\delta$  4,49 foi confirmada como auxílio do mapa de contornos HSQC (APÊNDICE P2-Q2, p. 187-188), uma vez que não foi observada nenhuma correlação para este sinal. Ainda analisando o espectro de RMN de <sup>1</sup>H foram observados na região referente aos hidrogênios aromáticos dois sinais, um em  $\delta$  6,53 (d,  $J=9,2$  Hz) atribuído aos hidrogênios H-2'/H-6' e outro em  $\delta$  8,04 (d,  $J=9,2$ Hz) atribuído aos hidrogênios H-3'/H-5'. O mapa de contornos COSY (APÊNDICE R2, p. 188) apresentou a correlação do hidrogênio ligado ao átomo de nitrogênio ( $\delta$  4,49) com o hidrogênio H-2 ( $\delta$  3,70), confirmando a ligação do nitrogênio da fenilamina com o carbono C-2 do anel clovânico.

Figura 64- Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do composto **98**



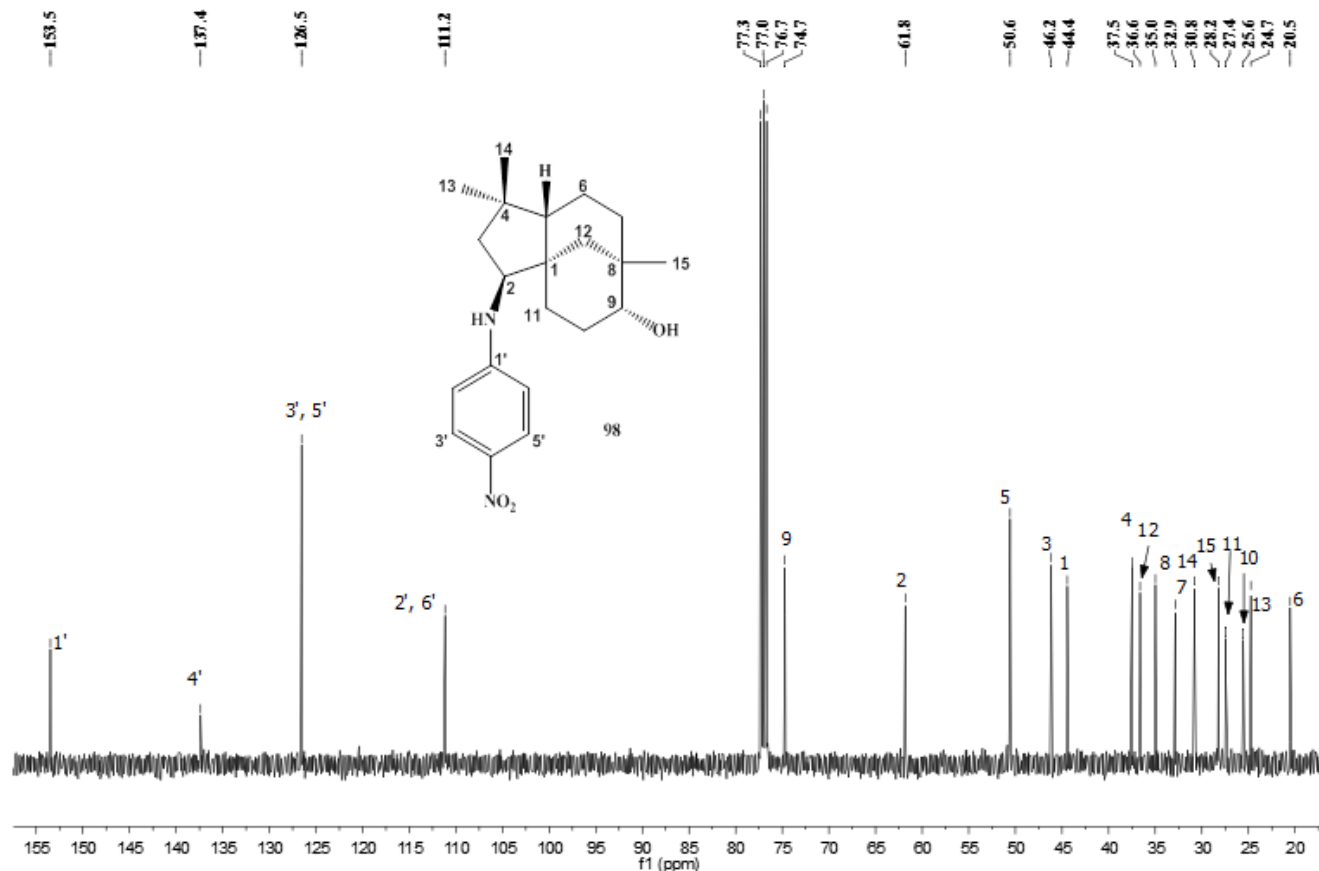
No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (FIG. 65, p. 97) foram observados 19 sinais, dos quais quatro foram atribuídos aos carbonos aromáticos C-2'/C-6' ( $\delta$  111,2), C-3'/C-5' ( $\delta$  126,6), C-4' ( $\delta$  127,4) e C-1' ( $\delta$  153,5). A atribuição destes carbonos foi realizada com auxílio do mapa de contornos HMBC (APÊNDICE S2-T2, p. 189), no qual foi possível observar correlações  $^3J_{\text{CH}}$  para H-N (C-2', C-6') e H-2 (C-1').

Por meio do mapa de contornos NOESY (APÊNDICE U2, p. 190) foi possível observar algumas correlações que confirmam a disposição espacial dos átomos do composto **98** proposta nesta investigação, tais como H-2 $\alpha$  x H-13, H-2 $\alpha$  x NH, H-2 $\alpha$  x H-2', H-2 $\alpha$  x H-6', H-2' x H-3', H-5' x H-6', H-2' x NH, H-6' x NH e 9 $\beta$  x 10 $\beta$ .

No espectro de massas EM-ESI positivo (APÊNDICE V2, p. 190), obtido em um espectrofotômetro ESI-Q-TOF, foi observado o pico base  $[\text{M}]^+$  em  $m/z$  358,2.

Figura 65- Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do composto **98**

ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$



### 2 $\beta$ -(*p*-nitrofenilamino)clovan-9 $\alpha$ -ol (**98**)

Sólido amarelo; Tf: 179,8-181,6°C;  $[\alpha]_{20}^D$ : -14,0 ° (c = 33,8 mg mL $^{-1}$ ,  $\text{CHCl}_3$ ); **IV (KBr)  $\nu_{\text{max}}$  (cm $^{-1}$ ):** 3364 ( $\nu_{\text{O-H}}$ ,  $\nu_{\text{N-H}}$ ), 2946, 2924 e 2862 ( $\nu_{\text{C-H}}$ ), 1600 ( $\nu_{\text{N-C=C}}$ ) 1308 ( $\delta_{\text{NO}_2}$ ), 1284 ( $\nu_{\text{C-N}}$ ), 1112 ( $\nu_{\text{C-O}}$ ), 754 ( $\delta_{\text{C}_{\text{sp}^2\text{-H}}$ ). **RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm):** 8,04 (d, 2H, H-3', H-5',  $J=9,2\text{Hz}$ ), 6,52 (d, 2H, H-2', H-6',  $J=9,2\text{Hz}$ ), 4,49 (d, 1H, NH,  $J=9,4\text{Hz}$ ), 3,70 (ddd, 1H, H-2 $\alpha$ ,  $J=12,0$ ; 9,7 e 5,4Hz), 3,31 (sl, 1H, H-9 $\beta$ ), 2,06-1,93 (m, 1H, 10 $\beta$ ), 1,77 (dd, 1H, H-3 $\beta$ ,  $J=11,9$  e 5,6Hz), 1,68-1,53 (m, 3H, H-10 $\alpha$ , H-11 $\beta$ , H-12 $\beta$ ), 1,51-1,33 (m, 6H, H-6, H-7 $\beta$ , H-3 $\alpha$ , H-5), 1,16-1,07 (m, 2H, H-7 $\alpha$ , H-12 $\alpha$ ), 1,07 (s, 3H, H-14), 1,01-1,05 (m, 1H, H-11 $\alpha$ ), 0,96 (s, 3H, H-15), 0,96 (s, 3H, H-13). **RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm):** 153,5 (C-1'), 137,4 (C-4'), 126,6 (C-3', C-5'), 111,2 (C-2', C-6'), 74,7 (C-9), 61,8 (C-2), 50,6 (C-5), 46,2 (C-3), 44,4 (C-1), 37,5 (C-4), 36,6 (C-12), 35,0 (C-8), 32,9 (C-7), 30,8 (C-14), 28,2 (C-15), 27,4 (C-11), 25,6 (C-10), 24,7 (C-13), 20,5 (C-6). **HMBC (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):** NH (C-2', C-6') -  $^3J_{\text{CH}}$ , H-2' (C-4', C-6') -  $^3J_{\text{CH}}$ , H-6' (C-2', C-4') -  $^3J_{\text{CH}}$ , H-3' (C-4') -  $^2J_{\text{CH}}$ , H-3' (C-1', C5') -  $^3J_{\text{CH}}$ , H-5' (C-4') -  $^2J_{\text{CH}}$ , H-5' (C-1', C-3') -  $^3J_{\text{CH}}$ , H-2 (C-1, C-3) -  $^2J_{\text{CH}}$ , H-2 (C-1', C-11, C12) -  $^3J_{\text{CH}}$ , H-9 (C-12) -  $^3J_{\text{CH}}$ , H-3 (C-2, C-4) -  $^2J_{\text{CH}}$ , H-3 (C-1, C-5, C-13) -  $^3J_{\text{CH}}$ , H-11 (C-1, C-10) -  $^2J_{\text{CH}}$ , H-11 (C-2, C-9) -  $^3J_{\text{CH}}$ , H-13 (C-4) -  $^2J_{\text{CH}}$ , H-13 (C-3, C-5, C-14) -  $^3J_{\text{CH}}$ , H-14 (C-4) -  $^2J_{\text{CH}}$ , H-14 (C-3, C-5, C-13) -

$^3J_{\text{CH}}$ , H-15 (C-8) -  $^2J_{\text{CH}}$ , H-15 (C-7, C-9, C-12) -  $^3J_{\text{CH}}$ . **COSY (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** H-2'xH-3', H-6'xH-5', H-2xNH, H-3xH-2, H-7xH-6, H-10xH-9, H-11xH-10. **NOESY (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** H-2'x H-3', H-5'x H-6', H-2 $\alpha$  x NH, H-2 $\alpha$  x H-2', H-2 $\alpha$  x H-6', H-2 $\alpha$  x H-13, NH x H-2', NH x H-6', H-9 $\beta$  x H-10 $\beta$ . **EM m/z:** 358,2 [M]<sup>+</sup>. **MM:** 358,4765. **FM:** C<sub>21</sub>H<sub>30</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

4.2.4 2 $\beta$ -(*N*-metilanilina)clovan-9 $\alpha$ -ol (**99**), 2 $\beta$ -[*o*-(*N*-metilamino)fenil]clovan-9 $\alpha$ -ol (**100**) e 2 $\beta$ -[*p*-(*N*-metilamino)fenil]clovan-9 $\alpha$ -ol (**101**)



Os compostos **99**, **100** e **101** foram obtidos a partir da reação entre o óxido de cariofileno (**72**) e *N*-metilanilina (**94**). Os produtos **99** e **101** apresentaram-se como um líquido viscoso de coloração amarelada, já **100** é um sólido branco e cristalino, com temperatura de fusão entre a faixa de 181,6-183,2 °C.

Nos espectros na região do IV (APÊNDICES X2-Z2 e A2, p. 191-192) obtidos para estes compostos foram observadas bandas referentes ao estiramento de OH em 3404 cm<sup>-1</sup> para **99** e bandas referentes aos estiramentos de OH e NH em 3356 cm<sup>-1</sup> para **100** e em 3418 cm<sup>-1</sup> para **101**. A análise dos espectros de RMN de <sup>1</sup>H destes compostos (FIG. 66, p. 100) mostrou sinais distintos na região de hidrogênios aromáticos, devido as diferentes conexões estabelecidas com o esqueleto clovânico para cada um dos produtos formados. Foram observados sinais em  $\delta$  6,69 (t,  $J = 7,2$  Hz) atribuído ao hidrogênio H-4', em  $\delta$  6,86 (d,  $J = 8,3$  Hz) atribuído aos hidrogênios H-2' e H-6' e em  $\delta$  7,25-7,20 (m) atribuído aos hidrogênios H-3' e H-5' para **99** (FIG. 66- A). O composto **100** forneceu sinais em  $\delta$  6,64 (d,  $J = 8,0$  Hz) atribuído ao hidrogênio H-6', em  $\delta$  6,68 (t,  $J = 7,5$  Hz) atribuído ao hidrogênio H-4' e em  $\delta$  7,17-7,05 (m) atribuído aos hidrogênios H-3' e H-5' (FIG. 66- B). Já para o composto **101** foram observados apenas dois dupletos, um em  $\delta$  6,56 ( $J = 8,5$  Hz) atribuído aos hidrogênios H-2' e H-6' e outro em  $\delta$  6,99 ( $J = 8,5$  Hz) atribuído aos hidrogênios H-3' e H-5', condizentes com um anel *para* substituído (FIG. 66- C). Os sinais atribuídos aos hidrogênios do grupo metila ligado ao nitrogênio

foram observados em  $\delta$  2,84 (s), em  $\delta$  2,86 (s) e em  $\delta$  2,82 (s) referentes aos compostos **99**, **100** e **101** respectivamente.

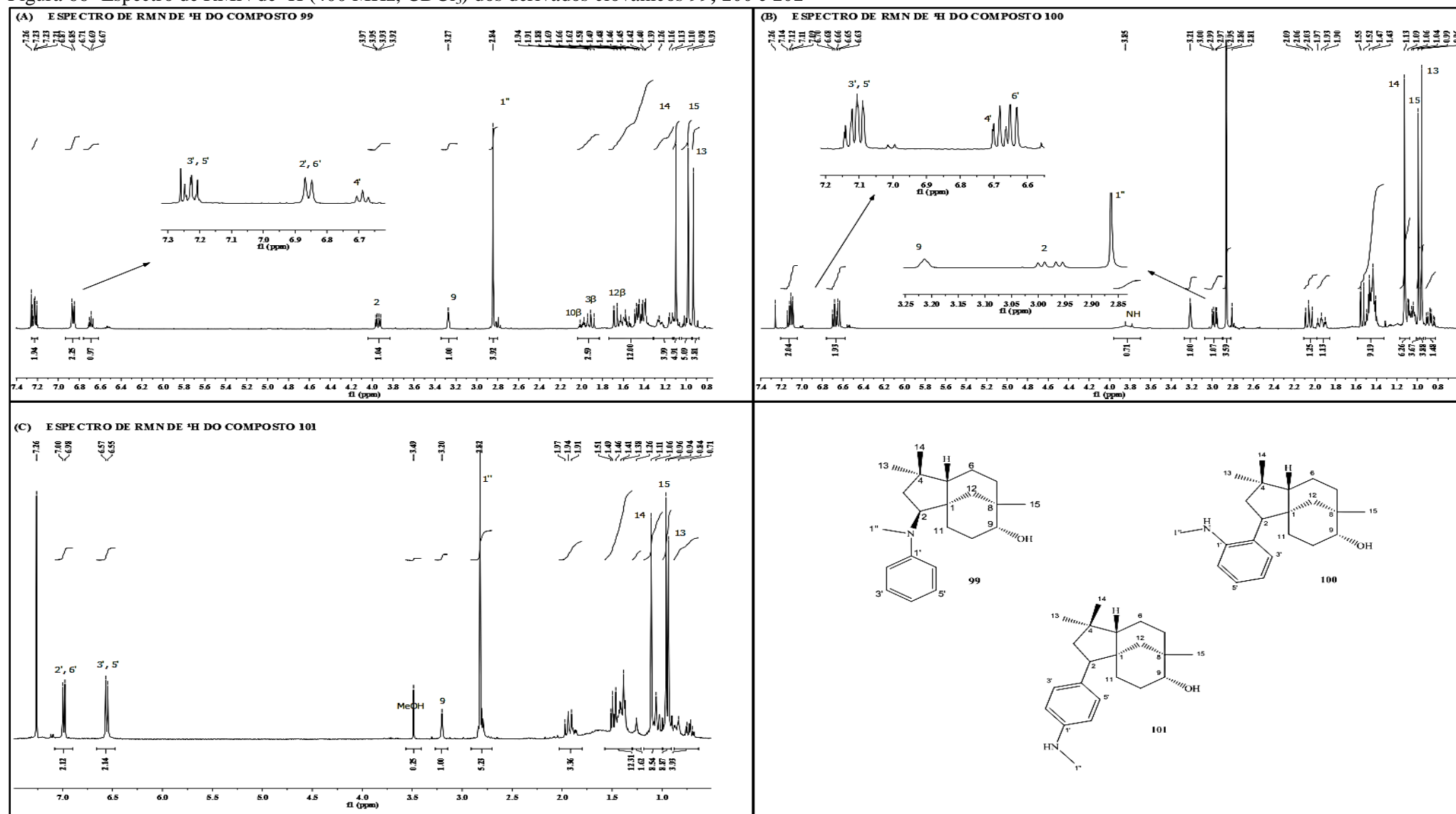
Nos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  (FIG. 67, p. 101) foram observados 20 sinais para os compostos **99** (FIG. 67- A) e **101** (FIG. 67- C), e para o composto **100** (FIG. 67- B) observaram-se 22 sinais. Os sinais encontrados na região dos carbonos aromáticos apresentaram diferentes deslocamentos, devido a substituição distinta do anel aromático. O derivado **100** apresentou mais sinais no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  que seus isômeros **99** e **101**, este fato sugeriu para este composto a presença de um anel aromático *orto*-substituído, já que todos os carbonos do anel apresentam deslocamentos distintos (FIG. 67- B). Pelos mapas de contornos HSQC (APÊNDICE B2-G2, p. 192-195) foram identificados os hidrogênios e seus respectivos carbonos, sendo possível propor para o composto **99** a presença de um anel aromático monossubstituído, já que entre os sinais referentes aos carbonos aromáticos apenas aquele localizado em  $\delta$  151,6 não mostrou correlação com nenhum hidrogênio. A conexão entre as cadeias laterais e o esqueleto sesquiterpênico, para os diferentes fenilaminoclovanos, foi estabelecida a partir dos mapas de contornos HMBC (APÊNDICE H2-N2, p. 195-198). Para o composto **99** observaram-se correlações  $^3J_{\text{CH}}$  entre os hidrogênios H-2 com o carbono C-1' e H-1'' com o carbono C-2. Para **100** foram visualizadas correlações  $^2J_{\text{CH}}$  entre o hidrogênio H-2 com o carbono C-2' e  $^3J_{\text{CH}}$  entre os hidrogênios H-2 com os carbonos C-1' e C-3' e H-3 $\beta$  com o carbono C-2'. O composto **101** apresentou as correlações  $^2J_{\text{CH}}$  entre o hidrogênio H-2 com o carbono C-4' e  $^3J_{\text{CH}}$  entre o hidrogênio H-2 com os carbonos C-3' e C-5'.

Utilizou-se, ainda, o mapa de contornos COSY (APÊNDICE O2-Q2, p. 199-200) para confirmar a conexão entre os átomos hidrogenados, sendo a disposição espacial de alguns átomos confirmada através do n.O.e diferencial (FIG. 68, p. 102).

Para o derivado **99** foram observadas intensificações dos sinais referentes aos hidrogênios H-2', H-1'' e H-13 quando o sinal atribuído ao hidrogênio H-2 $\alpha$  foi irradiado (FIG. 68- A), observou-se ainda a intensificação dos sinais atribuídos aos hidrogênios aromáticos H-2' e H-6' ao irradiar o sinal referente ao hidrogênio da metoxila H-1'' (FIG. 68- B). Para o derivado **100** observaram-se intensificações nos sinais atribuídos aos hidrogênios H-13 e H-6' ao irradiar os sinais referentes aos hidrogênios H-2 $\alpha$  e H-6' respectivamente (FIG. 68- C e D). Já para o derivado **101** foram observadas intensificações nos sinais atribuídos aos hidrogênios H-3', H-5' e H-1'' ao irradiar os sinais referentes aos hidrogênios aromáticos H-2' e H-6' (FIG. 68- E), e ainda foi possível observar intensificação referente ao sinal atribuído ao hidrogênio H-15 ao irradiar o sinal referente ao hidrogênio H-9 do anel clovânico (FIG. 68- F).

# Caracterização dos compostos sintetizados

Figura 66- Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) dos derivados clovânicos **99**, **100** e **101**





## Caracterização dos compostos sintetizados

Figura 67- Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) dos derivados clovânicos **99**, **100** e **101**

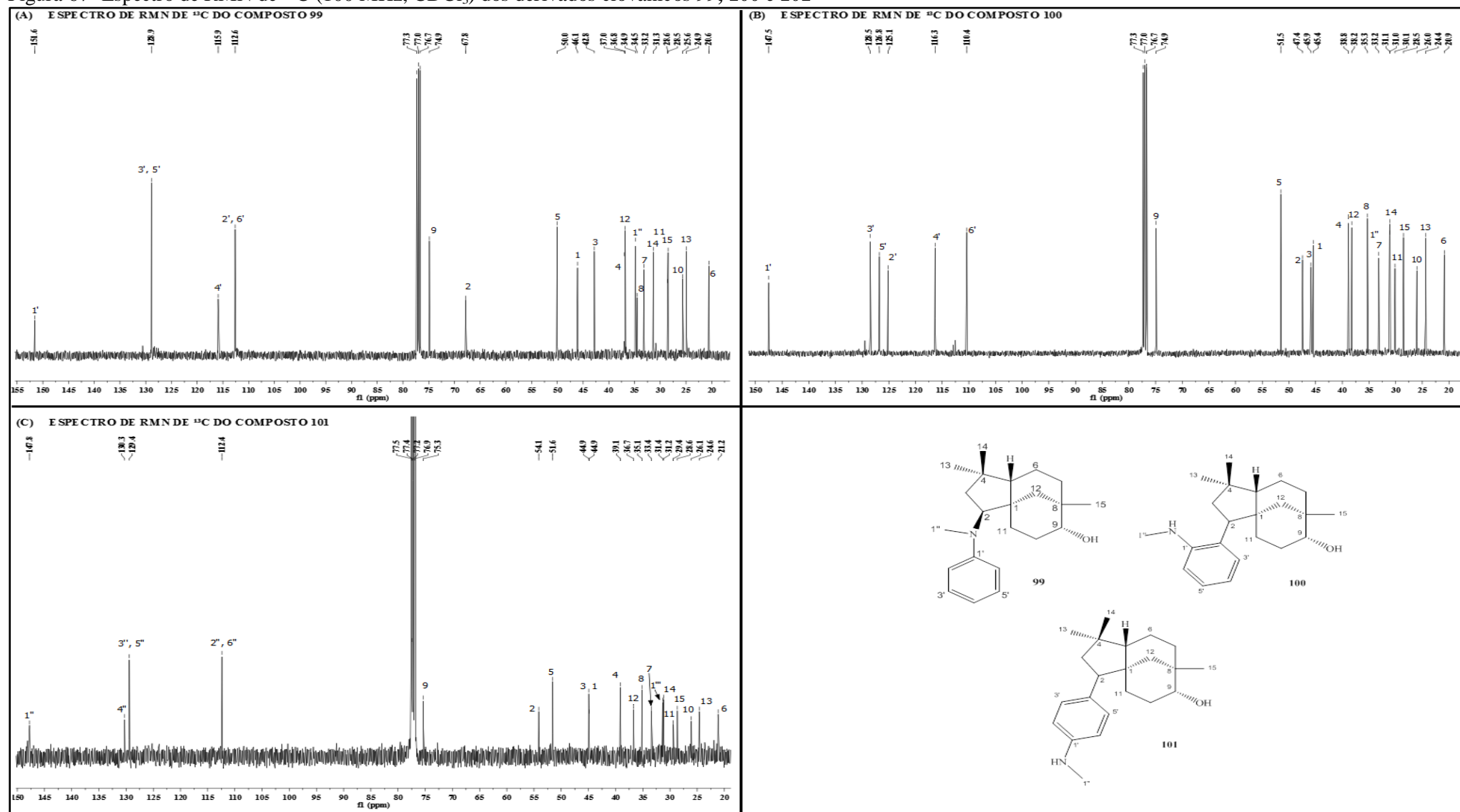
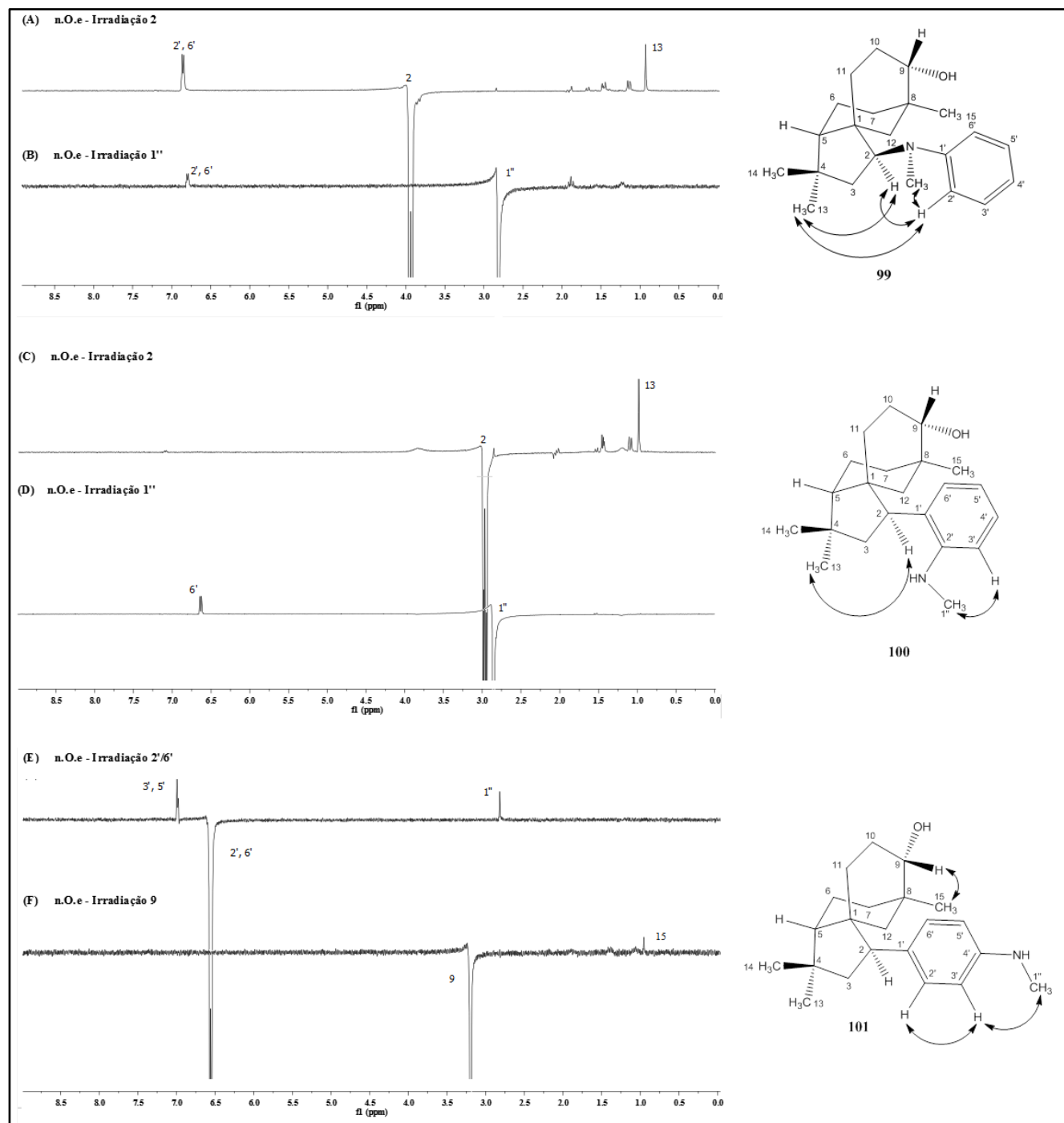
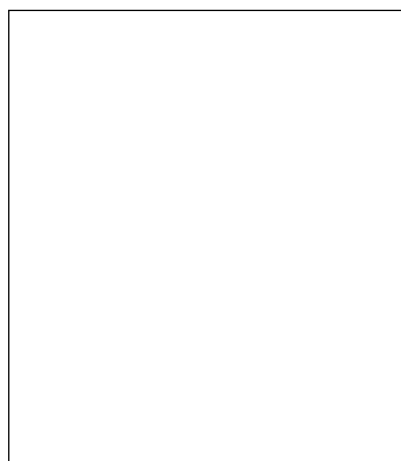


Figura 68- Espectros de n.O.e(400MHz, CDCl<sub>3</sub>) dos compostos **99**, **100** e **101**



Nos espectros de massas EM-ESI positivo (APÊNDICE R2-T2, p. 200-201), obtido em um espectrofotômetro ESI-Q-TOF, foram observados os picos base das espécies protonadas  $[M+H]^+$  em  $m/z$  328,2643 para o composto **99**, em  $m/z$  328,2638 para o composto **100** e em  $m/z$  328,2649 para **101**.

**2β-(N-metilnilina)clovan-9α-ol (99)**



Líquido viscoso de coloração amarelada;  $[\alpha]_{20}^D$ :  $-77,0^\circ$  ( $c = 33,8 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $\text{CHCl}_3$ ); **IV (KBr)  $\nu_{\text{max}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ )**: 3404 ( $\nu_{\text{O-H}}$ ), 2948, 2928 e 2864 ( $\nu_{\text{C-H}}$ ), 1596 ( $\nu_{\text{N-C=C}}$ ), 1504 ( $\nu_{\text{C=C}}$ ), 1274 ( $\nu_{\text{C-N}}$ ), 748 ( $\delta_{\text{C}_{\text{sp}^2\text{-H}}$ ). **RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm)**: 7,25-7,20 (m, 2H, H-3', H-5'), 6,86 (d, 2H, H-2', H-6',  $J=8,3\text{Hz}$ ), 6,69 (t, 1H, H-4',  $J=7,2\text{Hz}$ ), 3,94 (dd, 1H, H-2 $\alpha$ ,  $J=12,9$  e  $5,5\text{Hz}$ ), 3,27 (sl, 1H, H-9 $\beta$ ), 2,84 (s, 3H, H-1''), 2,03-1,92 (m, 1H, 10 $\beta$ ), 1,90 (d, 1H, H-3 $\beta$ ,  $J=12,6\text{Hz}$ ), 1,67 (d, 1H, H-12 $\beta$ ,  $J=12,6\text{Hz}$ ), 1,65-1,62 (m, 2H, H-11 $\alpha$ , H-10 $\alpha$ ), 1,50-1,37 (m, 6H, H-6, H-7 $\beta$ , H-3 $\alpha$ , H-5), 1,29-1,20 (m, 1H, H-11 $\beta$ ), 1,18-1,11 (m, 2H, H-12 $\alpha$ , H-7 $\alpha$ ), 1,10 (s, 3H, H-14), 0,98 (s, 3H, H-15), 0,93 (s, 3H, H-13). **RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm)**: 151,6 (C-1'), 128,9 (C-3', C-5'), 115,9 (C-4'), 112,6 (C-2', C-6'), 74,9 (C-9), 67,8 (C-2), 50,0 (C-5), 46,1 (C-1), 42,8 (C-3), 37,0 (C-4), 36,8 (C-12), 34,9 (C-1''), 34,5 (C-8), 33,2 (C-7), 31,3 (C-14), 28,6 (C-11), 28,5 (C-15), 25,6 (C-10), 24,9 (C-13), 20,6 (C-6). **HMBC (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**: H-3' (C-2') -  $^2J_{\text{CH}}$ , H-3' (C-1', C-5') -  $^3J_{\text{CH}}$ , H-5' (C-6') -  $^2J_{\text{CH}}$ , H-5' (C-1', C-3') -  $^3J_{\text{CH}}$ , H-2' (C-4', C-6') -  $^3J_{\text{CH}}$ , H-6' (C-2', C-4') -  $^3J_{\text{CH}}$ , H-4' (C-3', C-5') -  $^2J_{\text{CH}}$ , H-4' (C-2', C-6') -  $^3J_{\text{CH}}$ , H-2 (C-1, C-3) -  $^2J_{\text{CH}}$ , H-2 (C-1', C-1''), C-11, C-12) -  $^3J_{\text{CH}}$ , H-1'' (C-1', C-2) -  $^3J_{\text{CH}}$ , H-9 (C-11) -  $^3J_{\text{CH}}$ , H-3 (C-2, C-4) -  $^2J_{\text{CH}}$ , H-3 (C-13, C-14) -  $^3J_{\text{CH}}$ , H-10 (C-1) -  $^3J_{\text{CH}}$ , H-11 (C-5) -  $^3J_{\text{CH}}$ , H-11 (C-10) -  $^2J_{\text{CH}}$ , H-12 (C-1, C-8) -  $^2J_{\text{CH}}$ , H-12 (C-5, C-7, C-11) -  $^3J_{\text{CH}}$ , H-13 (C-4) -  $^2J_{\text{CH}}$ , H-13 (C-3, C-5, C-14) -  $^3J_{\text{CH}}$ , H-14 (C-4) -  $^2J_{\text{CH}}$ , H-14 (C-3, C-5, C-13) -  $^3J_{\text{CH}}$ , H-15 (C-8) -  $^2J_{\text{CH}}$ , H-15 (C-7, C-9, C-12) -  $^3J_{\text{CH}}$ . **COSY (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**: H-3'xH-4', H-5'xH-4', H-3'xH-2', H-5'xH-6', H-9xH-10, H-10xH-11, H-6xH-7. **EM  $m/z$** : 328,2643[M+H]<sup>+</sup>. **MM**: 327,2562. **FM**: C<sub>22</sub>H<sub>33</sub>NO.

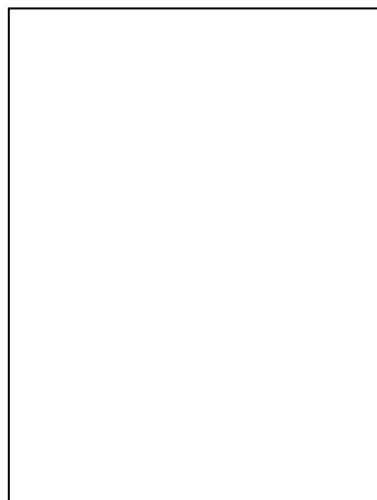
**2β-[o-(metilamino)fenil]clovan-9α-ol (100)**



Sólido branco cristalino; Tf: 181,6-183,2°C;  $[\alpha]_{20}^D$ :  $-77,0^\circ$  ( $c = 33,8 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $\text{CHCl}_3$ ); **IV (KBr)  $\nu_{\text{max}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ )**: 3356 ( $\nu_{\text{O-H, N-H}}$ ), 2944, 2928 e 2862 ( $\nu_{\text{C-H}}$ ), 1508 ( $\nu_{\text{N-C=C}}$ ), 1460 ( $\nu_{\text{C=C}}$ ), 746 ( $\delta_{\text{C}_{\text{sp}^2\text{-H}}$ ). **RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm)**: 7,05-7,17 (m, 2H, H-3', H-5'), 6,68 (t, 1H, H-4',  $J = 7,5 \text{ Hz}$ ), 6,64 (d, 1H, H-6',  $J = 8,0 \text{ Hz}$ ), 3,85 (s, 1H, NH), 3,21 (sl, 1H, H-9 $\beta$ ), 2,98 (dd, 1H, H-2 $\alpha$ ,  $J = 13,5$  e  $5,0 \text{ Hz}$ ), 2,86 (s, 3H, H-1''), 2,06 (t, 1H, 3 $\beta$ ,  $J = 12,6 \text{ Hz}$ ), 1,99-1,87 (m, 1H, H-10 $\beta$ ), 1,54 (d, 1H, H-12 $\beta$ ,  $J = 11,9 \text{ Hz}$ ), 1,51-1,38 (m, 7H, H-3 $\alpha$ , H-5, H-6, H-10 $\alpha$ , H-7 $\beta$ ), 1,13 (s, 3H, H-14), 1,10-1,01 (m, 3H, H-12 $\alpha$ , H-7 $\alpha$ , H-11 $\beta$ ), 0,99 (s, 3H, H-13), 0,96 (s, 3H, H-15), 0,87 (td, 3H, H-11 $\alpha$ ,  $J = 13,6$  e  $4,7 \text{ Hz}$ ). **RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm)**: 147,5 (C-1'), 128,5 (C-3'), 126,8 (C-5'), 125,2 (C-2'), 116,3 (C-4'), 110,4 (C-6'), 74,9 (C-9), 51,5 (C-5), 47,4 (C-2), 45,9 (C-3), 45,5 (C-1), 38,9 (C-4), 38,2 (C-12), 35,3 (C-8), 33,2 (C-7), 31,1 (C-1''), 31,1 (C-14), 30,1 (C-11), 28,5 (C-15), 26,0 (C-10), 24,4 (C-13), 20,9 (C-6). **HMBC (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**: H-3' (C-5', C-1') -  $^3J_{\text{CH}}$ , H-4' (C-2', C-6') -  $^3J_{\text{CH}}$ , H-5' (C-1', C-3') -  $^3J_{\text{CH}}$ , H-6' (C-2', C-4') -  $^3J_{\text{CH}}$ , H-2 (C-2', C-1, C-3) -  $^2J_{\text{CH}}$ , H-2 (C-1', C-3', C-11, C-12) -  $^3J_{\text{CH}}$ , H-3 (C-2, C-4) -  $^2J_{\text{CH}}$ , H-3 (C-13, C-14) -  $^3J_{\text{CH}}$ , H-11 (C-1, C-10) -  $^2J_{\text{CH}}$ , H-11 (C-5) -  $^3J_{\text{CH}}$ , H-12 (C-1, C-8) -  $^2J_{\text{CH}}$ , H-12 (C-7, C-5) -  $^3J_{\text{CH}}$ , H-13 (C-4) -  $^2J_{\text{CH}}$ , H-13 (C-3, C-5, C-14) -  $^3J_{\text{CH}}$ , H-14 (C-4) -  $^2J_{\text{CH}}$ , H-14

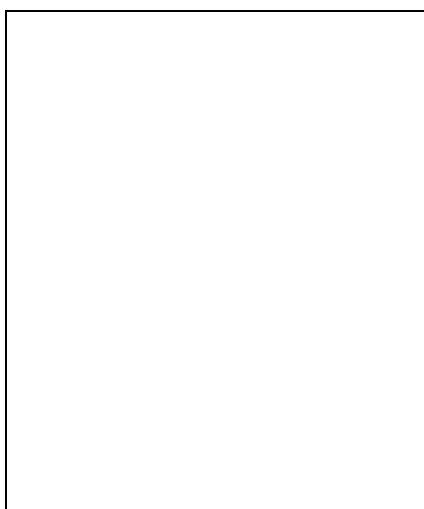
(C-3, C-5, C-13) -  $^3J_{CH}$ , H-15 (C-8) -  $^2J_{CH,H-15}$  (C-7, C-9, C-12) -  $^3J_{CH}$ . **COSY (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** H-3' x H-4', H-4' x H-5', H-5' x H-6', H-2 x H-3, H-9 x H-10, H-10 x H-11. **EM m/z:** 328,2638 [M+H]<sup>+</sup>. **MM:** 327,2562. **FM:** C<sub>22</sub>H<sub>33</sub>NO.

#### 2β-[p-metilamino)fenil]clovan-9α-ol (101)



Líquido viscoso de coloração amarelada;  $[\alpha]_{20}^D$ : 2,24 ° (c = 33,8 mg mL<sup>-1</sup>, CHCl<sub>3</sub>); **IV (KBr) vmax (cm<sup>-1</sup>):** 3418 (ν O-H, N-H), 2922 (ν C-H), 1628 (ν C=C), 1264 (ν C-N), 774 (δ C<sub>sp<sup>2</sup>-H</sub>). **RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 6,99 (d, 2H, H-3', H-5', J=8,5 Hz), 6,56 (d, 2H, H-4', H-6', J=8,5 Hz), 3,20 (sl, 1H, H-9β), 2,85-2,87 (m, 4H, H-1'', H-2α), 1,90 (s, 2H, H-3β, H-10β), 1,54 (d, 1H, H-12β, J=11,9 Hz), 1,58-1,31 (m, 8H, H-12β, H-3α, H-6, H-10α, H-7β, H-5), 1,11 (s, 3H, H-14), 1,08-0,97 (m, 3H, H-12α, H-7α, H-11β), 0,96 (s, 3H, H-15), 0,96 (s, 3H, H-15), 0,94 (s, 3H, H-13), 0,72 (td, 1H, H-11α, J=13,6 e 4,6 Hz). **RMN de <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 147,8 (C-1'), 130,3 (C-4'), 129,4 (C-3', C-5'), 112,4 (C-2', C-6'), 75,3 (C-9), 54,1 (C-2), 51,6 (C-5), 44,9 (C-3), 44,9 (C-1), 39,1 (C-4), 36,7 (C-12), 35,2 (C-8), 33,4 (C-7), 31,4 (C-1''), 31,2 (C-14), 29,4 (C-11), 28,7 (C-15), 26,1 (C-10), 24,6 (C-13), 21,2 (C-6). **HMBC (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** H-2' (C-4', C-6') -  $^3J_{CH}$ , H-6' (C-2', C-4') -  $^3J_{CH}$ , H-3' (C-1', C-5', C-2) -  $^3J_{CH}$ , H-5' (C-1', C-3', C-2) -  $^3J_{CH}$ , H-1'' (C-1') -  $^3J_{CH}$ , H-2 (C-4', C-1, C-3) -  $^2J_{CH}$ , H-2 (C-11) -  $^3J_{CH}$ , H-3 (C-2, C-4) -  $^2J_{CH}$ , H-3 (C-13) -  $^3J_{CH}$ , H-13 (C-4) -  $^2J_{CH}$ , H-13 (C-3, C-5, C-14) -  $^3J_{CH}$ , H-14 (C-4) -  $^2J_{CH}$ , H-14 (C-3, C-5, C-13) -  $^3J_{CH}$ , H-15 (C-8) -  $^2J_{CH}$ , H-15 (C-7, C-9, C-12) -  $^3J_{CH}$ . **COSY (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** H-2' x H-3', H-5' x H-6', H-2 x H-3, H-9 x H-10, H-10 x H-11. **EM m/z:** 328,2649 [M+H]<sup>+</sup>. **MM:** 327,2562. **FM:** C<sub>22</sub>H<sub>33</sub>NO.

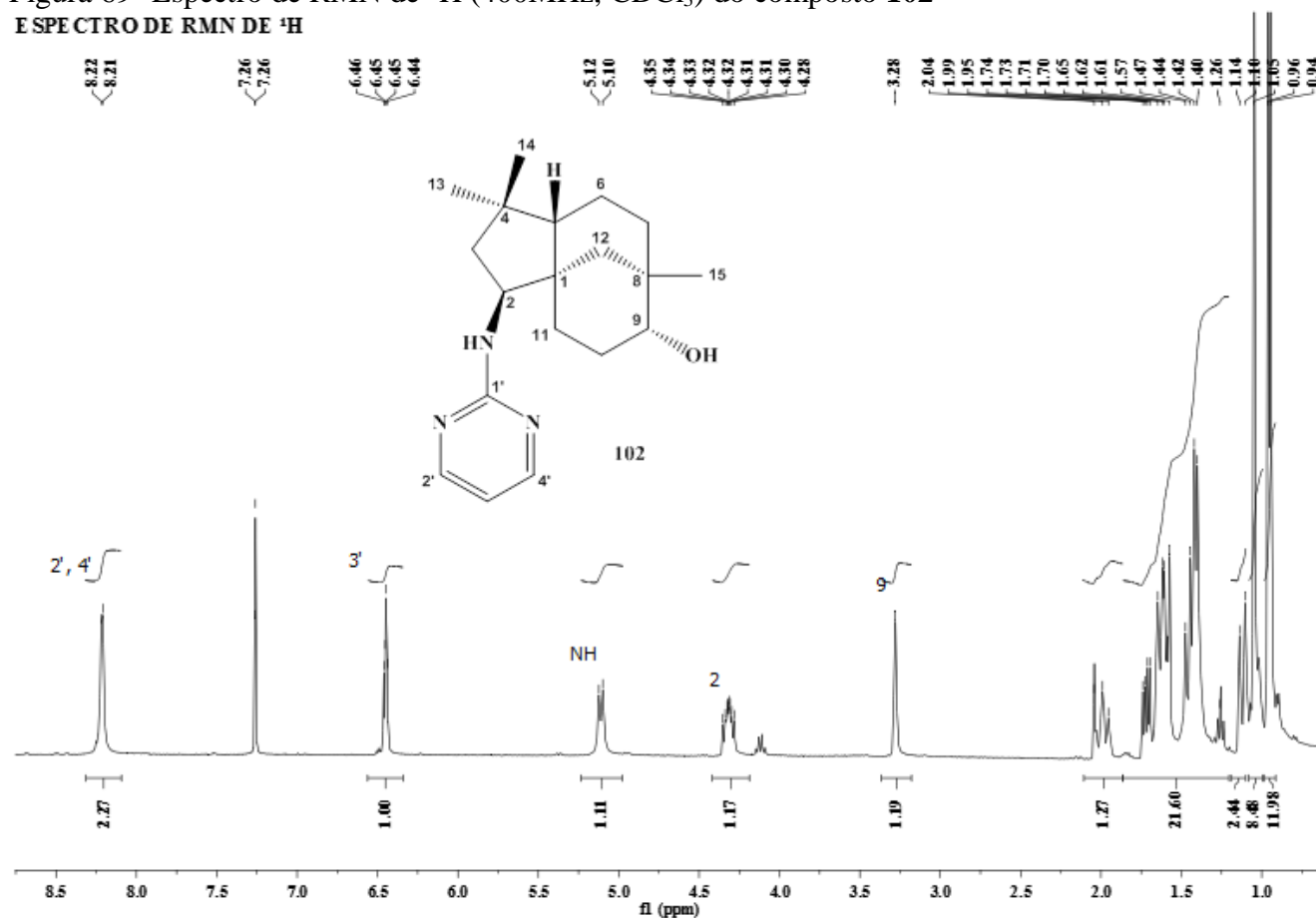
#### 4.2.5 2β-(N-pirimidin)clovan-9α-ol (102)



O composto **102** apresentou-se como um sólido branco com temperatura de fusão na faixa entre 85,5-87,0°C. No espectro na região do IV (APÊNDICE U2, p. 202) obtido para **102** foram observadas bandas referentes aos estiramentos OH e NH em 3388 cm<sup>-1</sup> e aos estiramentos C-H de grupo alifático em 2946, 2924 e 2860 cm<sup>-1</sup>. Em 1588 cm<sup>-1</sup> foi possível observar uma banda intensa referente ao estiramento N=C e em 1522 referente ao estiramento N-C=C (BIEMANN, 1998).

No espectro de RMN de <sup>1</sup>H (FIG. 69) foram observados sinais em δ 3,28 (sl) atribuído ao hidrogênio H-9, em δ 4,37-4,26 (m) atribuído ao hidrogênio H-2 e em δ 5,11 (d, J=9,7 Hz) atribuído ao hidrogênio N-H da aminopirimidina. Na região referente a hidrogênios aromáticos, foram observados sinais em 6,47-6,43 (m) e 8,21 (d, J=4,3 Hz) atribuídos respectivamente aos hidrogênios H-3' e H-2'/H-4' do anel pirimidínico. A atribuição do sinal em δ 5,11 foi confirmada a partir do mapa de contornos HSQC (APÊNDICE V2-X2, p. 202-203), no qual não foi observada nenhuma correlação para este sinal.

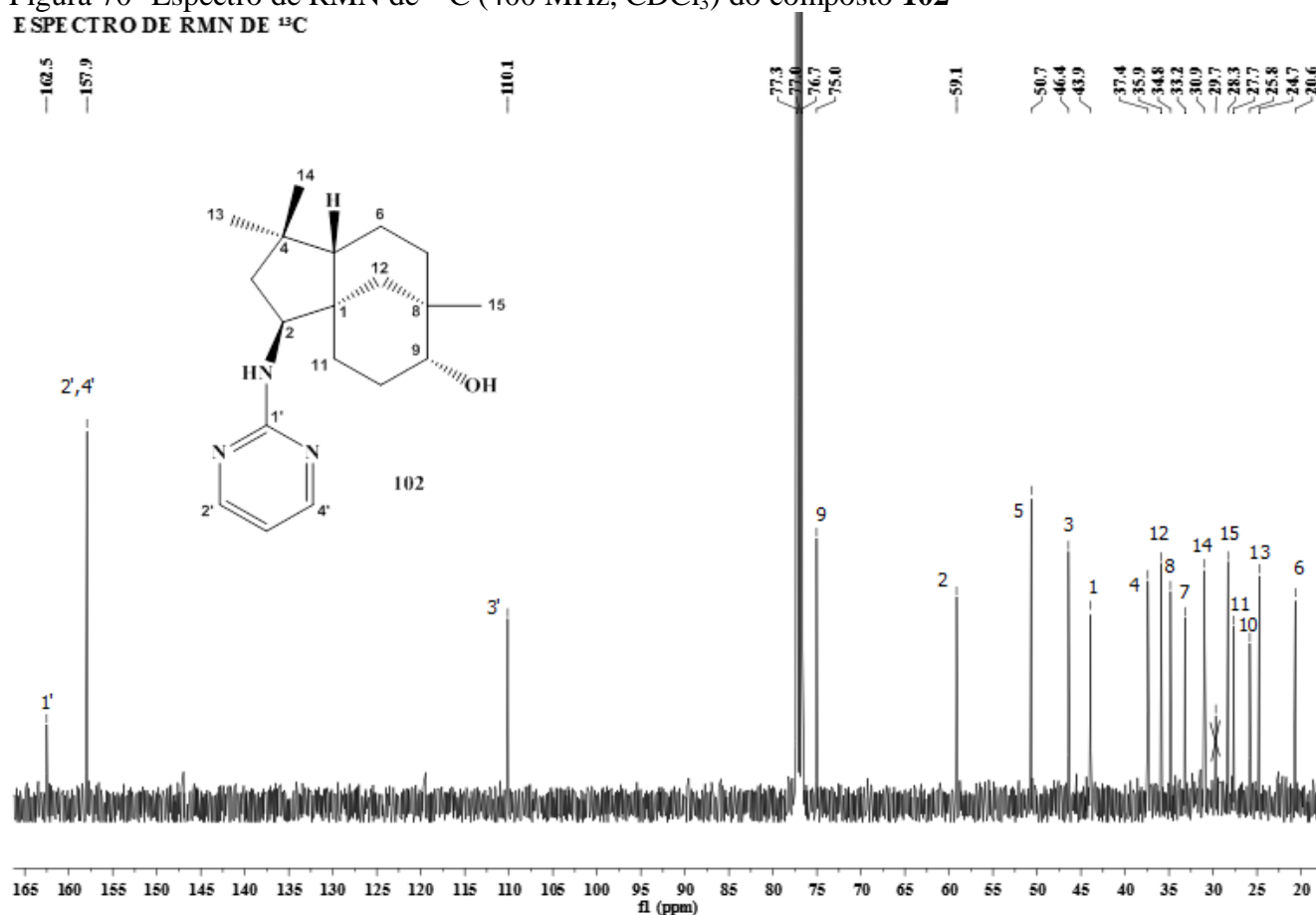
Figura 69- Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do composto **102**



Pela análise do espectro de RMN de <sup>13</sup>C (FIG. 70, p. 106), verificou-se a presença de 18 sinais, sendo três referentes aos carbonos C-3' (δ 110,1), C-2'/C-4' (δ 157,9) e C-1' (δ 162,5) do anel

pirimidínico. No mapa de contornos HMBC (APÊNDICE Z2 e A3, p. 203-204) foram observadas correlações  $^2J_{CH}$  entre o hidrogênio H-3' com os carbonos C-2' e C-4' e  $^3J_{CH}$  entre o hidrogênio H-2 do esqueleto clovânico e o carbono C-1' do anel pirimidínico, confirmando a ligação entre o nitrogênio do grupo amino com o carbono C-2 do esqueleto sesquiterpênico.

Figura 70- Espectro de RMN de  $^{13}C$  (400 MHz,  $CDCl_3$ ) do composto **102**  
ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}C$



A disposição espacial de alguns átomos foi determinada utilizando o espectro n.O.e (APÊNDICE B3, p. 205). Quando se irradiou o sinal referente ao hidrogênio H-2 observou-se a intensificação dos sinais atribuídos aos hidrogênios H-13, H-3 $\alpha$  e H-12 $\alpha$ , e ao irradiar o sinal referente ao hidrogênio H-9 $\beta$  do anel clovânico o sinal atribuído ao hidrogênio H-15 se intensificou. No espectro de massas EM-ESI positivo (APÊNDICE C3, p. 205), obtido em um espectrofotômetro ESI-Q-TOF, foi observado o pico base da espécie protonada  $[M+H]^+$  em  $m/z$  316,2390.

### **2 $\beta$ -(N-pirimidin)clován-9 $\alpha$ -ol (102)**



Sólido branco. Tf: 85,5-87,0°C;  $[\alpha]_{20}^D$ : -14,09° (c = 33,8 mg mL<sup>-1</sup>, CHCl<sub>3</sub>); **IV (KBr) v<sub>max</sub> (cm<sup>-1</sup>):** 3388 (ν O-H, N-H), 2946, 2924 e 2860 (ν C-H), 1588 (ν N=C), 1522 (ν N-C=C), 1456 (ν C-N). **RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 8,21 (d, 2H, H-2', H-4', J= 4,3 Hz), 6,47-6,43 (m), 5,11 (d, 1H, NH, J=9,7 Hz), 4,37-4,26 (m, 1H, H-2), 3,28 (sl, 1H, H-9β), 2,06-1,92 (m, 1H, H-10β), 1,72 (dd, 1H, H-3α, J= 11,8 e 5,8 Hz), 1,68-1,55 (m, 3H, H-10α, H-11β, H-12β), 1,50-1,36 (m, 6H, H-3β, H-7β, H-6, H-5), 1,16-1,06 (m, 2H, H-12α, H-7α), 1,05 (s, 3H, H-14), 1,02 (s, 1H, H-11), 0,96 (s 3H, H-13), 0,94 (s, 3H, H-

15). **RMN de <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 162,5 (C-1'), 157,9 (C-2', C-4'), 110,1 (C-3'), 75,0 (C-9), 59,1 (C-2), 50,7 (C-5), 46,4 (C-3), 43,9 (C-1), 37,4 (C-4), 35,9 (C-12), 34,8 (C-8), 33,2 (C-7), 30,9 (C-14), 29,7 (C-15), 27,7 (C-11), 25,8 (C-10), 24,7 (C-13), 20,6 (C-6). **HMBC (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** H-2' (C-3') - <sup>2</sup>J<sub>CH</sub>, H-2' (C-1') - <sup>3</sup>J<sub>CH</sub>, H-3' (C-2', C-4') - <sup>2</sup>J<sub>CH</sub>, H-2 (C-3, C-1) - <sup>3</sup>J<sub>CH</sub>, H-2 (C-1', C-11, C-12) - <sup>3</sup>J<sub>CH</sub>, H-3 (C-2, C-4) - <sup>2</sup>J<sub>CH</sub>, H-3 (C-1, C-5, C-13) - <sup>3</sup>J<sub>CH</sub>, H-13 (C-4) - <sup>2</sup>J<sub>CH</sub>, H-13 (C-3, C-5, C-14) - <sup>3</sup>J<sub>CH</sub>, H-14 (C-4) - <sup>2</sup>J<sub>CH</sub>, H-14 (C-3, C-5, C-13) - <sup>3</sup>J<sub>CH</sub>, H-15 (C-8) - <sup>2</sup>J<sub>CH</sub>, H-15 (C-7, C-9, C-12) - <sup>3</sup>J<sub>CH</sub>. **EM m/z:** 316,2390 [M+H]<sup>+</sup>. **MM:** 315,2311. **FM:** C<sub>19</sub>H<sub>29</sub>N<sub>3</sub>O.

#### 4.2.6 N-(fenil)-N'-(9α-hidroxiclovan-2β-il)-benzamidina (**103**)

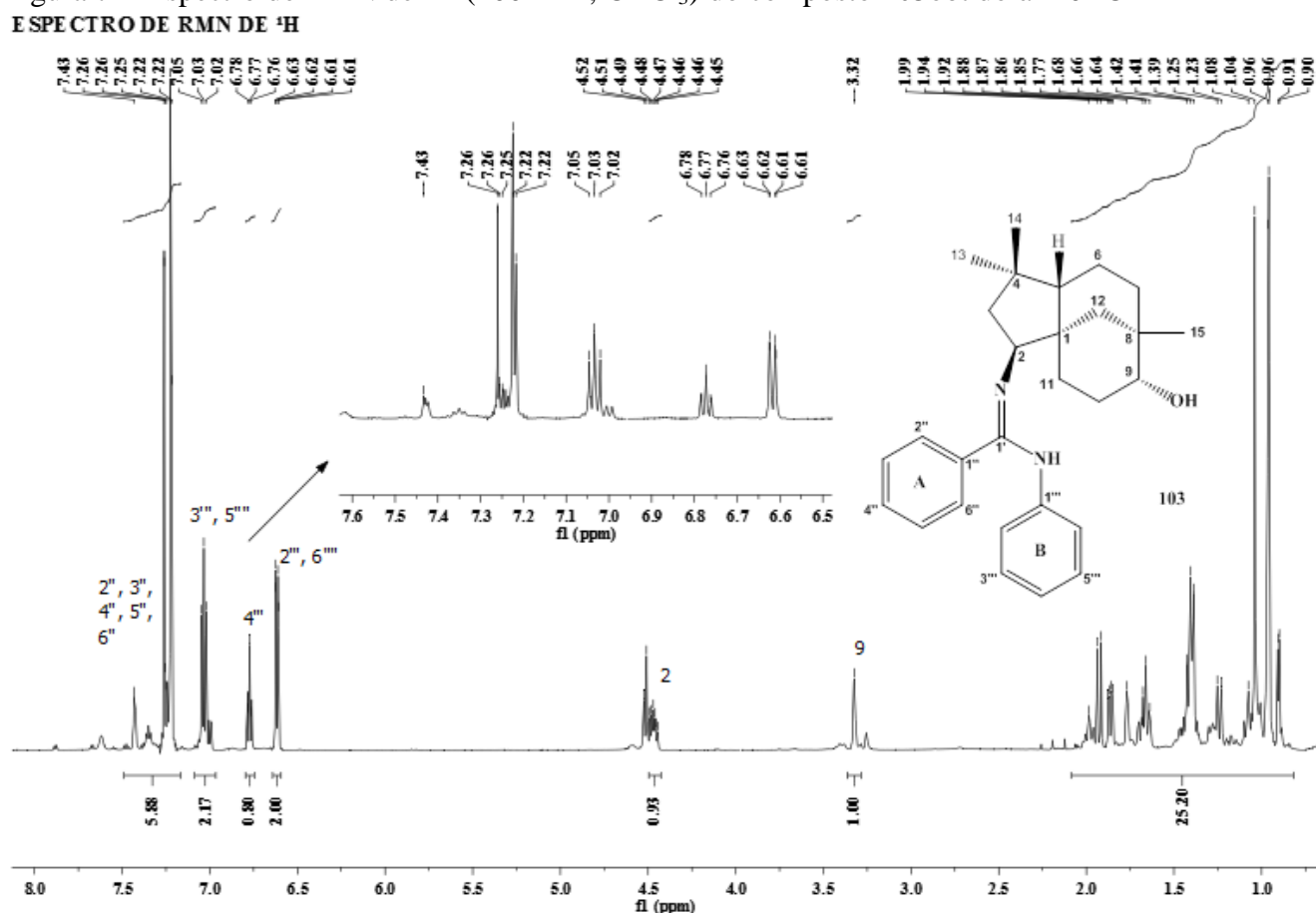


O composto **103** apresentou-se como um líquido viscoso de coloração amarela. O espectro na região de IV (APÊNDICES D3, p. 206) apresentou bandas em 3446 cm<sup>-1</sup>, referente aos estiramentos de OH e NH e em 2944 e 2862 cm<sup>-1</sup> referentes aos estiramentos de C-H de grupo alifático. Em 1618cm<sup>-1</sup>

<sup>1</sup>foi possível observar uma banda intensa referente ao estiramento N=C e a banda em 1590cm<sup>-1</sup> atribuída ao estiramento de N-C=C(BIEMANN, 1998).

Ao se obter o espectro de RMN de <sup>1</sup>H, a 25°C, do composto **103** observou-se a presença de sinais largos, o que pode ser justificado por uma possível interconversão entre diferentes conformêros a essa temperatura. Desta forma realizou-se um estudo de espectroscopia de RMN de <sup>1</sup>H a baixas temperaturas, 25, 0, -10, -20, -30 e -40°C, (APÊNDICE E3-J3, p. 206-209), no qual foi possível obter uma boa resolução espectral a -20°C (FIG. 71). Desta forma todos os espectros de RMN mono e bidimensionais foram obtidos à -20 °C.

Figura 71- Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) do composto **103** obtido à -20 °C



Analisando o espectro de RMN de <sup>1</sup>H (FIG. 71), além dos sinais típicos do esqueleto sesquiterpênico, em  $\delta$  3,32 (sl) e  $\delta$  4,56-4,42 (m) atribuídos aos hidrogênios H-9 e H-2 respectivamente, foram observados na região de hidrogênios aromáticos, quatro multipletos sendo um em  $\delta$  7,43-7,13, atribuído aos hidrogênios H-2'', H-3'', H-4'', H-5'' e H-6'' do anel aromático A, e os outros três referentes a hidrogênios do anel aromático B, sendo o multipletto em  $\delta$  6,63-6,60 atribuído aos



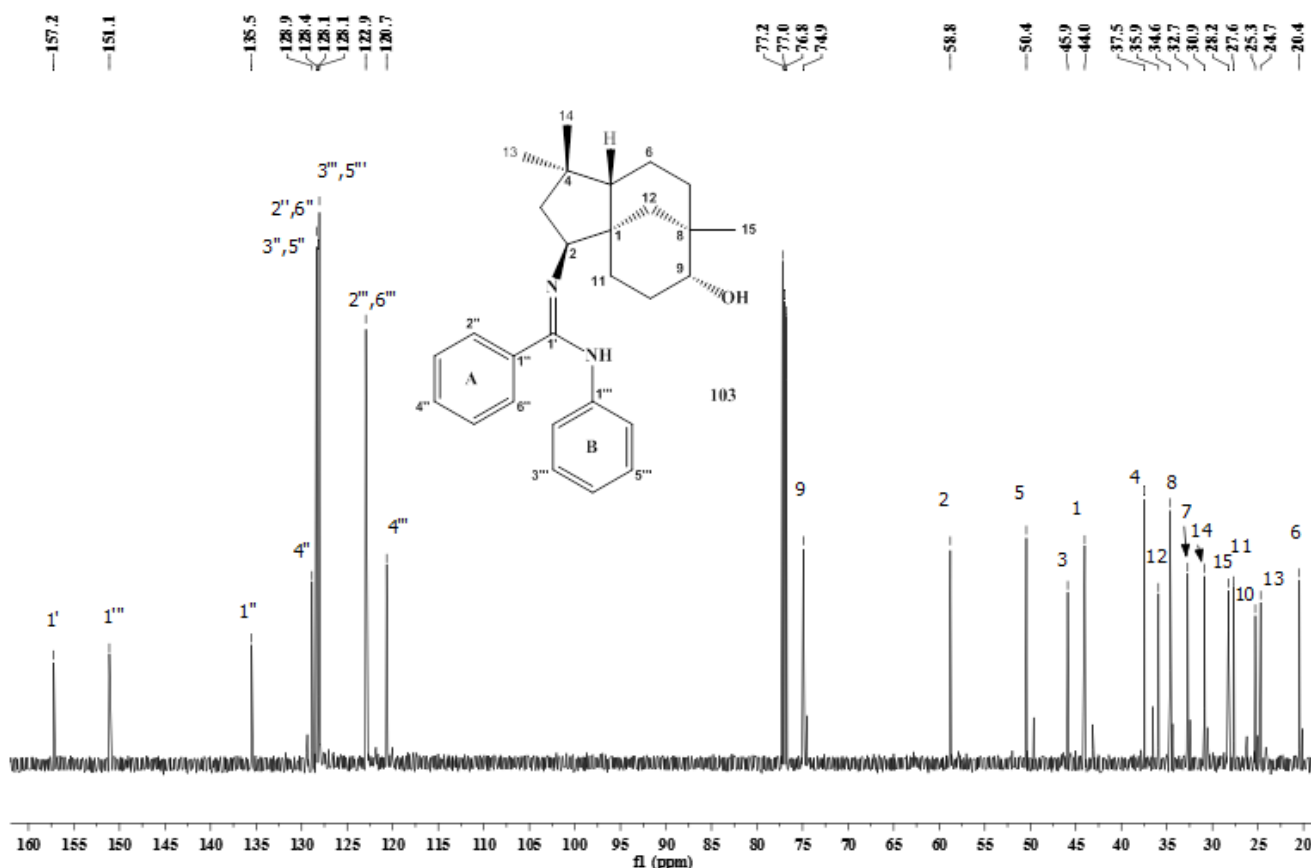
hidrogênios H-2''' e H-6''', em  $\delta$  6,79-6,75(m) atribuído ao hidrogênio H-4''' e em  $\delta$  7,06-7,01 (m) atribuído aos hidrogênios H-3''' e H-5'''.

As posições dos hidrogênios aromáticos do anel B foram determinadas a partir das correlações visualizadas no mapa de contornos COSY (APÊNDICE L3, p. 209), no qual foram observadas correlações entre os hidrogênios H-2''' x H-3''', H-5''' x H-6''', H-3''' x H-4''' e H-4''' x H-5'''.

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (FIG. 72) foram observados 23 sinais, sendo oito localizados na região referente a carbonos aromáticos. Estes sinais foram atribuídos aos respectivos hidrogênios com auxílio do mapa de contornos HSQC (APÊNDICE M3-N3, p. 210), sendo os sinais em  $\delta$  120,7 atribuído ao C-4''', em  $\delta$  122,9 atribuído aos carbonos C-2'''/C-6''', em  $\delta$  128,1 atribuído aos carbonos C-3'''/C-5''' e aos carbonos C-2''/C-6'', em  $\delta$  128,4 atribuído aos carbonos C-3''/C-5'', em  $\delta$  128,9 atribuído ao carbono C-4'' e os carbonos não hidrogenados C-1'', C-1''' e C-1' foram relacionados aos deslocamentos observados em  $\delta$  135,5,  $\delta$  151,1 e  $\delta$  157,2.

Figura 72- Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do composto **103** à  $-20^\circ\text{C}$

**ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$**



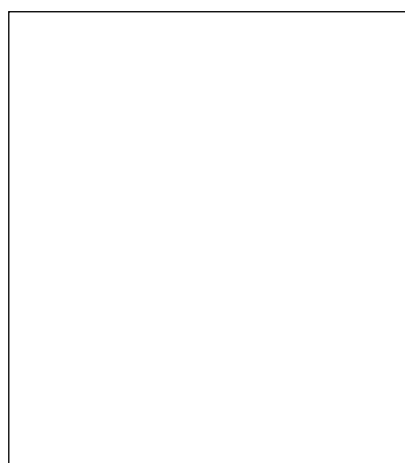
A conexão entre o esqueleto clovânico e os anéis aromáticos foi determinada a partir do mapa de contornos HMBC (APÊNDICE O3-P3, p. 211), no qual observou-se a correlação  $^3J_{\text{CH}}$  entre os

hidrogênios H-2 e o carbono C-1' (FIG. 73, p. 110). Também foram observadas as correlações  $^3J_{CH}$  entre os hidrogênio H-6''' e o carbono C-1''' confirmando a conectividade proposta para os anéis aromáticos A e B. As demais correlações observadas para o composto **103** podem ser visualizadas no mapa de contornos HMBC (APÊNDICE O3-P3, p. 211).

Figura 73- Algumas correlações da *N*-(fenil)-*N'*-(9 $\alpha$ -hidroxiclovan-2 $\beta$ -il)-benzamidina (**103**) visualizadas no mapa de contornos HMBC

No espectro de massas EM-ESI positivo (APÊNDICE Q3, p. 212), obtido em um espectrofotômetro ESI-Q-TOF, foi possível visualizar o pico base da espécie protonada  $[M+H]^+$  em  $m/z$  417.

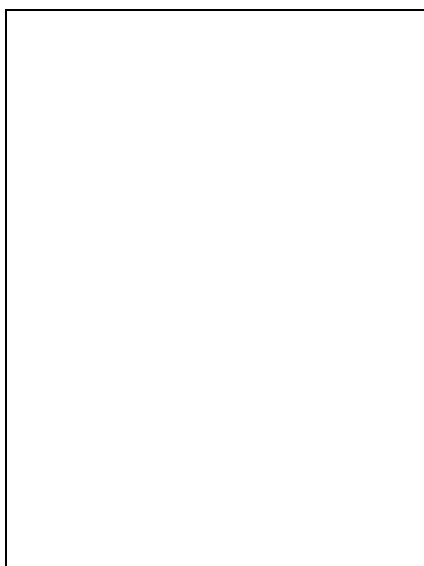
#### **N-(fenil)-N'-(9 $\alpha$ -hidroxiclovan-2 $\beta$ -il)-benzamidina (103)**



Líquido viscoso de coloração amarela ( $\nu_{O-H}$ ,  $\nu_{N-H}$ ), 2944 e 2862 ( $\nu_{C-H}$ ), 1618 ( $\nu_{N=C}$ ), 1590 ( $\nu_{N-C=C}$ ), 1486 ( $\nu_{C=C}$ ), 766 e 698 ( $\delta_{C_{sp^2-H}}$ ). **RMN de  $^1H$  (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm):** 7,43-7,13 (m, 5H, H-2'', H-3'', H-4'', H-5'', H-6''), 7,06-7,01 (m, 2H, H-3''', H-5'''),  $\delta$  6,79-6,75 (m, 1H, H-4'''),  $\delta$  6,63-6,60 (m, 2H, H-2''', H-6'''), 4,56-4,42 (m, 1H, H-2 $\alpha$ ), 3,32 (sl, 1H, H-9 $\beta$ ), 2,03-1,95 (m, 1H, H-10 $\beta$ ), 1,93 (d,  $J=13,3$  Hz, 1H, H-12 $\beta$ ), 1,86 (dd,  $J=11,6$  e  $5,6$  Hz, 1H, H-3 $\beta$ ), 1,73-1,61 (m, 2H, H-10 $\alpha$ , H-11 $\beta$ ), 1,50-1,33 (m, 5H, H-3 $\alpha$ , H-5, H-6, H-7 $\beta$ ), 1,24 (d,  $J=13,3$  Hz, 1H, H-12 $\alpha$ ), 1,11-1,06 (m, 1H, H-7 $\alpha$ ), 1,04 (s, 3H, H-14), 1,02-0,98 (m, 1H, H-11 $\alpha$ ), 0,96 (s, 3H, H-13), 0,96 (s, 3H, H-15), 0,90 (d,  $J=5,0$  Hz, 1H, 11 $\alpha$ ). **RMN de  $^{13}C$  (100 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm):** 157,2 (C-1'), 151,1 (C-1'''), 135,5 (C-1''), 128,9 (C-4''), 128,4 (C-3'', C-5''), 128,1 (C-2'', C-6''), 128,1 (C-3''', C-5'''), 123,0 (C-2''', C-6'''), 120,7 (C-4'''), 74,9 (C-9), 58,8 (C-2), 50,4 (C-5), 45,9 (C-3), 44,0 (C-1), 37,5 (C-4), 35,9 (C-12), 34,7 (C-8), 32,7 (C-

7), 30,9 (C-14), 28,2 (C-15), 27,6 (C-11), 25,3 (C-10), 24,7 (C-13), 20,5 (C-6). **HMBC (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** H-4''' (C-3''', C-5''') - <sup>2</sup>J<sub>CH</sub>, H-4''' (C-2''', C-6''') - <sup>3</sup>J<sub>CH</sub>, H-2''' (C-1''') - <sup>2</sup>J<sub>CH</sub>, H-2''' (C-4''', C-6''') - <sup>3</sup>J<sub>CH</sub>, H-6''' (C-1''') - <sup>2</sup>J<sub>CH</sub>, H-6''' (C-2''', C-4''') - <sup>3</sup>J<sub>CH</sub>, H-3''' (C-2''') - <sup>2</sup>J<sub>CH</sub>, H-3''' (C-1'', C-5'') - <sup>3</sup>J<sub>CH</sub>, H-5''' (C-6''') - <sup>2</sup>J<sub>CH</sub>, H-5''' (C-1''') - <sup>3</sup>J<sub>CH</sub>, H-2 (C-1') - <sup>3</sup>J<sub>CH</sub>, H-3 (C-2) - <sup>2</sup>J<sub>CH</sub>, H-3 (C-1, C-5, C-13) - <sup>3</sup>J<sub>CH</sub>, H-11 (C-10) - <sup>2</sup>J<sub>CH</sub>, H-11 (C-5, C-9, C-12) - <sup>3</sup>J<sub>CH</sub>, H-12 (C-1, C-8) - <sup>2</sup>J<sub>CH</sub>, H-12 (C-5, C-7, C-9) - <sup>3</sup>J<sub>CH</sub>, H-13 (C-4) - <sup>2</sup>J<sub>CH</sub>, H-13 (C-3, C-5, C-14) - <sup>3</sup>J<sub>CH</sub>, H-14 (C-4) - <sup>2</sup>J<sub>CH</sub>, H-14 (C-3, C-5, C-13) - <sup>3</sup>J<sub>CH</sub>, H-15 (C-8) - <sup>2</sup>J<sub>CH</sub>, H-15 (C-7, C-9, C-12) - <sup>3</sup>J<sub>CH</sub>. **COSY (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** H-4''' x H-3''', H-4''' x H-5''', H-2''' x H-3''', H-6''' x H-5''', H-3 x H-2. **EM m/z:** 417,2918[M+H]<sup>+</sup>. **MM:** 416,2828. **FM:** C<sub>28</sub>H<sub>36</sub>N<sub>2</sub>O.

#### 4.2.7 *N*-(*p*-nitrofenil)-*N'*-(9 $\alpha$ -hidroxiclovan-2 $\beta$ -il)-benzamidina (**104**)



O composto **104** apresentou-se como um sólido amarelo cristalino, com a temperatura de fusão na faixa entre 198,9-200,0°C. No espectro na região do IV (APÊNDICE R3, p. 212) foram observadas bandas em 3406 cm<sup>-1</sup> referente aos estiramentos de O-H e N-H, em 1580cm<sup>-1</sup> referente ao estiramento de N-C=C. Foi ainda observado em 1326 cm<sup>-1</sup> uma banda intensa referente a deformação axial simétrica de NO<sub>2</sub> e em 1282 e 1108cm<sup>-1</sup> bandas referentes aos estiramentos de C-N e C-O, respectivamente (BIEMANN, 1998).

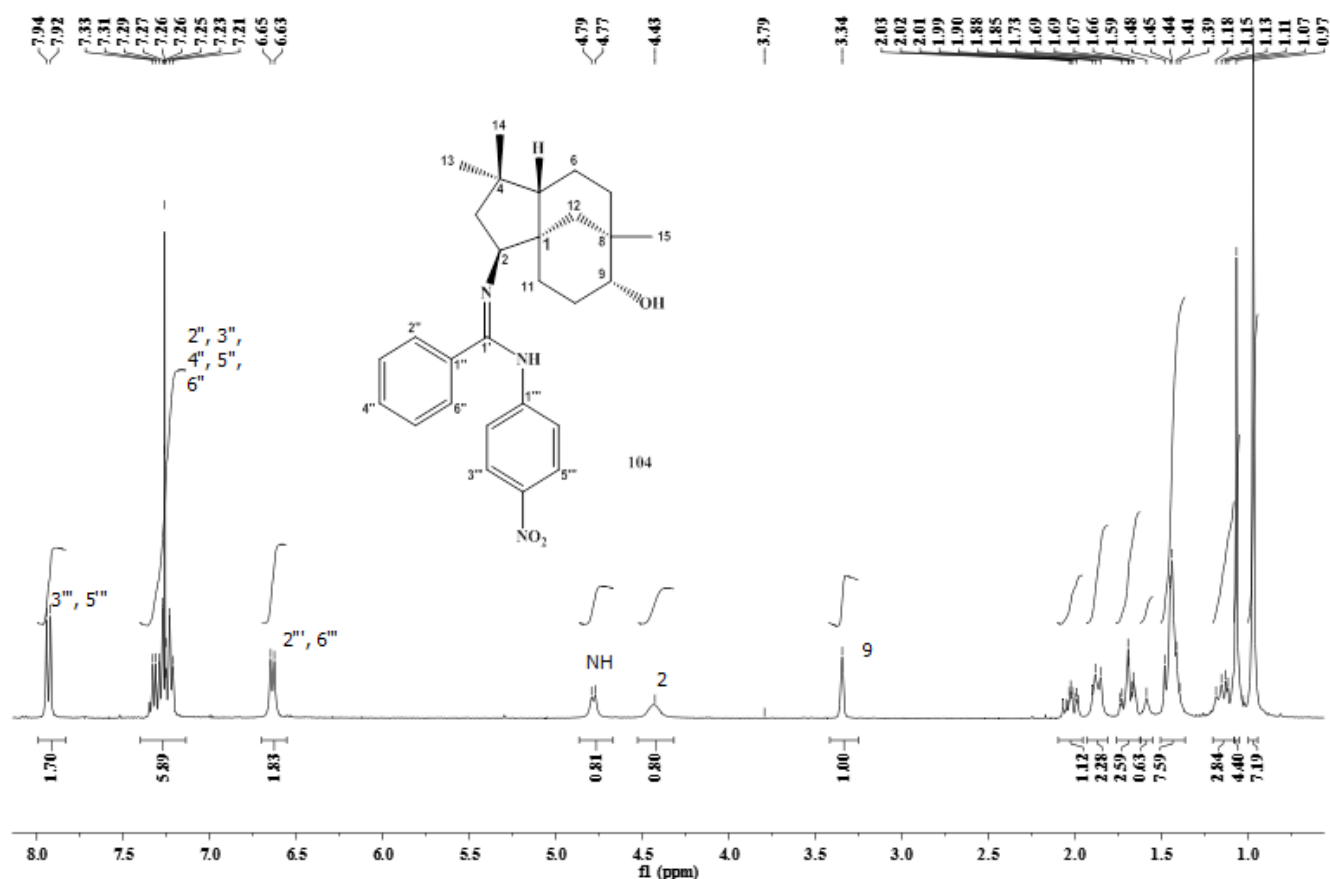
No espectro de RMN de <sup>1</sup>H (FIG. 74, p. 112) foram observados em  $\delta$  3,34 (sl) e  $\delta$  4,43 (s) sinais atribuídos aos hidrogênios H-9 e H-2 do esqueleto clovânico. A presença dos grupos nitrofenila e benzamidina foi confirmada através dos sinais presentes na região de hidrogênios aromáticos e a atribuição destes hidrogênios foi realizada com auxílio do mapa de contornos COSY (APÊNDICE S3, p. 213), no qual o sinal em  $\delta$  6,64 (d,  $J=8,0$ Hz) foi atribuído aos hidrogênios H-2'''/H-6''', em  $\delta$  7,37-

7,16 (m) foi atribuído aos hidrogênios H-2''/H-3''/H-4''/H-5''/H-6'' e em  $\delta$  7,93 (d,  $J= 8,0\text{Hz}$ ) foi atribuído aos hidrogênios H-3'''/H-5'''.

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (FIG. 75, p. 113) foram detectados 24 sinais, dos quais oito referem-se a carbonos aromáticos. A conectividade dos hidrogênios aos respectivos carbonos, assim como a ordem de conexão entre os carbonos foi determinada utilizando o mapa de contornos HSQC (APÊNDICE T3-U3, p. 213-214) e o mapa de contornos HMBC (APÊNDICE V3-X3, p. 214-215) no qual o sinal do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  observado em  $\delta$  122,8 foi atribuído aos carbonos C-2'''/C-6''', em  $\delta$  124,6 foi atribuído aos carbonos C-3'''/C-5''', em  $\delta$  128,3 atribuído aos carbonos C-2''/C-6'', em  $\delta$  128,6 atribuído aos carbonos C-3''/C-5'' e em  $\delta$  129,9 atribuído ao carbono C-4''. Os demais sinais observados na região de carbonos aromáticos, em  $\delta$  134,6, em  $\delta$  141,5, em  $\delta$  158,1 e em  $\delta$  158,5 foram atribuídos aos carbonos C-1'', C-4''', C-1''' e C-1' respectivamente.

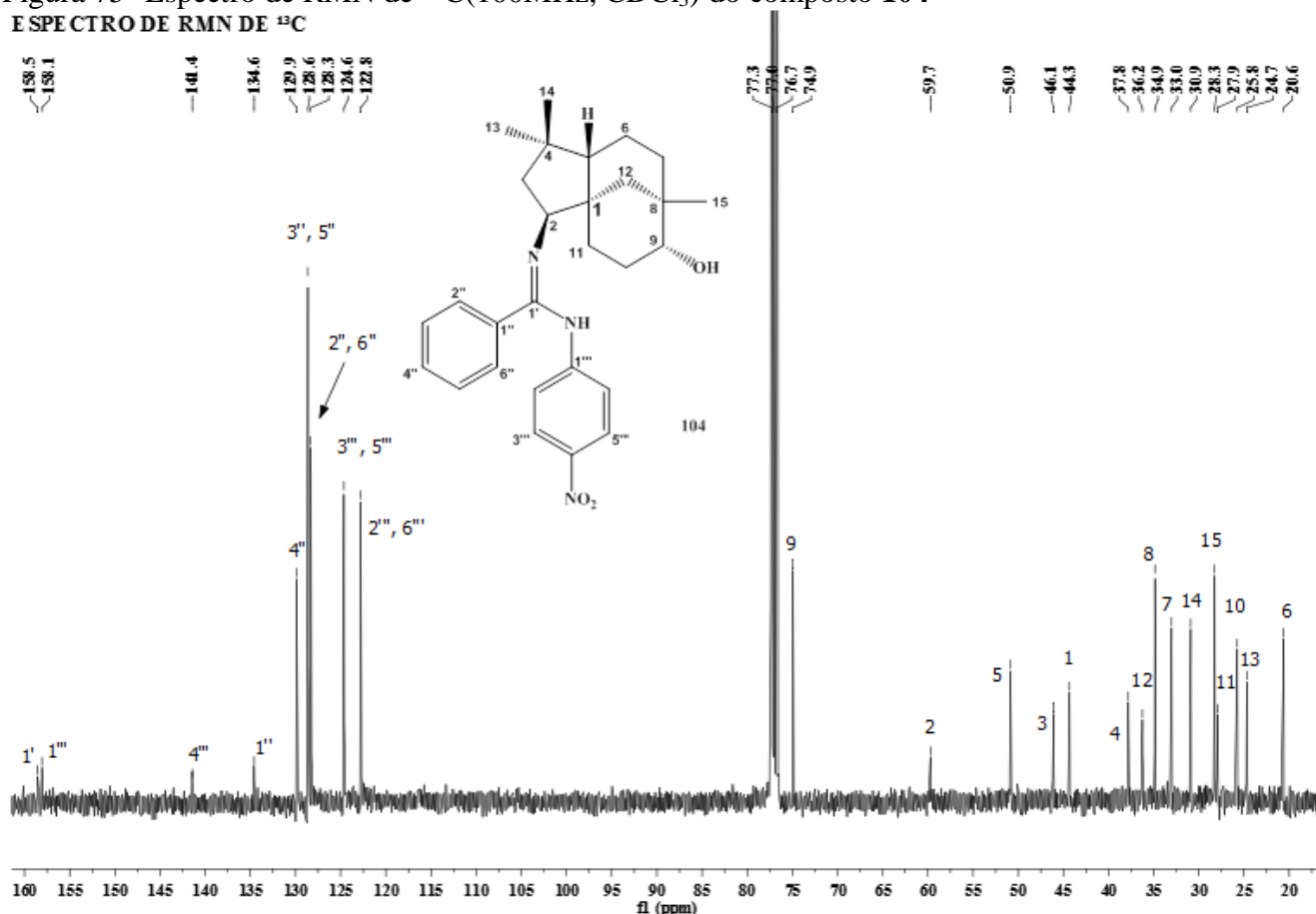
Figura 74- Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do composto **104**

ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$



No espectro de massas EM-ESI positivo (APÊNDICE Z3, p. 215), obtido em um espectrofotômetro ESI-Q-TOF, foi possível observar o pico base da espécie protonada  $[\text{M}+\text{H}]^+$  em  $m/z$  462,2765.

Figura 75- Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ (100MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do composto **104**

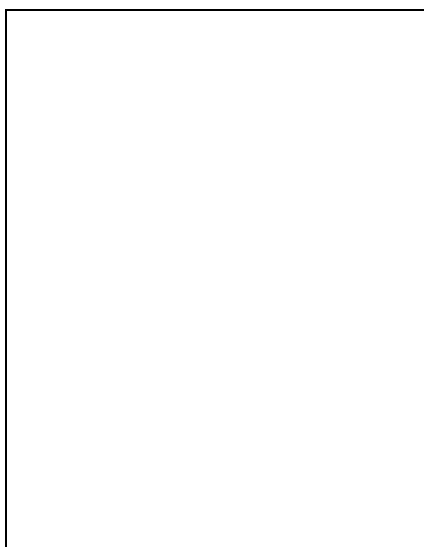


***N*-(*p*-nitrofenil)-*N'*-(9 $\alpha$ -hidroxiclovan-2 $\beta$ -il)-benzamidina (**104**)**

Sólido amarelo; Tf: 198,9-200,0°C;  $[\alpha]_{20}^D$ : 87,4 ° ( $c = 33,8 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $\text{CHCl}_3$ ); **IV (KBr)  $\nu_{\text{max}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ):** 3406 ( $\nu_{\text{O-H}}$ ,  $\nu_{\text{N-H}}$ ), 2948, 2924 e 2862 ( $\nu_{\text{C-H}}$ ), 1580( $\nu_{\text{C=N}}$ ), 1506 ( $\nu_{\text{C=C}}$ ), 1282 ( $\nu_{\text{C-N}}$ ), 1108 ( $\nu_{\text{C-O}}$ ) 1326 ( $\delta_{\text{NO}_2}$ ), 756 ( $\delta_{\text{C}_{\text{sp}^2\text{-H}}$ ). **RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm):** 7,93 (d, 2H, H-3''', H-5''',  $J=8,0\text{Hz}$ ), 7,27 (m, 5H, H-2'', H-3'', H-4'', H-5'', H-6''), 6,64 (d, 2H, H-2'', H-6'',  $J=8,0\text{Hz}$ ), 4,78 (d, 1H, NH,  $J=8,4\text{Hz}$ ), 4,43 (sl, 1H, H-2 $\alpha$ ), 3,34 (sl, 1H, H-9 $\beta$ ), 2,02 (m, 1H, 10 $\beta$ ), 1,92-1,82 (m, 2H, H-3 $\beta$ , H-12 $\beta$ ), 1,76-1,63 (m, 2H, H-10 $\alpha$ , H-11 $\beta$ ), 1,51-1,36 (m, 6H, H-6, H7 $\beta$ , H-3 $\alpha$ , H-5), 1,21-1,09 (m, 2H, H-7 $\alpha$ , H-12 $\alpha$ , H-11 $\alpha$ ), 1,07 (s, 3H, H-14), 0,97 (s, 3H, H-15), 0,97 (s, 3H, H-13). **RMN**

de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 158,5 (C-1'), 158,1 (C-1'''), 141,5 (C-4'''), 134,6 (C-1''), 129,9 (C-4''), 128,6 (C-3'', C-5''), 128,3 (C-2'', C-6''), 124,6 (C-3''', C-5'''), 122,8 (C-2''', C-6'''), 74,9 (C-9), 59,7 (C-2), 50,9 (C-5), 46,1 (C-3), 44,3 (C-1), 37,8 (C-4), 36,2 (C-12), 34,9 (C-8), 33,0 (C-7), 30,9 (C-14), 28,3 (C-15), 27,9 (C-11), 25,8 (C-10), 24,7 (C-13), 20,6 (C-6). **HMBC (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):** H-2'' (C-1'') -  $^2J_{\text{CH},\text{H-6''}}$  (C-1'') -  $^2J_{\text{CH},\text{H-2'''}}$  (C-4''') -  $^3J_{\text{CH},\text{H-3'''}}$  (C-1''') -  $^3J_{\text{CH},\text{H-5'''}}$  (C-1''') -  $^3J_{\text{CH},\text{H-6'''}}$  (C-4''') -  $^3J_{\text{CH},\text{H-10}}$  (C-9) -  $^3J_{\text{CH},\text{H-10}}$  (C-1) -  $^3J_{\text{CH},\text{H-11}}$  (C-1) -  $^2J_{\text{CH},\text{H-11}}$  (C-9) -  $^3J_{\text{CH},\text{H-14}}$  (C-4) -  $^2J_{\text{CH},\text{H-14}}$  (C-3, C-5, C-13) -  $^3J_{\text{CH},\text{H-15}}$  (C-8) -  $^2J_{\text{CH},\text{H-15}}$  (C-7, C-9) -  $^3J_{\text{CH}}$ . **COSY (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):** H-3'''xH-2'', H-5'''xH-6'', H-2xH-3, H-9xH-10, H-10xH-11. **EM**  $m/z$ : 462,2765[M+1H]<sup>+</sup>. **MM**: 461,2678. **FM**:  $\text{C}_{28}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_3$ .

#### 4.2.8 *N*-(*p*-bromofenil)-*N'*-(9 $\alpha$ -hidroxiclovan-2 $\beta$ -il)-benzamidina (105)



Este composto é de um sólido branco cristalino com a temperatura de fusão na faixa entre 146,1-147,9°C. No espectro na região do IV (APÊNDICE A4, p. 216) foi possível observar bandas em 3434  $\text{cm}^{-1}$  referente aos estiramentos O-H e NH, em 2946 e 2862  $\text{cm}^{-1}$  referente aos estiramentos C-H de grupo alifático, em 1618  $\text{cm}^{-1}$  referente aos estiramentos C=N e duas bandas em 1260 e 1033  $\text{cm}^{-1}$ , referentes aos estiramentos C-N e C-O respectivamente (BIEMANN, 1998).

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  observaram-se sinais em  $\delta$  3,30 (sl) e em  $\delta$  4,47-4,35(m) atribuídos aos hidrogênios H-9 e H-2 do esqueleto clovânico (FIG. 76, p. 115). Na região de hidrogênios aromáticos foram observados quatro sinais e com auxílio do mapa de contornos COSY (APÊNDICE B4, p. 216) fez-se a atribuição destes, sendo o sinal em  $\delta$  6,47 (d,  $J = 8,6\text{Hz}$ ) atribuído aos hidrogênios H-2'''/H-6''', em  $\delta$  7,09 (d,  $J = 8,6\text{Hz}$ ) atribuído aos hidrogênios H-3'''/H-5''' e em  $\delta$  7,50-7,14 (m) atribuído aos hidrogênios H-2''/ H-3''/ H-4''/ H-5''/ H-6''. No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (FIG. 77, p. 115) foram visualizados 24 sinais, dos quais oito se referem a carbonos aromáticos. Com auxílio do mapa de contornos HSQC (APÊNDICE C4-D4, p. 217), foi possível fazer a atribuição de cinco destes

## Caracterização dos compostos sintetizados

sinais, sendo o sinal em  $\delta$  124,7 atribuído aos carbonos C-2'''/C-6''', em  $\delta$  128,2 atribuído aos carbonos C-5'''/C-6'', em  $\delta$  128,3 atribuído aos carbonos 2''/3'', em  $\delta$  129,1 atribuído aos carbonos C-3'''/C-5''' e, em 131,0, atribuído ao carbono C-4''. Os quatro sinais localizados em  $\delta$  113,4, em  $\delta$  135,0, em  $\delta$  150,3 e em  $\delta$  157,6 foram atribuídos aos carbonos não hidrogenados C-4''', C-1'', C-1''' e C-1' respectivamente.

Figura 76- Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do composto **105**

### ESPECTRO DE RMN DE $^1\text{H}$

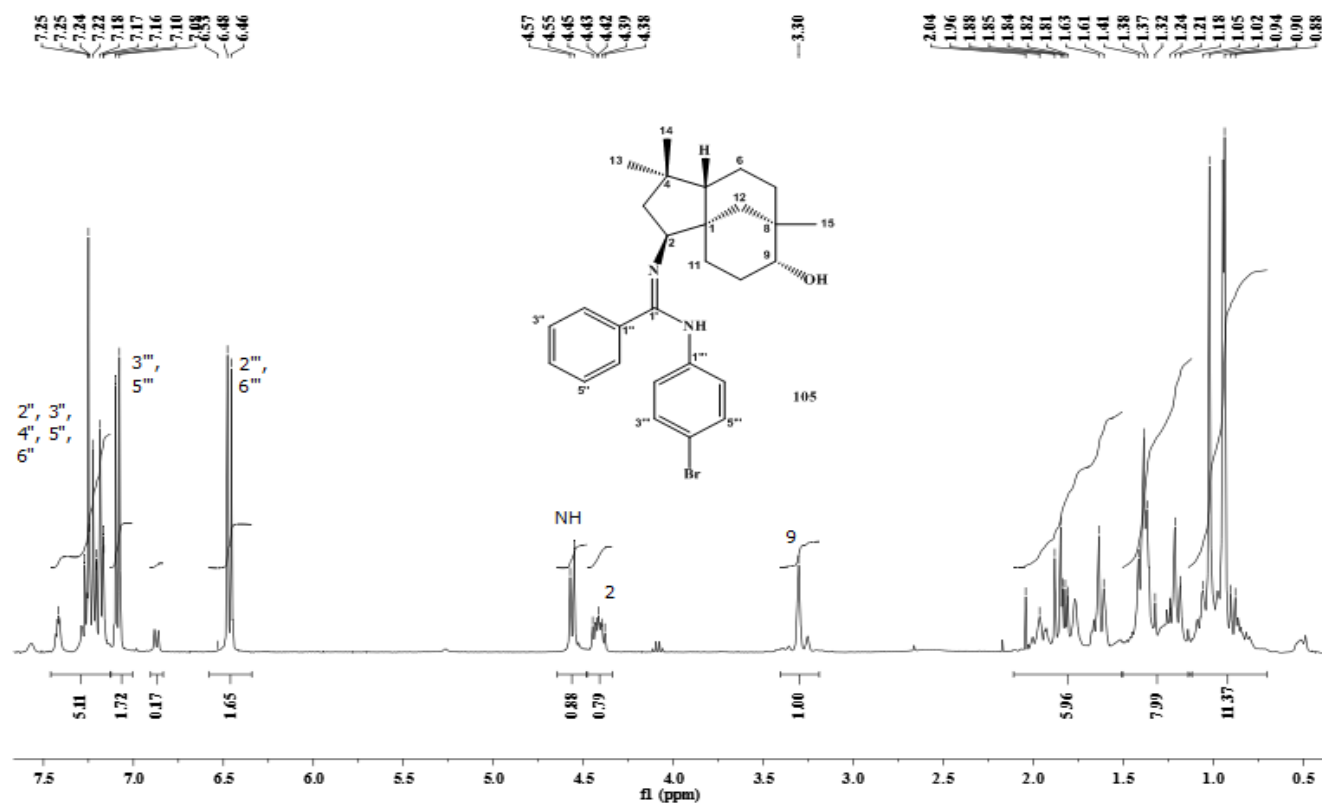
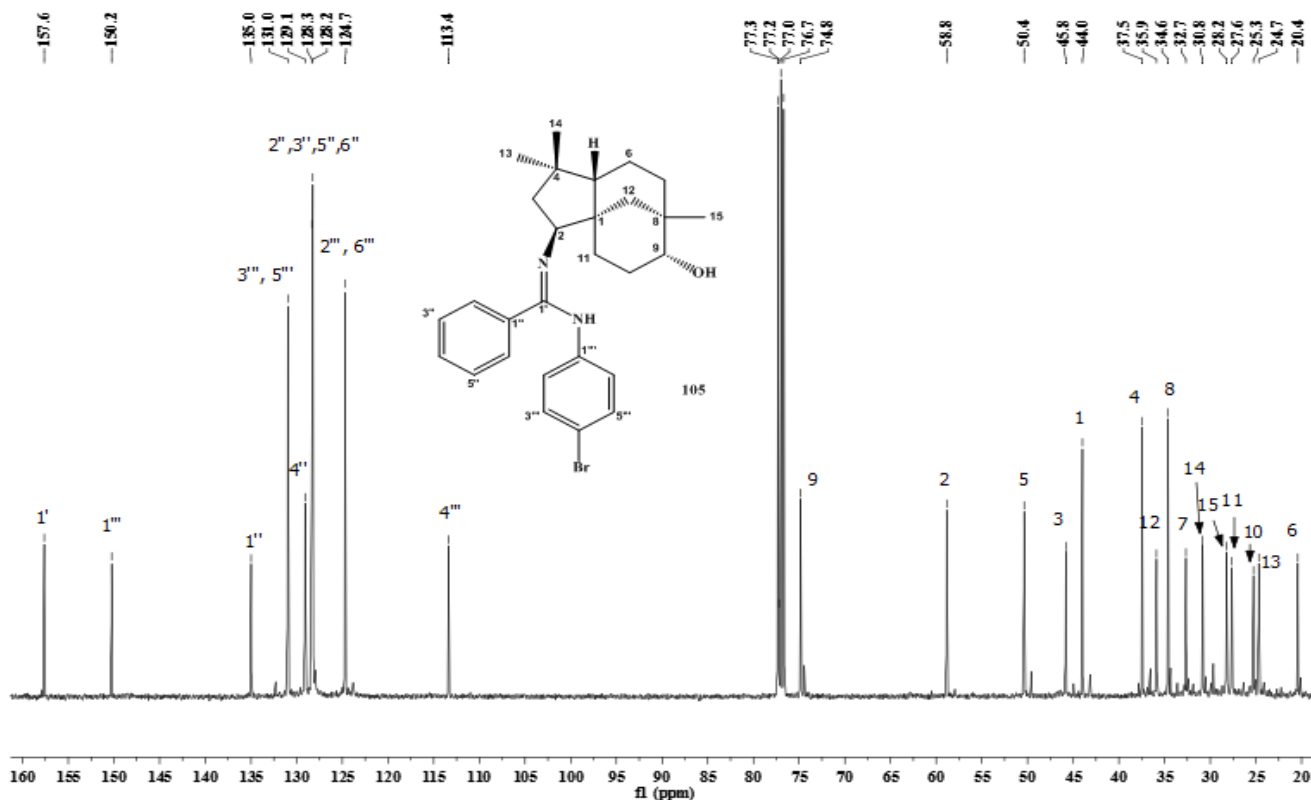


Figura 77- Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do composto **105**

ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$



Pelo mapa de contornos HMBC (APÊNDICE E4-F4, p. 218-219) foi possível estabelecer a conexão entre os anéis aromáticos e o anel clovânico, sendo observada a correlação  $^3J_{\text{CH}}$  entre o hidrogênio H-2 e o carbono C-1'. A conectividade dos anéis aromáticos foi confirmada a partir das correlações  $^2J_{\text{CH}}$  entre o hidrogênio NH e os carbonos C-1'/C-1''', entre os hidrogênios H-2'''/H-6''' e o carbono C-1''' e entre os hidrogênios H-3'''/H-5''' e o carbono C-4'''; e correlações  $^3J_{\text{CH}}$  entre o hidrogênio NH e os carbonos C-1'', entre os hidrogênios H-2'''/H-6''' e o carbono C-4''' e entre os hidrogênios H-3'''/H-5''' e o carbono C-1'. Algumas destas correlações podem ser visualizadas na FIG. 78.

Figura 78- Algumas correlações da *N*-(*p*-bromofenil)-*N'*-(9 $\alpha$ -hidroxiclovan-2 $\beta$ -il)-benzamidina (**105**) visualizadas no mapa de contornos HMBC

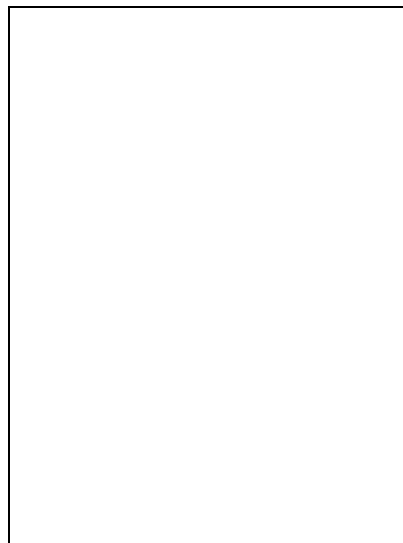


O mapa de contornos NOESY (APÊNDICE G4, p. 220) mostrou as correlações H-2 $\alpha$  x H-13 e H-9 $\beta$  x H-15 já observadas para os outros derivados clovânicos. No espectro de massas EM-ESI positivo (APÊNDICE H4, p. 220), obtido em um espectrofotômetro ESI-Q-TOF foi possível visualizar o pico base da espécie protonada [M+H]<sup>+</sup> em  $m/z$  495,2010.

***N*-(*p*-bromofenil)-*N'*-(9 $\alpha$ -hidroxiclovan-2 $\beta$ -il)-benzamidina (105)**

Sólido branco cristalino; Tf: 146,1-147,9°C;  $[\alpha]_{20}^D$ : 28,41 ° (c = 33,8 mgmL<sup>-1</sup>, CHCl<sub>3</sub>); **IV (KBr) v<sub>max</sub> (cm<sup>-1</sup>):** 3434 (v O-H, v N-H), 2946 e 2862 (v C-H), 1618 (v C=N), 1260 (v C-N), 1033 (v C-O), 642 ( $\delta$  C<sub>sp<sup>2</sup>-H</sub>). **RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm):** 7,50-7,14 (m, 5H, H-2'', H-3'', H-4'', H-5'', H-6''), 7,09 (d, 2H, H-3''', H-5''',  $J=8,6$  Hz), 6,47 (d, 2H, H-2''', H-6''',  $J=8,6$  Hz), 4,56 (d, 1H, NH,  $J=9,0$ Hz), 4,41 (m, 1H, H-2 $\alpha$ ), 3,30 (sl, 1H, H-9 $\beta$ ), 2,02-1,91 (m, 1H, 10 $\beta$ ), 1,89-1,79 (m, 2H, H-3 $\beta$ , H-12 $\beta$ ), 1,69-1,57 (m, 2H, H-10 $\alpha$ , H-11 $\beta$ ), 1,37 (m, 6H, H-6, H-7 $\beta$ , H-3 $\alpha$ , H-5), 1,27-1,13 (m, 1H, H-12 $\alpha$ ), 1,02 (s, 3H, H-14), 0,97 (s, 1H, H-7 $\alpha$ ), 0,94 (s, 3H, H-13), 0,94 (s, 3H, H-15), 0,93-0,67 (m, 1H, H-11 $\alpha$ ). **RMN de <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm):** 157,6 (C-1'), 150,2 (C-1'''), 135,0 (C-1''), 131,0 (C-3''', C-5'''), 129,1 (C-4''), 128,3 (C-2'', C-3''), 128,2 (C-5'', C-6''), 124,7 (C-2''', C-6'''), 113,4 (C-4'''), 74,8 (C-9), 58,8 (C-2), 50,4 (C-5), 45,8 (C-3), 44,0 (C-1), 37,5 (C-4), 35,9 (C-12), 34,6 (C-8), 32,7 (C-7), 30,8 (C-14), 28,2 (C-15), 27,6 (C-11), 25,3 (C-10), 24,7 (C-13), 20,4 (C-6). **HMBC (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** H-2'''' (C-3''') - <sup>2</sup>J<sub>CH</sub>, H-2'''' (C-4''', C-6''') - <sup>3</sup>J<sub>CH</sub>, H-3'''' (C-1''') - <sup>3</sup>J<sub>CH</sub>, H-5'''' (C-1''') - <sup>3</sup>J<sub>CH</sub>, H-6'''' (C-5''') - <sup>2</sup>J<sub>CH</sub>, H-6'''' (C-2''', C-4''') - <sup>3</sup>J<sub>CH</sub>, NH (C-1', C-1''') - <sup>2</sup>J<sub>CH</sub>, NH (C-1'') - <sup>3</sup>J<sub>CH</sub>, H-2 (C-1, C-3) - <sup>2</sup>J<sub>CH</sub>, H-2 (C-1', C-4, C-11, C-12) - <sup>2</sup>J<sub>CH</sub>, H-3 (C-4) - <sup>2</sup>J<sub>CH</sub>, H-3 (C-1, C-5) - <sup>3</sup>J<sub>CH</sub>, H-9 (C-8) - <sup>2</sup>J<sub>CH</sub>, H-9 (C-11) - <sup>3</sup>J<sub>CH</sub>, H-10 (C-1) - <sup>3</sup>J<sub>CH</sub>, H-11 (C-5, C-9) - <sup>3</sup>J<sub>CH</sub>, H-11 (C-1) - <sup>2</sup>J<sub>CH</sub>, H-12 (C-1, C-8) - <sup>2</sup>J<sub>CH</sub>, H-12 (C-2, C-5, C-7, C-9) - <sup>3</sup>J<sub>CH</sub>, H-13 (C-4) - <sup>2</sup>J<sub>CH</sub>, H-13 (C-3, C-5, C-14) - <sup>3</sup>J<sub>CH</sub>, H-14 (C-4) - <sup>2</sup>J<sub>CH</sub>, H-14 (C-3, C-5, C-13) - <sup>3</sup>J<sub>CH</sub>, H-15 (C-8) - <sup>2</sup>J<sub>CH</sub>, H-15 (C-9, C-12) - <sup>3</sup>J<sub>CH</sub>. **COSY (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** H-3''''xH-2''', H-5''''xH-6''', H-2xH-3, H-9xH-10, H-10xH-11, H-6xH-7. **NOESY (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** H-2 $\alpha$  x H-12 $\alpha$ , H-2 $\alpha$  x H-13 $\alpha$ , H-3 $\alpha$  x H-3 $\beta$ , H-9 $\beta$  x H-15 $\beta$ , H-10 $\alpha$  x H-10 $\beta$ , H-12 $\alpha$  x H-12 $\beta$ . **EM  $m/z$ :** 495,2010 [M+H]<sup>+</sup>. **MM:** 495,4970. **FM:** C<sub>28</sub>H<sub>35</sub>N<sub>2</sub>OBr.

4.2.9  $2\beta$ -(N-benzamido)clovan-9 $\alpha$ -ol (**113**)

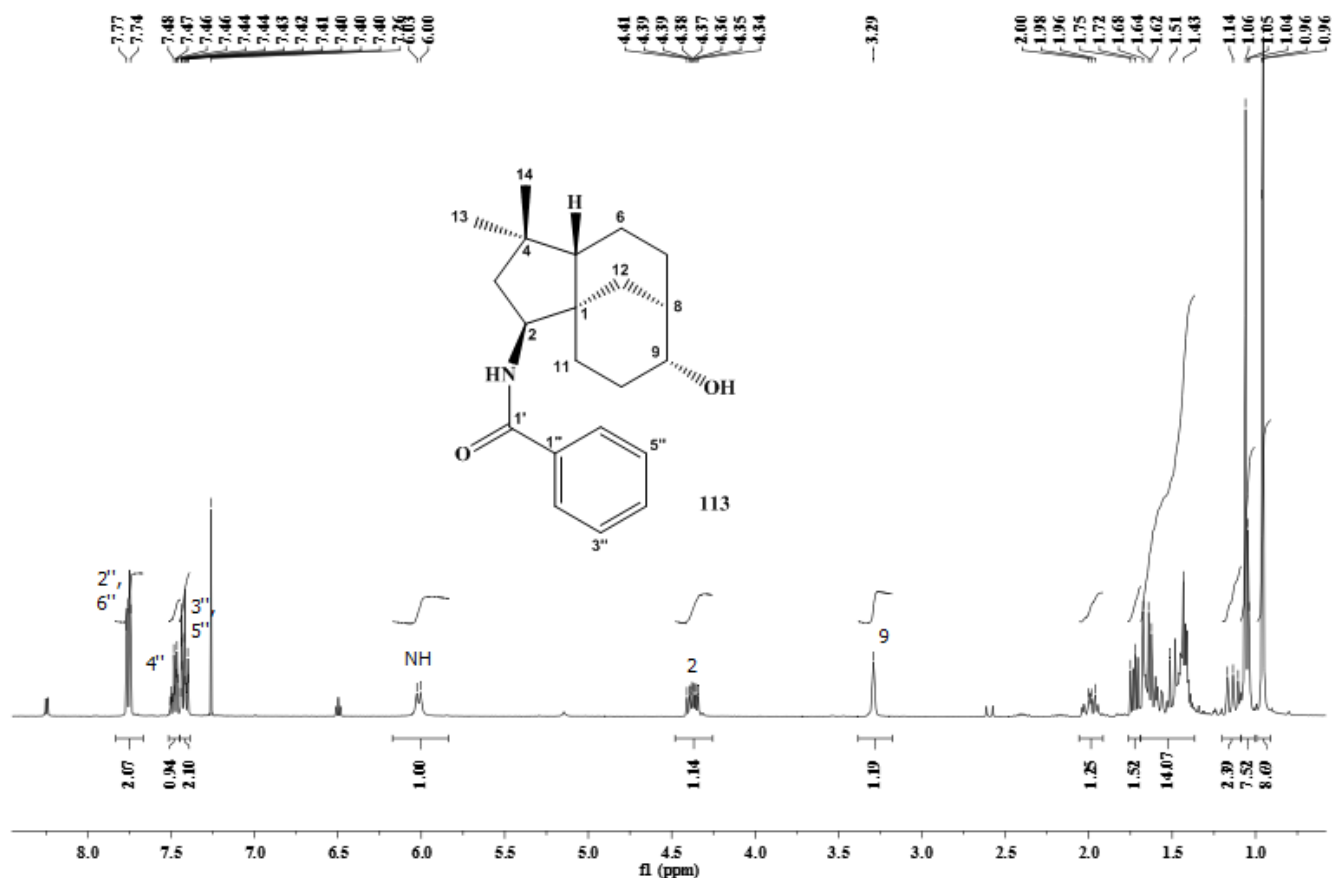


O composto **113** apresentou-se como um sólido branco com temperatura de fusão na faixa entre 172,6-174,2°C. Através do espectro na região de IV (APÊNDICE I4, p. 221) foi possível identificar uma banda em 3334  $\text{cm}^{-1}$  referente aos estiramentos OH e NH; em 2948, 2926 e 2860  $\text{cm}^{-1}$  bandas referentes aos estiramentos C-H de grupo alifático, em 1642  $\text{cm}^{-1}$  uma banda intensa referente ao estiramento C=O da amida e em 1534  $\text{cm}^{-1}$  referente ao estiramento C=C (BIEMANN, 1998).

Analisando o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (FIG. 79) foram identificados os sinais que indicam a formação do esqueleto clovânico em  $\delta$  3,29 (sl), atribuído ao hidrogênio H-9 e em  $\delta$  4,37 (ddd,  $J = 12,7; 9,3$  e  $5,9$  Hz), atribuído ao hidrogênio H-2. A multiplicidade do sinal referente ao hidrogênio H-2 sugere que a ligação entre o esqueleto sesquiterpênico e o nitrogênio da amida tenha ocorrido através do carbono C-2 do esqueleto clovânico. Na região referente aos hidrogênios aromáticos foram observados sinais em  $\delta$  7,45-7,39 (m), atribuído aos hidrogênios H-3''/H-5'', em  $\delta$  7,51-7,45 (m), atribuído ao hidrogênio H-4'' e em  $\delta$  7,75 (d,  $J = 9,7$  Hz), atribuído aos hidrogênios H-2''/H-6''.

Figura 79- Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do composto **113**

E S P E C T R O D E R M N D E  $^1\text{H}$

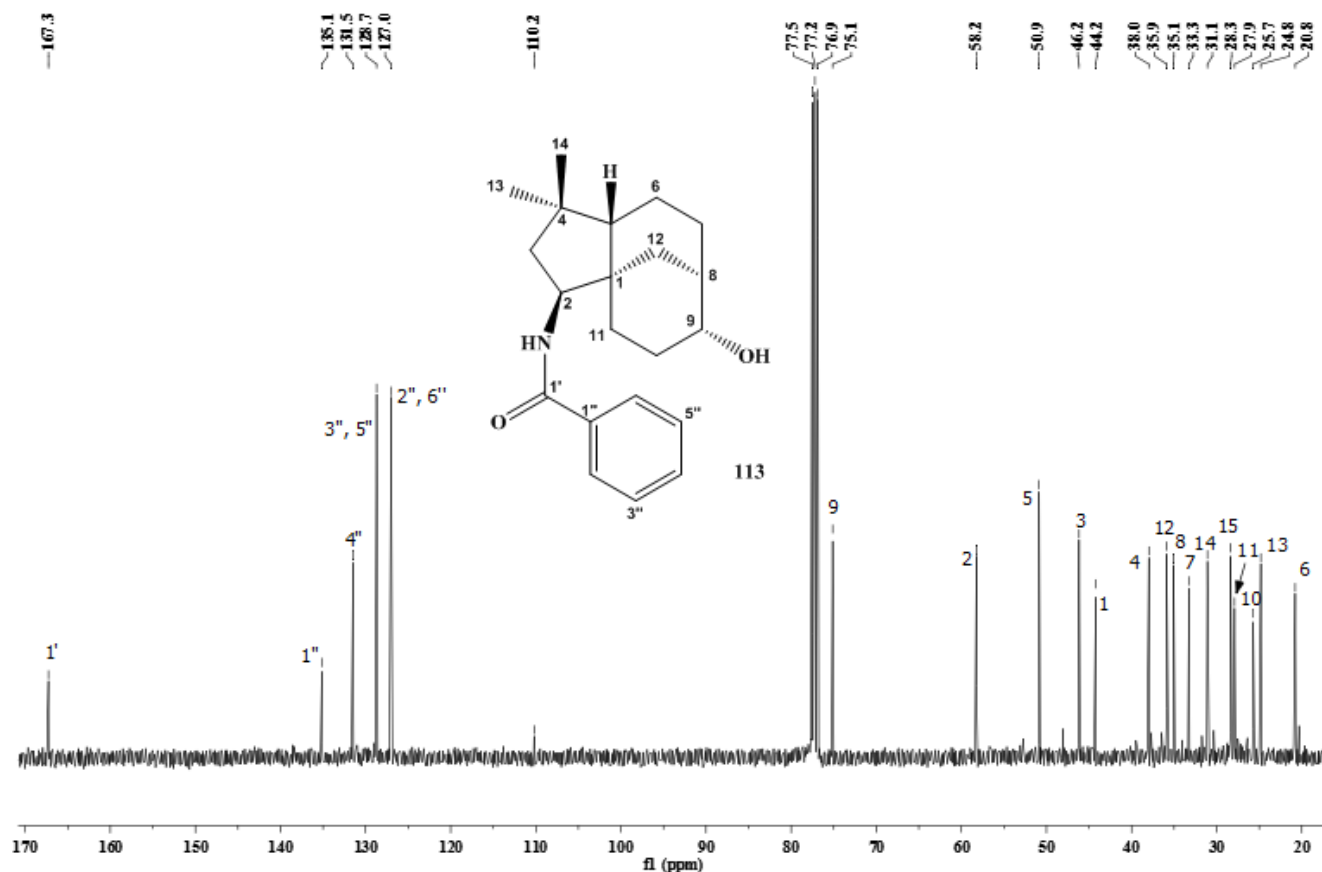


Com o auxílio do mapa de contornos HSQC (APÊNDICE J4-L4, p. 221-222) foi possível verificar que o sinal observado em  $\delta$  6,02 (d,  $J = 9,0$  Hz) no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  não apresentou mancha de correlação com nenhum outro sinal do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ . Desta forma, este sinal foi atribuído ao hidrogênio referente à amida N-H. Por meio do mapa de contornos COSY (APÊNDICE M4, p. 222) foi possível visualizar, dentre outras correlações, aquela entre o hidrogênio ligado ao nitrogênio da amida e o hidrogênio H-2 do anel clovânico.

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (FIG. 80) foram observados 20 sinais, dos quais quatro localizados na região referente a carbonos aromáticos: em  $\delta$  127,0 atribuído aos carbonos C-2''/C-6'', em  $\delta$  128,7, atribuído aos carbonos C-3''/C-5'', em  $\delta$  131,5, atribuído ao carbono C-4'' e em  $\delta$  135,1, atribuído ao carbono C-1''. Observou-se, ainda, um sinal em  $\delta$  167,3, ainda não visualizado em nenhum dos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  obtido para os outros derivados clovânicos. Este sinal foi atribuído ao carbono C-1' referente à carbonila da amida.

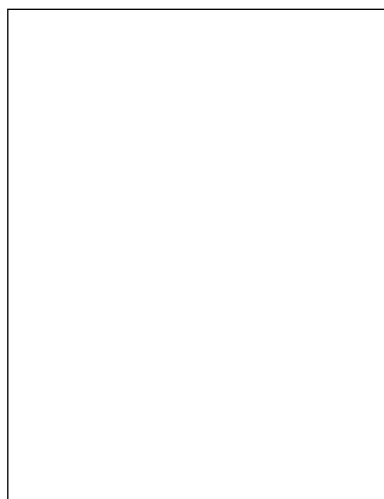
Figura 80- Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do composto **113**

ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$



A conectividade entre os carbonos foi atribuída com a ajuda do mapa de contornos HMBC (APÊNDICE N4-O4, p. 223), no qual observou-se a correlação entre o hidrogênio H-2 do anel clovânico e o carbono da carbonila C-1' da amida. A disposição tridimensional de alguns átomos foi confirmada pelas correlações entre H-13 $\alpha$  x H-2 $\alpha$ , H-9 $\beta$  x H-15 $\beta$ , H-10 $\beta$  x H-12 $\beta$  e H-10 $\beta$  x H-11 $\beta$  observadas no mapa de contornos NOESY (APÊNDICE P4, p. 224). No espectro de massas EM-ESI positivo (APÊNDICE Q4, p. 224), obtido em um espectrofotômetro ESI-Q-TOF, observaram-se o pico base da espécie protonada  $[\text{M}+\text{H}]^+$  em  $m/z$  342,2437 e o aduto de sódio  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  em  $m/z$  364,2249.

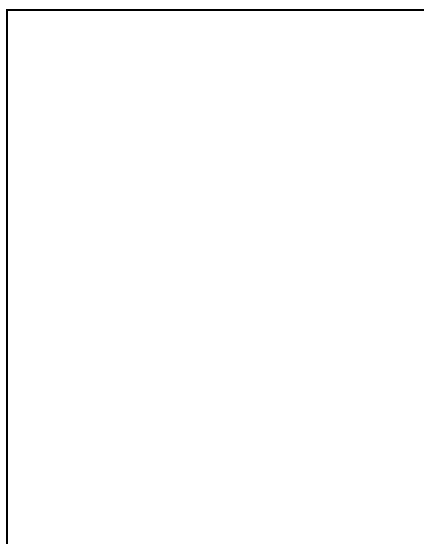
**2 $\beta$ -(N-benzamido)clovan-9 $\alpha$ -ol (113)**



Sólido branco; Tf: 172,6-174,2 $^{\circ}\text{C}$ ;  $[\alpha]_{20}^{\text{D}}$ : 64,44 $^{\circ}$  ( $c = 33,8 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $\text{CHCl}_3$ ); **IV (KBr)  $\nu_{\text{max}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ):** 3334 ( $\nu_{\text{O-H}}$ ,  $\nu_{\text{N-H}}$ ), 2948, 2926 e 2860 ( $\nu_{\text{C-H}}$ ), 1642 ( $\nu_{\text{C=O}}$ ), 1534 ( $\nu_{\text{C=C}}$ ), 758 ( $\delta_{\text{C}_{\text{sp}^2\text{-H}}}$ ). **RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm):** 7,75 (d, 2H, H-2'', H-6'',  $J=9,7$  Hz), 7,51-7,45 (m, 1H, H-4''), 7,45-7,39 (m, 2H, H-3'', H-5''), 6,02 (d, 1H, NH,  $J=9,0$  Hz), 4,37 (ddd, 1H, H-2 $\alpha$ ,  $J = 12,7; 9,0$  e  $5,9$  Hz), 3,29 (sl, 1H, H-9 $\beta$ ), 2,05-1,93 (m, 1H, 10 $\beta$ ), 1,73 (dd, 1H, H-3 $\beta$ ,  $J=11,6$  e  $5,9$  Hz),

1,69-1,61 (m, 2H, H-10 $\alpha$ , H-12 $\beta$ ), 1,58 (dd, 1H, H-11 $\beta$ ,  $J=13,4$  e  $4,5$  Hz), 1,53-1,47 (m, 1H, H-3 $\alpha$ ), 1,47-1,38 (m, H-6, H-7 $\beta$ , H-5), 1,15 (d, 1H, H-12 $\alpha$ ,  $J=13,3$  Hz), 1,10 (d, 1H, H-7 $\alpha$ ,  $J=5,8$ Hz), 1,06 (s, 3H, H-14), 1,05-1,01 (m, 1H, H-11 $\alpha$ ), 0,96 (s, 3H, H-15 $\beta$ ), 0,96 (s, 3H, H-13 $\alpha$ ). **RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm):** 162,3 (C-1'), 135,1 (C-1''), 131,5 (C-4''), 128,7 (C-3'', C-5''), 127,0 (C-2'', C-6''), 75,1 (C-9), 58,2 (C-2), 50,9 (C-5), 46,2 (C-3), 44,2 (C-1), 38,0 (C-4), 35,9 (C-12), 35,1 (C-8), 33,3 (C-7), 31,1 (C-14), 28,3 (C-15), 27,9 (C-11), 25,7 (C-10), 24,8 (C-13), 20,8 (C-6). **HMBC (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):** H-2'' (C-3'') -  $^2J_{\text{CH}}$ , H-2'' (C-1', C-6'') -  $^3J_{\text{CH}}$ , H-3'' (C-4'') -  $^2J_{\text{CH}}$ , H-5'' (C-4'') -  $^2J_{\text{CH}}$ , H-6'' (C-5'') -  $^2J_{\text{CH}}$ , H-6'' (C-1', C-2'') -  $^3J_{\text{CH}}$ , H-2 (C-1, C-2) -  $^2J_{\text{CH}}$ , H-2 (C-11, C-12) -  $^3J_{\text{CH}}$ , H-3 (C-4, C-2) -  $^2J_{\text{CH}}$ , H-3 (C-1, C-5, C-13, C-14) -  $^3J_{\text{CH}}$ , H-7 (C-6) -  $^2J_{\text{CH}}$ , H-7 (C-15) -  $^3J_{\text{CH}}$ , H-10 (C-11) -  $^2J_{\text{CH}}$ , H-12 (C-1) -  $^2J_{\text{CH}}$ , H-12 (C-2, C-9, C-11) -  $^3J_{\text{CH}}$ , H-13 (C-4) -  $^2J_{\text{CH}}$ , H-13 (C-5, C-14) -  $^3J_{\text{CH}}$ , H-14 (C-4) -  $^2J_{\text{CH}}$ , H-14 (C-3, C-5, C-13) -  $^3J_{\text{CH}}$ , H-15 (C-8) -  $^2J_{\text{CH}}$ , H-15 (C-7, C-9, C-12) -  $^3J_{\text{CH}}$ . **COSY (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):** H-6''xH-5'', H-2''xH-3'', NHxH-2, H-2xH-3, H-10xH-11. **EM  $m/z$ :** 364,2249[M+Na] $^+$ ; 342,2437[M+H] $^+$ . **MM:** 341,2355. **FM:** C<sub>22</sub>H<sub>31</sub>NO<sub>2</sub>.

#### 4.2.10 1 $\beta$ -(*p*-metoxifenilamino)cariolan-9 $\alpha$ -ol (**106**)



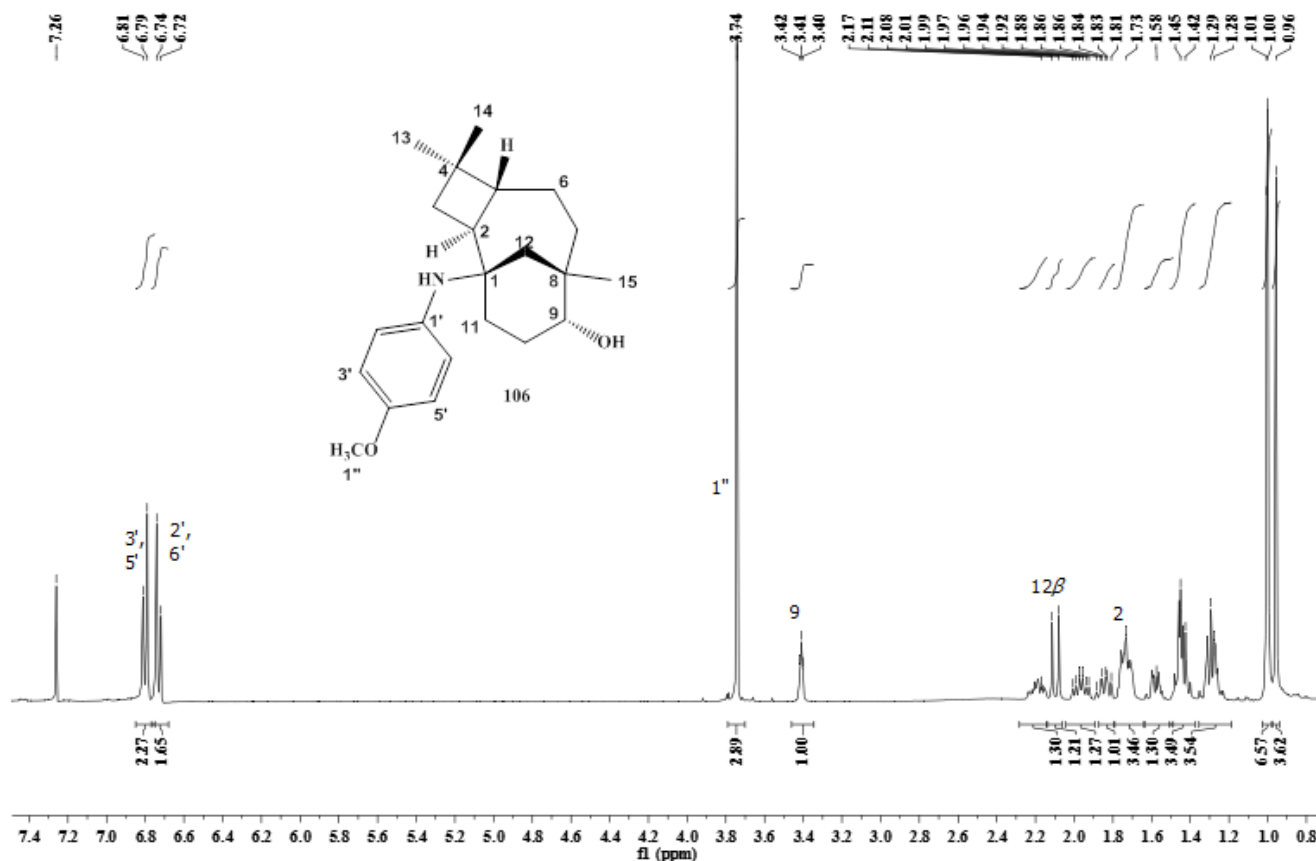
O composto **106** apresentou-se como um líquido viscoso de coloração marrom. No espectro na região do IV (APÊNDICE R4, p. 225) foram observadas bandas em 3400 $\text{cm}^{-1}$  devido aos estiramentos OH e NH, em 2946, 2928 e 2864  $\text{cm}^{-1}$  referentes aos estiramentos C-H de grupo alifático, em 1510 devido ao estiramento C=C. As banda em 1236 e 1038  $\text{cm}^{-1}$  foram atribuídas aos estiramentos C-N e C-O respectivamente (BIEMANN, 1998).

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (FIG. 81) foram observados quatro simpletos, sendo três atribuídos aos hidrogênios metílicos H-13, H-14 e H-15 em  $\delta$  1,01,  $\delta$  0,96 e  $\delta$  1,00 respectivamente e um atribuído ao hidrogênio metoxílico H-1'' em  $\delta$  3,74. Observou-se ainda um tripleto em  $\delta$  3,41 ( $J = 3,0$  Hz) que foi atribuído ao hidrogênio H-9. O sinal referente ao hidrogênio H-2, na região característica de compostos com esqueleto clovânico não foi visualizado no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  deste composto,

sugerindo um esqueleto diferenciado. Observaram-se, ainda, dois dupletos na região de hidrogênios aromáticos em  $\delta$  6,73 ( $J = 8,9$  Hz) e  $\delta$  6,80 ( $J = 8,9$  Hz) atribuídos aos hidrogênios H-2'/H-6' e H-3'/H-5' respectivamente.

FIGURA 81- Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do composto **106**

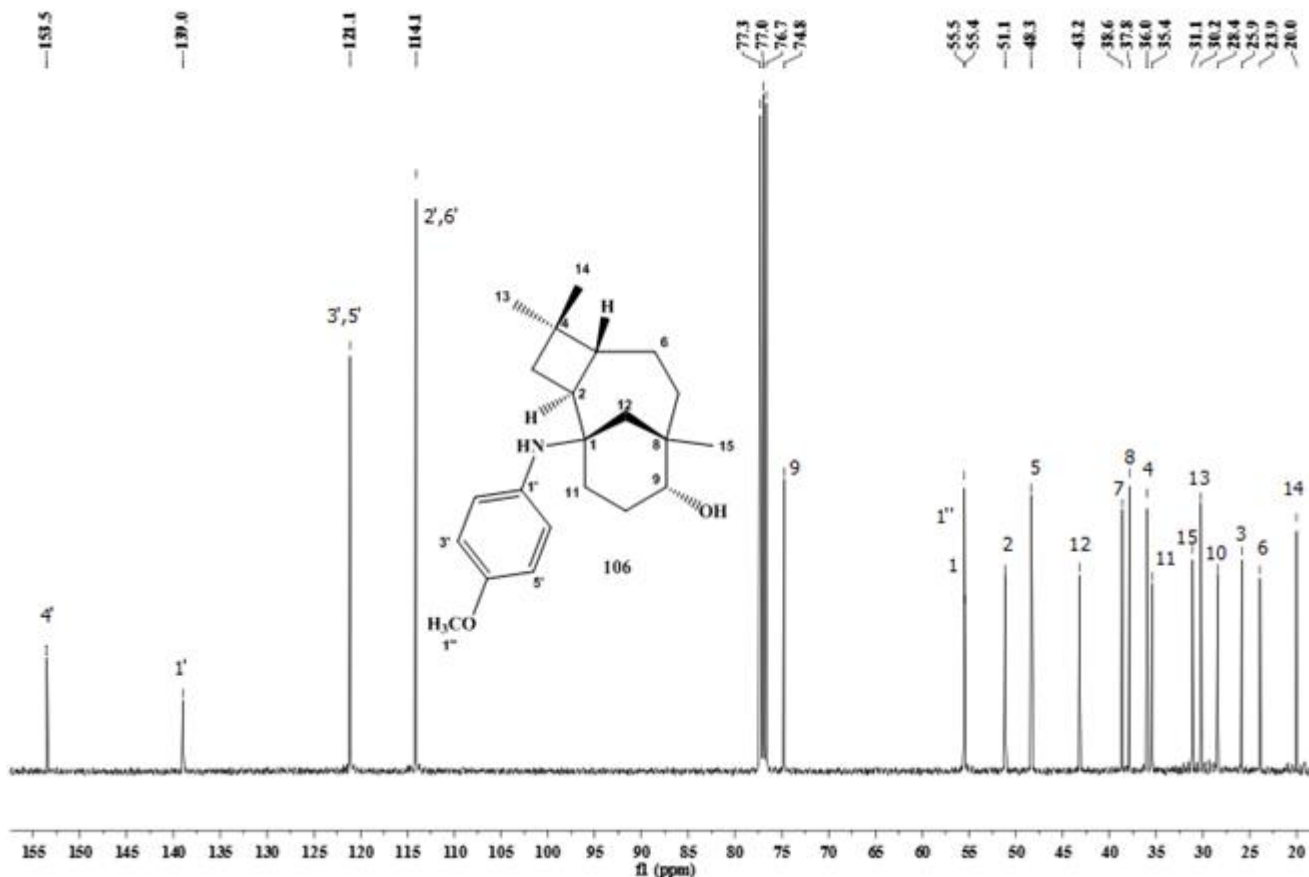
**E SPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$**



No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (FIG. 82, p. 122) foram observados 20 sinais, dos quais quatro referem-se a carbonos aromáticos em  $\delta$  114,1, em  $\delta$  121,1, em  $\delta$  139,0 e em  $\delta$  153,5, que com auxílio do mapa de contornos HSQC (APÊNDICE S4-T4, p. 225-226) foram atribuídos aos carbonos C-2'/C-6', C-3'/C-5', C-1' e C-4' respectivamente. Ainda com auxílio do mapa de contornos HSQC, observou-se uma correlação entre o sinal referente ao hidrogênio metoxílico ( $\delta$  3,74) do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  e o sinal em  $\delta$  55,5 (C-1'') do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ .

Figura 82- Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do composto **106**

E S P E C T R O D E R M N D E  $^{13}\text{C}$

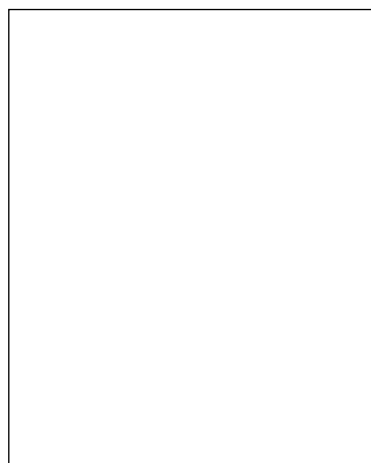


Pelo mapa de contornos COSY (APÊNDICE U4, p. 226) foi possível observar uma correlação entre os sinais referentes aos hidrogênios H-2 e H-5, mostrando que os mesmos são vicinais (FIG.83, p. 123). Este resultado sugere que o anel de quatro membros presente no material de partida, óxido de cariofileno (**72**), não sofreu expansão, e desta forma formou um produto com esqueleto diferente dos clovanos sintetizados. Anteriormente um estudo realizado por Collado e colaboradores (1996) mostrou que o óxido de cariofileno (**72**) pode se rearranjar nas condições utilizadas gerando cariolanos, o que corrobora os dados espectroscópicos encontrados para o composto **106**. Pelo mapa de contornos HSQC observou-se que o carbono C-1é um carbono não hidrogenado, indicando que a ligação entre a anisidina (**91**) e o esqueleto cariolano ocorreu via C-1 (FIG. 54, p. 70). Pelo mapa de contornos HMBC (APÊNDICE V4, p. 227) foi possível confirmar a posição dos grupos metílicos pelas correlações  $^3J_{\text{CH}}$  entre os hidrogênios H-13 com os carbonos C-5/C-14, H-14 com os carbonos C-5/C-13 e H-15 com os carbonos C-7/C-8/C-9/C-12 (FIG. 83, p. 123).

Figura 83- Algumas correlações visualizadas no mapa de contornos COSY ( $\leftrightarrow$ ) e mapa de contornos HMBC ( $\rightarrow$ ) do derivado **106**

No espectro de massas EM-ESI positivo (APÊNDICE X4, p. 227), obtido em um espectrofotômetro ESI-Q-TOF foi possível visualizar o pico base da espécie protonada  $[M+H]^+$  em  $m/z$  344,2589.

#### **1 $\beta$ -(*p*-metoxifenilamino)cariolan-9 $\alpha$ -ol (106)**

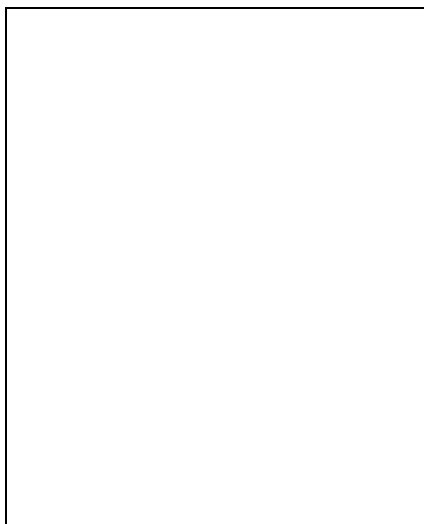


Líquido viscoso de coloração marrom;  $[\alpha]_D^{20}$ : 36,3 ° (c = 33,8 mg mL<sup>-1</sup>, CHCl<sub>3</sub>); **IV (KBr) v<sub>max</sub> (cm<sup>-1</sup>):** 3400 (v O-H, N-H), 2946, 2928, 2864 (v C-H), 1510 (v C=C), 1236 (v C-N), 1038 (v C-O), 754 ( $\delta$  C<sub>sp<sup>2</sup>-H</sub>). **RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm):** 6,80 (d, 2H, H-3', H-5',  $J=8,9$ Hz), 6,73 (d, 2H, H-2', H-6',  $J=8,9$ Hz), 3,74 (s, 3H, H-1''), 3,41 (t, 1H, H-9 $\beta$ ,  $J=3,0$  Hz), 2,25-2,13 (m, 1H, H-10 $\beta$ ), 2,10 (d, 1H, H-12 $\beta$ ,  $J=13,9$ Hz), 2,02-1,91 (m, 1H, H-6 $\beta$ ), 1,89-1,79 (m, 1H, H-2 $\alpha$ ), 1,79-1,67 (m, 4H, H-5, H-6 $\alpha$ , H-10 $\alpha$ ), 1,62-1,53 (m, 1H, H-7 $\beta$ ), 1,50-1,39 (m, 3H, H-3 $\beta$ , H-11), 1,35-1,23 (m, 3H, H-7 $\alpha$ , H-12 $\alpha$ , H-3 $\alpha$ ), 1,01 (s, 3H, H-15), 1,00 (s, 3H, H-15), 0,96 (s, 3H, H-14). **RMN de <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm):** 153,5 (C-4'), 139,0 (C-1'), 121,2 (C-3', C-5'), 114,1 (C-2', C-6'), 74,8 (C-9), 55,5 (C-1''), 55,4 (C-1), 51,1 (C-2), 48,3 (C-5), 43,2 (C-

12), 38,6 (C-7), 37,8 (C-8), 36,0 (C-4), 35,4 (C-11), 31,1 (C-15), 30,2 (C-13), 28,4 (C-10), 25,9 (C-3), 23,9 (C-6), 20,0 (C-14). **HMBC (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** H-2' (C-1') - <sup>2</sup>J<sub>CH</sub>, H-2' (C-4', C-6') - <sup>3</sup>J<sub>CH</sub>, H-6' (C-1') - <sup>2</sup>J<sub>CH</sub>, H-6' (C-2', C-4') - <sup>3</sup>J<sub>CH</sub>, H-3' (C-4') - <sup>2</sup>J<sub>CH</sub>, H-3' (C-5') - <sup>3</sup>J<sub>CH</sub>, H-5' (C-4') - <sup>2</sup>J<sub>CH</sub>, H-5' (C-3') - <sup>3</sup>J<sub>CH</sub>, H-1'' (C-4') - <sup>2</sup>J<sub>CH</sub>, H-12 (C-1, C-8) - <sup>2</sup>J<sub>CH</sub>, H-12 (C-2, C-15, C-7) - <sup>3</sup>J<sub>CH</sub>, H-13 (C-5, C-14) - <sup>3</sup>J<sub>CH</sub>, H-14 (C-5, C-13) - <sup>3</sup>J<sub>CH</sub>, H-15 (C-8) - <sup>2</sup>J<sub>CH</sub>, H-15 (C-9, C-7, C-12) - <sup>3</sup>J<sub>CH</sub>. **COSY (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** H-2'xH-3', H-5'xH-6', H-2 x H-5, H-6xH-7, H-9xH-10. **EM  $m/z$ :** 344,2589  $[M+H]^+$ . **MM:** 343,251. **FM:** C<sub>22</sub>H<sub>33</sub>NO<sub>2</sub>.

#### 4.2.11 1 $\beta$ -(*p*-bromofenilamino)cariolan-9 $\alpha$ -ol (107)





O composto **107** apresentou-se como líquido viscoso, marrom. O espectro na região do IV (APÊNDICE Z4, p. 228) apresentou uma banda em  $3416\text{ cm}^{-1}$  que foi atribuída aos estiramentos OH e NH e três bandas em  $2948$ ,  $2928$  e  $2864\text{ cm}^{-1}$  atribuídas aos estiramentos C-H de grupo alifático. Também foi observada uma banda característica do estiramento C-Br em  $1072\text{ cm}^{-1}$  (BIEMANN, 1998).

Através do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (FIG. 84, p. 125) foi possível observar três simpletos em  $\delta$  1,00, em  $\delta$  1,02 e em  $\delta$  1,03 que foram atribuídos respectivamente aos hidrogênios metílicos H-14, H-15 e H-13. Também observou-se um simpleto largo em  $\delta$  3,45 atribuído ao hidrogênio H-9. Na região referente aos hidrogênios aromáticos foram observados dois dupletos em  $\delta$  6,67 ( $J = 8,6\text{ Hz}$ ) e  $\delta$  7,18 ( $J = 8,6\text{ Hz}$ ) atribuídos respectivamente aos hidrogênios H-2'/H-6' e H-3'/H-5'. A atribuição de alguns sinais de hidrogênio foi feita com o auxílio do mapa de contornos COSY (APÊNDICE A5, p. 228), no qual foram observadas as correlações entre os hidrogênios H-9 e H-10, H-2 e H-3 e entre H-6 e H-7.

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (FIG. 85, p. 125) foram observados 19 sinais, dos quais quatro encontram-se na região de carbonos aromáticos, em  $\delta$  108,9, em  $\delta$  117,6, em  $\delta$  131,5 e em  $\delta$  145,0, com auxílio do mapa de contornos HSQC (APÊNDICE B5-C5, p. 229) os sinais em  $\delta$  117,6 e em  $\delta$  131,5 foram atribuídos aos carbonos C-2'/C6' e C-3'/C-5' respectivamente. Já os carbonos não hidrogenados C-4' e C-1' foram atribuídos aos sinais  $\delta$  108,9 e  $\delta$  145,0 respectivamente.

Pelo mapa de contornos HMBC (APÊNDICE D5, p. 230) foi possível confirmar a formação do esqueleto cariolânico através das correlações,  $^2J_{\text{CH}}$ , observadas entre o hidrogênio H-5 e o carbono C-2 e  $^3J_{\text{CH}}$ , entre o hidrogênio H-2 e o carbono C-6 e entre o hidrogênio H-5 e o carbono C-1, além de outras correlações que podem ser visualizadas na FIG. 86 (p. 126).

*Caracterização dos compostos sintetizados*

Figura 84- Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do composto **107**

E SPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$

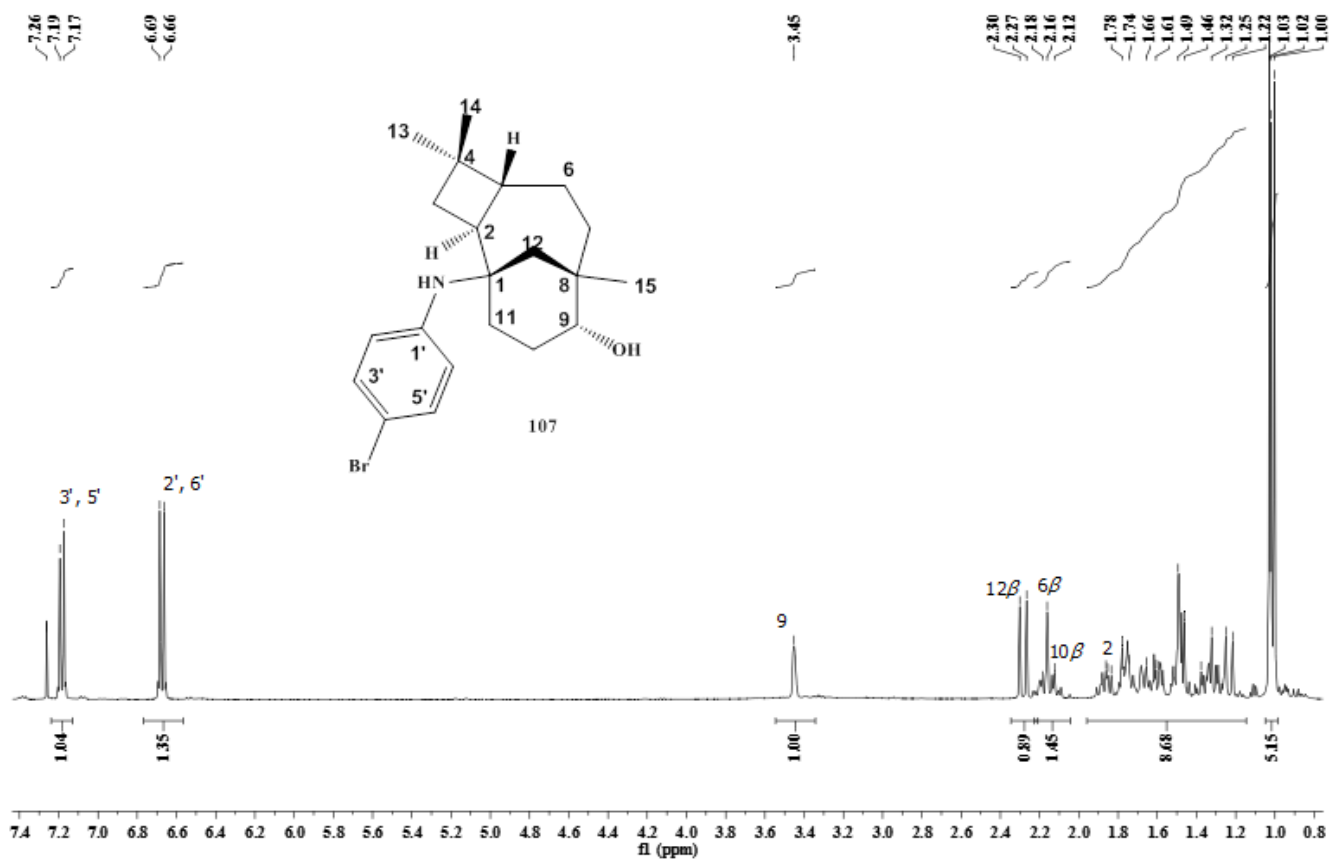


Figura 85- Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do composto **107**

E SPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$

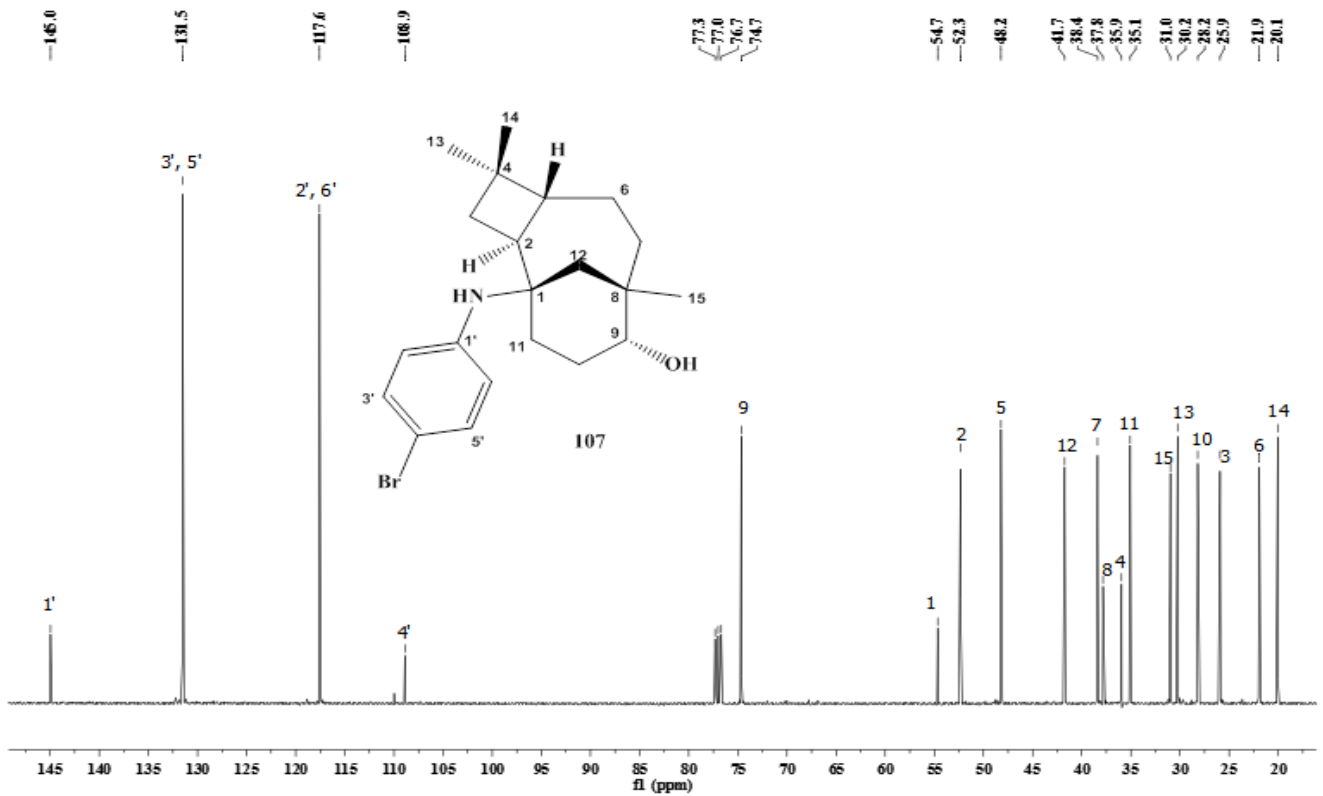
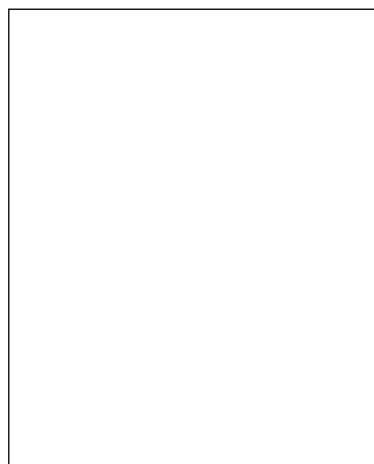


Figura 86- Algumas correlações visualizadas no mapa de contornos HMBC do derivado **107**

No espectro de massas EM-ESI positivo (APÊNDICE E5, p. 231), obtido em um espectrofotômetro ESI-Q-TOF foi possível visualizar o pico baseado na espécie protonada  $[M+H]^+$  em  $m/z$  392,1595.

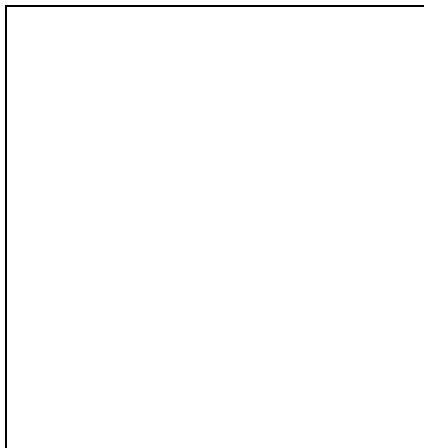
**1 $\beta$ -(p-bromofenilamino)cariolan-9 $\alpha$ -ol (107)**



Líquido viscoso de coloração marrom;  $[\alpha]_{20}^D$ : 34,80° (c = 33,8 mg mL<sup>-1</sup>, CHCl<sub>3</sub>); **IV (KBr) v<sub>max</sub> (cm<sup>-1</sup>):** 3416 (ν O-H, N-H), 2948, 2928, 2864 (ν C-H), 1592 (ν N-C=C), 1498 (ν C=C), 1072 (ν C-Br), 758 (δ C<sub>sp<sup>2</sup>-H</sub>). **RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 7,18 (d, 2H, H-3', H-5', J=8,6 Hz), 6,67 (d, 2H, H-2', H-6', J=8,6 Hz), 3,45 (s, 1H, H-9β), 2,28 (d, 1H, H-12β, J=14,0 Hz), 2,24-2,07 (m, 1H, H-6β), 2,15-2,08 (m, 1H, H-10β), 1,92-1,82 (m, 1H, H-2α), 1,81-1,71 (m, 1H, H-5), 1,70-1,60 (m, 2H, H-10α, H-6α), 1,60-1,56 (m, 1H, H-7β), 1,53-1,48 (m, 1H, H-3β), 1,48 (s, 1H, H-11), 1,42-1,28 (m, 2H, H-7α, H-3α), 1,23 (d, 1H, H-12α, J=14,0 Hz), 1,03 (s, 3H, H-13), 1,02 (s, 3H, H-15), 1,00 (s, 3H, H-14). **RMN de <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 145,0 (C-1'), 131,5 (C-3', C-5'), 117,6 (C-2', C-6'), 108,9 (C-4'), 74,7 (C-9), 54,7 (C-1), 52,3 (C-2), 48,2 (C-5), 41,7 (C-12), 38,4 (C-7), 37,8 (C-8), 35,9 (C-4), 35,1 (C-11), 31,0 (C-15), 30,2 (C-13), 28,2 (C-10), 25,9 (C-3), 21,9 (C-6), 20,1 (C-14). **HMBC (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** H-3' (C-4') - <sup>2</sup>J<sub>CH</sub>, H-3' (C-5') - <sup>3</sup>J<sub>CH</sub>, H-5' (C-4') - <sup>2</sup>J<sub>CH</sub>, H-5' (C-3') - <sup>3</sup>J<sub>CH</sub>, H-2' (C-1') - <sup>2</sup>J<sub>CH</sub>, H-2' (C-6') - <sup>3</sup>J<sub>CH</sub>, H-6' (C-1') - <sup>2</sup>J<sub>CH</sub>, H-6' (C-2') - <sup>3</sup>J<sub>CH</sub>, H-2 (C-1, C-3, C-5) - <sup>2</sup>J<sub>CH</sub>, H-2 (C-4, C-6, C-12) - <sup>3</sup>J<sub>CH</sub>, H-5 (C-2, C-4) - <sup>2</sup>J<sub>CH</sub>, H-5 (C-1, C-7, C-13, C-14) - <sup>3</sup>J<sub>CH</sub>, H-6 (C-2) - <sup>2</sup>J<sub>CH</sub>, H-9 (C-8) - <sup>2</sup>J<sub>CH</sub>, H-9 (C-12, C-15) - <sup>3</sup>J<sub>CH</sub>, H-10 (C-1) - <sup>3</sup>J<sub>CH</sub>, H-12 (C-1, C-8) - <sup>2</sup>J<sub>CH</sub>, H-12 (C-2, C-7, C-11, C-15) - <sup>3</sup>J<sub>CH</sub>, H-13 (C-4) - <sup>2</sup>J<sub>CH</sub>, H-13 (C-5, C-14) - <sup>3</sup>J<sub>CH</sub>, H-14 (C-4) - <sup>2</sup>J<sub>CH</sub>, H-15 (C-8) - <sup>2</sup>J<sub>CH</sub>, H-15 (C-9, C-12) - <sup>3</sup>J<sub>CH</sub>. **COSY (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**

H-2'xH-3', H-5'xH-6', H-2xH-3, H-9xH-10, H-6xH-7. **EM**  $m/z$ : 392,1595 [M+H]<sup>+</sup>. **MM**: 392,3750. **FM**: C<sub>21</sub>H<sub>30</sub>NOBr.

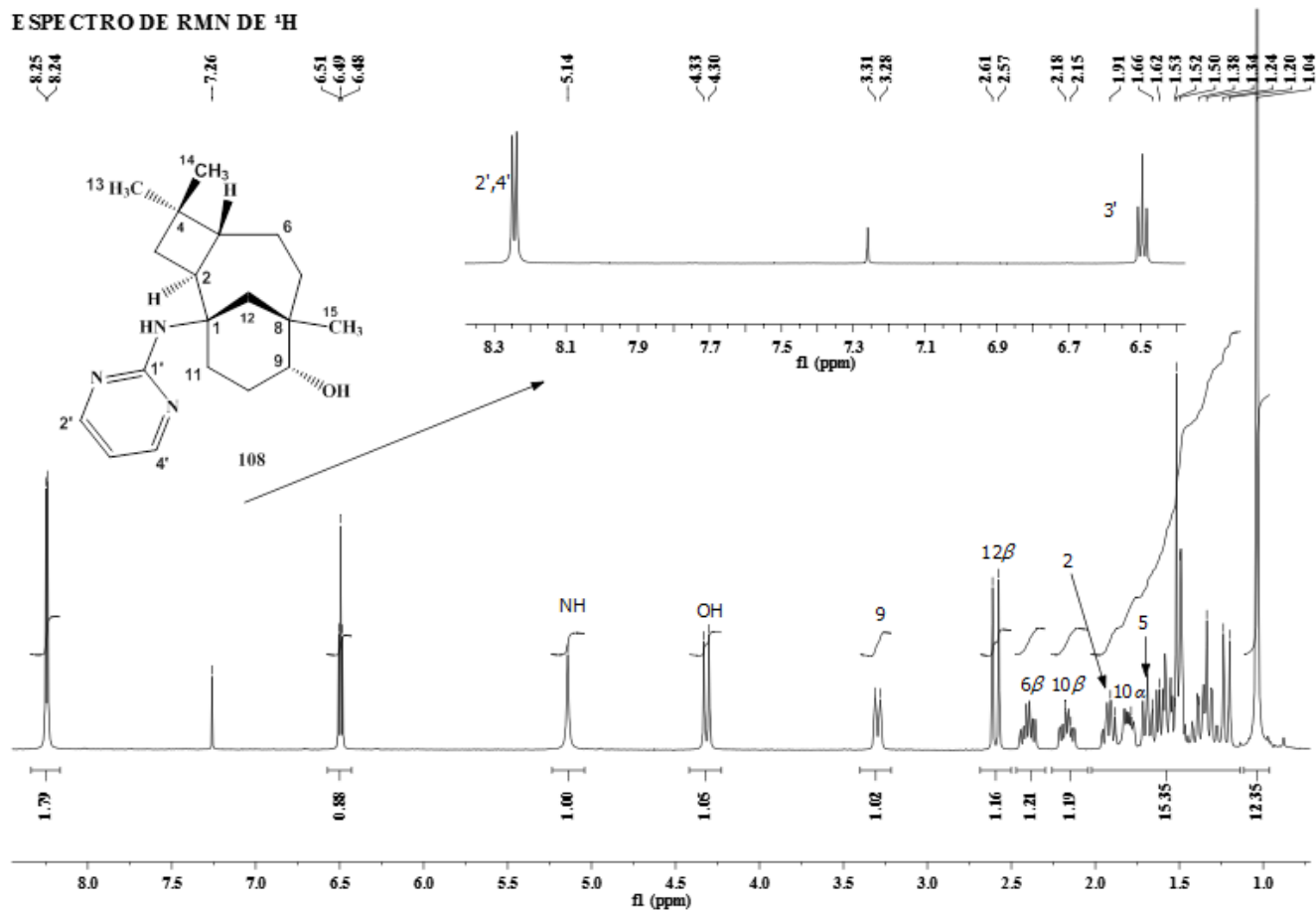
#### 4.2.12 1 $\beta$ -(N-pirimidin)cariolan-9 $\alpha$ -ol (**108**)



Este composto apresentou-se como um sólido branco cristalino com temperatura de fusão na faixa entre 113,6-115,1°C. No espectro na região do IV (APÊNDICE F5, p. 231) foram observadas bandas em 3380cm<sup>-1</sup> atribuída aos estiramentos OH e NH, em 2946, 2924 e 2864 cm<sup>-1</sup> atribuídas ao estiramento C-H de grupo alifático. Em 1590 cm<sup>-1</sup> e 1514cm<sup>-1</sup> foram observadas bandas referentes aos estiramentos N=C e N-C=C, respectivamente (BIEMANN, 1998).

Pela análise do espectro de RMN de <sup>1</sup>H (FIG. 87, p. 128) foi possível observar dois simpletos em  $\delta$  1,04 e  $\delta$  5,14, sendo o primeiro sinal com integral proporcional a nove hidrogênios. Com auxílio do mapa de contornos HSQC (APÊNDICE G5-H5, p. 232) o sinal em  $\delta$  1,04 foi atribuído aos hidrogênios metílicos H-13/H-14/H-15, já o sinal em  $\delta$  5,14 não apresentou correlação com nenhum sinal do espectro de RMN de <sup>13</sup>C e desta forma foi atribuído ao hidrogênio NH da aminopirimidina. O duplete visualizado em  $\delta$  4,32 ( $J = 12,2$  Hz) também não apresentou com nenhum sinal do espectro de RMN de <sup>13</sup>C e desta forma este sinal foi atribuído ao hidrogênio da hidroxila, a multiplicidade apresentada por este sinal sugeriu que este hidrogênio estava acoplado ao hidrogênio H-9 localizado em  $\delta$  3,30 (d,  $J = 12,2$  Hz), fato confirmado através do mapa de contornos COSY (APÊNDICE I5, p. 233) que mostrou a correlação entre os hidrogênios da hidroxila e H-9. Foram ainda observados no espectro de RMN de <sup>1</sup>H, um tripleto em  $\delta$  6,49 ( $J = 4,8$  Hz) e um duplete em  $\delta$  8,24 ( $J = 4,8$  Hz) atribuídos aos hidrogênios do anel pirimidínico H-3' e H-2'/H-4', respectivamente.

Figura 87- Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do composto **108**



No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (FIG. 88, p. 129) foram observados 18 sinais, sendo os mais desblindados,  $\delta$  110,0,  $\delta$  157,3 e  $\delta$  160,3, atribuídos aos carbonos do anel pirimidínico C-3', C-2'/C-4' e C-1', respectivamente. Com auxílio do mapa de contornos HSQC realizou-se a atribuição dos demais carbonos correspondentes a cada hidrogênio.

A formação do esqueleto cariolânico foi confirmada pelas correlações observadas no mapa de contornos COSY entre os hidrogênios H-2 e H-5, e no mapa de contornos HMBC, o qual mostrou correlações  $^3J_{\text{CH}}$  entre o hidrogênio H-12 e os carbonos C-2/C-9/C-11/C-15 (APÊNDICE J5-L5, p. 233-234). A disposição de alguns átomos de **108** foi determinada pelo mapa de contornos NOESY (APÊNDICE M5, p. 234). Algumas das principais correlações observadas podem ser visualizadas na FIG. 89 (p. 129).

No espectro de massas foi possível visualizar o pico base da espécie protonada  $[\text{M}+\text{H}]^+$  em  $m/z$  316,2396 (APÊNDICE N5, p. 235).

Figura 88- Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ (100MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do composto **108**

ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$

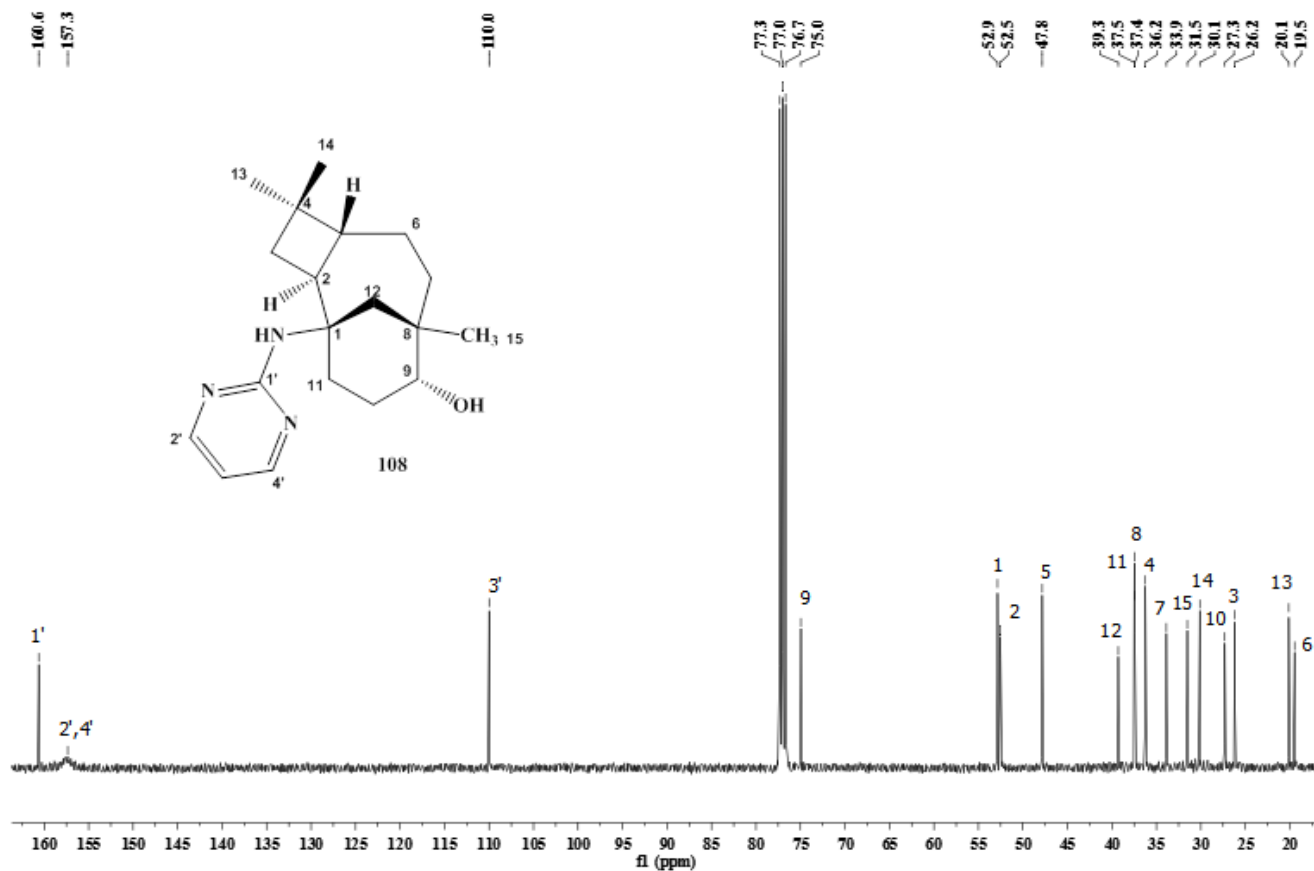


Figura 89- Correlações entre hidrogênios de 2 $\beta$ -(N-pirimidin)cariolan-9 $\alpha$ -ol (**108**) visualizadas no mapa de contornos NOESY

1β-(N-pirimidin)cariolan-9α-ol (108)

13

Sólido branco cristalino; Tf: 113,6-115,1°C;  $[\alpha]_{20}^D$ : 45,14° (c = 33,8 mg mL<sup>-1</sup>, CHCl<sub>3</sub>); **IV (KBr) v<sub>max</sub> (cm<sup>-1</sup>):** 3380 (ν O-H, N-H), 2946, 2924, 2864 (ν C-H), 1590(ν C=N), 1514 (ν C=C), 754 (δ C<sub>sp<sup>2</sup>-H</sub>). **RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 8,24 (d, 2H, H-2', H-4', J=4,8Hz), 6,49 (t, 1H, H-3', J=4,8Hz), 5,14 (s, 1H, NH), 4,32 (d, 1H, OH, J=12,2Hz), 3,30 (d, 1H, H-9β, J=12,2Hz), 2,59 (d, 1H, H-12β, J=14,8Hz), 2,46-2,33 (m, 1H, H-6β), 2,24-2,09 (m, 1H, H-10β), 1,92 (dd, 1H, H-2α, J=19,6 e 10,1Hz), 1,85-1,75 (m, 1H, H-10α), 1,69 (t, 1H, H-5, J=11,5Hz), 1,64-1,53 (m, 2H, H-6α, H-11β), 1,52 (s, 1H, H-7), 1,50-1,46 (m, 1H, H-3β), 1,41-1,28 (m, 2H, H-3α, H-11α), 1,22 (d, 1H, H-12α, J=14,8Hz), 1,04 (s, 9H, H-13, H-14, H-15). **RMN de <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 160,6 (C-1'), 157,3 (C-2', C-4'), 110,0 (C-3'), 75,0 (C-9), 52,9 (C-1), 52,5 (C-2), 47,8 (C-5), 39,3 (C-12), 37,5 (C-11), 37,4 (C-8), 36,2 (C-4), 33,9 (C-7), 31,5 (C-15), 30,1 (C-14), 27,3 (C-10), 26,2 (C-3), 20,1 (C-13), 19,5 (C-6). **HMBC (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** H-2' (C-3') - <sup>2</sup>J<sub>CH</sub>, H-2' (C-1') - <sup>3</sup>J<sub>CH</sub>, H-4' (C-3') - <sup>2</sup>J<sub>CH</sub>, H-4' (C-1') - <sup>3</sup>J<sub>CH</sub>, OH (C-9) - <sup>2</sup>J<sub>CH</sub>, H-3 (4)<sup>2</sup>J<sub>CH</sub>, H-3 (13)<sup>3</sup>J<sub>CH</sub>, H-5 (C-4) - <sup>2</sup>J<sub>CH</sub>, H-6 (C-2) - <sup>2</sup>J<sub>CH</sub>, H-7 (C-6, C-8) - <sup>2</sup>J<sub>CH</sub>, H-7 (C-5) - <sup>3</sup>J<sub>CH</sub>, H-10 (C-1) - <sup>3</sup>J<sub>CH</sub>, H-11 (C-1) - <sup>2</sup>J<sub>CH</sub>, 11 (C-9) - <sup>3</sup>J<sub>CH</sub>, H-12 (C-1, C-8) - <sup>2</sup>J<sub>CH</sub>, H-12 (C-2, C-9, C-11, C-15) - <sup>3</sup>J<sub>CH</sub>, H-13 (C-5, C-14) - <sup>3</sup>J<sub>CH</sub>, H-14 (C-5, C-15) - <sup>3</sup>J<sub>CH</sub>, H-15 (C-8) - <sup>3</sup>J<sub>CH</sub>, H-15 (C-7, C-9, C-12) - <sup>3</sup>J<sub>CH</sub>. **COSY (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** H-2'xH-3', H-4'xH-3', OHxH-9, H-2xH-3, H-2xH-5, H-9xH-10, H-10xH-11. **NOESY (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** H-2αxH-13α, H-5 x H-10β, H-5xH-14β, H-9βx H-10β. **EM m/z (intensidade relativa):** 316,2396 [M+H]<sup>+</sup>. **MM:** 315,231. **FM:** C<sub>19</sub>H<sub>29</sub>N<sub>3</sub>O.

## 5 METODOLOGIA

Todos os procedimentos que envolveram cultivo e manipulação de micro-organismos foram conduzidos em capela de fluxo laminar (Capela PACHANE® PA 320). Os materiais utilizados na manipulação dos micro-organismos foram esterilizados em autoclave vertical Selecta, modelo Autester 4043720. A transferência de pequenas quantidades de soluções líquidas, assim como as diluições, foram conduzidas utilizando-se micropipetas automáticas. Os reagentes utilizados, bem como os produtos obtidos foram pesados em balança analítica BP 121 S (Sartorius).

### 5.1 Meios de cultura, soluções e suspensão de esporos utilizados para os ensaios biológicos

Para o preparo dos meios sólidos descritos, dissolveram-se os respectivos componentes em água, sob agitação e a solução obtida foi aquecida até a formação de um líquido translúcido que foi esterilizado em autoclave a 120 °C por 15 min em recipientes adequados.

Meios de cultura sólidos:

Ágar malte (GAMSet *al.*, 1998) - Parte I, seção 4.1, p. 46;

Ágar batata (GAMS *et al.*, 1998) - Parte I, seção 4.1, p. 46;

Ágarsuco de tomate (NUÑEZ *et al.*, 2006)

- Ágar (Merck) – 20,0 g L<sup>-1</sup>
- Suco de tomate *in natura* sem casca – 500 mL
- Água destilada – 500 mL

Meio de cultura líquido: Sabouraud líquido 2X:

- Peptona (Merck) – 20,0 g L<sup>-1</sup>;
- Glicose (Vetec) – 40,0 g L<sup>-1</sup>;
- pH ajustado para 7;

Para a preparação da suspensão de esporos dos fungos filamentosos, o *P. crustosum* foi incubado por sete dias a 28 °C em ágar batata e o *B. cinerea* foi incubado, também a 28°C, em meio sólido malte e, após três dias, foi transferido para o meio tomate e novamente incubado a 28 °C por mais sete dias. Posteriormente, com auxílio de uma alça estéril, transferiram-se os esporos para um erlenmeyer de 125 mL contendo água esterilizada. Os esporos fúngicos foram contados em câmara de Neubauer e realizou-se a diluição adequada para que a concentração final fosse de 5 x 10<sup>3</sup> esporos mL<sup>-1</sup> para o *P. crustosum* e 5 x 10<sup>4</sup> esporos mL<sup>-1</sup> para o *B. cinerea*.

Para o preparo da solução estoque em DMSO (dimetilsufóxido) utilizaram-se 12,5 mg mL<sup>-1</sup> de substância pura a ser testada. Para o preparo da solução trabalho diluíram-se 40 µL da solução estoque em 960 µL de meio de cultura Sabouraud.



### 5.2 Teste antifúngico

Para avaliar a atividade antifúngica dos derivados clovânicos e cariolanos obtidos foram usadas cepas de *P. crustosum*(VR4) e *B. cinerea*(UCA992) da coleção do Laboratório de Desenho Biosintético *Botrytis* (Departamento de Química, Universidade de Cádiz/Espanha).

Foram usadas microplacas constituídas por 96 poços (8 linhas e 12 colunas). As microplacas foram preparadas da mesma forma que as descritas na seção 4.3, p. 48 (PARTE I), porém o meio de cultura BHI foi substituído, neste procedimento, por meio de cultura Sabouraud. Os compostos sintetizados foram avaliados na concentração fixa de 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

As microplacas preparadas foram incubadas em uma sala “branca” a 37 °C durante 48 h. Realizaram-se leituras em leitora de ELISA (Thermo Scientific Multiskan FC), em comprimento de onda fixo de 492 nm, com 48 h.

### 5.3 Solventes, ácidos orgânicos e reagentes utilizados

Todos os solventes utilizados foram de grau de pureza para CLAE da Aldrich e Merck. Óxido de cariofileno, feniletanol, fenoxietanol, nitrofeniletanil, nitrofenoxietanol, anilina, metilanilina, nitroanilina, bromoanilina, anisidina, aminopirimidina, TCNE,  $\text{Sn}(\text{OTf})_2$  utilizados foram das marcas Acros Organics, Synth e Aldrich.

### 5.4 Métodos físico-químicos de análise

#### 5.4.1 Temperatura de fusão

As faixas de fusão foram determinadas pelo aparelho Reichert Thermovar tipo 300429, com reostato Reichert-Jung e termômetro RS 206-3722 (Departamento de Química, Universidade de Cádiz/Espanha).

#### 5.4.2 Atividade ótica ( $[\alpha]_D$ )

O poder rotatório específico das substâncias foi medido no polarímetro Perkin Elmer modelo 341 (Departamento de Química, Universidade de Cádiz/Espanha).

#### 5.4.3 Ressonância magnética nuclear

Os espectros de RMN mono e bidimensionais foram registrados nos espectrômetros Varian Inova-400 e Varian Inova-600 MHz, a temperaturas entre 25 e -50°C (Departamento de Química, Universidade de Cádiz/Espanha). Utilizou-se como referência interna o tetrametilsilano ou o próprio solvente deuterado.

### 5.4.4 Espectroscopia no infravermelho

Os espectros na região do infravermelho foram registrados no aparelho Perkin Elmer FT-IR System, Spectrum BX, série 69799 (Departamento de Química, Universidade de Cádiz/Espanha). As amostras foram dissolvidas em metanol Aldrich 99,9% A.C.S. grau espectrofotométrico, e foram depositadas sobre célula de KBr. Para as atribuições das bandas presentes nos espectros do infravermelho utilizou-se como referência Biemann (1998) e Silverstein e colaboradores (2006).

### 5.4.5 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Utilizou-se um cromatógrafo Merck-Hitachi LaChrom, equipado com índice de refração L-7490, bomba L-7100 e um processador Pentium 90, com o programa Borwin, versão 1.21. As separações foram realizadas em colunas semipreparativas LiChroCart<sup>®</sup> 250-10 e LiChrospher Si-60 (10µm) e coluna analítica LiChroCart<sup>®</sup> 250-4 e LiChrospher Si-60 (5µm). Os eluentes utilizados foram hexano, acetato de etila e misturas hexano/acetato de etila, previamente destilados e filtrados, utilizando filtro millipore (0,45µm).

### 5.4.6 Espectrometria de massas (EM)

Os espectros de massas foram obtidos nos seguintes aparelhos: Espectrometro Voyager 70 eV. E os espectros de Massas de alta resolução foram obtidos em aparelho Micromass Autospec 70 eV ou Waters Synapt G2 QTOF empregando ionização do tipo eletrospray (ESI).

### 5.4.7 Cromatografia em camada delgada

Para os procedimentos cromatográficos utilizaram-se placas de sílica gel F-254 (Polygram<sup>®</sup> SIL G/UV<sub>254</sub>, Macherey & Nagel, Duren, Alemanha), de 5 cm de comprimento por 10 cm de largura e 0,25 mm de espessura e placas de sílica gel Merck “Kieselgel 60 F254”, com uma espessura de 0,25 mm e indicador fluorescente. Como fase móvel foram utilizados os sistemas de solvente hexano/acetato de etila e acetato de etila/metanol em proporções variadas. As cromatoplasmas foram revelados utilizando-se lâmpada ultravioleta VL-6LC BDH e, como revelador químico, vanilina, vapores de iodo e *oleum* (ácido sulfúrico, água e ácido acético na proporção 4:16:80).

### 5.4.8 Cromatografia em coluna

Para as colunas cromatográficas utilizou-se sílica gel Merck 60 (200µm) sob pressão atmosférica.

### 5.5 Síntese dos 2-ariloxiclovanos **82, 87-89**a partir do óxido de cariofileno (**72**)

Como procedimento geral, o tratamento de óxido de cariofileno (**72**) com os álcoois (**83-86**), catalizados por TCNE forneceu os sesquiterpenos 2-arilcovanos **82, 87-89**(FIG.90).

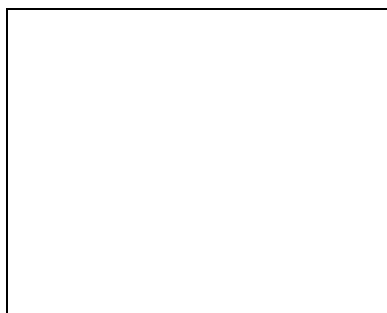
Figura90- Esquema para obtenção dos 2-arilcovanos **82, 87-89**

#### 5.5.1 Síntese do $2\beta$ -[2-(2'-*p*-nitrofenoxi)etoxi]clovan- $9\alpha$ -ol (**82**)

Pesaram-se 500 mg (2,27 mmol) de óxido de cariofileno (**72**) e 600 mg (3,28 mmol) de *p*-nitrofenoxietanol (**82**), que foram vertidos em um frasco tipo Schlenck contendo 5 mL de acetona e a solução foi mantida sob agitação magnética. Posteriormente adicionou-se 60 mg (0,47 mmol) de TCNE. A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada e se processou durante 20 h. Após este período, a solução foi concentrada e o resíduo foi submetido à cromatografia em coluna, utilizando gradiente crescente contendo hexano, acetato de etila e metanol. Nas frações hexano/30-50% acetato de etila foi obtido o produto **82** como um líquido viscoso de coloração alaranjada (61,3 mg, 0,152 mmol, 7%).

Além do produto **82**, também foram isolados, nas frações eluídas com hexano/10-20% acetato de etila, o composto **110** (2,4mg, 0,011 mmol, 0,5 %) (FIG. 91) e na fração eluída com 100% acetato de etila o composto **73**(174,2mg, 0,737 mmol, 32%).

Figura 91- Fórmula estrutural do composto **110**

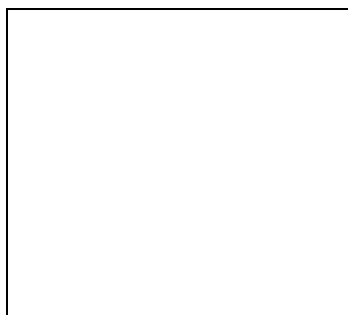


### 5.5.2 Síntese do 2 $\beta$ -[2-(*p*-nitrofenil)etoxi]clovan-9 $\alpha$ -ol (**87**)

Pesaram-se 500 mg (2,27 mmol) de óxido de cariofileno (**72**) e 500 mg (2,99 mmol) de *p*-nitrofeniletanol (**84**), que foram vertidos em um frasco tipo Schlenck contendo 5 mL de acetona e a solução foi mantida sob agitação magnética. Posteriormente adicionou-se 60 mg (0,47 mmol) de TCNE. A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada e se processou durante 21 h. Após este período, a solução foi concentrada e o resíduo foi submetido à cromatografia em coluna com gradiente crescentede hexano, acetato de etilae metanol.Na fração hexano/15% acetato de etila foi eluído o produto **87**como umlíquido viscoso de coloração amarelada (51,3 mg, 0,133 mmol, 6%).

Além do produto **87** também foram isolados nas frações eluídas com hexano/30% acetato de etila o composto **110** (1,5 mg, 0,007 mmol, 0,3 %), com hexano/50% acetato de etila, o composto **111**(2,2 mg, 0,011 mmol, 0,5 %) (FIG. 92) e com 100 % acetato de etila o composto **73**(47,6 mg, 0,201 mmol, 9 %).

Figura 92- Fórmula estrutural do composto **111**



### 5.5.3 Síntese do 2 $\beta$ -[2-(2'-fenoxi)etoxi]clovan-9 $\alpha$ -ol (**88**)

Para obtenção do composto **88** pesaram-se 500 mg (2,27 mmol) de óxido de cariofileno (**72**), que foram vertidos em um frasco tipo Schlenck contendo 0,5 mL de fenoxietanol (**85**).A solução foi mantida sob agitação. Posteriormente adicionou-se 60 mg (0,47 mmol) de TCNE. A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada e se processou durante 114 h. Após este período, a solução foi concentrada e submetida à cromatografia em coluna, utilizando gradientes crescentes em

hexano, acetato de etila e metanol. Na fração eluída com hexano/20% acetato de etila foi obtido o produto **88** como um líquido viscoso de coloração amarelada (73,7 mg, 0,206 mmol, 9 %).

Além do produto **88** também, foi isolado, nas frações eluídas com acetato de etila/20% metanol, o composto **73** (72,6 mg, 0,307 mmol, 14 %).

### 5.5.4 Síntese do 2 $\beta$ -(2-feniletóxi)clovan-9 $\alpha$ -ol (**89**)

Pesaram-se 500mg (2,27 mmol) de óxido de cariofileno, que foram vertidos em um frasco tipo Schlenck contendo 3 mL de feniletanol (**86**). A solução foi mantida sob agitação magnética. Posteriormente adicionou-se 60 mg (0,47 mmol) de TCNE e, logo após esta adição, a reação tornou-se avermelhada. A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada e se processou durante 103 h. Após este período, a solução foi concentrada e o resíduo foi submetido à cromatografia em coluna, utilizando gradiente crescente, hexano, acetato de etila e metanol, na fração hexano/20% acetato de etila foi purificado o produto **89** como um sólido branco cristalino (80,5mg, 0,235 mmol, 10 %).

Além do produto **89**, também foram isolados com hexano/10% acetato de etila o composto **110** (7,7mg, 0,035 mmol, 2 %) e, com hexano/50-100% acetato de etila, o composto **73** (27,3mg, 0,112 mmol, 5 %).

### 5.6 Síntese dos derivados clovânicos **96-105**, **113** e cariolânicos **106-108**

Como procedimento geral, o tratamento do óxido de cariofileno (**72**) com as fenilaminas **90-94** e 2-aminopirimidina (**95**), em benzonitrila, a 80 °C e catalisadas por Sn(OTf)<sub>2</sub> (FIG. 93), forneceu as clovanofenilaminas **96-101**, a clovanoaminopirimidina **102** e as clovanofenilamidinas **103-105** (FIG. 48, p. 66). Também foram obtidos duas cariolanofenilaminas (**106** e **107**) e uma cariolanoaminopirimidina (**108**) (FIG. 49, p. 66).

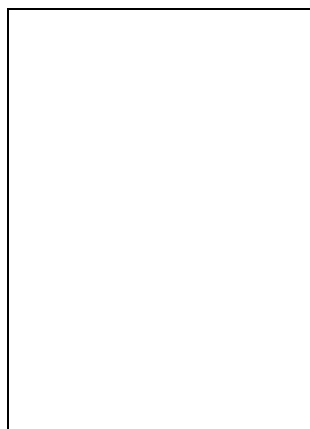
Figura 93- Esquema para obtenção dos derivados clovânicos **96-105** e cariolânicos **106-108**

5.6.1 Síntese dos compostos 2 $\beta$ -fenilaminoclovan-9 $\alpha$ -ol (**96**) e *N*-(fenil)-*N'*-(9 $\alpha$ -hidroxiclovan-2 $\beta$ -il)-benzamidina (**103**)

Pesaram-se 500mg (2,27 mmol) de óxido de cariofileno (**72**), que foram vertidos em um frasco tipo Schlenck contendo 3 mL de benzonitrila seco e 0,73 mg (0,166 mmol) de Sn(OTf)<sub>2</sub>. A solução foi mantida sob agitação magnética. Após 30 minutos adicionou-se 0,5 mL de anilina (**90**) e a temperatura foi ajustada para 80 °C. A reação tornou-se amarelada em poucos segundos e foi acompanhada por cromatografia em camada delgada tendo se processado por 24 h. Após este período, a solução foi concentrada e o resíduo foi submetido à cromatografia em coluna, utilizando gradiente crescente de hexano, acetato de etila e metanol. Na fração hexano/10% acetato de etila foi obtido o produto **96** como um sólido branco e cristalino (60,2 mg, 0,192 mmol, 9 %). Na fração acetato de etila /10% metanol foi obtido o produto **103** como um líquido amarelo e viscoso (56,1mg, 0,135 mmol, 6 %).

Além dos produtos **96** e **103**, também foram isolados com hexano/30% acetato de etila o composto **111** (17,5mg, 0,079 mmol, 4 %) (FIG. 94) e com hexano/50 % acetato de etila, o composto **113** (51,5mg, 0,151 mmol, 7 %).

Figura 94- Fórmula estrutural do composto **113**



### 5.6.2 Síntese dos compostos 2 $\beta$ -(*p*-metoxifenilamino)clovan-9 $\alpha$ -ol (**97**) e 1 $\beta$ -(*p*-metoxifenilamino)cariolan-9 $\alpha$ -ol (**106**)

Pesaram-se 500mg (2,27 mmol) de óxido de cariofileno (**72**) e 350 mg (2,84 mmol) de *p*-metoxianilina (**91**) que foram vertidos em um frasco tipo Schlenck contendo 3 mL de benzonitrila anidro e 0,73 mg (0,166 mmol) de Sn(OTf)<sub>2</sub>, em seguida a solução foi mantida sob agitação magnética e a temperatura foi ajustada para 80 °C. A reação tornou-se morrom em poucos segundos e foi acompanhada por cromatografia em camada delgada tendo se processado por 24 h. Após este período, a solução foi concentrada e o resíduo foi submetido à cromatografia em coluna, utilizando gradiente crescente de hexano, acetato de etila e metanol. Na fração eluída com hexano/80% acetato de etila foi obtido o produto **97** como um sólido rosa cristalino (250,8 mg, 0,731 mmol, 32 %). Na fração eluída com 100% acetato de etila foi obtido o produto **106** como um líquido marrom e viscoso (102,3mg, 0,298 mmol, 13 %).

Além dos produtos **97** e **106**, também foi isolado, com hexano/30% acetato de etila, o composto **111** (40,1mg, 0,182 mmol, 8 %).

### 5.6.3 Síntese dos compostos 2 $\beta$ -(*p*-nitrofenilamino)clovan-9 $\alpha$ -ol (**98**) e 1 $\beta$ -[*p*-*N*-(*p*-nitrofenil)-*N'*-(9 $\alpha$ -hidroxiclovan-2 $\beta$ -il)]-benzamidina (**104**)

Pesaram-se 500mg (2,27 mmol) de óxido de cariofileno (**72**) e 500 mg (3,62 mmol) de nitroanilina (**92**) que foram vertidos em um frasco tipo Schlenck contendo 3 mL de benzonitrila anidro e 0,73 mg (0,166 mmol) de Sn(OTf)<sub>2</sub>, a solução foi mantida sob agitação magnética e a temperatura foi ajustada para 80 °C. A reação tornou-se amarelada em poucos segundos e foi acompanhada por cromatografia em camada delgada tendo se processado por 24 h. Após este período, a solução foi concentrada e o resíduo foi submetido à cromatografia em coluna, utilizando gradiente crescente de hexano, acetato de etila e metanol. Na fração hexano/30% acetato de etila foi obtido o produto **98** como um sólido amarelo cristalino (114,6 mg, 0,320 mmol, 14 %). Na fração hexano/80 % acetato de etila foi obtido o produto **104** como um sólido amarelo cristalino (413,3mg, 0,896 mmol, 39 %).

Além dos produtos **98** e **104**, também foi isolado, com hexano/50% acetato de etila, o composto **111** (71,5mg, 0,324 mmol, 14 %).

### 5.6.4 Síntese dos compostos *N*-(*p*-bromofenil)-*N'*-(9 $\alpha$ -hidroxiclovan-2 $\beta$ -il)-benzamidina (**105**) e 1 $\beta$ -(*p*-bromofenilamino)cariolan-9 $\alpha$ -ol (**107**)

Pesaram-se 500 mg (2,27 mmol) de óxido de cariofileno (**72**) e 450 mg (2,62 mmol) de bromoanilina (**93**) que foram vertidos em um frasco tipo Schlenck contendo 3 mL de benzonitrila anidra e 0,73 mg (0,166 mmol) de Sn(OTf)<sub>2</sub>, a solução foi mantida sob agitação magnética e a temperatura foi ajustada para 80 °C. A reação tornou-se amarelada em poucos segundos e foi acompanhada por cromatografia em camada delgada tendo se processado por 24 h. Após este período, a solução foi concentrada e o resíduo foi submetido à cromatografia em coluna, utilizando gradiente crescente de hexano, acetato de etila e metanol. Na fração 100 % acetato de etila foi obtido o produto **105** como um sólido amarelo cristalino (196,3 mg, 0,396 mmol, 17 %). Na fração hexano/80 % acetato de etila foi obtido o produto **107** como um sólido amarelo cristalino (86,2 mg, 0,220 mmol, 10 %).

Além dos produtos **105** e **107**, também foram isolados, com hexano/30 % acetato de etila o composto **110** (1,3 mg, 0,006 mmol, 0,3 %) e, com acetato de etila/30 % metanol, o composto **113** (62,7 mg, 0,184 mmol, 8 %).

### 5.6.5 Síntese dos compostos 2β-(N-metilanilina)clovan-9α-ol (**99**)

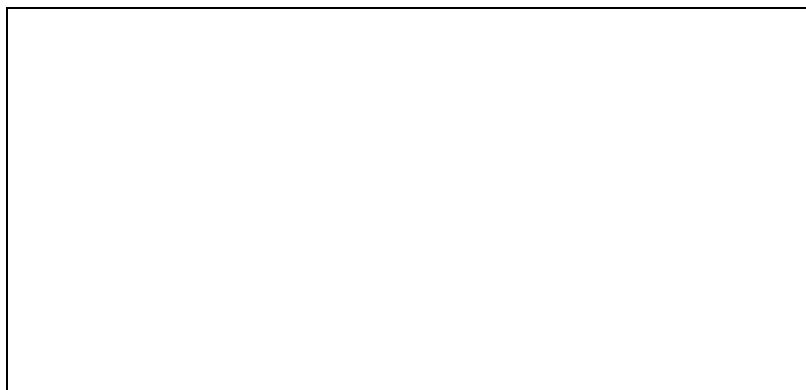
Pesaram-se 500 mg (2,27 mmol) de óxido de cariofileno (**72**) que foram vertidos em um frasco tipo Schlenck contendo 1 mL de metilanilina (**94**), 3 mL de benzonitrila anidra e 0,73 mg (0,166 mmol), a solução foi mantida sob agitação magnética e a temperatura foi ajustada para 80 °C. A reação tornou-se amarelada em poucos segundos e foi acompanhada por cromatografia em camada delgada tendo se processado durante 24 h. Após este período, a solução foi concentrada e o resíduo foi submetido à cromatografia em coluna, utilizando gradiente crescente de hexano, acetato de etila e metanol. Na fração hexano/50 % acetato de etila foi obtido o produto **99** como um líquido amarelo e viscoso (99,4 mg, 0,303 mmol, 13 %).

Além do produto **99** foram obtidos os produtos da reação de Friedel-Craft 2β-[o-(N-metilamino)fenil]clovan-9α-ol (**100**) (sólido branco cristalino, 36,7 mg, 0,112 mmol, 5 %), (FIG. 95) na fração eluída com hexano/20 % acetato de etila e 2β-[p-(N-metilamino)fenil]clovan-9α-ol (**101**) (líquido amarelo e viscoso, 13,0 mg, 0,040 mmol, 2 %) (FIG. 95), na fração eluída com hexano/80 % acetato de etila.

Além dos produtos **99**, **100** e **101**, também foram isolados, com hexano/20 % acetato de etila, o composto **110** (1,5 mg, 0,007 mmol, 0,3 %) e, com acetato de etila/10% metanol, o composto **111** (22,9 mg, 0,104 mmol, 5 %).

Figura 95- Fórmula estrutural dos compostos **100** e **101**





#### 5.6.6 Síntese dos compostos $2\beta$ -(*N*-pirimidin)clovan- $9\alpha$ -ol (**102**) e $2\beta$ -(*N*-pirimidin)cariolan- $9\alpha$ -ol (**108**)

Pesaram-se 500mg (2,27 mmol) de óxido de cariofileno (**72**) e 300 mg (3,29 mmol) de 2-aminopirimidina (**95**) que foram vertidos em um frasco tipo Schlenck contendo 3 mL de benzonitrila anidra e 0,73 mg (0,166 mmol) de Sn(OTf)<sub>2</sub>, a solução foi mantida sob agitação magnética e a temperatura foi ajustada para 80 °C. A reação tornou-se amarelada em poucos segundos e foi acompanhada por cromatografia em camada delgada tendo se processado por 24 h. Após este período, a solução foi concentrada e o resíduo foi submetido à cromatografia em coluna, utilizando gradiente crescente de hexano, acetato de etila e metanol. Na fração acetato de etila/30% metanol foi obtido o produto **102** como um sólido branco cristalino (13,0 mg, 0,041 mmol, 2 %). Na fração acetato de etila/10% metanol foi obtido o produto **108** como um sólido amarelo cristalino (22,6mg, 0,072 mmol, 3 %).

Além dos produtos **102** e **108**, também foram isolados, com hexano/50% acetato de etila, o composto **111** (83,1 mg, 0,377 mmol, 17 %) e, com acetato de etila/30% metanol, o composto **113** (62,7mg, 0,184 mmol, 8 %).

## 6 CONCLUSÕES

Neste trabalho foram sintetizados derivados clovânicos e cariolânicos, e testados na concentração de 250 µg L<sup>-1</sup> frente aos fungos *B. cinerea* e *P. crustosum*, sendo:

Quatro ariloxiclovanos, 2β-[2-(2'-*p*-nitrofenoxi)etoxi]clovan-9α-ol (**82**), 2β-[2-(*p*-nitrofenil)etoxi]clovan-9α-ol (**87**), 2β-[2-(2'-fenoxi)etoxi]clovan-9α-ol (**88**) e 2β-(2-feniletoxi)clovan-9α-ol (**89**), sendo, os compostos **87-89**, inéditos. Destaca-se o composto **87**, que apresentou 100% de inibição frente ao crescimento do fungo *B. cinerea*.

Seis clovanofenilaminas, 2β-fenilaminoclovan-9α-ol (**96**), 2β-(*p*-metoxifenilamino)clovan-9α-ol (**97**), 2β-(*p*-nitrofenilamino)clovan-9α-ol (**98**), 2β-(*N*-metilanilina)clovan-9α-ol (**99**), 2β-[*o*-(*N*-metilamino)fenil]clovan-9α-ol (**100**) e 2β-[*p*-(*N*-metilamino)fenil]clovan-9α-ol (**101**), sendo, os compostos **98-101**, inéditos. Todas as clovanofenilaminas sintetizadas apresentaram 100% de inibição frente ao crescimento do fungo *B. cinerea*, indicando a eficiência desta classe de substâncias no combate a este fitopatógeno.

Uma clovanopirimidina inédita, 2β-(*N*-pirimidin)clovan-9α-ol (**102**) que apresentou uma inibição de 90,4 ± 1,9 % contra *B. cinerea*.

Três clovanofenilamidinas inéditas, *N*-(fenil)-*N'*-(9α-hidroxiclovan-2β-il)-benzamidina (**103**), *N*-(*p*-bromofenil)-*N'*-(9α-hidroxiclovan-2β-il)-benzamidina (**104**) e *N*-(*p*-nitrofenil)-*N'*-(9α-hidroxiclovan-2β-il)-benzamidina (**105**). Dentre as clovanofenilamidinas sintetizadas, a **103** apresentou 90,4 ± 2,5% de inibição frente ao fungo *B. cinerea*.

Três derivados cariolânicos inéditos, 1β-(*p*-metoxifenilamino)cariolan-9α-ol (**106**), 1β-(*p*-bromofenilamino)cariolan-9α-ol (**107**) e 2β-(*N*-pirimidin)cariolan-9α-ol (**108**). Todos fenilcariolanos apresentaram atividade de inibição frente ao *B. cinerea*, destacando-se o composto **107**, que inibiu 100% do crescimento fúngico.

Um clovanobenzamido, 2β-(*N*-benzamido)clovan-9α-ol (**113**) inédita, obtida mediante reação de Ritter, que inibiu 100% do fitopatógeno avaliado, *B. cinera*.

Todos os compostos sintetizados foram testados em relação à inibição do crescimento do fungo *P. crustosum*, afim de avaliar a especificidade dos derivados preparados. Apenas os derivados 1β-(*p*-bromofenilamino)cariolan-9α-ol (**107**) e 1β-(*p*-metoxifenilamino)cariolan-9α-ol (**106**) inibiram 100%

## *Conclusão*

---

do crescimento fúngico. Entre os demais derivados que apresentaram atividade, apenas a  $1\beta$ -(*p*-nitrofenilamino)clovan- $9\alpha$ -ol (**98**) inibiu mais de 50% do crescimento fúngico ( $64,1\pm 3,4$ ). Este resultado demonstrou a especificidade dos derivados preparados, principalmente das clovanofenilaminas, frente ao fitopatógeno *B. cinerea*, indicando a eficiência da metodologia de desenho biossintético de fungicidas na busca de inibidores fúngicos que possam diminuir os impactos negativos causado pelo uso de agrotóxicos utilizados atualmente para combater o crescimento deste fitopatógeno.

## CONCLUSÃO GERAL

A primeira parte deste trabalho consistiu no preparo e na análise de 120 processos de cultivo distintos, das quais foram selecionadas seis condições ótimas para produção de ácido kójico (**51**), dez processos que promoveram maior diversidade de metabólitos secundários e treze condições que levaram à modulação de metabólitos antimicrobianos a partir do fungo *A. parasiticus*. Os parâmetros escolhidos como variáveis neste trabalho (fonte de carbono, concentração de carboidrato, agitação e tempo de cultivo) promoveram a produção de diferentes metabólitos secundários para os diferentes cultivos realizados, evidenciando a importância da abordagem OSMAC. Entre os meios avaliados, destacaram-se o meio de cultivo LCS150 que na ausência de agitação e com 12 dias de fermentação (PAK02), proporcionou o melhor rendimento (65,4%) de ácido kójico a partir do extrato bruto analisado; o meio de cultivo YES, na ausência de agitação e 27 dias de fermentação (PMS09), que forneceu 21 metabólitos detectados por CLAE-DAD; e o meio LCG20, na ausência de agitação e 15 dias de cultivo (PMB06) que mostrou ser a condição mais adequada para a produção de metabólitos ativos contra *E. coli* ( $69,8 \pm 1,1\%$  de inibição). As treze condições de cultivo encontradas para modulação de metabólitos antimicrobianos forneceram extratos que apresentaram atividade biológica com IC<sub>40</sub> para pelo menos um dos micro-organismos testados.

A segunda parte deste trabalho consistiu na síntese de clovanos e cariolânicos baseada na metodologia de desenho bissintético de fungicidas. Foram sintetizadas quinze substâncias com esqueleto clovânico (quatro ariloxiclovanos, seis clovanofenilaminas, uma clovanoaminopirimidina, três clovanofenilamidinas e um clovanobenzamido) e três com esqueleto cariolânico, a partir do óxido de cariofileno. Dentre as substâncias preparadas, quinze são inéditas. Todas as substâncias preparadas foram testadas frente ao fungo *B. cinerea*. Destas, apenas duas não foram ativas na concentração avaliada ( $250 \mu\text{g L}^{-1}$ ), demonstrando a eficiência da metodologia empregada. Todas as clovanofenilaminas apresentaram inibição superior a 90 %. A fim de avaliar a especificidade de inibição frente a este fitopatógeno, realizaram-se ensaios antifúngicos com *Penicillium crustosum*. Apenas os derivados  $1\beta$ -(*p*-bromofenilamino)cariolan- $9\alpha$ -ol (**107**) e  $1\beta$ -(*p*-metoxifenilamino)cariolan- $9\alpha$ -ol (**106**) inibiram 100% do crescimento fúngico. Entre os demais derivados que apresentaram atividade, apenas a  $1\beta$ -(*p*-nitrofenilamino)clovan- $9\alpha$ -ol (**98**) inibiu mais de 50% do crescimento fúngico ( $64,1 \pm 3,4$ ). Este resultado demonstrou a especificidade dos derivados preparados, principalmente das clovanofenilaminas, frente ao fitopatógeno *B. cinerea*, indicando a eficiência da metodologia de desenho biossintético de fungicidas na busca de inibidores fúngicos que possam

## *Conclusão*

---

diminuir os impactos negativos causado pelo uso de agrotóxicos utilizados atualmente para combater o crescimento deste fitopatógeno.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, L.M., PHIPPS, R.K., PFENNING, L.H., GOTFREDSEN, C.H., TAKAHASHI, J.A., LARSEN, T.O. Cytosporines O, P and Q from an endophytic *Cytospora* sp. **Tetrahedron Letters**, v.51, p. 1803-1805, 2010.
- ACERO, F.J.F., CARBÚ, M., EL-AKHAL, M.R., GARRIDO, C., GONZÁLEZ, V.E.R., CANTORAL, J.M. Development of proteomics-based fungicides: new strategies for environmentally friendly control of fungal plant diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v.12, p. 795-816, 2011.
- ACOURENE, S., AMMOUCHE, A. Optimization of ethanol, citric acid, and  $\alpha$ -amylase production from date wastes by strains of *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger*, and *Candida guilliermondii*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.39, p. 759-766, 2012.
- ADRIAN, M., JEANDET, P., VENEAU, J., WESTON, L.A., BESSIS, R. Biological activity of resveratrol, a stilbenic compound from grapevines, against *Botrytis cinerea*, the causal agent for gray mold. **Journal Chemical Ecology**, v.23, p. 1689-1702, 1997.
- ALEU, J., GALÁN, R.H., HANSON, J.R., HITCHCOCK, P.B., COLLADO, I.G. Biotransformation of the fungistatic sesquiterpenoid ginsenoside by *Botrytis cinerea*. **Journal Chemical Society**, v.1, p. 727-730, 1999.
- ALEXOPOULOS, C.J., MIMS C.W., BLACKWELL M. **Introductory Mycology**. 4 ed. **John Wiley & Son**, New York, 1996. 869 p.
- ALVES, O.L. A química brasileira mostrando a sua cara. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.17, n. 2, 2006.
- AMSELEM, J., CUOMO, C.A., VAN, K.J.A.L., VIAUD, M., BENITO, E.P. Genomic analysis of the necrotrophic fungal pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. **Plos Genetic**, v.1, p. 1-3, 2011.
- ANUPAMA, B., DINDA, S.C., PRASAD, Y.R., RAO, A.V. Synthesis and antimicrobial activity of some new e,4,6-trisubstituted pyrimidines. **International Journal of Research in Pharmacy and Chemistry**, v.2, p. 231-236, 2012.
- ARNAUD, M.B., CERQUEIRA, G.C., INGLIS, D.O., SKRZYPEK, M.S., BINDLEY, J., CHIBUCOS, M.C., CRABTREE, J., HOWARTH, C., ORVIS, J., SHAH, P., WYMORE, F., BINKLEY, G., MIYASATO, S.R., SIMISON, M., SHERLOCK, G., WORTMAN, R. The *Aspergillus* genome database (AspGD): recent developments in comprehensive multispecies curation, comparative genomics and community resources. **Nucleic Acids Research**, v.40, p. 653-659, 2012.
- ASAI, T., CHUNG, Y.M., SAKURAI, H., OZEKI, T., CHANG, F.R., YAMASHITA, K., OSHIMA, Y. Tenuipyronone, a novel skeletal polyketide from the entomopathogenic fungus, *Isaria tenuipes*, cultivated in the presence of epigenetic modifiers. **Organic Letters**, v.14, p. 513-515, 2012.

- AWAAD, A.S., NABILAH, A.J.A., ZAIN, M.E. New antifungal compounds from *Aspergillus terreus* isolated from desert soil. **Phytotherapy research**, v.26, p. 1872-1877, 2012.
- BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v.32, p. 326-337, 2009.
- BARRET, M.C., MAHON, M.F., MOLLOY, K.C., STEED, J. W., WRINGHT, P. Synthesis and Structural Characterization of Tin (II) and Zinc (II) Derivatives of Cyclic  $\alpha$ -Hydroxyketones, Including the Structures of Sn(maltol)<sub>2</sub>, Sn(tropolone)<sub>2</sub>, and Zn(hinokitiol)<sub>2</sub>. **Inorganic Chemistry**, v.40, p. 4384-4388, 2001.
- BAYARAM, Z., BRAUS, G. Coordination of secondary metabolism and development in fungi: the velvet Family of regulatory protein. **Federation of European Microbiological Societies Reviews**, v.36, p. 1-24, 2012.
- BENTLEY, R. From miso, sake and shoyu to cosmetics: a century of science for kojic acid. **Natural Product Reports**, v.23, p. 1046-1062, 2006.
- BERGOLD, A.M. E GEORGIADIS, S. Novidades em fármacos antifúngicos: uma revisão. **Visão Acadêmica** v.5, p. 159-172, 2004.
- BIEMANN, K. Spectral data for structure determination of organic compounds. **Springer Verlag** Berlin Heidelberg, 2<sup>nd</sup> edition, 1998, 415 p.
- BILLS, G.F., PLATAS, G., FILLOLA, A., JIMENEZ, M.R., COLLADO, J., VICENTE, F., MARTIN, J., GONZALEZ, A., BUR-ZIMMERMANN, J., TORMO, J.R., PELAEZ, F. Enhancement of antibiotic and secondary metabolite detection from filamentous fungi by growth on nutritional arrays. **Journal of Applied Microbiology**, v.104, p. 1644-1658, 2008.
- BJORN, H., BETHE, B., ZEECK, A. Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity. **Chembiochem: a European Journal of Chemical Biology**, v.3, p. 619-627, 2002.
- BLACKWELL, M. The Fungi: 1,2,3 ... 5.1 Million Species?. **American Journal of Botany**, v.98, p. 426-438, 2011.
- BODE, H.B., BETHE, B., HOFES, R. ZEECK, A. Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity. **Chembiochem: a European Journal of Chemical Biology**, v.3, p. 619-27, 2002.
- BOK, J.W., HOFFMEISTER, D., MAGGIO-HALL, S.A., MUILLO, R., GLASNER, J.D., KELLER, N.P. Genomic Mining for *Aspergillus* Natural Products. **Chemistry & Biology**, v.13, p. 31-37, 2006.
- BRACARENSE, A. A.P. Isolamento, preparo de derivados e bioprospecção da atividade biológica de metabólitos de fungos filamentosos. Dissertação de mestrado, **UFMG**, 2008.
- BRAKHAGE, A.A. Regulation of fungal secondary metabolism. **Nature Reviews Microbiology**, v.11, p. 21-32, 2013.
- BURKE, S. Analysis of Variance. LC.GC Europe Online Supplement. **Statistics and analysis**, p. 9-12, 1997.

- BUTLER, M.S. Natural products to drugs: natural product derive compounds in clinical trials. **Natural Product Reports**, v.22, p. 162-195, 2005.
- CACHIBA, T.H., CARVALHO, C.G.P., DIAS, A.L.T. Síntese e avaliação preliminar da atividade antibacteriana e antifúngica de derivados *N*-acilidrazônicos. **Química Nova**, v.35, p. 1566-1569, 2012.
- CARLILE, M. J., WATKINSON, S. C., GOODAY, G. W. The fungi. 2 ed. **Elsevier Academic Press**, London, England, 588 p., 2004.
- CHENG, X., HARZDORF, N., KHAING, Z., KANG, D., CAMELIO, A.M., SHAW, T., SCHMIDT, C.E., SIEGEL, D. Neuronal growth promoting sesquiterpene-neolignans; syntheses and biological studies. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v.10, p. 383-393, 2012.
- CHIANG, Y.M., SZEWCZYK, E., DAVIDSON, A.D., ENTWISTLE, R., KELLER, N., WANG, C.C.C., OAKLEY, B.R.. Genetic characterization of the monodictyphenone gene cluster in *Aspergillus nidulans*. **Environmental Microbiology**, v.76, p. 2067-2074, 2010.
- COLLADO, I.G., HANSON, J.R., SÁNCHEZ, J.M. The cleavage of caryophyllene oxide catalyzed by tetracyanoethylene. **Tetrahedrom**, v.52, p. 7961-7972, 1996.
- COLADO, IG, HANSON, J.R., HITCHCOCK, P.B., SÁNCHEZ, A.J.M. Stereochemistry of epoxidation of some caryophyllenols. **Journal Organic Chemistry**, v.62, p. 1965-1969, 1997.
- COLLADO, I.G., HANSON, J.R., SÁNCHEZ, A.J.M., MOBBS, D. The biotransformation of some clovanes by *Botrytis cinerea*. **Journal of Natural Products**, v.61, p. 1348-1351, 1998.
- COLLADO, I.G., SÁNCHEZ, A.J.M., HANSON, J.R. Fungal terpene metabolites: biosynthetic relationships and the controlo of the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. **Natural Product Reports**, v.24, p. 674-686, 2007.
- COLLADO, I.G. **Isidro González Collado research group**. Disponível em <<http://www.isidrocollado.es/>>. Acesso em 6 set. 2013.
- COPPING, I.G., HEWITT, H.G. Chemistry and mode of action of crop protection agentes. **The Royal Society of Chemistry**, Cambridge, UK, p. 74-113, 1998.
- DANIEL, W.W. Biostatistic: a foundation for analysis in the health sciences. 7 ed. **Jonh Wiley and Sons**, New York, 1999. 907 p.
- DEIGHTON, N., MUCKENSCHNABEL, I., COLMENARES, A.J., COLLADO, I.G., WILLAMSON, B. Botrydial is produced in plant tissues infected by *Botrytis cinerea*. **Phytochemistry**, v.57, p. 689-692, 2001.
- DELIGEORGOPOULOU, A., SÁNCHEZ, A.J.M., MOBBS, D.J., HITCHCOCK, P.B., HANSON, J.R., COLLADO, I.G. Structure-activity relationships in the fungistatic activit against *Botrytis cinerea* of clovanes modified on ring C. **Journal Natural Product**, v.67, p. 893-798, 2004.
- DEMAIN, A.L. Microbial biotechnology. **Trendes in Biotechnol**, v.18, p. 26-31, 2000.



- DEMAIN, A.L., VAISHNAV, P. Natural products for cancer chemotherapy. **Microbial Biotechnology**, v.4, n.6, p. 687-689, 2011.
- DESSET, S.L., READER, S.W., HAMILTON, D.J.C. Aqueous-biphasic hydroformylation of alkenes promoted by “weak” surfactants. **Green Chemistry**, v.11, p. 630-637, 2009
- DEWICK, P. M. Medicinal natural products: A Biosynthetic Approach. 3 ed. **John Wiley & Sons**, New York, 2011, 550 p.
- DIAZ, P., IBÁÑEZ, E., SEÑORÁNS, F.J. E REGLERO, G. Truffle aroma characterization by headspace solid-phase microextraction. **Journal of Chromatography A**, v.1017, p. 207-214, 2003.
- DRIOUCH, H., ROTH, A., DERSCH, P., WITTMANN, C. Optimized bioprocess for production of fructoranosidase by recombinant *Aspergillus niger*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.87, p. 2001-2024, 2010.
- EDELMANN, F.T. Lanthanide amidinates and guanidinates in catalysts and materials science: a continuing success story. **Chemical Society Reviews**, v.41, p. 7657-7672, 2012.
- EL-AASAR, S.A. Cultural Conditions Studies on Kojic Acid Production by *Aspergillus parasiticus*. **International Journal of Agriculture & Biology**, v.8, p. 468-473, 2006.
- ELAD, Y., WILLIAMSON, B., TUDZYNSKI, P., DELEN, N. *Botrytis*: biology, pathology and control. **Kluwer academic**, Dordrecht: The Netherlands, 2004. 404p.
- ELAD, Y., ZIMAND, G., ZAQUS, Y., ZURIEL, S., CHET, I. Use of *Trichoderma harzianum* in combination or alternation with fungicides to control cucumber grey mould (*Botrytis cinerea*) under comercial greenhouse conditions. **Plant Pathology**, v.42, p. 324-332, 2007.
- EPA. Europe´s Network of Patent Databases. European Patent Office. **Worldwide Patent**. Disponível em: <[www.espacenet.com](http://www.espacenet.com)>. Acesso em 25 ago. 2013.
- ESPEL, E.A., TILBURN, J., ARST, H.N. E PEHALVAL, M.A. pH regulation is a major determinant in expression of a fungal penicillin biosynthetic gene. **The EMBO Journal**, v.12, p. 3947-3956, 1993.
- EYONG, K.O., AMBASSA, P., YIMDJO, M.C., SIDJUI, L.S., FOLEFOG, G.N. A new source of kojic acid isolated from *Kigelia africana*: A possible precursor for quinone biosynthesis. **Rasāyan Journal of Chemistry**, v.5, n.4, p. 493-503, 2012.
- FAO (Food and Agriculture Organization). FAO e OCDE preveem alta mais lenta da produção agrícola mundial. Brasil, 6 jun. 2013. Reportagem publicada no **Globo Rural, Agronegócios**. Disponível em: <<http://g1.globo.com/economia/agronegocios/noticia/2013/06/fao-e-ocde-preveem-alta-mais-lenta-da-producao-agricola-mundial.html>>. Acesso em: 3 set. 2013.
- FEHLHABER, H.W., GEIPEL, R., MERCKER, H.J., TSCHESCHE, R., WELMAR, K., SHONBECK, F. Botrydial, ein sesquiterpen - Antibiotikum aus der nahrlosung des pilzes *Botrytis cinerea*. **European Journal Inorganic Chemistry**, v.107, n.5, p. 1720-1739, 1974.

- FERREIRA, I.P., LIMA, G.M., PANIAGO, E.B., ROCHA, W.R., TAKAHASHI, J.A., PINHEIRO, C.B., ARDISSON, J.D. Design, structural and spectroscopic elucidation, and the in vitro biological activities of new diorganotin dithiocarbamates. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.58, p. 493-503, 2012.
- FERREIRA, N.R., SARQUIS, M.I., ALVES, C.N., SANTOS, A.S. Biotransformation of sucrose into 5-hydroxy-2-hydroxymethyl- $\gamma$ -pirone by *Aspergillus flavus*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.82, p. 569-576, 2010.
- FILHO, G.P., PEDROSO, E.R.P., GIANNETTI, A.V. E DARWICH, R. Aspergilose cerebral em paciente imunocompetente. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v.63, p. 1094-1098, 2005.
- FRANCO, J.P., LLOMPART, M.G., GÁLVEZ, J., DOMENECH, R.G. Application of molecular topology for the prediction of reaction yields and anti-inflammatory activity of heterocyclic amidine derivatives. **Molecular Sciences**, v.12, p. 1281-1292, 2011.
- GAMS, W., HOEDSTRA, E.S., APTROOT, A. CBS Course of Mycology. 4 ed. **Centraalbureau voor Schimmelcultures**, Netherlands, 1998. 165 p.
- GOSWAMI, S., VIDYARTHI, A.S., BHUNIA, B., MANDAL, T. A review on lovastatin and its production. **Journal of Biochemistry Technology**, v.4, n. 1, p. 581-587, 2012.
- GROSS, H. Strategies to unravel the function of orphan biosynthesis pathways: recent examples and future prospects. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.75, p. 267-277, 2007.
- GUILE, S.D., ALCARAZ, L., BIRKINSHAW, T.N., BOWERS, K.C., EBDEN, M.R., FURBER, M., STOCKS, M.J. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.52, p. 3123-3141, 2009.
- GUIMARÃES, D.O., MOMESSO, L.S. E PUPO, M.T. Antibióticos: importância e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v.33, p. 667-679, 2010.
- HARVEY, A. L. Natural products as a screening resource. **Current Opinion in Chemical Biology**, v.11, p. 480-484, 2007.
- HEDAYATI, M.T., PASQUALOTTO, A.C., WARN, P.A., BOWYER, P., DENNING, D.W. *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. **Microbiology**, v.153, p. 1677-1692, 2007.
- HEYMANN, H., TEZUKA, Y., KIKUCHI, T., SUPRIYATNA, S. Constituents of *Sindora sumatrana* MIQ. II. Five new sesquiterpenoids from the dried pods. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v.42, p. 941-946, 1994.
- HORNSEY, I. The Chemistry and Biology of Winemaking. Cambridge, UK: **RSC Publishing**, 2007. 316 p.
- HOU, J., GAO, J.N., FENG, J., MA, Z., ZHANG, X. Sensitivity of *Botrytis cinerea* to propamidine: in vitro determination of baseline sensitivity and the risk of resistance. **European Journal of Plant Pathology**, v.128, p. 261-267, 2010.
- <<http://www.ufpi.br/lapnex/materias/index/mostrar/id/5651>>. Acesso em: 3 set. 2013.

- HUTER, O.F. Use of natural products in the crop protection industry. **Phytochemistry Reviews**, v.10, p. 185-194, 2011.
- IMHOFF, J.F., LABES, A., WIESE, J. Bio-mining the microbial treasures of the ocean: New natural products Bio-mining the microbial treasures of the ocean: New natural products. **Biotechnology Advances**, v.29, p. 468-482, 2011.
- JIA, Z., ZHANG, X., CAO, X. Effects of carbon sources on fungal morphology and lovastatin biosynthesis by submerged cultivation of *Aspergillus terreus*. **Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering**, v. 4, p. 672-677, 2009.
- KARDOS, N., DEMAIN, A.L. Penicillin: the medicine with the greatest impact on therapeutic outcomes. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 92, p. 677-687, 2011.
- KE, S., LIU, F., WANG, N., YANG, Q., QIAN, X. 1,3,4-Oxadiazoline derivatives as novel potential inhibitors targeting chitin biosynthesis: Design, synthesis and biological evaluation. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.19, p. 332-335, 2009.
- KHARCHENKO, S.M.; KUTS, N.V. Biosynthesis of kojic acid by strains of *Aspergillus flavus* Link isolated from forage. **Mikrobiologichnii Zhurnal**, v.61, p. 15-21, 1999.
- KIM, S.W., HWANG, H.J., XU, C.P., CHOI, J.W., YUN, J.W. Effect of aeration and agitation on the production of mycelia biomass and exopolysaccharides in an entomopathogenic fungus *Paecilomyces sinclairii*. **Letters in Applied Microbiology**, v.36, p. 321-326, 2003.
- KLICH, M.A. Identification of Common *Aspergillus* Species. 1 ed. **Centraalbureau voor Schimmelcultures**, Utrecht, 2002, 122 p.
- KLICH, M.A. Identification of clinically relevant aspergilli. **Medical Mycology**, v.44, p. S127-S131, 2006.
- KNIGHT, S.C., ANTHONY, V.M., BRADY, A.M., GREENLAND, A.J., HEANEY, S.P., MURRAY, D.C., POWELL, K.A., SCHULZ, M.A., SPINKS, C.A., WORTHINGTON, P.A., YOULE, D. Rationale and perspectives on the development of fungicides. **Annual Review of Phytopathology**, v.35, p. 349-372, 1997.
- LAM, K.S. New aspects of natural products in drug discovery. **Trends in Microbiology**, v.5, p. 279-289, 2007.
- LANNA, E.J.L., CARAZZA, F., TAKAHASHI, J.A. Antibacterial evaluation of some new 2-aryl-3,5-dimethoxy-1,4-benzoquinone derivatives. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** v.54, p. 2053-2056, 2006.
- LAURENT, F., STANICKI, D., HUANG, T.L., DEI-CAS, E., POTTIER, M., ALIOUAT, E.M., EYNDE, J.J.V. Bisbenzamidines as antifungal agents. Are both amidine functions required to observe an anti-*pneumocystis carinii* activity? **Molecules**, v.15, p. 4283-4293, 2010.
- LEROUX, P. Recent developments in the mode of action of fungicides. **Pesticide science**, v.47, p. 191-197, 1996.

- LI, A., PFELZER, N., ZUIJDERWIJK, R., BRICKWEDDE, ZEIJL, A., C.V., PUNT, P. Reduced by-product formation and modified oxygen availability improve itaconic acid production in *Aspergillus niger*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.97, p. 3901-3911, 2013.
- LIN, M.T., MAHAJAN, J.R., DANESE, J.C., TAKATSU, A. High Production of Kojic Acid Crystals by *Aspergillus parasiticus* UNBF A12 in Liquid Medium. **Journal Applied and Environmental Microbiology**, v.32, p. 298-299, 1976.
- LIN, Z.J., ZHU, T.J., CHEN, L., GU, Q.Q. Three new aspochalasin derivatives from the marine-derived fungus *Spicaria elegans*. **Chinese Chemical Letters**, v.21, p. 824-826, 2010.
- LUCAS, E.M.F., CASTRO, M.C.M., TAKAHASHI, J.A. Antimicrobial properties of sclerotiorin, isochromphilone VI and pencolide metabolites from a Brazilian cerrado isolate of *Penicillium sclerotiorum* Van Beyma. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, p. 785-789, 2007.
- MACHIDA, M., GOMI, K. *Aspergillus: Molecular Biology and Genomics*. **Caister Academic Press**, Norfolk, UK, 2010, 238 p.
- MANCILLA, G., RÍOS, M.F., SÁNCHEZ, A.J.M., COLLADO, I.G. Sn(OTf)<sub>2</sub> catalysed regioselective styrene oxide ring opening with aromatic amines. **Tetrahedron**, v.64, p. 11732-11737, 2008.
- MATHAN, S., SUBRAMANIAN, V., NAGAMONY, S. Optimization and antimicrobial metabolite production from endophytic fungi *Aspergillus terreus* KC 582297. **European Journal of Experimental Biology**, v.3, p. 138-144, 2013.
- MISHIMA, Y. New Era of Cell Re-Discovery Led to the Control of Melanogenesis: Melanoma: A Scientific Journey into *Terra Incognita*. **Pigment Cell Research**, v.14, p. 47-70, 2001.
- MOHAMAD, R., MOHAMED, M.S., SUHAILI, N., SALLEH, M.M., ARIFF, A.B. Kojic acid: Applications and development of fermentation process for production. **Biotechnology and Molecular Biology Reviews**, v.5, p. 24-37, 2010.
- NETO, B.B., SCARMINIO, I.S., BRUNS, R.E. 25 Anos de Quimiometria no Brasil. **Química Nova**, v.29, p. 1401-1406, 2006.
- NEWMAN, D.J., CRAGG, G.M. Natural Products of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v.75, p. 311-335, 2012.
- NUÑEZ, Y.O., SALABARRIA, I.S., COLLADO, I.G., GALAÑ, R.H. The antifungal activity of widdrol and its biotransformation by *Colletotrichum gloeosporioides* (penz.) Penz. & Sacc. and *Botrytis cinerea* Pers.: Fr. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v.54, p. 7517-7521, 2006.
- PAN, K., SCOTT, M.K., LEE, D.H.S., FITZPATRICK, L.J., CROOKE, J.J., RIVERO, R.A., ROSENTHAL, D.I., VAIDYA, A.H., ZHAO, B., REITZ, A.B. 2,3-diaryl-5-anilino[1,2,4]thiadiazoles as melanocortin MC4 receptor agonists and their effects on feeding behavior in rats. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.11, p. 185-192, 2003.

- PATRÓN, R.D., CANTORAL, J.M., GALÁN, R.H., HANSON J.R., COLLADO I.G. The biodegradation of the phytotoxic metabolite botrydial by its parent organism. **Journal of Chemical Research**, v.2004, p. 441-443, 2004.
- PHAN, L., CHIU, D., HELDEBRANT, D.J., HUTTENHOWER, H., JOHN, E., LI, X., POLLET, P., WANG, R., ECKERT, C.A., LIOTTA, C.L., JESSOP, P.G. Switchable solvents consisting of amidine/alcohol or guanidine/alcohol mixtures. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v.47, p. 539-545, 2008.
- PIMENTA, E.F., MARQUES, A.M.V., TININIS, A., SELEGHIM, M.H.R., SETTE, L.D., VELOSO, K., FERREIRA, A.G., WILLIAMS, D.E., PATRICK, B.O., DALISAY, D.S., ANDERSEN, R.J., BERLINCK, R.G. Use of experimental design for the optimization of the production of new secondary metabolites by two *Penicillium* species. **Journal Natural Product**, v.73, p. 1821-1832, 2010.
- PITT, J.I. A laboratory guide to common *Penicillium* species. 3 ed. **Food Science**, Australia, 2000, 187 p.
- PORTO, M.F., SOARES, W.L. Modelo de desenvolvimento, agrotóxicos e saúde: um panorama da realidade agrícola brasileira e propostas para uma agenda de pesquisa inovadora. **Revista Brasileira de Saúde Ocupacional**, v.37, p. 17-50, 2012.
- PRASAD, P., CHAUHAN, K., KANDARI, L.S., MAIKHURI, R.K., ADITYA PUROHIT, R.P., BHATT E RAO, K.S. *Morchella esculenta* (Guchhi): Need for scientific intervention for its cultivation in Central Himalaya. **Current Science**, v.82, p. 1098-1100, 2002.
- PRASAD, K.S., KUMAR, L.S., SHEKAR, S.C., PRASAD, M., REVANASIDDAPPA, H.D. Oxovanadium complexes with bidentate N, O ligands: Synthesis, Characterization, DNA Binding, nuclease activity and antimicrobial studies. **Chemical Sciences Journal**, v.12, p. 1-10, 2011.
- Chemical Sciences Journal, Volume 2011: CSJ-12
- PUPO, M.T., GALLO, M.B.C., VIEIRA, P.C. Biologia Química: Uma estratégia moderna para a pesquisa em produtos naturais. **Química Nova**, v.30, p. 1446-1455, 2007.
- RACERO, J.C., COLLADO, I.G., MACÍAS, A.J. Síntesis de sesquiterpenos isocariolánicos con potencial actividad antifúngica frente a *Botrytis cinérea*. **Revista de la Sociedad Química de México**, v.48, p. 58-66, 2004.
- RAKU, T., TOKIWA, Y. Regioselective synthesis of kojic acid esters by *Bacillus subtilis* protease. **Biotechnology Letters** v.25, p. 969-974, 2003.
- RAMOS, H.P., SAID, S. Modulation of biological activities produced by an endophytic fungus under different culture conditions. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 2, p. 443-449, 2011.
- RATEB, M.E., EBEL, R. Secondary metabolites of fungi from marine habitats. **Natural Product Reports**, v.28, p. 290-344, 2011.

- REINO, J.L., GALÁN, R.H., PATRÓN, R.D., COLLADO, I.G. Virulence-Toxin production relationship in isolates of the plant pathogenic fungus *Botrytis cinerea*. **Journal of Phytopathology**, v.152, p. 563-566, 2004.
- RODRIGUES, M.I. E LEMMA, A.F. Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos. 2 ed, **Cárta Editora**, São Paulo, 2009. 358 p.
- ROEHR, M., KUBICEK, C.P., ZEHENTGRUBER, O. E ORTHOFOR, R. Accumulation and partial reconsumption of polyols during citric acid fermentation by *A. niger*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.27, p. 235-239, 1987.
- ROSFARIZAN, M. E ARIFF, A.B. Kinetics of kojic acid fermentation by *Aspergillus flavus* link S44-1 using sucrose as a carbon source under different pH conditions. **Chemistry and Materials Science**, v.11, p. 72-79, 2008.
- SAIZ-URRA, L., RACERO, J.C., SÁNCHEZ, A.J.M., GALÁN, R.H., HANSON, J.R., GONZALEZ, M.P., COLLADO, I.G. Synthesis and quantitative structure-antifungal activity relationships of clovane derivatives against *Botrytis cinerea*. **Journal of Agricultural and food chemistry**, v.57, p. 2420-2428, 2009.
- SAMSON, R.A., PETERSON, S.W., FRISVAD, J.C., VARGAS, J. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Fumigati* and its teleomorph *Neosartory*. **Studies in Mycology**, v.59, p. 147-203, 2007.
- SÁNCHEZ, A.J.M., AMIGO, C.F.D., COLLADO, I.G. Tin triflate catalysed selective synthesis of *N,N'*-Unsymmetrically substituted *N*-(Hydroxyclovanil)-*N'*-aryl acetamidines. **Synlett**, v.13, p. 1989-1992, 2003.
- SANFELICE, A.M. E TRUITI, M.C.T. Produtos em filme – Inovação na tecnologia de cosméticos. **Acta Scientiarum Health Sciences**, v.32, p. 61-66, 2010.
- SCHEFFER, R.P. Toxins as chemical determinants of plant disease. Toxins and plant pathogenesis. **Academic Press**, New York, p. 1-40, 1983.
- SCHUBLER, A., SCHWARZOTT E WALKER, C. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. **Mycological Research**, v. 105, p. 1413-1421, 2001.
- SCHURMANN, B.T.M., TAKAHASHI, J.A. Austin, dehydroaustin and metabolites from *Penicillium brasilianum*. **Química Nova**, v.33, p. 1044-1046, 2010.
- SHU, C.H. Fungal Fermentation for Medicinal Products. In: Yang, S.T. (Ed.). *Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable*. 1 ed. **Elsevier's Science e Technology publishing**, United States, 2007, 685 p.
- SILVA, M.R., CAMPOS, A.C.E., BOHM, F.Z. Agrotóxicos e seus impactos sobre ecossistemas aquáticos continentais. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, v. 8, p. 46-58, 2013.
- SILVERSTEIN, R.M., WEBSTER, F.X., KIEMLE, D.J. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 7 ed. **LTC - Livros Técnicos e Científicos Editora Ltda.**, Rio de Janeiro, 2006. 490 p.

- SINGH, U.P., BHAT, H.R., GAHTORI, P. Antifungal activity, SAR and physicochemical correlation of some thiazole-1,3,5-triazine derivatives. **Journal de Mycologie Médicale**, v.22, p. 134-141, 2012.
- SOARES, J.F. E SIQUEIRA, A.L. Introdução à Estatística Médica. 2 ed Belo Horizonte, **Coopmed**, 2002, 330 p.
- SOCCOL, C., VANDENBERGHE, L.P.S., RODRIGUES, C., PANDEY, A. New perspectives for citric acid production and application. **Food Technol. Biotechnol**, v.44, p. 141-149, 2006.
- SOUZA, G.G., OLIVEIRA, T.S., TAKAHASHI, J.A., COLLADO, I.G., SÁNCHEZ, A.J.M., GALÁN, R.H. Biotransformation of clovane derivatives. Whole cell fungi mediated domino synthesis of rumphellclovane A. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v.10, p.3315-3320, 2012.
- STAATS, M., VAN, P.B., VAN, J.A.L.K. Molecular phylogeny of the plant pathogenic genus *Botrytis* and the evolution of host specificity. **Molecular Biology and Evolution**, v.22, p. 333-346, 2005.
- STANICKI, D., POTTIER, M., GANTOIS, N., PINÇON, C. FORGE, D., MAHIEU, I., BOUTRY, S., EYNDE, J.J.V., MARTINEZ, A., DEI-CAS, E., ALIOUAT, E.M. Diamidenes *versus* monoamidines as anti-pneumocystis agentes: an in vivo study. **Pharmaceuticals**, v.6, p.837-850, 2013.
- STIERLE, D.B., STIERLE, A.A., BUGNI, T. Sequoiamonascins A-D: Novel anticancer metabolites isolated from a Redwood Endophyte. **Journal Organic Chemistry**, v. 68, p. 4966-4969, 2003.
- SUN, L., WU, J., ZHANG, L., LUO, M., SUN, D. Synthesis and antifungal activities of some novel pyrimidine derivatives. **Molecules**, V.16, p. 5618-5628, 2011.
- SUNAZUKA, T., HIROSE, T. ÔMURA, S. Efficient total synthesis of novel bioactive microbial metabolites. **Accounts Chemical Research**, v.41, p. 302-314, 2008.
- SZCZEPANKIEWICZ, W., WAGNER, P., DANICKI, M., SKI, J.S. Transformation of 5,5-diaryl-4,5-dihydro-1,2,4-oxadiazoles to 4-arylquinazolines. **Tetrahedron Letters**, v.44, p. 2015-2017, 2003.
- TAKAHASHI, J.A., LUCAS, E.M.F. Ocorrência e diversidade estrutural de metabólitos fúngicos com atividade antibiótica, **Química Nova**, v.31, p. 1807-1813, 2008.
- TAKAHASHI, J.A., CASTRO, M.C.M., SOUZA, G.G., LUCAS, E.M.F., BRACARENSE, A.A.P., ABREU, L.M., MARRIEL, I.E., OLIVEIRA, M.S., FLOREANO, M.B., OLIVEIRA, T.S. Isolation and screening of fungal species isolated from Brazilian cerrado soil for antibacterial activity against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus pyogenes* and *Listeria monocytogenes*. **Journal de Mycologie Médicale**, v.18, p. 198-204, 2008.
- TAKAHASHI, J.A., TELES, A.P.C., BRACARENSE, A. A. P., GOMES, D.C. Classical and epigenetic approaches to metabolite diversification in filamentous fungi. **Phytochemistry Reviews**, 2013. DOI 10.1007/s11101-013-9305-5.
- TOFOLI, J.G., FERRARI, J.T., DOMINGUES, R.J., NOGUEIRA, E.M.C. Mofocinza em plantas oleráceas, frutíferas e ornamentais. **Artigo em Hypertexto**, 2011. Disponível em: <[http://www.infobibos.com/Artigos/2011\\_2/Mofocinza/index.htm](http://www.infobibos.com/Artigos/2011_2/Mofocinza/index.htm)>. Acesso em 16 maio 2013.

- TSUI, W.Y., BROWN, G.D. Sesquiterpenes from *Baekkea frutescens*. **Journal Natural Product**, v.59, p. 1084-1086, 1996.
- TURBYVILLE, T.J., WIJERATNE, E.M.K., WHITESELL, L. Stress response pathways acid A is associated with modulation of multiple the anticancer activity of the fungal metabolite terrecyclic. **Molecular Cancer Therapeutics**, v.4, p. 1569-1576, 2005.
- VEIGA, M.M. Agrotóxicos: eficiência econômica e injustiça socioambiental. **Ciência saúde coletiva**, v.12, p. 145-152, 2007.
- VIEIRA, S. Análise de Variância. **Editora AtlasSA**, São Paulo, 2006. 204 p.
- WAN, H.M., CHEN, C.C., GIRIDHAR, R., CHANG, T.S., WU, W.T. Repeated-batch production of kojic acid in cell-retention fermenter using *Aspergillus oryzae* M3B9. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**, v.32, p. 227-233, 2005.
- WANG, Q.X., BAO, L., YANG, X.L., GUO, H., REN, B., GUO, L.D., SONG, F.H., WANG, W.Z., LIU, H.W., ZHANG, L.X. Tricycloalternarenes F-H: Three new mixed terpenoids produced by an endolichenic fungus *Ulocladium sp.* using OSMAC method. **Fitoterapia**, v.85, p. 8-13, 2013.
- WEI, C.I., HUANG, T.S., FERNANDO, S.Y., CHUNG, D.T. Mutagenicity studies of kojic acid. **Toxicology Letters**, v. 59, p. 213-220, 1991.
- WU, Q.X., CREWS, M.S., DRASKOVIC, M., SOHN, J., JOHNSON, T.A., TENNEY, K., VALERIOTE, F.A., YAO, X.J., BJELDANES, L.F., CREWS, P. Azonazine, a novel dipeptide from a Hawaiian marine sediment-derived fungus, *Aspergillus insulicola*. **Organic Letters**, v. 12, p. 4458-4461, 2010.
- YANG, F., HUANG, H. E YANG, M. The influence of environmental conditions on the mycelia growth of *Antrodia cinnamomea* in submerged cultures. **Enzyme and Microbial Technolgy**, v.33, p. 395-402, 2003.
- YAROVAYA, O.I., KORCHAGINA, D.V., RYBALOVA, T.V., YU, V., GATILOV, V., POLOVINKA, M.P., BARKHASH, V.A. Reactions of caryophyllene, isocaryophyllene, and their epoxy derivatives with acetonitrile under Ritter reaction conditions. **Russian Journal of Organic Chemistry**, v.40, p. 1593-1598, 2004.

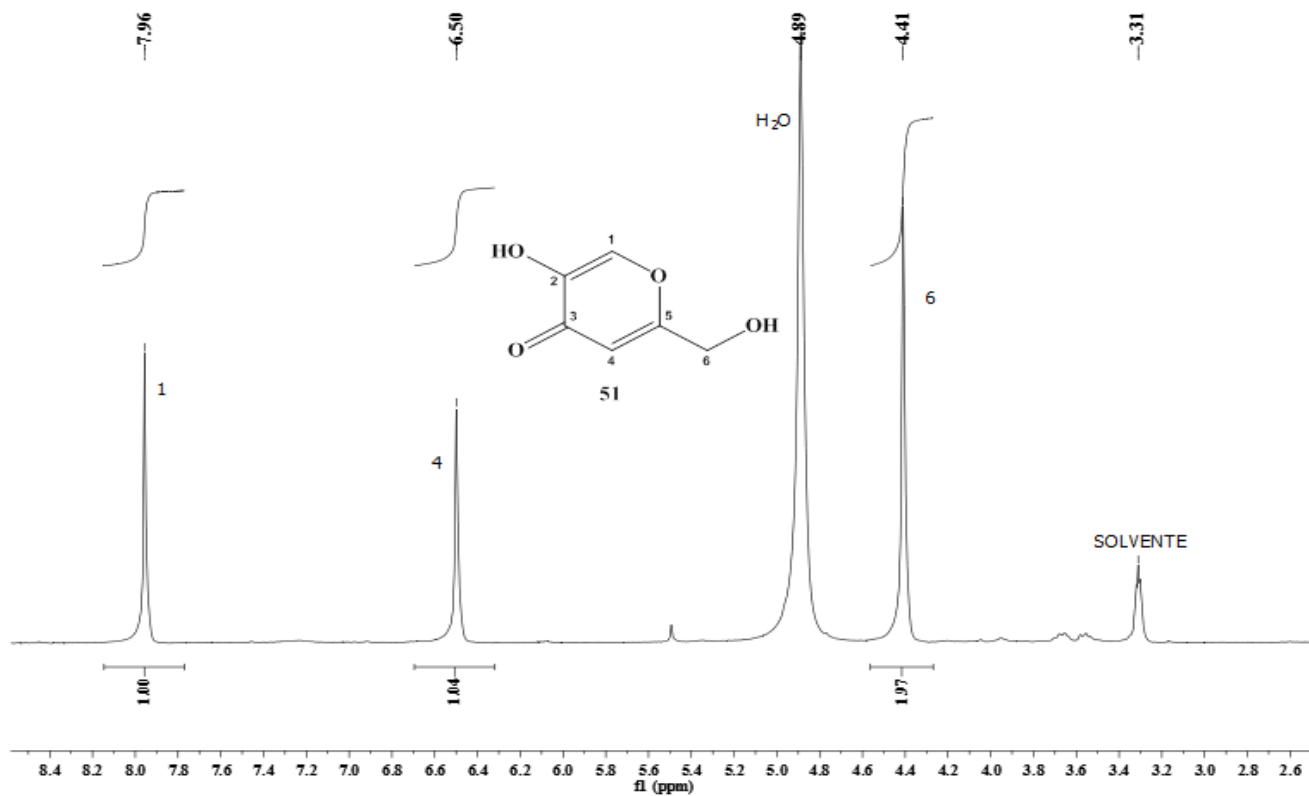




APÊNDICES

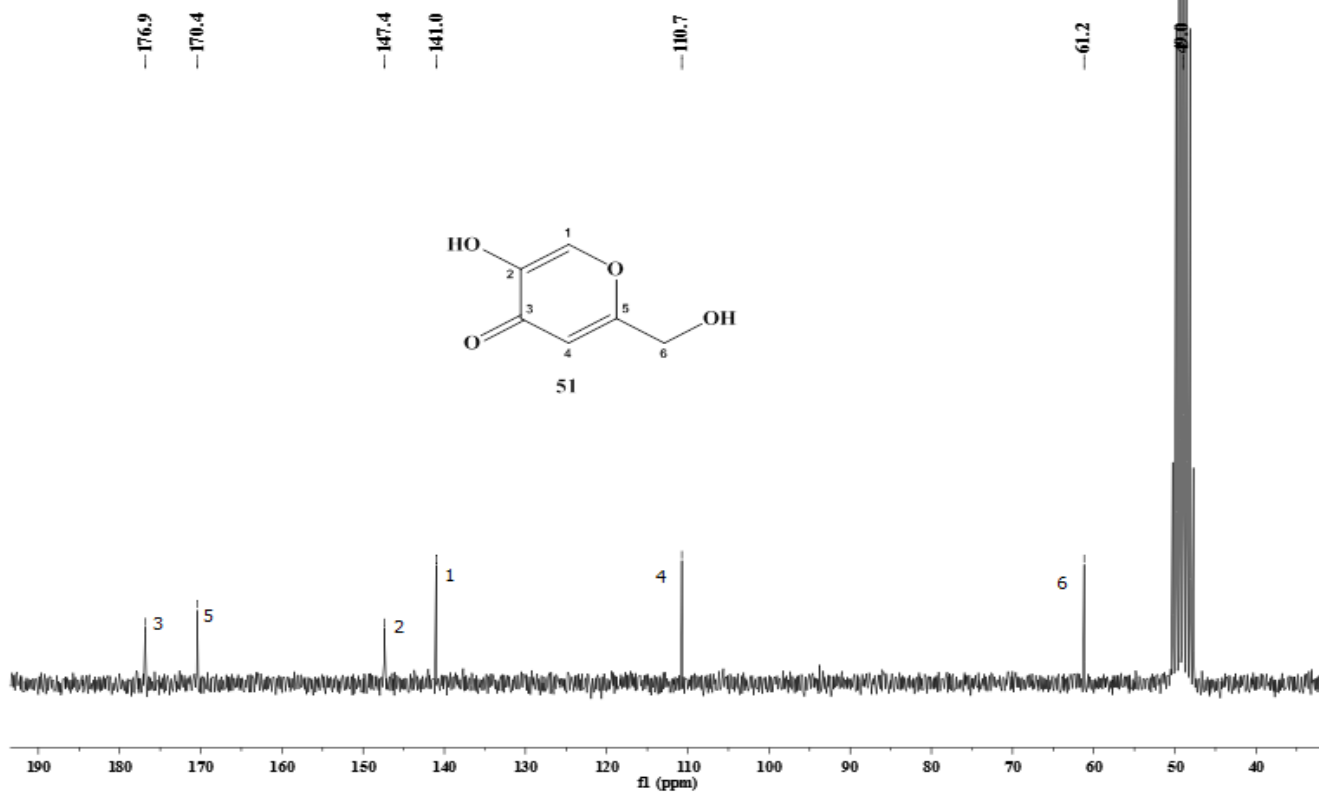
APÊNDICE A - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) do ácido kójico (**51**)

ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$

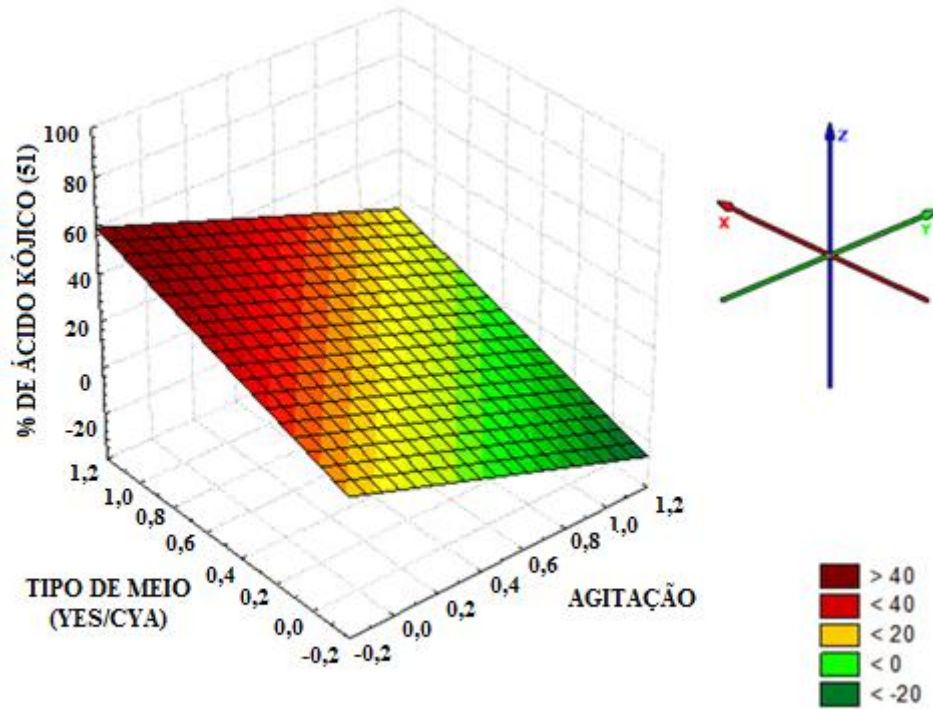


APÊNDICE B - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) do ácido kójico (**51**)

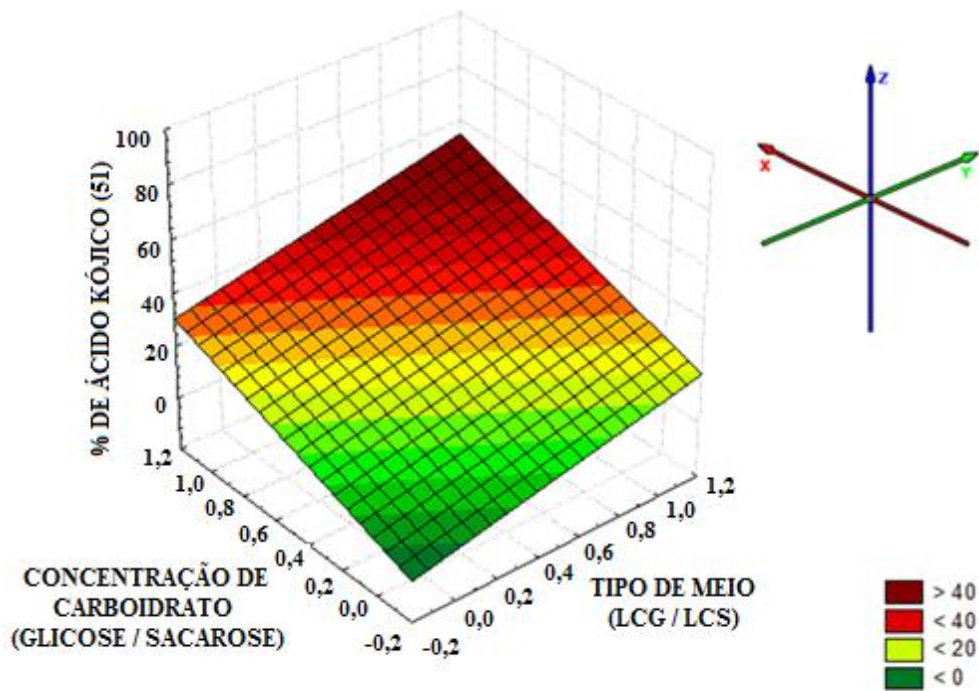
ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$



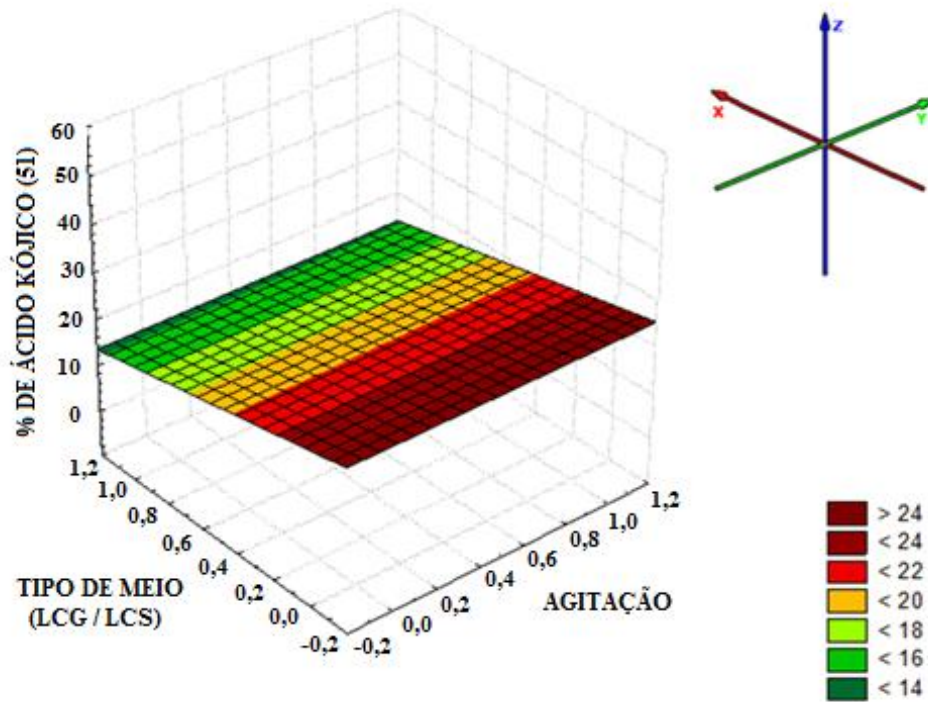
APÊNDICE C - Gráfico referente a superfície de resposta para a porcentagem de ácido kójico (51) produzida em função do tipo de meio (CYA/YES) e agitação, indicando a condição PK01 como a melhor avaliada para seis dias de cultivo.



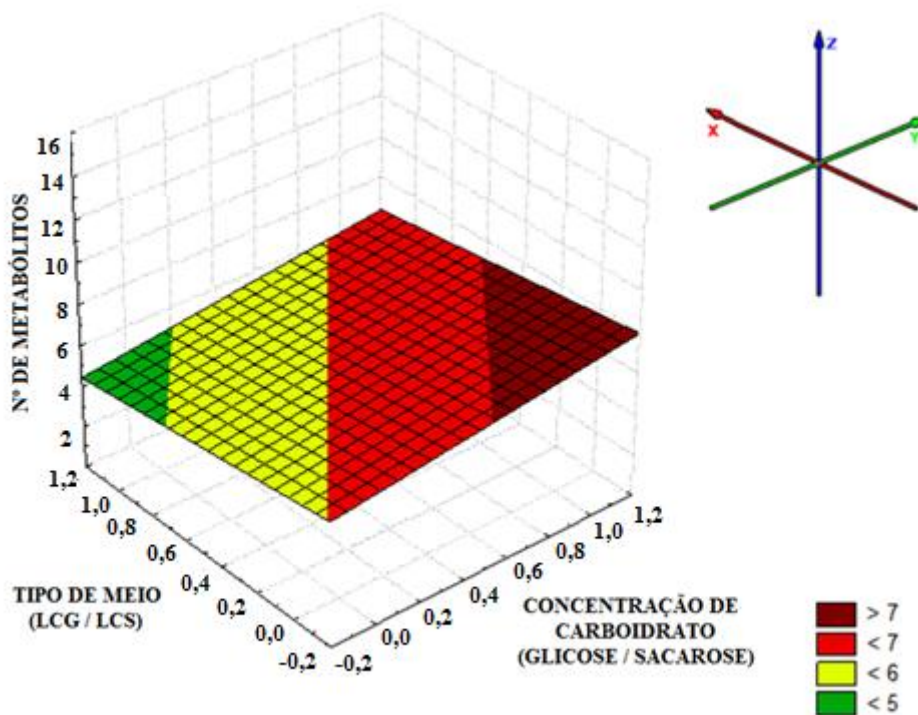
APÊNDICE D - Gráfico referente a superfície de resposta para a porcentagem de ácido kójico (51) produzida em função do tipo de meio (LCG/LCS) e concentração de carboidrato (20 g/L ou 150 g/L), indicando as condições PK03 e PK04 como as melhores avaliadas para 15 dias de cultivo.



APÊNDICE E - Gráfico referente a superfície de resposta para a porcentagem de ácido kójico (51) produzida em função do tipo de meio (LCG/LCS) e agitação, indicando as condições PK05 e PK06 como as melhores avaliadas para 30 dias de cultivo.

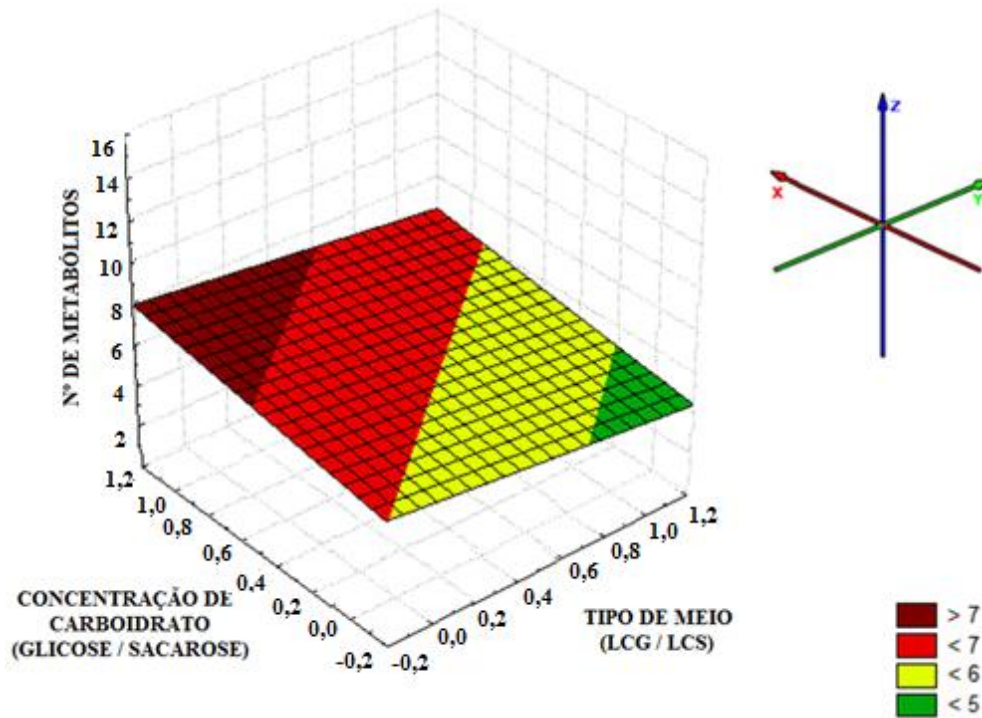


APÊNDICE F - Gráfico referente a superfície de resposta para o número de metabólitos secundários produzidos em função do tipo de meio (LCG/LCS) e concentração de carboidrato (20 g/L ou 150 g/L), indicando as condições PMS01 e PMS02 como as melhores avaliadas para três dias de cultivo.

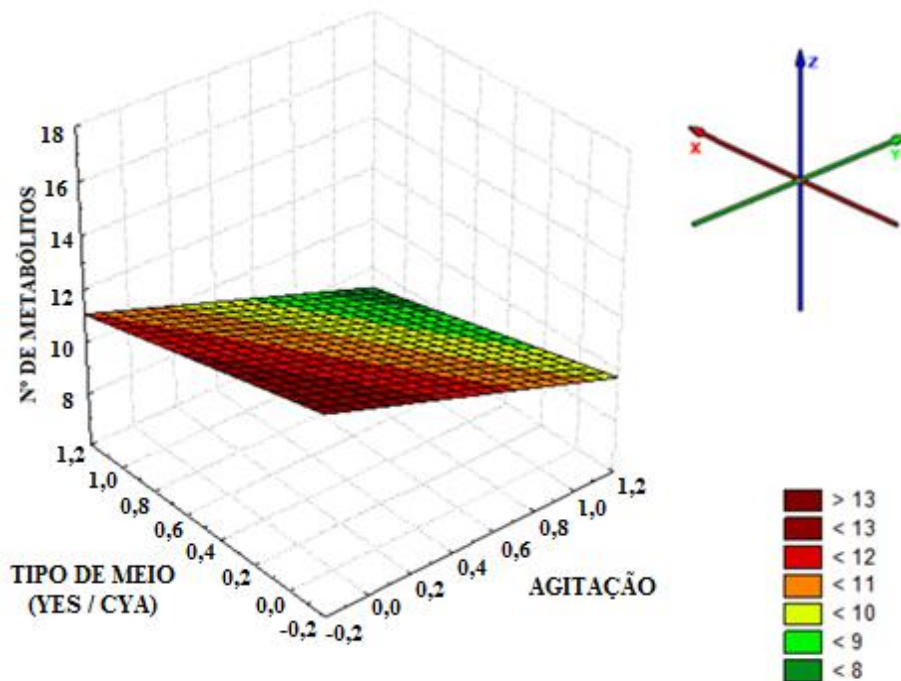


## Apêndices

APÊNDICE G - Gráfico referente a superfície de resposta para o número de metabólitos secundários produzidos em função do tipo de meio (LCG/LCS) e concentração de carboidrato (20 g/L ou 150 g/L), indicando as condições PMS03 e PMS04 como as melhores avaliadas para seis dias de cultivo.



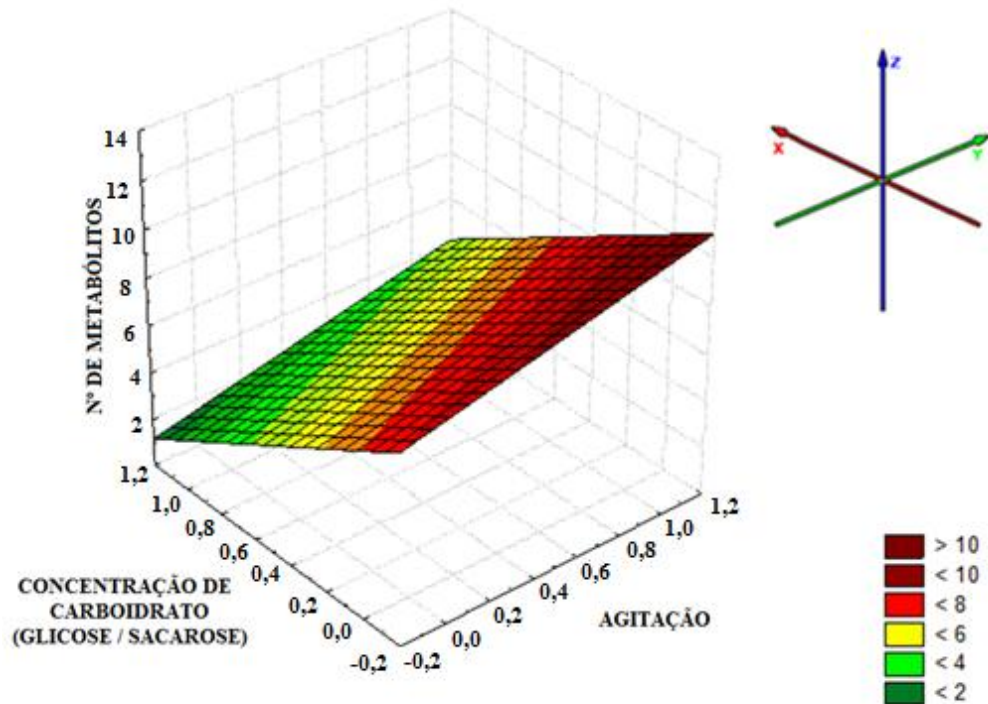
APÊNDICE H - Gráfico referente a superfície de resposta para o número de metabólitos secundários produzidos em função do tipo de meio (CYA e YES) e agitação, indicando a condição PMS05 como a melhor avaliada para 12 dias de cultivo.



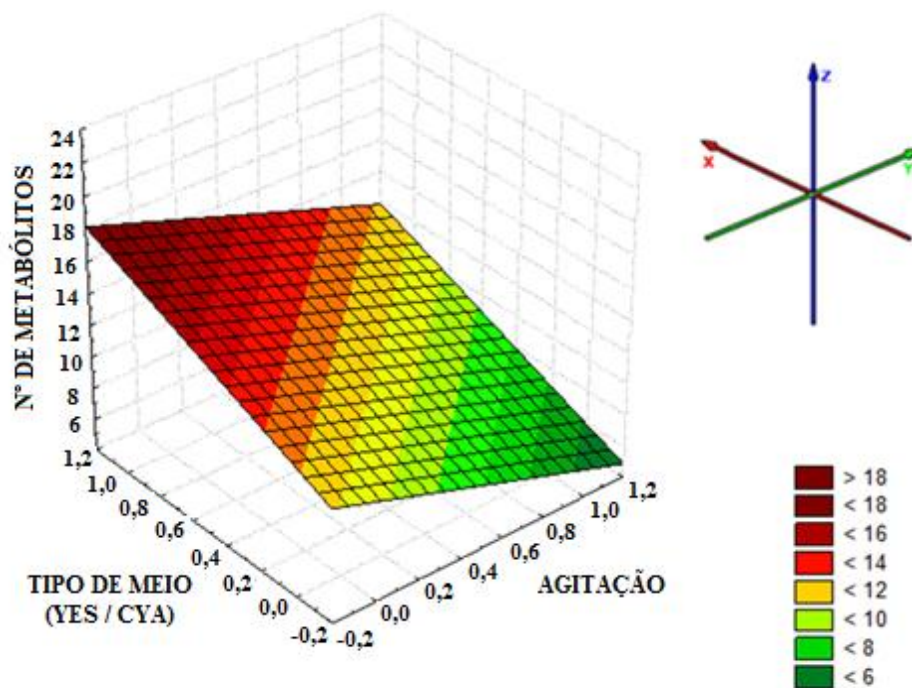


## Apêndices

APÊNDICE I - Gráfico referente a superfície de resposta para o número de metabólitos secundários produzidos em função do tipo de meio (LCG/LCS) e agitação, indicando as condições PMS06 e PMS07 como as melhores condições avaliadas para 21 dias de cultivo.

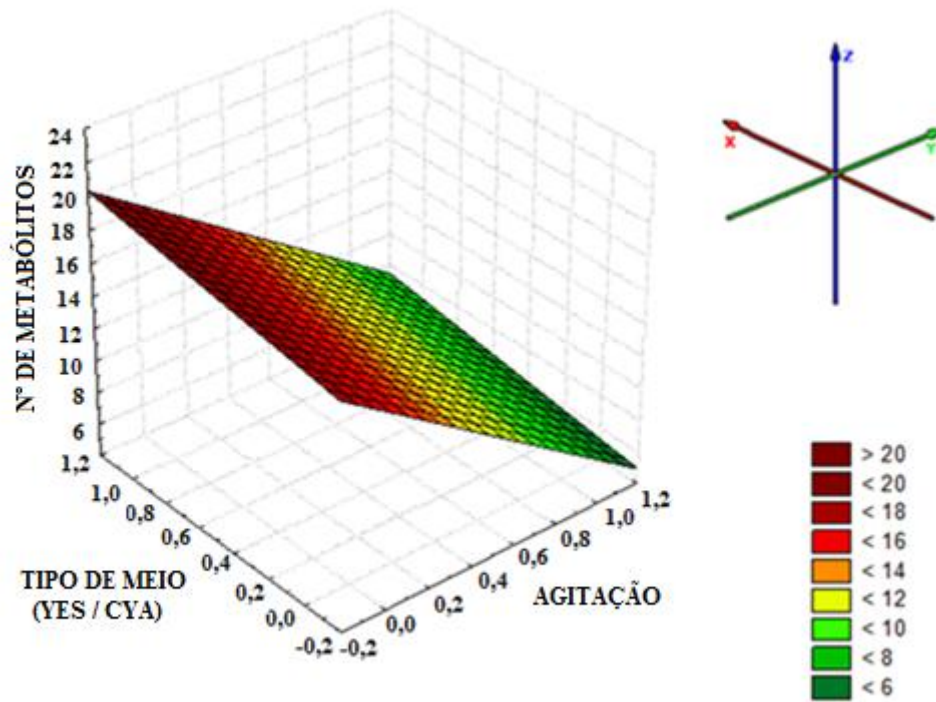


APÊNDICE J - Gráfico referente a superfície de resposta para o número de metabólitos secundários produzidos em função do tipo de meio (CYA e YES) e agitação, indicando a condição PMS08 como a melhor avaliada para 21 dias de cultivo.



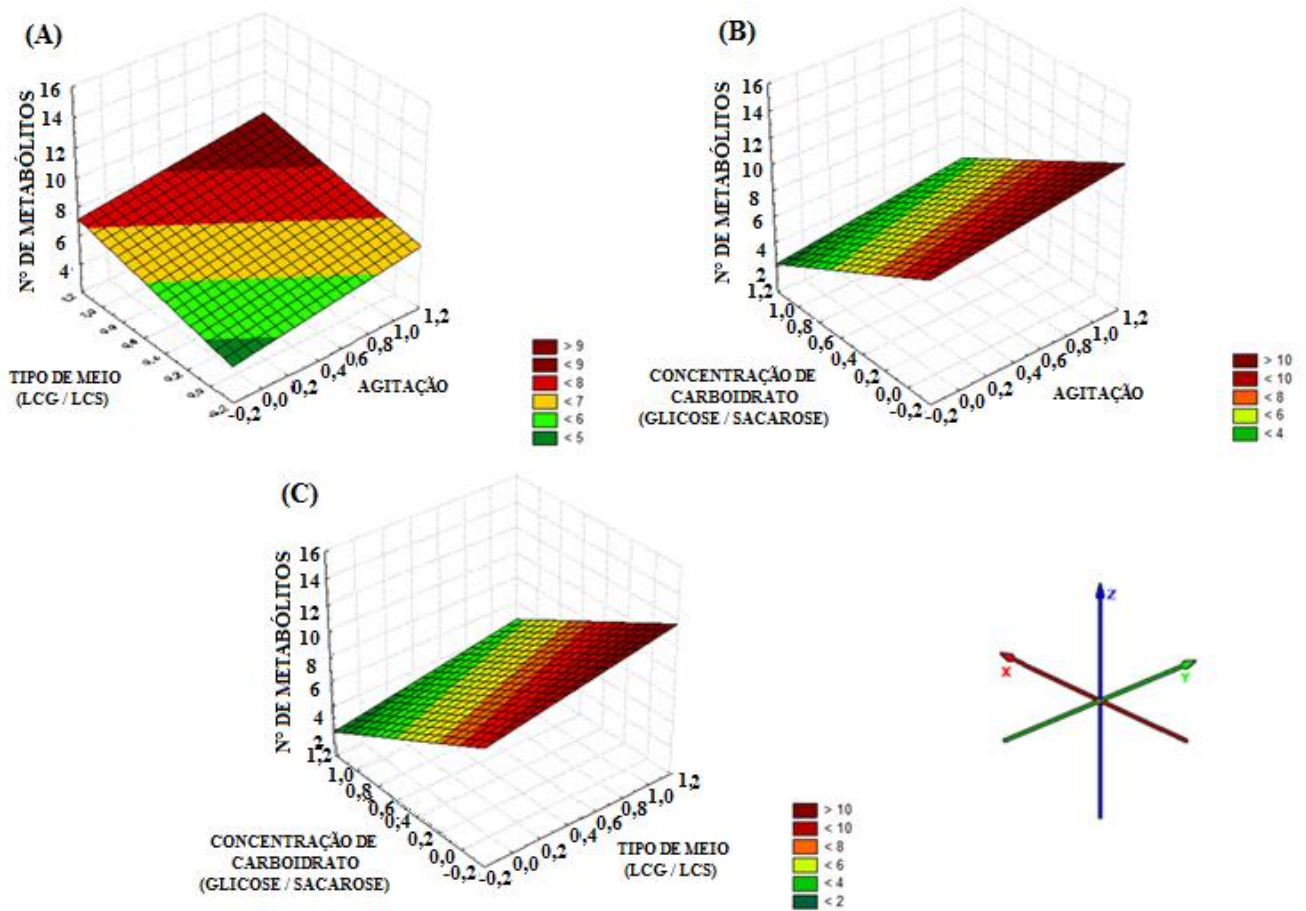
## Apêndices

APÊNDICE L - Gráfico referente a superfície de resposta para o número de metabólitos secundários produzidos em função do tipo de meio (CYA e YES) e agitação, indicando a condição PMS09 como a melhor avaliada para 27 dias de cultivo.



## Apêndices

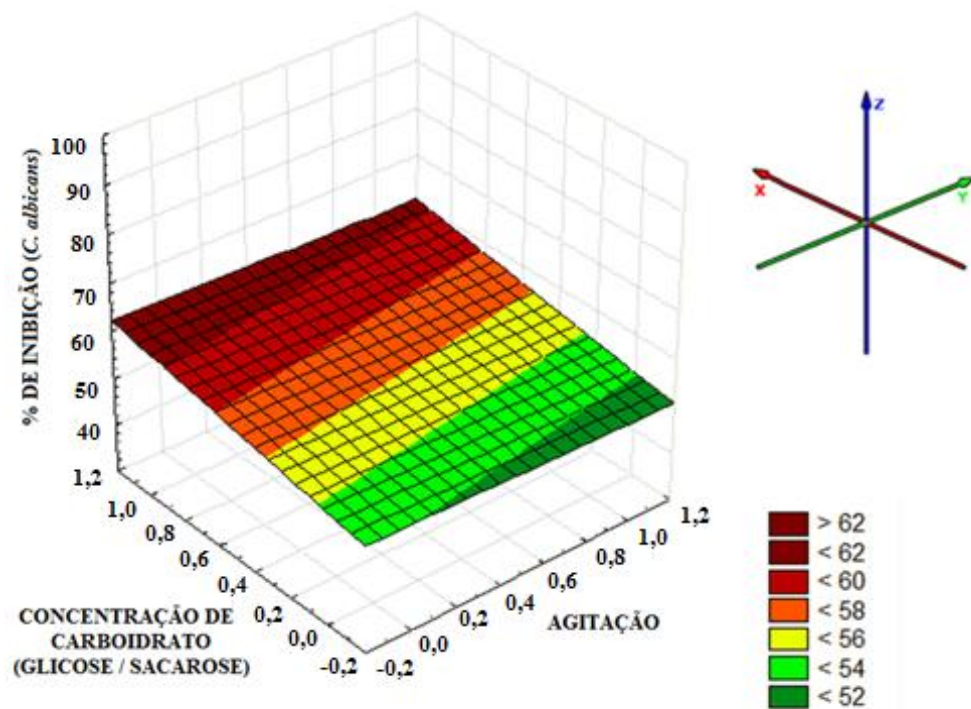
APÊNDICE M - Gráficos referentes a superfície de resposta para o número de metabólitos secundários produzidos em função do tipo de meio (LCG/LCS) versus agitação (GRAF. A), concentração de carboidrato (20 g/L ou 150 g/L) versus agitação (GRÁF. B) e a concentração de carboidrato (glicose/sacarose) versus tipo de meio (LCG/LCS) (GRÁF. C), indicando a condição PMS10 como a melhor avaliada para 30 dias de cultivo.



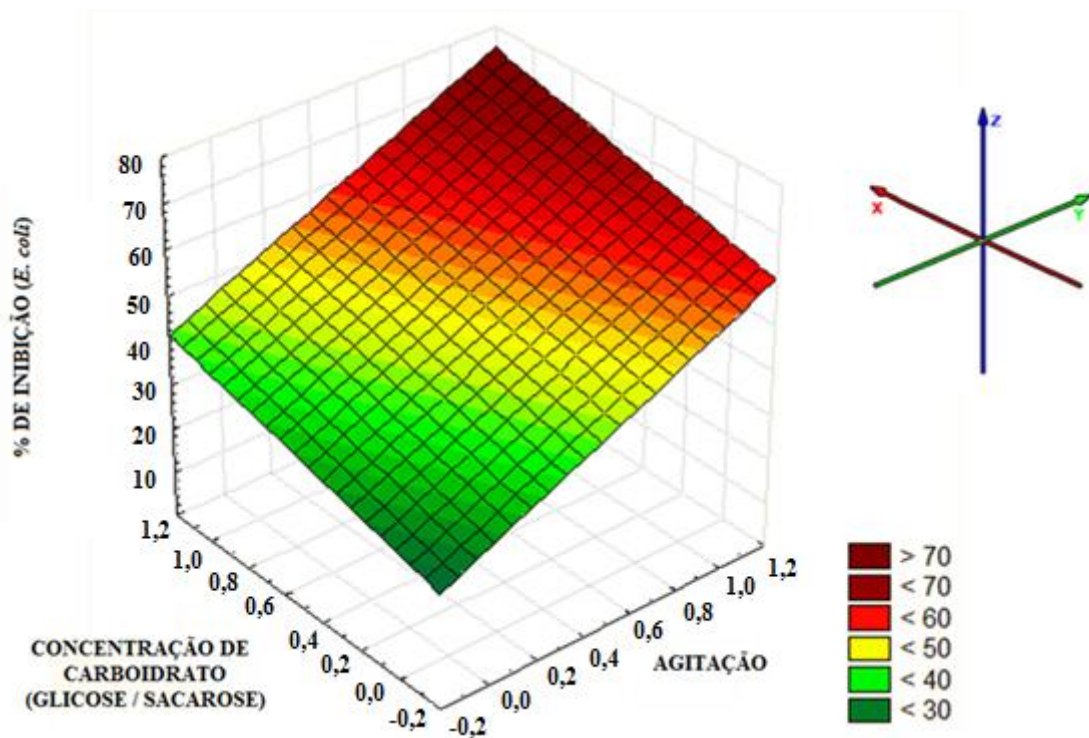


## Apêndices

APÊNDICE N - Gráfico referente a superfície de resposta para porcentagem de inibição frente *C. albicans* em função da concentração de carboidrato (20 g/L ou 150 g/L) e agitação, indicando as condições PMB02 e PMB03 como as melhores avaliadas para nove dias de cultivo.

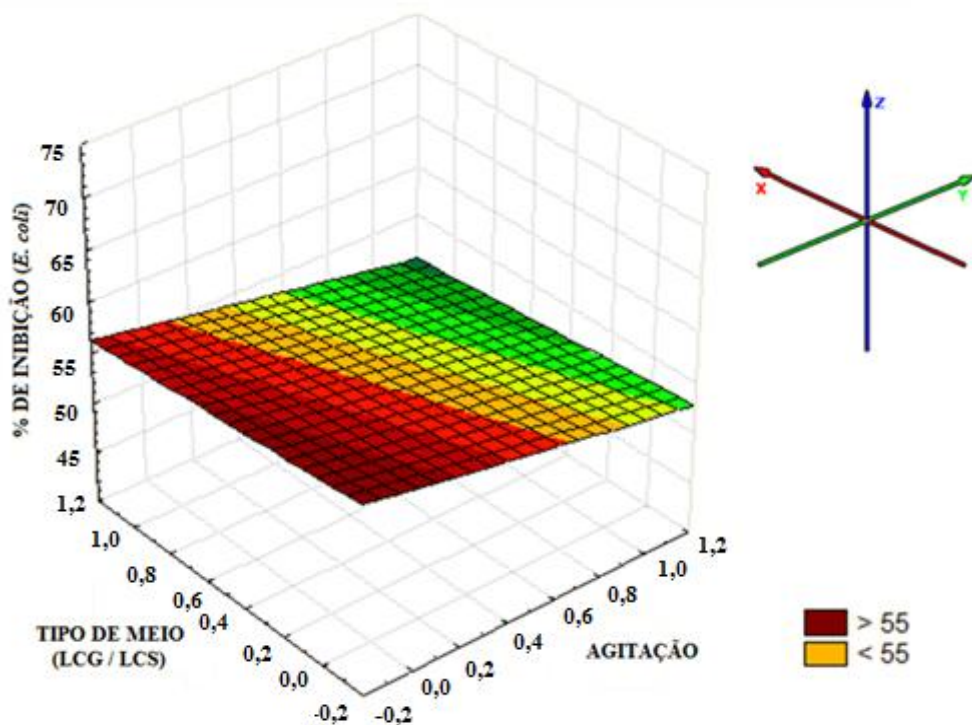


APÊNDICE O - Gráfico referente a superfície de resposta para porcentagem de inibição frente *E. coli* em função da concentração de carboidrato (20 g/L ou 150 g/L) e agitação, indicando as condições PMB04 e PMB05 como as melhores avaliadas para 12 dias de cultivo.

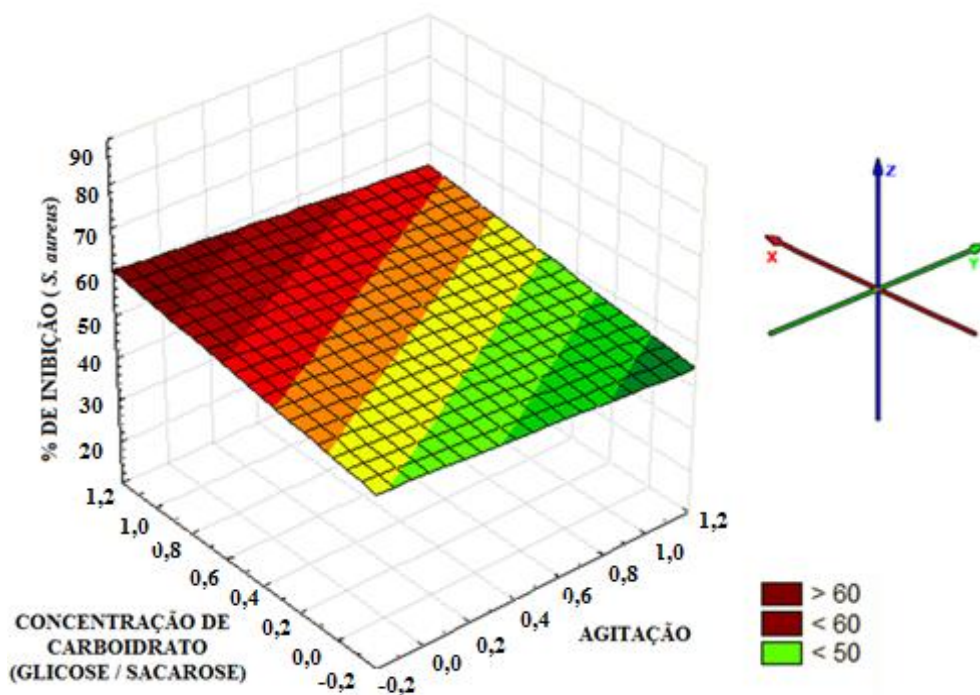


## Apêndices

APÊNDICE P - Gráfico referente a superfície de resposta para porcentagem de inibição frente *E. coli* em função da concentração de carboidrato (20 g/L ou 150 g/L) e agitação, indicando as condições PMB06 e PMB07 como as melhores avaliadas para 15 dias de cultivo.

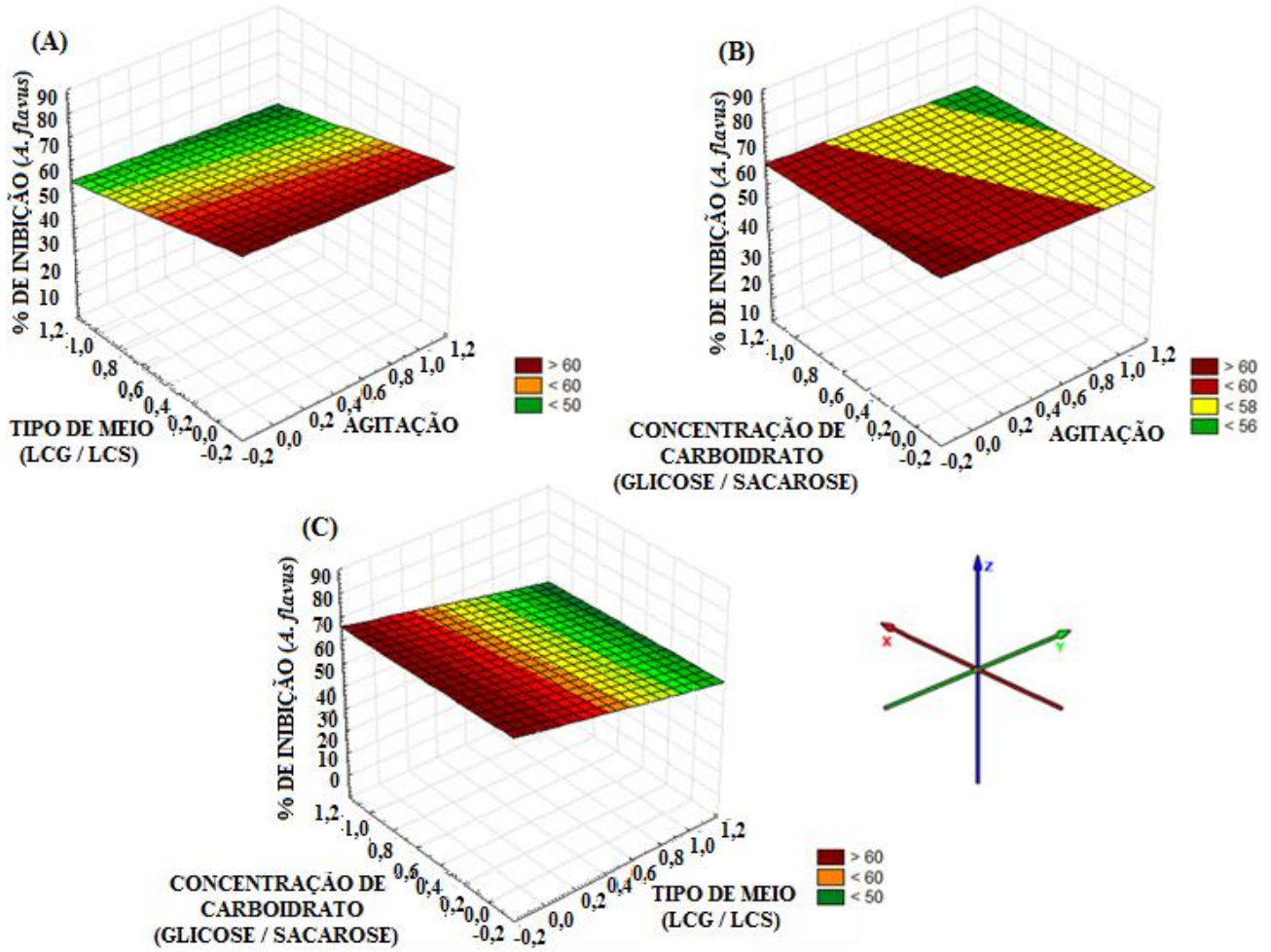


APÊNDICE Q - Gráfico referente a superfície de resposta para porcentagem de inibição frente *S. aureus* em função da concentração de carboidrato (20 g/L ou 150 g/L) e agitação, indicando as condições PMB08 e PMB09 como as melhores avaliadas para 21 dias de cultivo.



## Apêndices

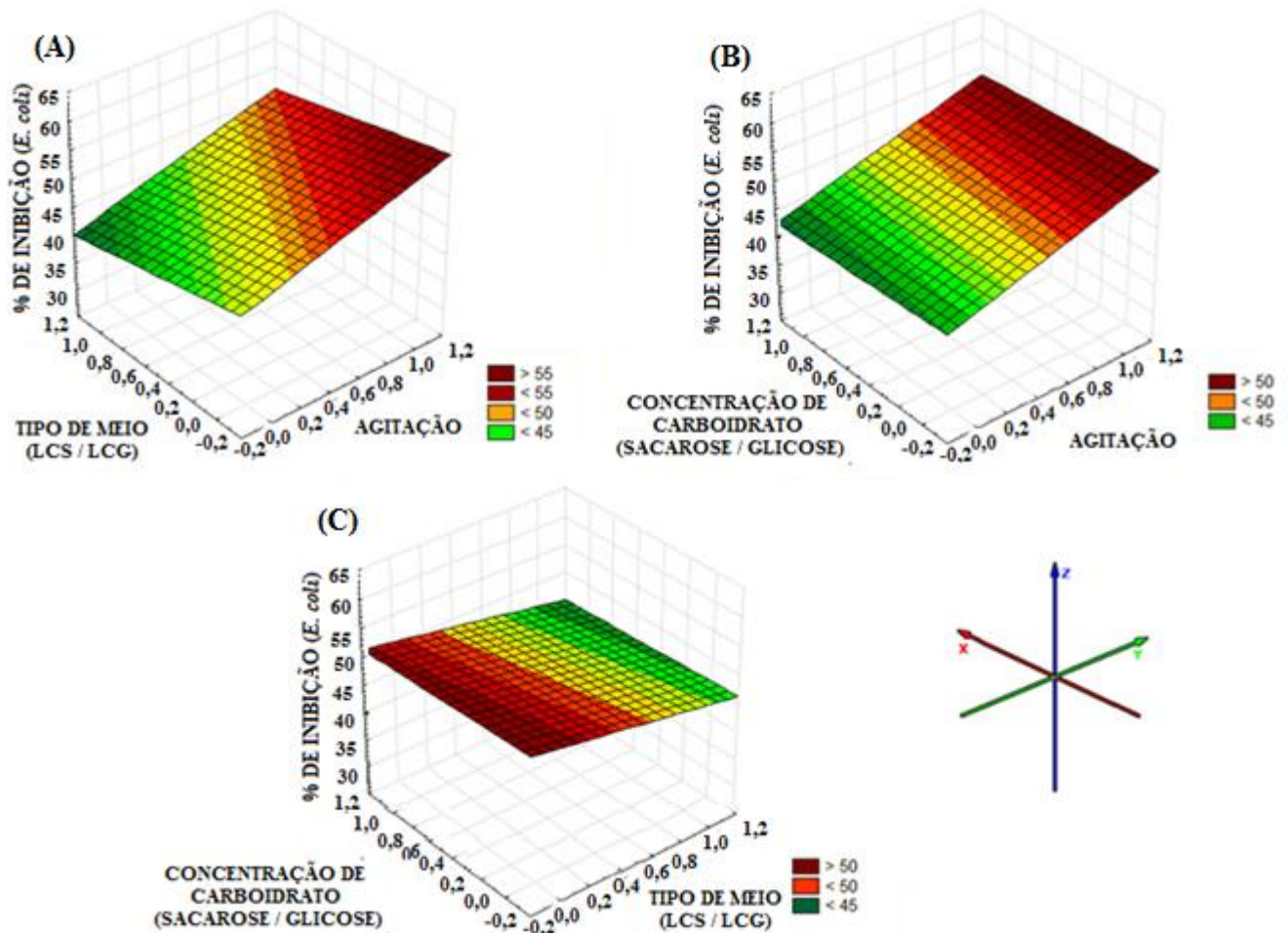
APÊNDICE R - Gráfico referente a superfície de resposta para porcentagem de inibição frente *A. flavus* em função do tipo de meio (LCG/LCS), da concentração de carboidrato (20 g/L ou 150 g/L) e agitação, indicando a condição PMB10 como a melhor avaliada para 24 dias de cultivo.





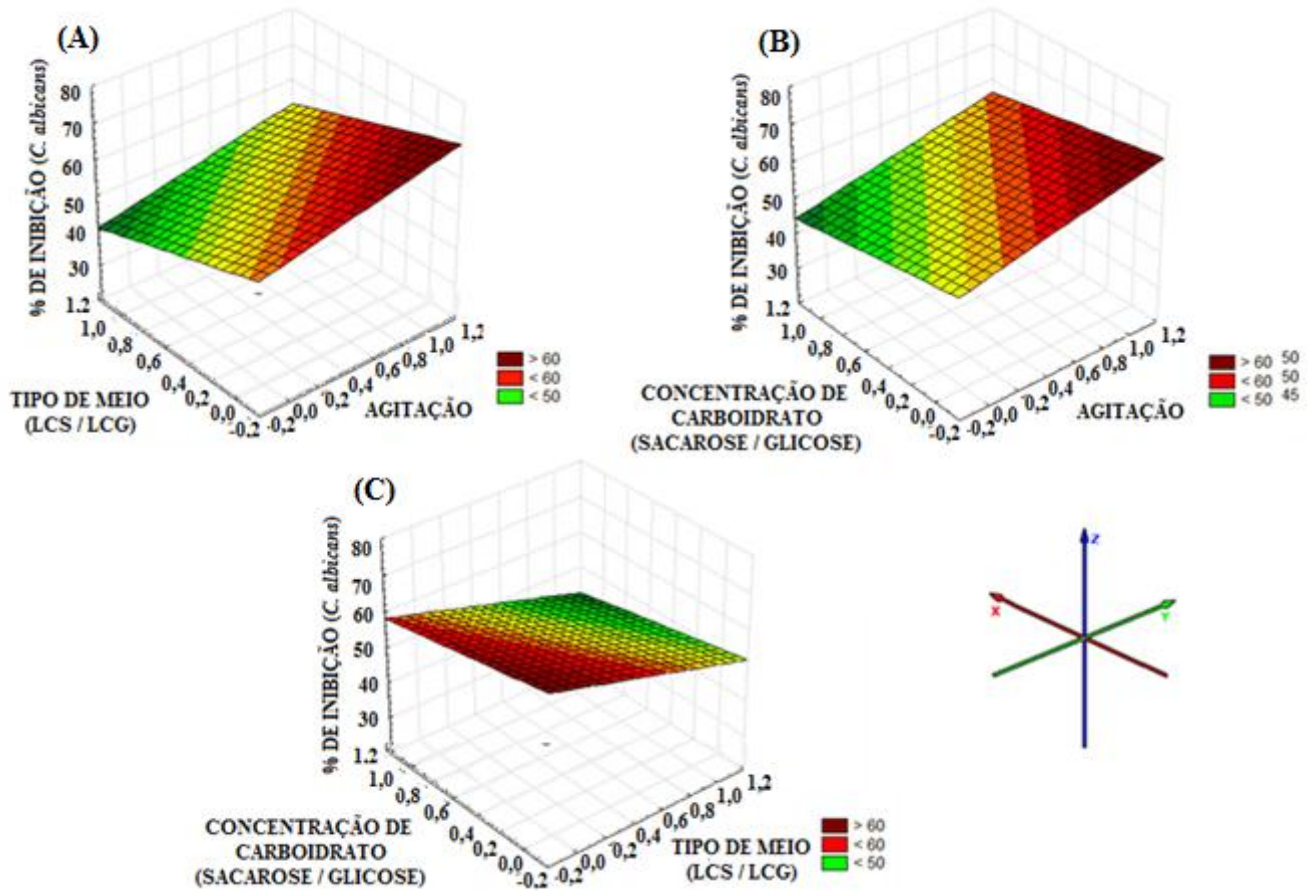
## Apêndices

APÊNDICE S - Gráfico referente a superfície de resposta para porcentagem de inibição frente *E. coli* em função do tipo de meio (LCG/LCS) versus agitação (GRÁF. A), concentração de carboidrato (20 g/L ou 150 g/L) versus agitação (GRÁF. B) e concentração do carboidrato versus tipo de meio (GRÁF. C), indicando a condição PMB11 como a melhor condição avaliada para 24 dias de cultivo.



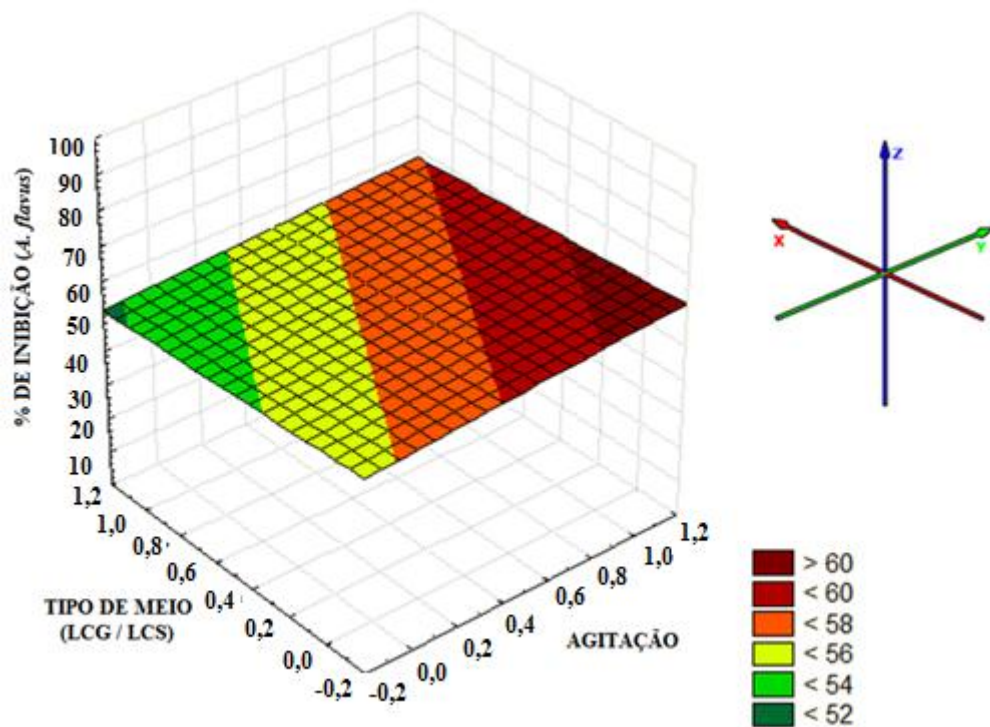
## Apêndices

APÊNDICE T - Gráfico referente a superfície de resposta para porcentagem de inibição frente *C. albicans* em função do tipo de meio (LCG/LCS), da concentração de carboidrato (glicose e sacarose) e agitação, indicando a condição PMB11 como a melhor condição avaliada para 24 dias de cultivo.

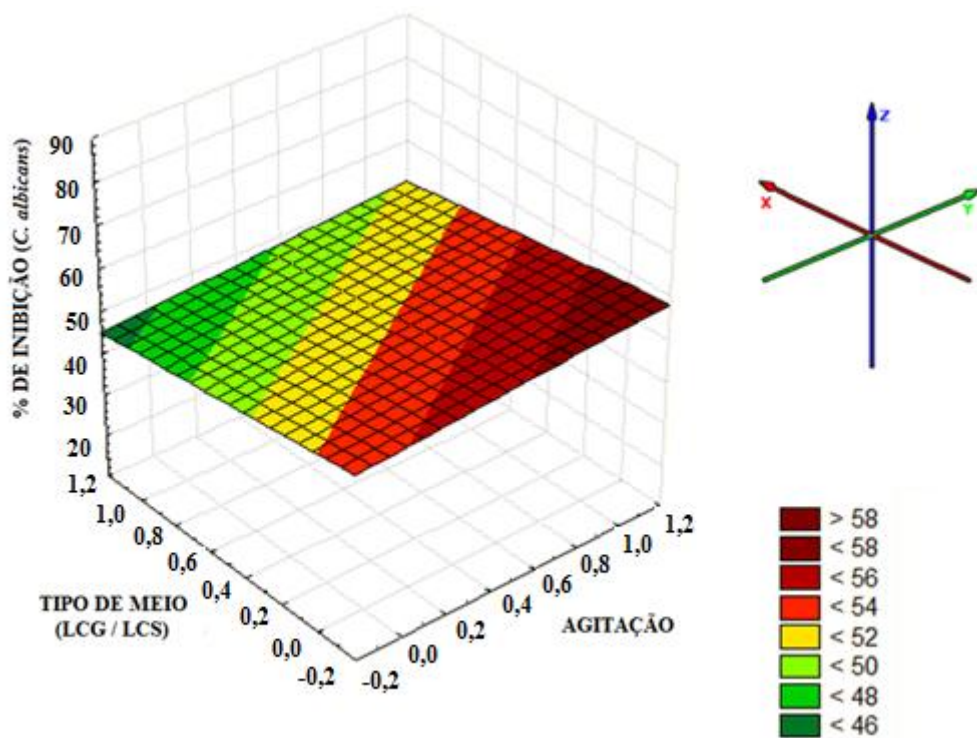


## Apêndices

APÊNDICE U - Gráfico referente a superfície de resposta para porcentagem de inibição frente *C. albicans* em função do tipo de meio (LCG/LCS) e agitação, indicando as condições PMB12 e PMB13 como as melhores condições avaliadas para 27 dias de cultivo.

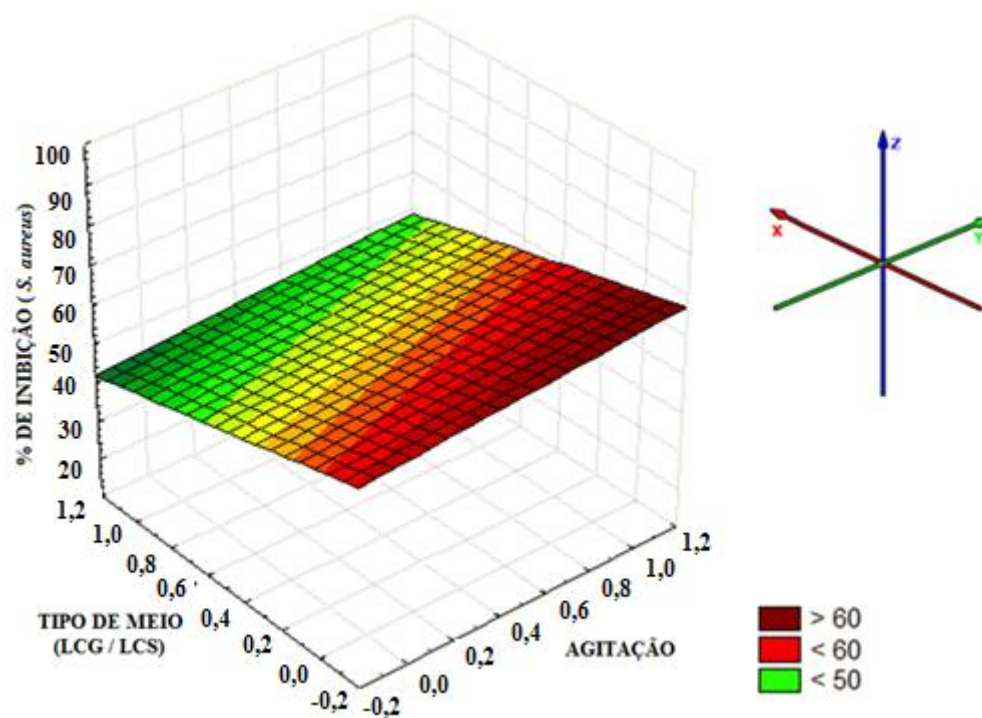


APÊNDICE V - Gráfico referente a superfície de resposta para porcentagem de inibição frente *C. albicans* em função do tipo de meio (LCG/LCS) e agitação, indicando as condições PMB12 e PMB13 como as melhores condições avaliadas para 27 dias de cultivo.

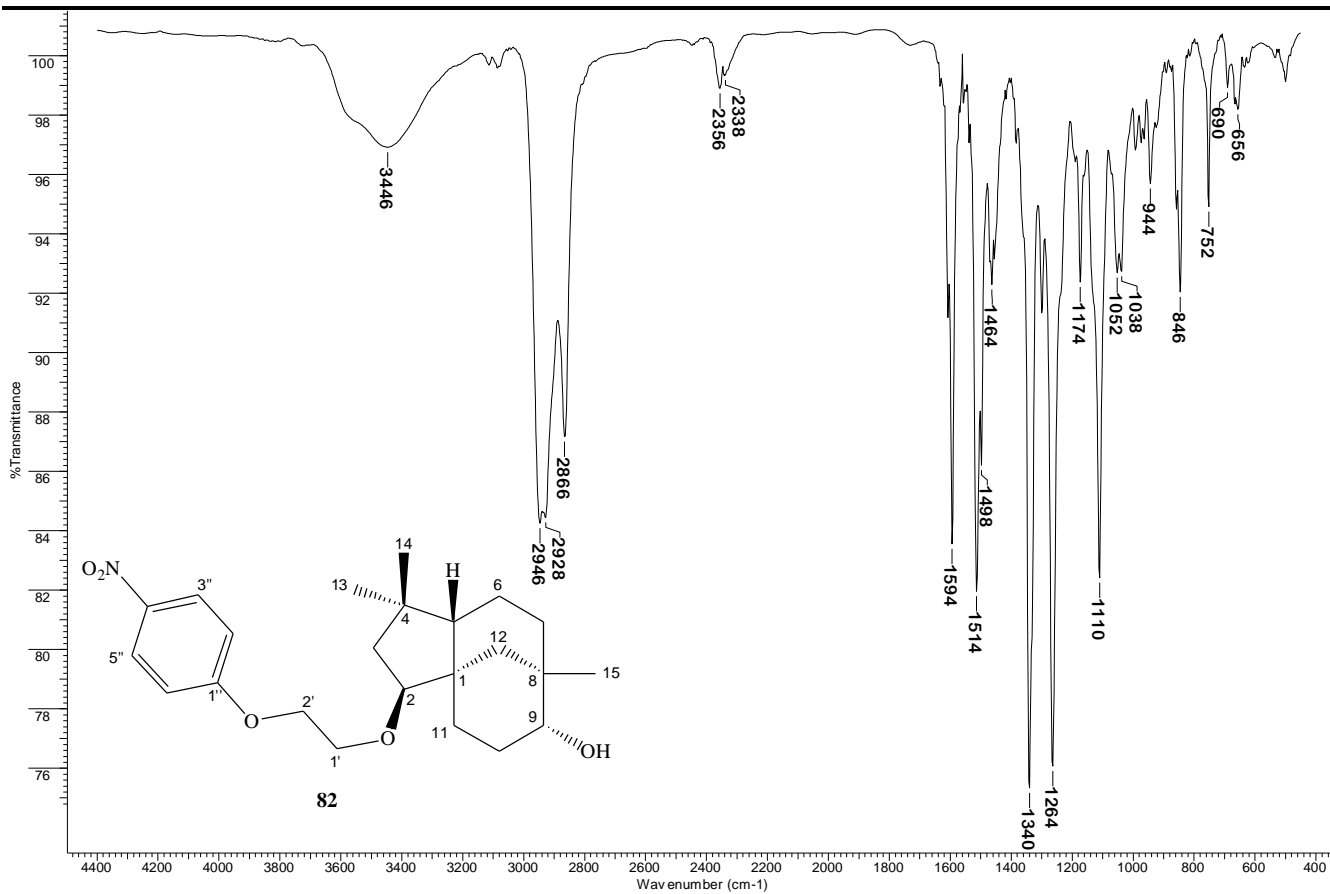


## Apêndices

APÊNDICE X - Gráfico referente a superfície de resposta para porcentagem de inibição frente *S. aureus* em função do tipo de meio (LCG/LCS) e agitação, indicando as condições PMB12 e PMB13 como as melhores condições avaliadas para 27 dias de cultivo.



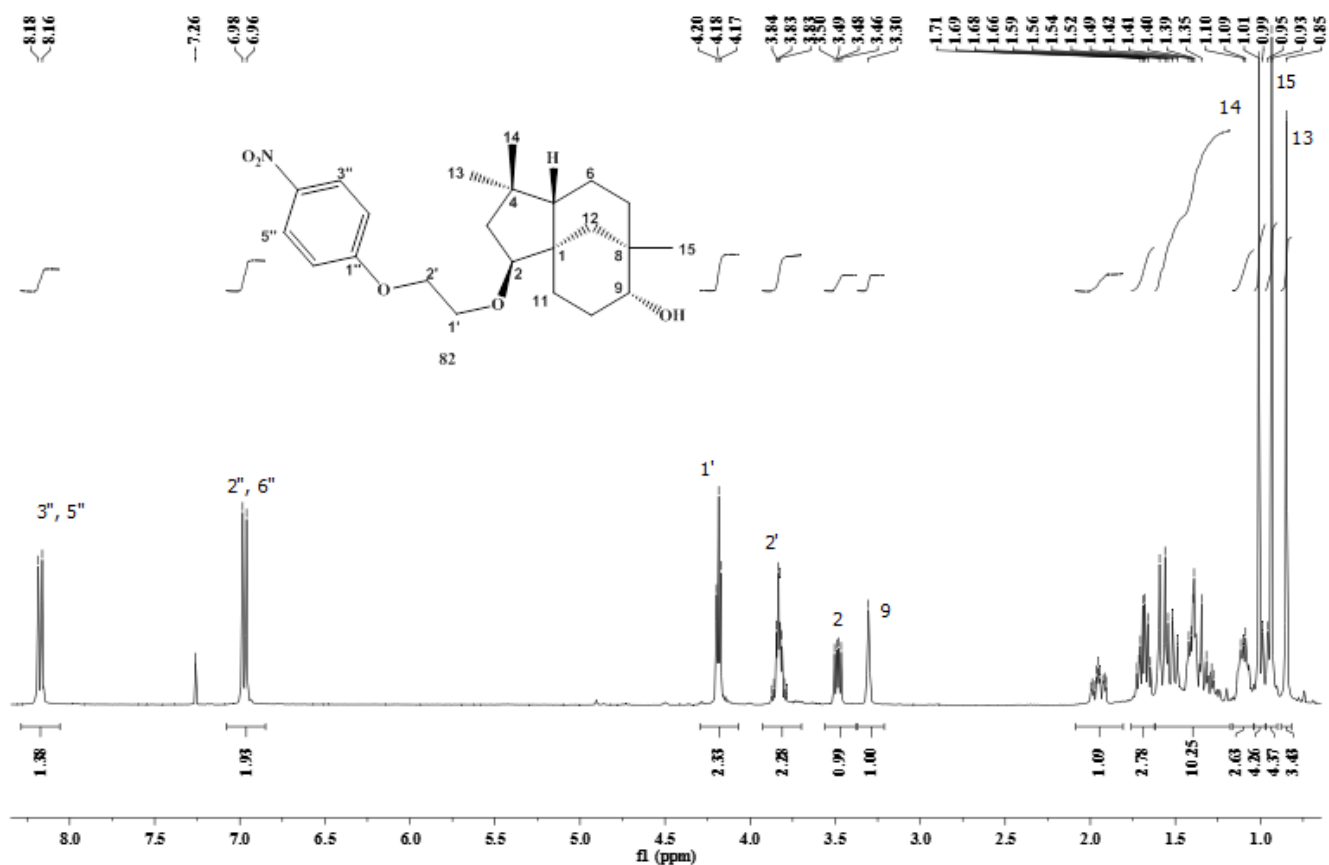
APÊNDICE Z - Espectro na região do IV (KBr) do composto **82**



APÊNDICE - A1 Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do composto **82**

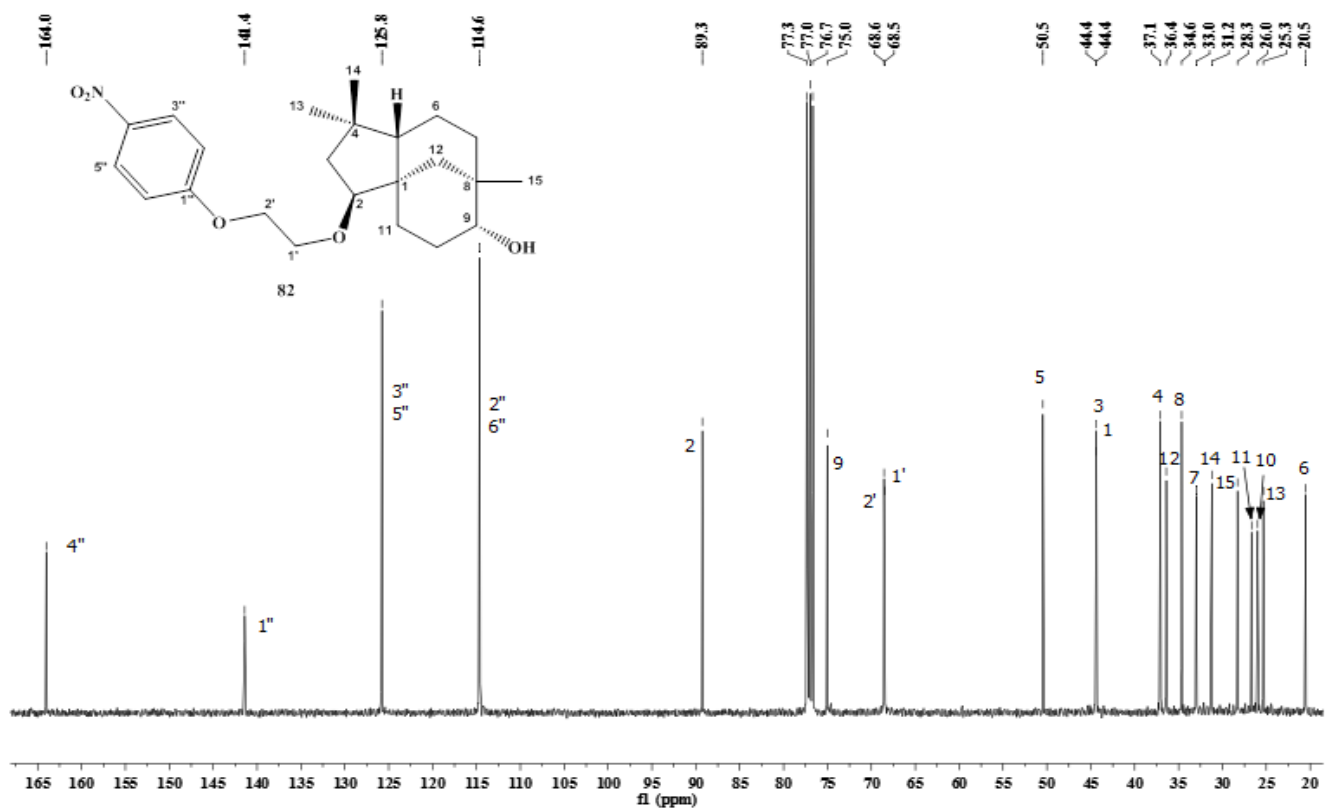


E SPECTRO DE RMN DE <sup>1</sup>H

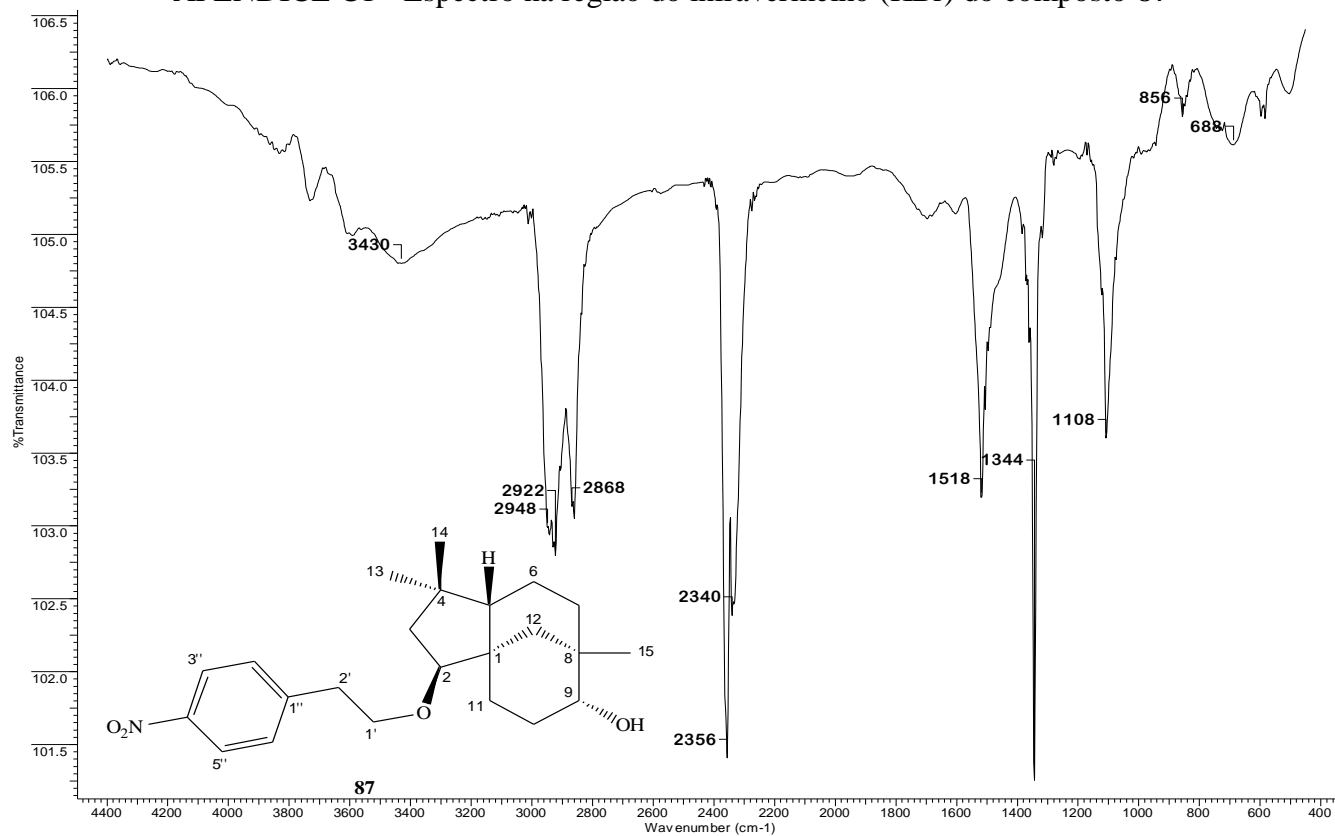


APÊNDICE - B1 Espectro de RMN de <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do composto **82**

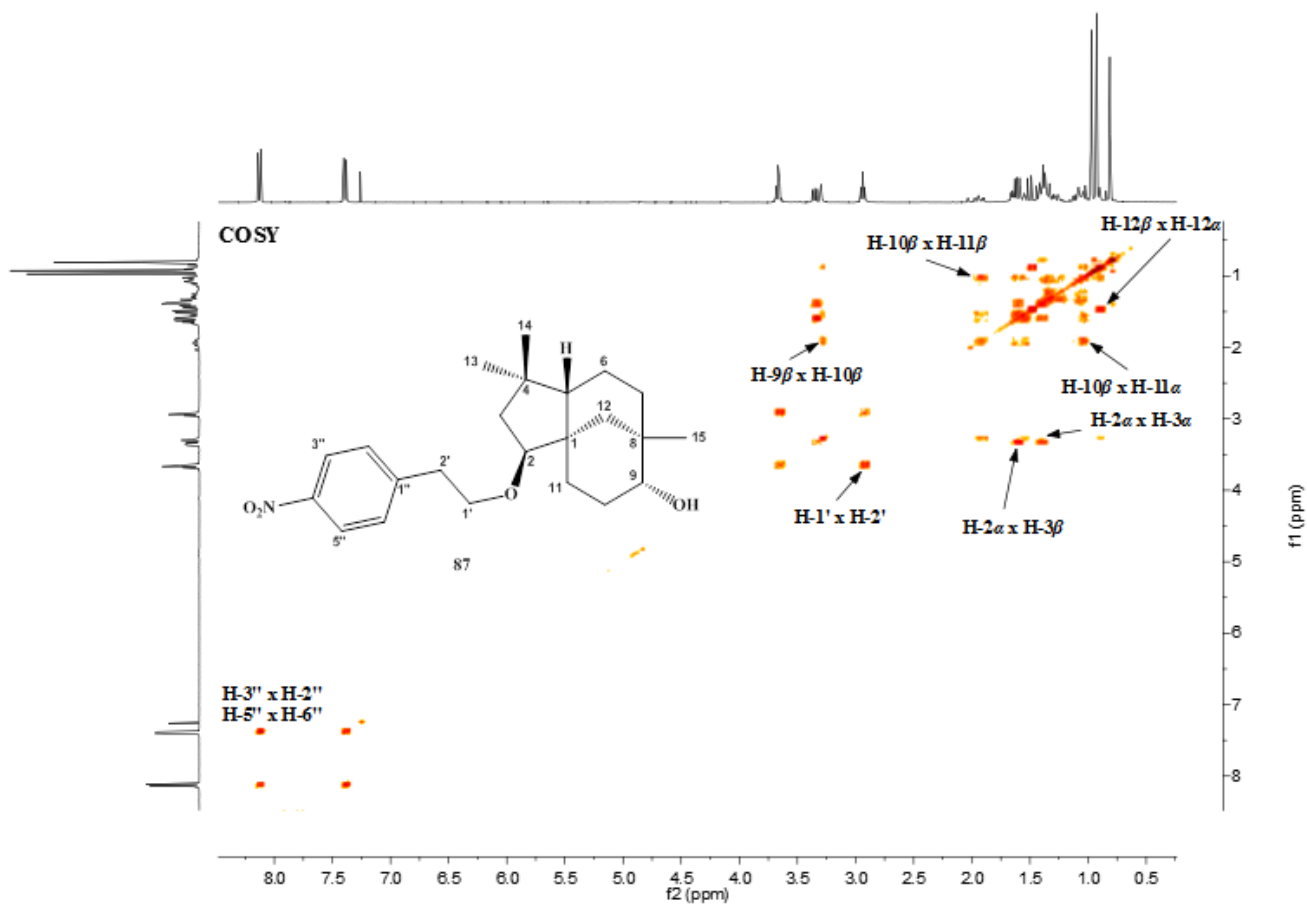
E SPECTRO DE RMN DE <sup>13</sup>C



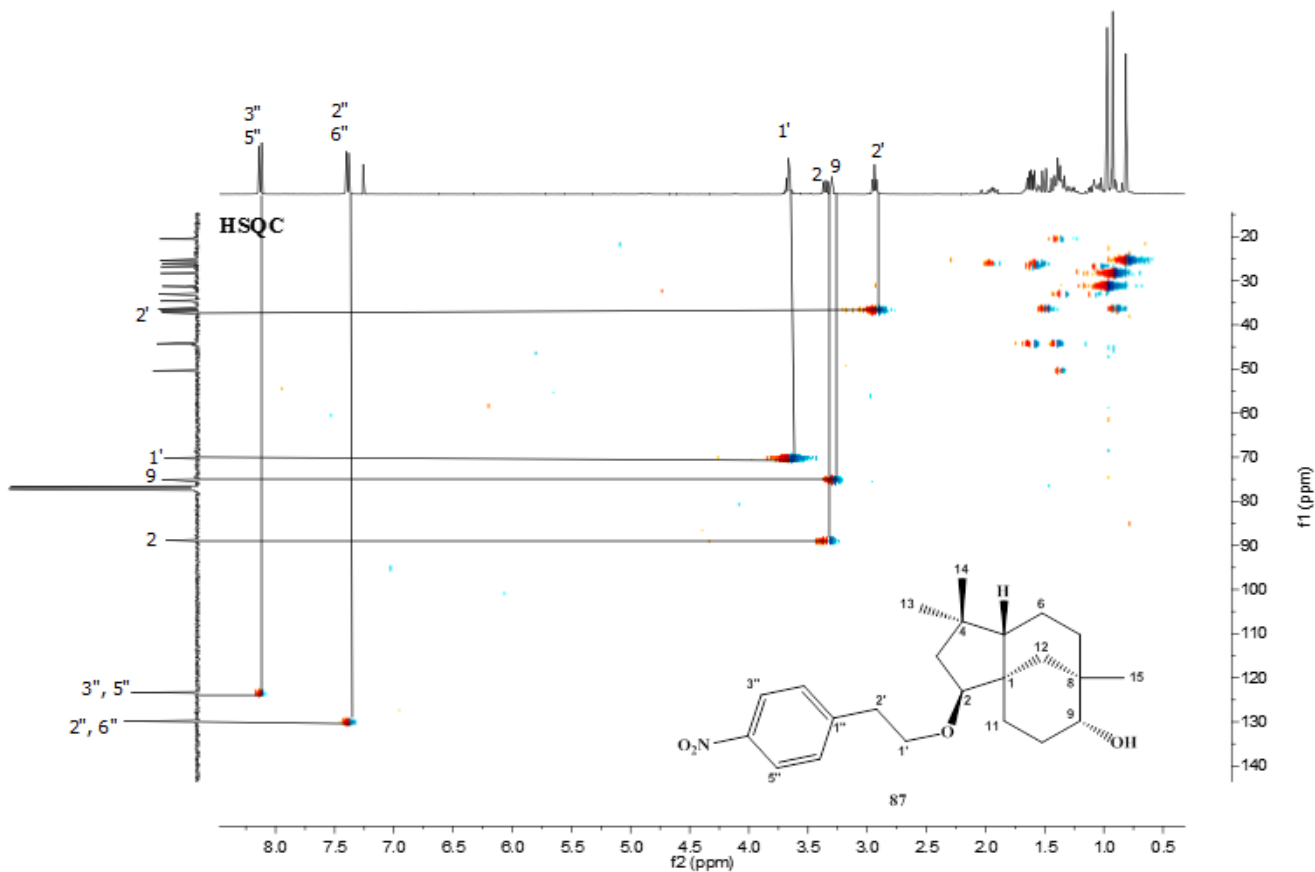
APÊNDICE C1 - Espectro na região do infravermelho (KBr) do composto **87**



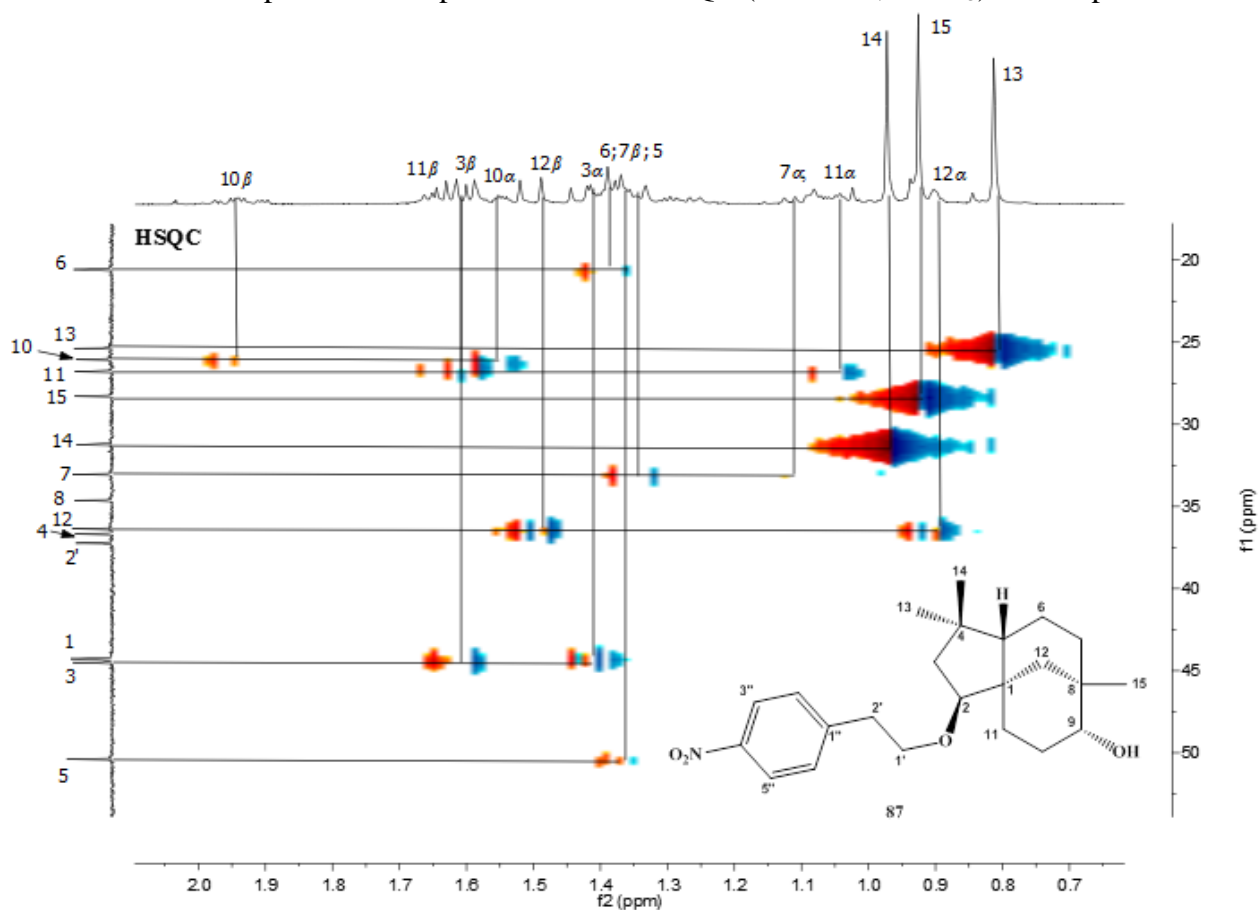
APÊNDICE D1 - Mapa de contornos COSY (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do composto **87**



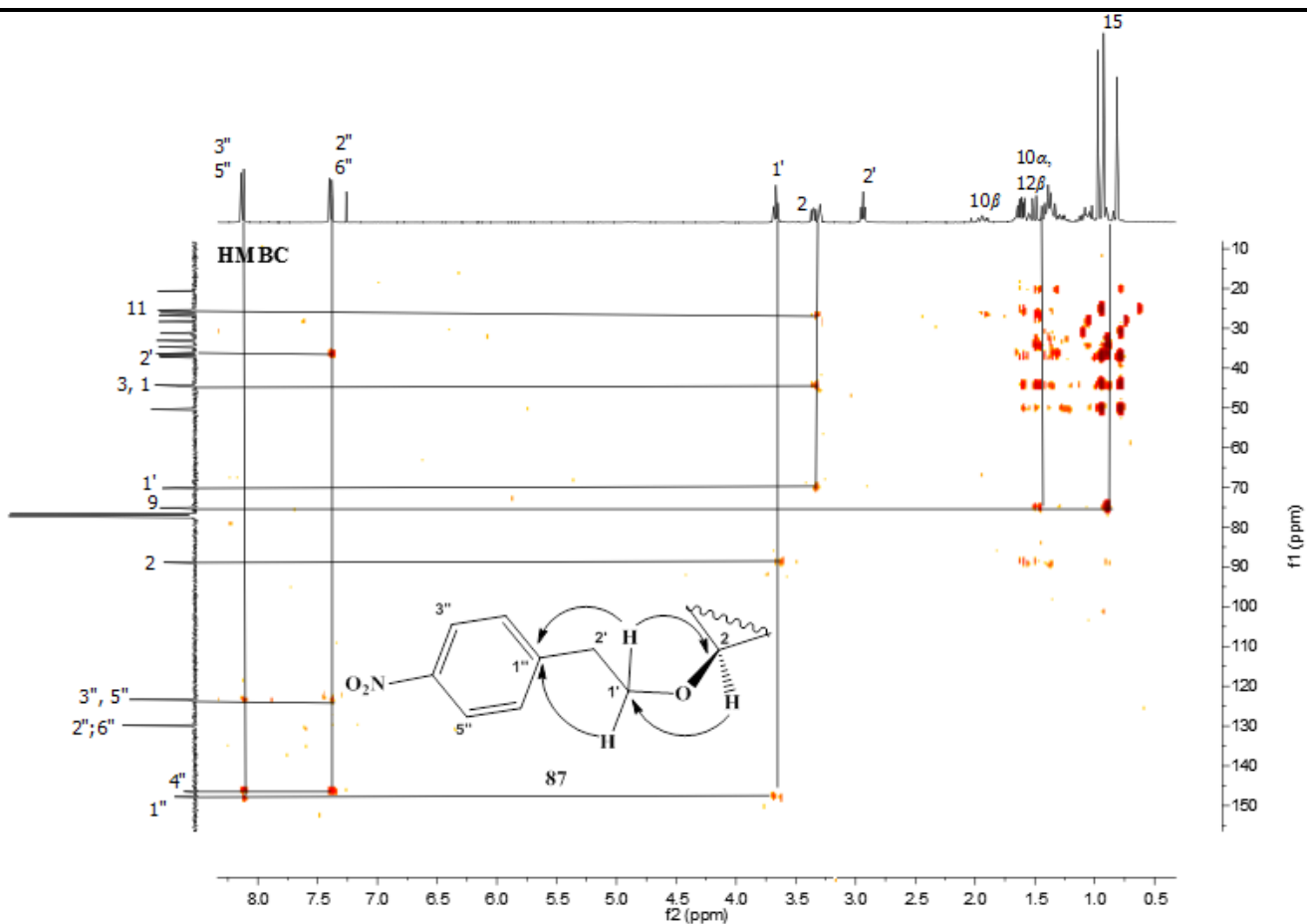
APÊNDICE E1 - Mapa de contornos HSQC (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do composto **87**



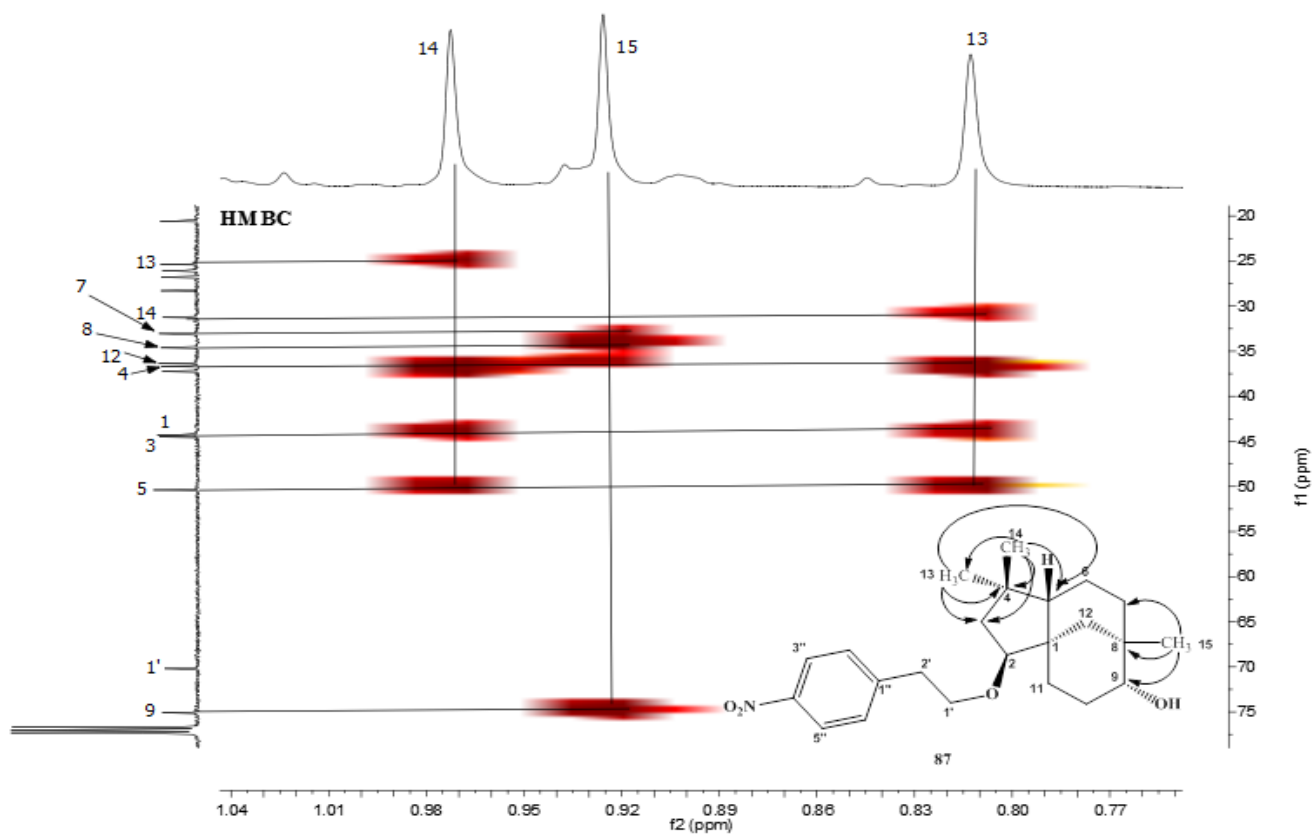
APÊNDICE F1 - Expansão do mapa de contornos HSQC (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do composto **87**



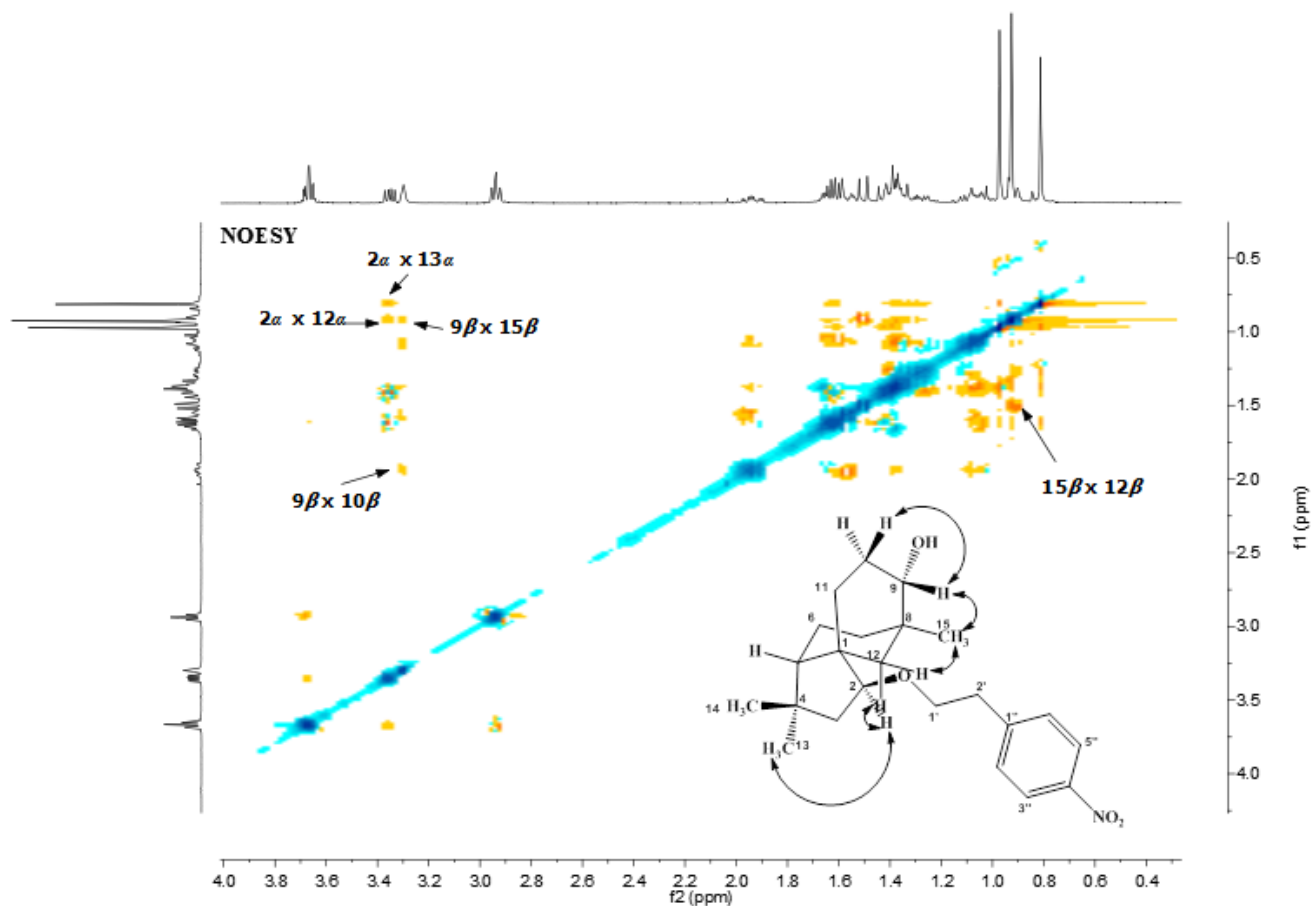
APÊNDICE G1 - Mapa de contornos HMBC (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do composto **87**



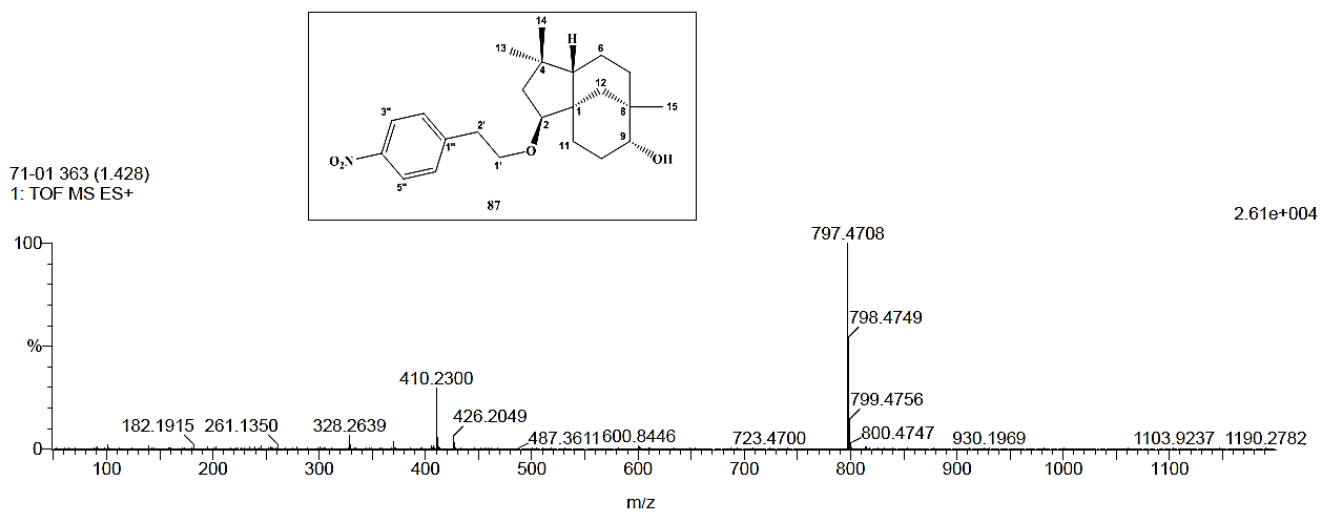
APÊNDICE H1 - Expansão do mapa de contornos HMBC (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do composto **87**



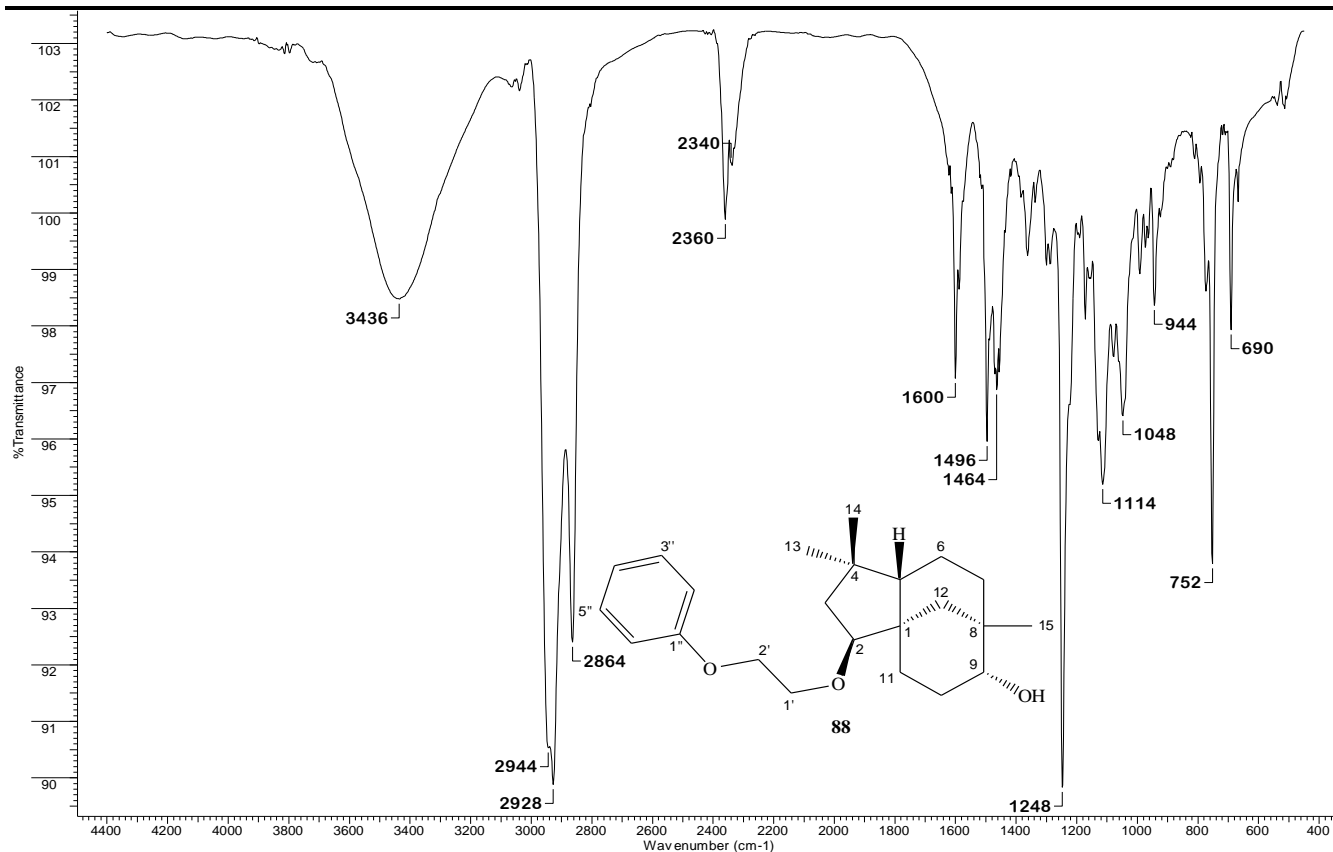
APÊNDICE I1 - Mapa de contornos NOESY (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do composto **87**



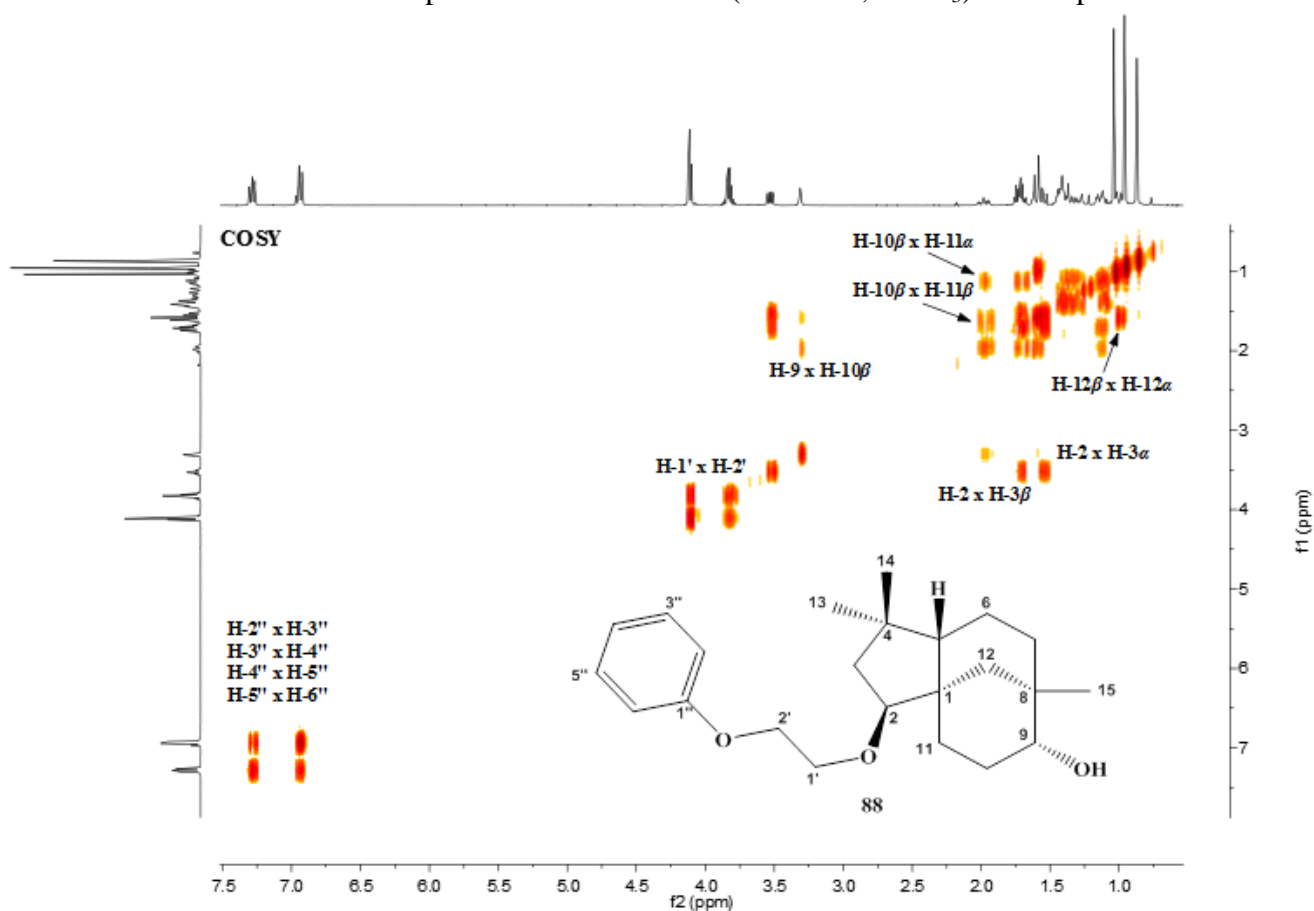
APÊNDICE J1 - Espectro de massas EM-ESI positivo de **87**, obtido em um espectrofotômetro ESI-Q-TOF



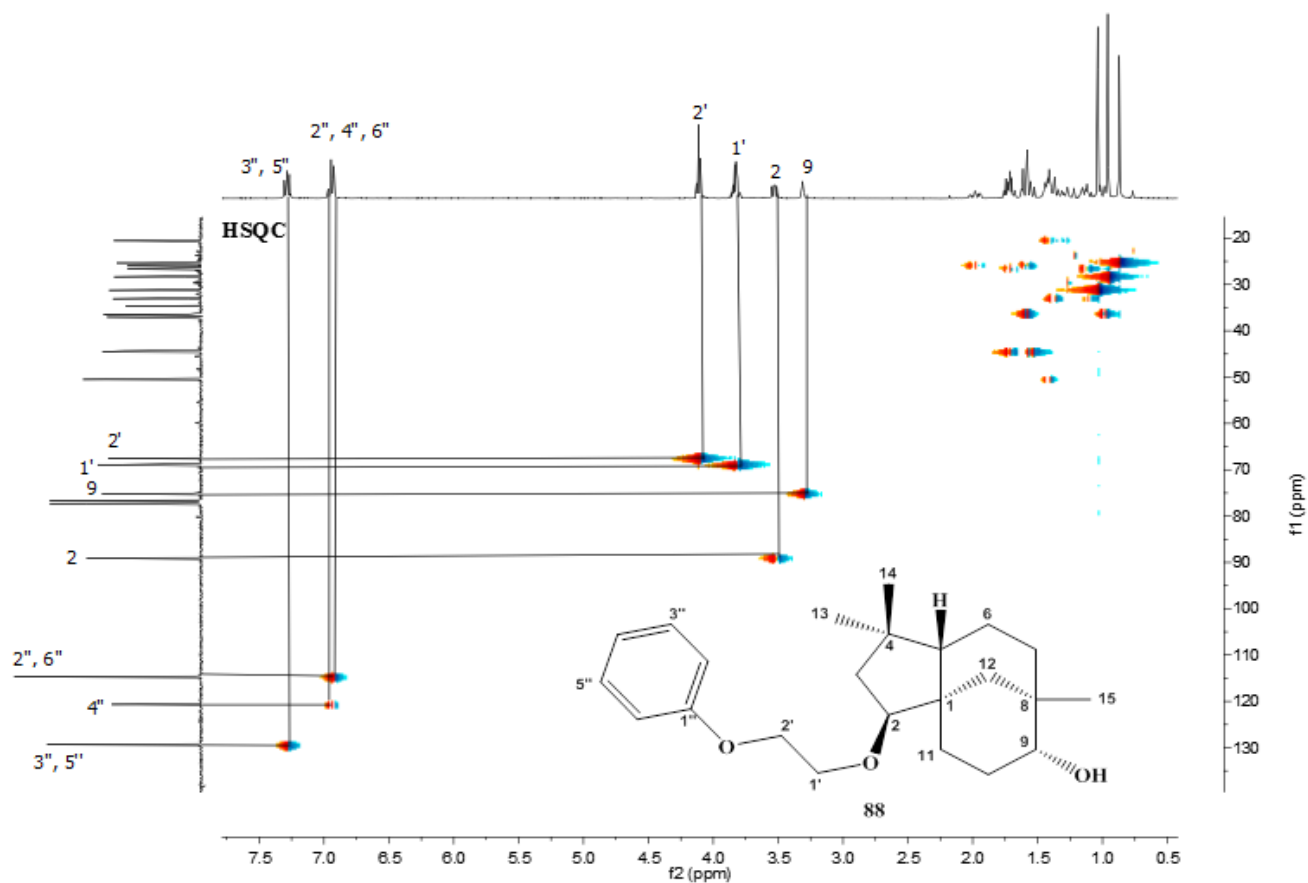
APÊNDICE L1 - Espectro na região do infravermelho (KBr) do composto **88**



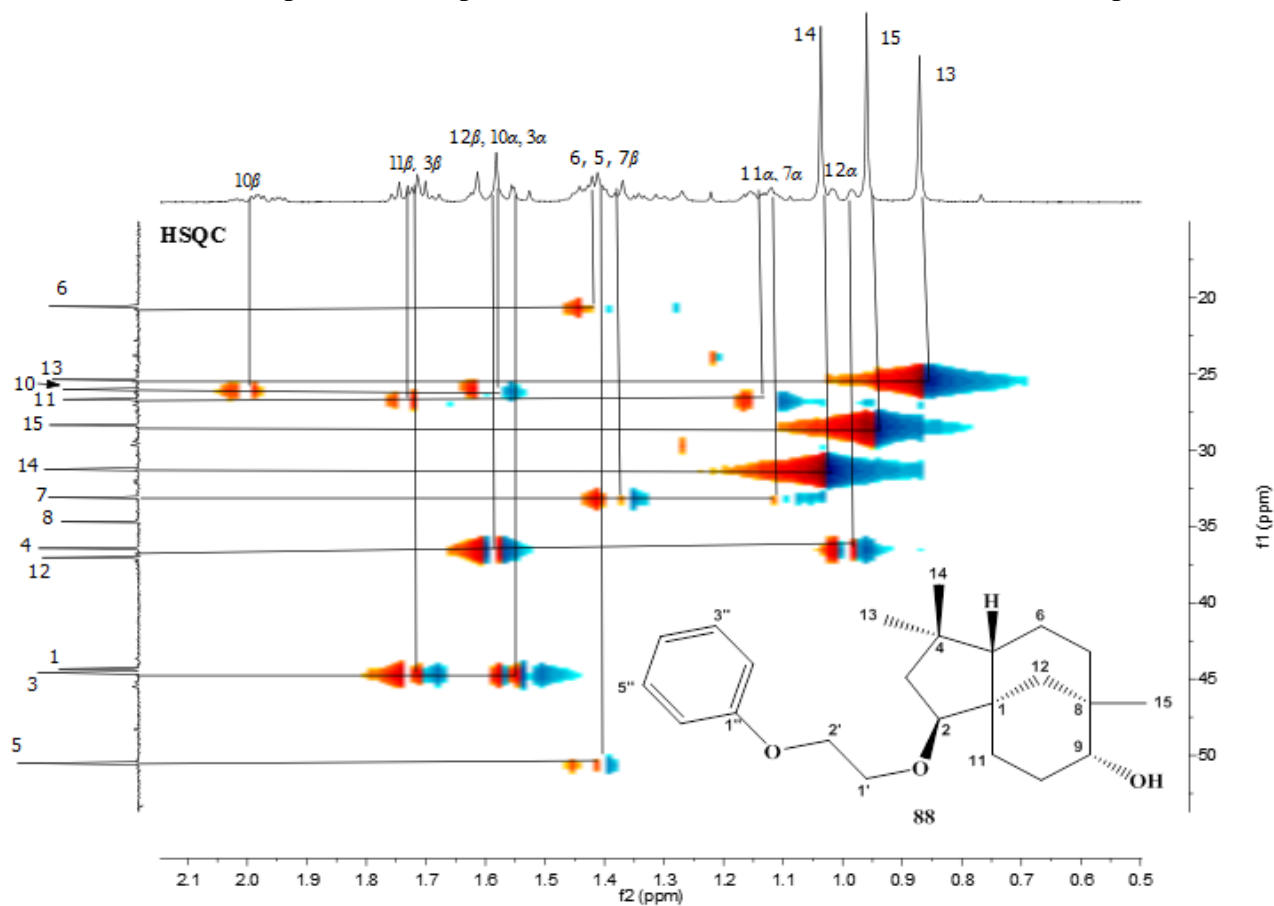
APÊNDICE M1 - Mapa de contornos COSY (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do composto **88**



APÊNDICE N1 - Mapa de contornos HSQC (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do composto **88**

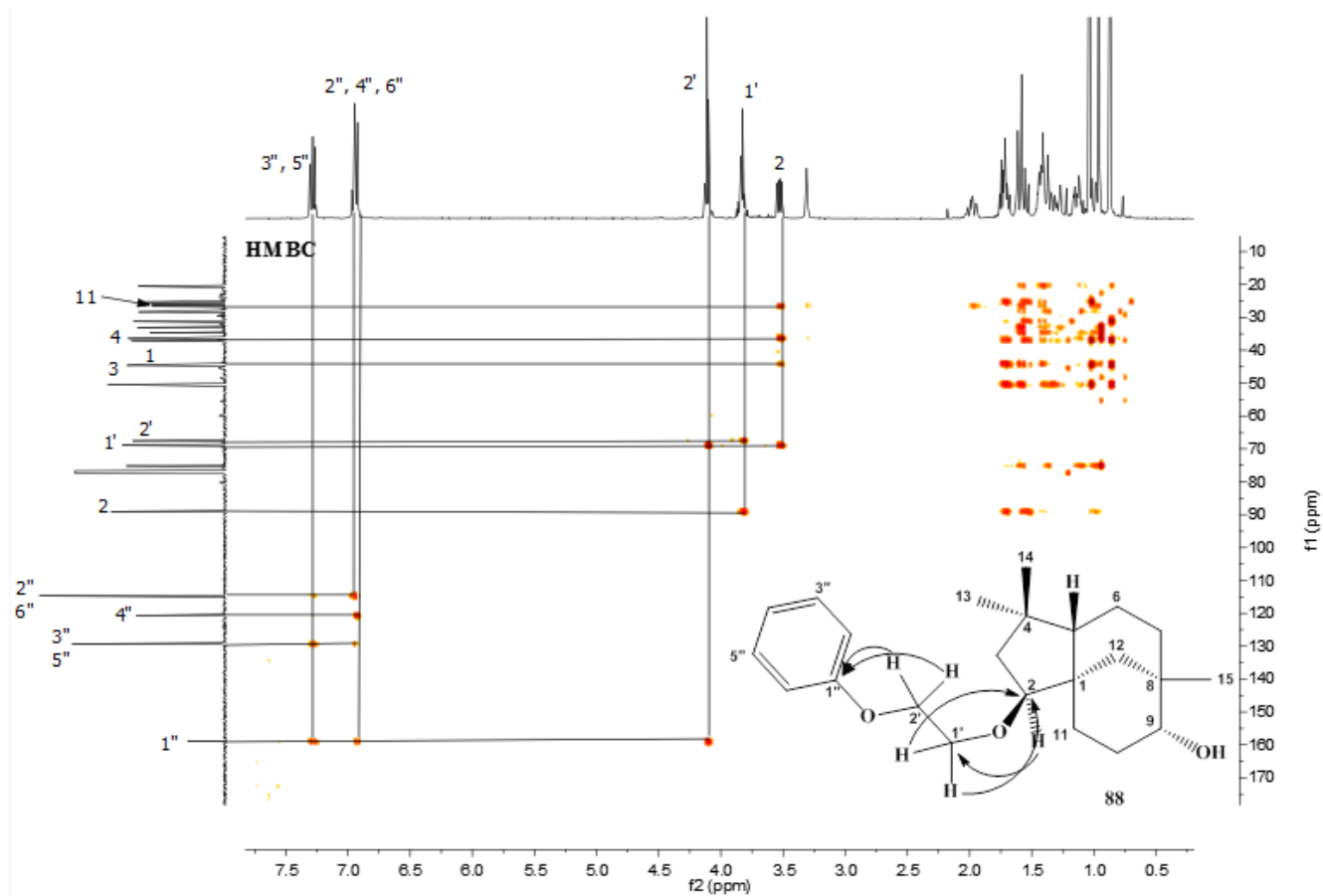


APÊNDICE O1 - Expansão do mapa de contornos HSQC (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do composto **88**

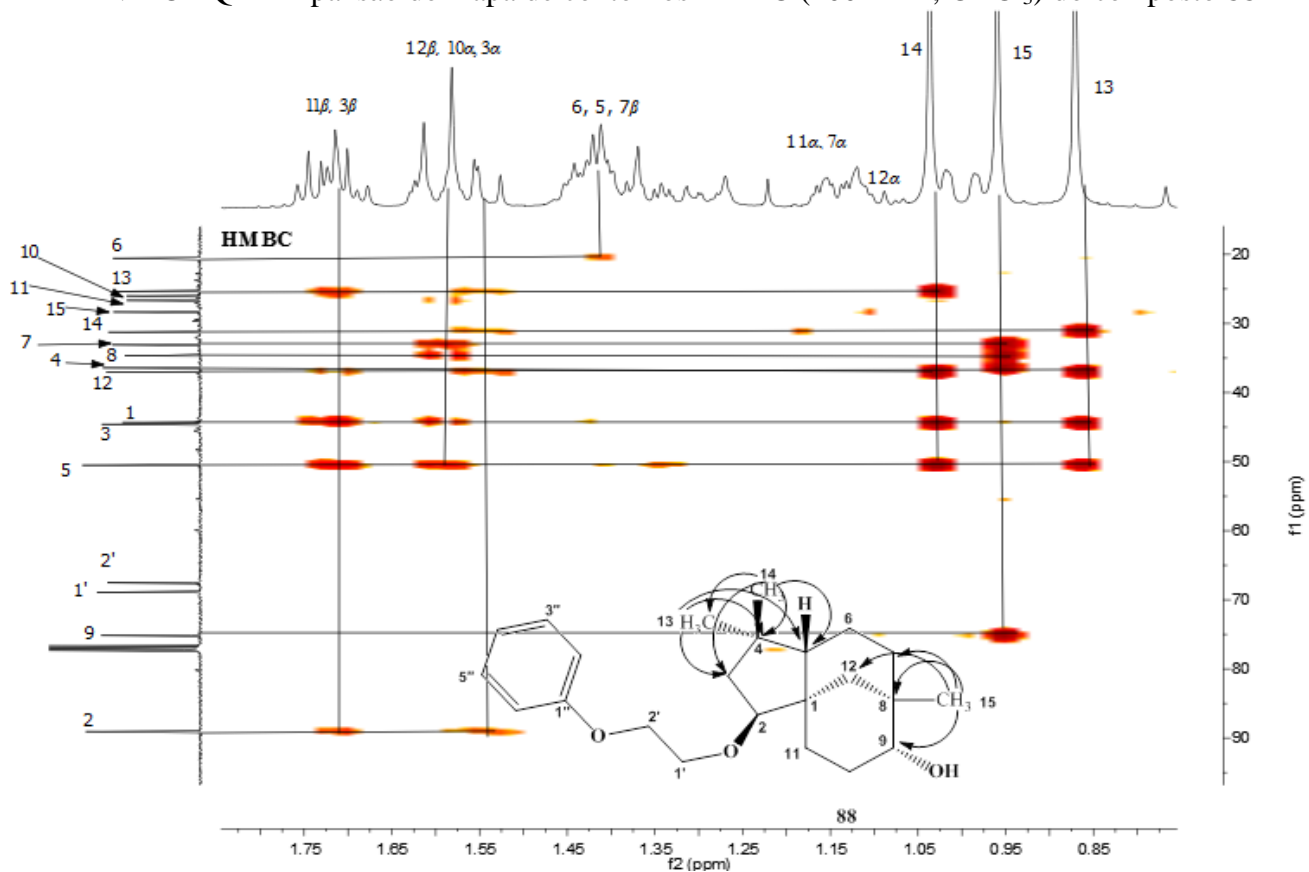




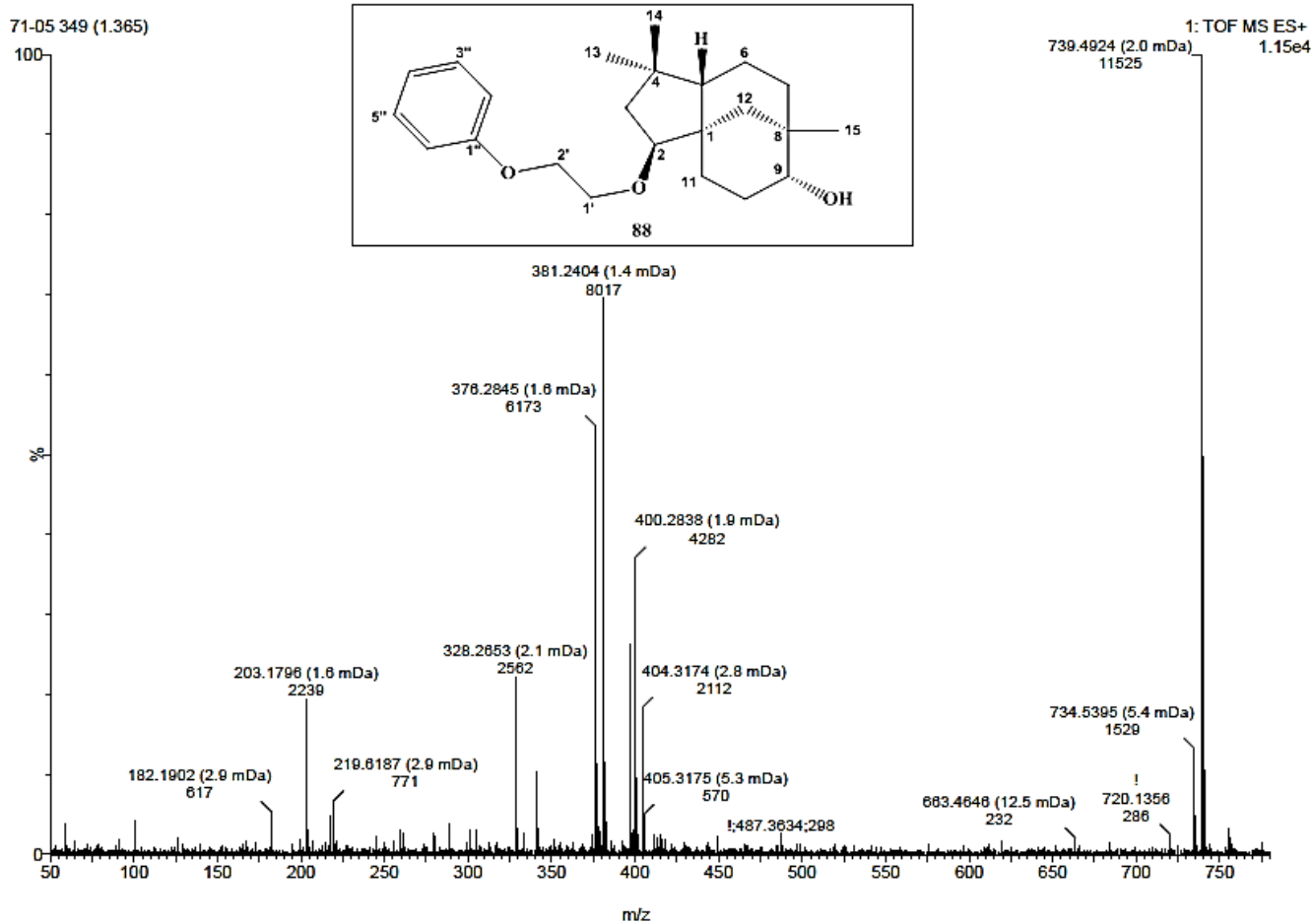
APÊNDICE P1 - Mapa de contornos HMBC (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do composto **88**



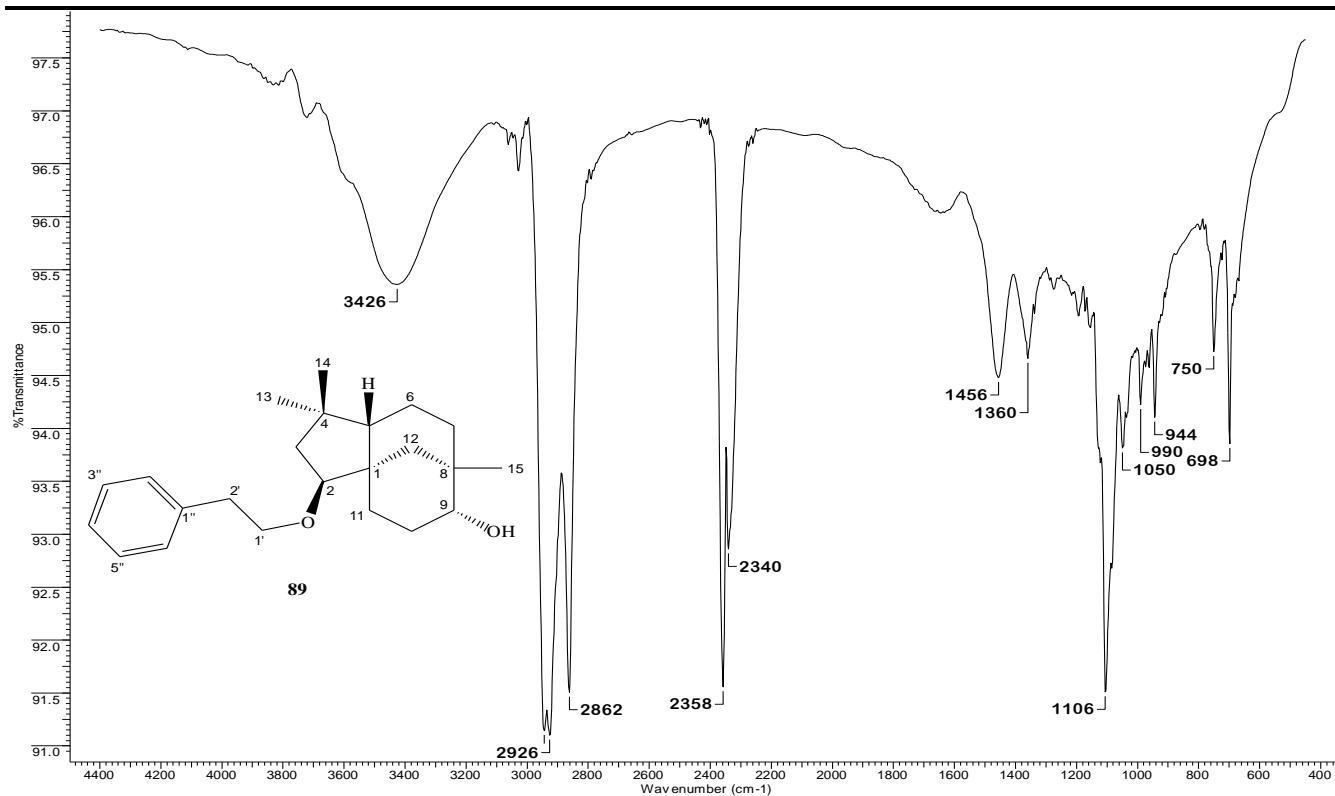
APÊNDICE Q1 - Expansão do mapa de contornos HMBC (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do composto **88**



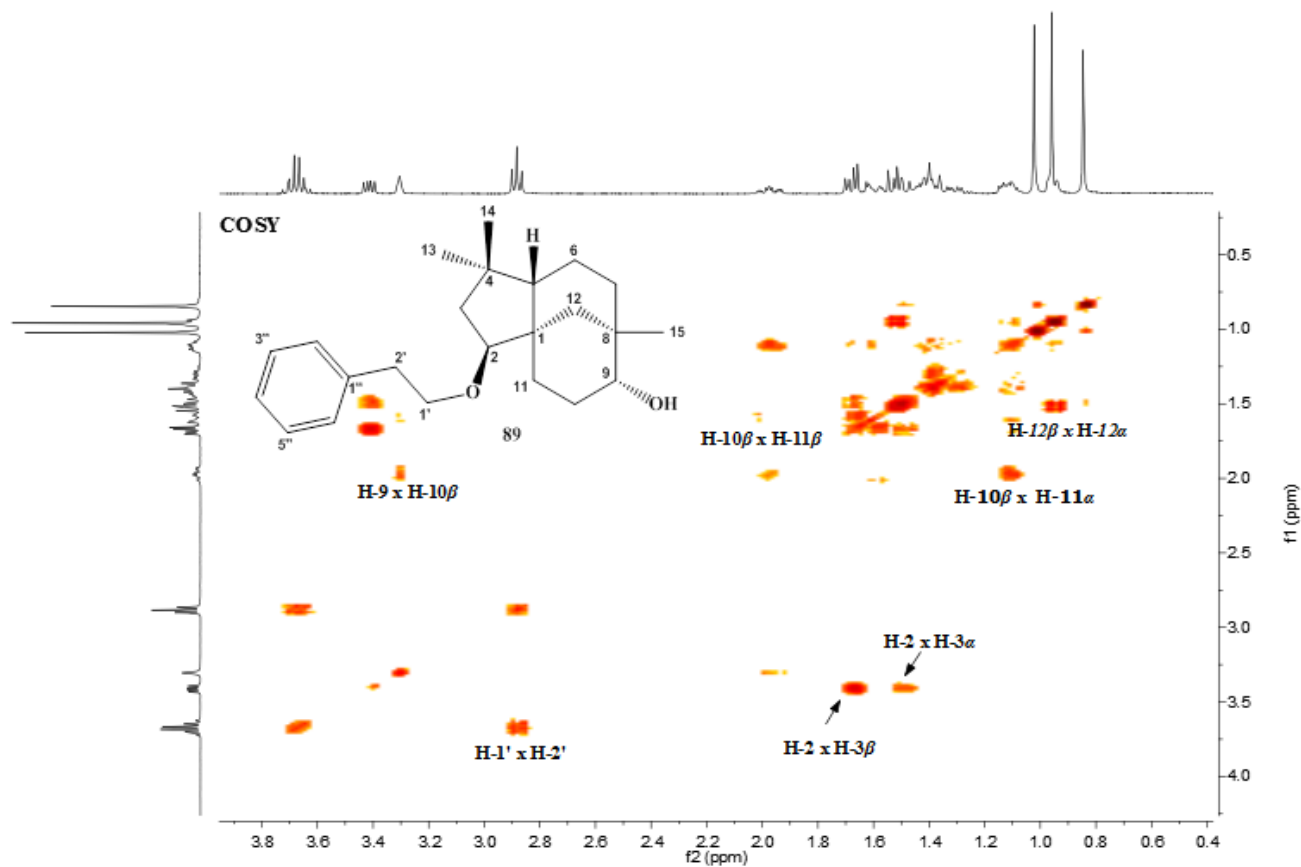
APÊNDICE R1 - Espectro massas EM-ESI positivo de **88**, obtido em um espectrofotômetro ESI-Q-TOF



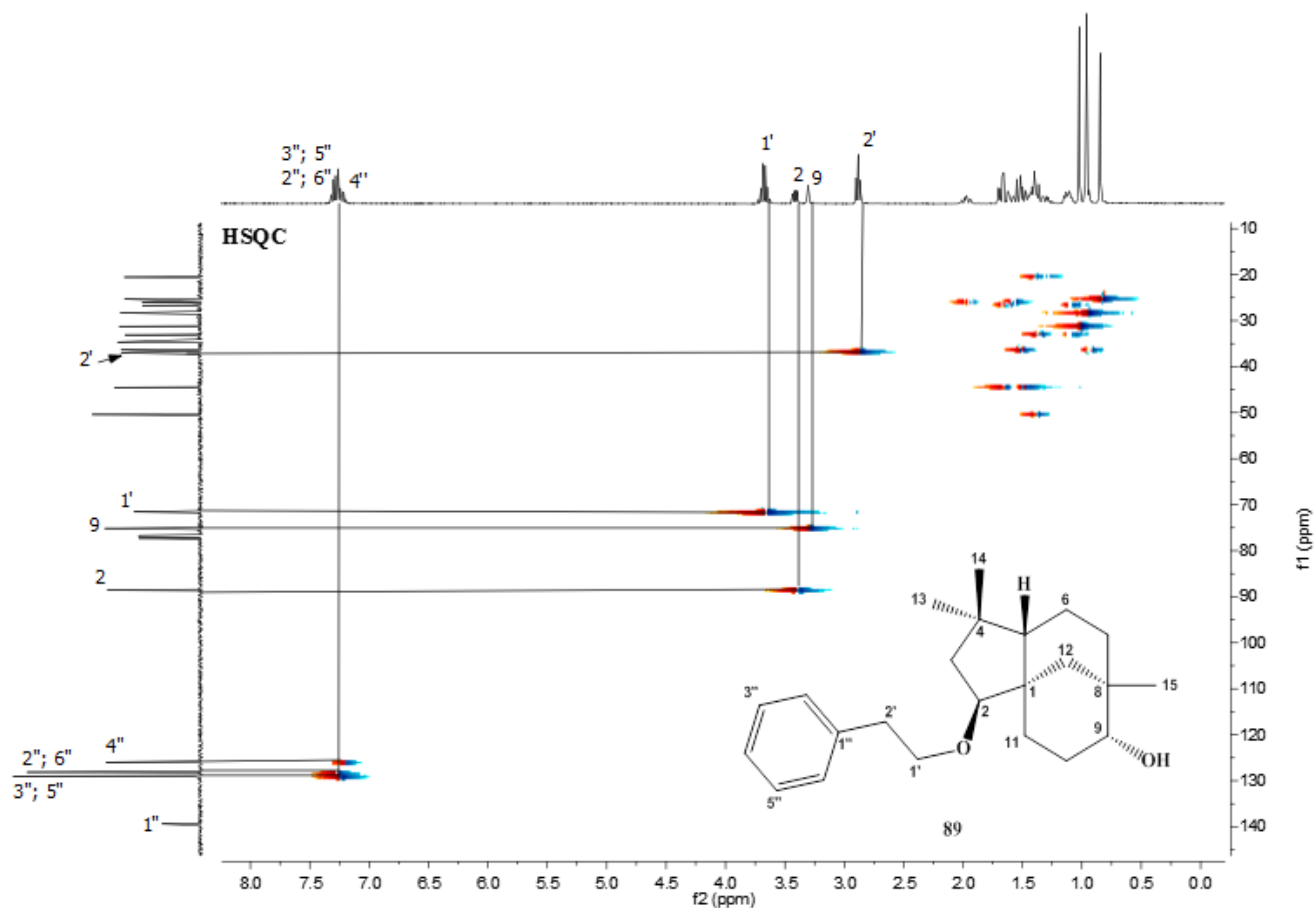
APÊNDICE S1 - Espectro na região do infravermelho (KBr) do composto **89**



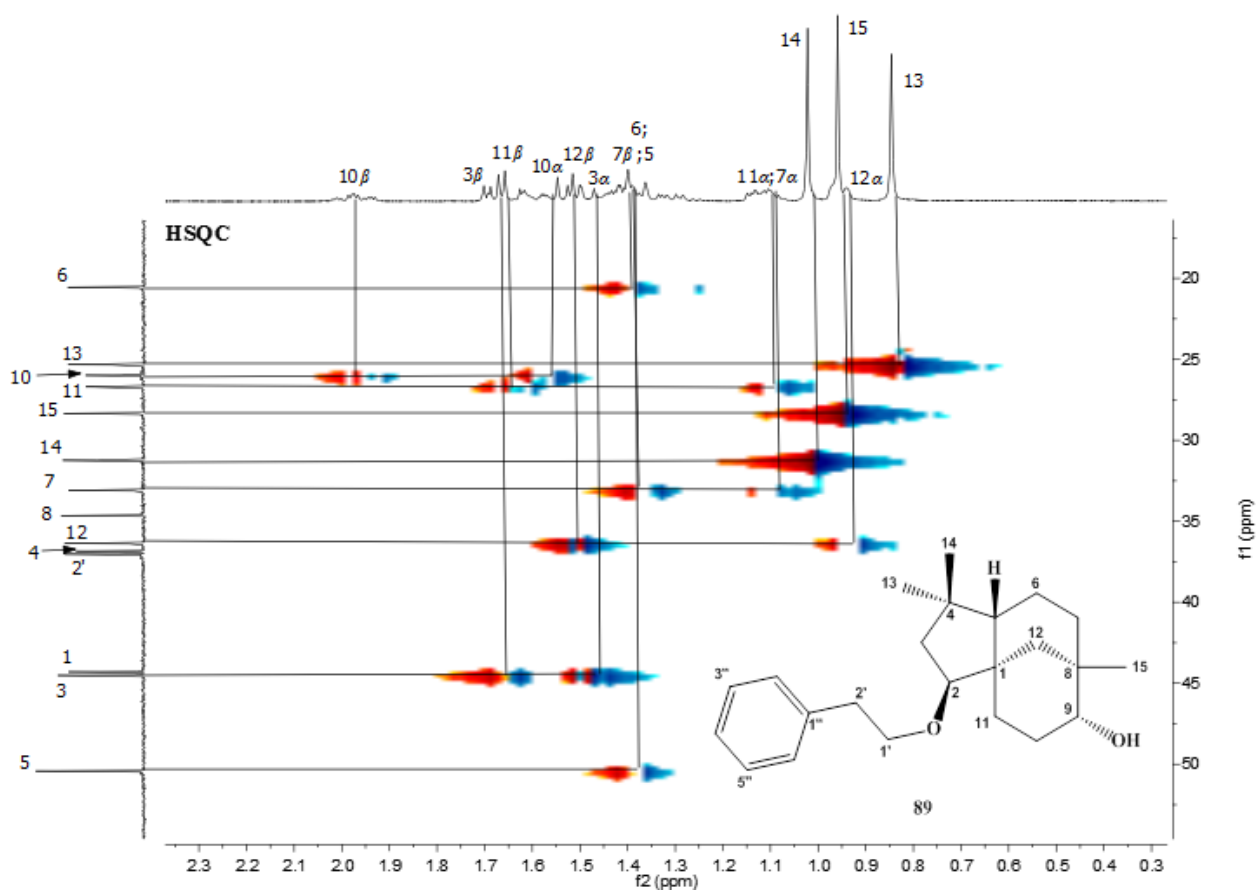
APÊNDICE T1 - Mapa de contornos COSY (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do composto **89**



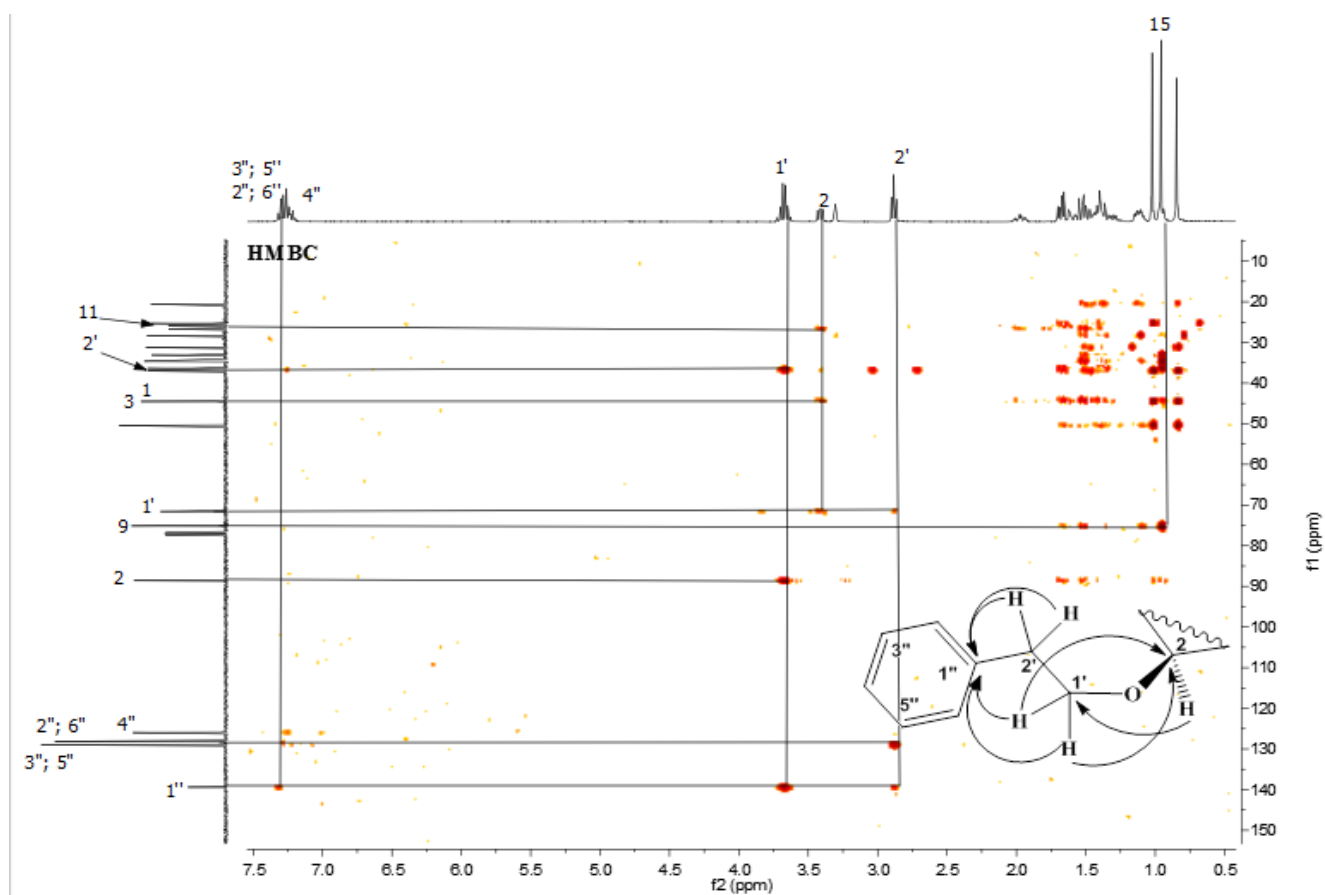
APÊNDICE U1 - Mapa de contornos HSQC (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do composto **89**



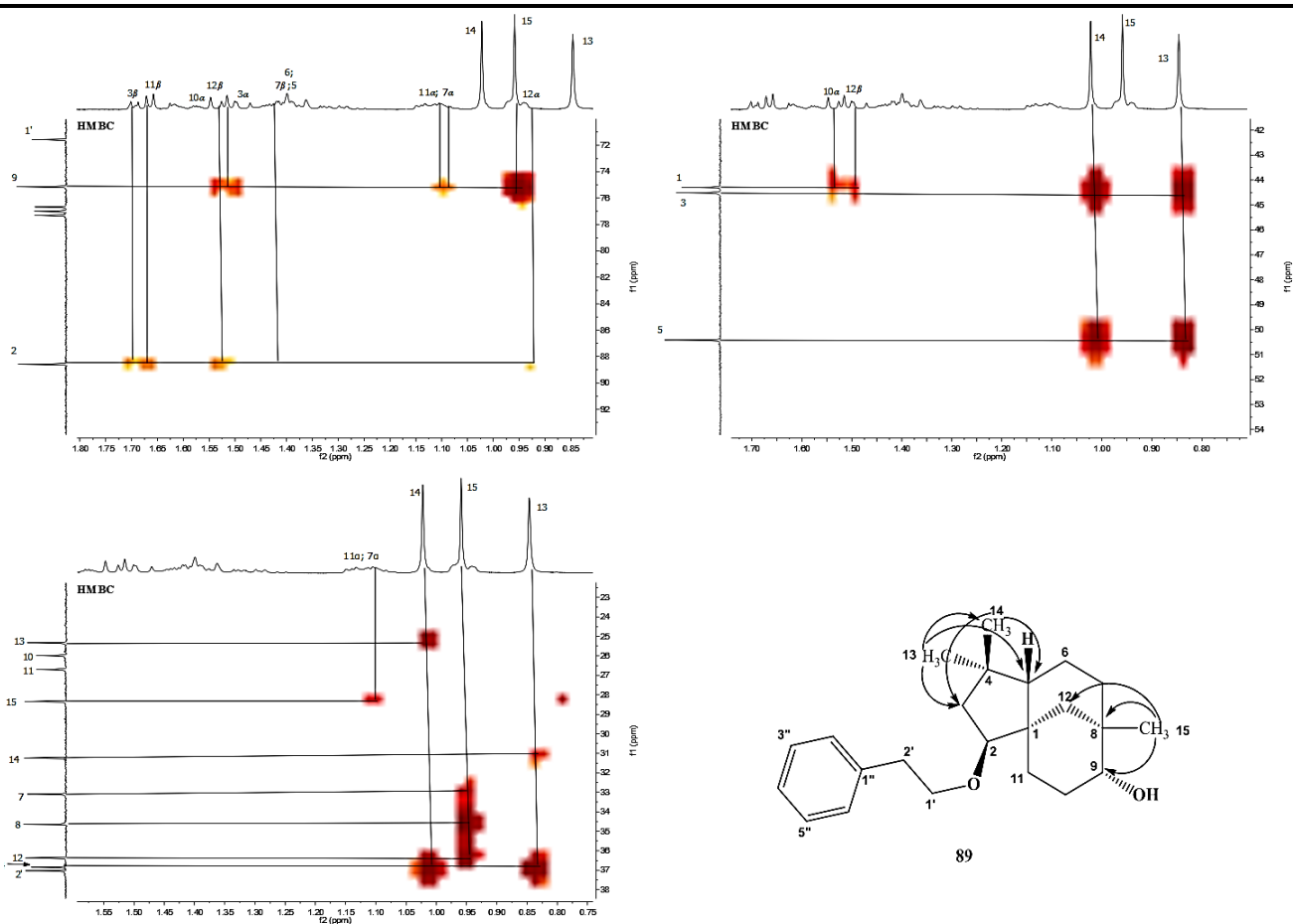
APÊNDICE V1 - Expansão do mapa de contornos HSQC (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do composto **89**



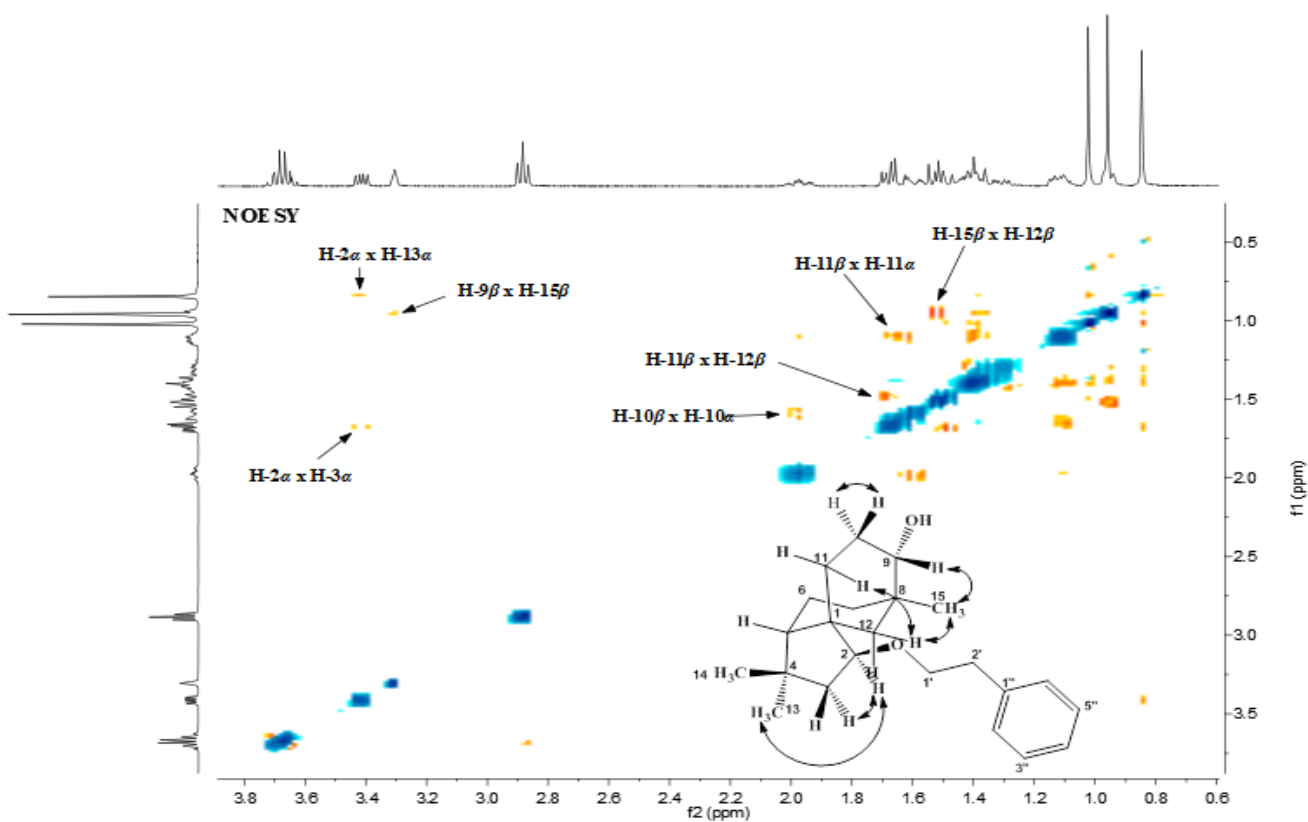
APÊNDICE X1 - Mapa de contornos HMBC (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do composto **89**



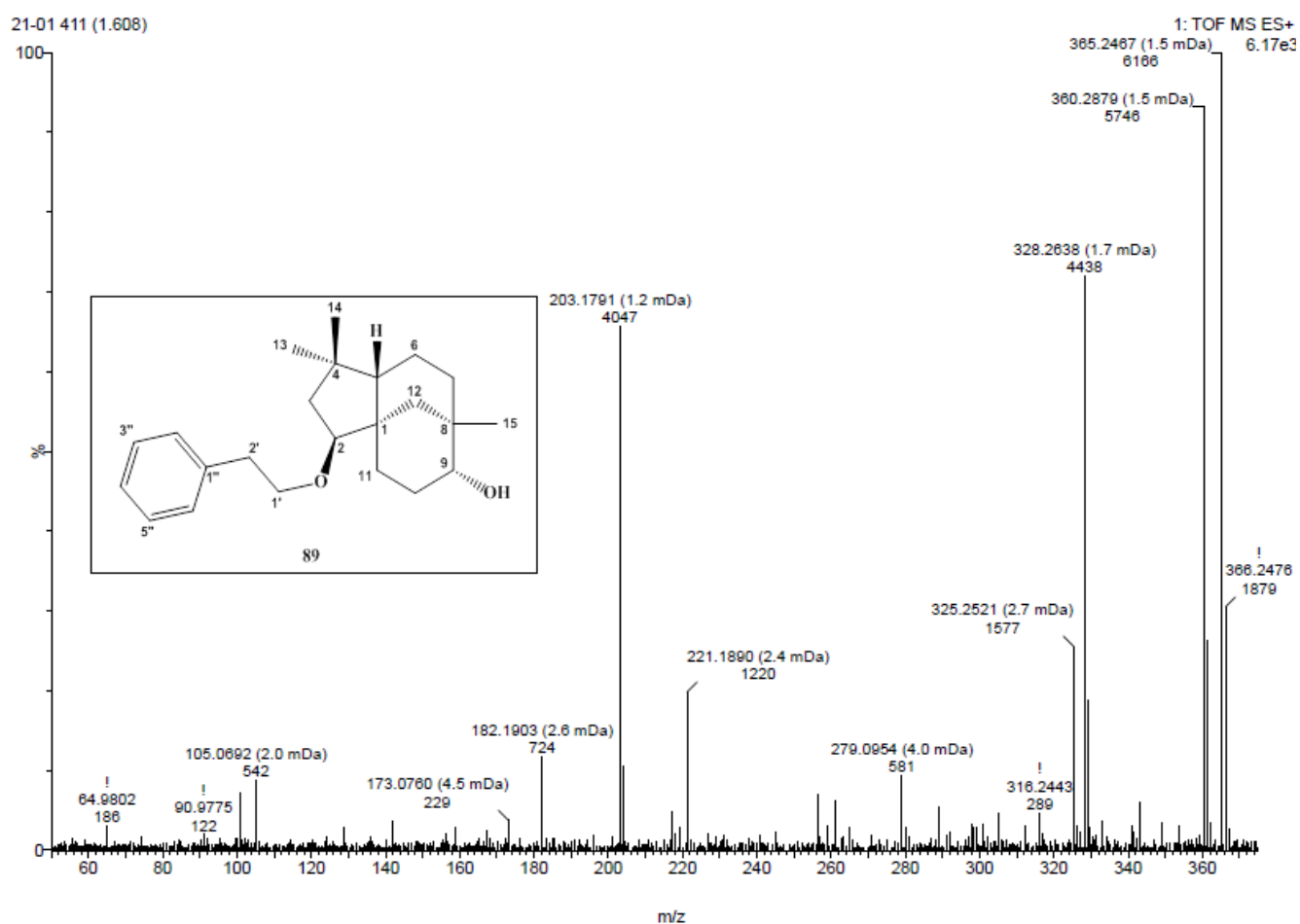
APÊNDICE Z1 - Expansões do mapa de contornos HMBC (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do composto **89**



APÊNDICE A2 - Mapa de contornos NOESY (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do composto **89**

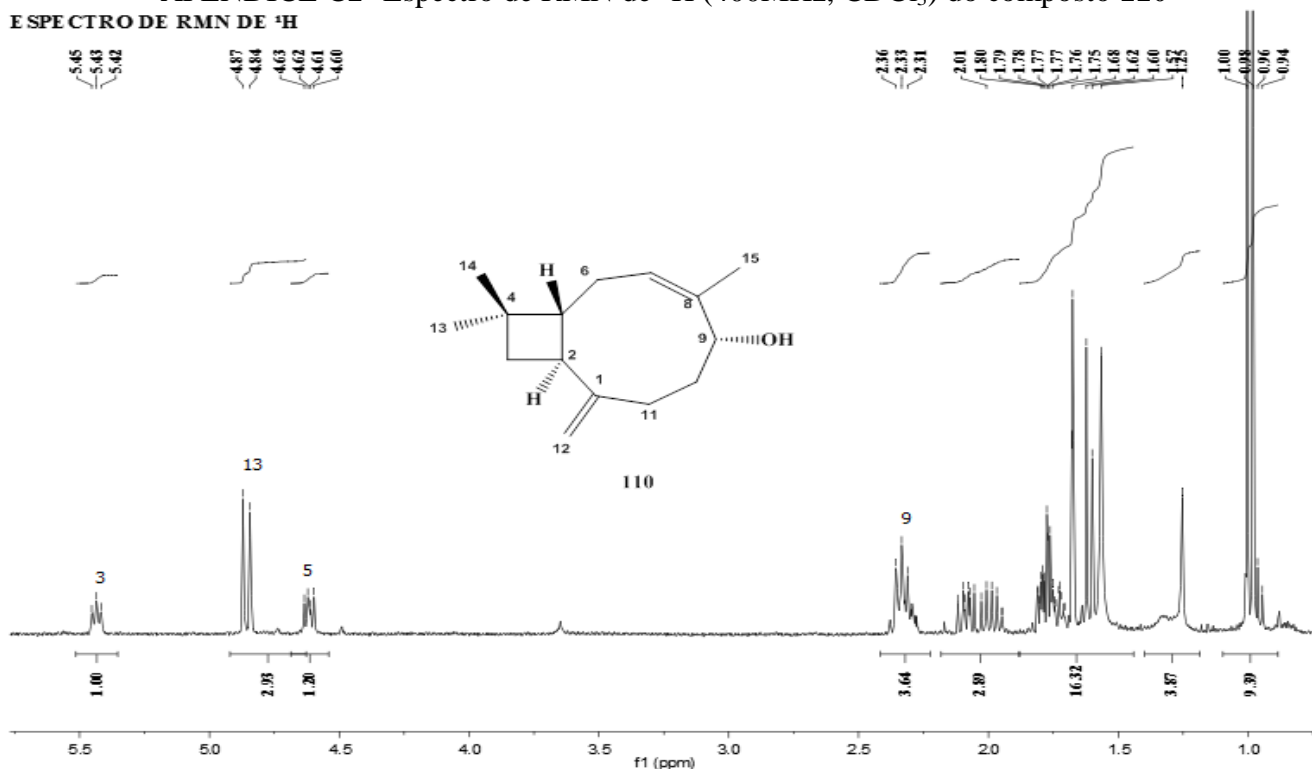


APÊNDICE B2 - Espectro massas EM-ESI positivo de **89**, obtido em um espectrofotômetro ESI-Q-TOF



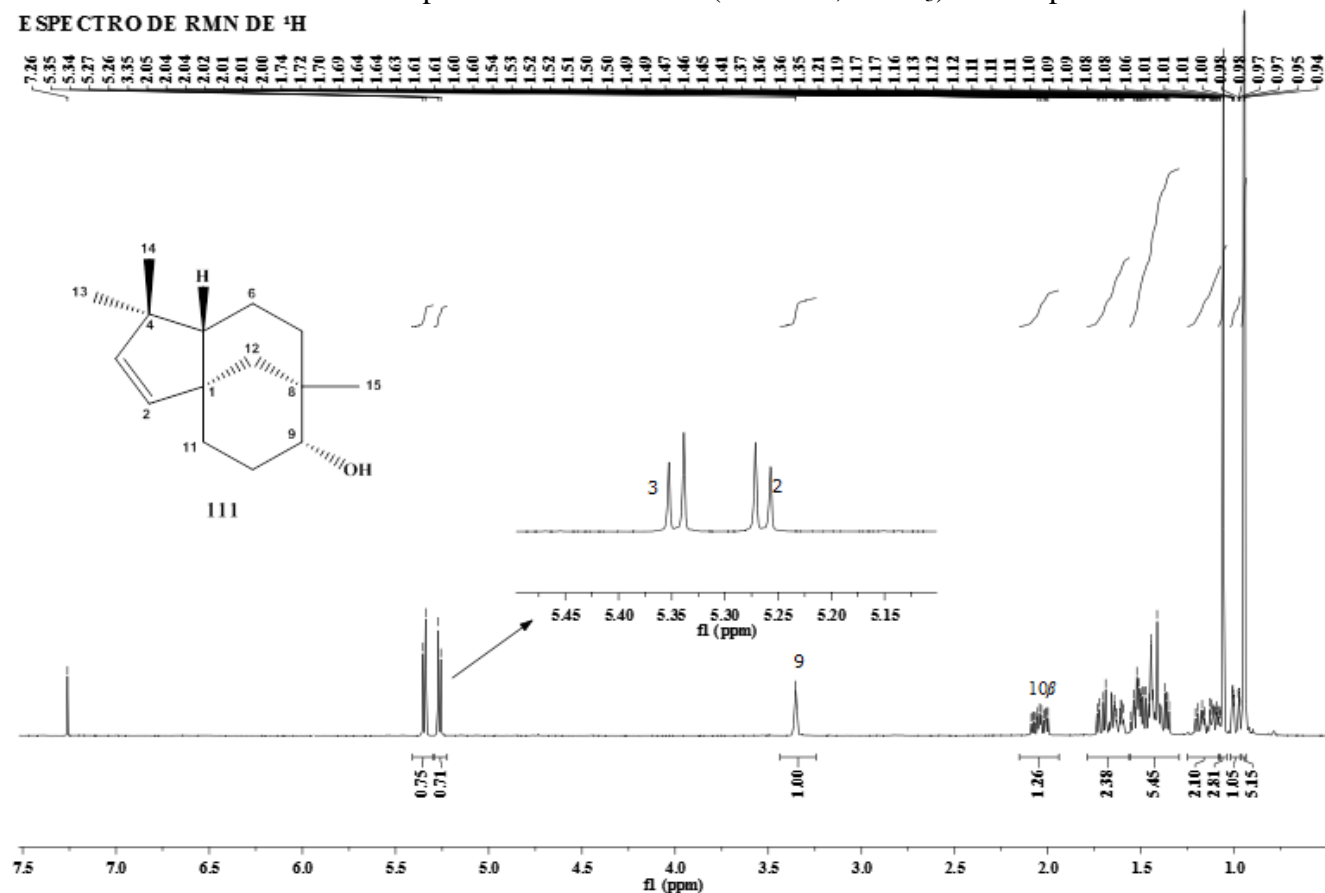
APÊNDICE C2- Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do composto **110**

ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$



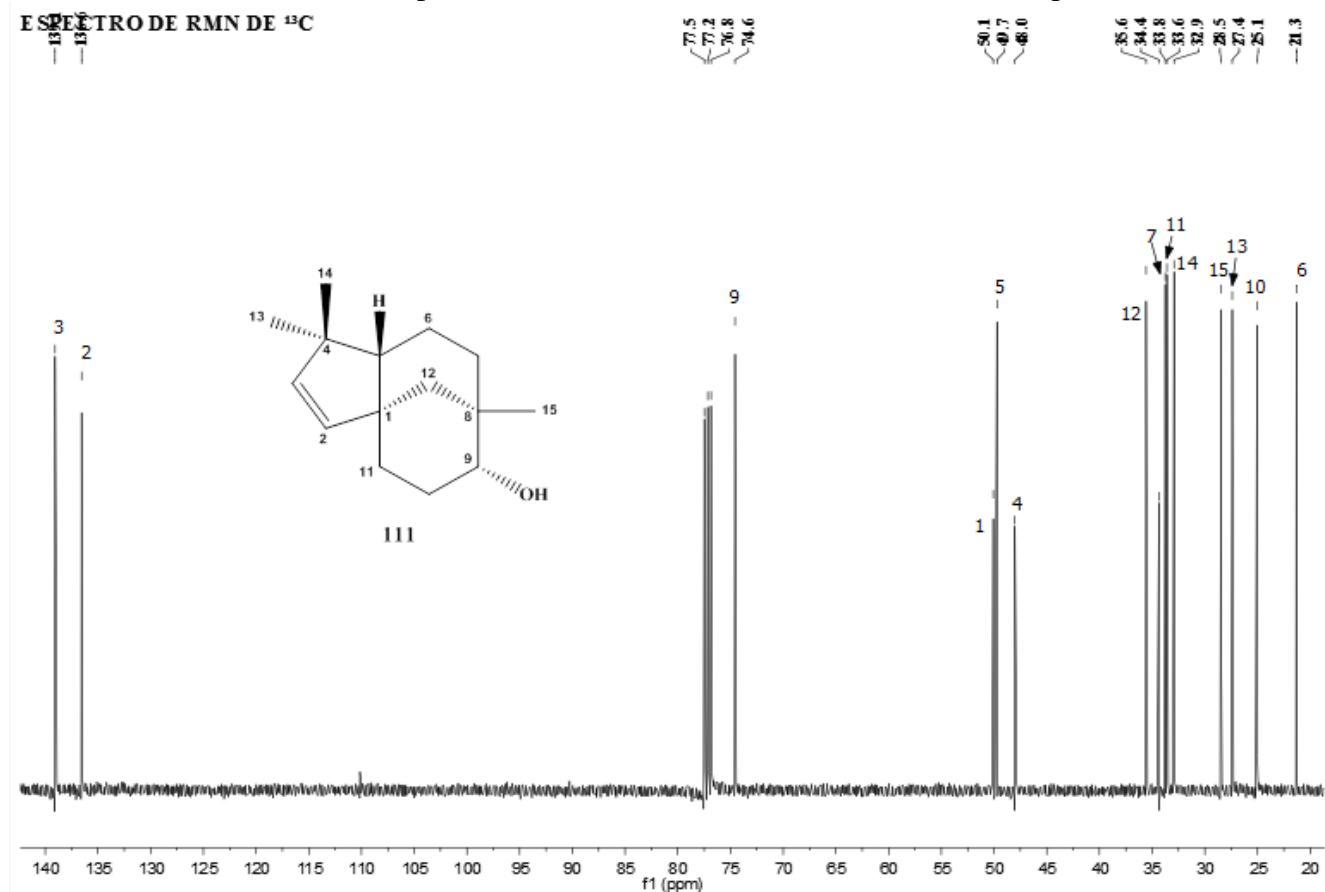
APÊNDICE D2- Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do composto **111**

ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$



APÊNDICE E2- Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do composto **111**

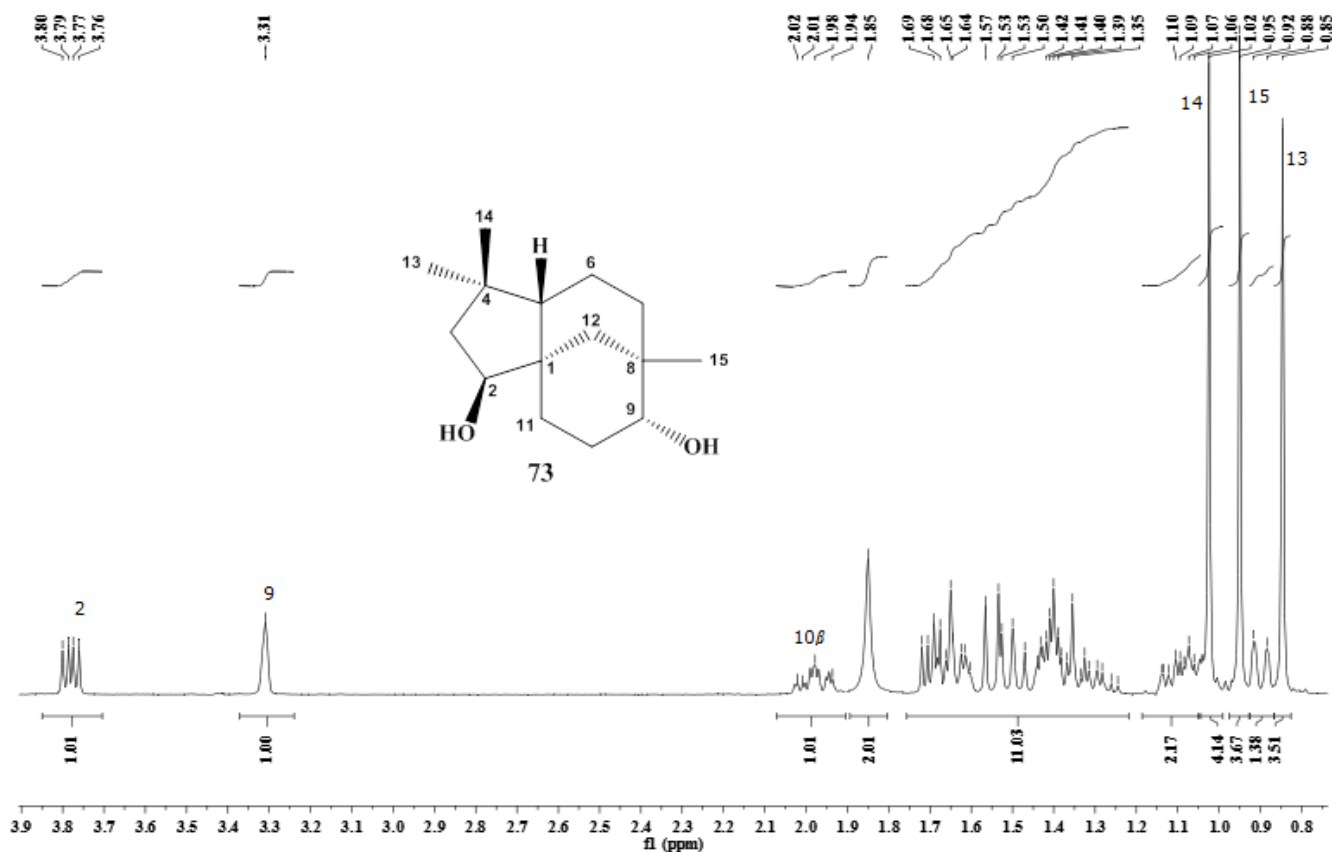
ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$





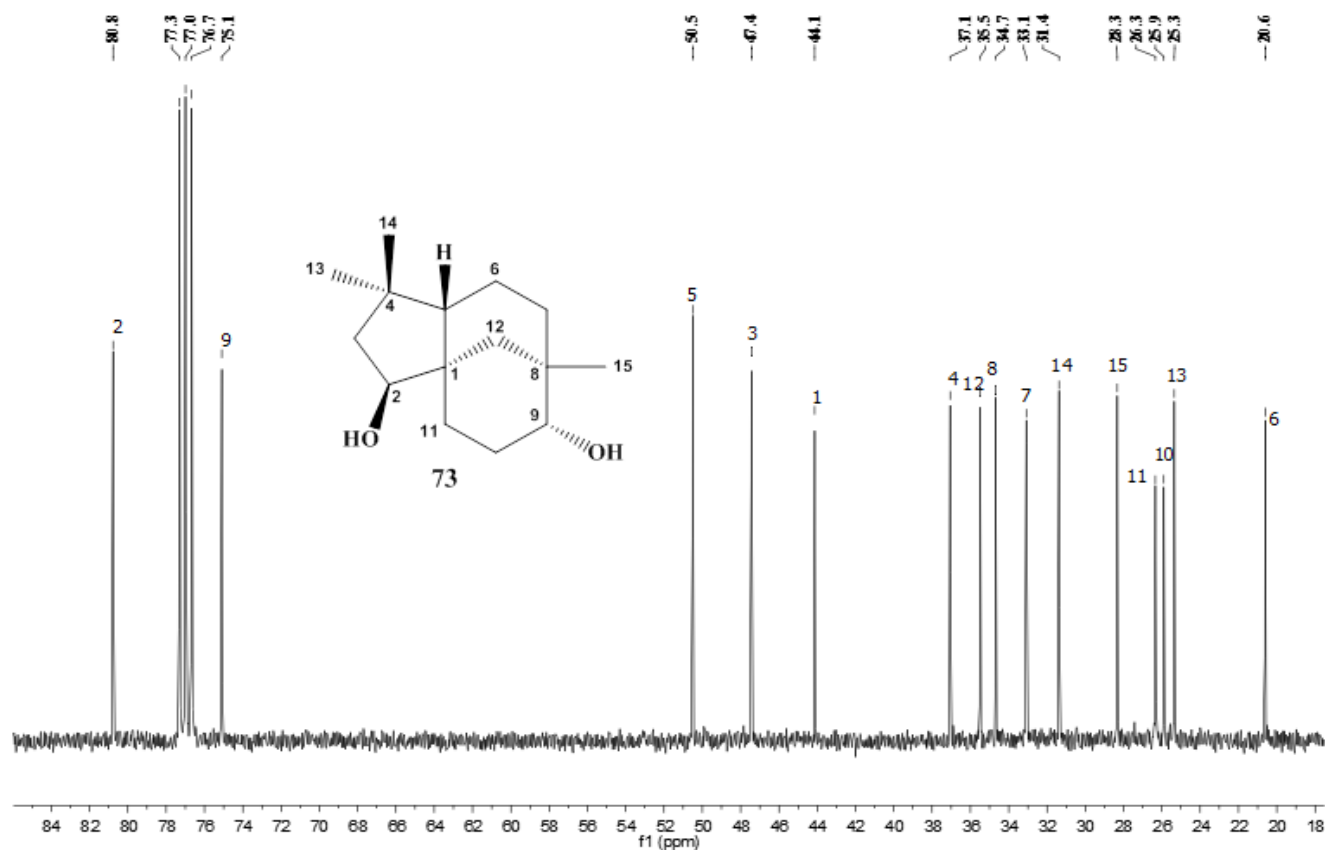
APÊNDICE F2- Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do composto **73**

E SPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$

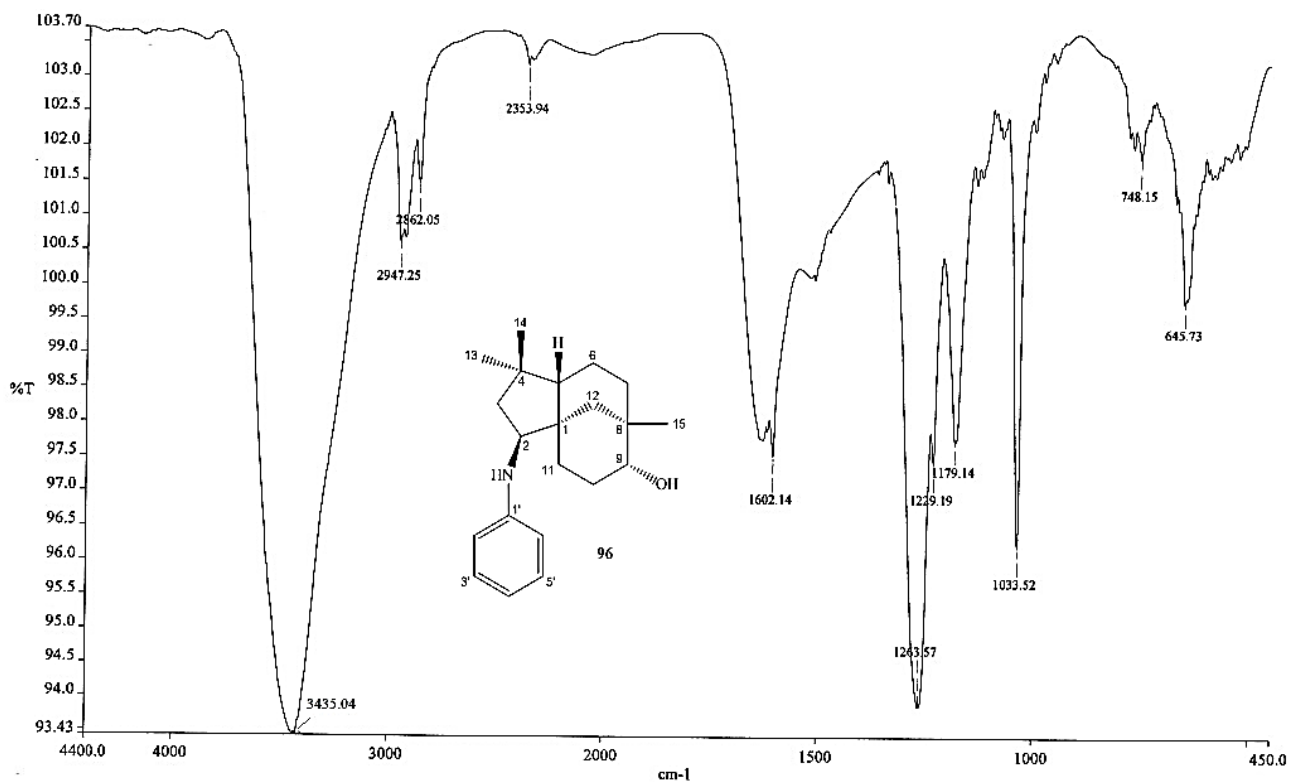


APÊNDICE G2- Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do composto **73**

E SPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$

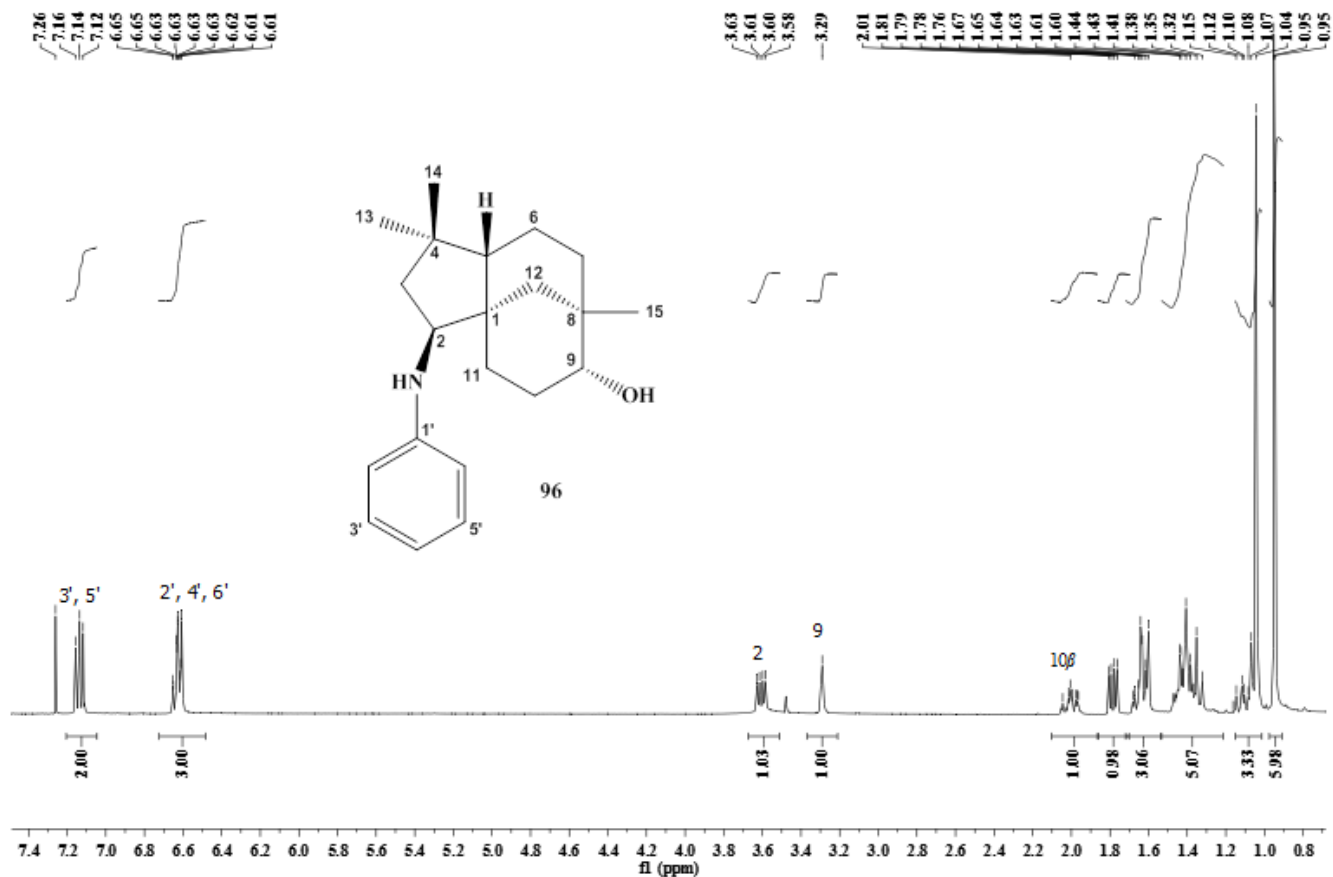


APÊNDICE H2 - Espectro na região do infravermelho (KBr) do composto **96**



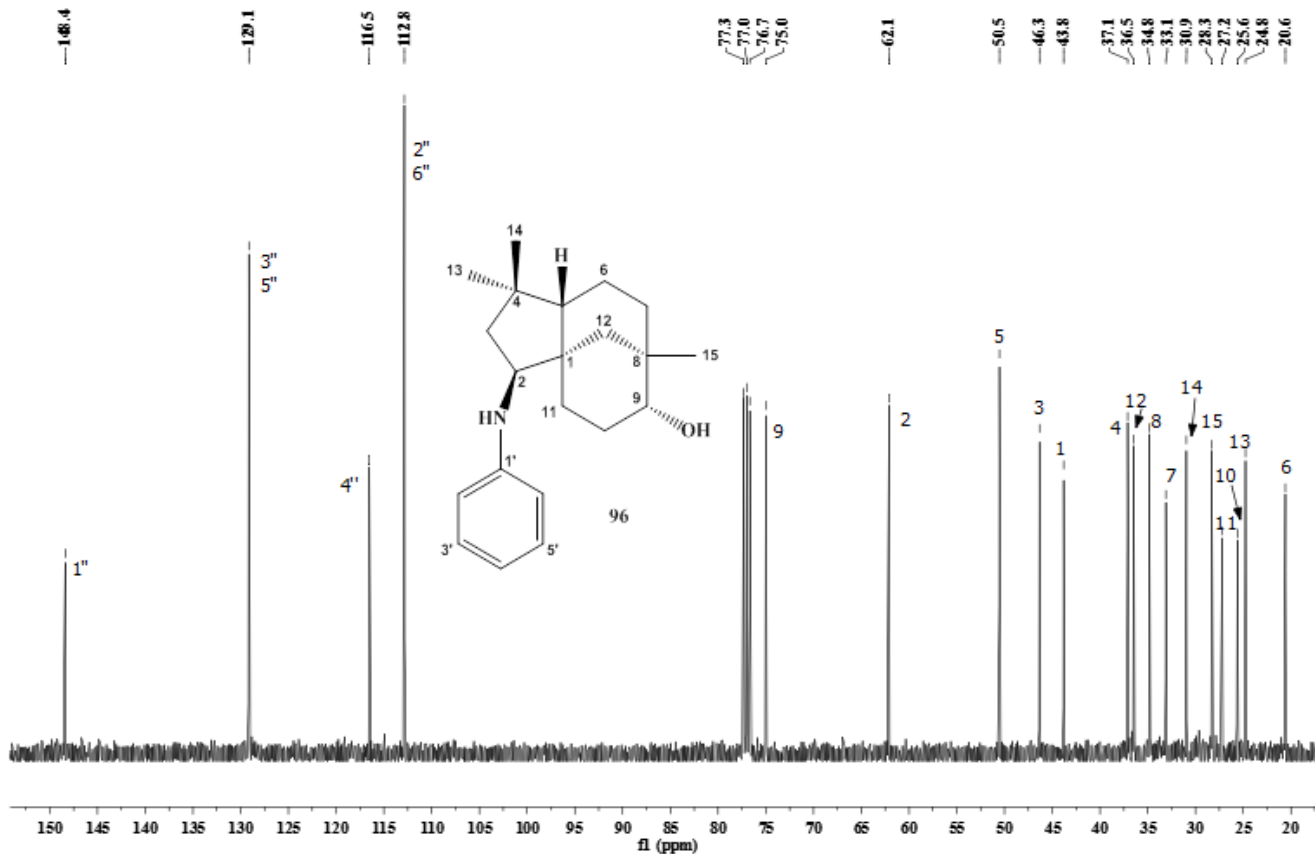
APÊNDICE I2- Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do composto **96**

ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$

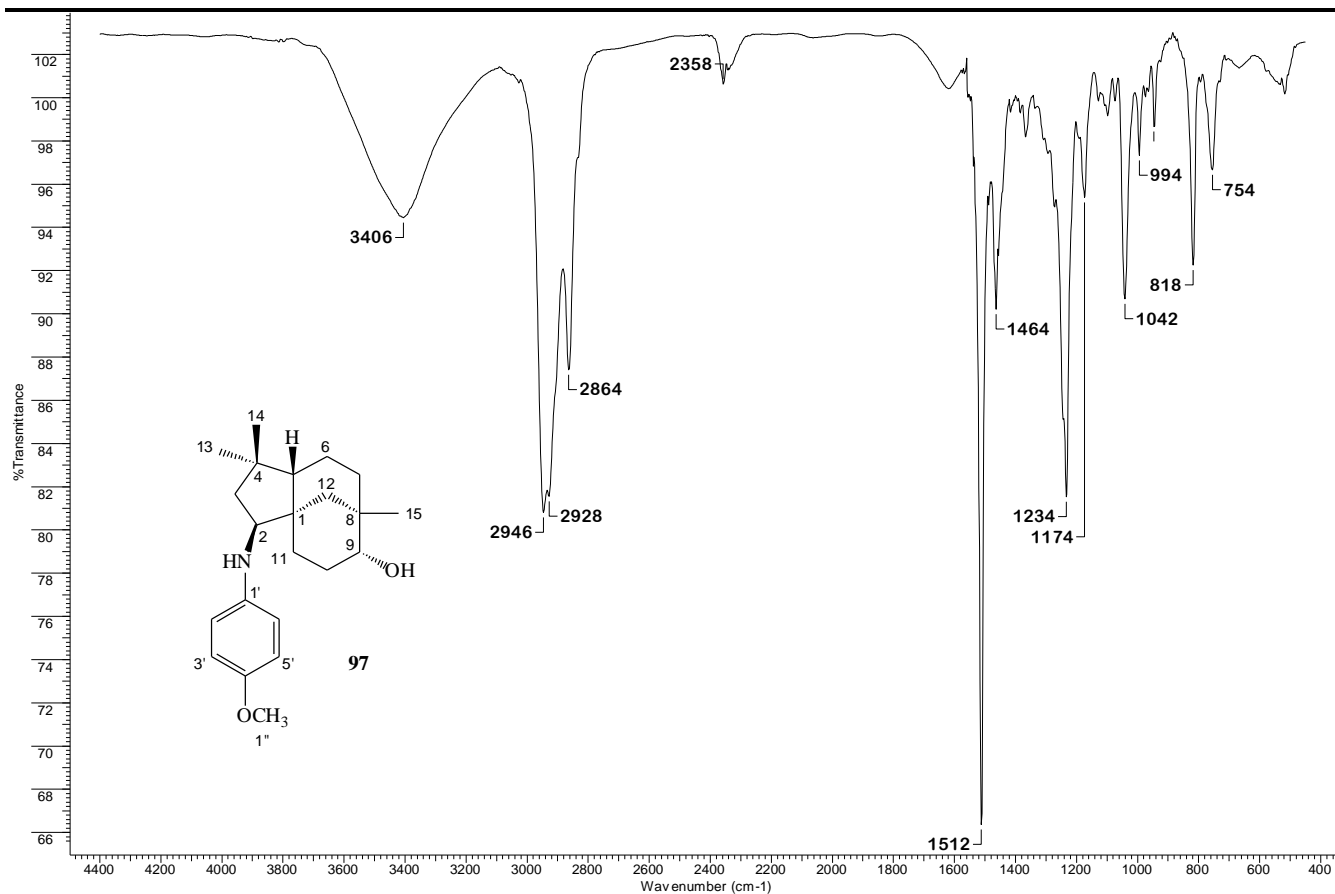


APÊNDICE J2- Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do composto **96**

E SPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$

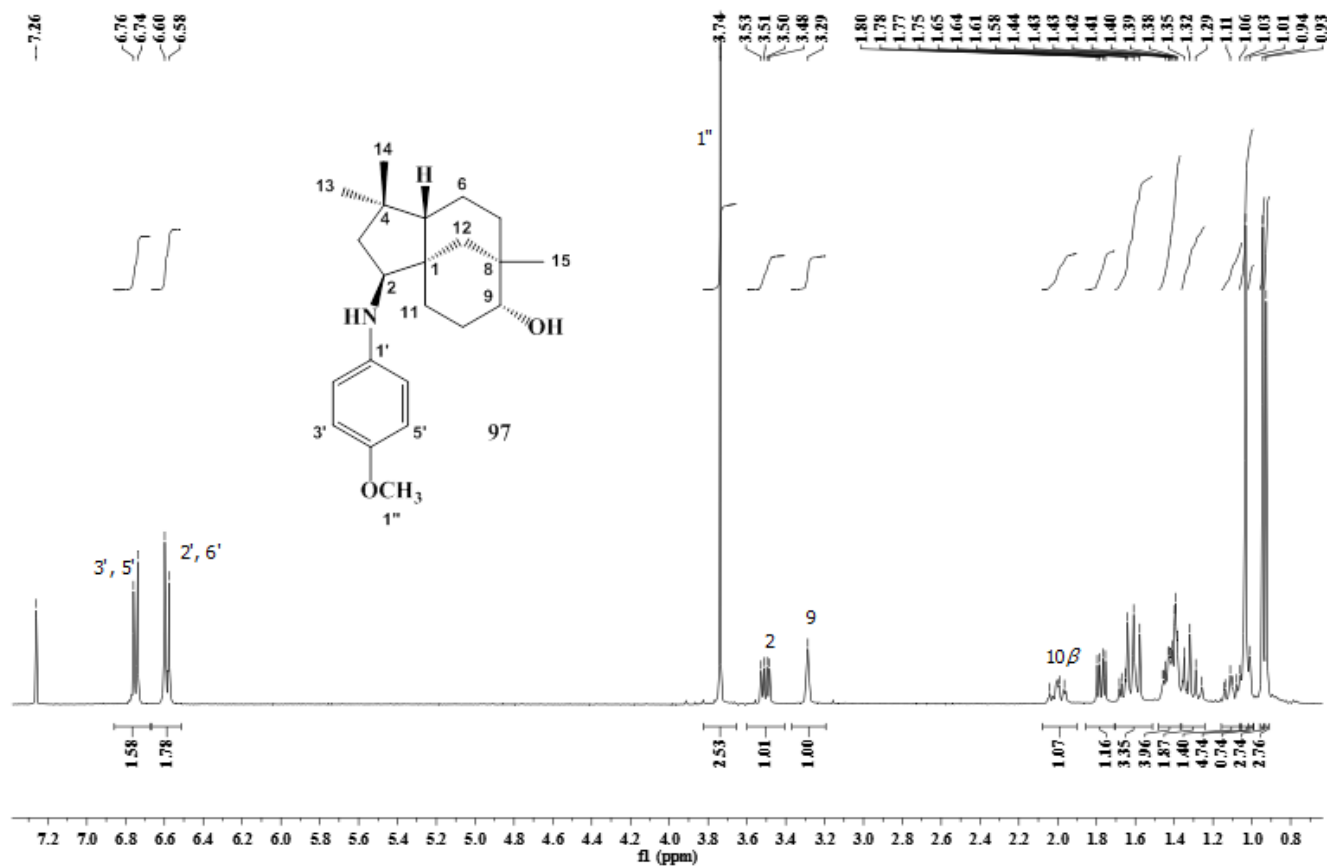


APÊNDICE L2 - Espectro na região do infravermelho (KBr) do composto **97**



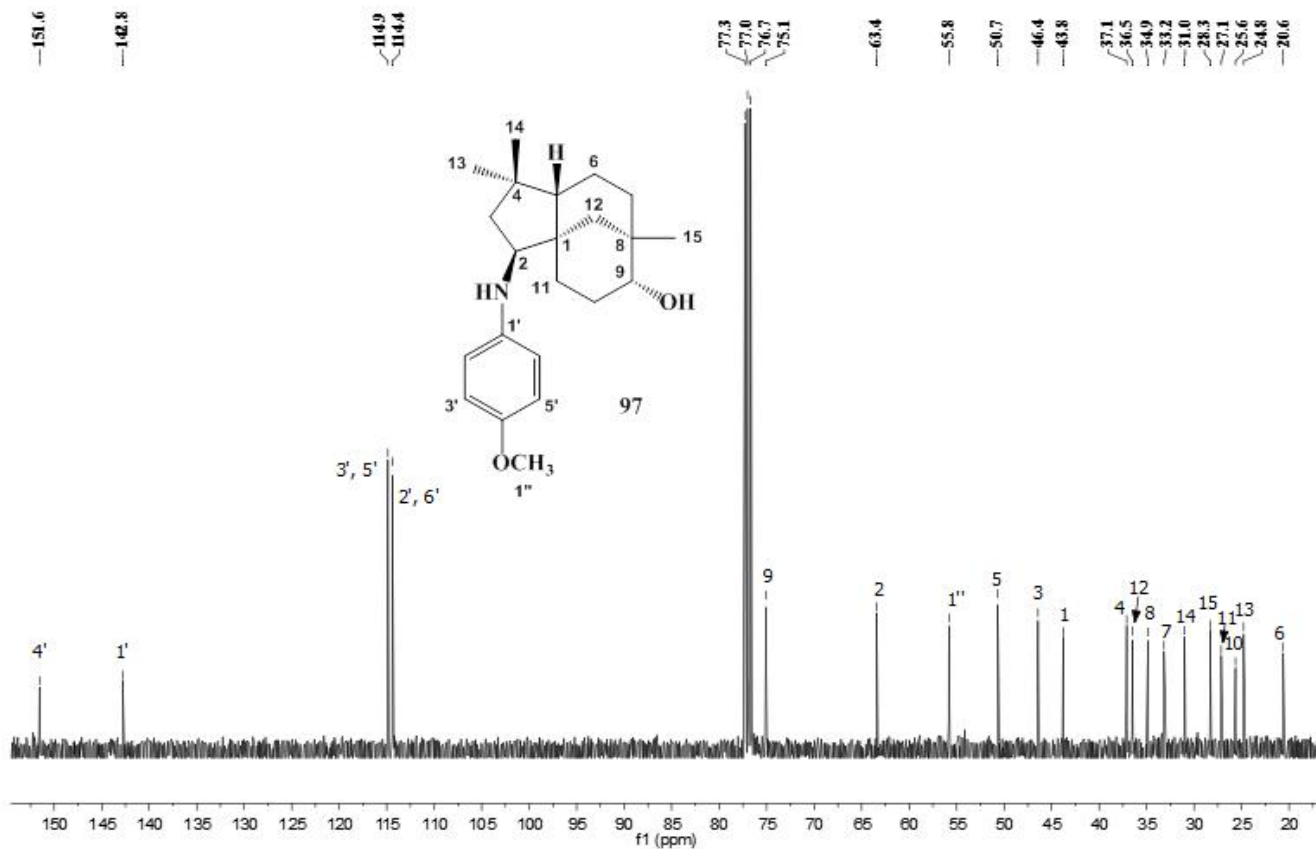
APÊNDICE M2 - Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) do composto **97**

ESPECTRO DE RMN DE <sup>1</sup>H

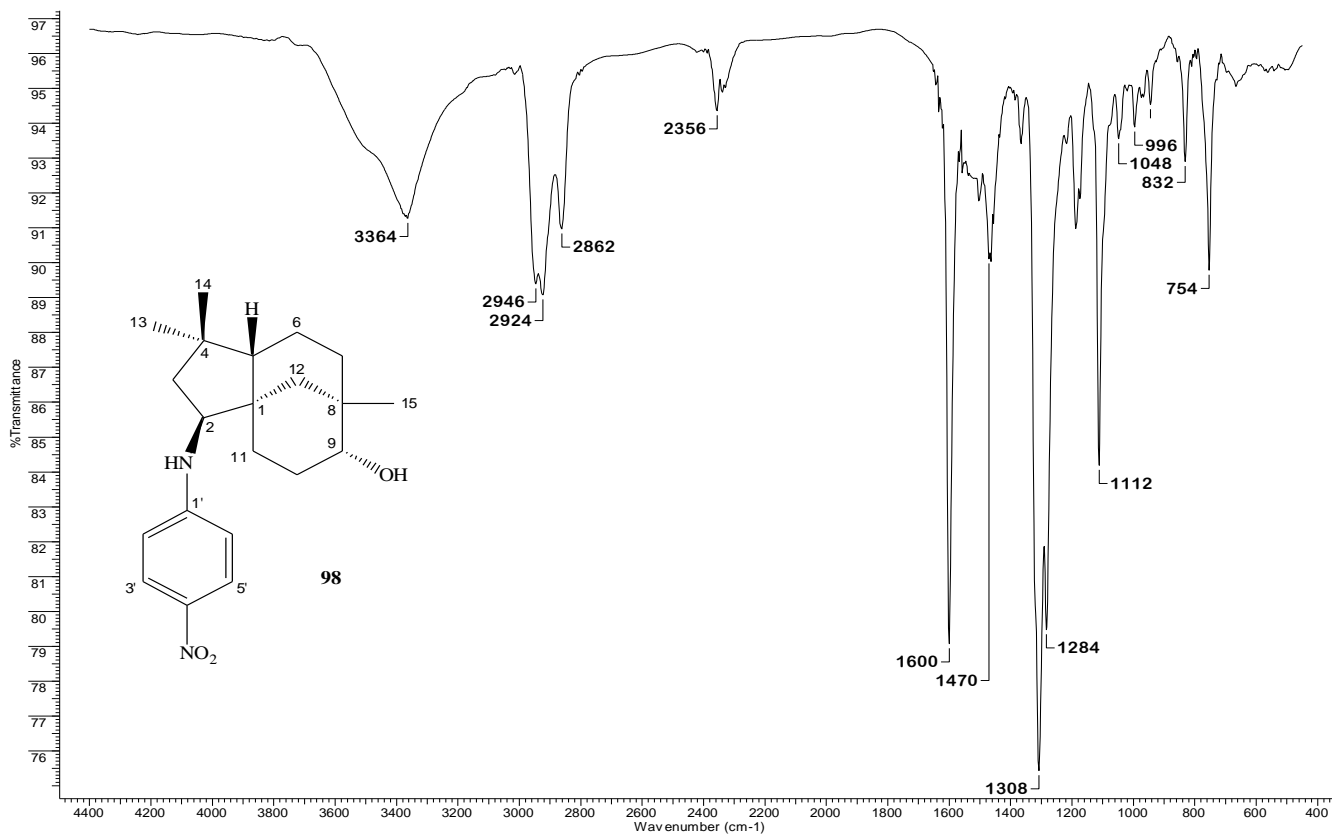


APÊNDICE N2- Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do composto **97**

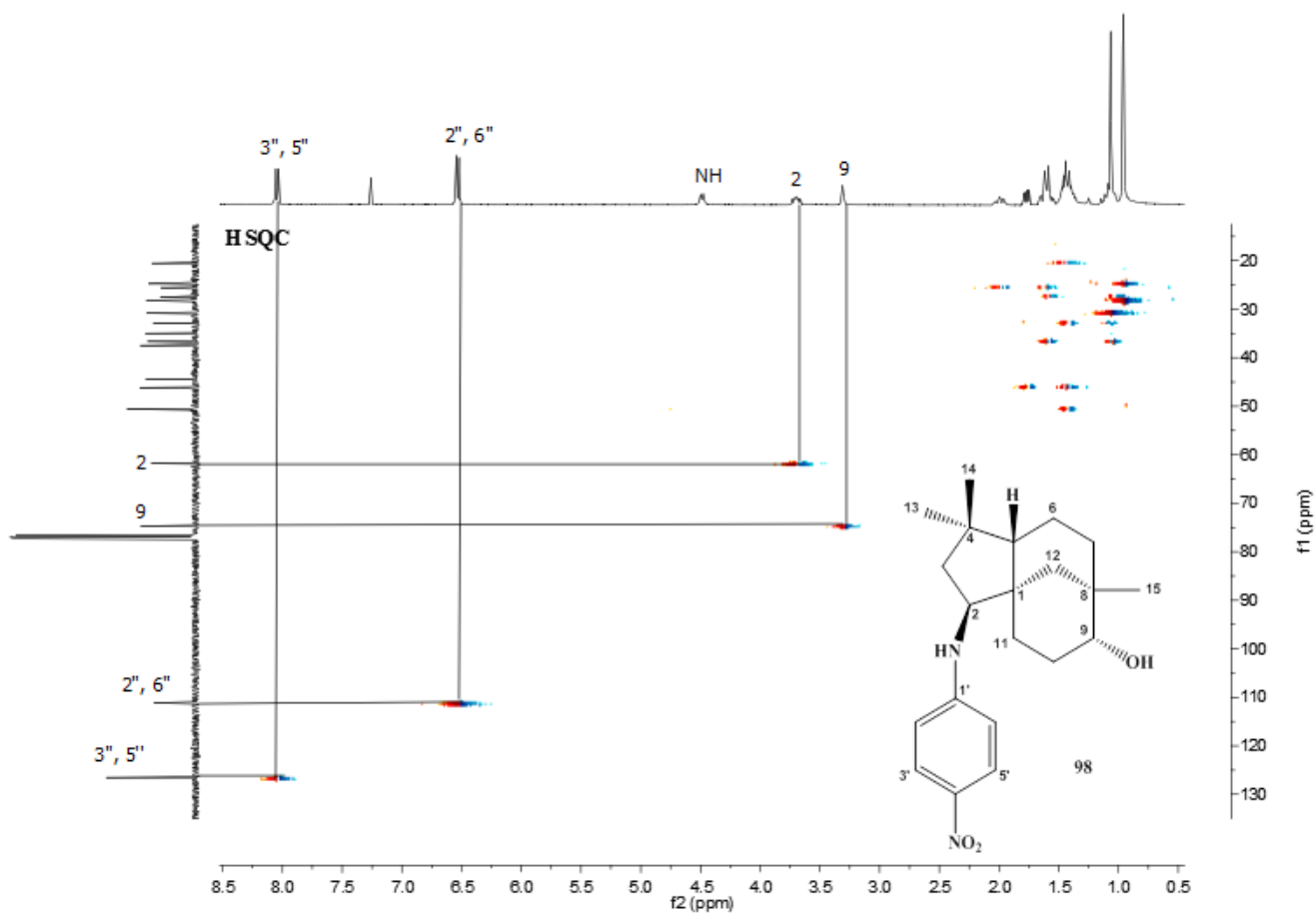
E SPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$



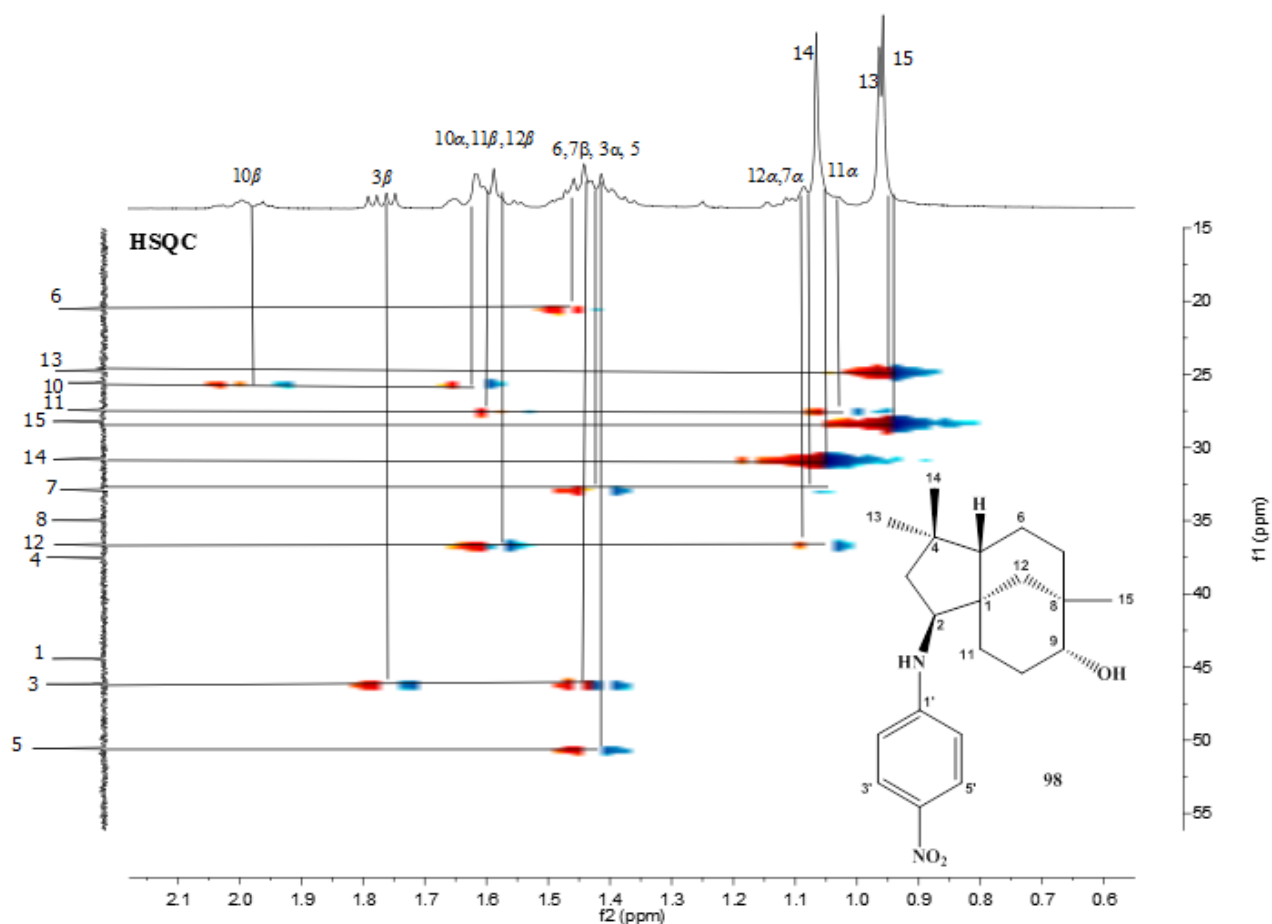
APÊNDICE O2 - Espectro na região do infravermelho (KBr) do composto **98**



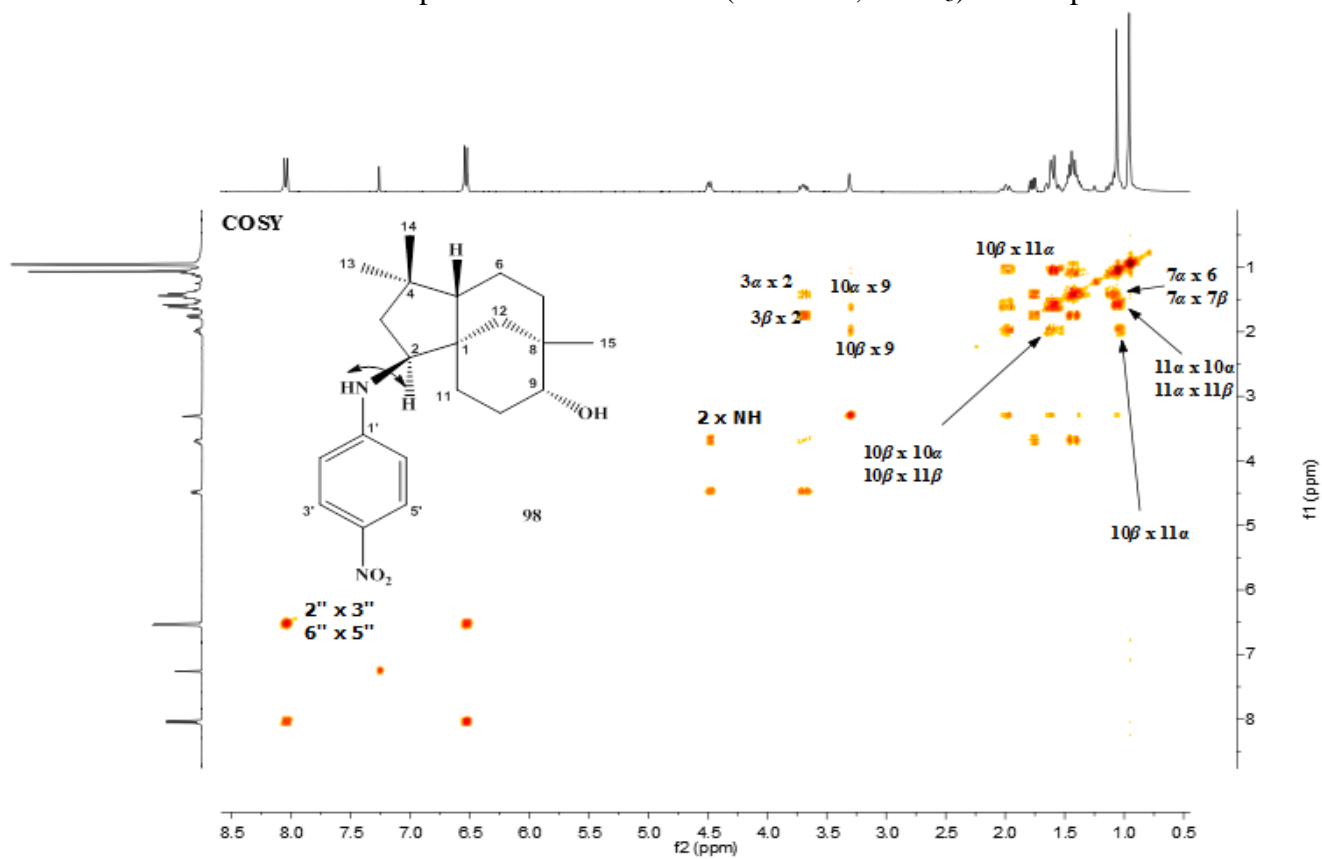
APÊNDICE P2 - Mapa de contornos HSQC (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do composto **98**



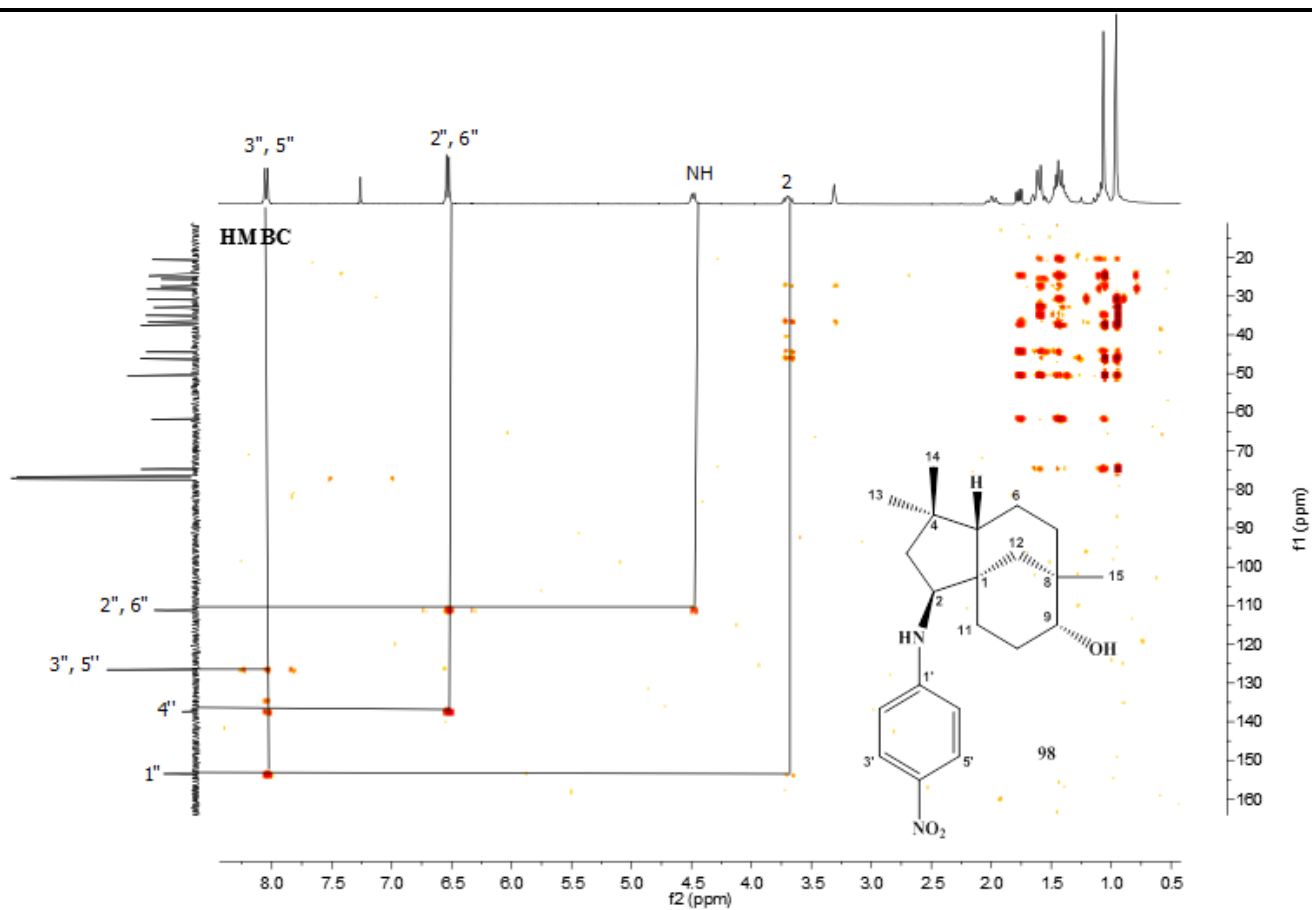
APÊNDICE Q2 - Expansão do mapa de contornos HSQC (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do composto **98**



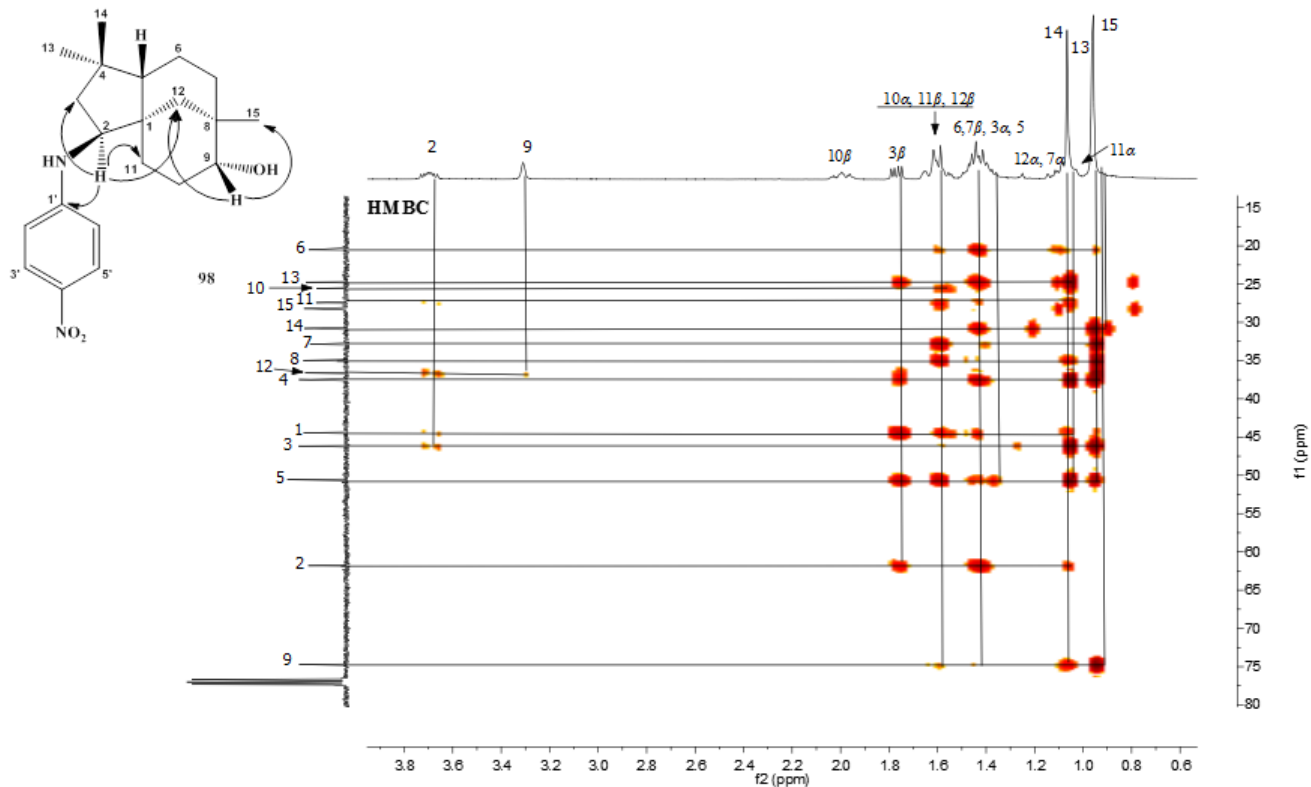
APÊNDICE R2 - Mapa de contornos COSY (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do composto **98**



APÊNDICE S2 - Mapa de contornos HMBC (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do composto **98**

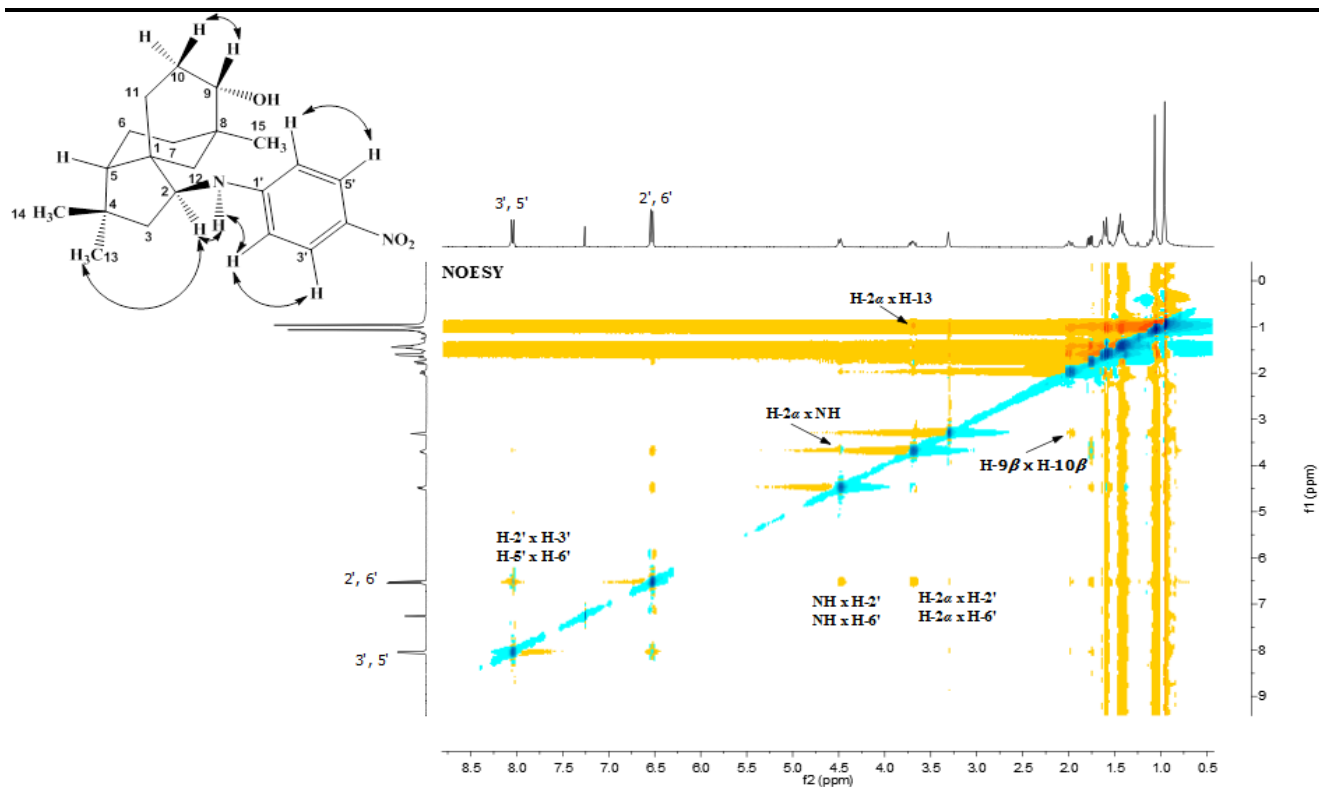


APÊNDICE T2 - Expansão do mapa de contornos HMBC (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do composto **98**

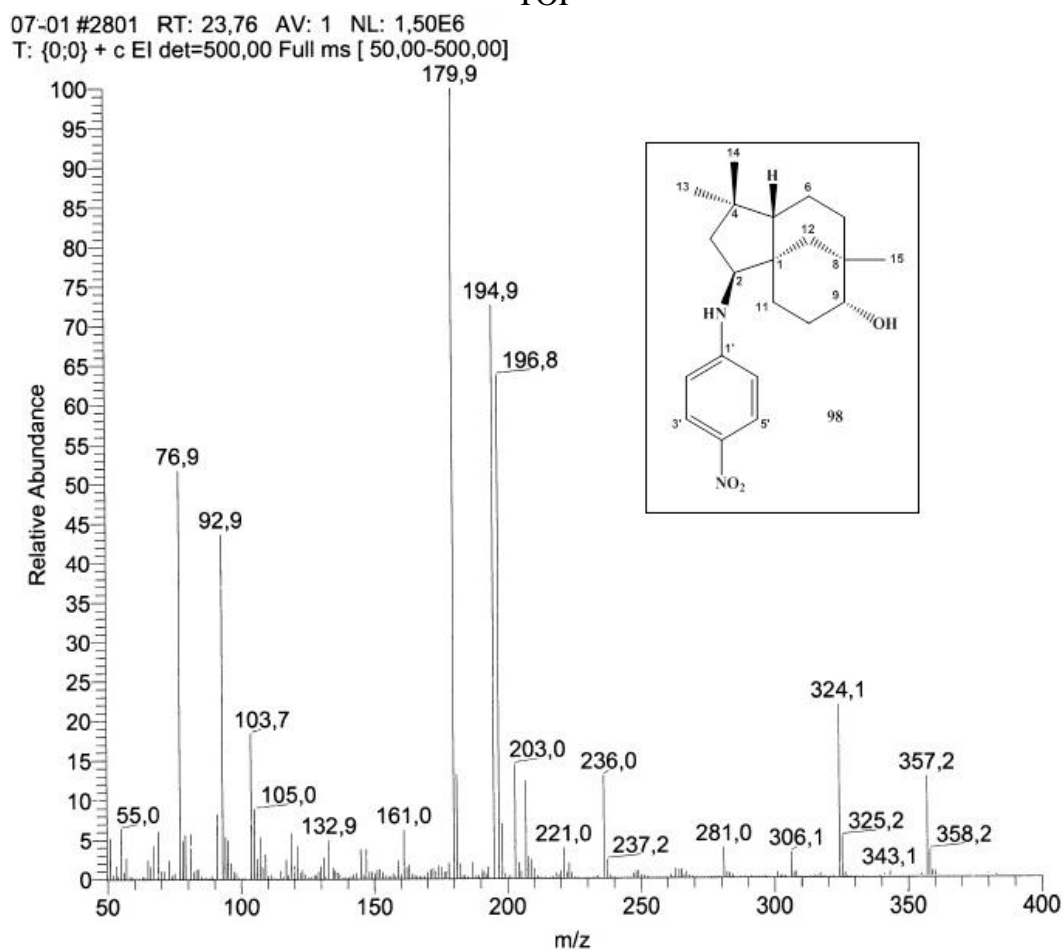


APÊNDICE U2 - Mapa de contornos NOESY (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do composto **98**

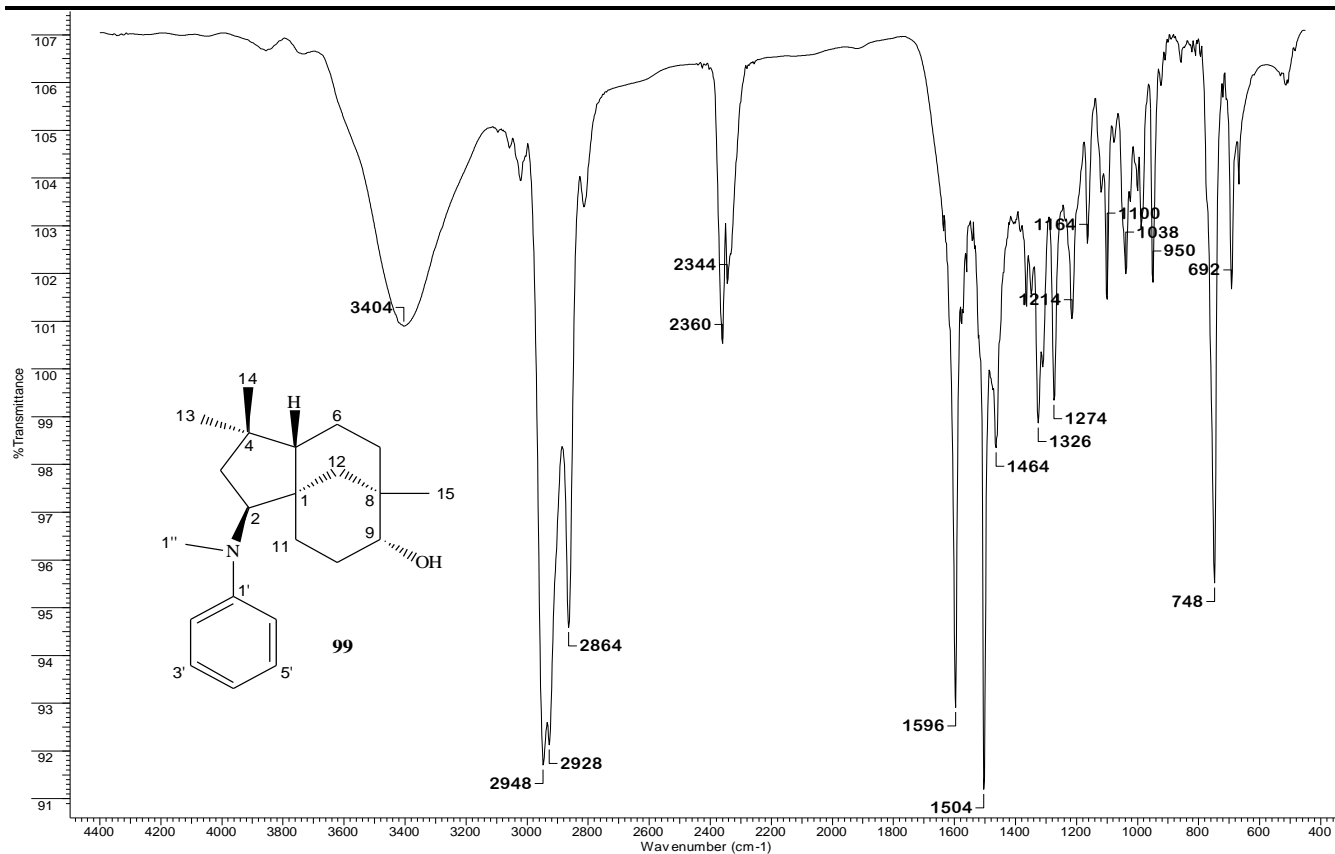




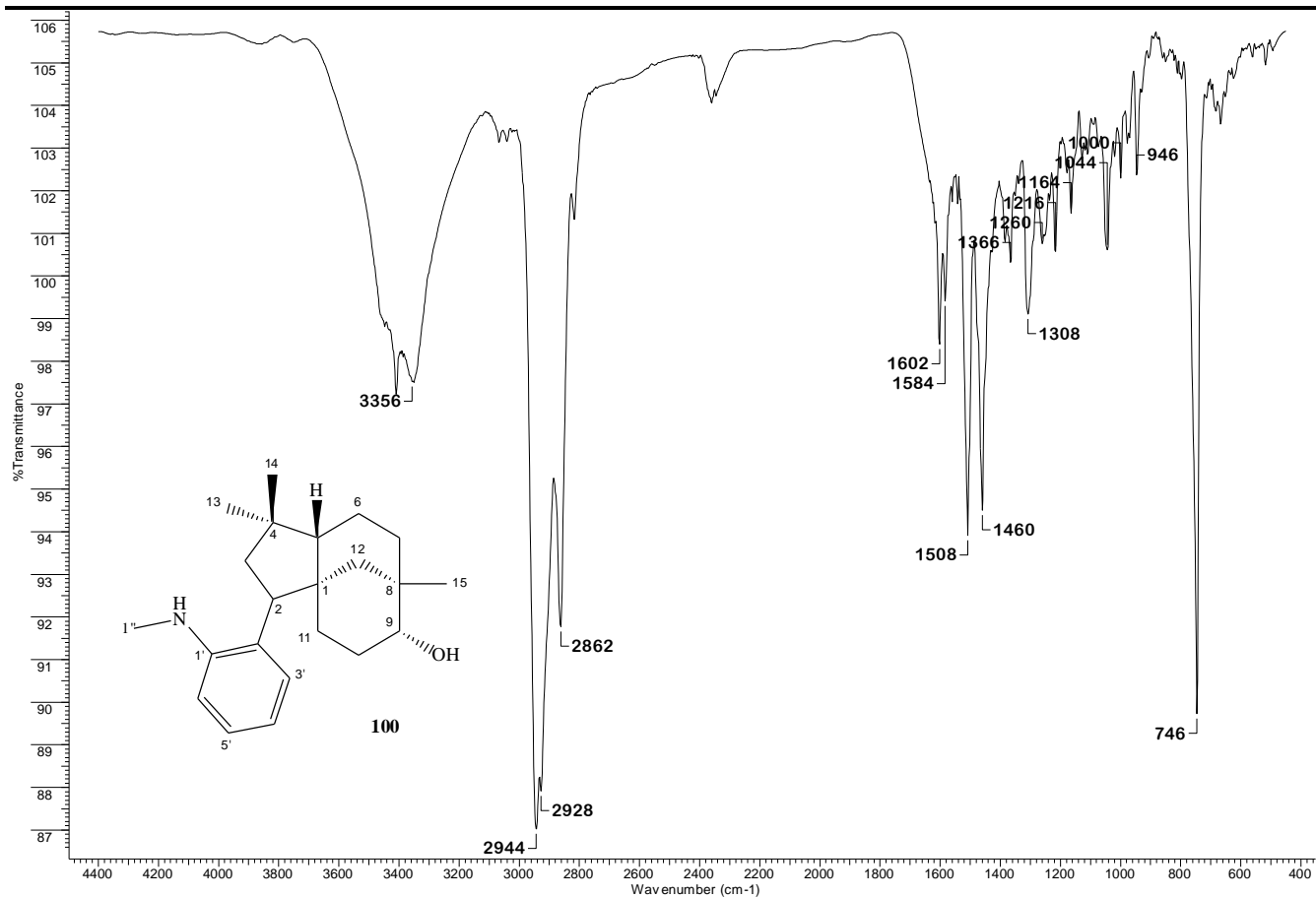
APÊNDICE V2 - Espectro massas EM-ESI positivo de **98**, obtido em um espectrofotômetro ESI-Q-TOF



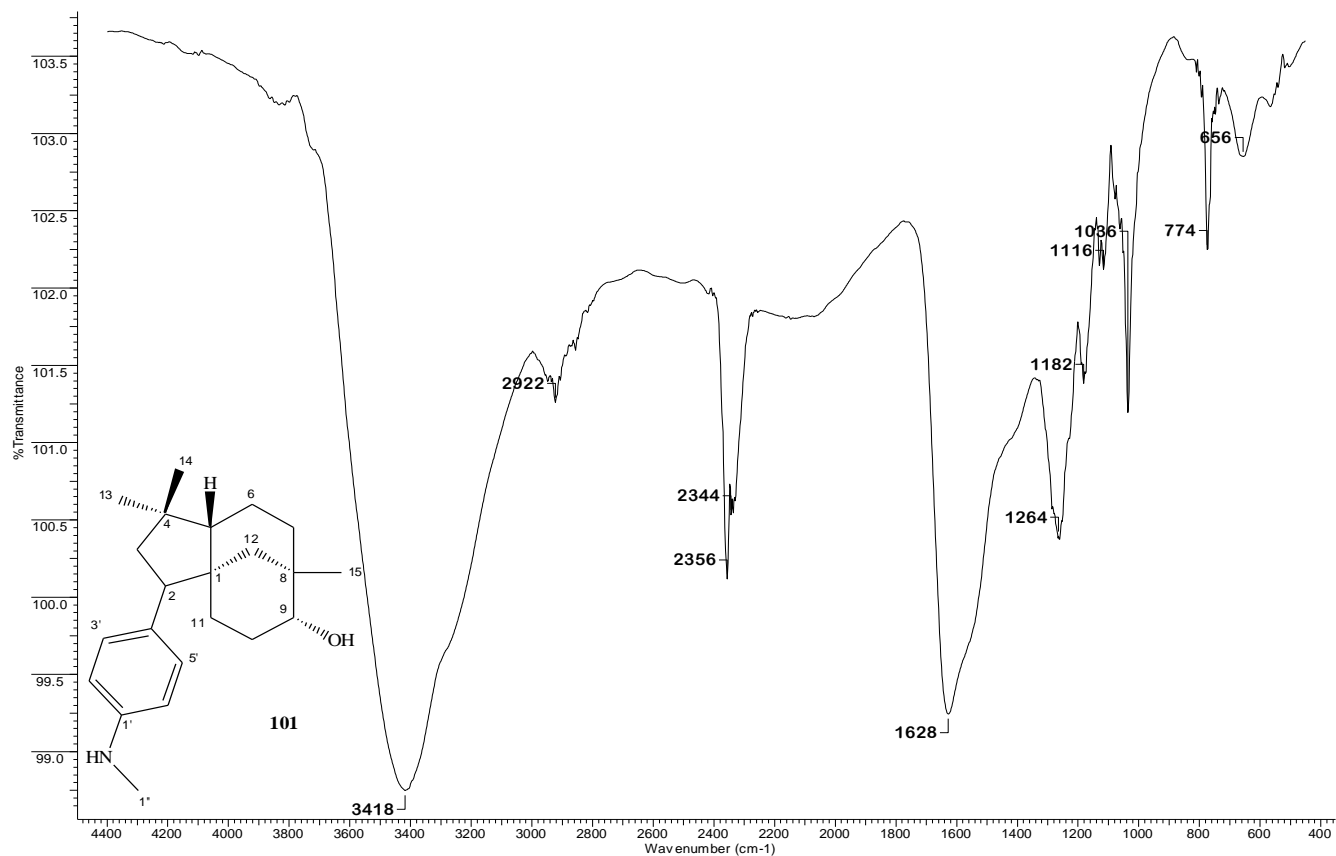
APÊNDICE X2 - Espectro na região do infravermelho (KBr) do composto **99**



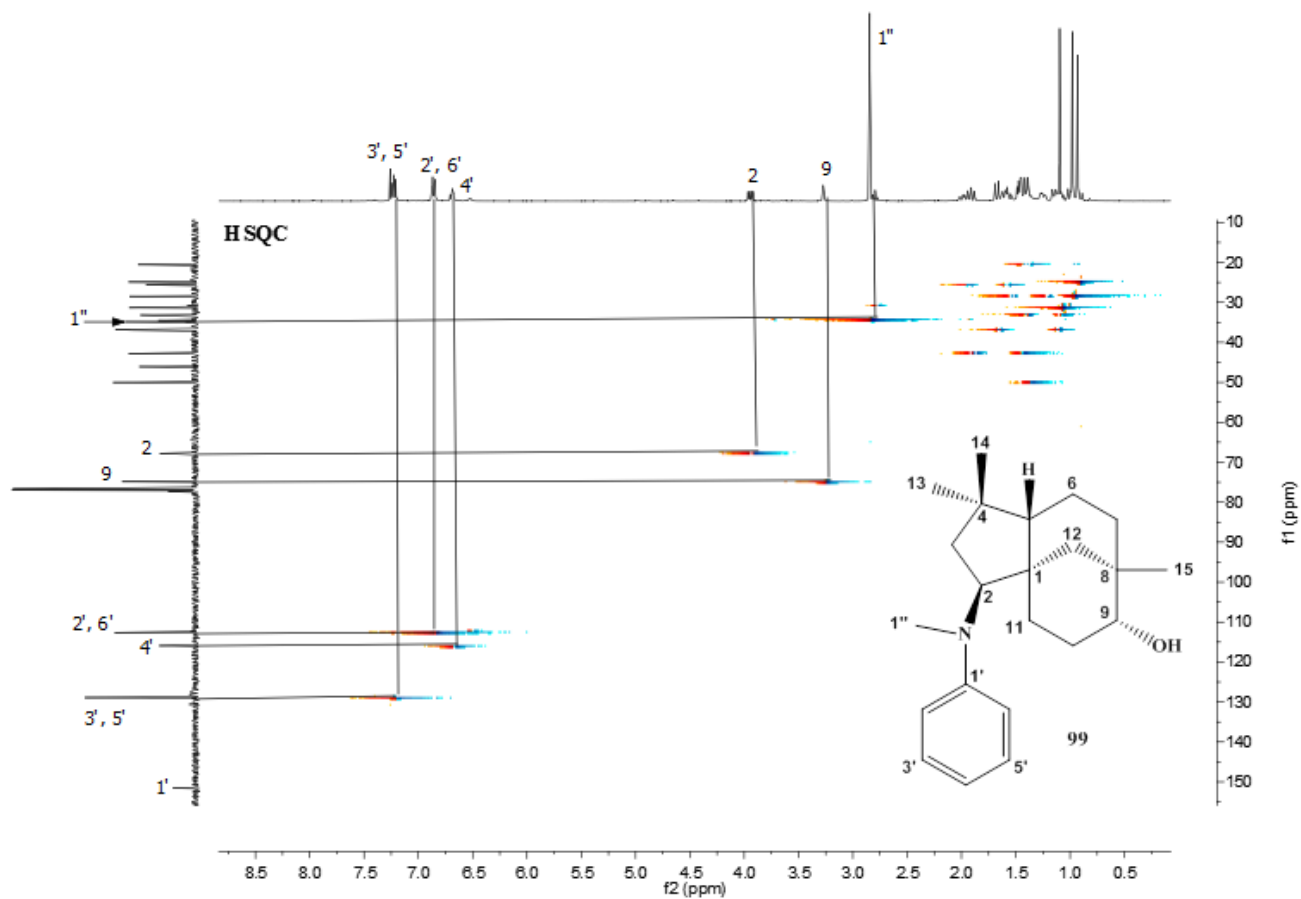
APÊNDICE Z2 - Espectro na região do infravermelho (KBr) do composto 100



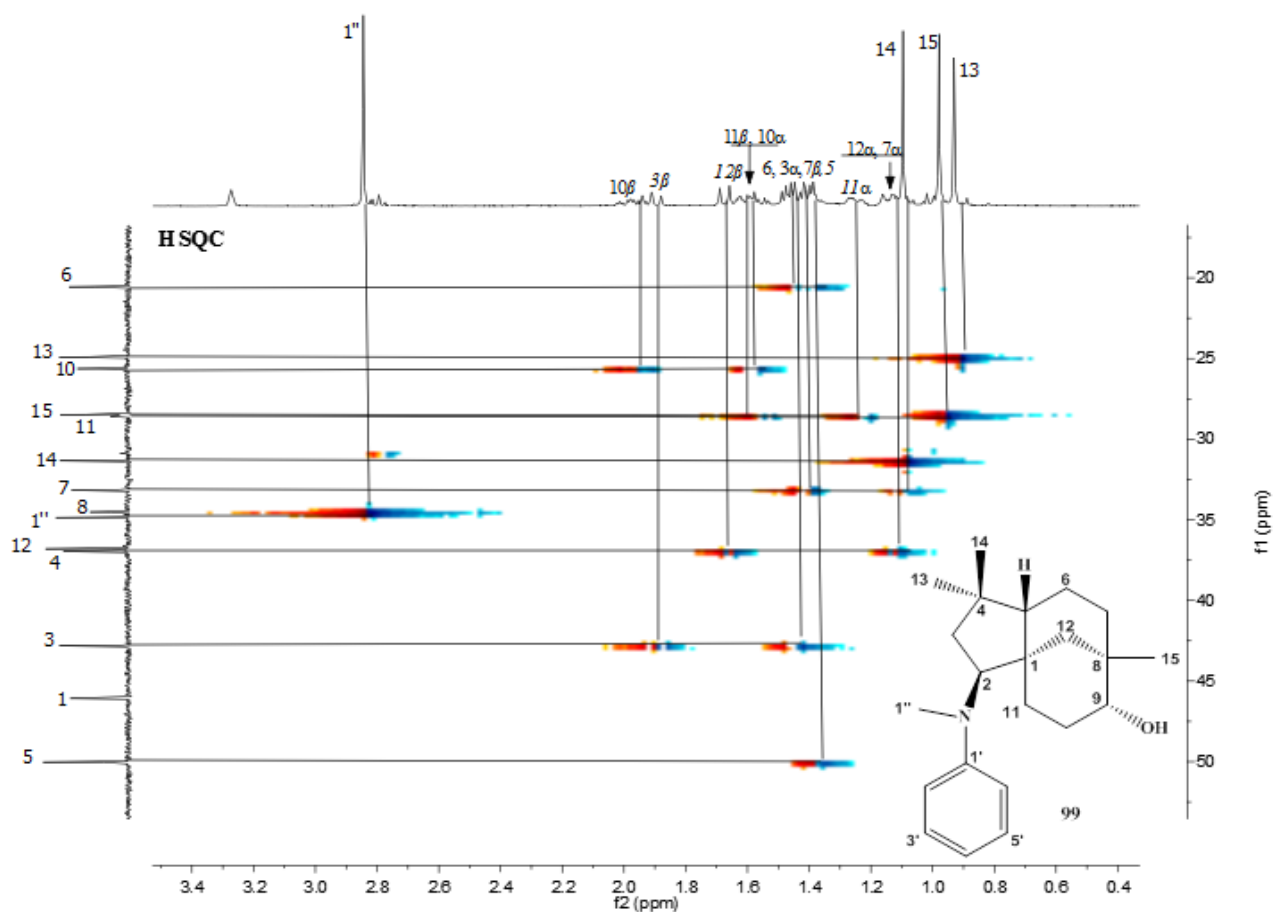
APÊNDICE A2 - Espectro na região do infravermelho (KBr) do composto **101**



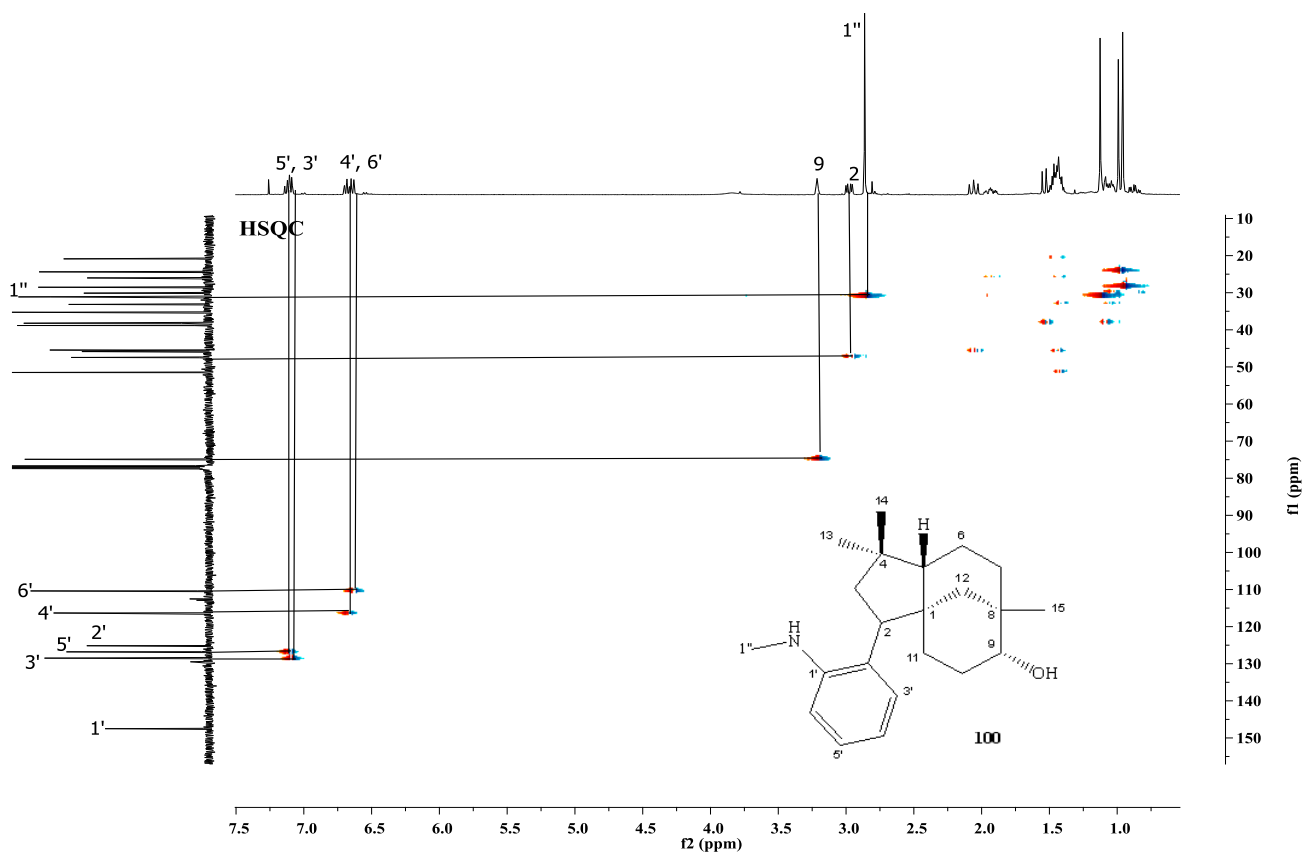
APÊNDICE B2 - Mapa de contornos HSQC (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do composto **99**



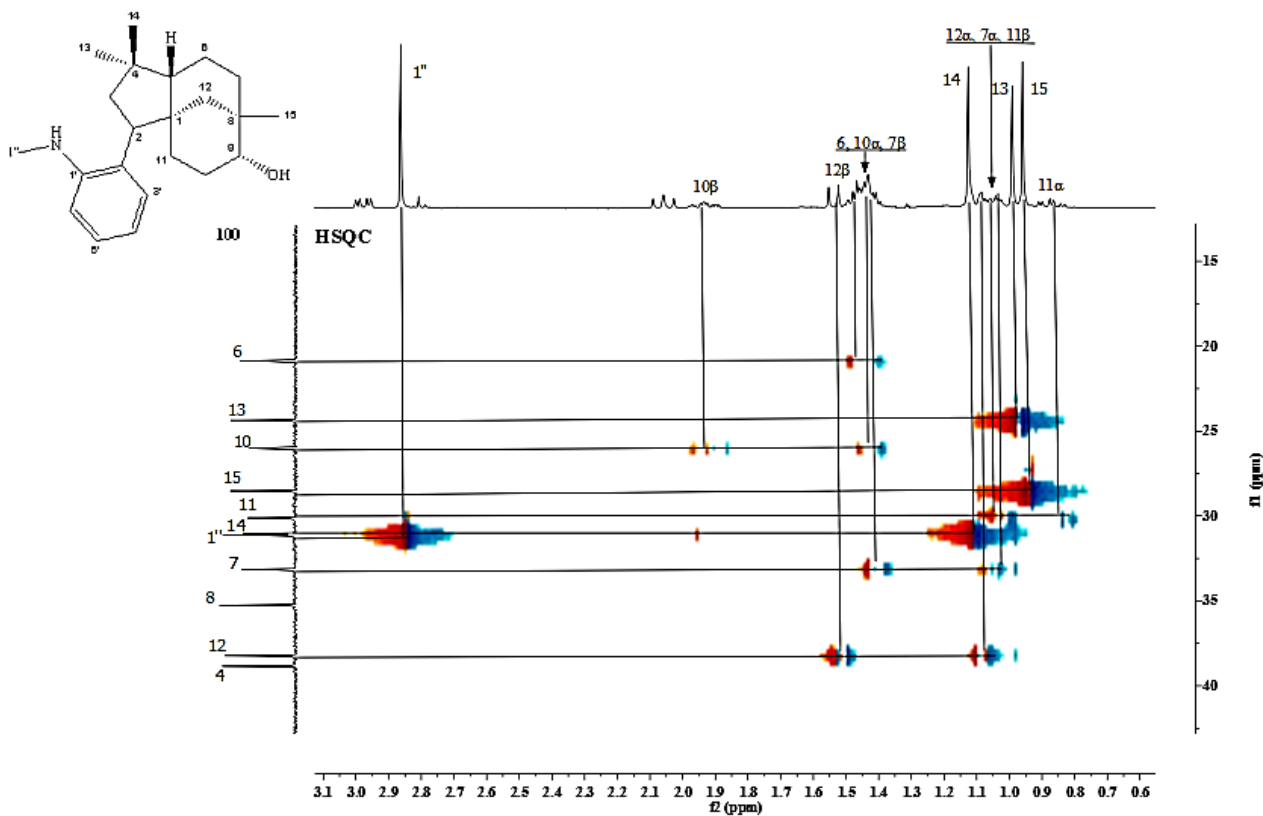
APÊNDICE C2 - Expansão do mapa de contornos HSQC (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do composto **99**



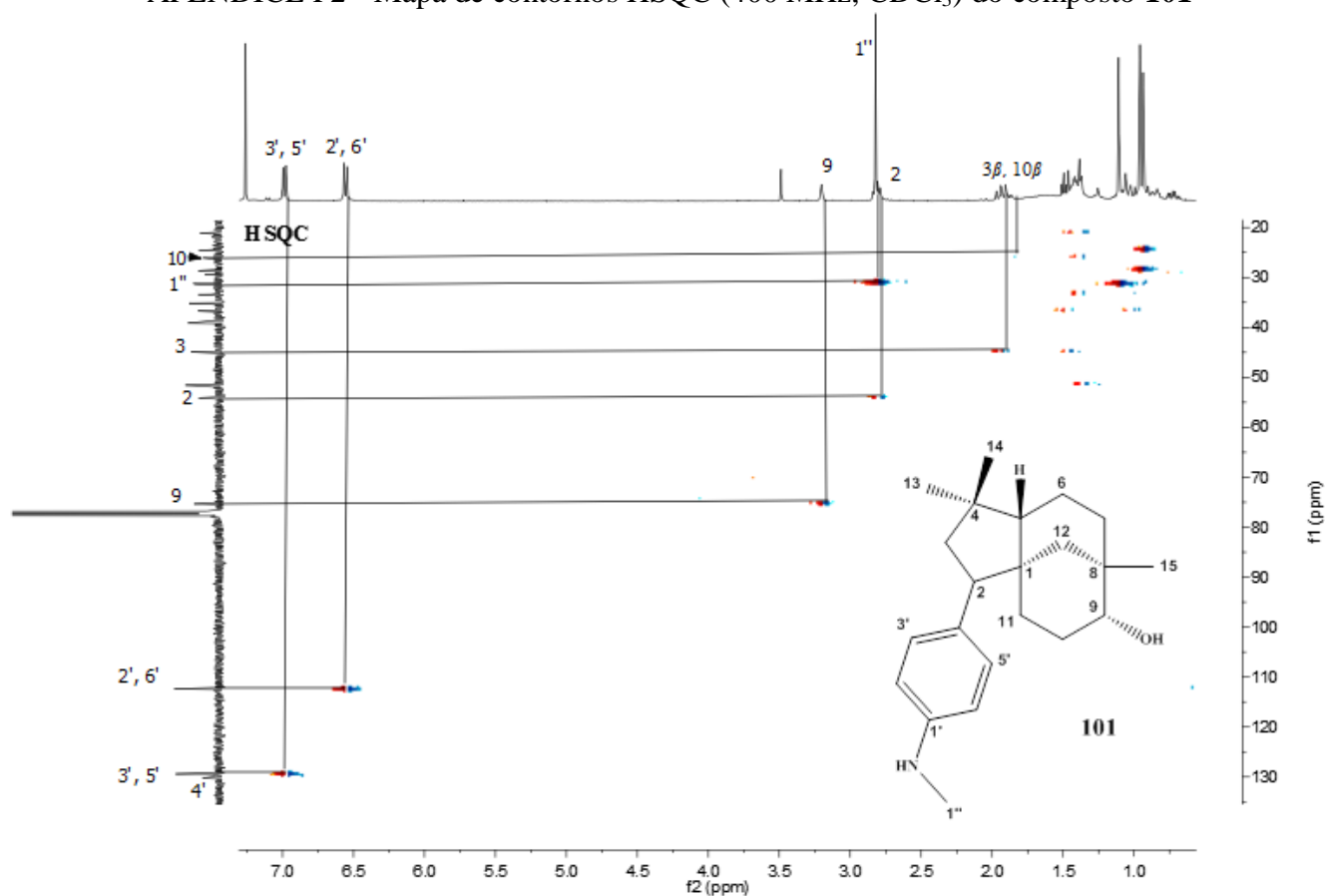
APÊNDICE D2 - Mapa de contornos HSQC (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do composto **100**



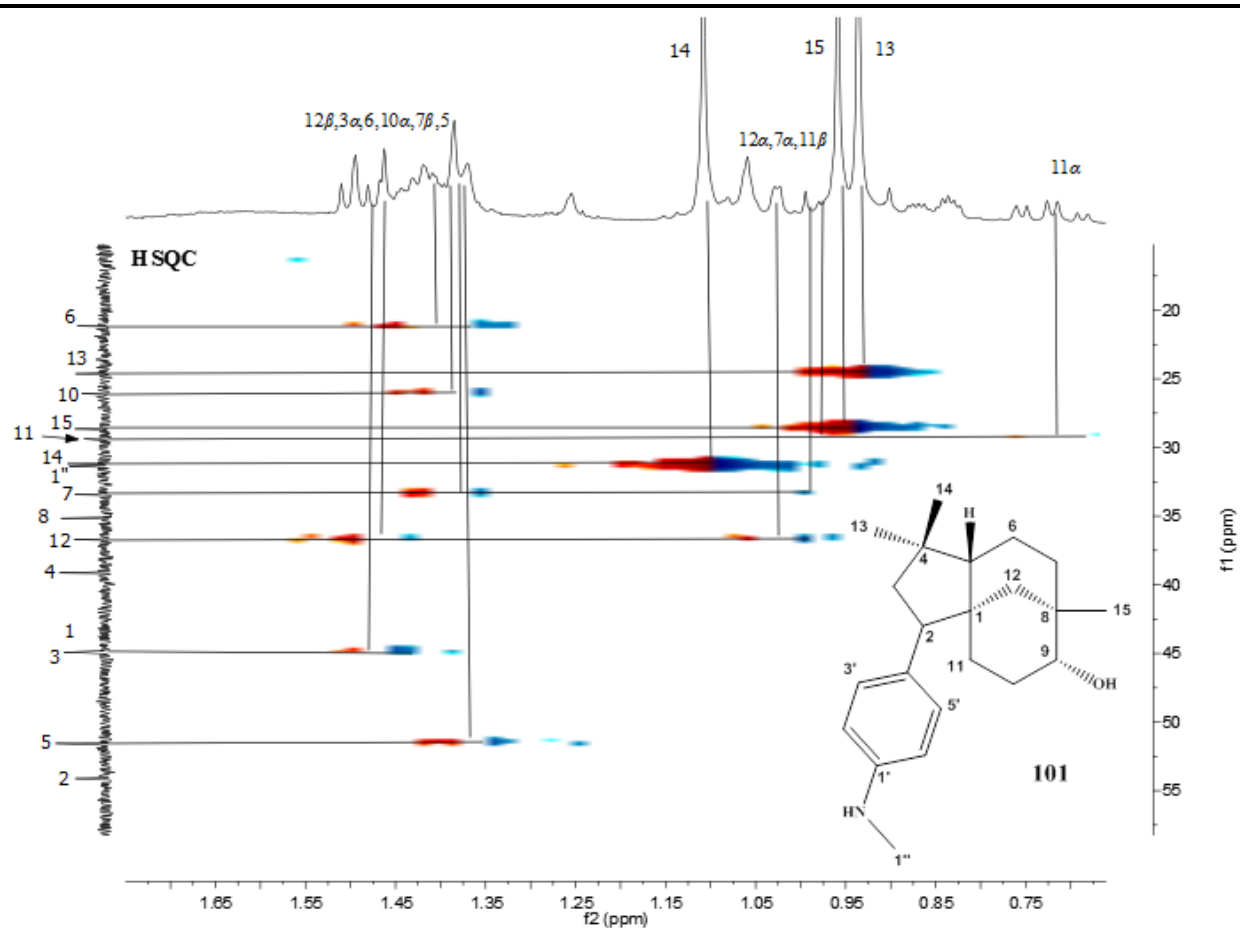
APÊNDICE E2 - Expansão do mapa de contornos HSQC (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do composto **100**



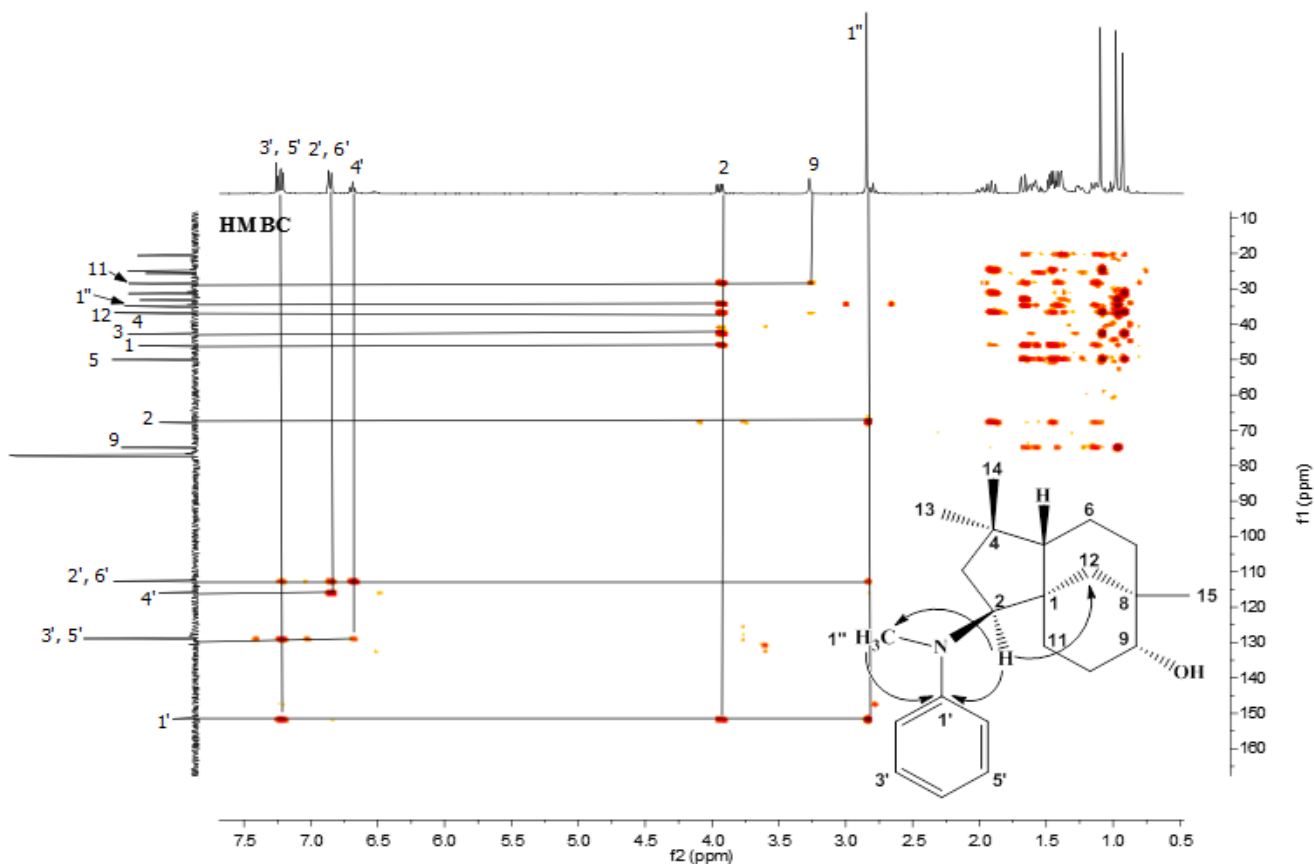
APÊNDICE F2 - Mapa de contornos HSQC (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do composto **101**



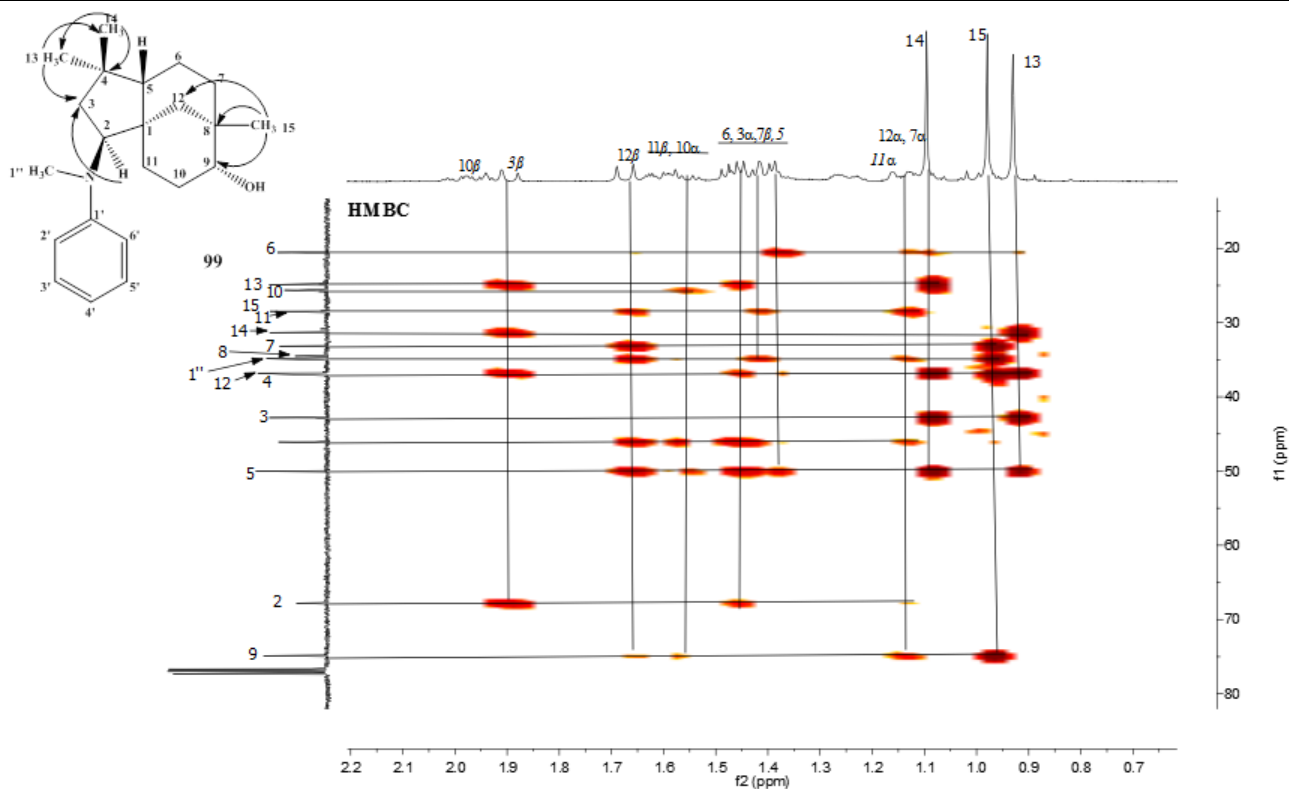
APÊNDICE G2 - Expansão do mapa de contornos HSQC (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do composto **101**



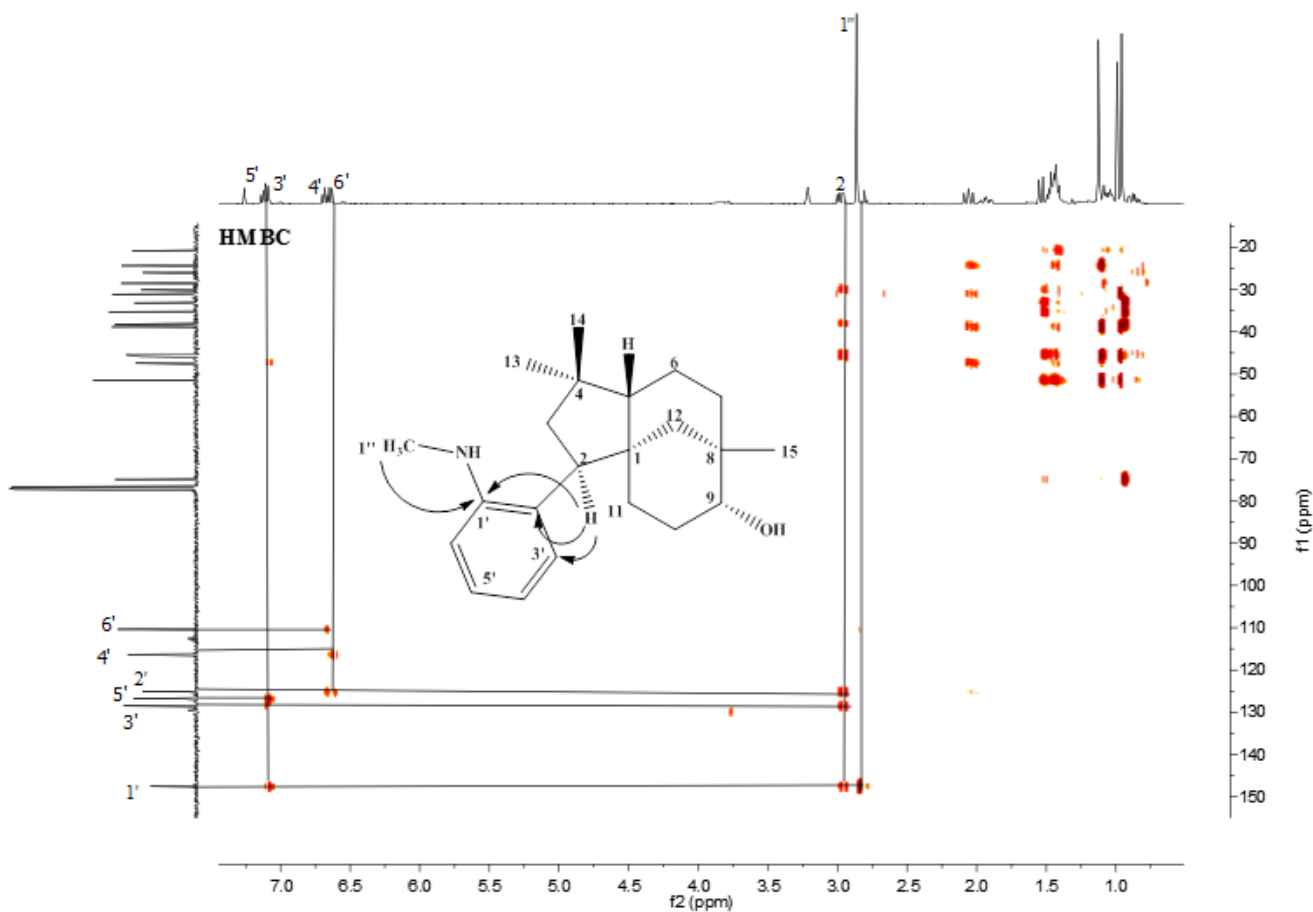
APÊNDICE H2 - Mapa de contornos HMBC (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do composto **99**



APÊNDICE I2 - Expansão do mapa de contornos HMBC (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do composto **99**

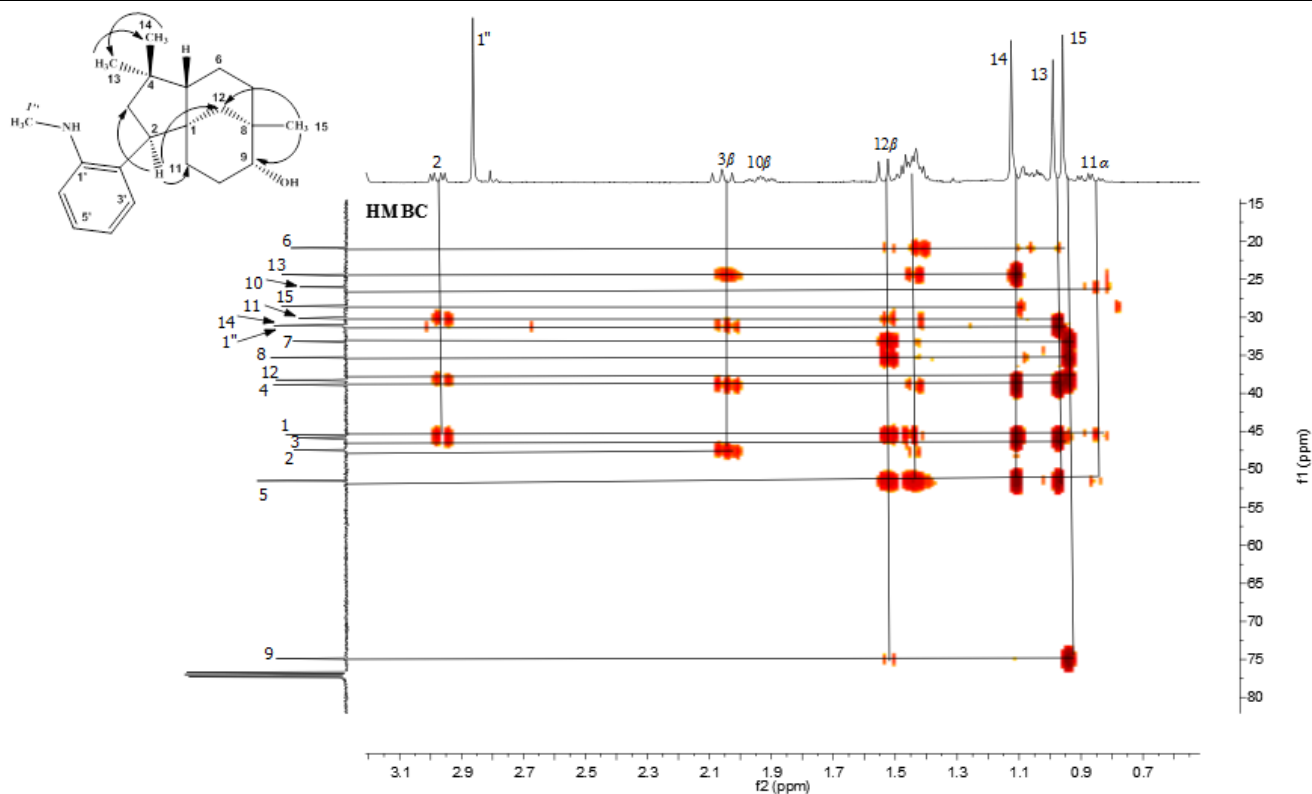


APÊNDICE J2 - Mapa de contornos HMBC (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do composto **100**

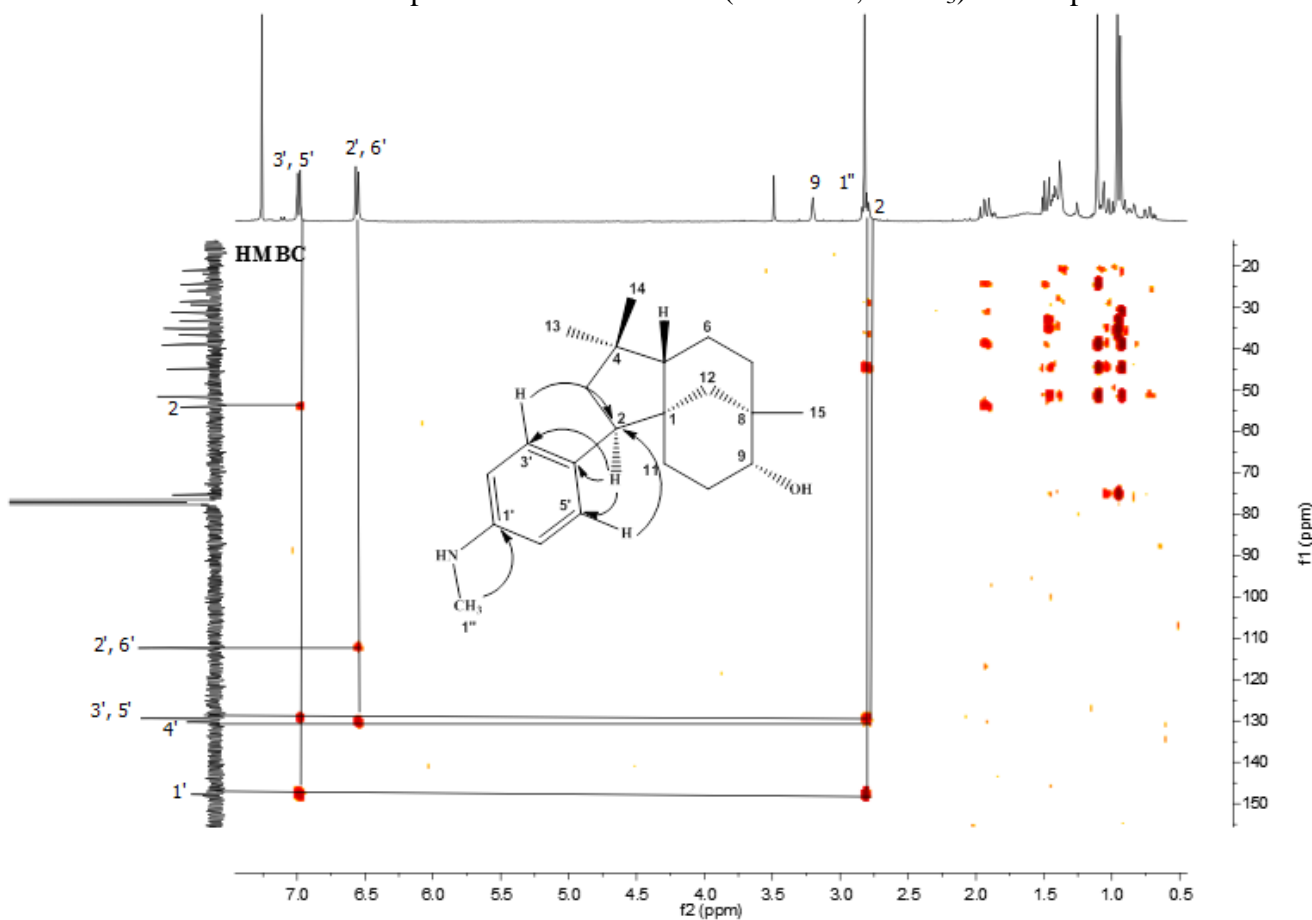


APÊNDICE L2 - Expansão do mapa de contornos HMBC (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do composto **100**

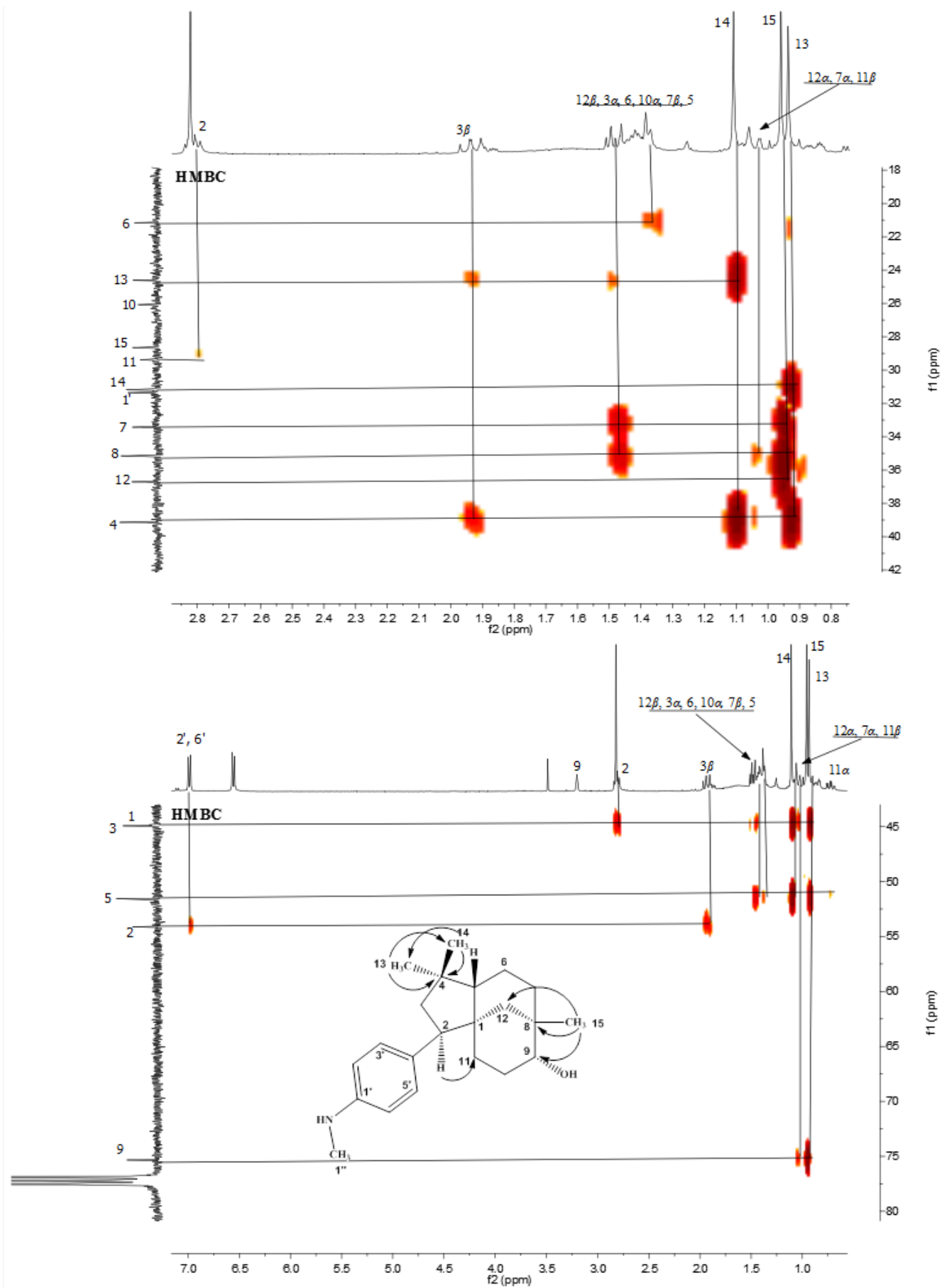




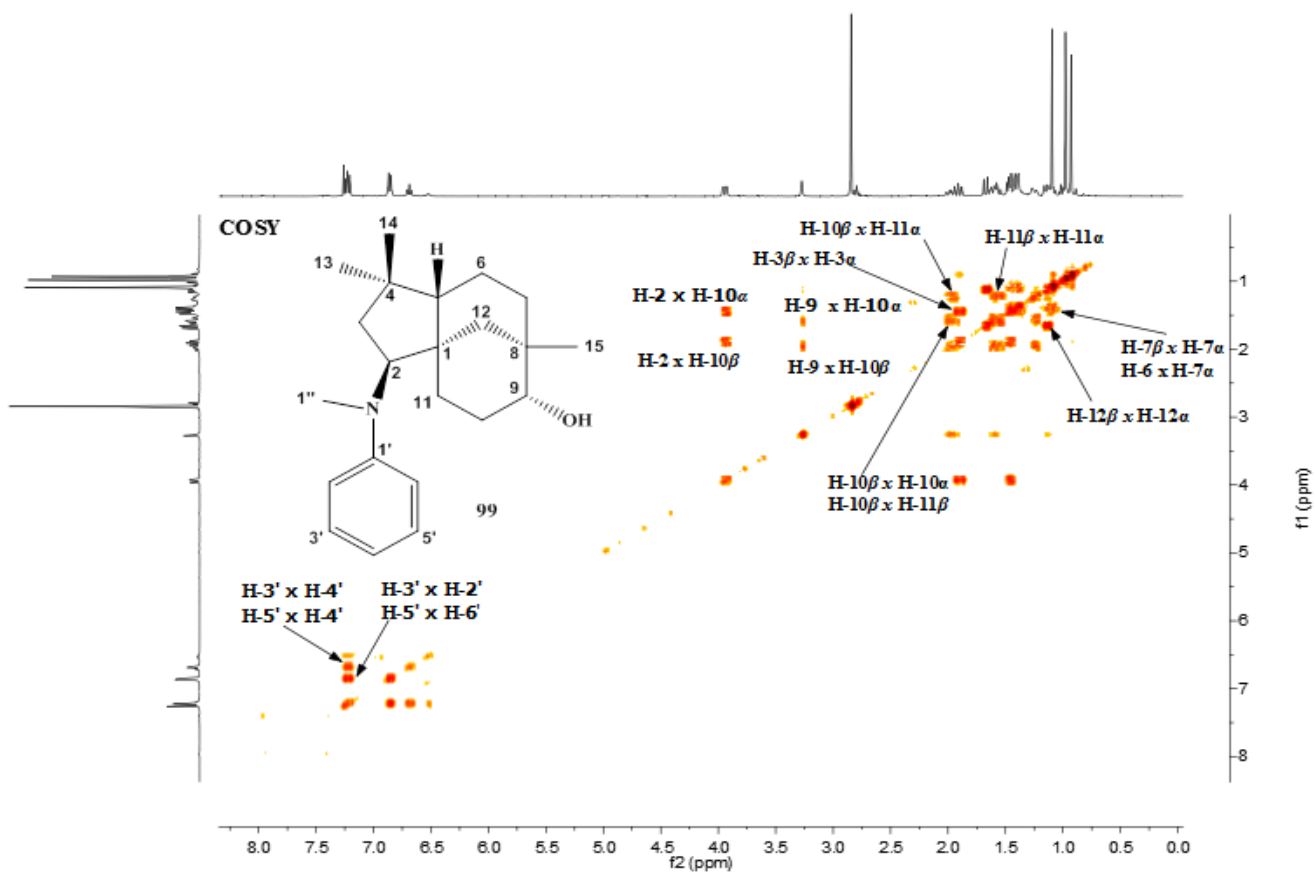
APÊNDICE M2 - Mapa de contornos HMBC (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do composto **101**



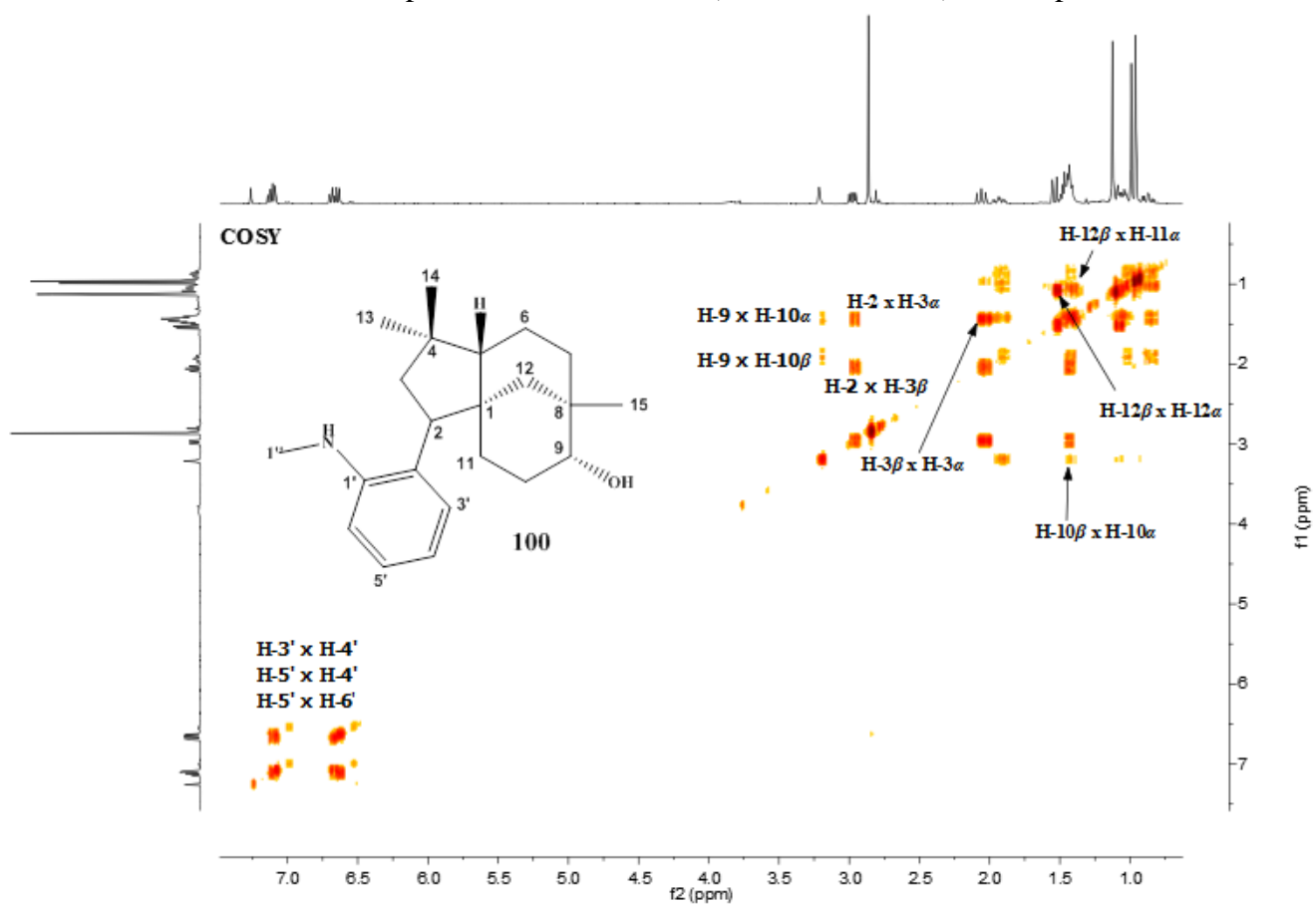
APÊNDICE N2 - Expansões do mapa de contornos HMBC (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do composto **101**



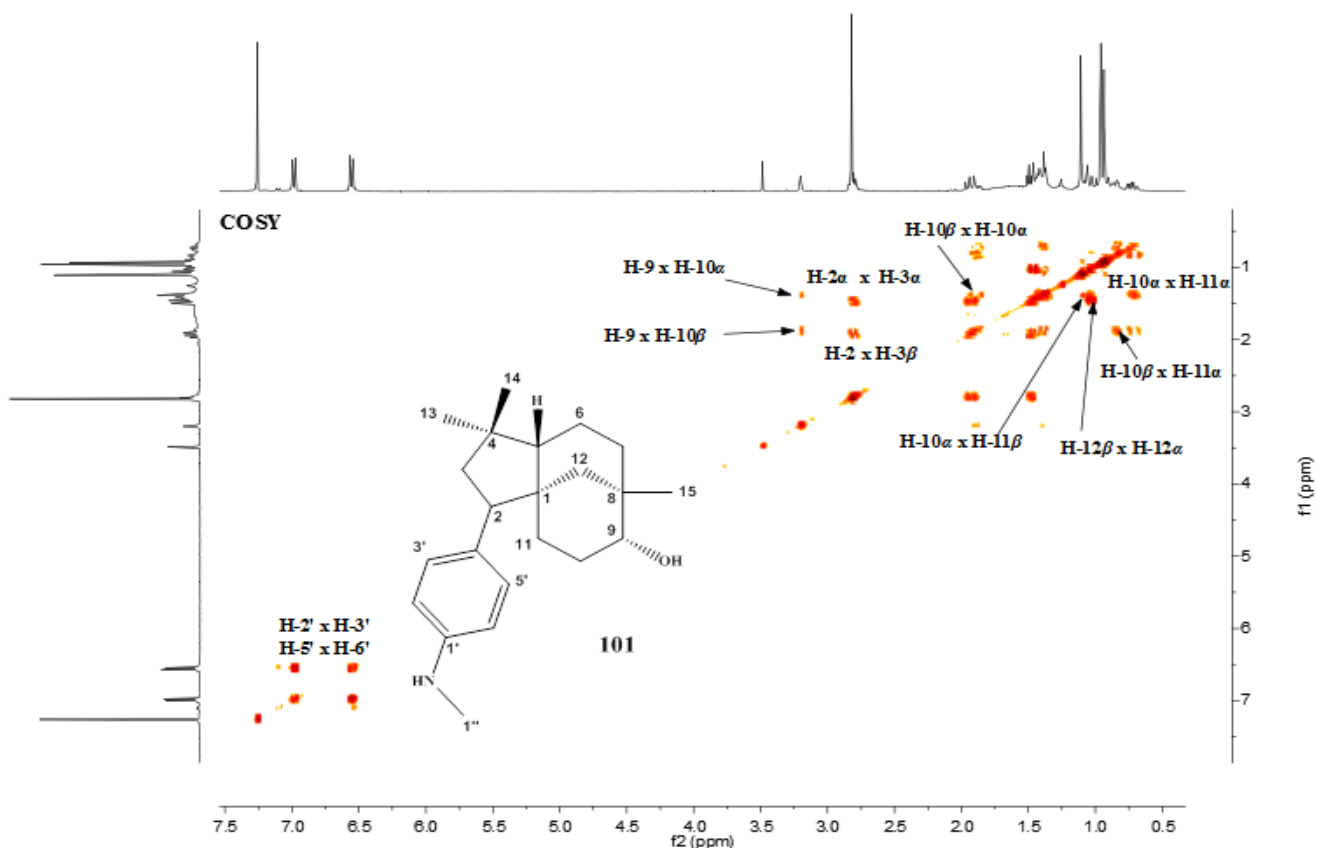
APÊNDICE O2 - Mapa de contornos COSY (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do composto 99



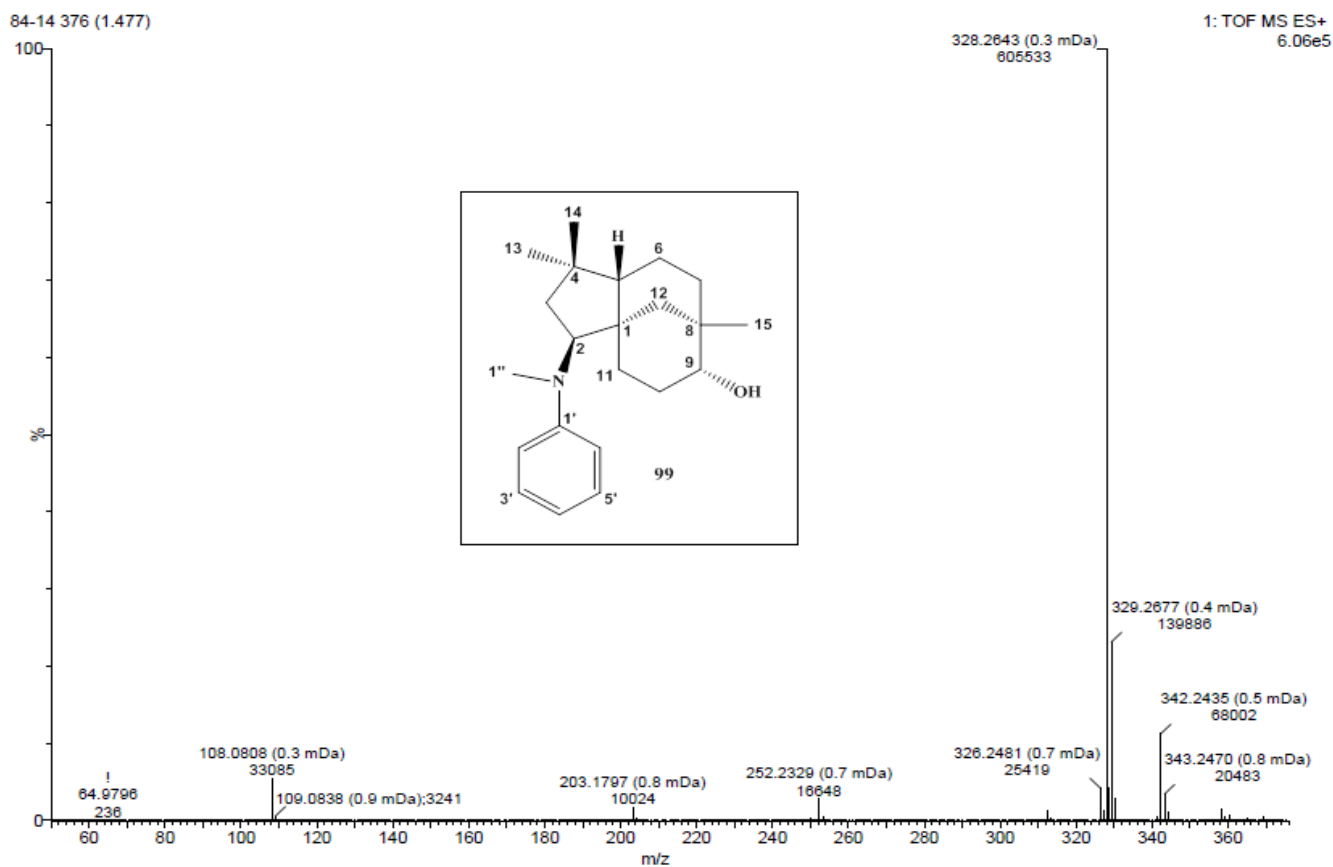
APÊNDICE P2 - Mapa de contornos COSY (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do composto **100**



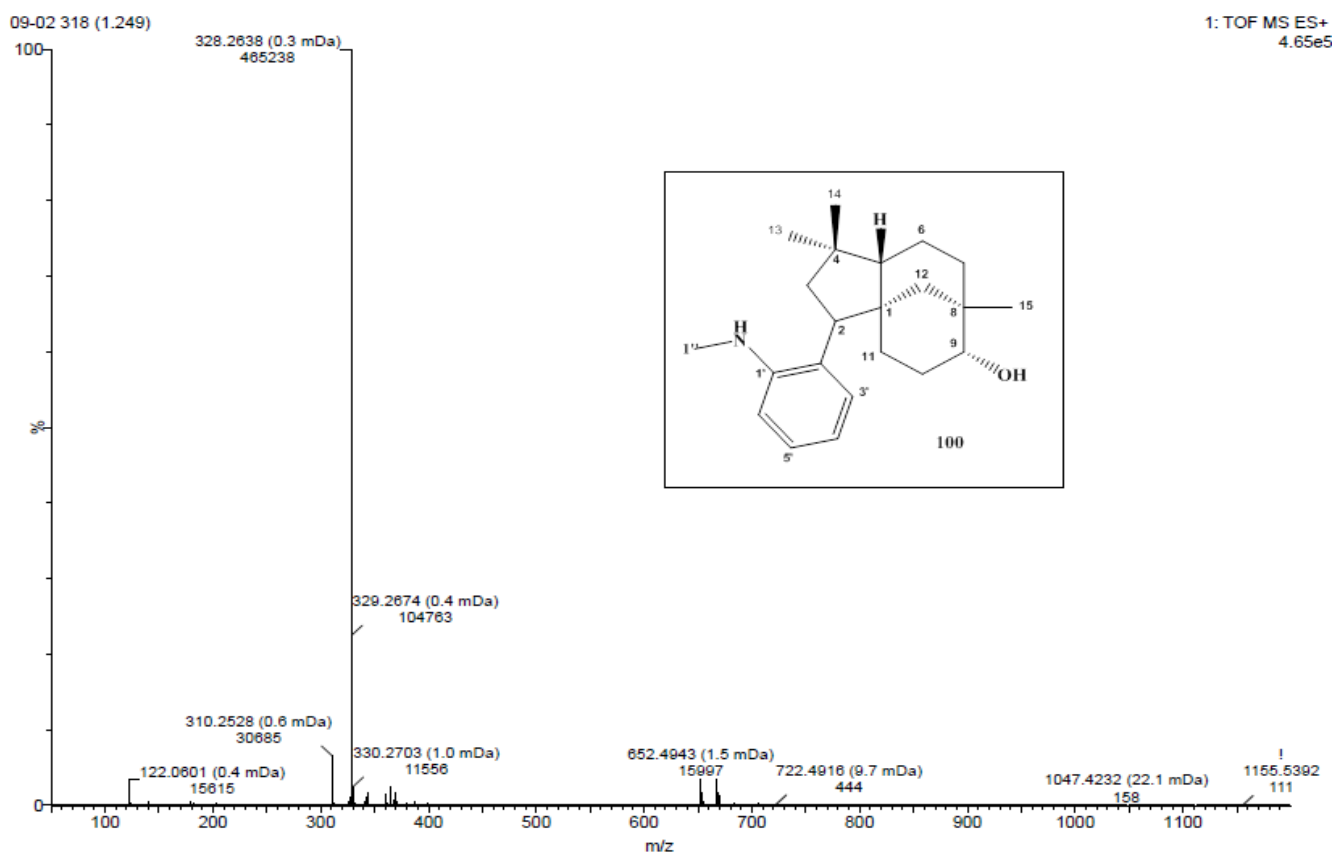
APÊNDICE Q2 - Mapa de contornos COSY (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do composto **101**



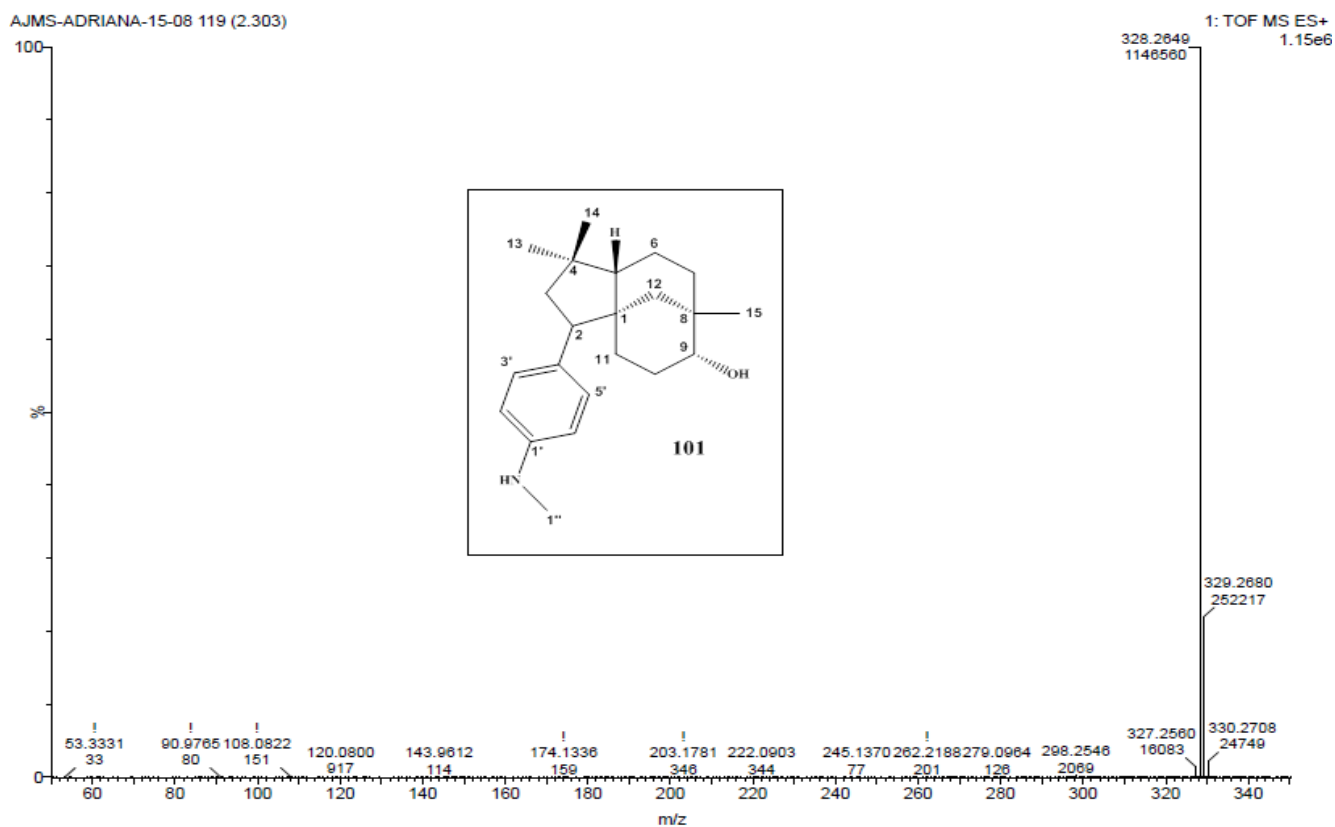
APÊNDICE R2 - Espectro massas EM-ESI positivo de **99**, obtido em um espectrofotômetro ESI-Q-TOF



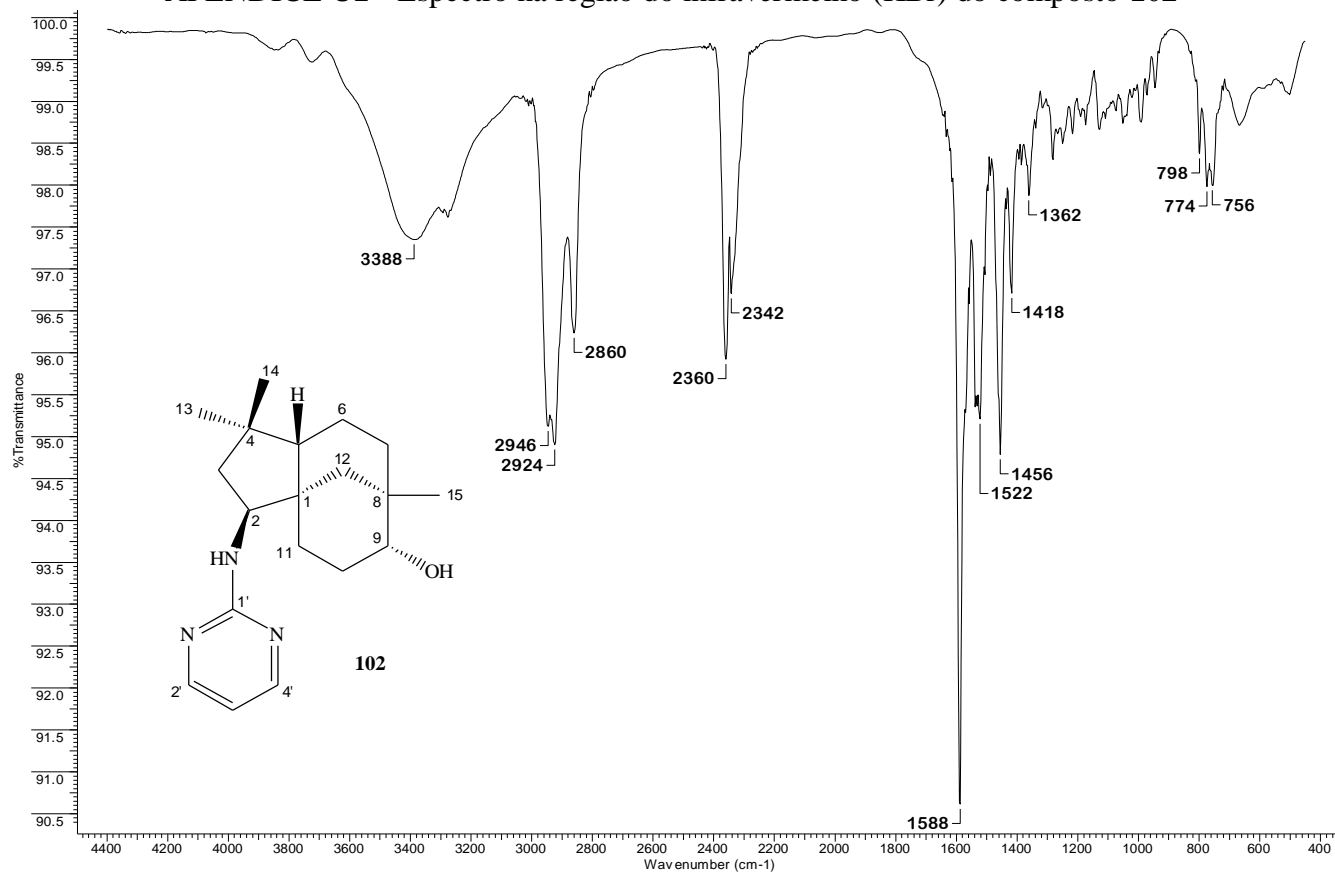
APÊNDICE S2 - Espectro massas EM-ESI positivo de **100**, obtido em um espectrofotômetro ESI-Q-TOF



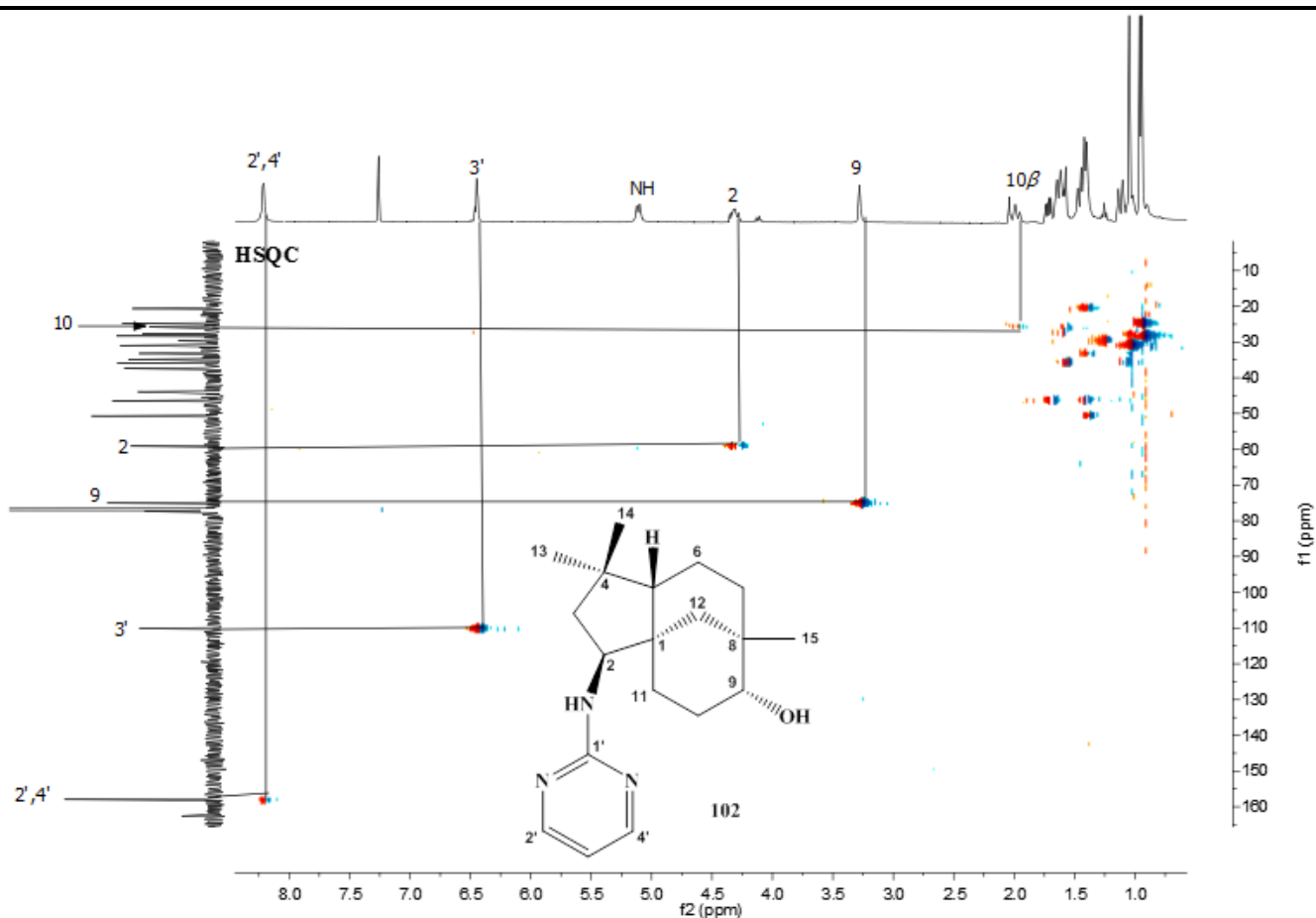
APÊNDICE T2 - Espectro massas EM-ESI positivo de **101** obtido em um espectrofotômetro ESI-Q-TOF



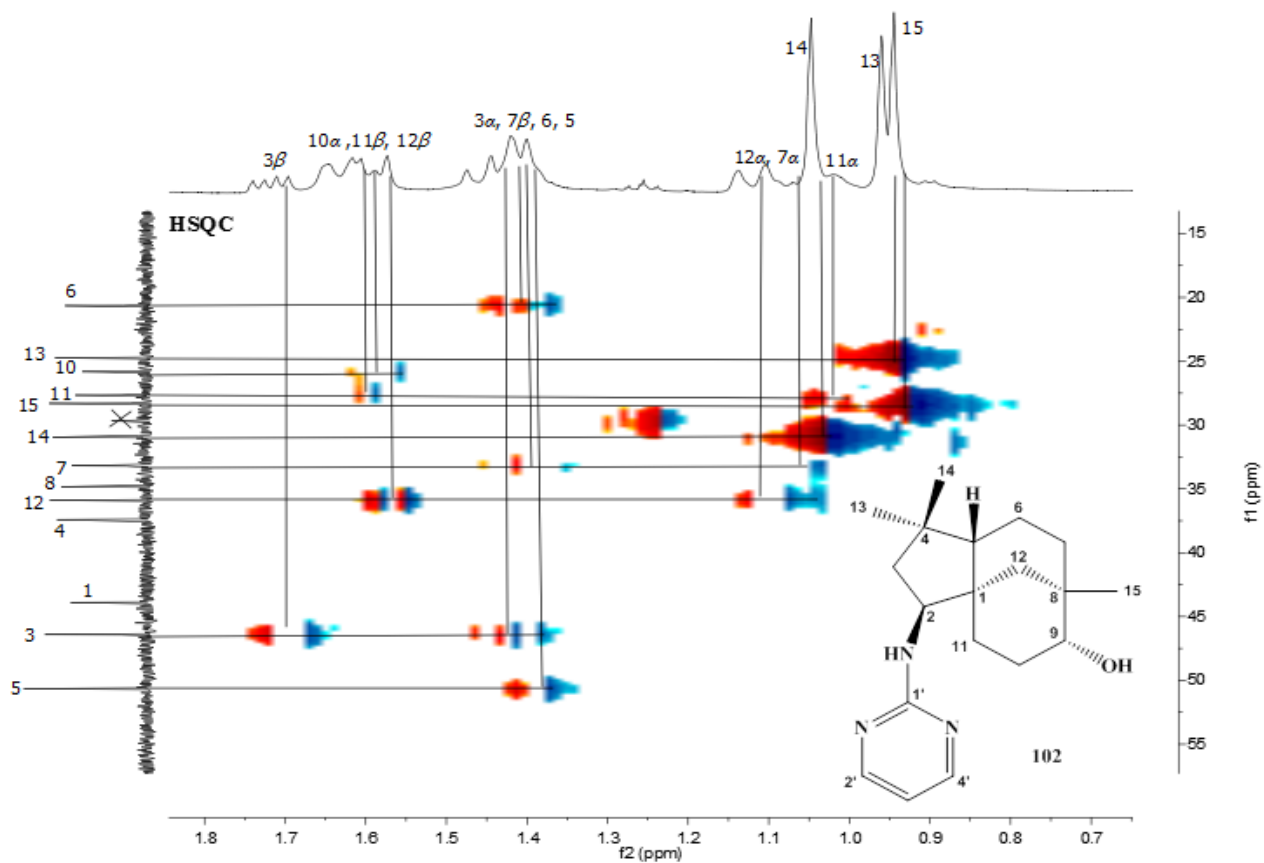
APÊNDICE U2 - Espectro na região do infravermelho (KBr) do composto **102**



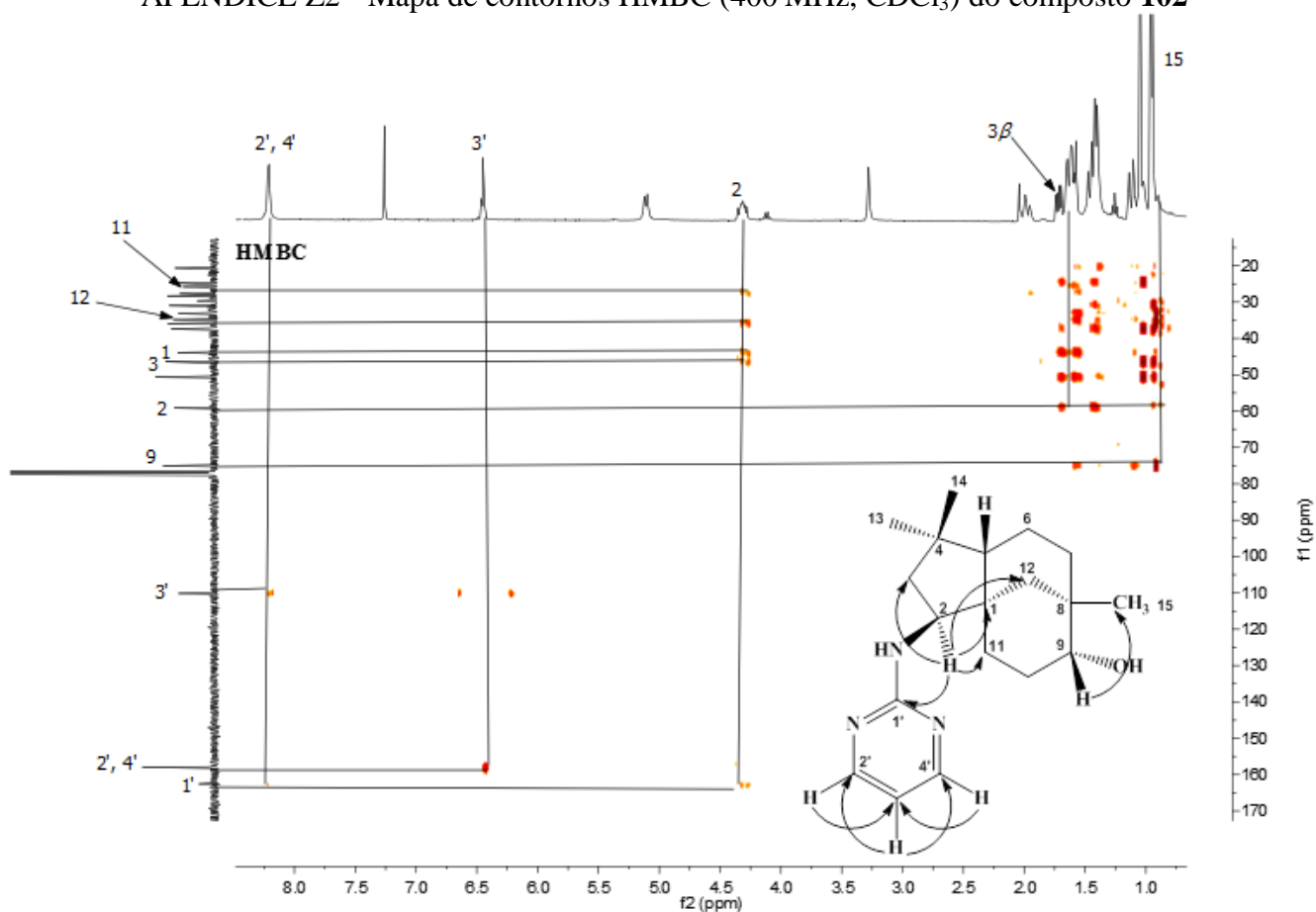
APÊNDICE V2 - Mapa de contornos HSQC (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do composto **102**



APÊNDICE X2 - Expansão do mapa de contornos HSQC (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do composto **102**

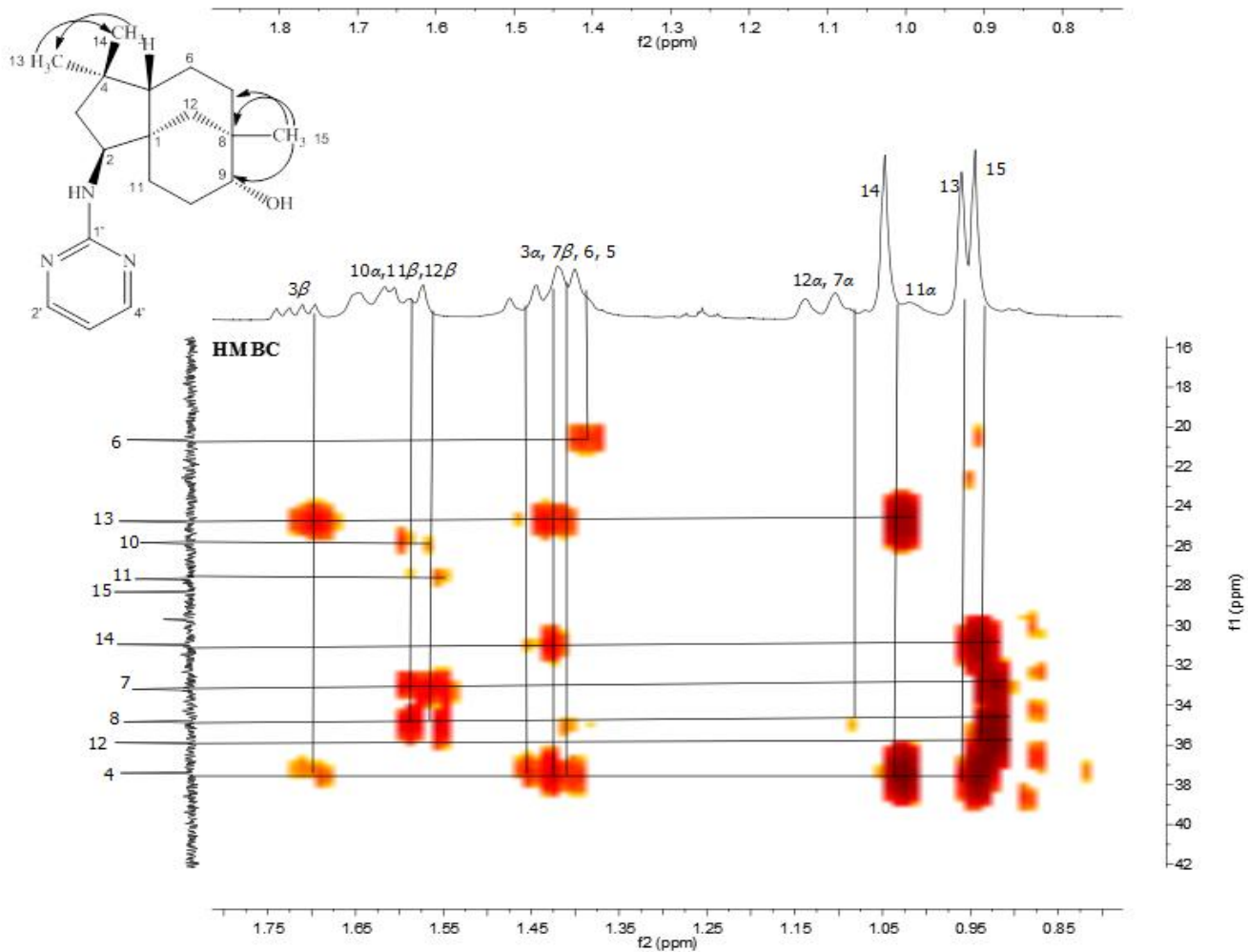
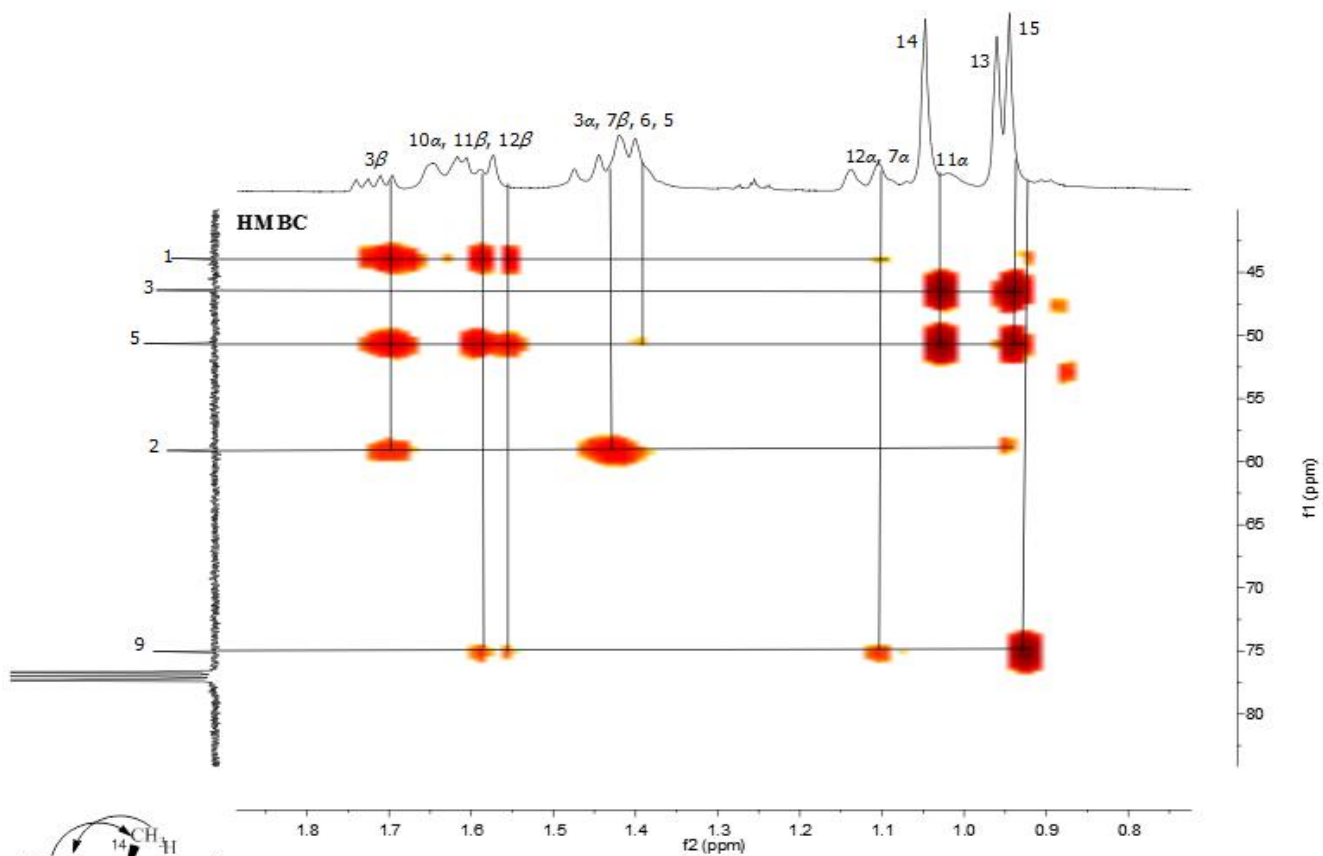


APÊNDICE Z2 - Mapa de contornos HMBC (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do composto **102**



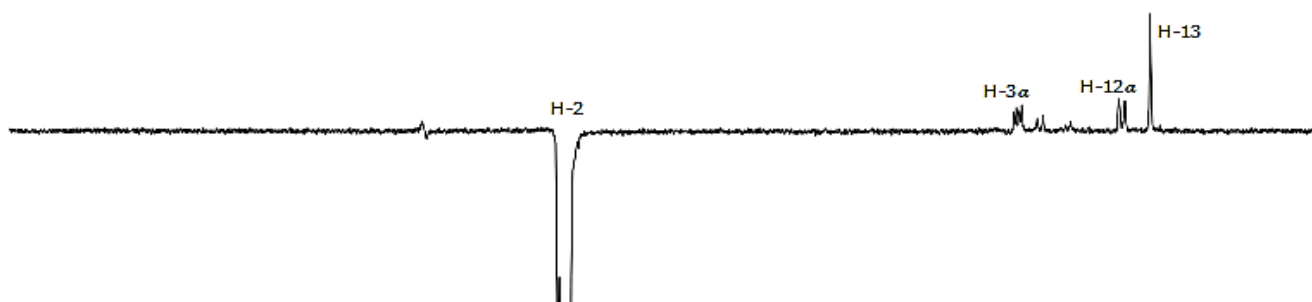
APÊNDICE A3 - Expansões do mapa de contornos HMBC (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do composto **102**



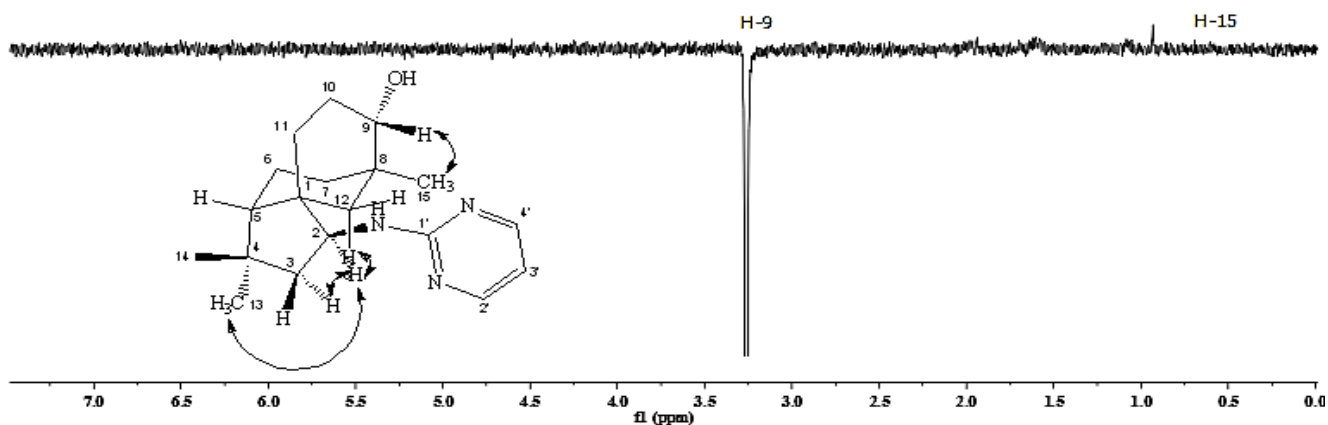


APÊNDICE B3- Espectro de n.O.e (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do composto **102**

n.O.e



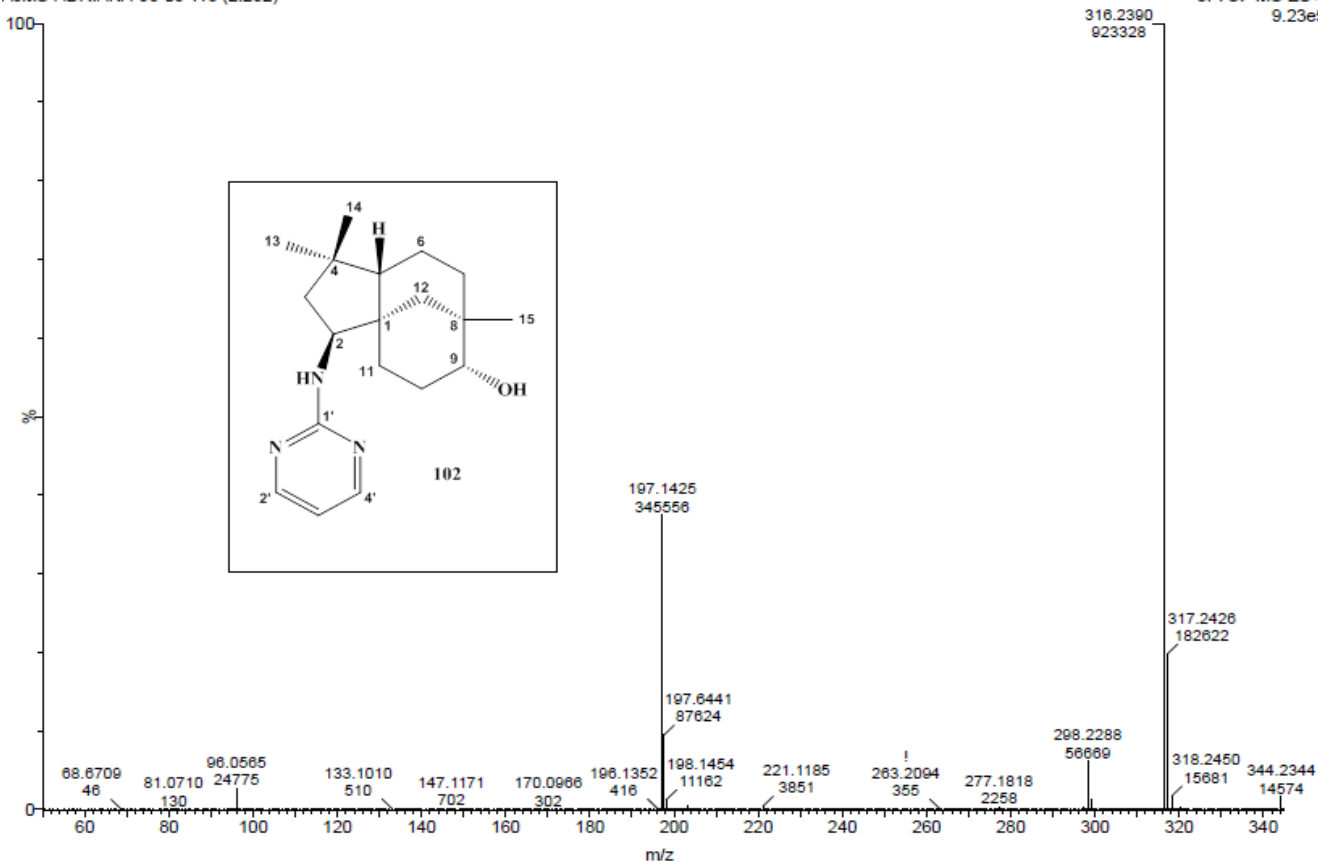
n.O.e



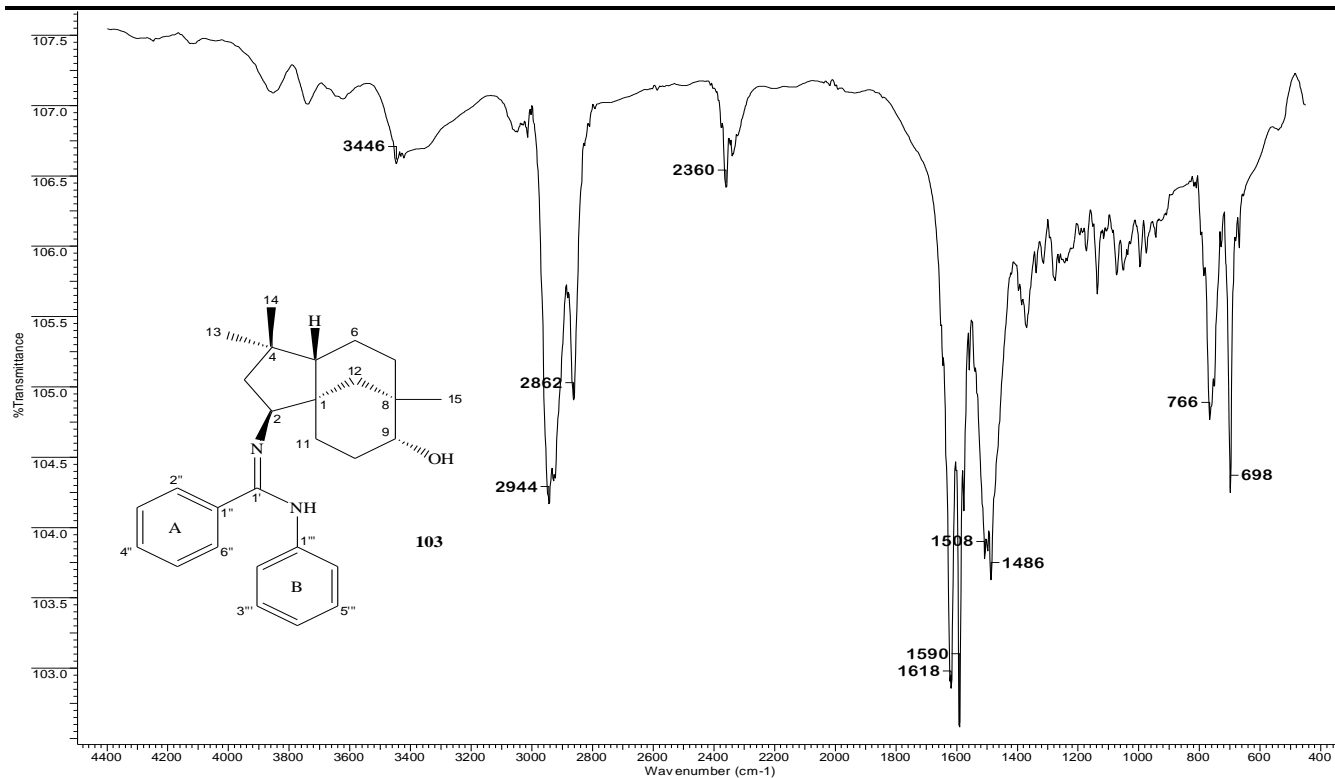
APÊNDICE C3 - Espectro massas EM-ESI positivo de **102**, obtido em um espectrofotômetro ESI-Q-TOF

AJMS-ADRIANA-98-09 118 (2.292)

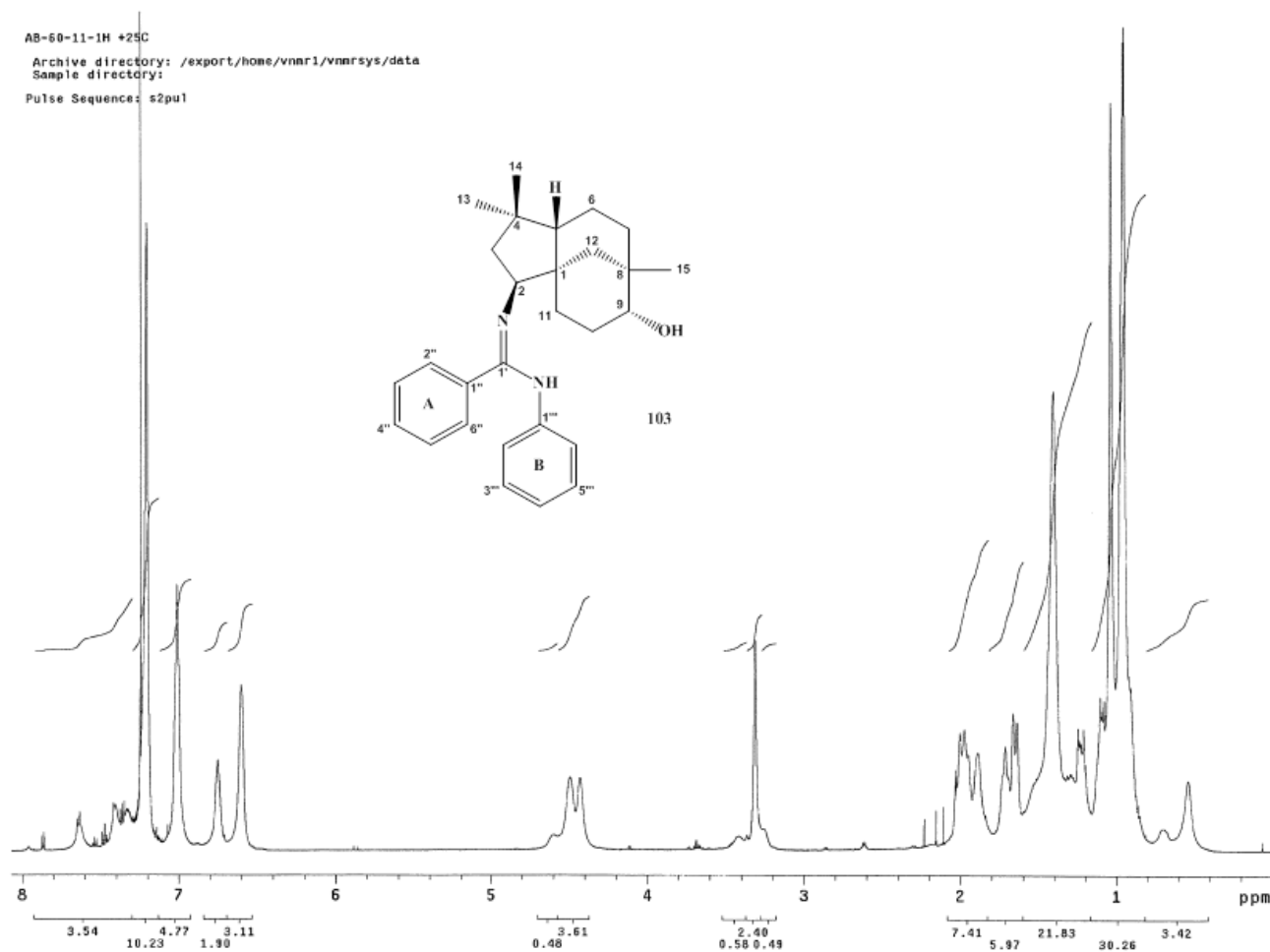
3: TOF MS ES+  
9.23e5



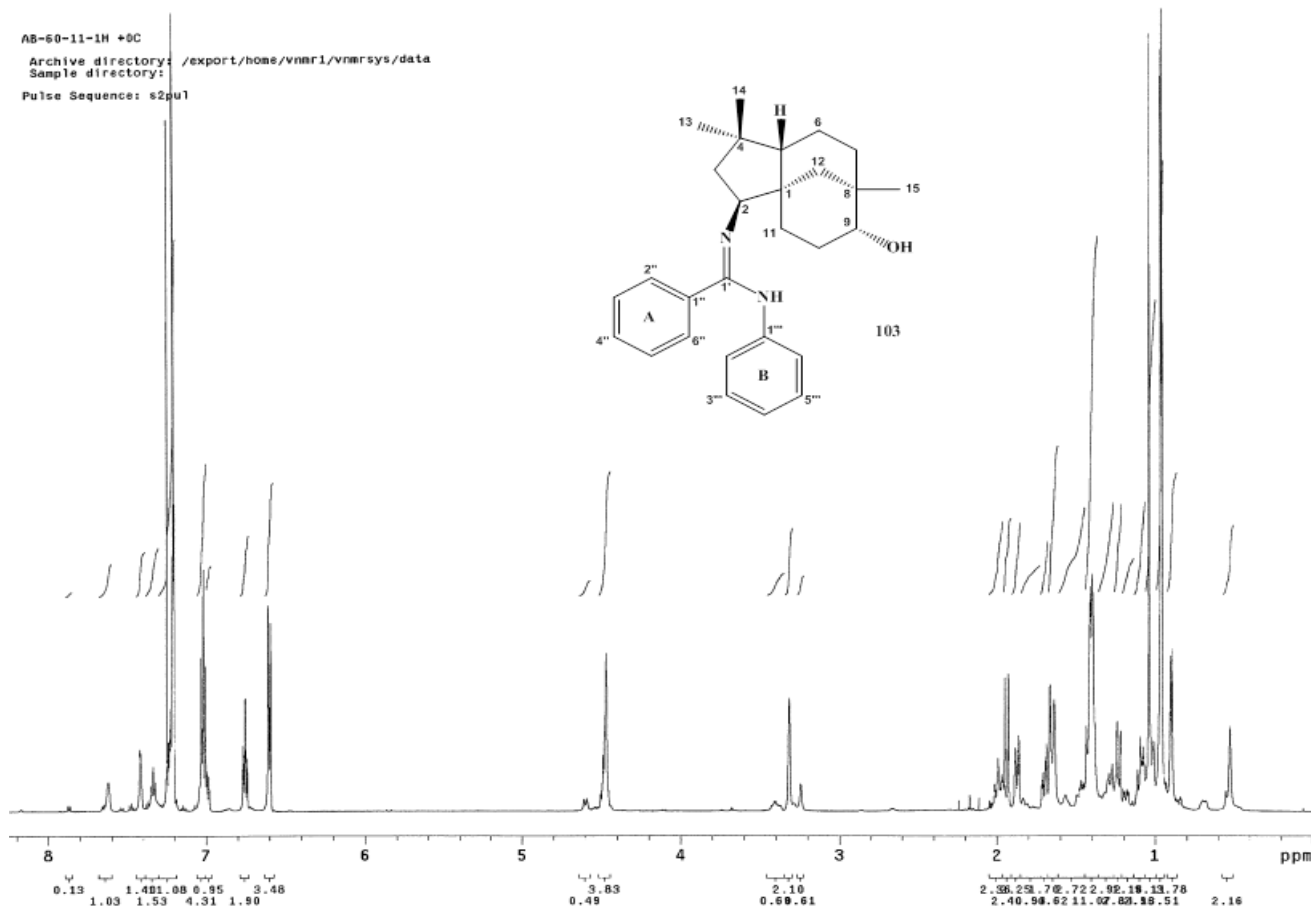
APÊNDICE D3 - Espectro na região do infravermelho (KBr) do composto **103**



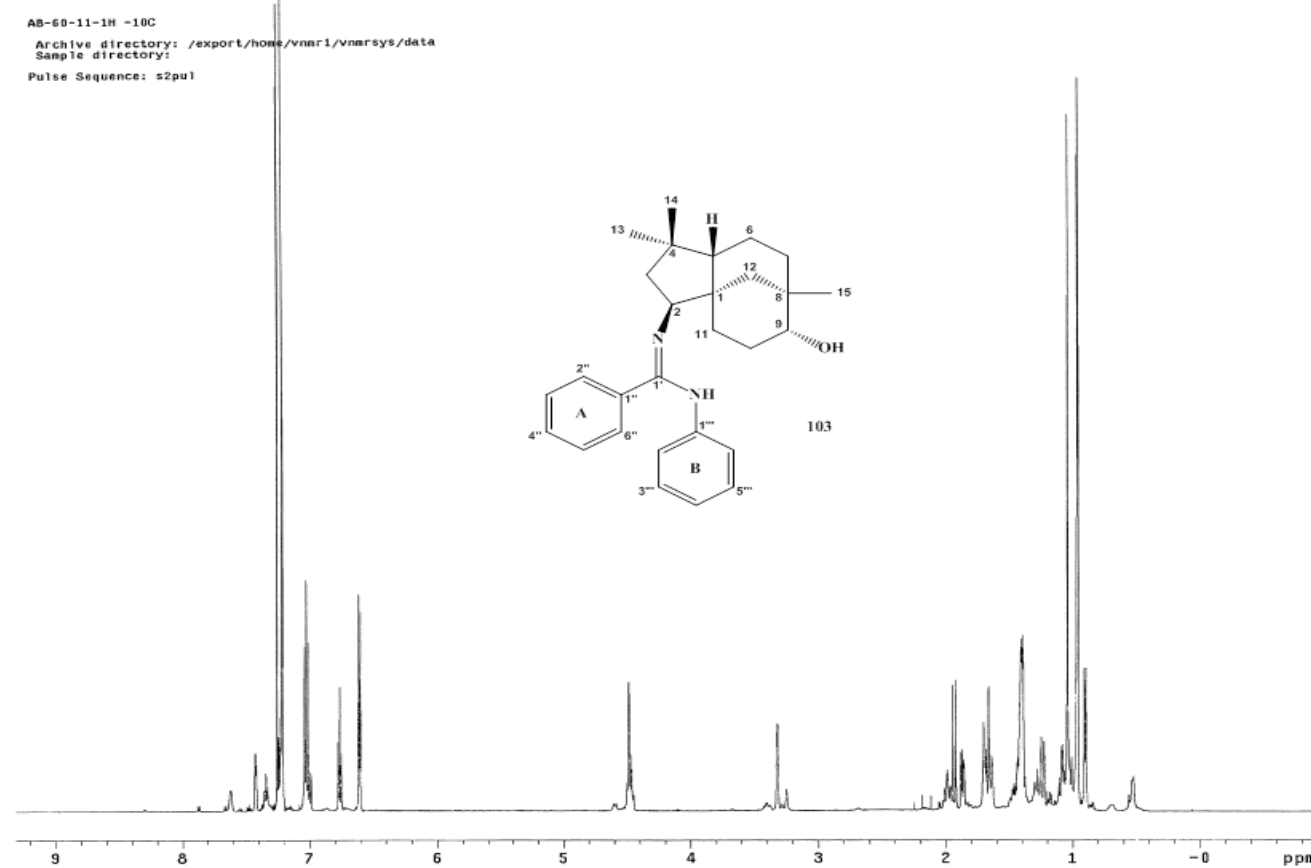
APÊNDICE E3 - Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do composto **103** à 25 °C



APÊNDICE F3 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do composto 103 à  $0^\circ\text{C}$



APÊNDICE G3 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do composto 103 à  $-10^\circ\text{C}$



APÊNDICE H3 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do composto 103 à  $-20^\circ\text{C}$

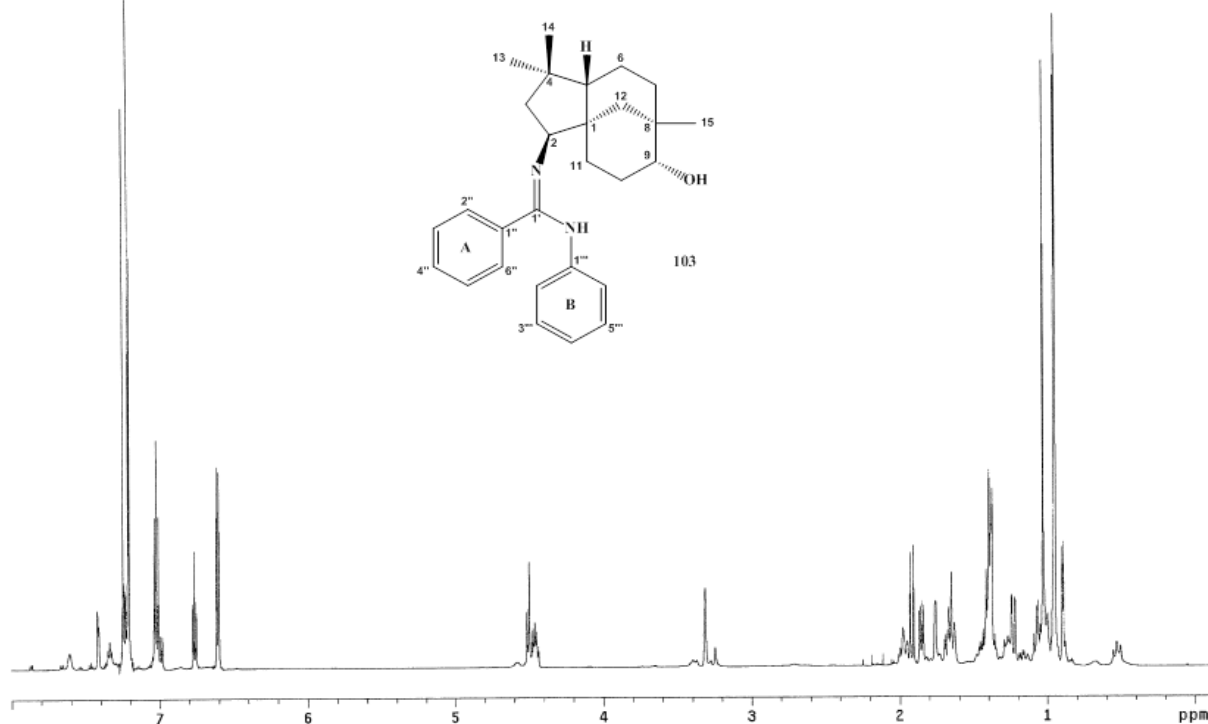
AB-60-11-1H -20C

Archive directory: /export/home/vnmr1/vnmrsys/data

Sample directory:

File: PROTON

Pulse Sequence: s2pu1



APÊNDICE I3 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do composto 103 à  $-30^\circ\text{C}$

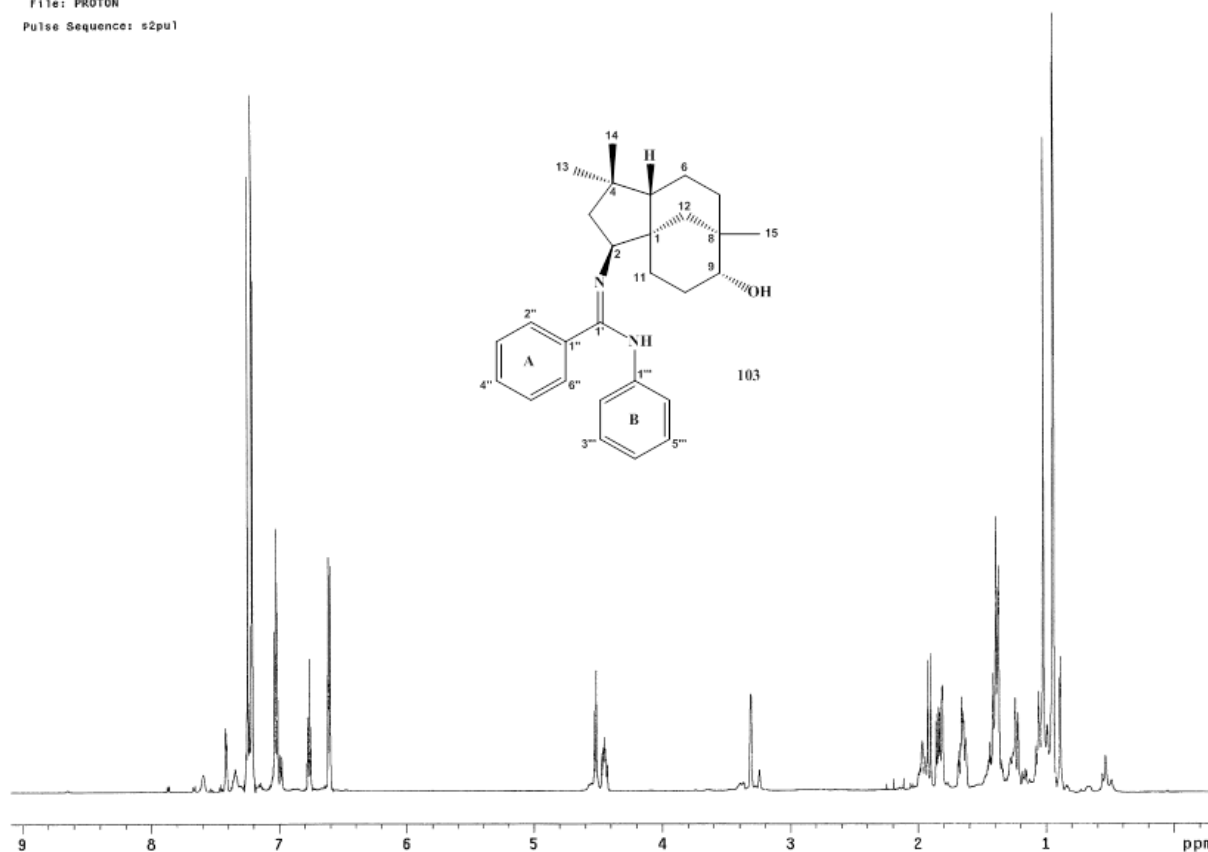
AB-60-11-1H -30C

Archive directory: /export/home/vnmr1/vnmrsys/data

Sample directory:

File: PROTON

Pulse Sequence: s2pu1



APÊNDICE J3 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do composto 103 à  $-40^\circ\text{C}$

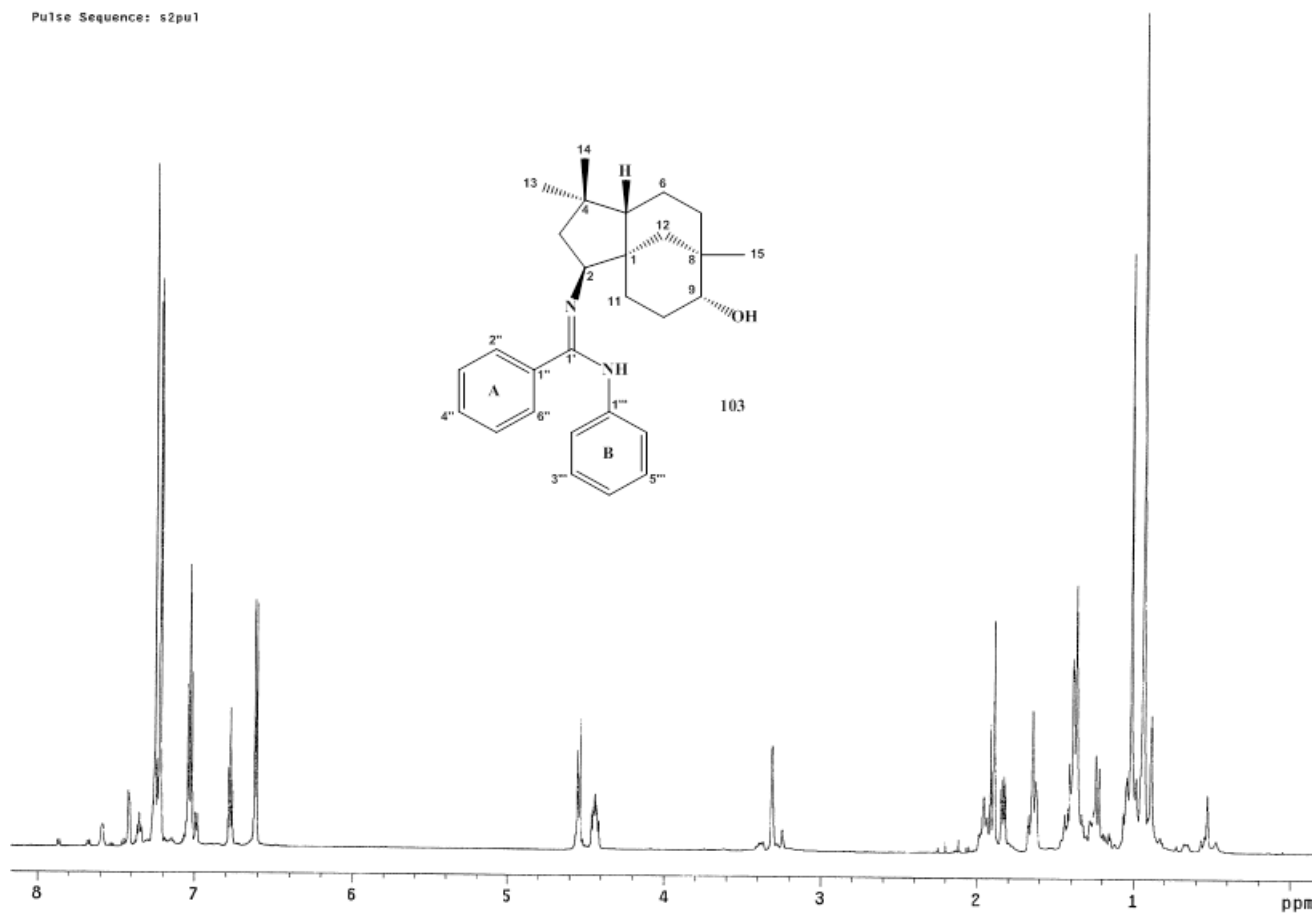
AB-60-11-1H -40C

Archive directory: /export/home/vnmr1/vnmrsys/data

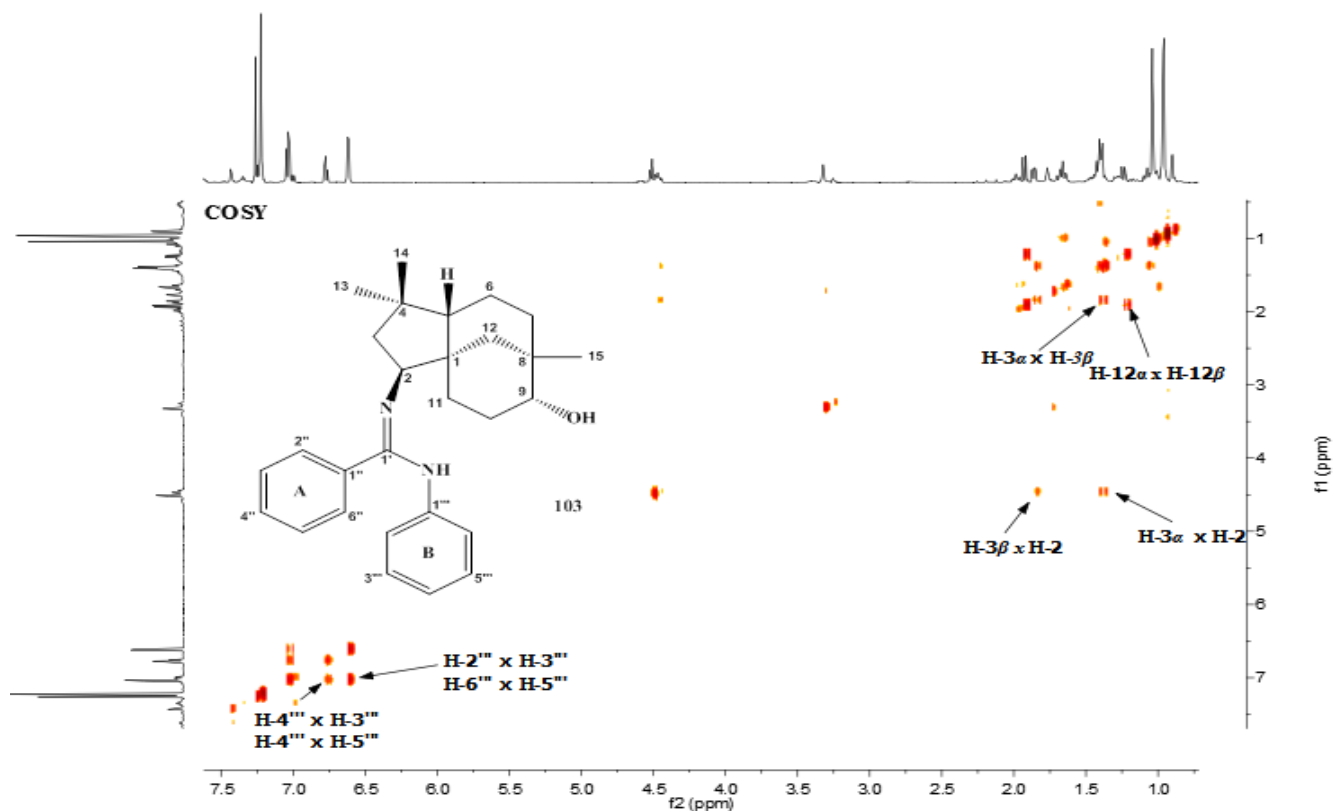
Sample directory:

File: PROTON

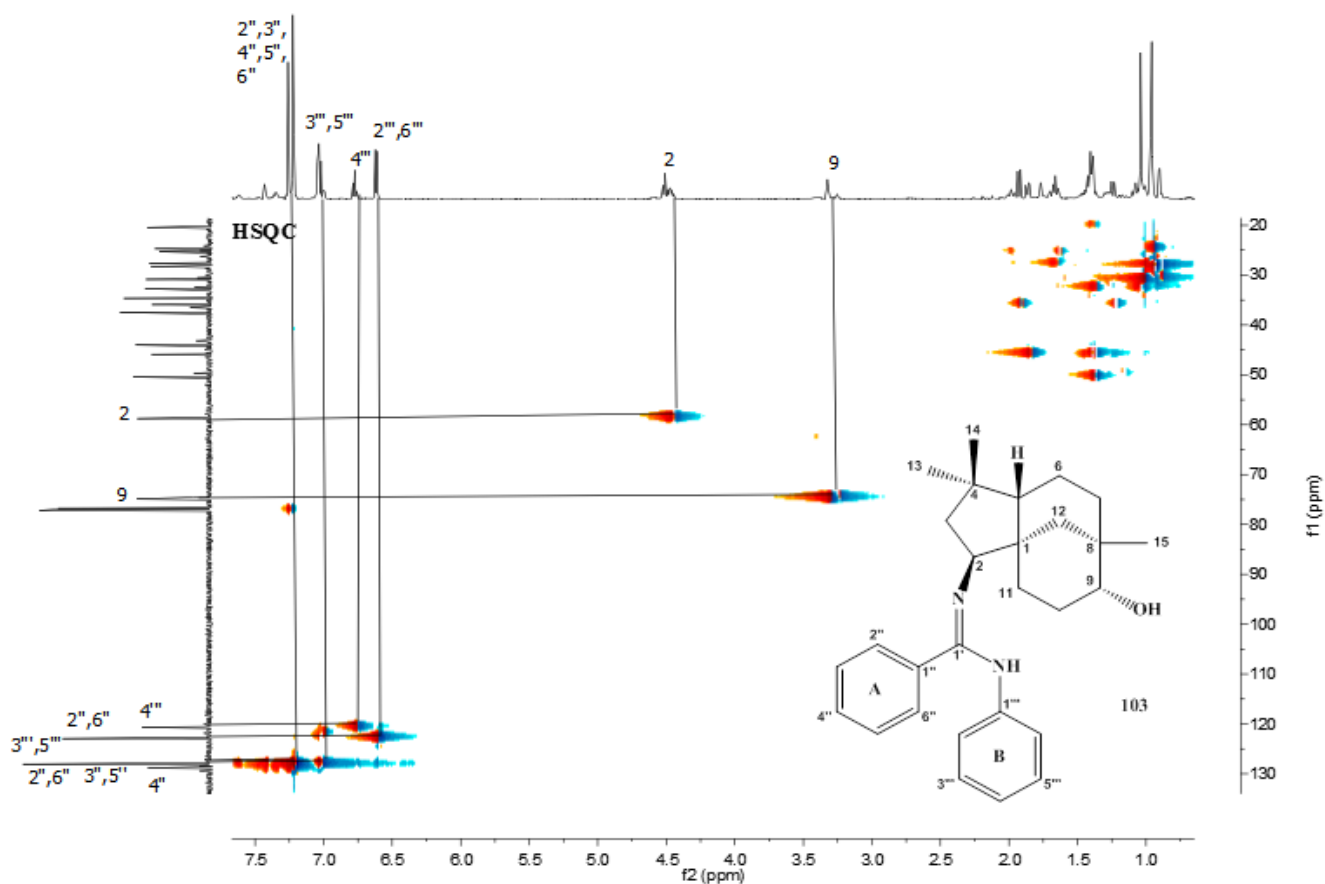
Pulse Sequence: s2pu1



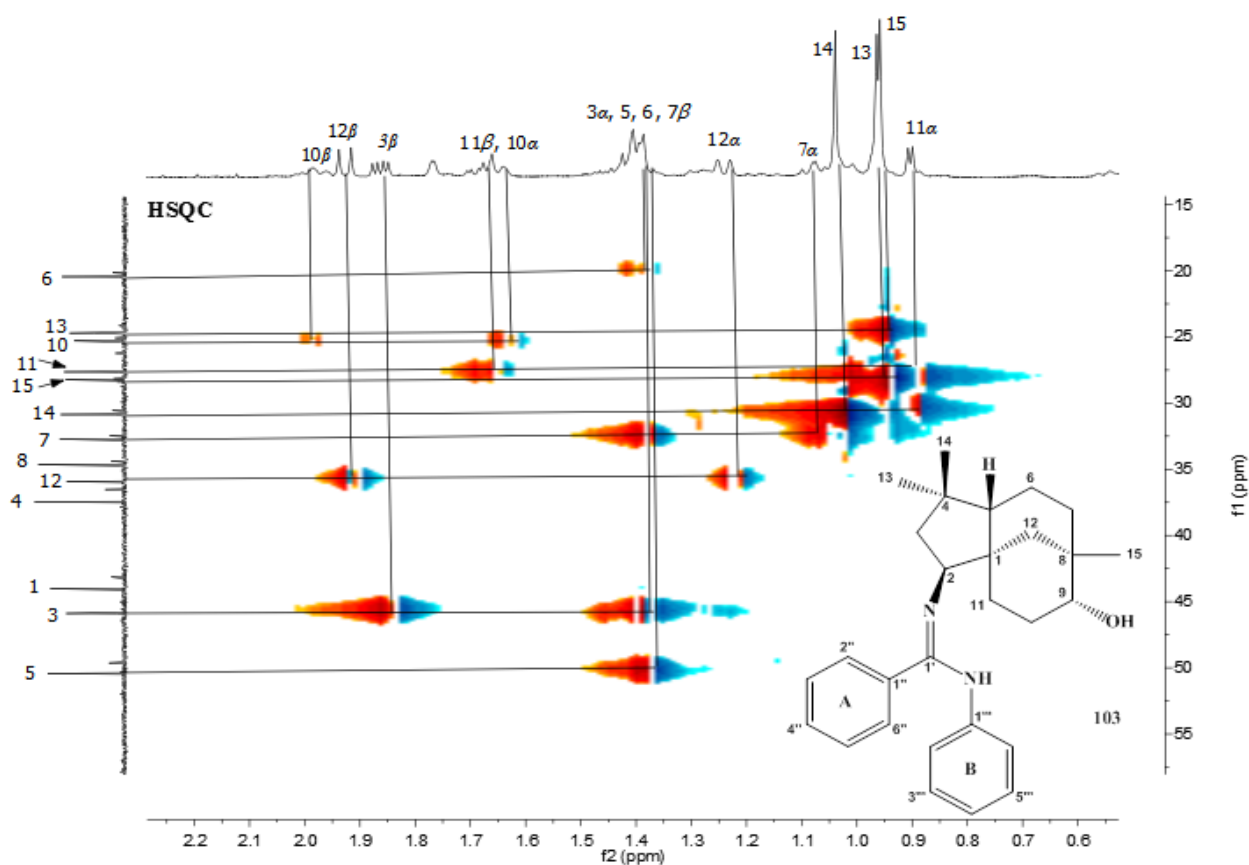
APÊNDICE L3 - Mapa de contornos COSY (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do composto 103



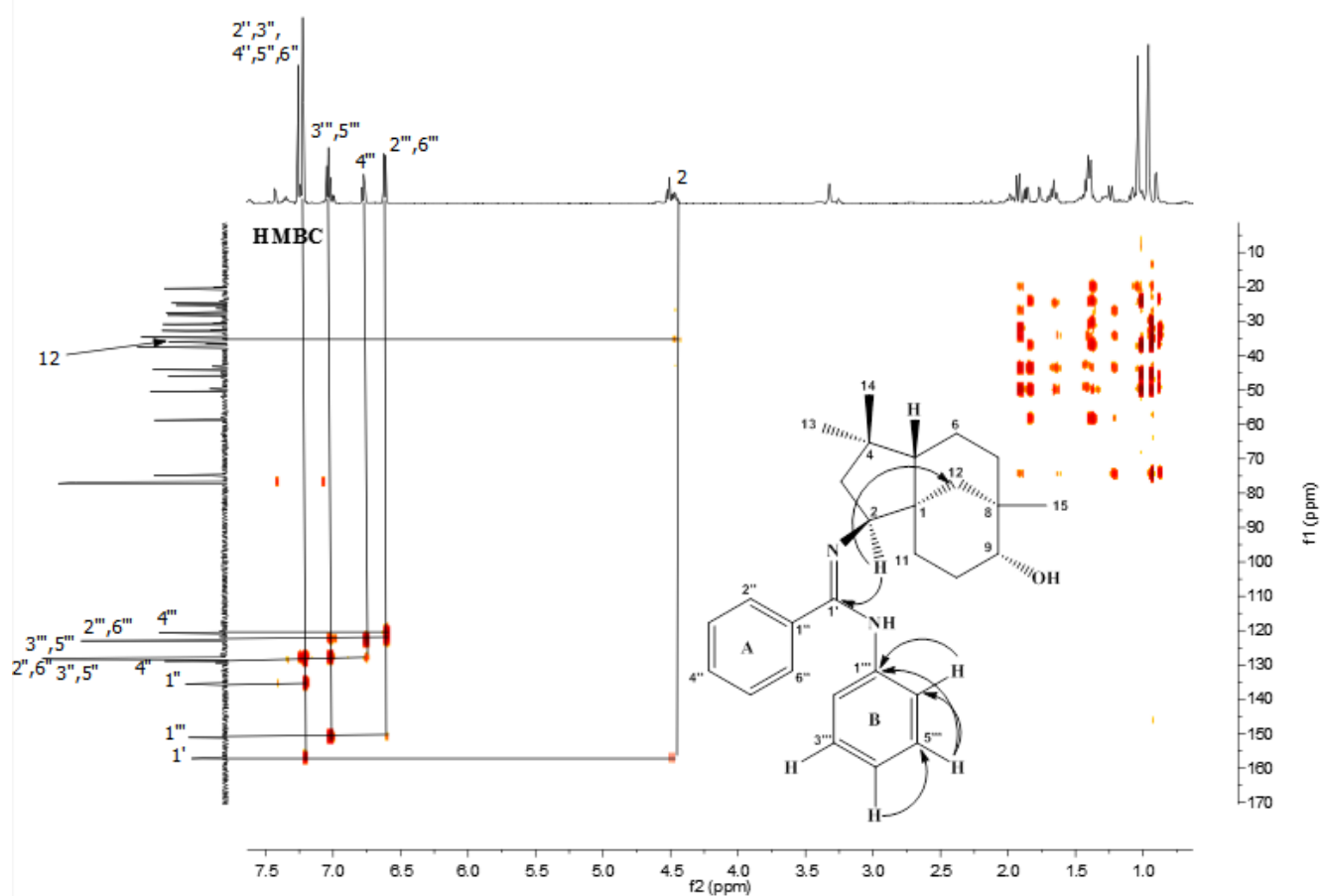
APÊNDICE M3 - Mapa de contornos HSQC (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do composto **103**



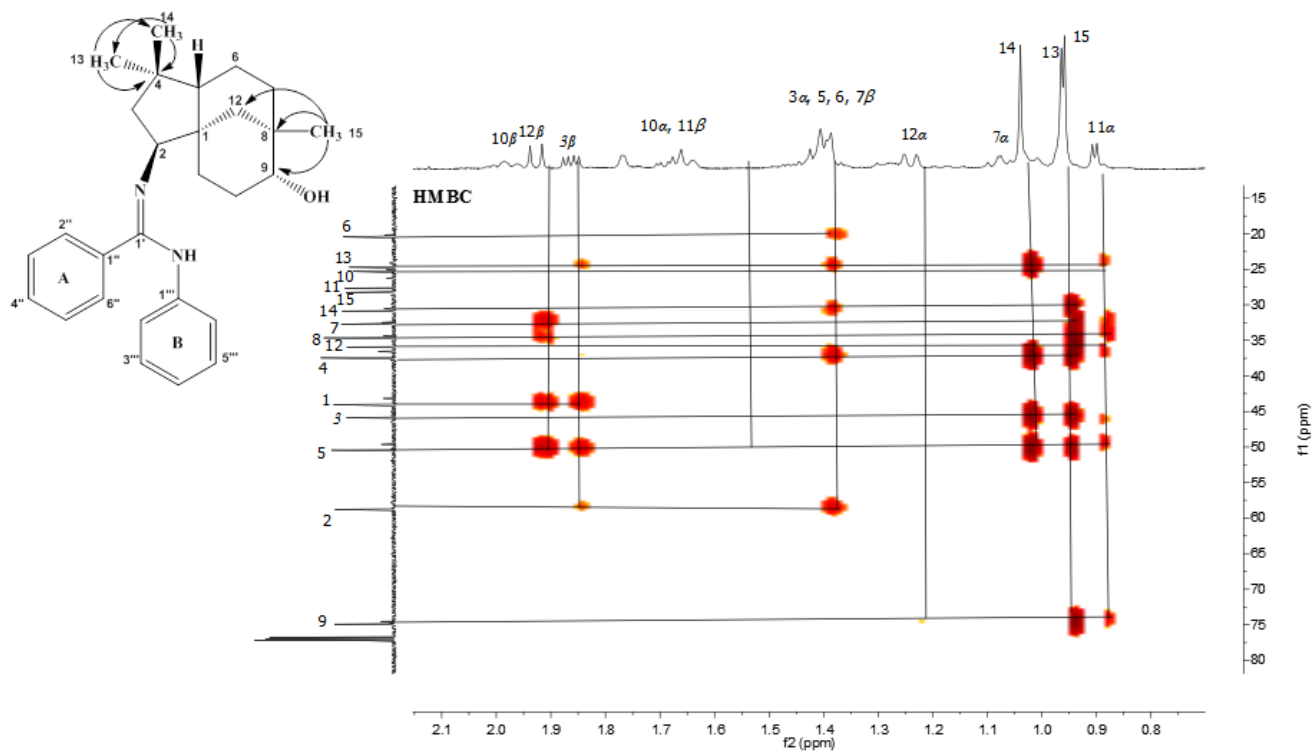
APÊNDICE N3 - Expansão do mapa de contornos HSQC (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do composto **103**



APÊNDICE O3 - Mapa de contornos HMBC (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do composto **103**

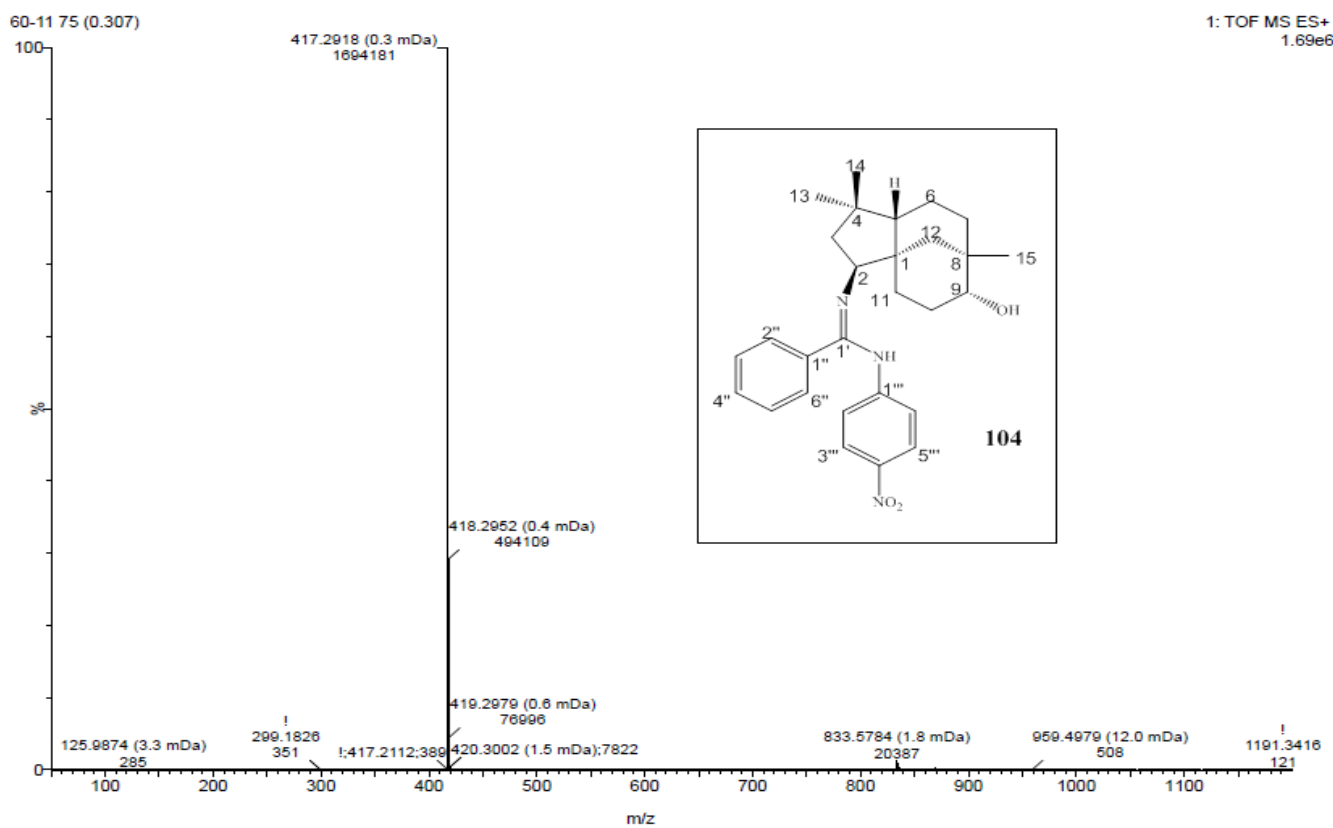


APÊNDICE P3 - Expansão do mapa de contornos HMBC (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do composto **103**

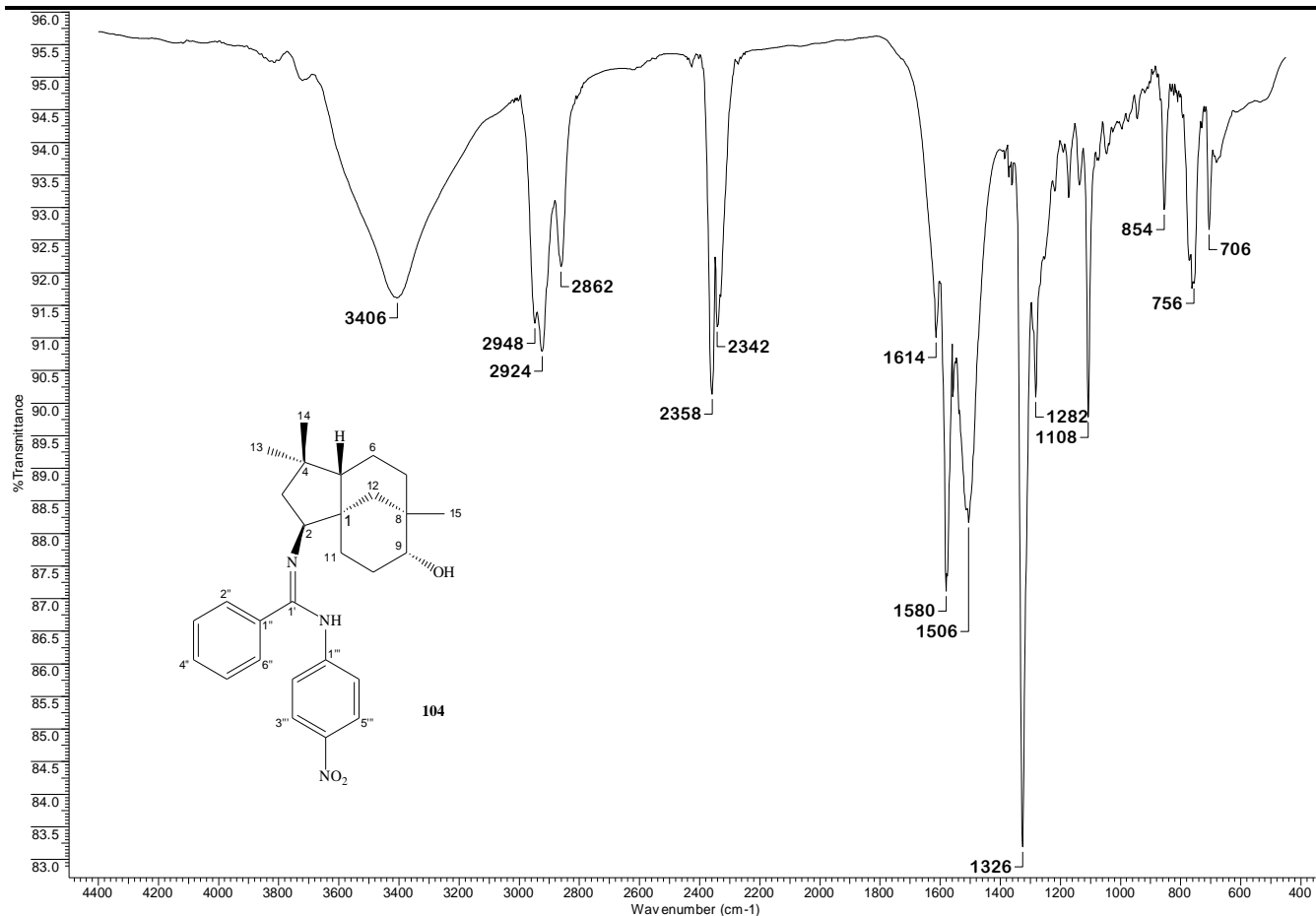




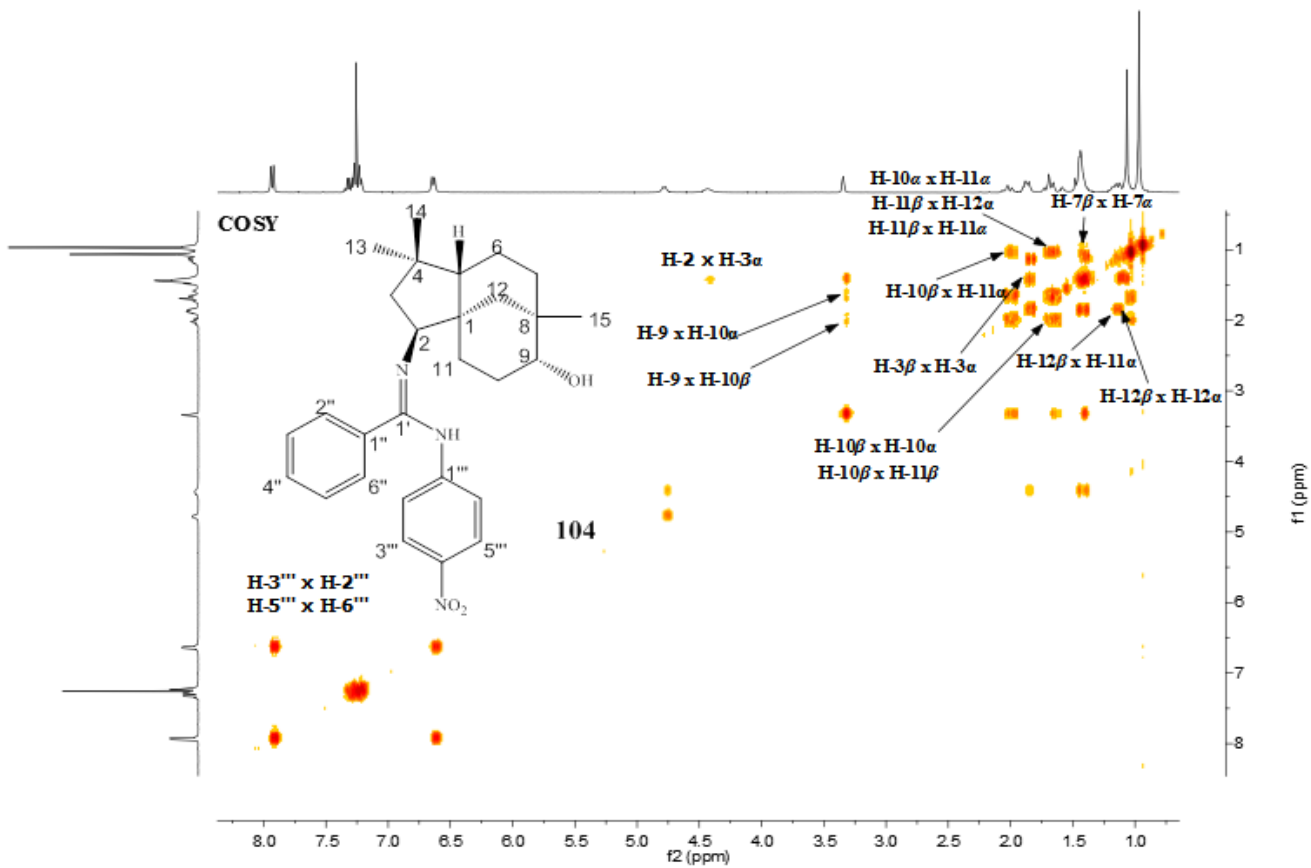
APÊNDICE Q3 - Espectro massas EM-ESI positivo de **103**, obtido em um espectrofotômetro ESI-Q-TOF



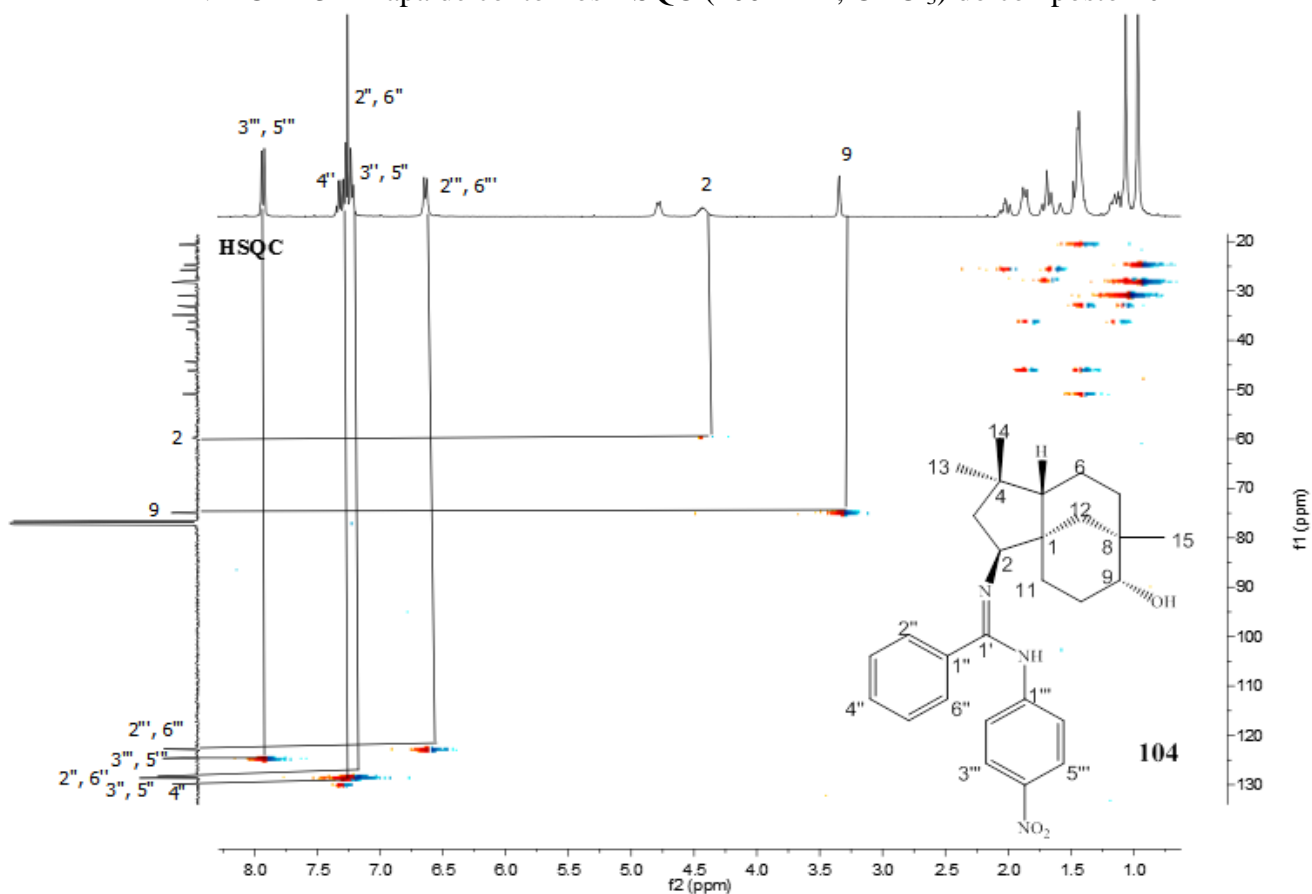
APÊNDICE R3 - Espectro na região do infravermelho (KBr) do composto **104**



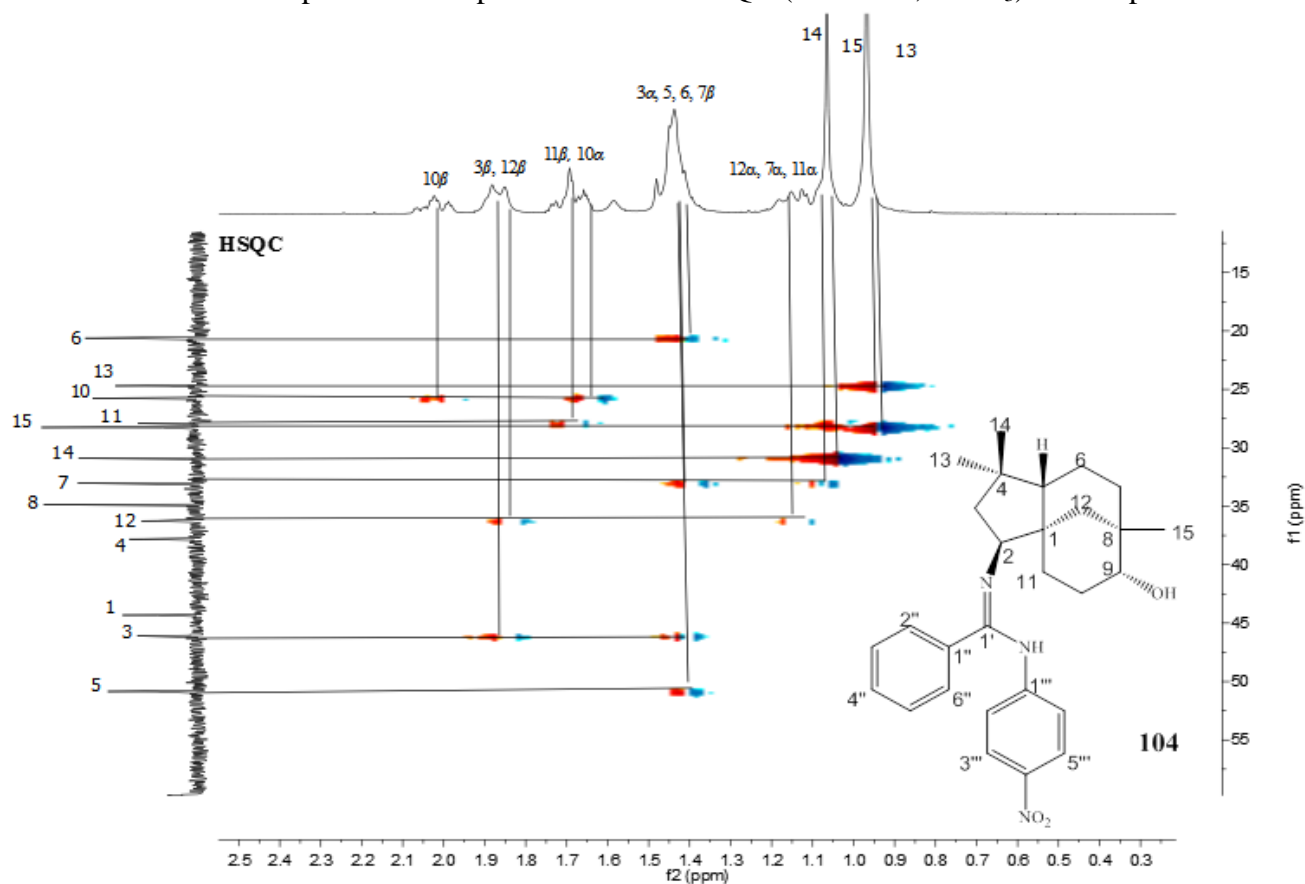
APÊNDICE S3 - Mapa de contornos COSY (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do composto **104**



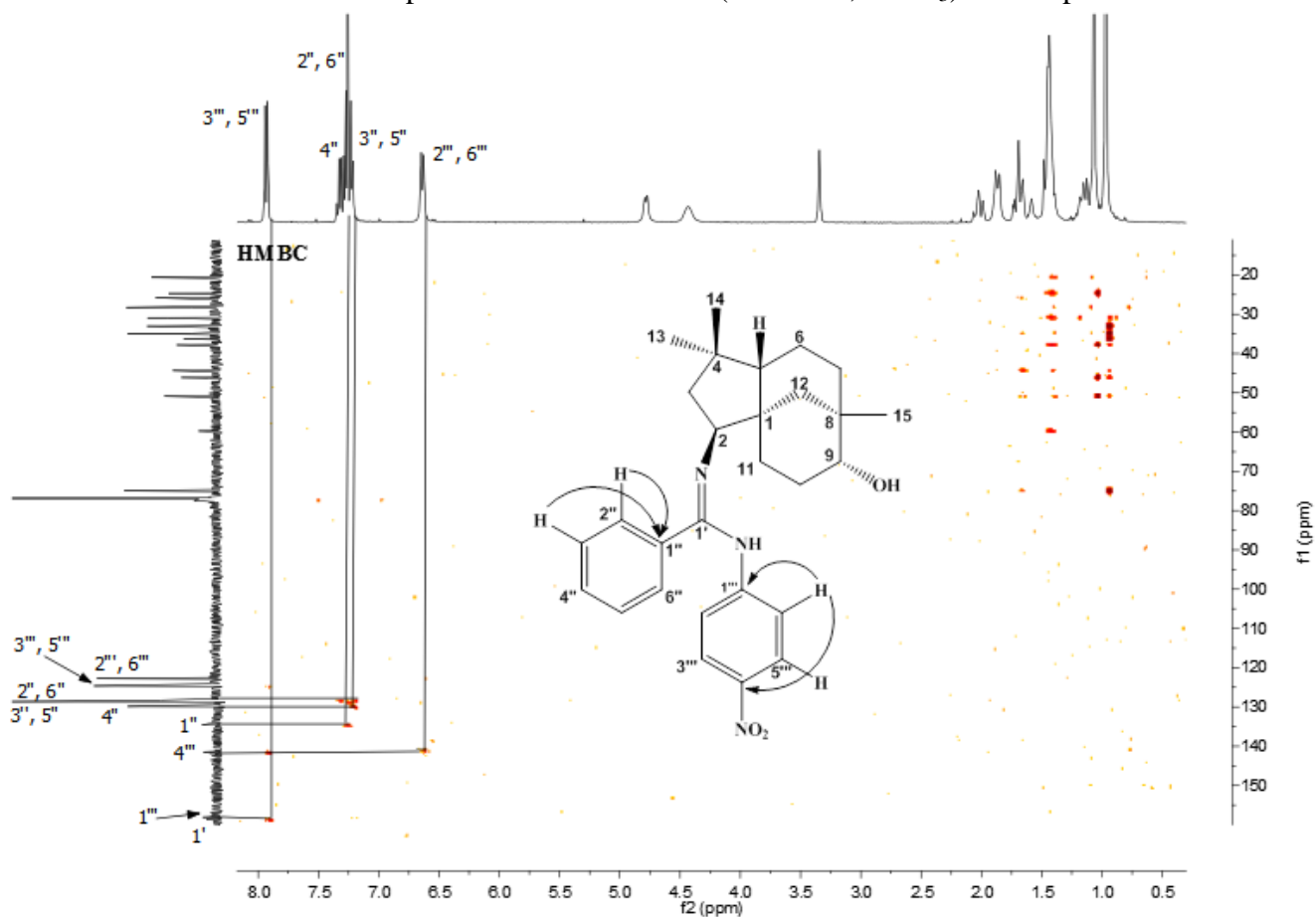
APÊNDICE T3 - Mapa de contornos HSQC (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do composto **104**



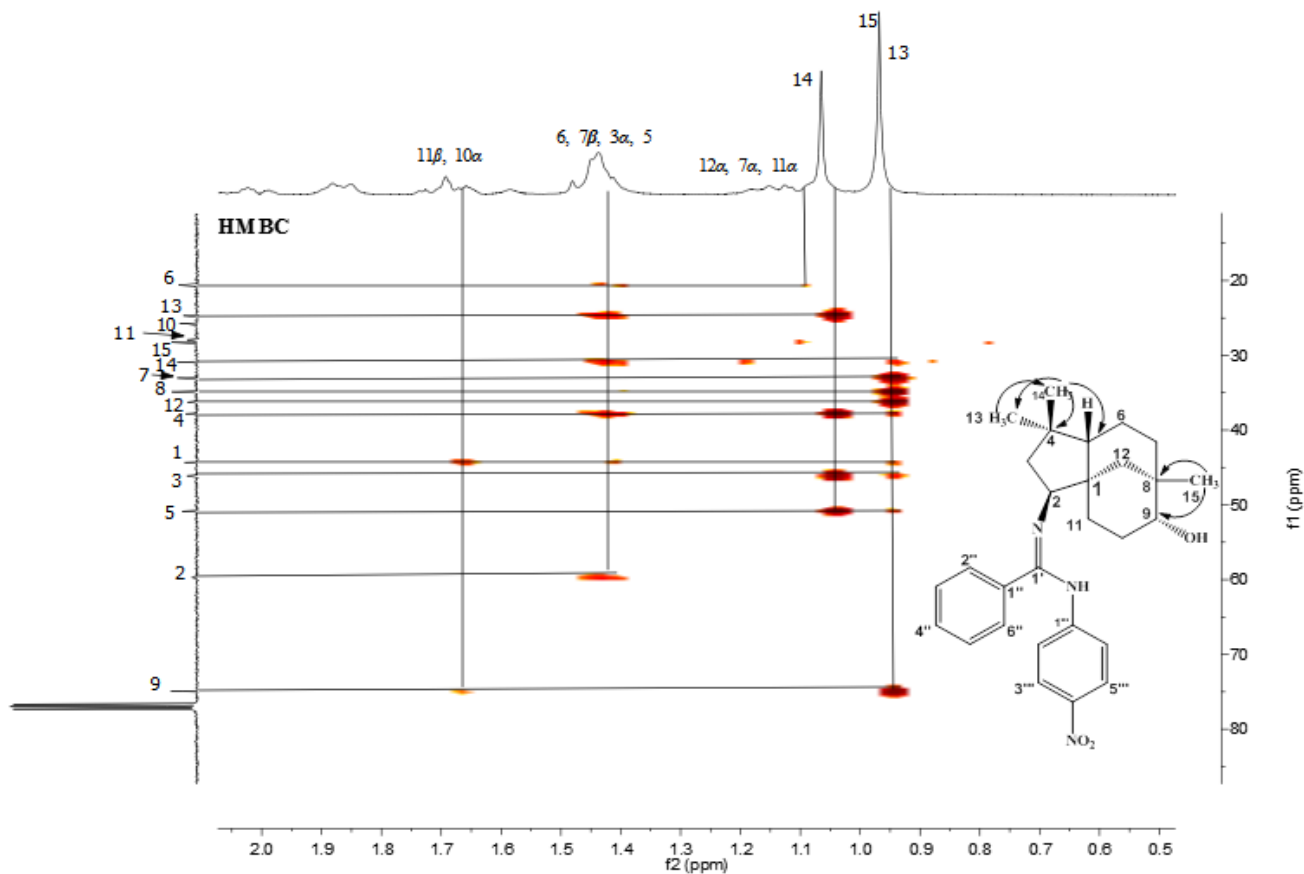
APÊNDICE U3- Expansão do mapa de contornos HSQC (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do composto **104**



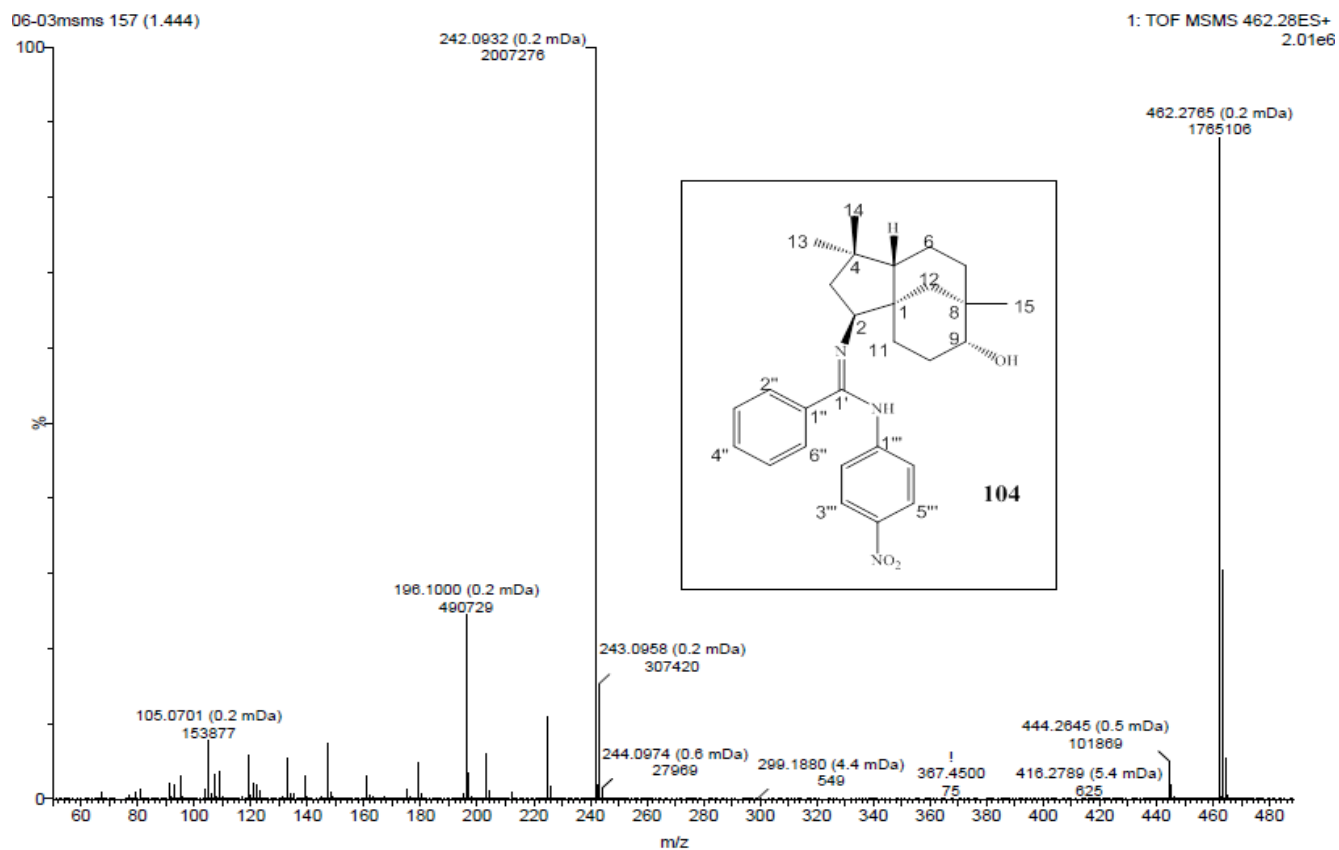
APÊNDICE V3 - Mapa de contornos HMBC (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do composto **104**



APÊNDICE X3 - Expansão do mapa de contornos HMBC (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do composto **104**

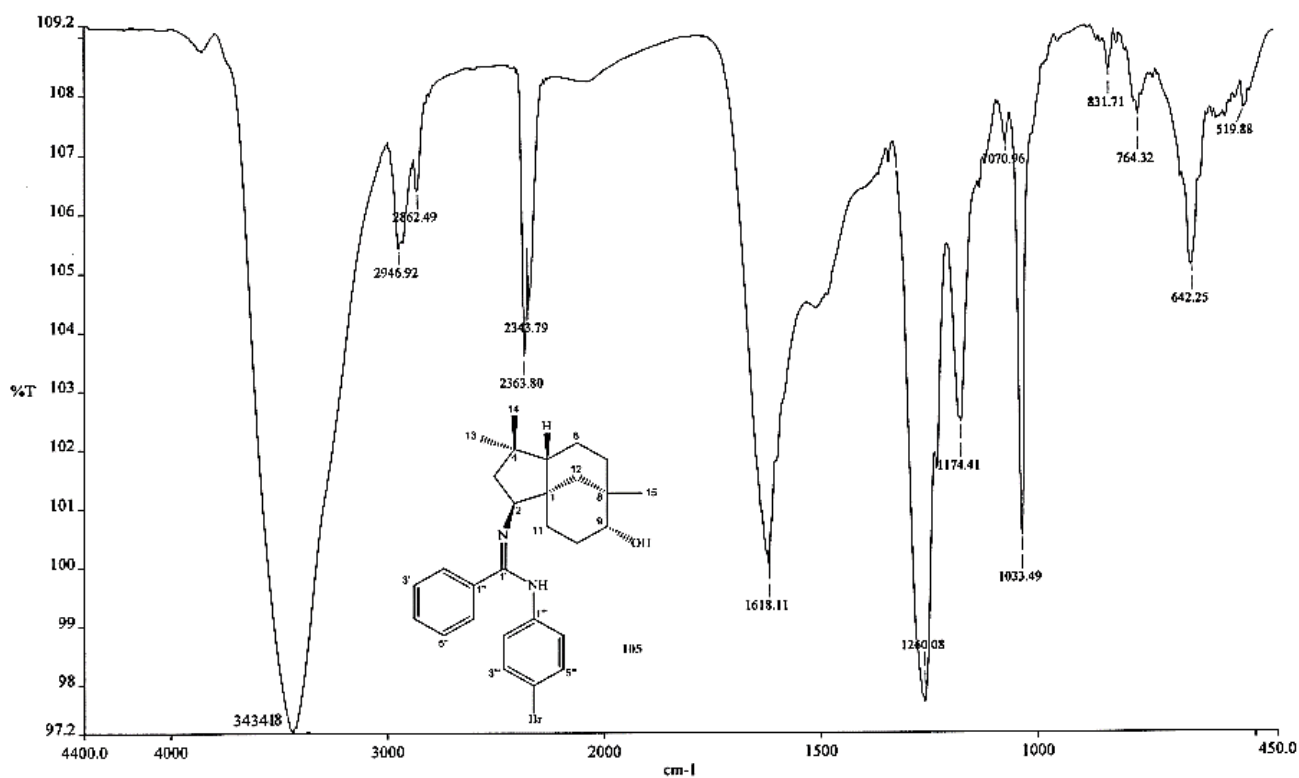


APÊNDICE Z3 - Espectro massas EM-ESI positivo de **104**, obtido em um espectrofotômetro ESI-Q-TOF

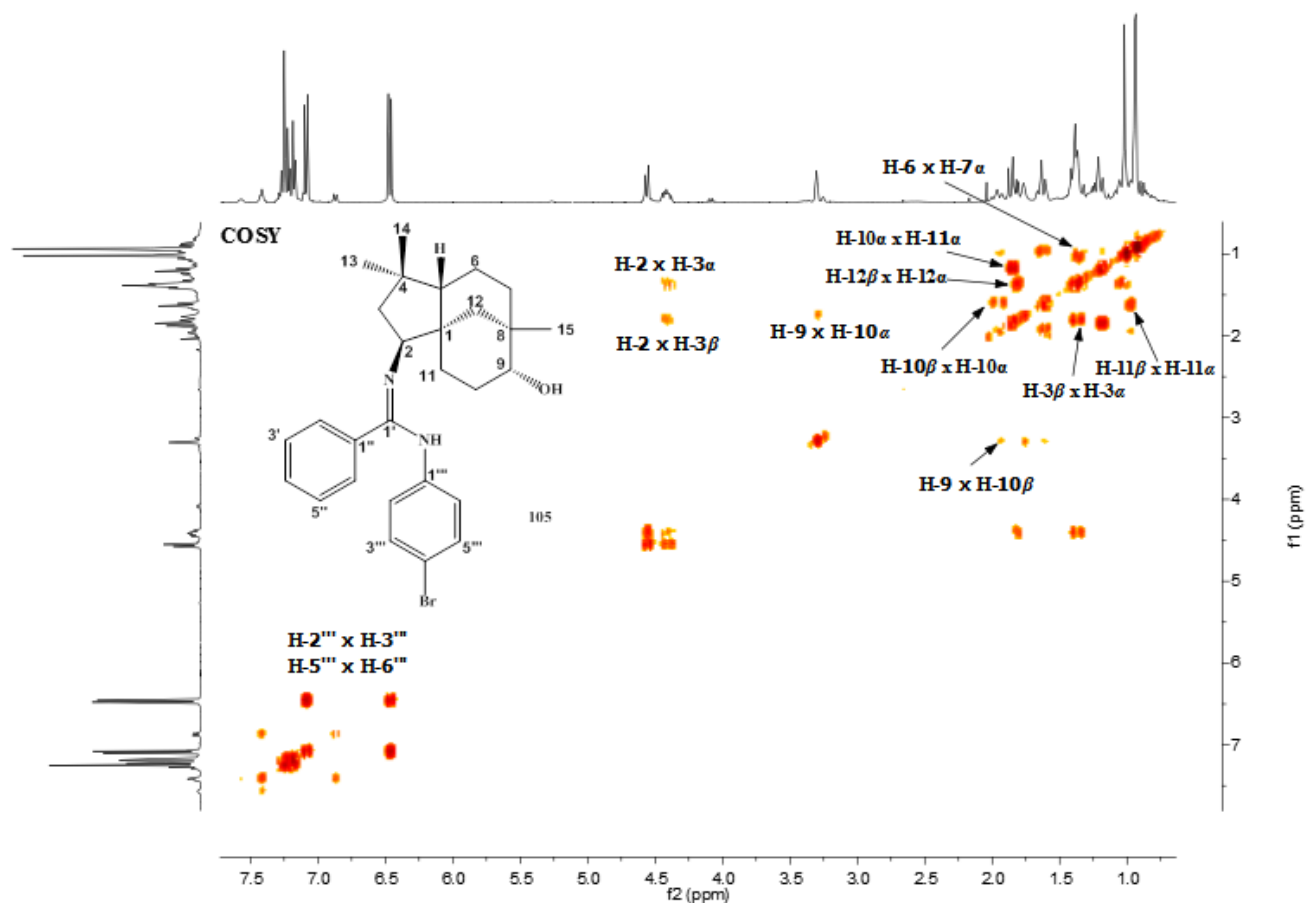


APÊNDICE A4 - Espectro na região do infravermelho (KBr) do composto **105**

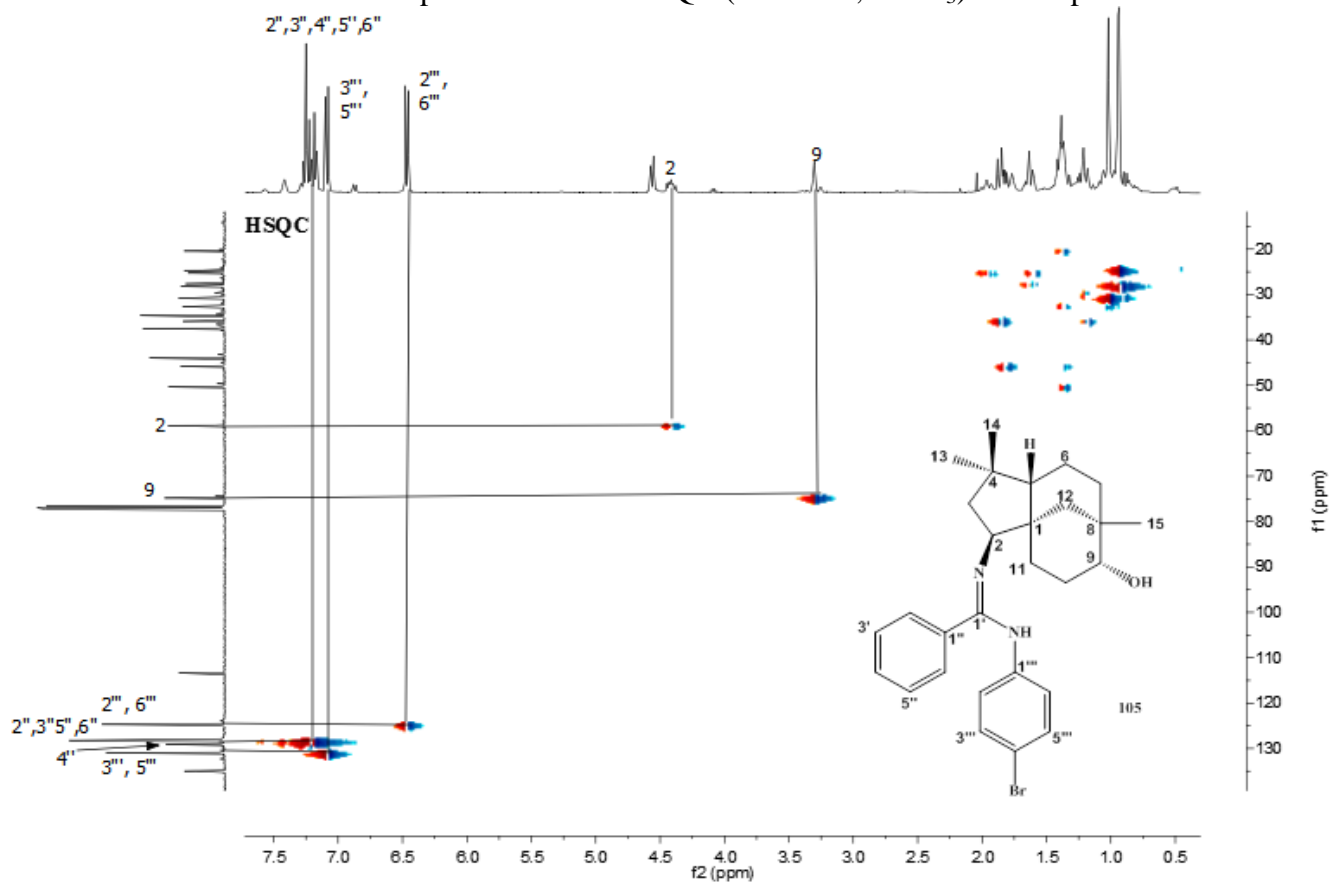
Spectrum Name: BROMO-AMIDINA.sp

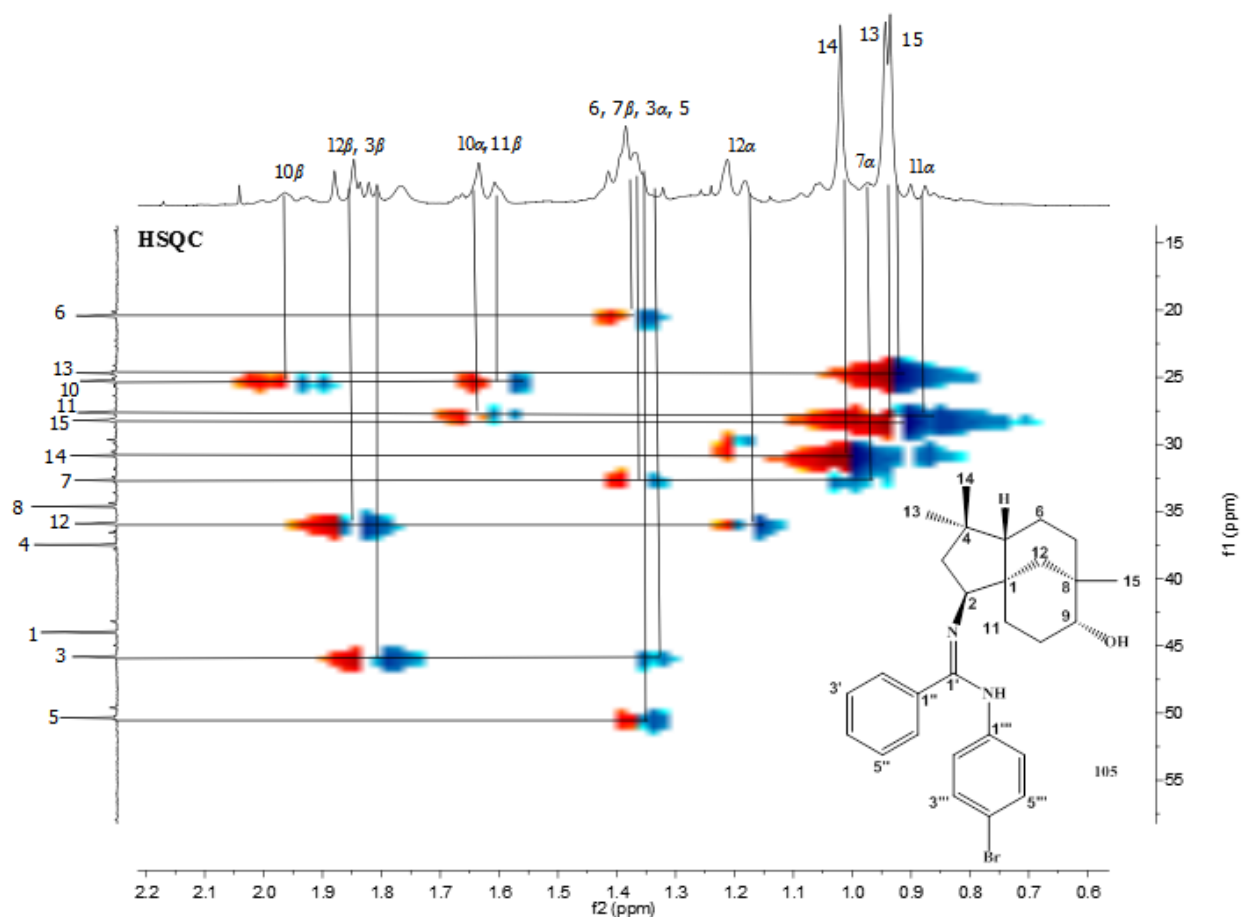


APÊNDICE B4 - Mapa de contornos COSY (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do composto **105**

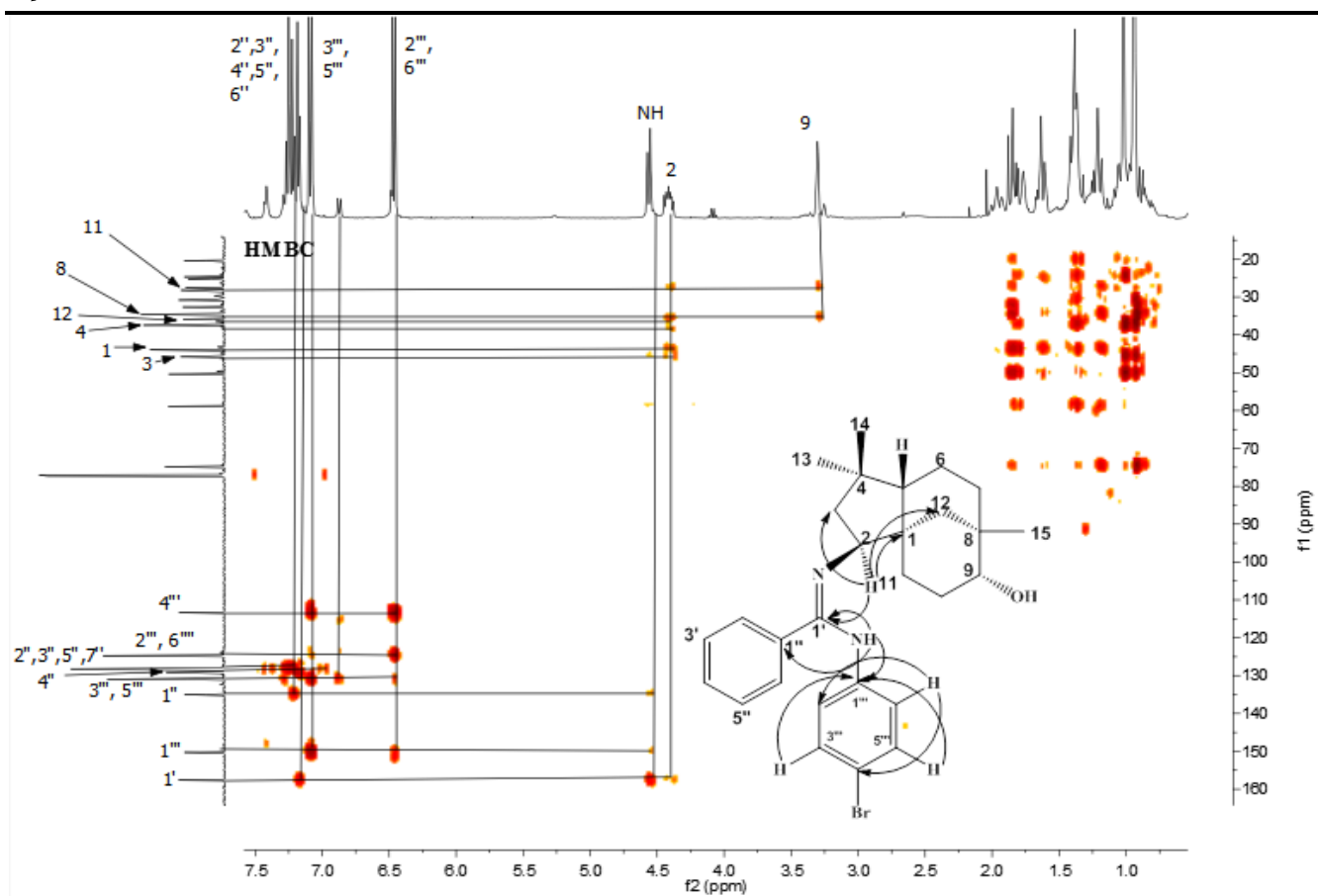


APÊNDICE C4 - Mapa de contornos HSQC (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do composto **105**

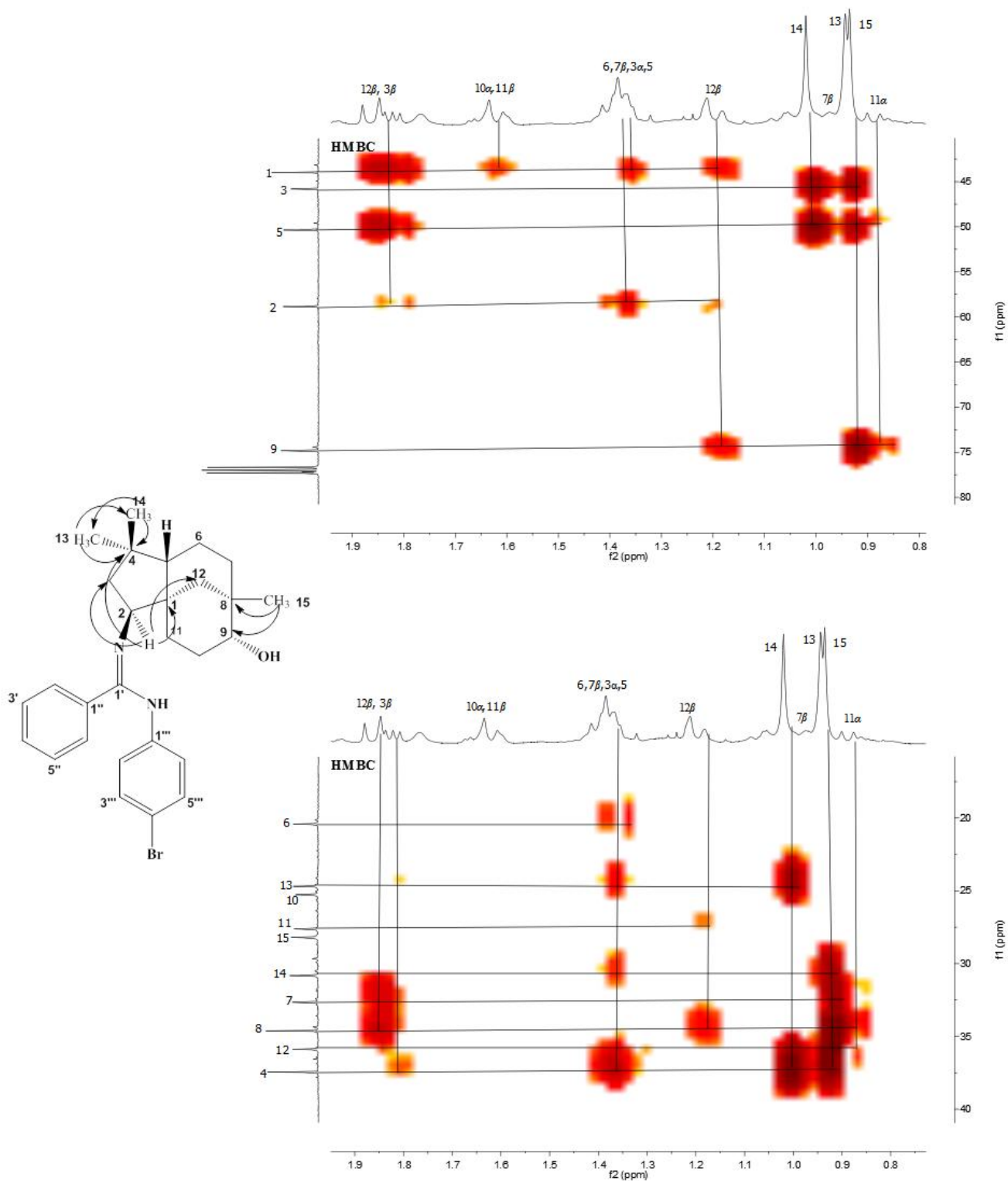




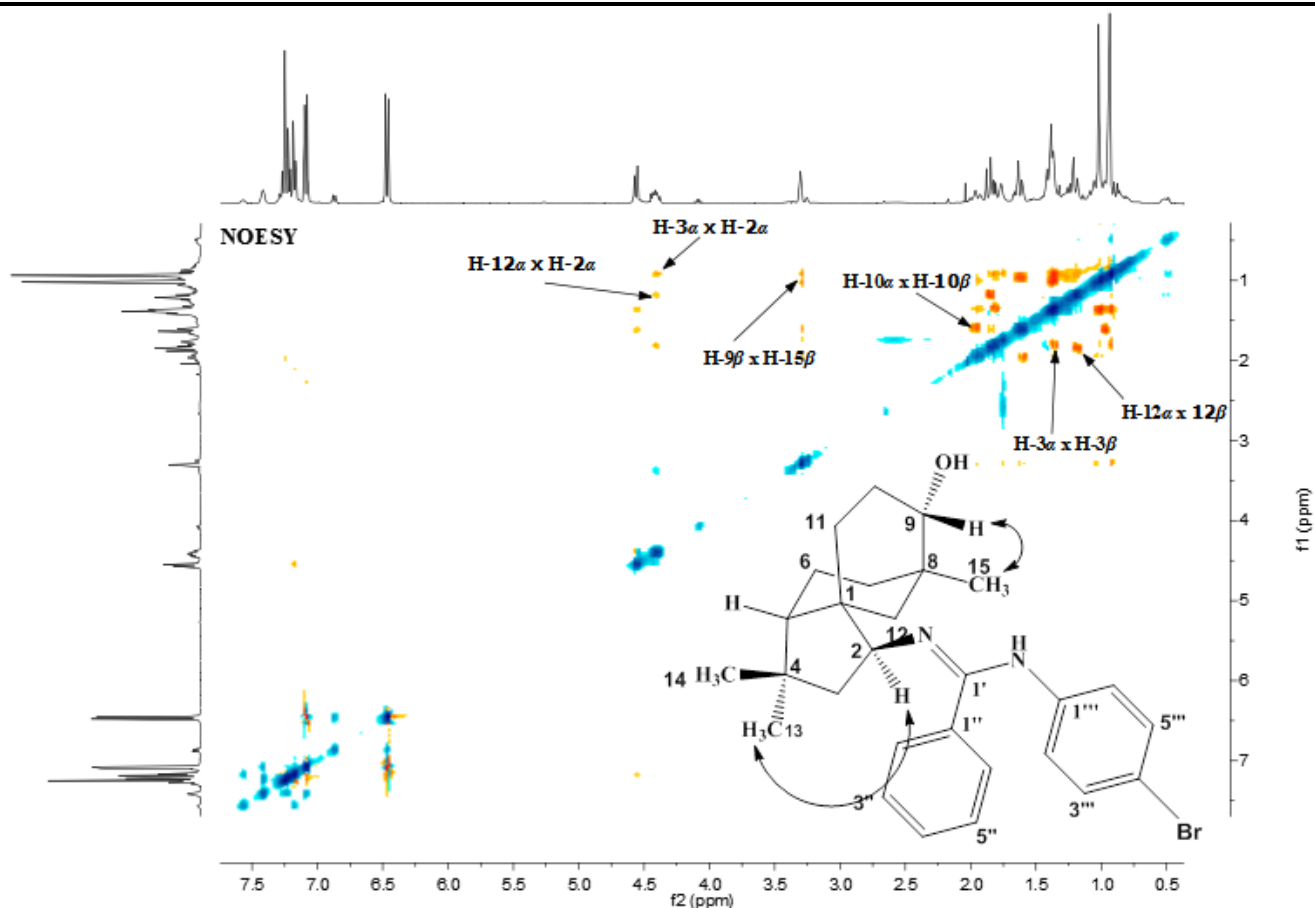
APÊNDICE E4 - Mapa de contornos HMBC (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do composto **105**



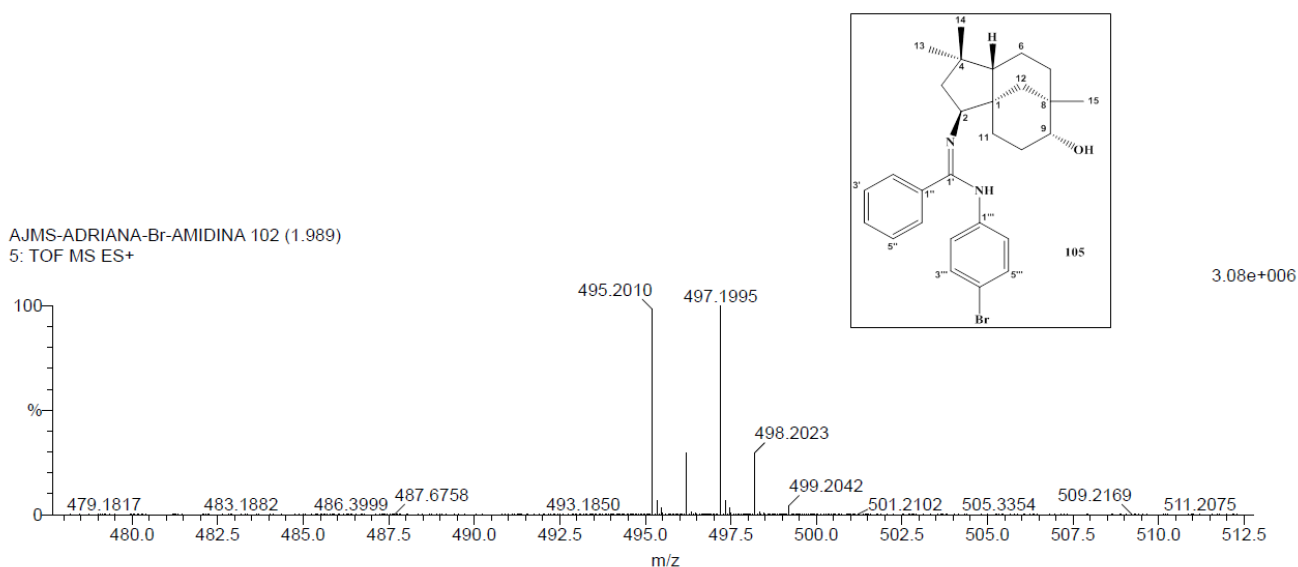




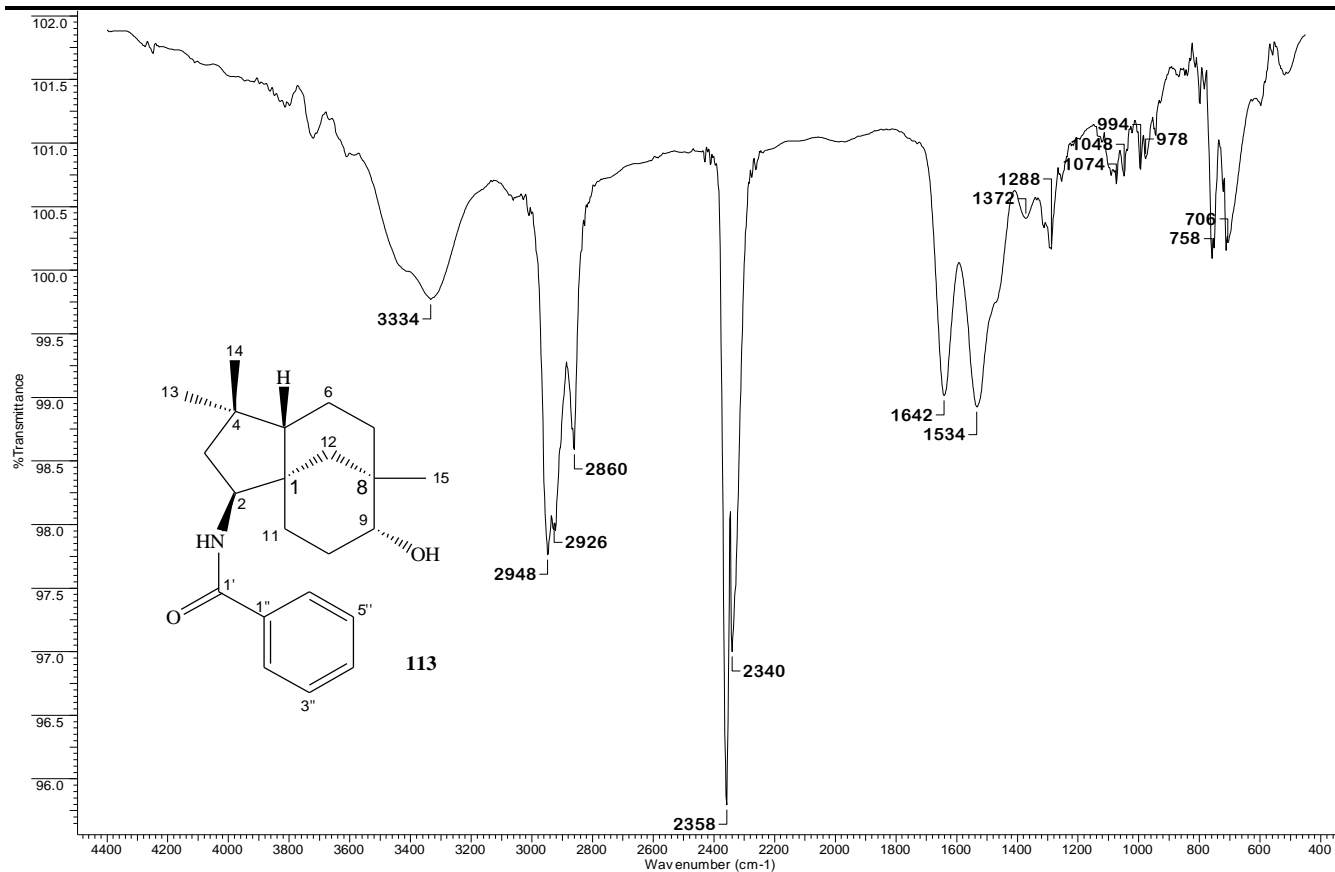
APÊNDICE G4 - Mapa de contornos NOESY (400 MHz, CDC<sub>3</sub>) do composto **105**



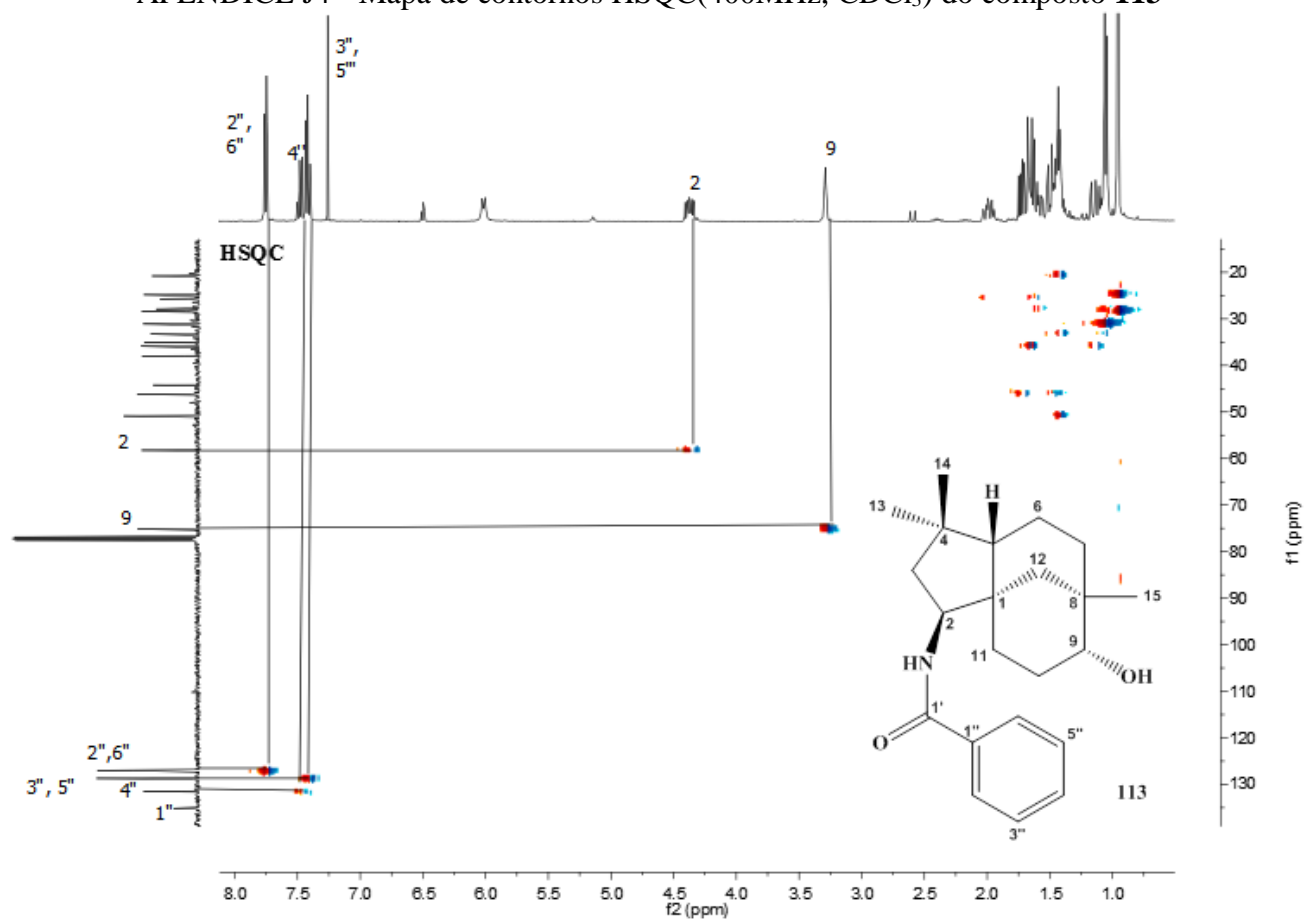
APÊNDICE H4 - Espectro massas EM-ESI positivo de **105**, obtido em um espectrofotômetro ESI-Q-TOF



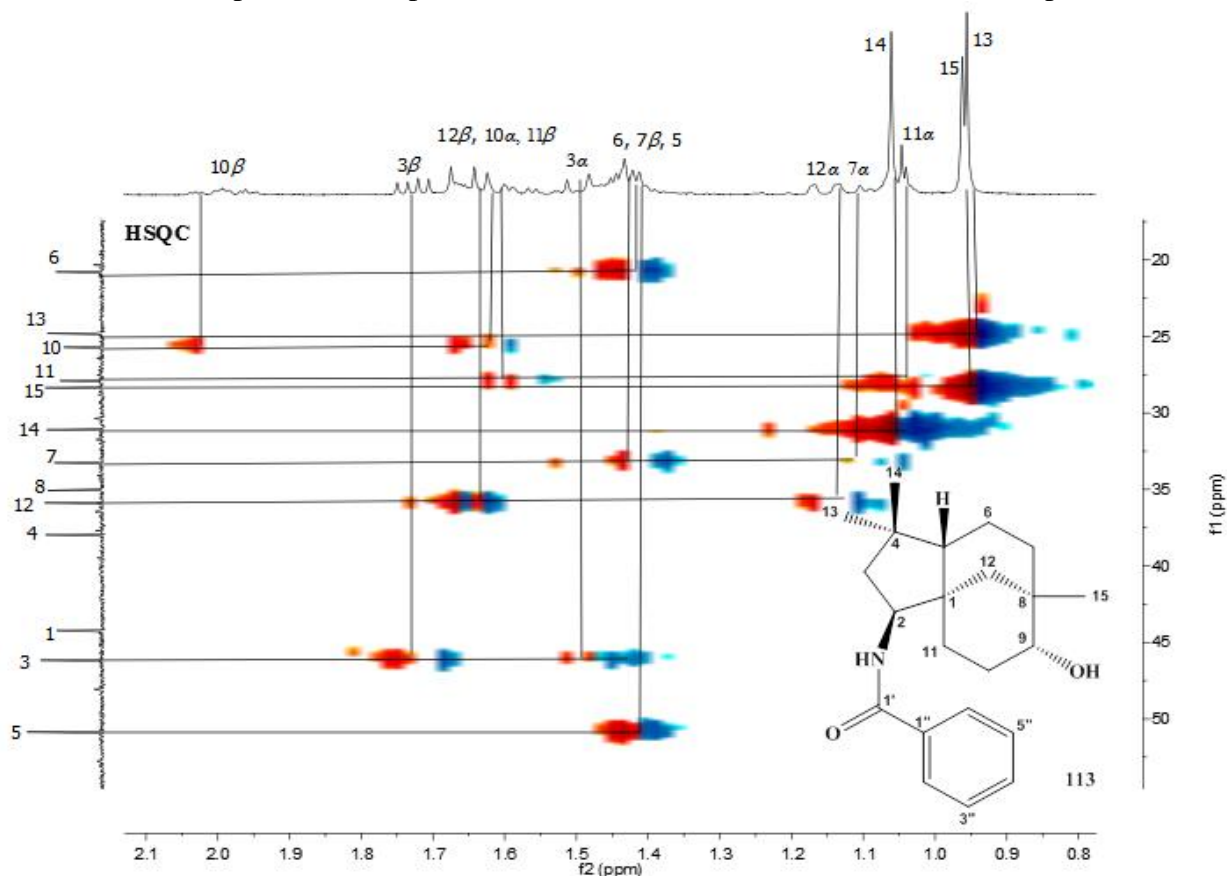
APÊNDICE I4 - Espectro na região do infravermelho (KBr) do composto **113**



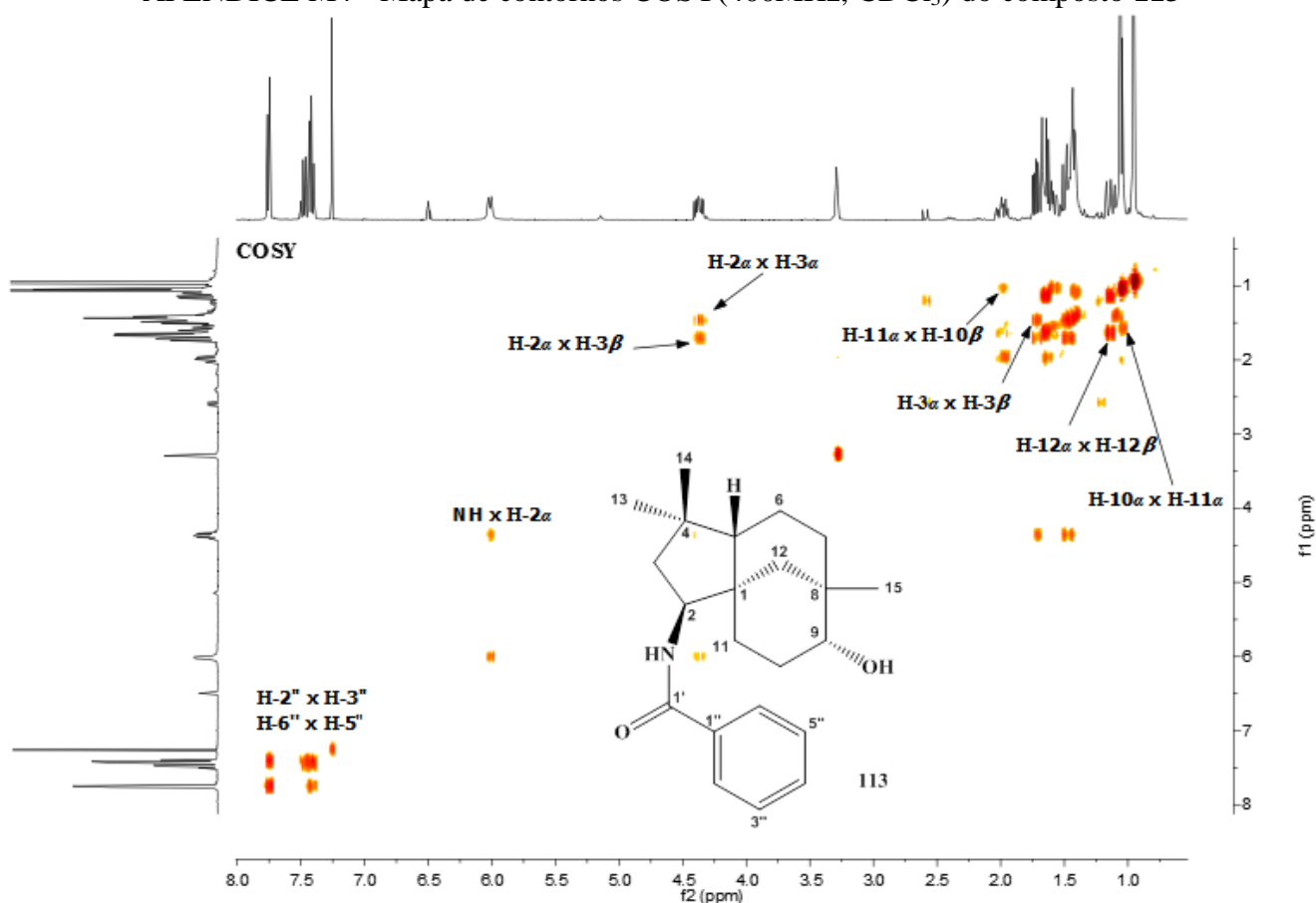
APÊNDICE J4 - Mapa de contornos HSQC(400MHz, CDCl<sub>3</sub>) do composto **113**



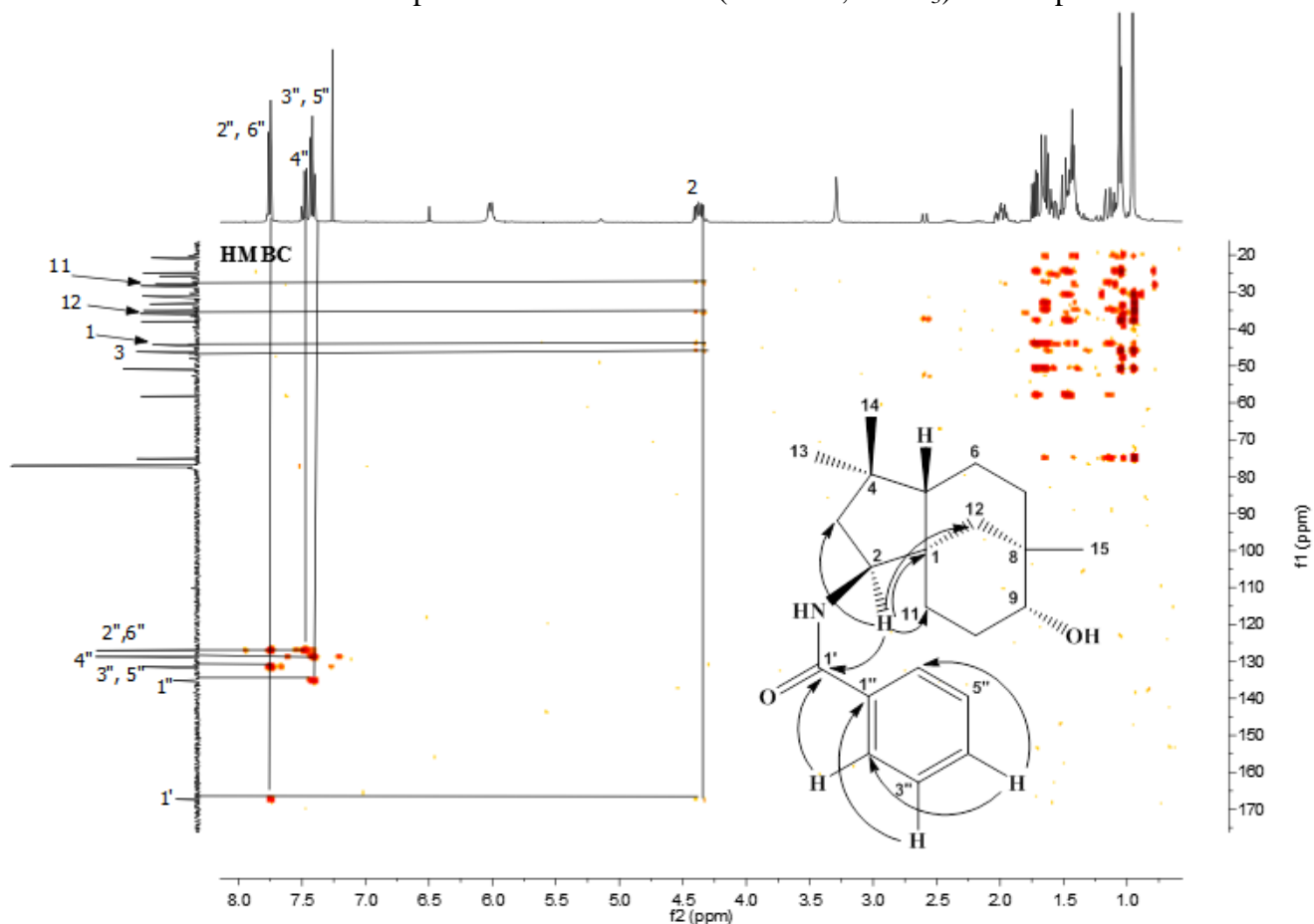
APÊNDICE L4 - Expansão do mapa de contornos HSQC(400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do composto **113**



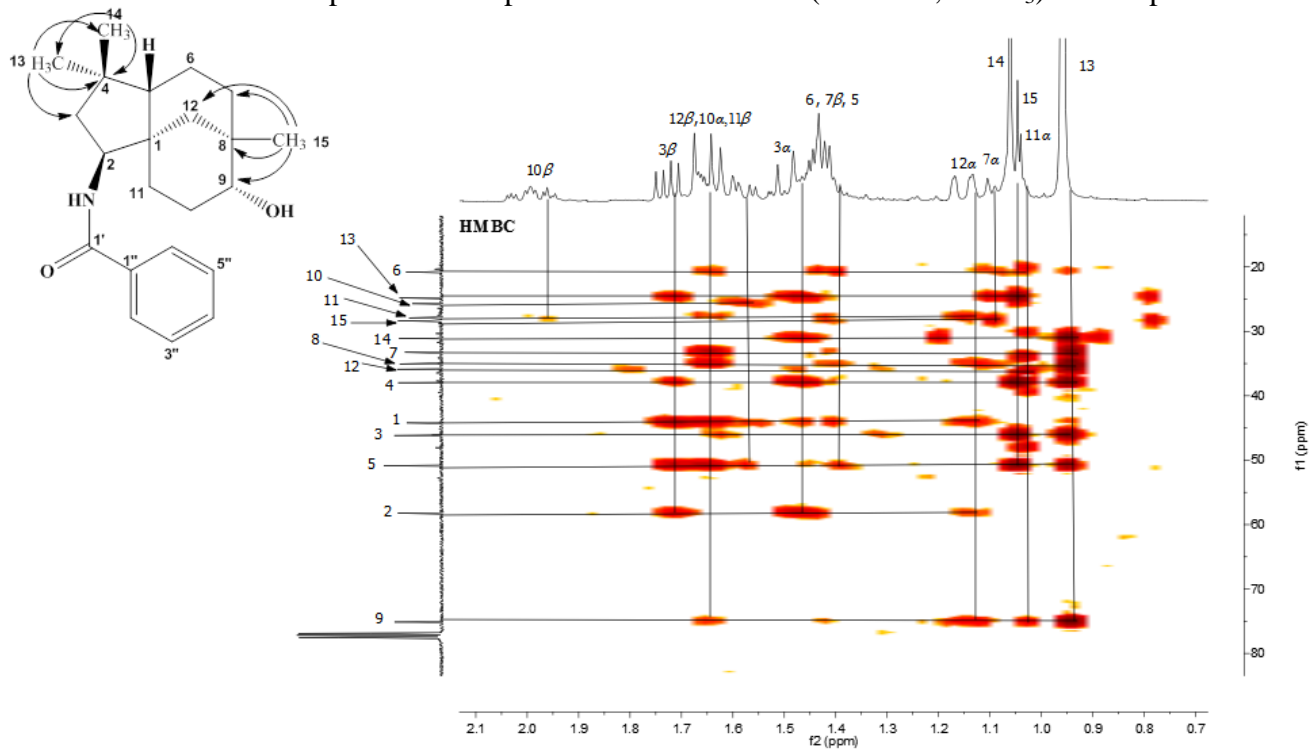
APÊNDICE M4 - Mapa de contornos COSY(400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do composto **113**



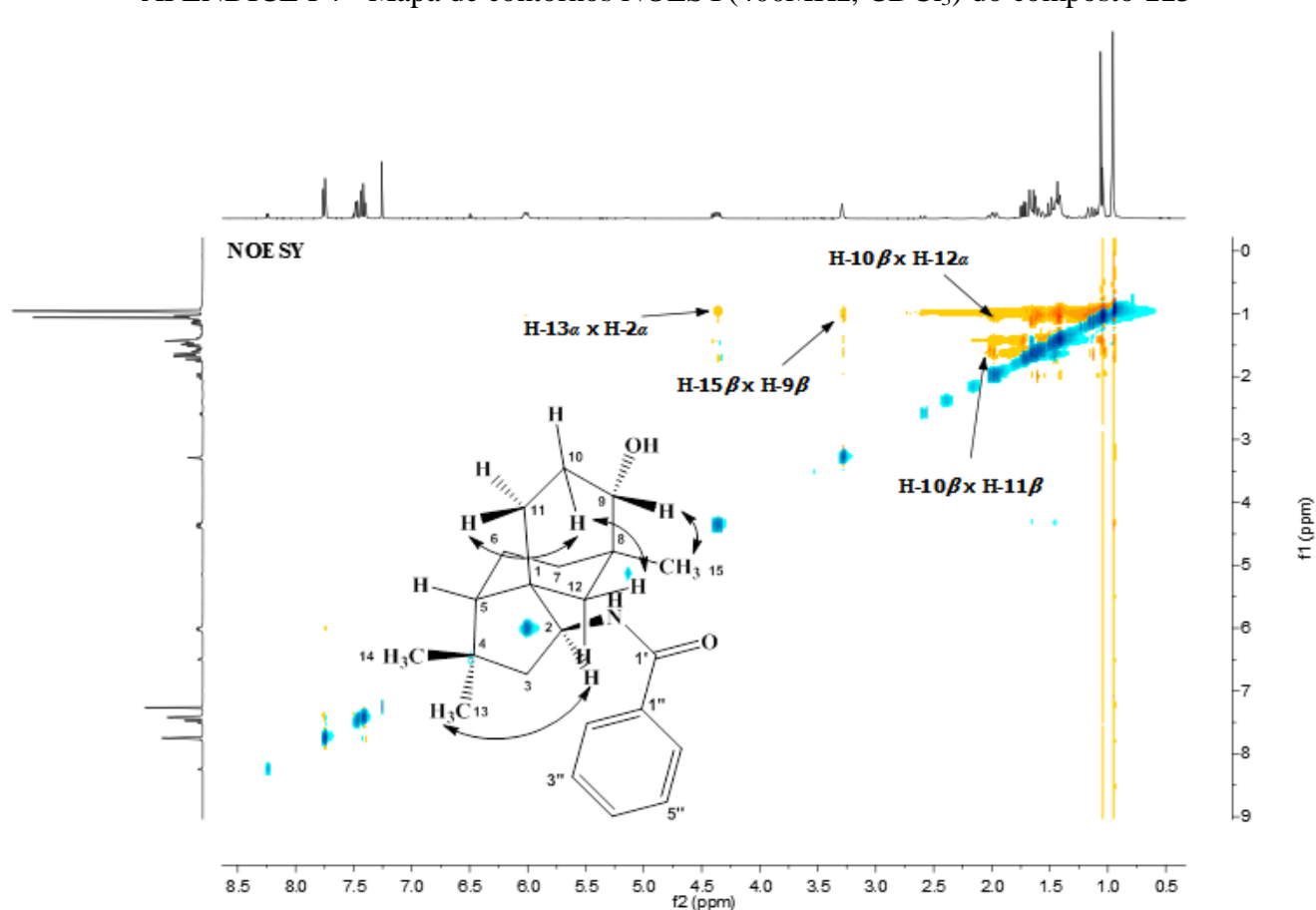
APÊNDICE N4 - Mapa de contornos HMBC(400MHz, CDCl<sub>3</sub>) do composto **113**



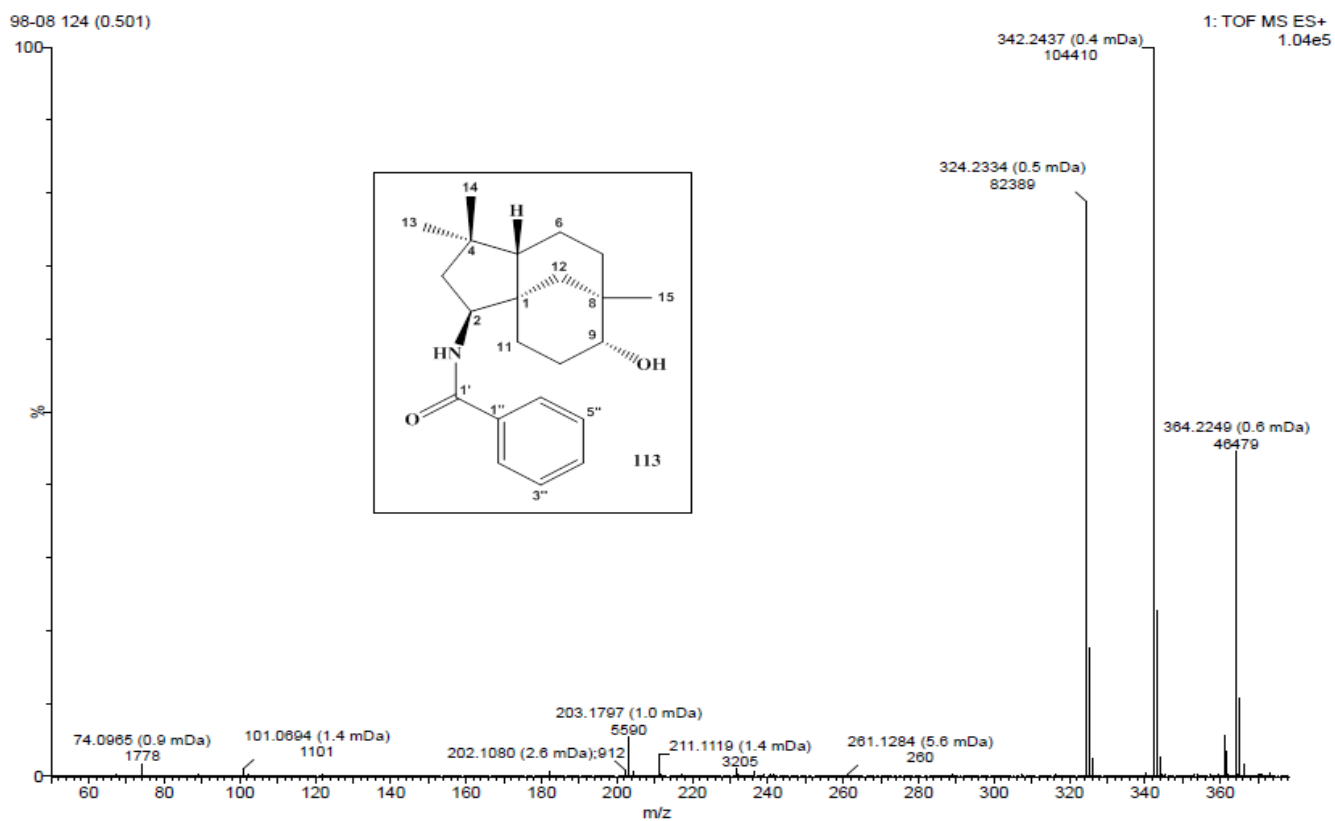
APÊNDICE O4 - Expansão do mapa de contornos HMBC(400MHz, CDCl<sub>3</sub>) do composto **113**



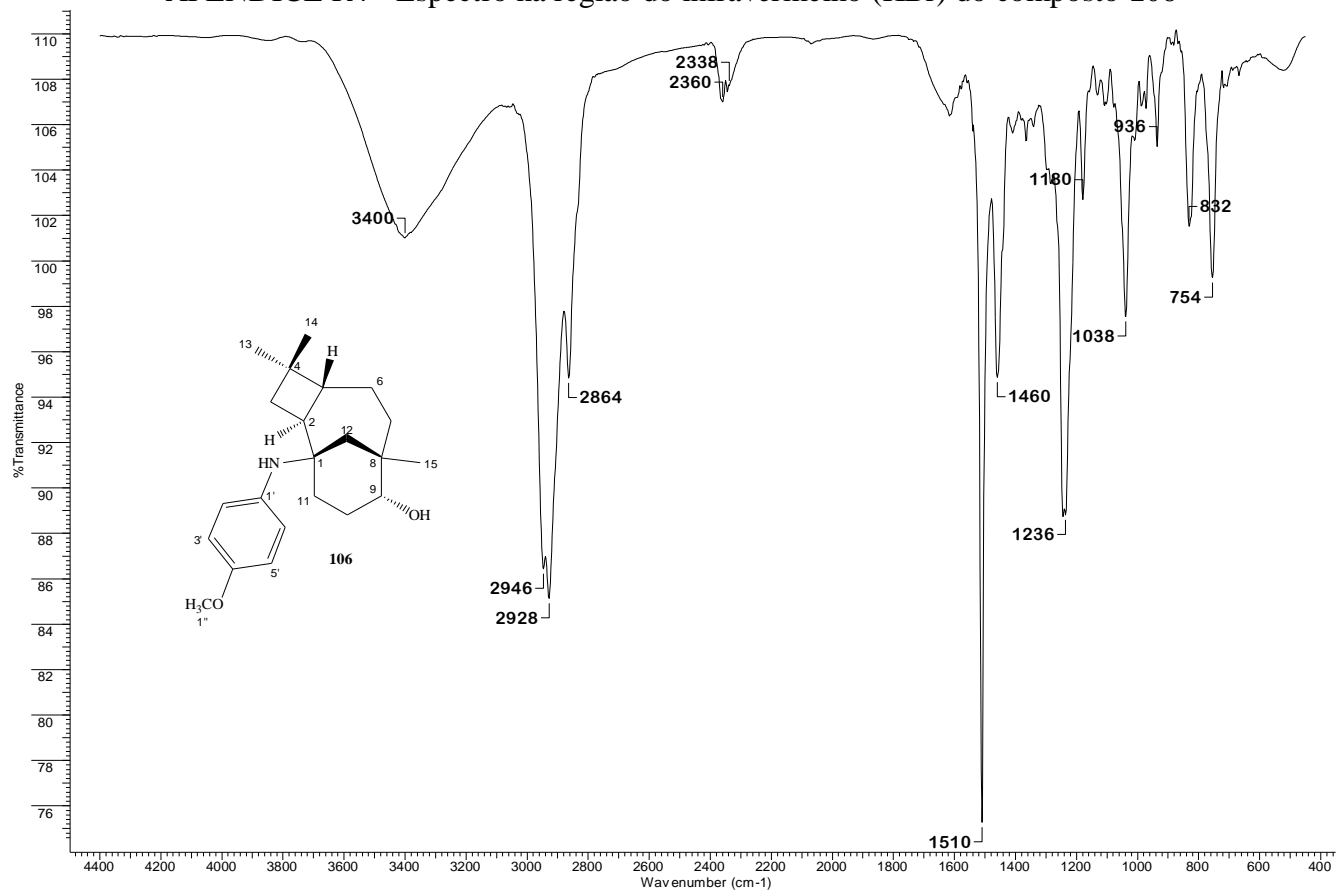
APÊNDICE P4 - Mapa de contornos NOESY(400MHz, CDCl<sub>3</sub>) do composto **113**



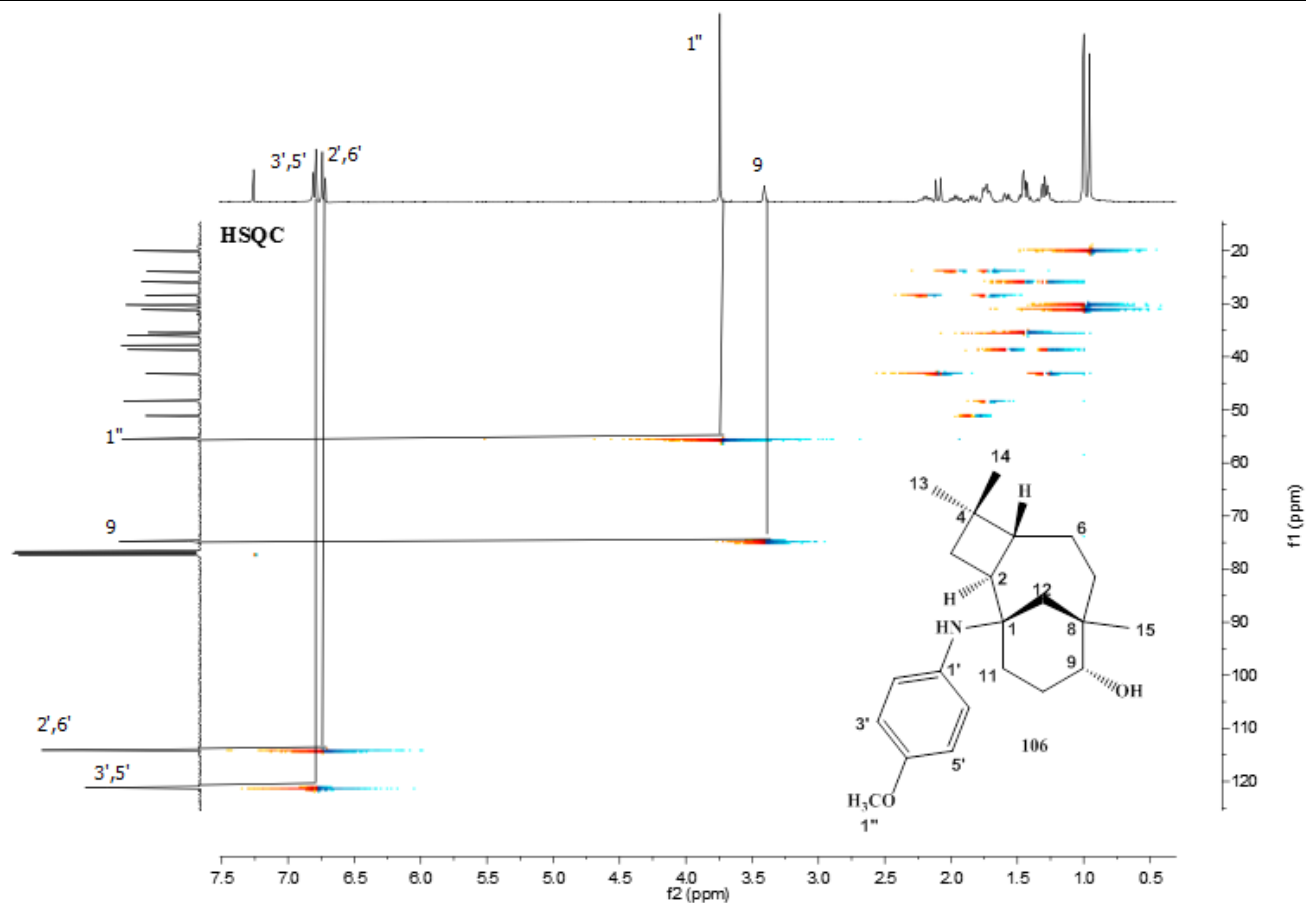
APÊNDICE Q4 - Espectro massas EM-ESI positivo de **113**, obtido em um espectrofotômetro ESI-Q-TOF



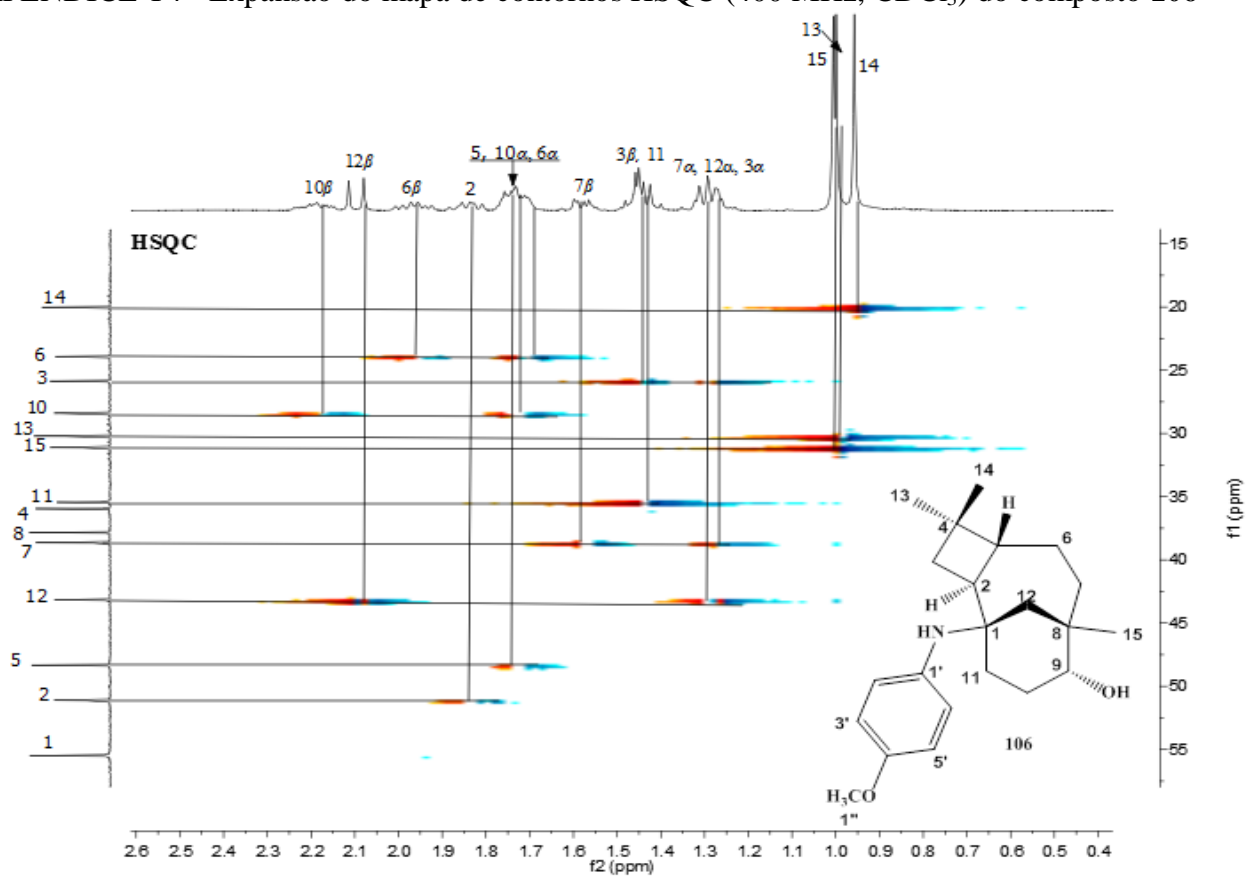
APÊNDICE R4 - Espectro na região do infravermelho (KBr) do composto **106**



APÊNDICE S4- Mapa de contornos HSQC (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do composto **106**

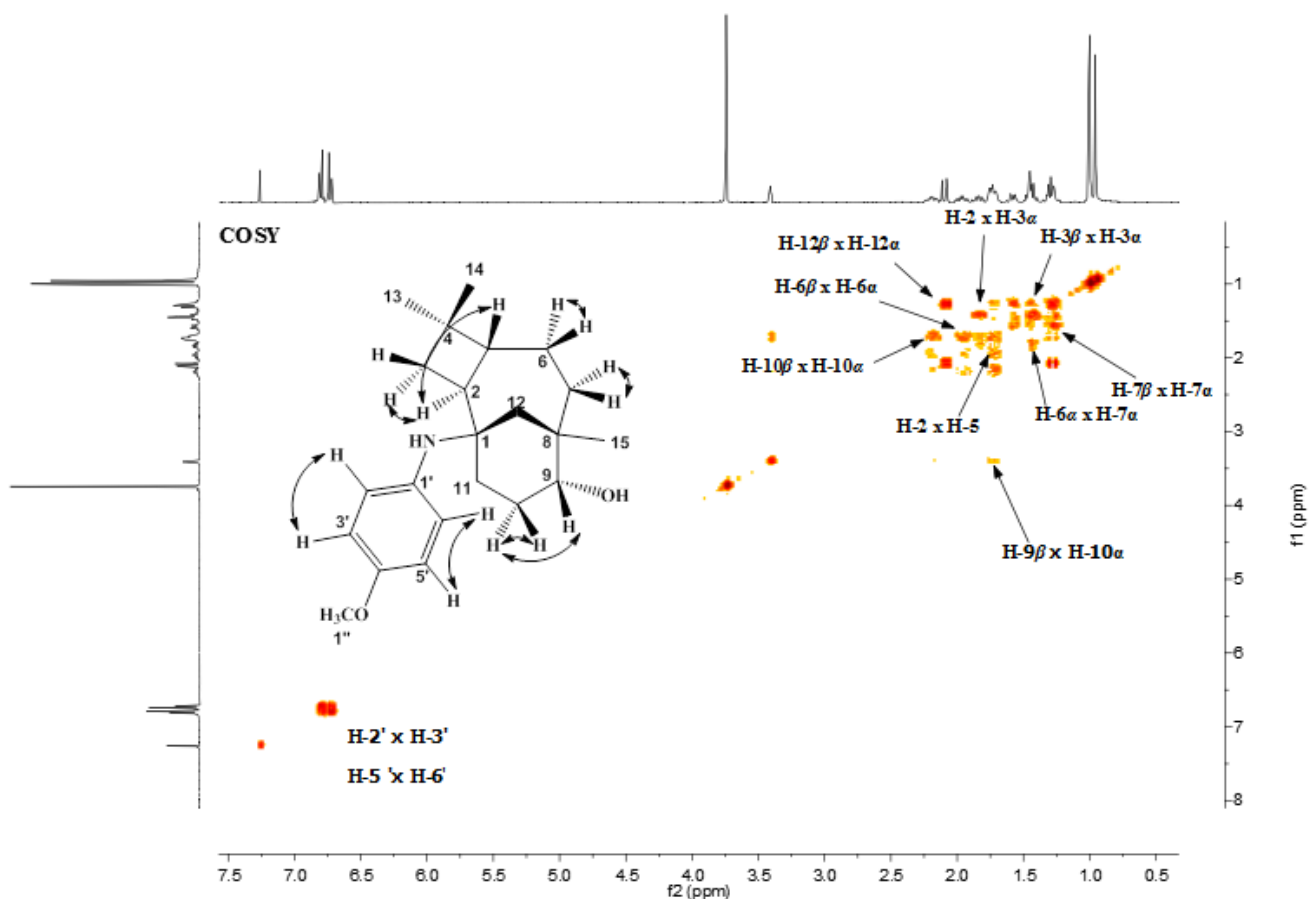


APÊNDICE T4 - Expansão do mapa de contornos HSQC (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do composto **106**

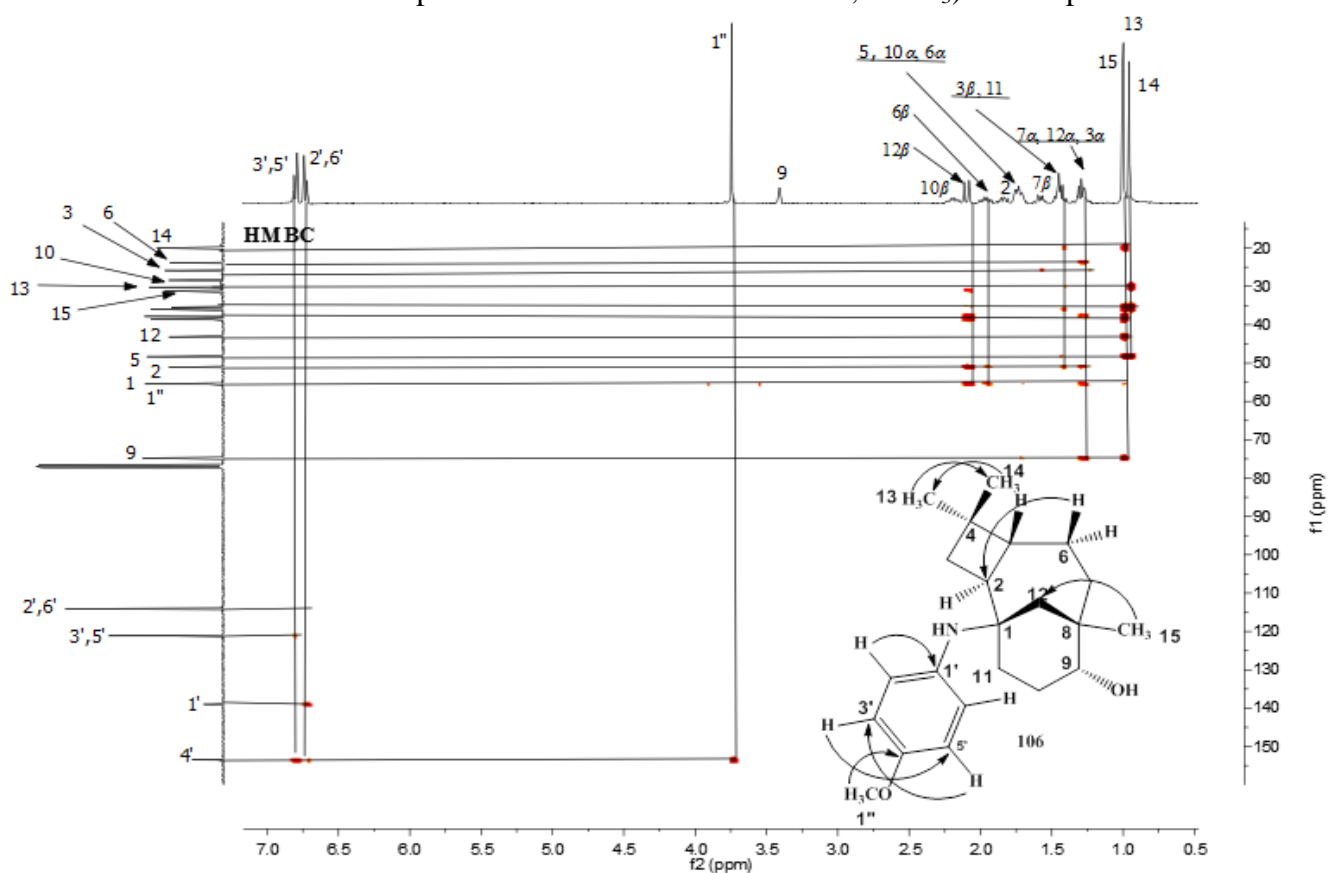


APÊNDICE U4- Mapa de contornos COSY (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do composto **106**

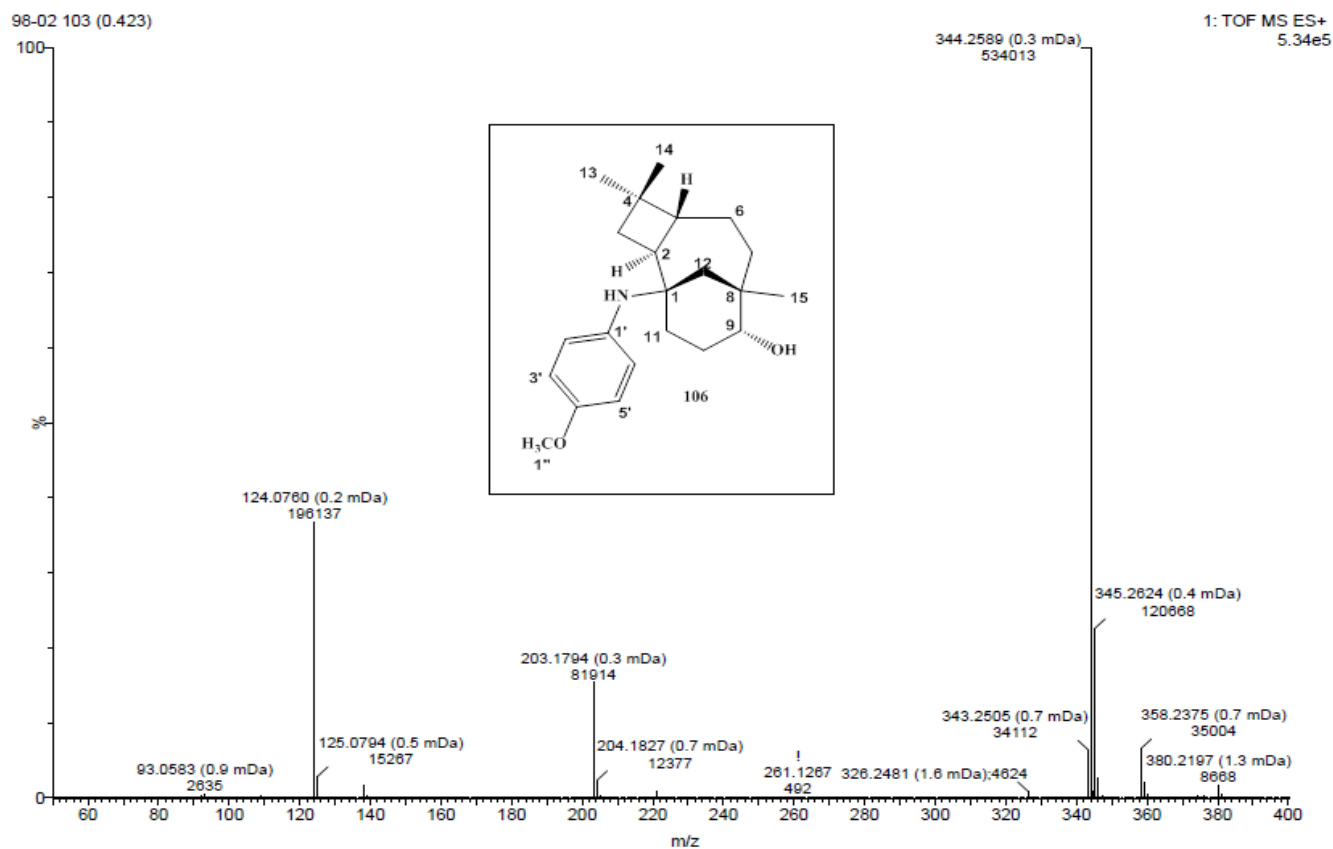




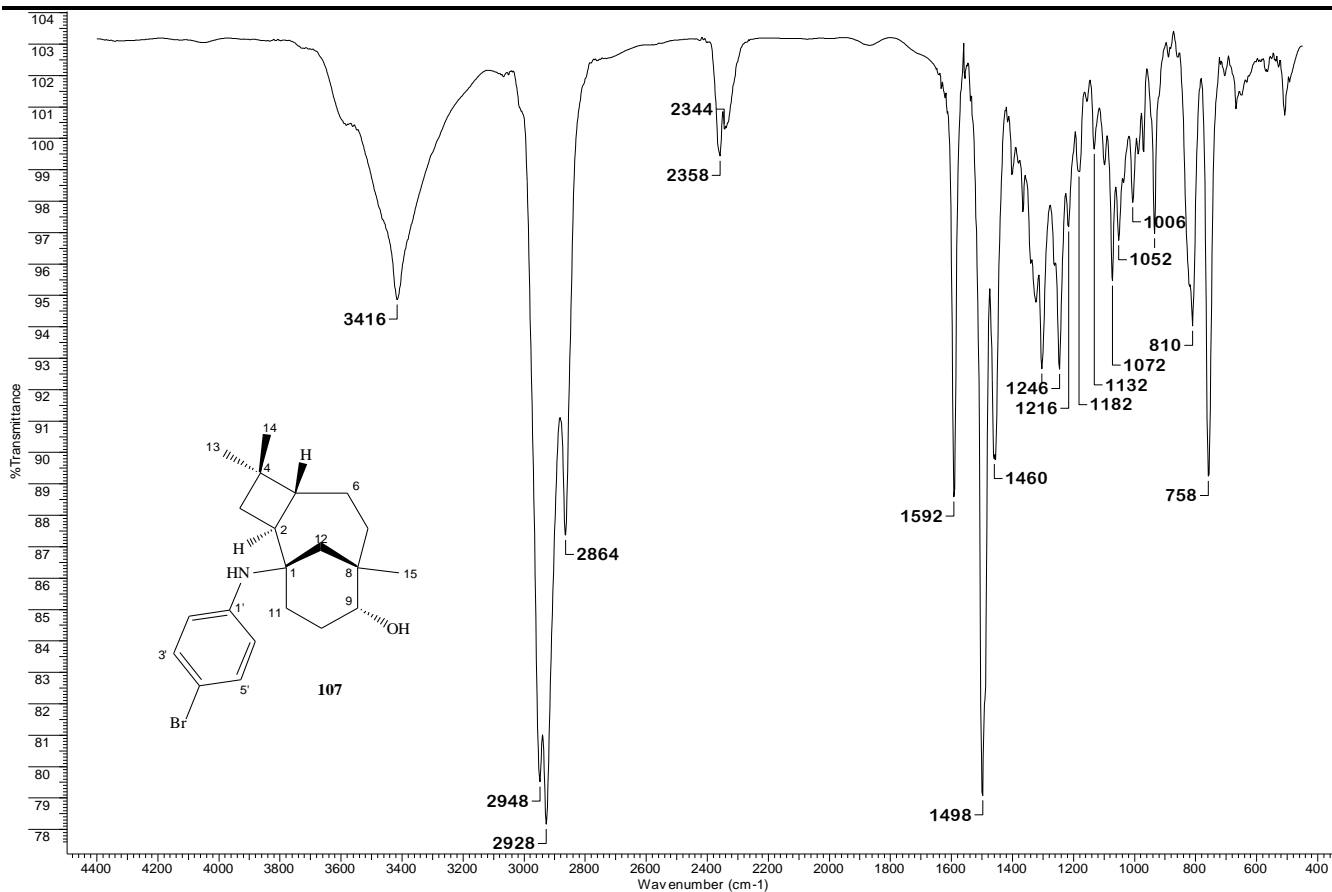
APÊNDICE V4- Mapa de contornos HMBC 400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do composto **106**



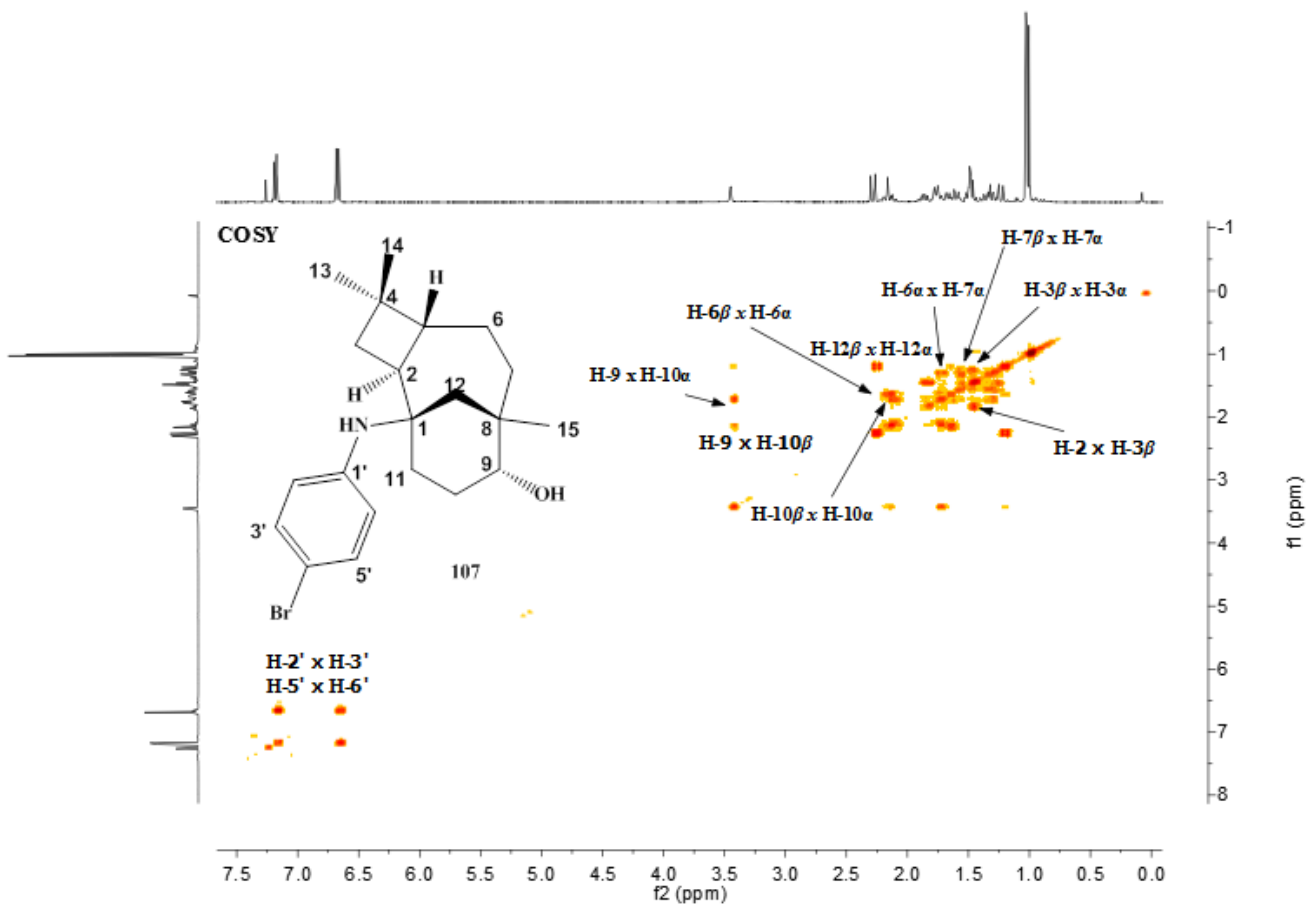
APÊNDICE X4 - Espectro massas EM-ESI positivo de **106**, obtido em um espectrofotômetro ESI-Q-TOF



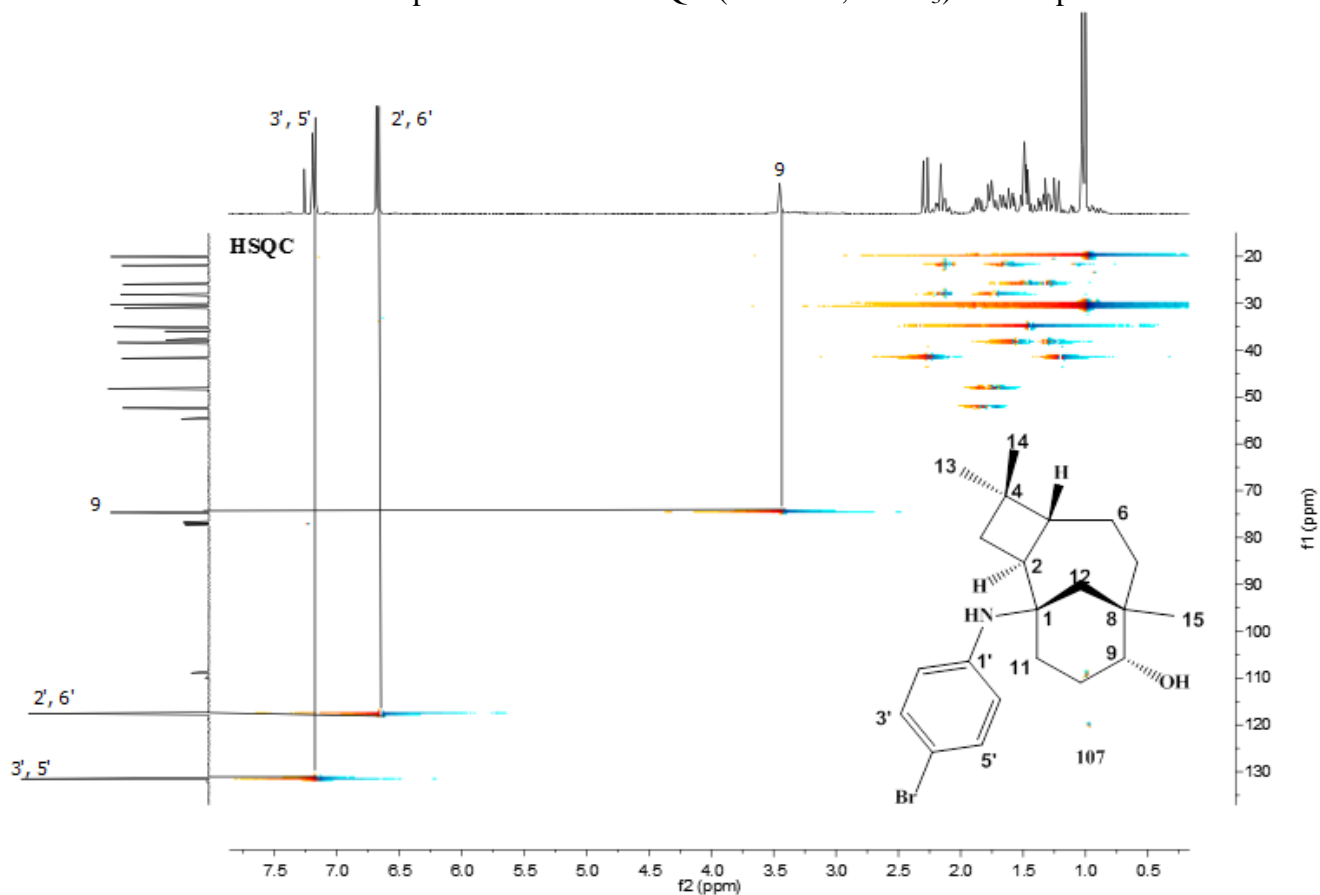
APÊNDICE Z4 - Espectro na região do infravermelho (KBr) do composto **107**



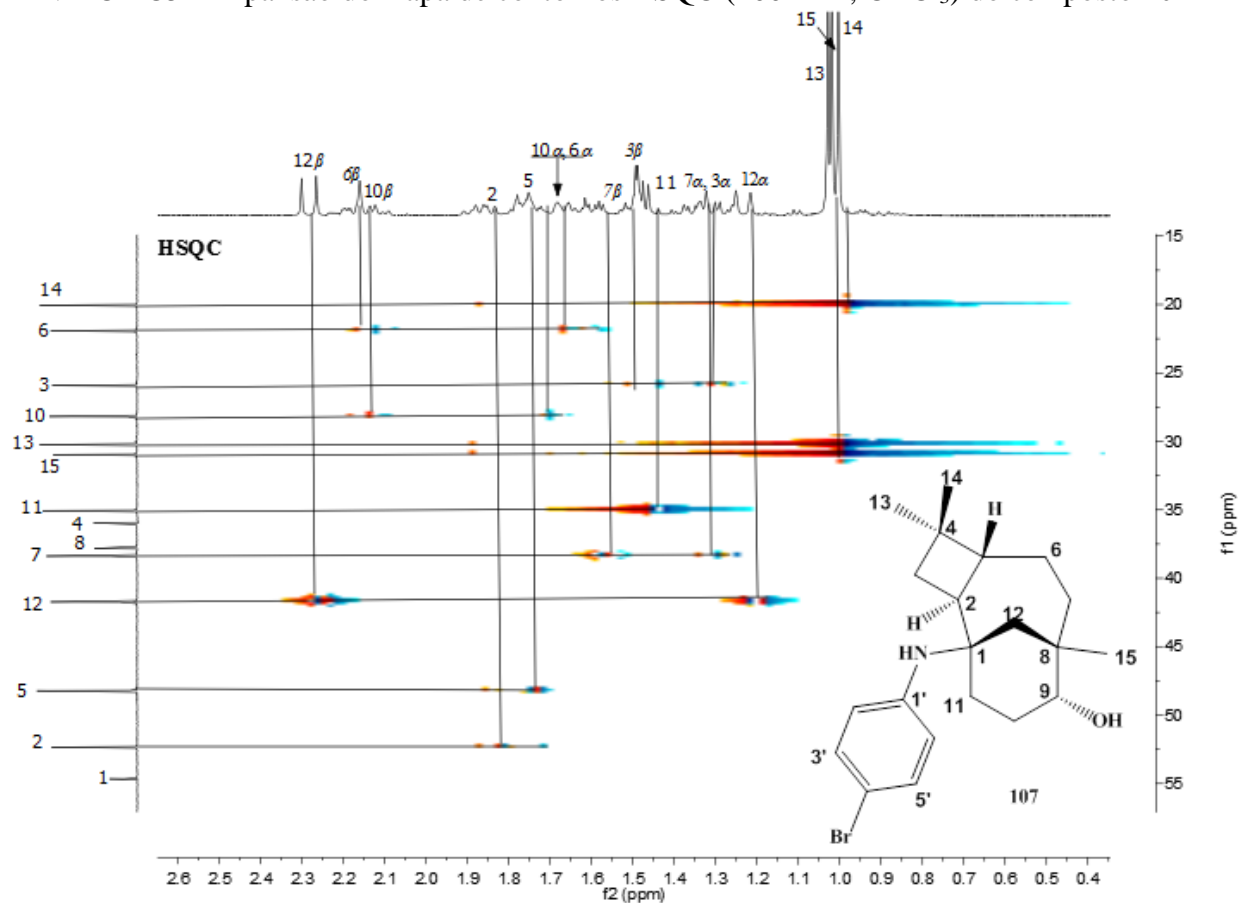
APÊNDICE A5 - Mapa de contornos COSY(400MHz, CDCl<sub>3</sub>) do composto **107**



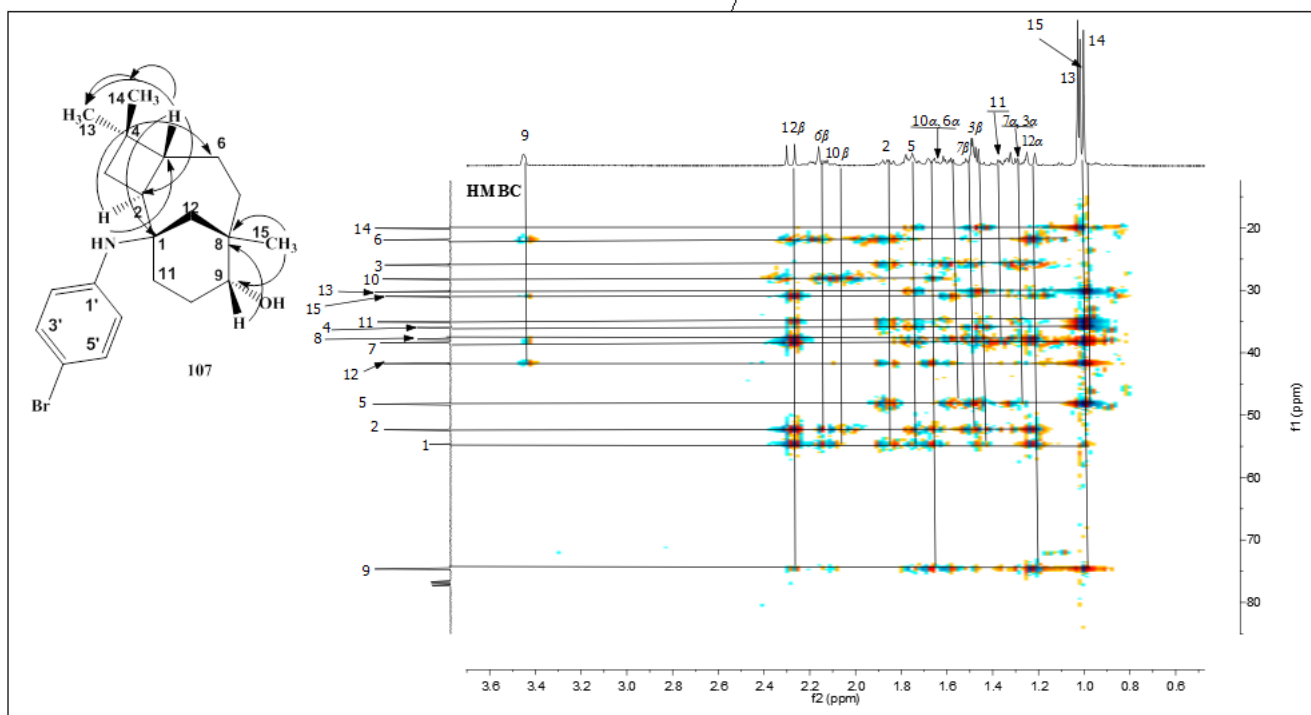
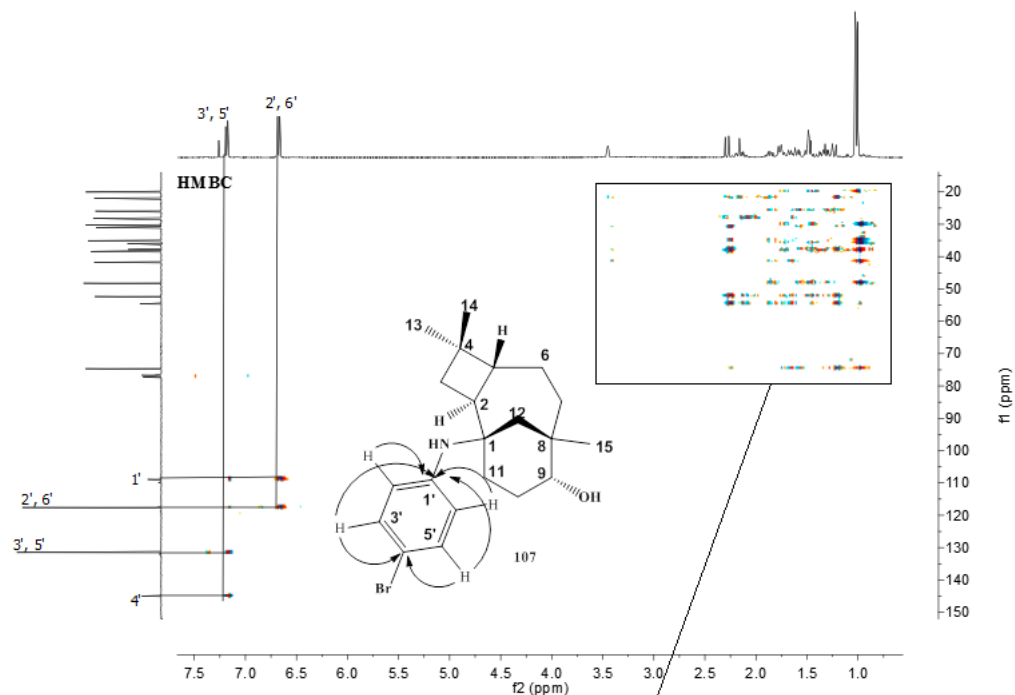
APÊNDICE B5 - Mapa de contornos HSQC (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) do composto **107**



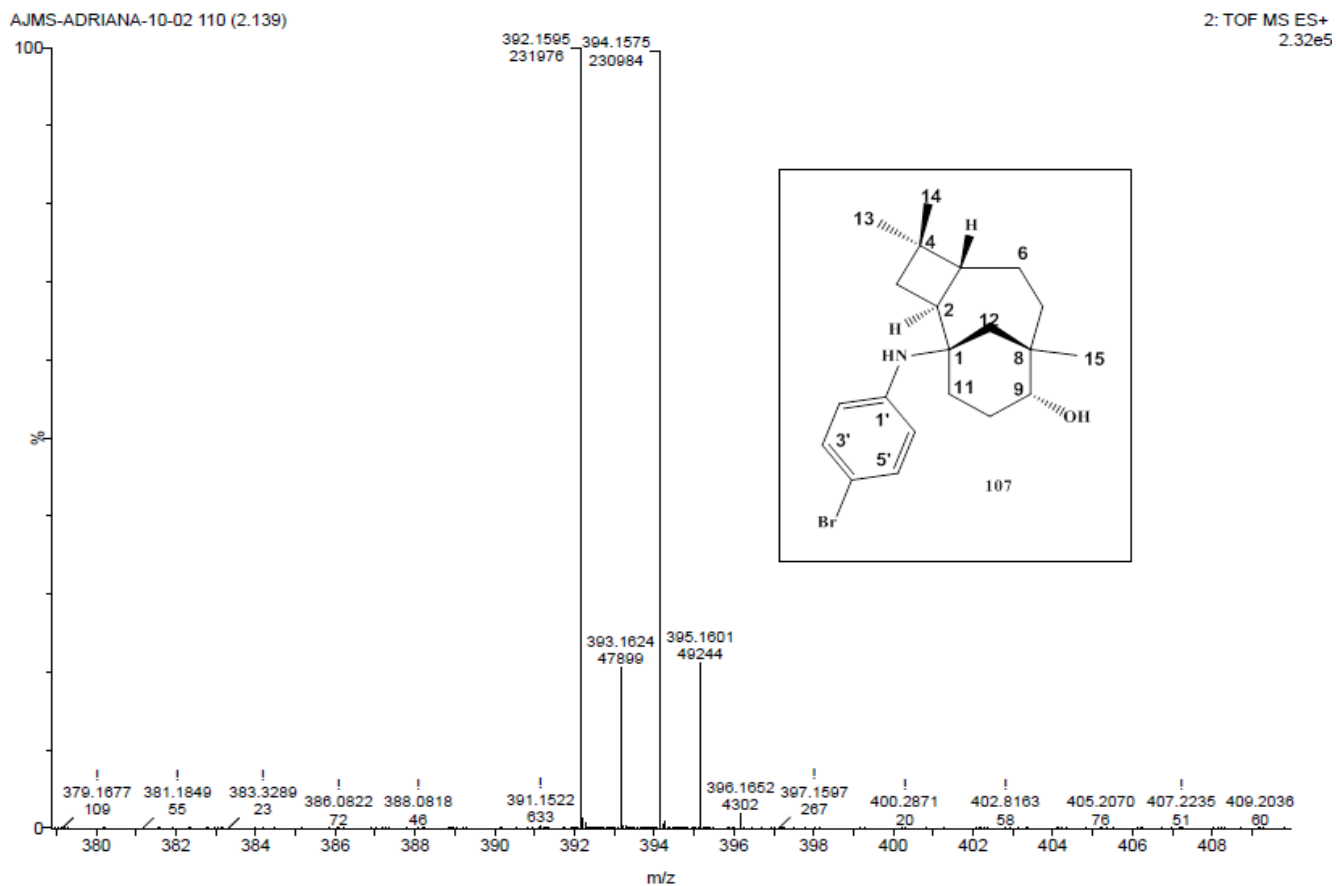
APÊNDICE C5 - Expansão do mapa de contornos HSQC (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) do composto **107**



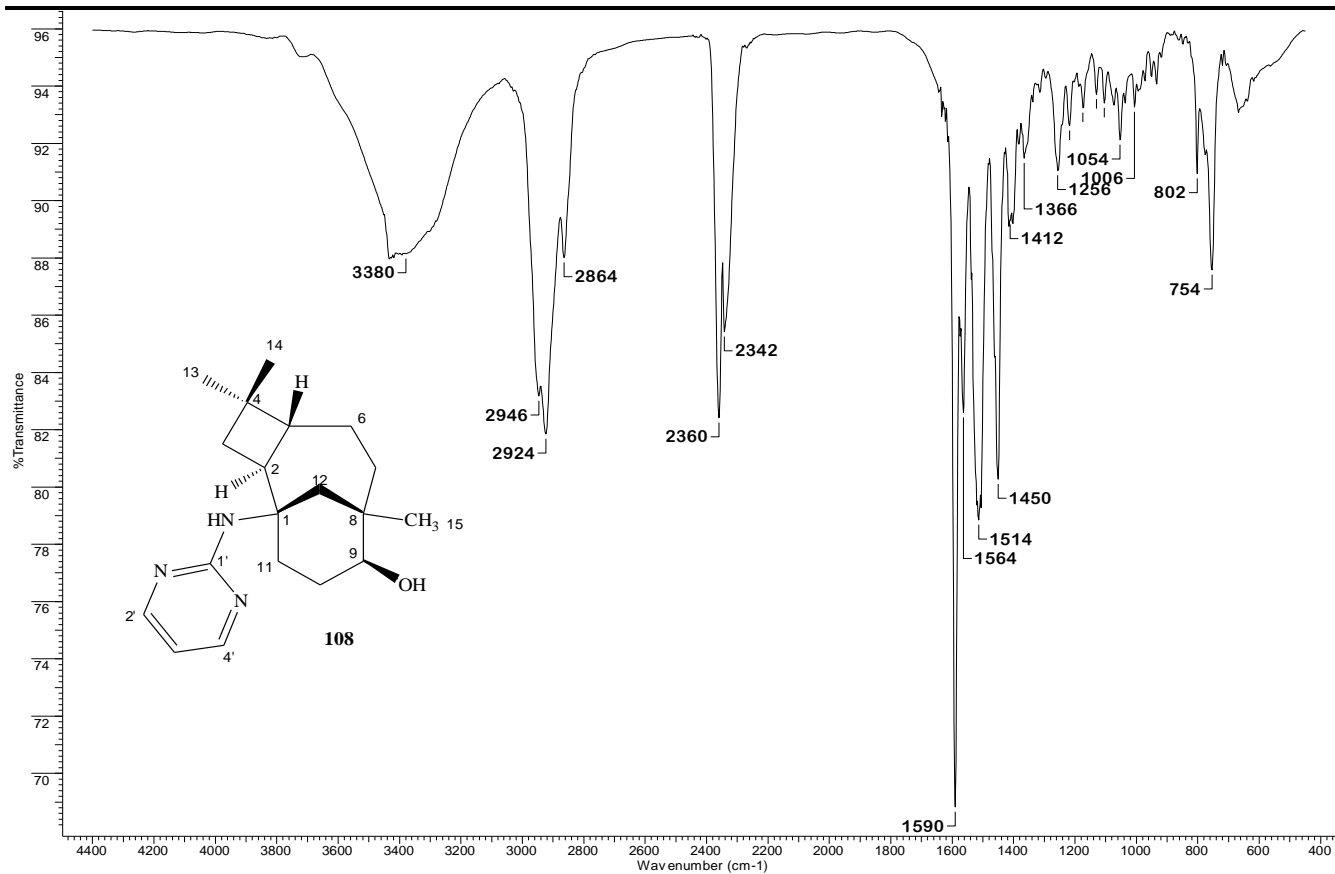
APÊNDICE D5 - Mapa de contornos HMBC e expansão do mapa de contornos HMBC (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) do composto **107**



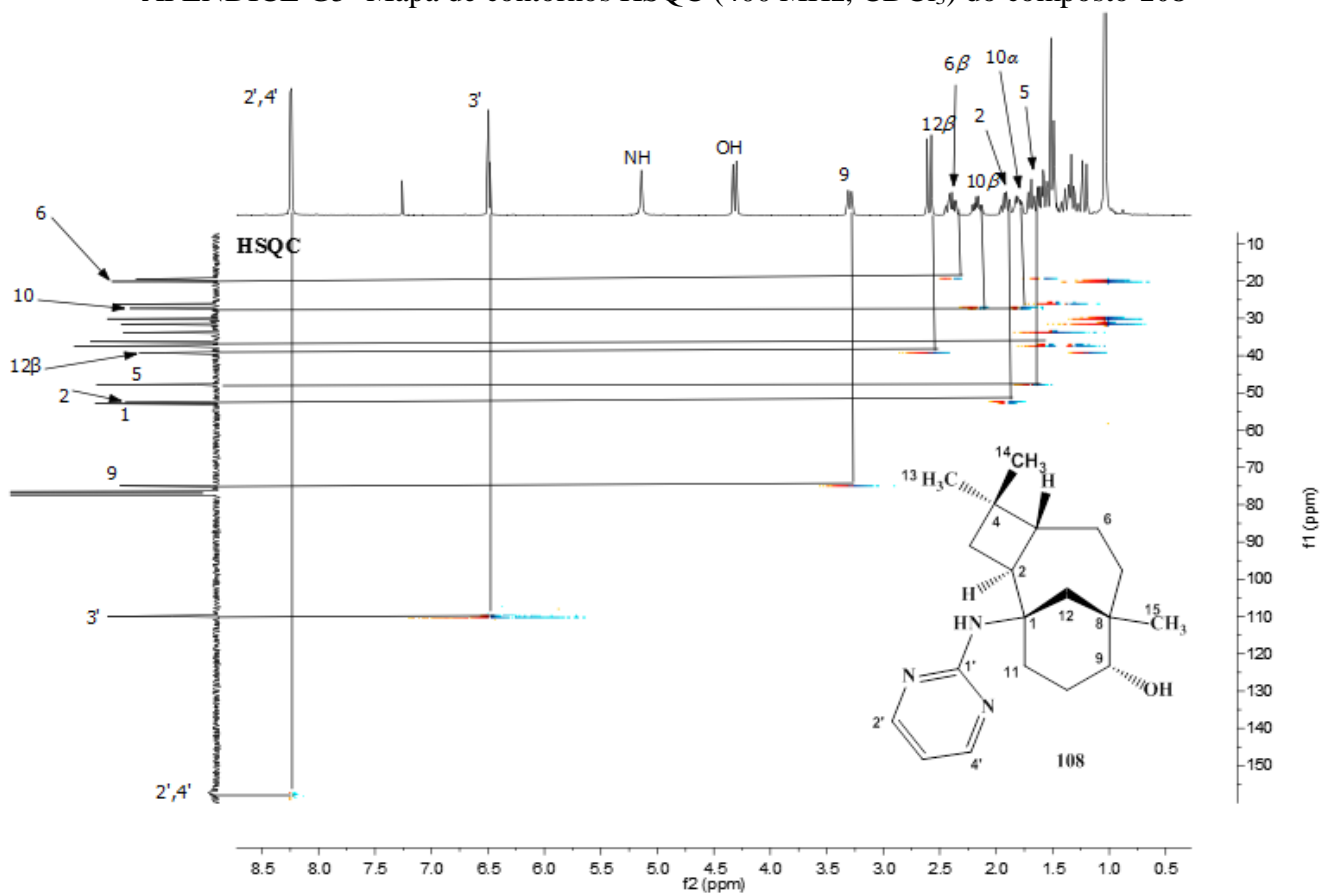
APÊNDICE E5 - Espectro massas EM-ESI positivo de **107**, obtido em um espectrofotômetro ESI-Q-TOF



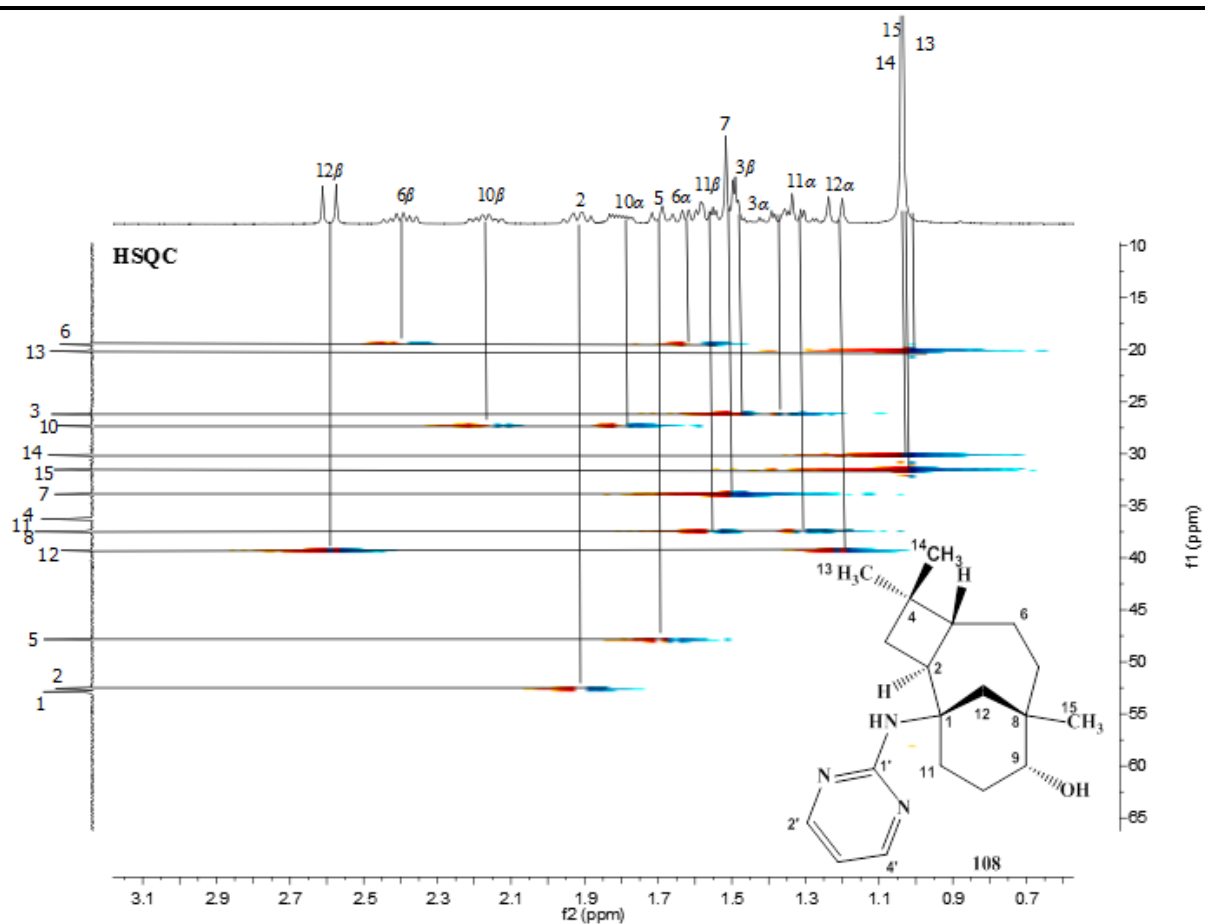
APÊNDICE F5 - Espectro na região do infravermelho (KBr) do composto **108**



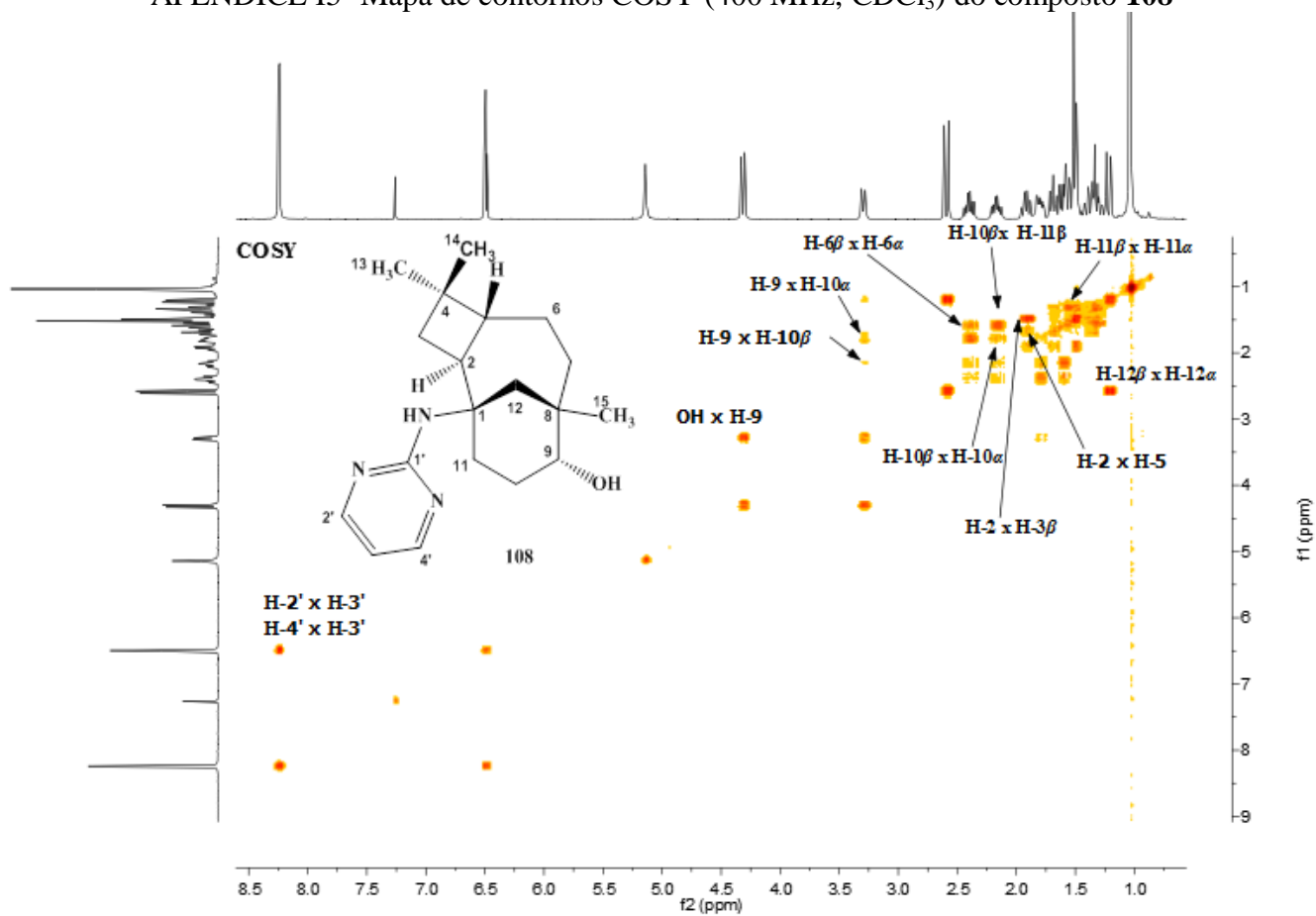
APÊNDICE G5 -Mapa de contornos HSQC (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do composto **108**



APÊNDICE H5 -Expansão do mapa de contornos HSQC (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do composto **108**

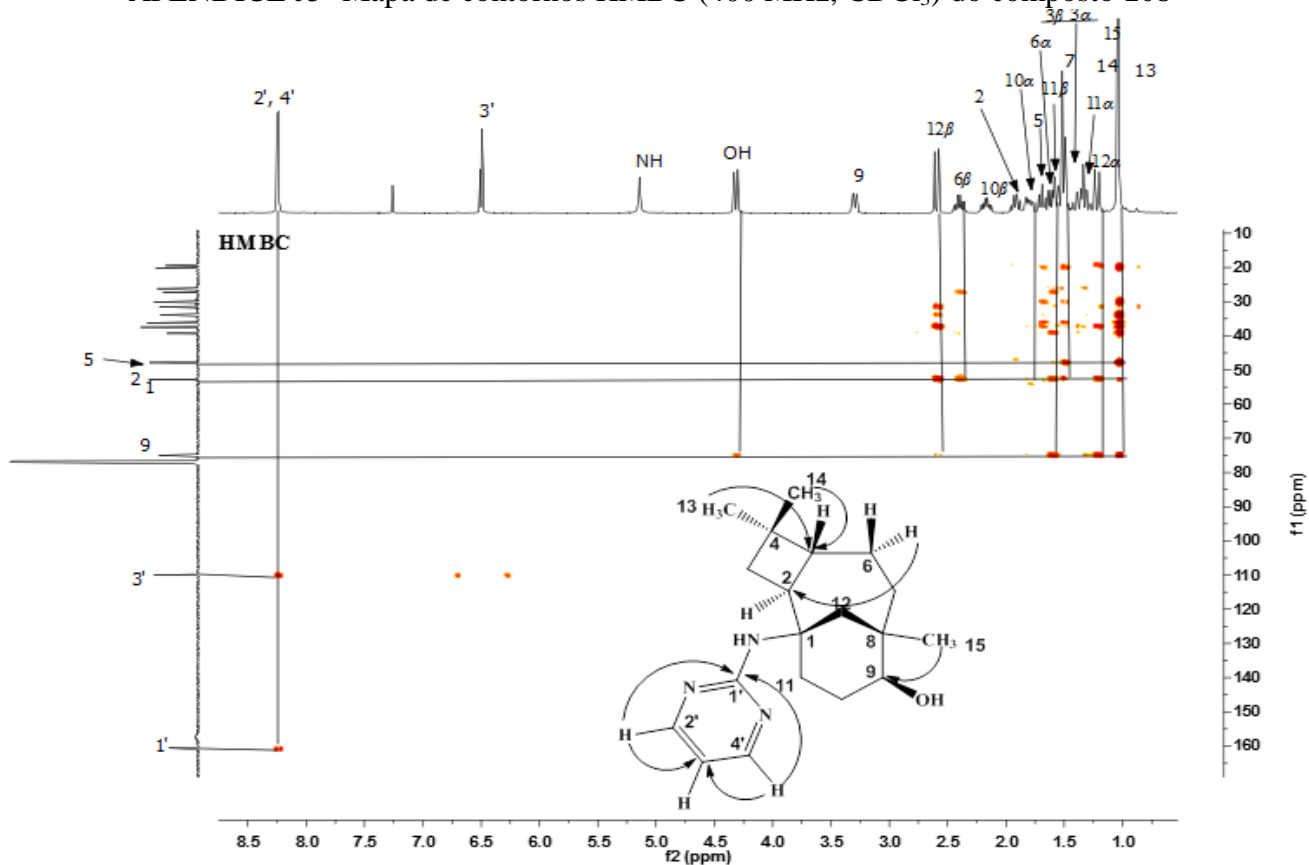


APÊNDICE I5 -Mapa de contornos COSY (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do composto **108**

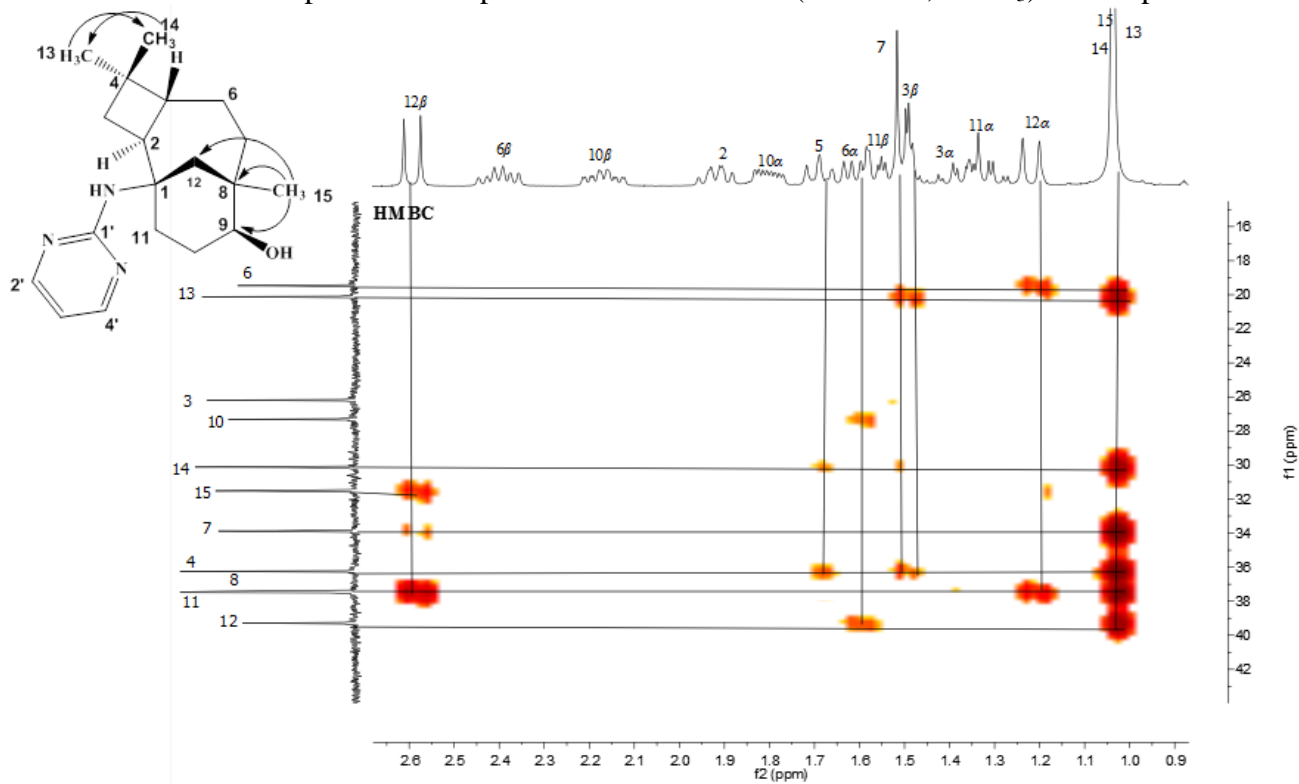


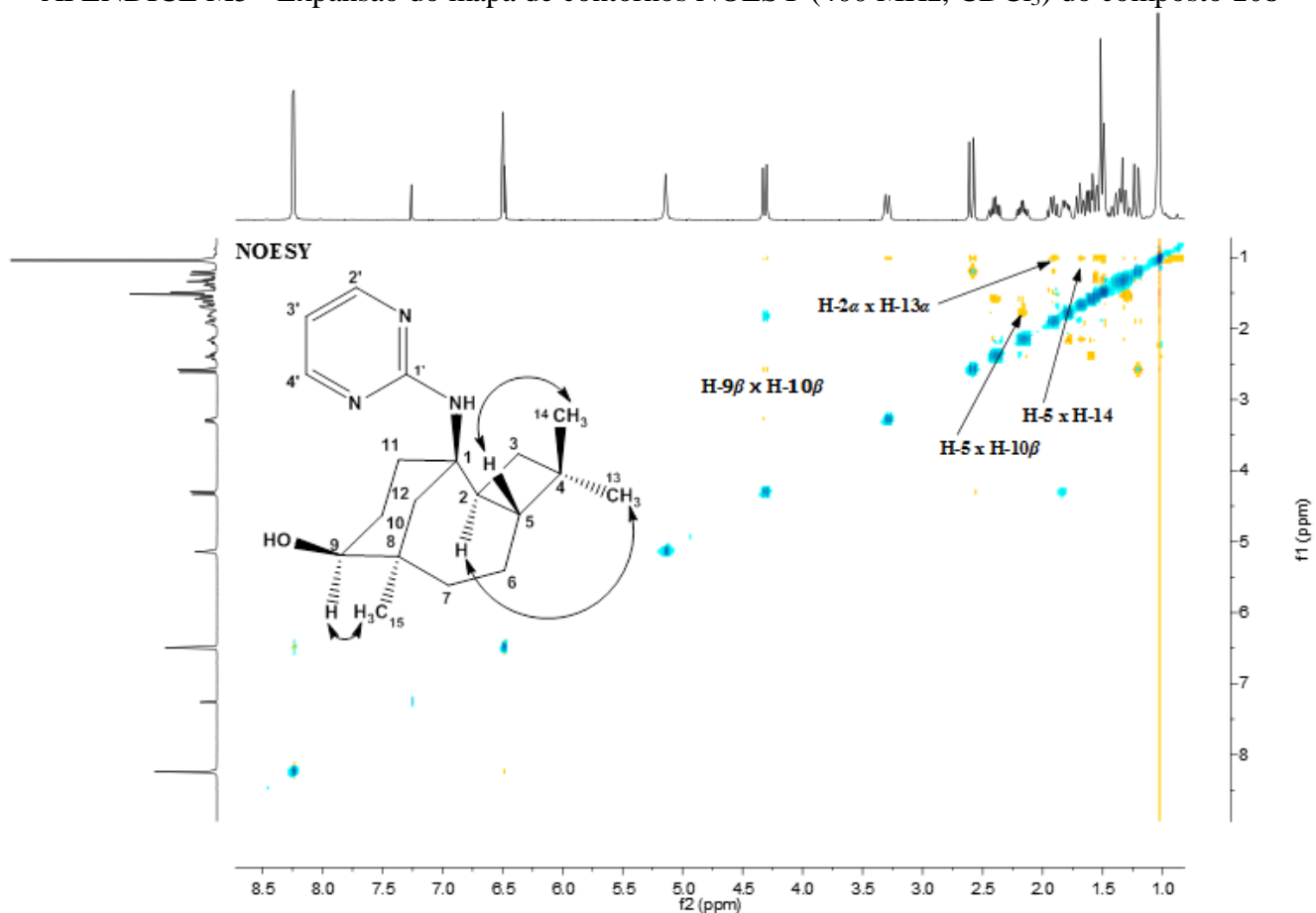


APÊNDICE J5 - Mapa de contornos HMBC (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do composto **108**



APÊNDICE L5 - Expansão do mapa de contornos HMBC (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do composto **108**





APÊNDICE N5 - Espectro massas EM-ESI positivo de **108**, obtido em um espectrofotômetro ESI-Q-TOF

98-06 210 (0.834)

1: TOF MS ES+  
1.14e6

