

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

Gabriel Franco dos Santos

**BIOTRANSFORMAÇÃO DE TERPENOS NATURAIS POR FUNGOS DE SOLOS
E APROXIMAÇÃO À BIOSÍNTESE DE SESQUITERPENOS ISOLADOS DO
FUNGO FITOPATÓGENO *Botrytis cinerea***

Belo Horizonte

2017

UFMG/ICEx/DQ. 1223^a

T. 552^a

GABRIEL FRANCO DOS SANTOS

**BIOTRANSFORMAÇÃO DE TERPENOS NATURAIS POR FUNGOS DE SOLOS
E APROXIMAÇÃO À BIOSÍNTESE DE SESQUITERPENOS ISOLADOS DO
FUNGO FITOPATÓGENO *Botrytis cinerea***

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

Belo Horizonte

2017

S237b
2017
T

Santos, Gabriel Franco dos
Biotransformação de terpenos naturais por fungos de
solos e aproximação à biossíntese de sesquiterpenos
isolados do fungo fitopatógeno *Botrytis cinerea*
[manuscrito] / Gabriel Franco dos Santos. 2017.
188 f. : il.

Orientadora: Jacqueline Aparecida Takahashi.
Coorientador: Isidro González Collado.

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

1. Química orgânica - Teses 2. Terpênios - Teses
3. Biotransformação (Metabolismo) - Teses 4.
Biossíntese - Teses 5. Alzheimer, Doença de - Teses 6.
Botrytis cinerea - Teses I. Takahashi, Jacqueline
Aparecida, Orientadora II. González Collado, Isidro,
Coorientador III. Título.

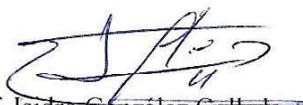
CDU 043

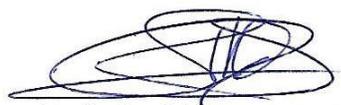
"Biotransformação de Terpenos Naturais por Fungos de Solo e Aproximação à Biossíntese de Sesquiterpenos Isolados do Fungo Fitopatógeno *Botrytis Cinerea*"

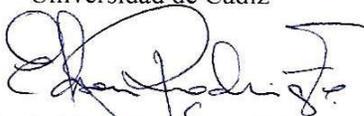
Gabriel Franco dos Santos

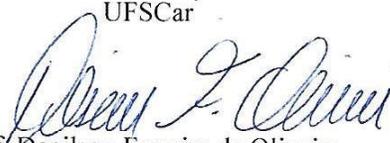
Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

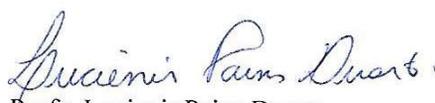

Prof. Jacqueline Aparecida Takahashi - Orientadora
UFMG

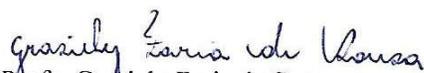

Prof. Isidro González Collado
Universidad de Cádiz


Prof. Rosario Hernández Galán
Universidad de Cádiz


Prof. Edson Rodrigues Filho
UFSCar


Prof. Denilson Ferreira de Oliveira
UFLA


Prof. Lucienir Pains Duarte
UFMG


Prof. Grasiely Faria de Sousa
UFMG

Esta tese foi desenvolvida em co-tutela através de um acordo assinado entre a Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e a Universidad de Cádiz (UCA)-Espanha.

As atividades experimentais foram realizadas no laboratório de Biotecnologia e Bioensaios do Departamento de Química da UFMG sob a orientação da Doutora Jacqueline Aparecida Takahashi e no laboratório Diseño Biosintético de Fungicidas sob a orientação do Doutor Isidro González Collado.

“Penso que cumprir a vida
seja simplesmente
compreender a marcha
e ir tocando em frente”

(Almir Sater e Renato Teixeira)

AGRADECIMENTOS

A meus pais e demais familiares;

À Gesiane;

À Prof^a Dra. Jacqueline Aparecida Takahashi e ao Prof^o Dr. Isidro González Collado pelas orientações;

À Inmaculada Izquierdo Bueno e Javier Moraga pelos trabalhos conjuntos;

Aos amigos do Laboratório de Biotecnologia e Bioensaios (UFMG), do laboratório Diseño Biosintético de Fungicidas (UCA) e do laboratório de Alelopatia (UCA);

E por fim, agradeço a **TODOS** que contribuíram e contribuem para minha formação, tanto pessoal como profissional, desde conversas de corredor até experimentos em laboratório, desde os amigos que ficaram em outras cidades e até mesmos aos amigos que estão por chegar.

SUMÁRIO

1. Revisão bibliográfica	1
1.1. Fungos e aplicações	1
1.2. Biotransformação: Aspectos gerais, metodologias e aplicações.....	4
1.3. Terpenos	14
1.4. Fungo <i>Botrytis cinerea</i>	19
2. Objetivos	24
2.1. Objetivos Gerais	24
2.2. Objetivos específicos	24
3. Biotransformação do ácido traquilobânico por fungos de solos	25
3.1. Introdução	25
3.2. Métodos experimentais	29
3.2.1. Reagentes e materiais	29
3.2.2. Equipamentos.....	30
3.2.3. Metodologia	30
3.2.3.1. Identificação, cultivo e armazenamento dos fungos	30
3.2.3.2. Caracterização do substrato	32
3.2.3.3. Biotransformação do ácido traquilobânico em escala reduzida pelos fungos <i>A. tubingensis</i> , <i>F. proliferatum</i> , <i>P. lilacinus</i> , <i>P. minioluteum</i> , <i>M. plumbeus</i> e <i>S. racemosum</i>	32
3.2.3.4. Biotransformação do ácido traquilobânico pelo fungo <i>A. tubingensis</i>	32
3.2.3.5. Biotransformação do ácido traquilobânico pelo fungo <i>M. plumbeus</i>	33
3.2.3.6. Biotransformação do ácido traquilobânico pelo fungo <i>S. racemosum</i>	34
3.2.3.7. Bioensaio de inibição da acetilcolinesterase (AChE).....	35
3.3. Resultados e discussões.....	36
3.3.1. Caracterização dos fungos	36
3.3.1.1. <i>A. tubingensis</i>	36
3.3.1.2. <i>P. minioluteum</i>	37
3.3.1.3. <i>F. proliferatum</i>	38
3.3.1.4. <i>P. lilacinus</i>	39

3.3.1.5. <i>M. plumbeus</i>	39
3.3.1.6. <i>S. racemosum</i>	40
3.3.2. Caracterização do ácido traquilobânico	41
3.3.3. Biotransformação do ácido traquilobânico em escala reduzida	42
3.3.4. Biotransformação do ácido traquilobânico pelo fungo <i>M. plumbeus</i>	43
3.3.4.1. Elucidação do MPTA18 (95) (ácido 7 β -hidroxitraquiloban-19-oico).....	44
3.3.4.2. Elucidação do MPTA41 (96) (traquiloban-19-oato de β -D-glicopiranosila).....	50
3.3.5. Biotransformação do ácido traquilobânico pelo fungo <i>S. racemosum</i>	55
3.3.5.1. Elucidação do SRTA29 (97) (ácido 17-hidroxitraquiloban-19-oico)	56
3.3.5.2. Elucidação do SRTA33 (98) (ácido traquiloban-17,19-oico).....	58
3.3.5.3. Elucidação do SRTA39 (99) (ácido 16 α ,17-di-hidroxicaur-11(12)em-19-oico).....	62
3.3.6. Bioensaio de inibição da acetilcolinesterase (AChE).....	70
4. Estudo dos mutantes $\Delta bcaba1$, $\Delta bcaba2$, $\Delta bcaba3$ e $\Delta bcaba4$	72
4.1. Introdução	72
4.2. Métodos experimentais	76
4.2.1. Reagentes e materiais.....	76
4.2.2. Equipamentos.....	76
4.2.3. Metodologia	76
4.3. Resultados e discussões.....	78
4.3.1. Elucidação estrutural de aba13-7 (104) de $\Delta bcaba1$	79
4.3.2. Elucidação estrutural de aba2-4 (105) de $\Delta bcaba2$	82
4.3.3. Biossíntese do ácido abscísico.....	84
5. Estudo do mutante $\Delta bcbot4$	86
5.1. Introdução	86
5.2. Métodos experimentais	89
5.2.1. Reagentes e materiais cromatográficos	89
5.2.2. Equipamentos.....	89
5.2.3. Metodologia	89
5.3. Resultados e discussões.....	92

5.3.1. Identificação das botcininas B (117), A (118) e E (130).....	93
5.3.2. Identificação da botrilactona (120) e 6-hidroxibotrilactona (121)	98
5.3.3. Identificação dos sesquiterpenos eremofilenos 4-epieremofil-9-ene- 1 α ,2 α ,11-triol (125) e 4-epieremofil-9-en-2 α ,8 β ,11-triol (126).....	103
5.3.4. Identificação dos policetídeos monômero (123) e 4,5-di-hidroxi-2-metil- 6-fenilexan-3-ona (128)	106
5.3.5. Elucidação dos sesquiterpenos inéditos ácido 7 α -hidroxicameronan- 14,15-dioico 7,14-lactona (119), presilfiperfolan-8 α ,10 β ,14-triol (124), e cameroonan-7 α ,10 β ,14-triol (129)	110
5.3.6. Compostos não identificados.....	120
6. Conclusões.....	123
7. Referências Bibliográficas.....	124
8. Apêndice	148

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Imagens de diferentes espécies fúngicas. _____	1
Figura 2 – Alguns fármacos provenientes de fungos: ciclosporina A (1), lovastatina (2), bestatina (3) e ácido micofenólico (4). _____	3
Figura 3 – Hidroxilação seletiva da progesterona (5) por <i>R. arrhizus</i> na formação da 11 α -hidroxiprogesterona (6), intermediário na produção da cortisona (7). ____	6
Figura 4 – Biotransformação da bavaquinina (8) por <i>A. flavus</i> , <i>C. elegans</i> e <i>P. raistrickii</i> . _____	7
Figura 5 – Estrutura química do buagarofurano (11) e dos produtos de biotransformação por <i>C. echinulata</i> (12-22). _____	8
Figura 6 – Biotransformação da pisatina (23) por <i>F. solani</i> . _____	9
Figura 7 – Biotransformação do ácido 7 β -hidroxicaur-16-en-19-oico (25) por <i>G. fujikuroi</i> . _____	9
Figura 8 – Biotransformação do 7 β -acetoxicaureno (28) produzindo seis novos compostos caurânicos (29-34). _____	10
Figura 9 – Estrutura química dos fármacos pravastatina (sal sódico) (35), <i>L</i> -dopa (36), lamivudina (37), saxagliptina (38) e atazanavir (39) _____	11
Figura 10 – Síntese do composto MK0507 (40). _____	12
Figura 11 – Biotransformação da curvularina (44) por <i>B. bassiana</i> . _____	13
Figura 12 – Hidroxilação estereosseletiva no carbono 2 do ácido 16-oxo-17-norcauran-19-óico (48) por <i>F. proliferatum</i> . _____	13
Figura 13 - Biotransformação do metoxiclovanol (50) por <i>P. minioluteum</i> . ____	14
Figura 14 – Biossíntese dos terpenos a partir do pirofosfato de isopentila. ____	15
Figura 15 – Imagem macro e microscópica de <i>B. cinerea</i> . _____	19
Figura 16 – Estrutura química das fitotoxinas botridianas isoladas de <i>B. cinerea</i> .21	
Figura 17 – Estrutura química de fitotoxinas da família das botcininas e botrilactonas. _____	21
Figura 18 – Eremofilenóis isolados de <i>B. cinerea</i> . _____	22
Figura 19 – Estrutura química do ácido abscísico (80). _____	23

Figura 20 – Rota biossintética para formação dos diterpenos traquilobânicos	__ 26
Figura 21 – Hidroxilações regio- e estereosseletivas catalisadas por <i>R. stolonifer</i> nos diterpenos traquilobânicos 81 e 84 .	_____ 26
Figura 22 – Hidroxilações regio- e estereosseletivas do diterpeno 86 por <i>R. arrhizus</i> .	_____ 27
Figura 23 – Hidroxilação regiosseletiva do diterpeno 89 por <i>G. fujikuroi</i> .	_____ 27
Figura 24 – Biotransformações dos traquilobanos 81 e 84 com rearranjo para produtos de esqueleto caurânicos (91-94).	_____ 28
Figura 25 – Exemplo de microcultivo das espécies estudadas.	_____ 31
Figura 26 – Imagem de microscopia óptica (40x) de <i>Aspergillus</i> sp. (A) conidióforo ou conídio, (B) hifa, (C) conidiósporo ou esporo. FONTE: acervo de Gabriel Franco dos Santos	_____ 37
Figura 27 – Imagem de microscopia óptica (10x e 40x) de <i>P. minioluteum</i> . (A) conidióforo, (B) conidiósporo, (C) hifa.	_____ 38
Figura 28 – Imagem de microscopia óptica (40x) de <i>F. proliferatum</i> (A) conidiósporos e (B) hifas.	_____ 38
Figura 29 – Imagem de microscopia óptica do fungo <i>P. lilacinus</i> . (A) conidiósporos e (B) hifa.	_____ 39
Figura 30 – Imagem de <i>Mucor</i> sp. (A) esporangiósporos ou esporos, (B) hifa e (C) columela.	_____ 40
Figura 31 – Imagem de microscopia de <i>S. racemosum</i> . (A) esporangióforo, (B) esporangiósporos ou esporos, (C) hifa.	_____ 40
Figura 32 – Espectro de RMN de ^1H do ácido traquilobânico (81) (200 MHz, CDCl_3).	_____ 41
Figura 33 – Espectro de RMN de ^{13}C do ácido traquilobânico (81) (50 MHz, CDCl_3).	_____ 42
Figura 34 – Imagem da CCD (Hexano/Acetona 20 %) do experimento de biotransformação do ácido traquilobânico por <i>A. tubingensis</i> . (A) meio + 81 , (B) meio + fungo, (C) meio + fungo + 81 (extração da fase aquosa), (D) meio + fungo + 81 (extração do micélio), (E) meio + fungo (micélio), (F) 81 padrão. O círculo vermelho indica a mancha de um possível produto.	_____ 43

Figura 35 – Biotransformação do ácido traquilobânico (81) por <i>M. plumbeus</i> . __	44
Figura 36 – Espectro de RMN de ^1H do 7β -hidroxitraquiloban-19-oico (95) (400 MHz, piridina- d_5), e ampliação do sinal em 3,87 ppm com apodização em seno. 45	
Figura 37 – Espectro de ^{13}C do 7β -hidroxitraquiloban-19-oico (95) (100 MHz, piridina- d_5). _____	46
Figura 38 – Subespectro DEPT-135 do 7β -hidroxitraquiloban-19-oico (95) (100 MHz, piridina- d_5)._____	46
Figura 39 – Seção expandida do mapa de contornos COSY do 7β -hidroxitraquiloban-19-oico (95) na região de 0,4-4,2 ppm (400 MHz, piridina- d_5). 47	
Figura 40 – Seção expandida do mapa de contornos HSQC do 7β -hidroxitraquiloban-19-oico (95) (400 MHz, piridina- d_5). _____	48
Figura 41 – Seção expandida do mapa de contornos NOESY do 7β -hidroxitraquiloban-19-oico (95) (400 MHz, piridina- d_5). As linhas indicam o acoplamento no espaço de H- 7α com H- 6β , H- 14β e H- 15α . _____	49
Figura 42 – Estrutura tridimensional do 7β -hidroxitraquiloban-19-oico (95). ____	49
Figura 43 – Espectro de RMN de ^1H do traquiloban-19-oato de β -D-glicopiranosila (96) (400 MHz, DMSO- d_6). _____	51
Figura 44 – Espectro de RMN de ^{13}C do traquiloban-19-oato de β -D-glicopiranosila (96) (100 MHz, DMSO- d_6). _____	51
Figura 45 – Subespectro DEPT-135 do traquiloban-19-oato de β -D-glicopiranosila (96) (100 MHz, DMSO- d_6)._____	52
Figura 46 – Seção expandida do mapa de contornos HMBC do traquiloban-19-oato de β -D-glicopiranosila (96) (400 MHz, DMSO- d_6). _____	53
Figura 47 – Estrutura do traquiloban-19-oato de β -D-glicopiranosila (96) e algumas correlações HMBC. _____	53
Figura 48 – Biotransformação do ácido traquilobânico (81) por <i>S. racemosum</i> formando os produtos 97 , 98 e 99 ._____	56
Figura 49 – Espectro de RMN de ^1H de 97 (400 MHz, piridina- d_5)._____	57
Figura 50 – Espectro de RMN de ^{13}C do produto 97 (100 MHz, piridina- d_5). ____	58
Figura 51 – Espectro de RMN de ^1H do ácido traquiloban-17,19-dioico (98) (400 MHz, piridina- d_5). _____	59

Figura 52 – Espectro de RMN de ^{13}C do ácido traquiloban-17,19-dioico (98) (100 MHz, piridina- d_5). _____	59
Figura 53 – Subespectro de DEPT 135 do ácido traquiloban-17,19-dioico (98) (100 MHz, piridina- d_5). _____	60
Figura 54 – Mapa de contornos HSQC do ácido traquiloban-17,19-dioico (98) (400 MHz, piridina- d_5). _____	61
Figura 55 – Proposta de rearranjo do ácido traquilobânico (81) para formação de diterpenos caurânicos (FRAGA, 1994). _____	63
Figura 56 – Espectro de RMN de ^1H do ácido $16\alpha,17$ -di-hidroxicaur-11(12)en-19-oico (99) (400 MHz, piridina- d_5). _____	64
Figura 57 – Subespectro de DEPT 135 do ácido $16\alpha,17$ -di-hidroxicaur-11(12)en-19-oico (99) (100 MHz, piridina- d_5). _____	65
Figura 58 – Espectro de RMN de ^{13}C do ácido $16\alpha,17$ -di-hidroxicaur-11(12)en-19-oico (99) (100 MHz, piridina- d_5). _____	65
Figura 59 – Mapa de contornos HSQC do ácido $16\alpha,17$ -di-hidroxicaur-11(12)en-19-oico (99) (400 MHz, piridina- d_5). _____	66
Figura 60 – Seção expandida do mapa de contornos NOESY do composto 99 ampliado na região de 2,6 a 6,2 ppm (400 MHz, piridina- d_5). _____	67
Figura 61 – Estrutura química do composto 99 . (A) Correlação NOESY entre os hidrogênios H-12 e H-13 com H-17; (B) Estrutura tridimensional. _____	67
Figura 62 – Estrutura química e dados de RMN de ^{13}C de alguns carbonos do produto 99 e do derivado 102 (UCHÔA et al., 2013). _____	69
Figura 63 – Porcentagem de inibição da AChE pelos compostos 81 , 95 , 96 , 97 , 98 , 99 e galantamina como controle. _____	70
Figura 64 – Perfil de inibição da AChE por 96 nas concentrações de 10; 5; 2,5; 1,25 e 0,75 mg/mL. _____	71
Figura 65 – Estrutura química do ácido abscísico (80). _____	72
Figura 66 – Estrutura química dos derivados 103-106 do ácido abscísico (80). _____	73
Figura 67 – Rota biossintética de ABA por plantas. _____	74
Figura 68 – Proposta de rota biossintética de ABA por <i>B. cinerea</i> (INOMATA et al., 2004). _____	75

Figura 69 – Estrutura química dos intermediários 110 e 111 isolados das cepas mutantes <i>Δbcaba1</i> e <i>Δbcaba2</i> , respectivamente, e do ácido abscísico (80). ____	79
Figura 70 – Espectro de RMN de ¹ H do bcaba1-3-7 (110) (500 MHz, CDCl ₃). __	80
Figura 71 – Espectro de RMN de ¹³ C do bcaba1-3-7 (110) (125 MHz, CDCl ₃). _	80
Figura 72 – Espectro de RMN de ¹ H do bcaba2-4 (111) (500 MHz, CDCl ₃)._____	82
Figura 73 – Espectro de RMN de ¹³ C do aba2-4 (111) (125 MHz, CDCl ₃)._____	83
Figura 74 – Proposta biossintética de ABA (80) a partir dos intermediários 110 e 111 isolados. _____	85
Figura 75 – Estrutura química de botridial (50)._____	86
Figura 76 – Rota biossintética do botridial (50) por <i>B. cinerea</i> (MORAGA et al., 2016)._____	88
Figura 77 – Metabólitos secundários isolados da cepa mutante <i>Δbcbot4</i> , que foram isolados anteriormente de <i>B. cinerea</i> . _____	92
Figura 78 – Metabólitos secundários inéditos, isolados do mutante nulo <i>Δbcbot4</i> . _____	93
Figura 79 – Rearranjo estrutural de sesquiterpeno botridiano para um cameroonano _____	93
Figura 80 – Espectro de RMN de ¹ H da botcinina A (118) (CDCl ₃ em 400 MHz). 94	
Figura 81 – Espectro de RMN de ¹³ C da botcinina A (118) (CDCl ₃ em 100 MHz). _____	95
Figura 82 – Espectro de RMN de ¹ H da botcinina B (117) (CDCl ₃ em 400 MHz). 95	
Figura 83 – Espectro de RMN de ¹³ C da botcinina B (117) (CDCl ₃ em 100 MHz). _____	96
Figura 84 – Espectro de RMN de ¹ H da botcinina E (130) (CDCl ₃ em 400 MHz). 97	
Figura 85 – Espectro de RMN de ¹³ C da botcinina E (130) (CDCl ₃ em 100 MHz). _____	97
Figura 86 – Espectro de RMN de ¹ H da botrilactona (120) (CDCl ₃ em 400 MHz).99	
Figura 87 – Espectro de RMN de ¹³ C da botrilactona (120) (CDCl ₃ em 100 MHz). _____	100
Figura 88 – Espectro de RMN de ¹ H da 6-hidroxi botrilactona (121) (CDCl ₃ em 400 MHz). _____	101

Figura 89 – Espectro de RMN de ^{13}C da 6-hidroxiobtrilactona (121) (CDCl_3 em 100 MHz).	102
Figura 90 – Espectro de RMN de ^1H (+)-4-epieremofil-9-ene- $1\alpha,2\alpha,11$ -triol (125) (CDCl_3 em 400 MHz).	103
Figura 91 – Espectro de RMN de ^1H do 4-epieremofil-9-en- $2\alpha,8\beta,11$ -triol (126) (CDCl_3 em 400 MHz).	104
Figura 92 – Espectro de RMN de ^{13}C do 4-epieremofil-9-en- $2\alpha,8\beta,11$ -triol (126) (CDCl_3 em 100 MHz).	105
Figura 93 – Espectro de RMN de ^1H do monômero (123) (CD_3OD em 500 MHz).	106
Figura 94 – Espectro de RMN de ^1H do monômero (123) (CD_3OD em 125 MHz).	107
Figura 95 – Espectro de RMN de ^1H 4,5-di-hidroxi-2-metil-6-fenilexan-3-ona (128) (CDCl_3 em 400 MHz).	108
Figura 96 – Espectro de RMN de ^{13}C do 4,5-di-hidroxi-2-metil-6-fenilexan-3-ona (128) (CDCl_3 em 100 MHz).	109
Figura 97 – Espectro de RMN de ^1H do ácido 7α -hidroxicameroonan-14,15-dioico 7,14-lactona (119) (CDCl_3 em 500 MHz).	111
Figura 98 – Espectro de RMN de ^{13}C do ácido 7α -hidroxicameroonan-14,15-dioico 7,14-lactona (119) (CDCl_3 em 125 MHz).	111
Figura 99 – Estrutura química do composto 119 e algumas de suas correlações NOESY.	113
Figura 100 – Espectro de RMN de ^1H do presilfiperfolan- $8\alpha,10\beta,14$ -triol (124) (CD_3OD em 500 MHz).	113
Figura 101 – Espectro de RMN de ^{13}C do presilfiperfolan- $8\alpha,10\beta,14$ -triol (124) (CD_3OD em 125 MHz).	114
Figura 102 – Representação em perspectiva ORTEP da estrutura obtida por cristalografia de raios-X para o presilfiperfolan- $8\alpha,10\beta,14$ -triol (124).	116
Figura 103 – Espectro de RMN de ^1H do cameroonan- $7\alpha,10\beta,14$ -triol (129) (CDCl_3 em 500 MHz).	117

Figura 104 – Espectro de RMN de ^{13}C do cameroonan-7 α ,10 β ,14-triol (129) (CDCl ₃ em 125 MHz). _____	117
Figura 105 – Subespectro DEPT 135 do composto 129 (). _____	118
Figura 106 – Seção expandida do mapa de contornos NOESY do cameroonan-7 α ,10 β ,14-triol (129) (CDCl ₃ em 500 MHz). _____	119
Figura 107 – Espectro de RMN de ^1H do composto 122 (CDCl ₃ em 500 MHz). _____	121
Figura 108 – Espectro de RMN de ^{13}C do composto 122 (CDCl ₃ at 125 MHz). _____	121
Figura 109 – Espectro de RMN de ^1H do composto 127 (CDCl ₃ em 500 MHz) _____	122

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Exemplos de biotransformações realizadas com terpenos _____	17
Tabela 2 – Exemplo de alguns sesqui- e diterpenos com atividades biológicas comprovadas _____	18
Tabela 3 – Dados de RMN de ^{13}C para o ácido traquilobânico 81 (CDCl ₃) e para os produtos de biotransformação 95 (piridina- <i>d</i> ₅) e 96 (DMSO- <i>d</i> ₆). _____	54
Tabela 4 – Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C e correlações HMBC para o composto traquiloban-19-oato de β -D-glicopiranosila (96) (DMSO- <i>d</i> ₆). _____	55
Tabela 5 – Dados de RMN de ^{13}C do ácido traquilobânico (81) e produtos de biotransformação deste por <i>S. racemosum</i> (81 em CDCl ₃ ; 97 , 98 e 99 em piridina- <i>d</i> ₅). _____	68
Tabela 6 – Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C e correlações HMBC do composto ácido 16 α ,17-di-hidroxicaur-11-en-19-oico (99) (piridina- <i>d</i> ₅). _____	62
Tabela 7 – Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C e correlações HMBC e NOESY do ácido sincefalóico (98) (piridina- <i>d</i> ₅). _____	69
Tabela 8 – Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C e correlações HMBC para o composto 1-hidroxiabscísico (110) (CDCl ₃). _____	81
Tabela 9 – Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C e correlações HMBC para o composto ácido 1'-H-abscísico (111) (CDCl ₃). _____	84
Tabela 10 – Dados de RMN de ^{13}C das botcininas A (118), B (117) e C (130). _____	98

Tabela 11 – Dados de RMN de ^{13}C da botrilactona (120) e 6-hidroxibotrilactona (121) comparadas com a literatura (MASSAROLI et al., 2013; MORAGA et al., 2016).	102
Tabela 12 – Dados de RMN de ^{13}C do eremofileno 126 comparado com a literatura (PINEDO et al., 2016)	105
Tabela 13 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C e correlações HMBC para o policetídeo monômero 123 (CD_3OD).	108
Tabela 14 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C e correlações HMBC para o policetídeo 4,5-di-hidroxi-2-metil-6-fenilexan-3-ona (128) (CDCl_3).	110
Tabela 15 – Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C e correlações HMBC para o 14-hidroxicarbonilcameroonan-7 α ,15-diol (119) (CDCl_3).	112
Tabela 16 – Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C e correlações HMBC para o presilfiperfolan-8 β ,10 β ,14-triol (124). (CD_3OD).	115
Tabela 17 – Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C e correlações HMBC para o cameroonan-7 α ,10 β ,14-triol (129) (CDCl_3).	120

ABREVIATURAS

AChE	-	Acetilcolinesterase
BDA	-	Batata, dextrose e ágar
CCD	-	Cromatografia em camada delgada
CL- EM	-	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas
CLAE	-	Cromatografia líquida de alta eficiência
δ	-	Deslocamento químico em partes por milhão
ppm	-	Partes por milhão
DMSO	-	Dimetilsulfóxido
UV-VIS	-	Espectroscopia na região de Ultravioleta/visível
2D	-	Experimento de RMN em duas dimensões
1D	-	Experimento de RMN em uma dimensão
MeOH	-	Metanol
m/z	-	Relação massa/carga
RMN	-	Ressonância magnética nuclear
RMN de ^{13}C	-	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
RMN de ^1H	-	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio 1
COSY	-	<i>Correlation Spectroscopy</i>
HMBC	-	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HSQC	-	<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i>
rpm	-	Rotações por minuto
e.d.	-	Excesso diastereoisomérico

RESUMO

Biotransformação de terpenos naturais por fungos de solos e aproximação à biossíntese de sesquiterpenos isolados do fungo fitopatogêno *Botrytis cinerea*. Neste trabalho, buscou-se obter novos compostos derivados do ácido traquilobânico, mediante biotransformação com os fungos *Aspergillus tubingensis*, *Fusarium proliferatum*, *Mucor plumbeus*, *Paecilomyces lilacinus*, *Penicillium minioluteum* e *Syncephalastrum racemosum*, a fim de encontrar novos derivados que apresentem maior atividade inibitória da acetilcolinesterase (AChE), enzima associada ao Mal de Alzheimer, do que a obtida para o substrato utilizado. A partir da biotransformação do ácido traquilobânico por *Mucor plumbeus* foram isolados dois produtos de biotransformação, dentre os quais um não é relatado na literatura. Ao se utilizar a espécie *Syncephalastrum racemosum* como agente biotransformador foi possível isolar três produtos, sendo dois deles inéditos. Todos os produtos de biotransformação apresentaram atividade de inibição da AChE maior que a apresentada pelo ácido traquilobânico. Além disso, foram realizados estudos do metabolismo secundário de mutantes nulos do fungo *Botrytis cinerea* ($\Delta bcaba1-4$ e $\Delta bcbot4$), a fim de investigar quais rotas biossintéticas estão envolvidas na produção do ácido abscísico, e quais metabólitos crípticos são produzidos pelo mutante $\Delta bcbot4$. Por meio do estudo dos mutantes nulos $\Delta bcaba1-4$ de *B. cinerea* foi possível identificar dois intermediários biossintéticos, um isolado de $\Delta bcaba1$ e outro de $\Delta bcaba2$. A partir desses intermediários foi possível propor um rota biossintética atualizada para a formação do ácido abscísico por fungos. A partir do estudo de metabólitos secundários do mutante $\Delta bcbot4$ foram isolados 15 compostos, dos quais sete são conhecidos, dois não foram elucidados e quatro são relatados pela primeira vez neste trabalho.

Palavras-chave: Biotransformação, ácido traquilobânico, *Botrytis cinerea*, biossíntese, metabólitos crípticos.

ABSTRACT

Biotransformation of natural terpenes by soil fungi and approach to the biosynthesis of sesquiterpenes isolated from the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. In this work, we sought to obtain new trachylobanic acid derivatives by biotransformation with *Aspergillus tubingensis*, *Fusarium proliferatum*, *Mucor plumbeus*, *Paecilomyces lilacinus*, *Penicillium minioluteum* and *Syncephalastrum racemosum*, in order to find new derivatives exhibiting greater inhibitory activity of acetylcholinesterase (AChE), enzyme related to Alzheimer's disease, than the substrate used. From the biotransformation of trachylobanic acid by *Mucor plumbeus* were isolated two products of biotransformation, among which one is not reported in the literature. When It was used *Syncephalastrum racemosum* as biotransformation agent, we isolated three products, being two of them unpublished. All products of bitransformation showed inhibition activities greater than the trachylobanic acid. In addition, we realized studies of secondary metabolism of null mutant of the fungus *Botrytis cinerea* ($\Delta bcaba1-4$ and $\Delta bcbot4$), in order to investigate which biosynthetic routes are involved in the production of abscisic acid, and what cryptic metabolites are produced by the mutant $\Delta bcbot4$. Through the study of null mutants $\Delta bcaba1-4$ of *B. cinerea*, it was possible to identify two biosynthetic intermediaries, from $\Delta bcaba1$ and $\Delta bcaba2$, respectively. From these intermediaries, it was possible to propose a biosynthetic route for the formation of abscisic acid by fungi. From the study of secondary metabolites of $\Delta bcbot4$ mutant, we isolated fifteen compounds, of which seven are known, two have not been elucidated and four are reported for the first time in this work.

Keywords: Biotransformation, trachylobanic acid, *Botrytis cinerea*, biosynthesis, cryptic metabolites.

RESUMEN

Biotransformación de terpenos naturales por hongos del suelo y aproximación a la biosíntesis de sesquiterpenos aislados del hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea*. En este trabajo se pretende obtener nuevos compuestos derivados de ácido traquilobánico, mediante biotransformación con los hongos *Aspergillus tubingensis*, *Fusarium proliferatum*, *Mucor plumbeus*, *Paecilomyces lilacinus*, *Penicillium minioluteum* y *Syncephalastrum racemosum*, a fin de encontrar nuevos derivados con mayor actividad inhibitoria de la acetilcolinesterasa (AChE), enzima relacionada con la enfermedad de Alzheimer, que los obtenidos para el sustrato utilizado. De la biotransformación del ácido traquilobánico por *Mucor plumbeus* fueron aislados dos productos de biotransformación, entre los cuales uno no se divulga en la literatura. Cuando se utiliza la especie *Syncephalastrum racemosum* como agente biotransformador fueron aislados 3 productos, siendo dos de ellos inéditos. Todos los productos de biotransformación demostraron inhibición de la acetilcolinesterasa más grandes que presentan por ácido traquilobánico. Además, estudios del metabolismo secundario del mutante nulo del hongo *Botrytis cinerea* fueron conducidos ($\Delta bcaba1-4$ e $\Delta bcbot4$), para investigar qué rutas biosintéticas están involucrados en la producción de ácido abscísico, y qué metabolitos crípticos son producidos por el mutante $\Delta bcbot4$. Mediante el estudio de mutantes nulos $\Delta bcaba1-4$ de *B. cinerea*, fue posible identificar dos intermediarios biosintético, aislados de $\Delta bcaba1$ y $\Delta bcaba2$. De estos intermedios, es posible proponer una ruta biosintética para la formación de ácido abscísico por hongos. Desde el estudio de metabolitos secundarios de $\Delta bcbot4$ fueron aislados 15 compuestos, de los cuales siete son conocidos, dos no se han aclarado y cuatro se reportan por primera vez en este trabajo.

Keywords: Biotransformación, ácido traquilobánico, *Botrytis cinerea*, biosíntesis, metabolitos crípticos.

1. Revisão bibliográfica

1.1. Fungos e aplicações

Durante o século XX, os antibióticos de origens fúngicas ajudaram a praticamente dobrar a expectativa de vida da população, revolucionando a medicina (DEMAIN, 2014). Isto contribuiu para que, com o passar dos anos, houvesse um crescente interesse na área de microbiologia, o que resultou, por exemplo, na utilização de fungos para várias aplicações biotecnológicas. Isso se deve principalmente ao rápido crescimento microbiano, facilidade de manuseio de micro-organismos e às diversidades de seus metabolismos (CHOMCHEON, 2009). O reino fungi é um dos mais numerosos, apresentando representantes com grande variedade de formas (Figura 1), comportamentos e ciclos de vida. Estimativas de 2007 indicavam que apenas 5 % de seus membros já tinham sido catalogados (MUELLER & SCHMIT 2007). Muitas dessas espécies são de grande importância ecológica e comercial e, como é o caso daquelas utilizadas na fabricação de alimentos, bebidas, fármacos e cosméticos. Com pesquisas na busca de novas espécies de fungos, espera-se descobrir substâncias com importância biotecnológica (HUTCHINSON, 2005; PELÁEZ, 2006; DEMAIN, 2014).



Figura 1 – Imagens de diferentes espécies fúngicas.

FONTE: Cedido por Gesiane da Silva Lima

Durante milhares de anos, civilizações antigas foram devastadas por doenças e epidemias como a peste bubônica. Muitas dessas doenças poderiam ter sido controladas por antibióticos, os quais ainda não existiam, até que Alexander Fleming observou que o fungo *Penicillium notatum* produzia uma substância capaz de inibir o crescimento da bactéria *Staphylococcus aureus*. A partir dessa observação inicial, constatou-se que o caldo de cultura deste fungo inibia o crescimento de muitas bactérias patogênicas comuns. A substância produzida por *P. notatum*, devido à sua origem, foi denominada penicilina, sendo o primeiro antibiótico comercial (KARDOS & DEMAINE, 2011). Após a descoberta da penicilina, passou-se a estudar com maior afinco os fungos, focando principalmente na descoberta de novas moléculas ativas. Até 2014, já tinham sido descritos aproximadamente 23 mil compostos ativos provenientes de microorganismos (antimicrobianos, antivirais, citotóxicos e imunossupressores), sendo que 42% desses são de origem fúngica (DEMAINE, 2014).

Em função da grande versatilidade da biossíntese microbiana, moléculas isoladas de fungos apresentam grande diversificação estrutural e, também, várias atividades biológicas associadas, de modo que estes produtos naturais apresentam um amplo espectro de utilização (DEMAINE, 1999; HARVEY, 2008). Muitas substâncias de origem fúngica são comercializadas em todo o mundo como fármacos para diferentes enfermidades incluindo: antibióticos (β -lactâmicos e tetraciclina) (SRIVASTAVA et al., 2009; LIU et al., 2014); antitumorais como a bestatina (HUO et al., 2014); redutores de colesterol (lovastatina) (KUMAR et al., 2014), imunossupressores (ciclosporina A, ácido micofenólico) (PERLMAN & RAO, 2014) (Figura 2, pág. 3); e vários outros (GANASAN, 2008; HARVEY, 2008).

A cada dia aumenta o escopo de pesquisas relacionadas a fungos, enfatizando a descoberta de novos fármacos, como também estudando e explorando seu rico sistema enzimático, capaz de produzir novas substâncias ou de modificar a estrutura de substâncias com alto grau de toxicidade a fim de diminuir essa toxicidade (KRUPINSKI et al., 2014). Além disso, fungos têm sido

utilizados para produzir moléculas com novas atividades associadas e/ou melhorar as atividades pré-existentes (RICO-MARTÍNEZ et al., 2014).

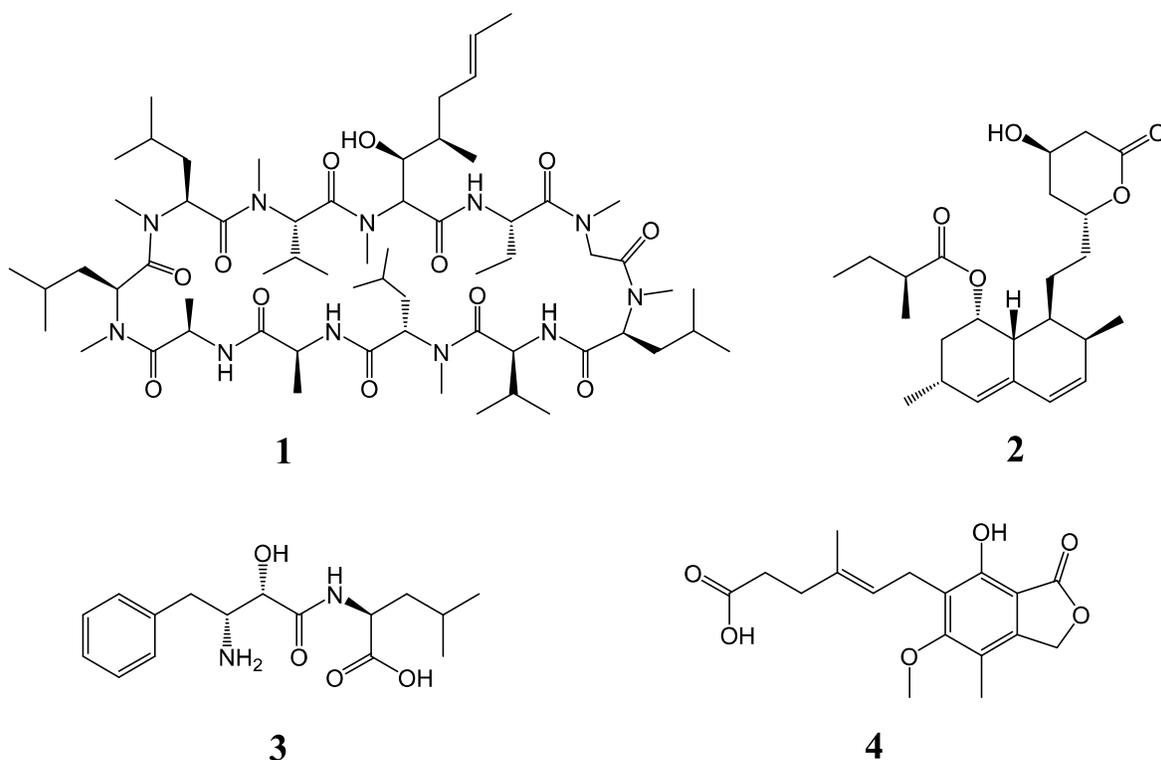


Figura 2 – Alguns fármacos provenientes de fungos: ciclosporina A (1), lovastatina (2), bestatina (3) e ácido micofenólico (4).

A utilização de fungos para realizar modificações em diferentes substâncias consiste na técnica de biotransformação, sendo utilizados principalmente produtos naturais como precursores. Os processos de biotransformação são uma ferramenta importante para a melhor compreensão do funcionamento do sistema enzimático dos fungos visando a produção de novos compostos (FABER, 2004; NUNES et al., 2013).

1.2. Biotransformação: Aspectos gerais, metodologias e aplicações

São denominadas biotransformações as reações químicas mediadas por micro-organismos ou por preparações enzimáticas, com o principal objetivo de se realizar uma reação química por uma via biológica de baixo custo, alta especificidade e de fácil execução (ADELIN et al., 2011). Devido à capacidade de enzimas realizarem reações quimiosseletivas, regioseletivas e enantiosseletivas, a biotransformação é uma ferramenta atual de tecnologia quiral (NUNES et al., 2013; TURNER & SCHNEIDER, 2000).

O processo de biotransformação surgiu em consequência da eficiência de biocatalisadores para realizar reações difíceis de serem obtidas por métodos tradicionais em química orgânica, tornando-o uma opção para a síntese de compostos enantiomericamente puros em algumas etapas sintéticas (PATEL, 1997; GHASEMI et al., 2014). Existem duas classes principais de biotransformação: com células inteiras e com enzimas.

Biotransformações com células inteiras são geralmente mais baratas, sendo necessário ter experiência em técnicas microbiológicas. O isolamento do produto de interesse é dificultado devido à biomassa, à presença de produtos de reações laterais, e de produtos naturais provenientes do metabolismo microbiano. Além disso, são necessários grandes volumes de meio de cultura e agitadores para a biotransformação de pequenas quantidades de material (FABER, 2004). Apesar disto, as biotransformações utilizando fungos são de fácil operação, baixo custo, além de ocorrer regeneração natural das células, de modo que uma mesma cepa fúngica pode ser utilizada durante anos em processos de biotransformação (FABER, 2004; HOLLMANN et al., 2011).

Devido ao fato de as enzimas serem mais seletivas, a biotransformação com estas macromoléculas pode ser executada com equipamentos mais simples, em soluções mais concentradas e na presença de solventes orgânicos (FABER, 2004).

No entanto, a utilização de enzimas em processos biocatalíticos apresenta algumas complicações, já que estas podem degradar com o tempo e as

formas corretas de armazenamentos afetam suas atividades. Além disso, as reatividades das enzimas são profundamente influenciada pelas condições de reação, de modo que fatores como o controle do pH são fundamentais para a atividade máxima da enzima. Ademais, há de se levar em consideração os custos elevados das purificações das enzimas, que a uma grande desvantagem em relação ao uso de células inteiras (FABER, 2004; HOLLMANN et al., 2011).

Processos fermentativos, com a utilização de micro-organismos, são empregadas há mais de seis mil anos, para a fabricação do pão, cerveja, vinhos e outras bebidas fermentadas como o hidromel. No ambiente acadêmico, o primeiro relato de biotransformação é datado no final do século XIX, quando Louis Pasteur utilizou um micro-organismo para resolver uma mistura racêmica de ácido tartárico. O micro-organismo adicionado à mistura racêmica degradou somente um enantiômero, deixando o outro intacto (TURNER & SCHNEIDER, 2000; BUCHHOLZ & COLLINS, 2013). O progresso no uso de enzimas e células inteiras na química orgânica sintética foi relativamente lento até os anos 50, quando estudos com esteroides passaram a ser referidos como um marco histórico nessa área. A partir da hidroxilação na posição 11 da progesterona (**5**) pelo fungo *Rhizopus arrhizus*, formando a 11 α -hidroxiprogesterona (**6**) (Figura 3, pág. 6), patenteada em 1952, numerosos micro-organismos têm sido investigados e alguns deles têm sido aplicados com sucesso para transformar uma gama de esteroides para a produção de compostos funcionalizados com uso terapêutico e de valor comercial. Deste modo, a funcionalização de intermediários na síntese de esteroides deu início ao uso de biotransformações em química e, atualmente, diversas moléculas e fungos são empregados e até mesmo utilizados em processos industriais (HUANG et al., 2010; DONOVA & EGOROVA, 2012).

Na indústria farmacêutica, o emprego de *R. arrhizus* e *Aspergillus niger* na síntese da cortisona (**7**) diminuiu os custos de produção de 1 g de cortisona de U\$ 200,00 (1949) para U\$ 1,00 (1979) e, além disso, reduziu o número de etapas do processo de 31 para 11 (PETERSON & MURRAY, 1952; DONOVA & EGOROVA, 2012).

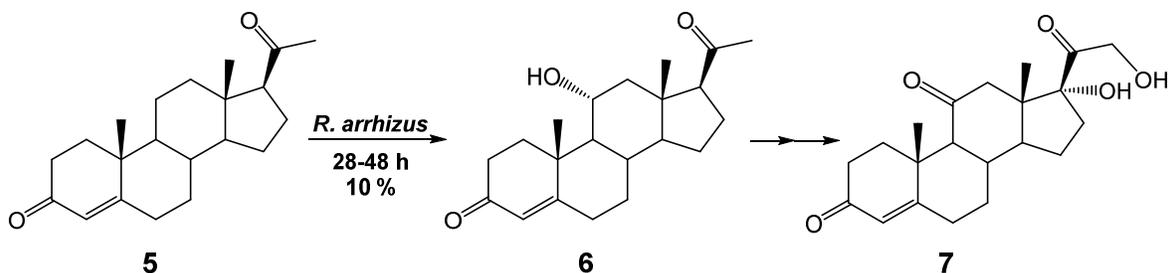


Figura 3 – Hidroxilação seletiva da progesterona (5) por *R. arrhizus* na formação da 11 α -hidroxiprogesterona (6), intermediário na produção da cortisona (7).

Atualmente as biotransformações têm tornado-se uma ferramenta muito importante no desenvolvimento de novas tecnologias para a síntese de compostos com alto valor agregado. Isso ocorre devido ao aumento do entendimento da capacidade que os fungos têm para transformar seletivamente determinados grupos funcionais situados em regiões quimicamente diferentes na molécula, e para realizar reações que dificilmente ocorreriam por síntese química (ADELIN et al., 2011).

As biotransformações também são uma alternativa para a prática de uma química mais verde, visando à produção de determinadas substâncias com menor uso de solventes orgânicos, o que pode contribuir para um crescente avanço neste campo (HOLLMANN et al., 2011).

Diversos fungos são capazes de efetuar biotransformações, como por exemplo, *Aspergillus flavus* (LUO et al., 2014), *Cunninghamella* spp. (FENG et al., 2012; QIAO et al., 2014), *Gibberella fujikuroi* (RICO-MARTÍNEZ et al., 2014; TAKAHASHI et al., 2014), *Mucor spinosus* (YANG et al., 2015), *Mucor circinelloides* (NUNES et al., 2013), *Penicillium chrysogenum* (PARSHIKOV et al., 2012), entre outros (DONOVA & EGOROVA, 2012; GHASEMI et al., 2014; MEI et al., 2015). Em geral, estes fungos atuam sobre diversos compostos, independente de suas estruturas. Embora este seja o tipo mais comum de biotransformação, também podem ser realizados processos biossinteticamente dirigidos, quando rotas biossintéticas de um determinado micro-organismo são utilizadas para se obter produtos de biotransformação específicos (ALAM & HANSON, 1990).

Na biotransformação de xenobióticos, o fungo atua em substâncias que não fazem parte do seu metabolismo, como por exemplo, a biotransformação da bavaquinina (**8**) (Figura 4) pelos fungos *A. flavus*, *Cunninghamella elegans* e *Penicillium raistrickii*, que geraram os produtos **9** e **10**. A bavaquinina é um flavonoide que possui diversas atividades biológicas associadas, incluindo antidiabética, antialérgica e anti-inflamatória. Os três fungos estudados para a biotransformação da bavaquinina foram capazes de realizar uma redução do grupamento carbonílico formando uma hidroxila seletivamente com orientação β . Os fungos *A. flavus* e *C. elegans* também foram capazes de adicionar duas hidroxilas na ligação dupla da cadeia isoprênica. O produto **10** apresentou atividade antitumoral mais acentuada do que a bavaquinina (LUO et al., 2014).

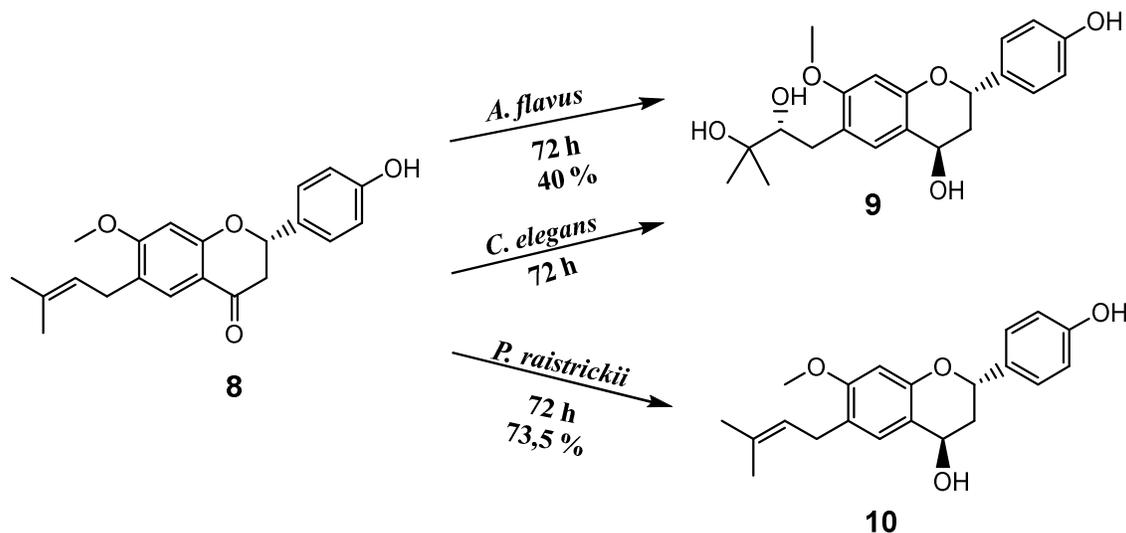


Figura 4 – Biotransformação da bavaquinina (**8**) por *A. flavus*, *C. elegans* e *P. raistrickii*.

A biotransformação do buagarofurano (**11**) pelo fungo *Cunninghamella echinulata* também pode ser citada. Com quatro dias de fermentação, este fungo transformou o substrato xenobiótico em onze novos produtos (**12** a **22**), mostrando sua capacidade de oxidação em diferentes posições (Figura 5, pág. 8) (QIAO et al., 2014).

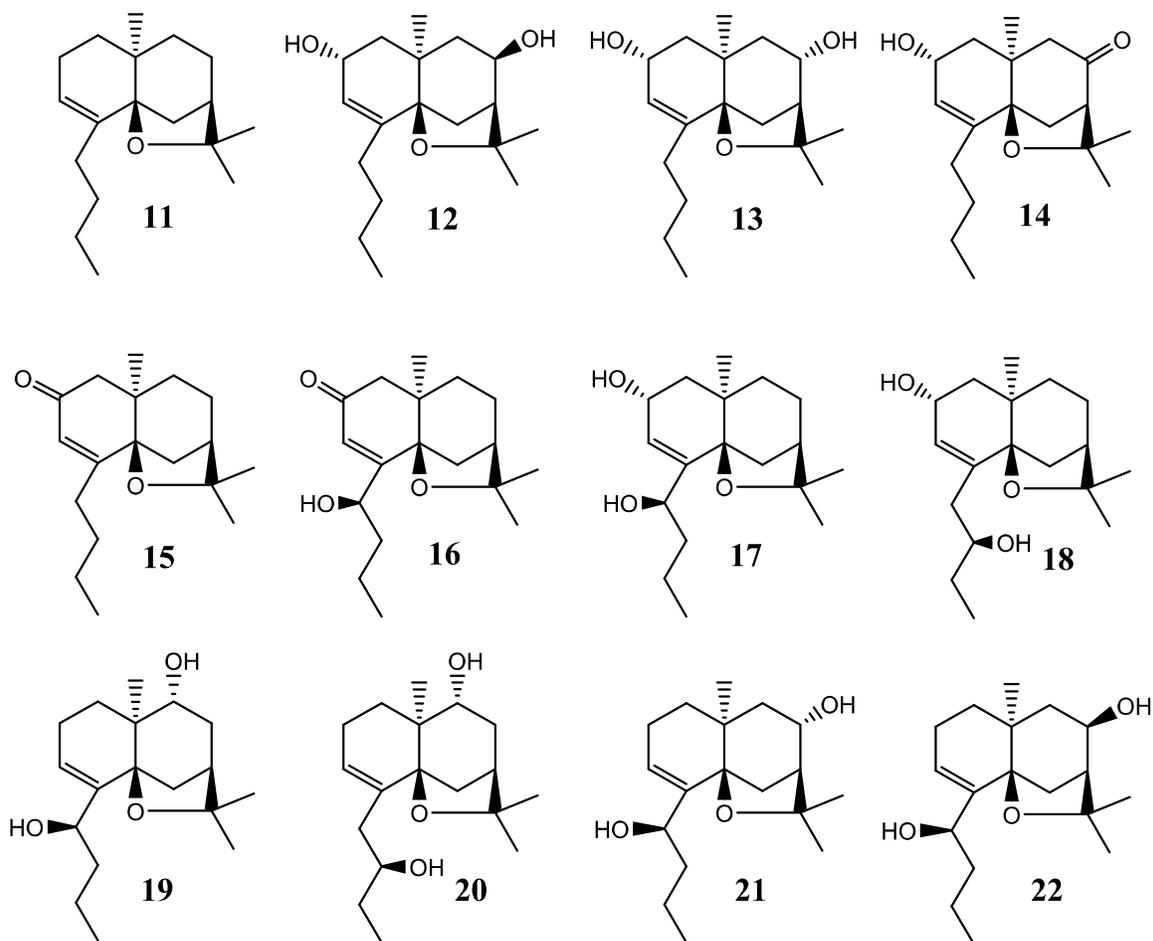


Figura 5 – Estrutura química do bugarofurano (**11**) e dos produtos de biotransformação por *C. echinulata* (**12-22**).

Outro exemplo curioso de biotransformação de xenobióticos é a biotransformação da pisatina (**23**), uma fitoalexina produzida por *Pisum sativum* (ervilha). Utilizando o fungo *Fusarium solani*, previamente isolado de *P. sativum*, foi possível realizar a biotransformação da pisatina em uma substância (**24**) sem toxicidade aparente contra o fungo. Esse exemplo mostra que, na natureza, alguns fungos produzem enzimas capazes de realizar biotransformações de substâncias que colocam em risco sua sobrevivência (Figura 6, pág. 9) (PUEPPKE & VANETTEN, 1976).

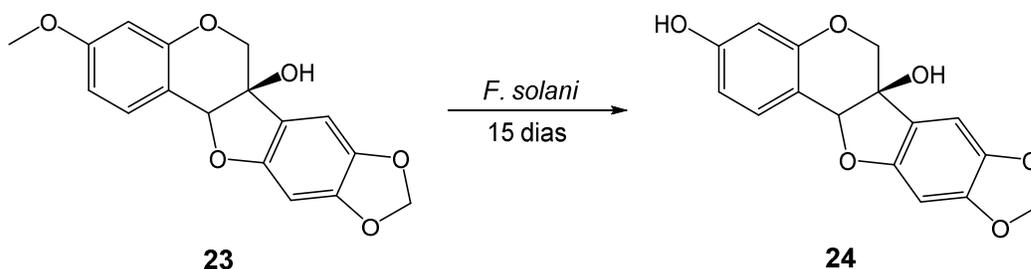


Figura 6 – Biotransformação da pisatina (**23**) por *F. solani*.

Na biotransformação biossinteticamente dirigida, o substrato administrado ao fungo deve ser análogo a algum intermediário biossintético natural produzido pelo fungo, a fim de se utilizar enzimas produzidas pelo fungo capazes de realizar modificações específicas. Um exemplo é a biotransformação do ácido 7β -hidroxicaureno (**25**) por *Gibberella fujikuroi* (FRAGA et al., 2012). Para a formação das giberelinas (**26** e **27**), o intermediário ácido 7β -hidroxicaureno (**25**), um diterpeno caurânico, sofre contração do anel em rearranjo estrutural promovido por *G. fujikuroi* (Figura 7) em sua biossíntese. Entretanto, quando o mesmo fungo foi utilizado para biotransformar o composto 7β -acetoxicaureno (**28**), similar a **25**, esse fungo não foi capaz de produzir as giberelinas, tendo, biotransformado o substrato **28** em seis novos compostos (**29-34**) (Figura 8, pág. 10).

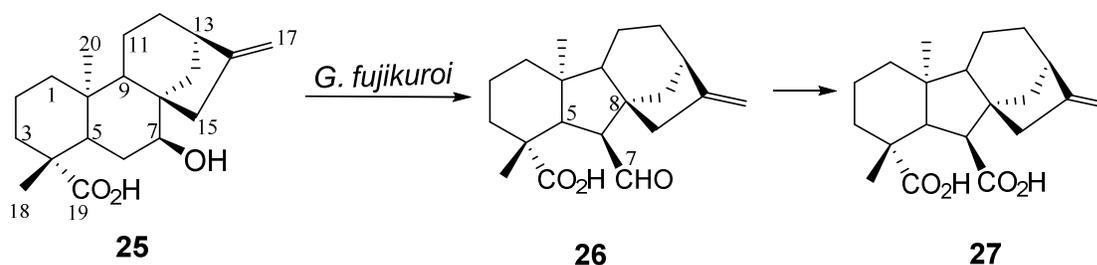


Figura 7 – Biotransformação do ácido 7β -hidroxicaur-16-en-19-oico (**25**) por *G. fujikuroi*.

A biotransformação de diterpenos caurânicos é uma boa alternativa de se alterar a relação entre estrutura-atividade desses compostos, como por exemplo, derivados caurânicos hidroxilados em posições como 7 e 14 apresentam

atividade antitumoral mais acentuada do que precursores não hidroxilado nessas posições (TAKAHASHI et al., 2014).

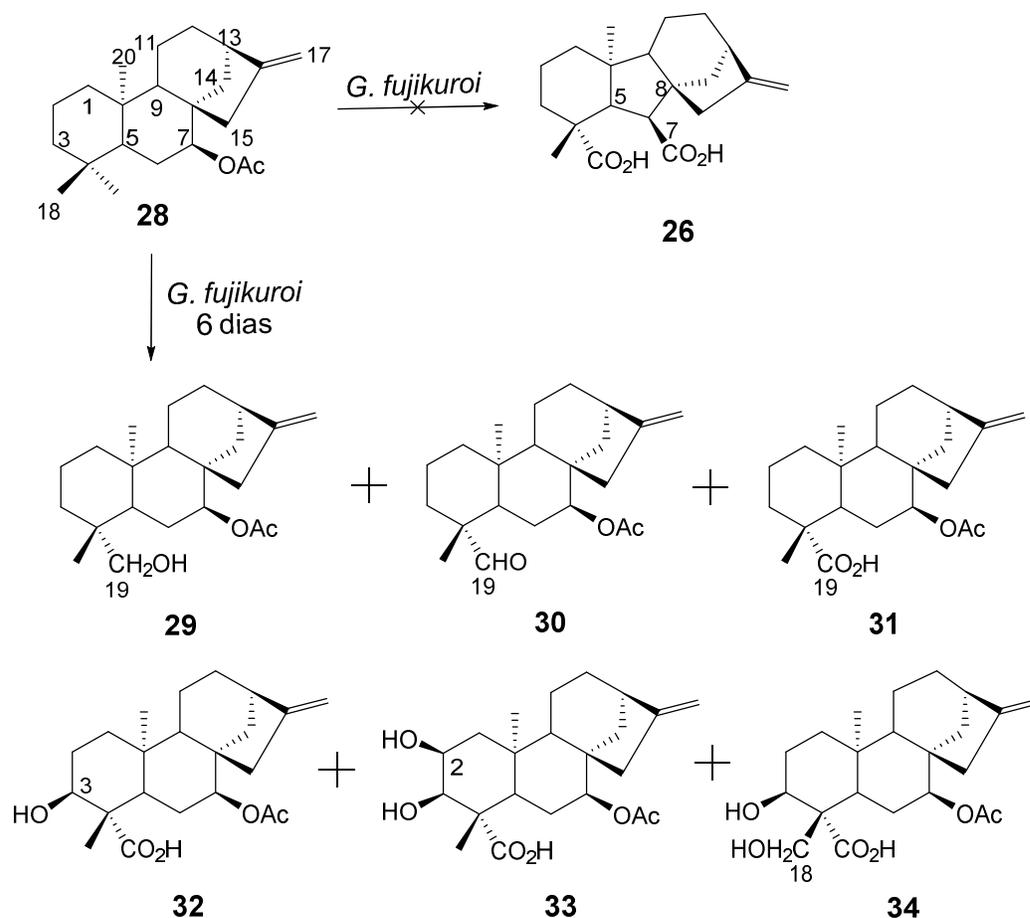


Figura 8 – Biotransformação do 7β-acetoxicaureno (**28**) produzindo seis novos compostos caurânicos (**29-34**).

Muitos fármacos são produzidos com a utilização de biotransformações em uma ou mais etapas de sua síntese, tais como: pravastatina (**35**) (reduzidor de colesterol), L-dopa (**36**) (anti-Parkinsoniano), lamivudina (**37**) (antiviral), saxagliptina (**38**) (antidiabético), atazanavir (**39**) (anti-HIV) (Figura 9, pág. 11) entre outros (ZAKS & DODDS, 1997; PATEL, 1997; PATEL, 2008).

Um desses fármacos produzidos através da biotransformação é o composto MK0507 (**40**) (Figura 10, pág. 12), um inibidor de anidrase carbônica, cuja síntese parte de um homopolímero (**41**). Ele está na composição de um

colírio usado no tratamento de glaucoma. O processo desenvolvido para a sua síntese utiliza uma redução do grupamento carbonílico da substância **42** a álcool por *Neurospora crassa*, com 99,2% de pureza diastereoisomérica (**43**). A reação é feita em pH 4 e o substrato é adicionado lentamente para não saturar o fungo (ZAKS & DODDS, 1997).

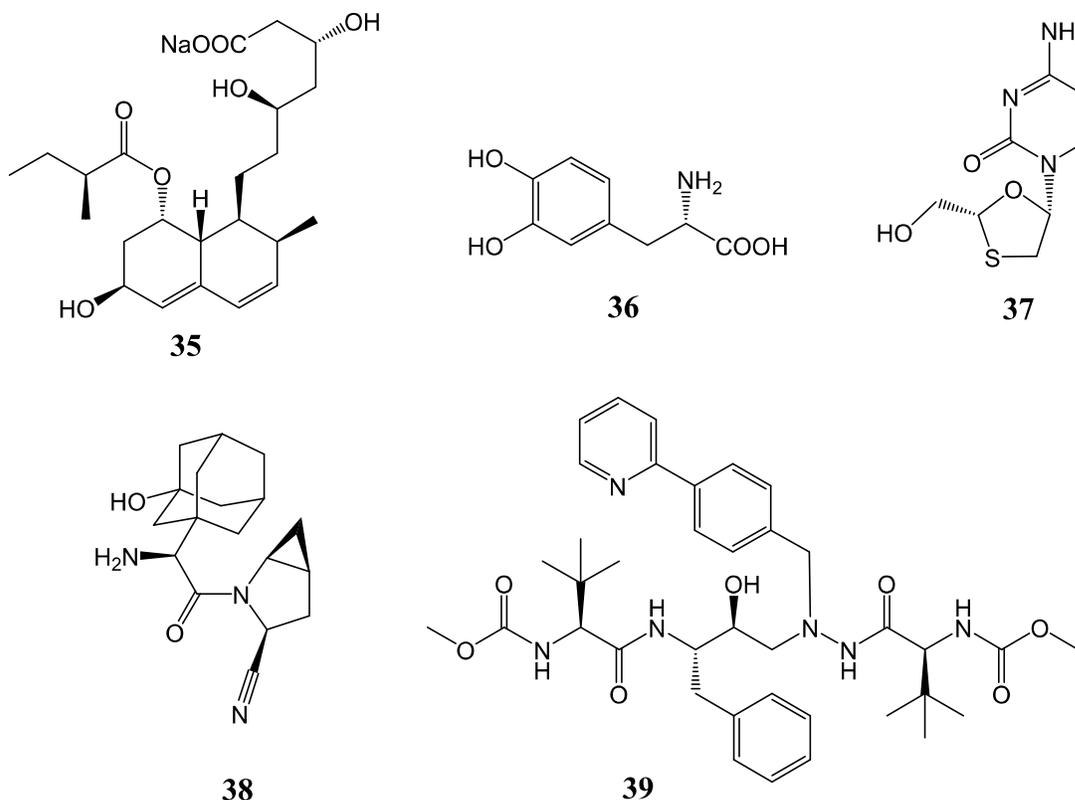


Figura 9 – Estrutura química dos fármacos pravastatina (sal sódico) (**35**), L-dopa (**36**), lamivudina (**37**), saxagliptina (**38**) e atazanavir (**39**)

Uma das principais modificações nas estruturas químicas realizadas por fungos em biotransformação, é a hidroxilação de alcanos. Esses microorganismos são capazes de hidroxilar alcanos em posições não ativadas, o que geralmente se deve à catalise pelo citocromo P450. Este corresponde a uma superfamília de proteínas responsável pela transferência de átomos de oxigênio em uma grande variedade de transformações químicas, o que tende a tornar as substâncias mais polares e hidrossolúveis. A exploração da função catalítica do

P450 oferece possibilidades sem precedentes para aplicações biotecnológicas, farmacêuticas e na medicina (MARTIN et al., 2017).

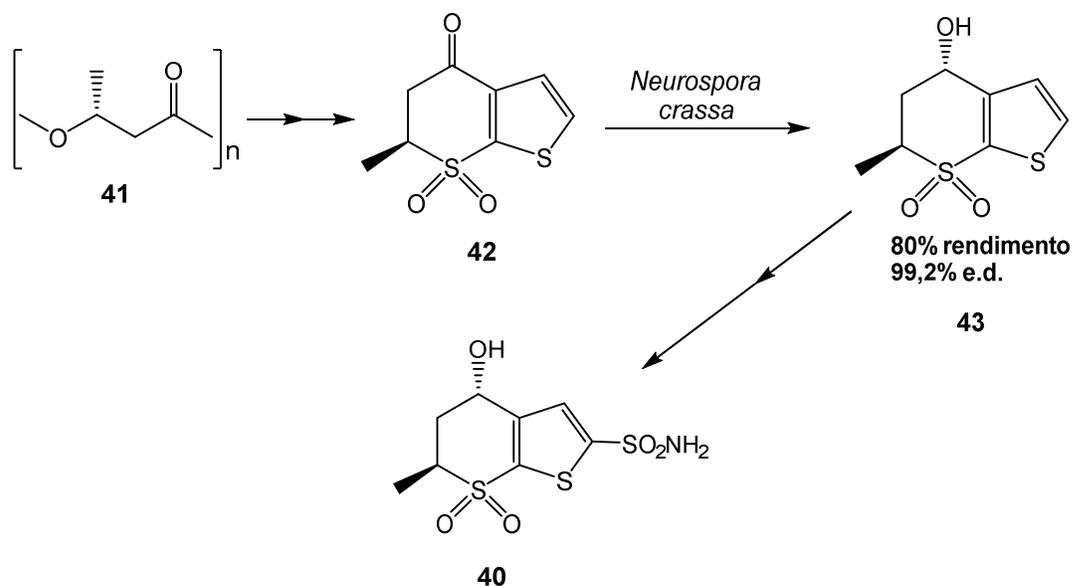


Figura 10 – Síntese do composto MK0507 (40).

A associação de glicosídeos com compostos de baixa massa molecular é uma ferramenta eficiente para aumentar a solubilidade em água (melhorando a disponibilidade no sangue), melhorar a estabilidade e modificar a atividade biológica (HUANG et al., 2015). A glicosilação é uma transformação bioquímica comum que acontece mediada por glicosiltransferases. Estas enzimas catalisam a formação de ligações glicosídicas através da transferência de um glicosídeo de um substrato doador para uma molécula receptora (SORDON et al., 2016). Dois exemplos de glicosilações por micro-organismos são a biotransformação de flavonoides por diferentes espécies de micro-organismos, relatada por Sordon e colaboradores (2016); e a biotransformação da curvularina (44) pelo fungo *Beauveria bassiana*, gerando os produtos curvularina-7-O- β -D-glicopiranosila (45), curvularina-4'-O-metil-7-O- β -D-glicopiranosila (46) e 6-hidroxicurvularina-4'-O-metil-6-O- β -D-glicopiranosila (47) (Figura 11, pág. 13) (ZHAN & GUNATILAKA, 2005).

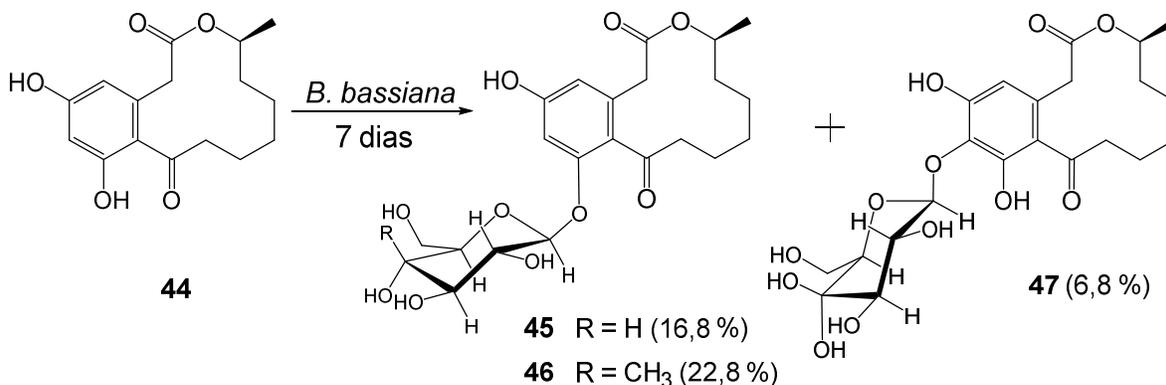


Figura 11 – Biotransformação da curvularina (**44**) por *B. bassiana*.

Neste trabalho foram utilizados os fungos *Aspergillus tubingensis*, *Fusarium proliferatum*, *Paecilomyces lilacinus*, *Penicillium minioluteum*, *Mucor plumbeus* e *Syncephalastrum racemosum* para a realização dos experimentos de biotransformação. Dentre eles, *M. plumbeus* é amplamente empregado em experimentos de biotransformações de terpenos (SILVA et al., 2013) e de outras classes (SILVA et al., 2015). *S. racemosum* possui características morfológicas muito similares às de fungos do gênero *Mucor*, além de ser conhecida sua capacidade de biotransformação dos compostos ácido ursólico (FU et al., 2013), cicloastragenol (FENG et al., 2015) e triterpenos protostanos (WANG et al., 2017). *F. proliferatum* mostrou capacidade de hidroxilar a posição 2 β de um diterpeno caurânico (**48**) de forma estereosseletiva (Figura 12) (ROCHA et al., 2010).

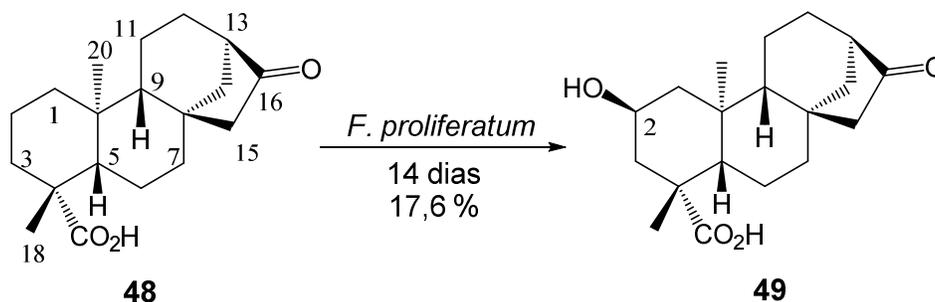


Figura 12 – Hidroxilação estereosseletiva no carbono 2 do ácido 16-oxo-17-norcauran-19-óico (**48**) por *F. proliferatum*.

O fungo *P. minioluteum* foi utilizado para biotransformar um sesquiterpeno clovano (**50**) em dois novos produtos (**51** e **52**), ambos com clivagem de um grupamento metílico, ocorrendo isomerização de um grupamento hidroxila em um dos produtos (Figura 13) (DE SOUZA et al., 2012). Para *A. tubingensis* e *P. lilacinus*, não há relatos na literatura de biotransformação de terpenos.

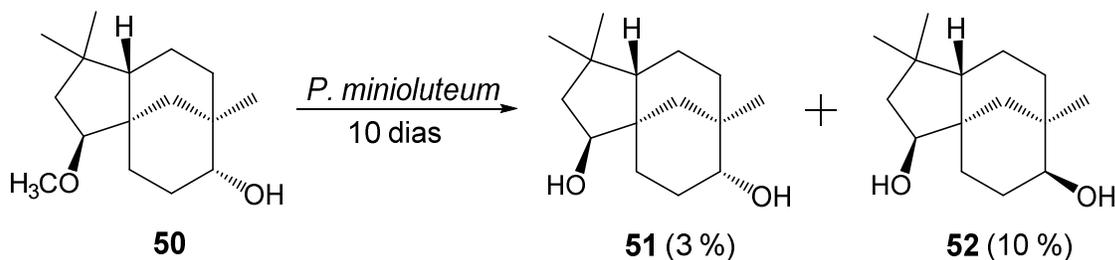


Figura 13 - Biotransformação do metoxiclovanol (**50**) por *P. minioluteum*.

1.3. Terpenos

Os terpenos representam a maior classe de metabólitos secundários, com mais de 50.000 substâncias conhecidas e apresentam grande diversidade estrutural (DEMYTTENAERE & POOTER, 1996; DICKSCHAT, 2016; YAO et al., 2016). Mesmo sendo mais comumente encontrados em plantas, como por exemplo em óleos essenciais de plantas aromáticas, diversos micro-organismos, como os fungos, são capazes de produzir metabólitos terpênicos de importância, como os das famílias de afidicolanos (LIN et al., 2011), botrianos (MORAGA et al., 2016), carotenoides (AVALOS & LIMÓN, 2015), giberelinas (HEDDEN & SPONSEL, 2015) e forscolininas (MIR et al., 2015). A rota biossintética dos terpenos é amplamente estudada e sabe-se que tanto a rota do ácido mevalônico quanto a do fosfato de metileritritol resultam na formação do pirofosfato de isopentenila, o qual é o precursor universal dos terpenos (Figura 14, pág. 15) (YAO et al., 2016). Estas unidades de pirofosfato de isopentenila, contendo cinco carbonos cada, dão origem à formação dos terpenos. Estes são classificados de acordo com o número de unidades isoprênicas presentes no esqueleto carbônico,

Dentre os terpenos encontrados na natureza, podem-se destacar os oxigenados como aqueles de maior importância para a indústria devido à sua alta qualidade sensorial. Este é o caso do mentol, responsável pela ação refrescante de pastilhas, balas e chicletes. Outro exemplo é a *R*-carvona, utilizada devido ao seu aroma característico de hortelã. Também se pode citar o 1,8-cineol, que apresenta aroma de eucalipto (KING & DICKINSON, 2003).

A biotransformação é uma estratégia que pode ser usada para modificação de terpenos naturais, a fim de se obter novos terpenos com estruturas, funções e atividades biológicas diversificadas. Na Tabela 1 (pág. 17) são observados diversos exemplos de biotransformação de terpenos naturais.

Dentre os terpenos com atividades biológicas, pode-se destacar o sesquiterpeno artemisinina, isolada de *Artemisia annua* (MOJAB, 2012), uma conhecida droga antimalárica e o diterpeno paclitaxel, isolado de *Taxus brevifolia* (LIU *et al.*, 2016), que se trata de um importante fármaco natural anticâncer. Na Tabela 2 (pág. 18) são apresentados exemplos de diversas atividades biológicas associadas a sesqui- e diterpenos naturais.

Tabela 1 – Exemplos de biotransformações realizadas com terpenos

Classe de terpeno	Substrato	Fungo	Tipo de transformação	Referência
Monoterpeno	(-)- α -pineno	<i>Stereum hirsutum</i>	Hidroxilação e rearranjo	LEE et al., 2015
	1,8-cineol	<i>Mucor ramannianus</i> e <i>Aspergillus niger</i>	Hidroxilação	RAMOS et al., 2015
	geraniol	<i>Penicillium italicum</i>	Degradação	DEMYTTENAERE & POOTER, 1996
	carvona	<i>Mucor circinelloides</i>	Hidroxilação	NUNES 2013
Sesquiterpeno	curcumenol	<i>Mucor polymorphosporus</i>	Hidroxilação, desidrogenação e rearranjo	CHEN et al., 2015
	arteméter	<i>Fusarium lini</i>	Hidroxilação, desacetilação, rearranjo e redução	MUSHARRAF et al., 2012
	8-metoxi-isocariolan-9-ol	<i>Botrytis cinerea</i>	Hidroxilação e desmetilação	ASCARI et al., 2011
Diterpeno	18,19-di-hidroxitraquilobano	<i>Rhizopus stolonifer</i>	Hidroxilação e rearranjo	VASCONCELOS et al., 2015
	16 α ,19-di-hidroxicaurano	<i>Cephalosporium aphidicola</i>	Hidroxilação	HANSON et al., 1995
	ácido pimara-8(14),15-dien-19-óico	<i>A. niger</i>	Hidroxilação	SEVERIANO et al., 2013
Triterpeno	oleanolato de metila	<i>Rhizomucor miehei</i>	Hidroxilação	MARTINEZ et al., 2015
	maslinato de metila	<i>R. miehei</i>	Hidroxilação	MARTINEZ et al., 2015
	betulina	<i>Rhodotorula mucilaginososa</i>	Hidroxilação	MAO et al., 2012

Tabela 2 – Exemplo de alguns sesqui- e diterpenos com atividades biológicas comprovadas

Classe de terpeno	Composto	Atividades biológicas	Referências
Sesquiterpeno	Ácido volvalerenal K	Anti-Alzheimer	CHEN et al., 2016
	(1 α ,4 α ,5 α ,7 β ,8 α) β -5,8a-dimetildecadronafitalene-1,4a,7-triol	Citotóxica contra hepatocarcinoma	XU et al., 2014
	Artemisinina	Antimalárico	MOJAB, 2012
	Eupalinolida O	Anticâncer e pro-apoptótica	YANG et al., 2016
	Ácido cóstico e ácido 3 α -hidroxicóstico	Antitumoral	YU et al., 2016
	Henriol A, 9 espicaclorantina A, cloramultilida A, shizukaol B, tianmushanol e 8-O-metiltianmushanol	Antimicrobiana	YANG et al., 2014
Diterpeno	Acetato de 4'-Hidroxi kamolonola e kamolonol	Anti-úlceras e anticâncer	DASTAN et al., 2014
	Esfaerodactilomelol, bromoesfaerol, 12S- e 12R-hidroxi-bromoesfaerol	Antimicrobiana e antitumoral	RODRIGUES et al., 2015
	Paclitaxel	Anticâncer	LIU et al., 2016
	Ácido giberélico	Estimulante de crescimento de plantas	HEDDEN & SPONSEL 2015
	Salvinorina A	Anti-inflamatória, antifedante e antagonista opioide	LI et al., 2016a
	Ácido caurenoico	Antimicrobiana, antifúngica, citotóxica, larvicida, anti-inflamatória e antiparkinson	TAKAHASHI et al., 2014
	Afidicolina	Antibiótico	KOLMAN et al., 2002
	Forskolina	Cardiovascular	LAURENZA et al., 1989

1.4. Fungo *Botrytis cinerea*

B. cinerea (Figura 15) é um fungo patógeno necrotrófico pertencente ao filo Ascomycota, à família Sclerotiniaceae e ao gênero *Botryotinia*. Fungos necrotróficos causam a morte das células de seu hospedeiro, para extrair nutrientes. Este fungo é o causador da fitopatogenicidade conhecida por podridão cinzenta, a qual ataca mais de 200 espécies de plantas como uva, morango e tomate. *B. cinerea* apresenta ampla distribuição geográfica e pode ser encontrado em todos os continentes e diferentes climas, ocasionando incontáveis danos agropecuários (STAATS et al., 2005; COLLADO et al., 2007; MALMIERCA et al., 2016). Mesmo que este patógeno já venha sendo estudado há muitos anos, atualmente há relatos de novas espécies sendo atacadas por *B. cinerea*, como a nativa brasileira *Miconia cinnamomifolia* (SILVA et al., 2016), variedades de *Salvia dorisiana*, cultivadas na Itália (GARIBALDI et al., 2016) e de *Vigna radiata*, cultivada na China (LI et al., 2016b).

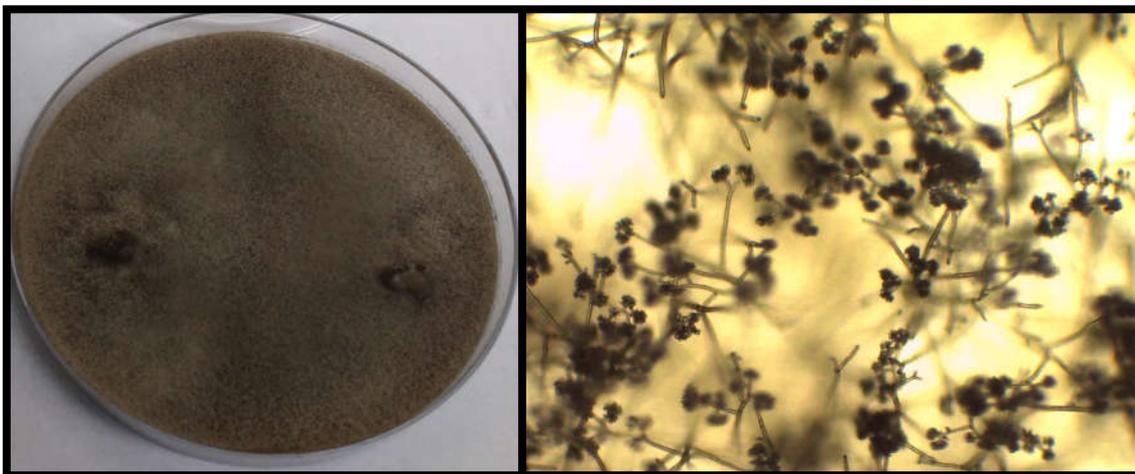


Figura 15 – Imagem macro e microscópica de *B. cinerea*.

FONTE: Imagens cedidas por Gesiane da Silva Lima

A habilidade de *B. cinerea* para infectar diversas espécies de plantas em diferentes condições ambientais, sua grande adaptabilidade e resistência a alguns fungicidas comerciais, assim como sua capacidade de produzir estruturas

reprodutivas que sobrevivem por anos, e fazem deste fungo um dos principais patógenos a nível mundial e dificultam sua erradicação (WILLIAMSON et al., 2007).

Para causar a necrose no hospedeiro, *B. cinerea* produz diferentes fitotoxinas, sendo que as duas principais famílias são a dos botridianos e das botcininas (MORAGA et al., 2011; MALMIERCA et al., 2016). Os botridianos são sesquiterpenos, dos quais o principal representante é o botridial (**50**). Além do botridial, já se tem conhecimento de diversos outros botridianos de *B. cinerea*, como os compostos di-hidrobotridial (**51**), 10-oxodi-hidrobotridial (**52**), β -O-metildi-hidrobotridialona (**53**), 4 β -acetoxi-9 β ,10 β ,15 α -tri-hidroxiprobotridial (**54**) (COLLADO et al., 1995); 1-epibotridial (**55**), 8,9-epibotridial (**56**), 1,8,9-epibotridial (**57**), botriendial (**58**), botrienalol (**59**), botridienal (**60**) (DURÁN-PATRÓN et al., 1999); e desidrobotridienol (**61**) (Figura 16, pág. 21) (DURÁN-PATRÓN et al., 2000).

A segunda família de fitotoxina de *B. cinerea*, as botcininas, são policetídeos, sendo os principais representantes encontrados neste fungo a botcinina A (**62**) e B (**63**) (TANI et al., 2005); botcinina E (**64**) e G (**65**) (TANI et al., 2006), e os ácidos botcínico (**66**) e botcínérico (**67**) (MASSAROLI et al., 2013). Outras toxinas encontradas em *B. cinerea* são policetídeos que derivam da rota biossintética das botcininas, as botrilactonas (**68** e **69**) (Figura 17, pág. 21) (COLLADO & VIAUD, 2016; MORAGA et al., 2016).

Os custos dos danos ocasionados por *B. cinerea* são muito difíceis de serem estimados, devido à ampla quantidade de plantas que este fungo pode atacar. Apesar do êxito no uso de agentes de controle biológico, como fungos do gênero *Trichoderma* (VOS et al., 2015) e *Gliocladium* (VAN DELM et al., 2015), em alguns cultivos a aplicação de fungicidas segue sendo o método mais comum para o controle de *B. cinerea*. Entretanto, a grande adaptabilidade desta espécie de fungo aos fungicidas comerciais tornam necessária uma contínua mudança dos mesmos e um aumento considerável da dose (MOSER et al., 2008; LEROCH et al., 2011).

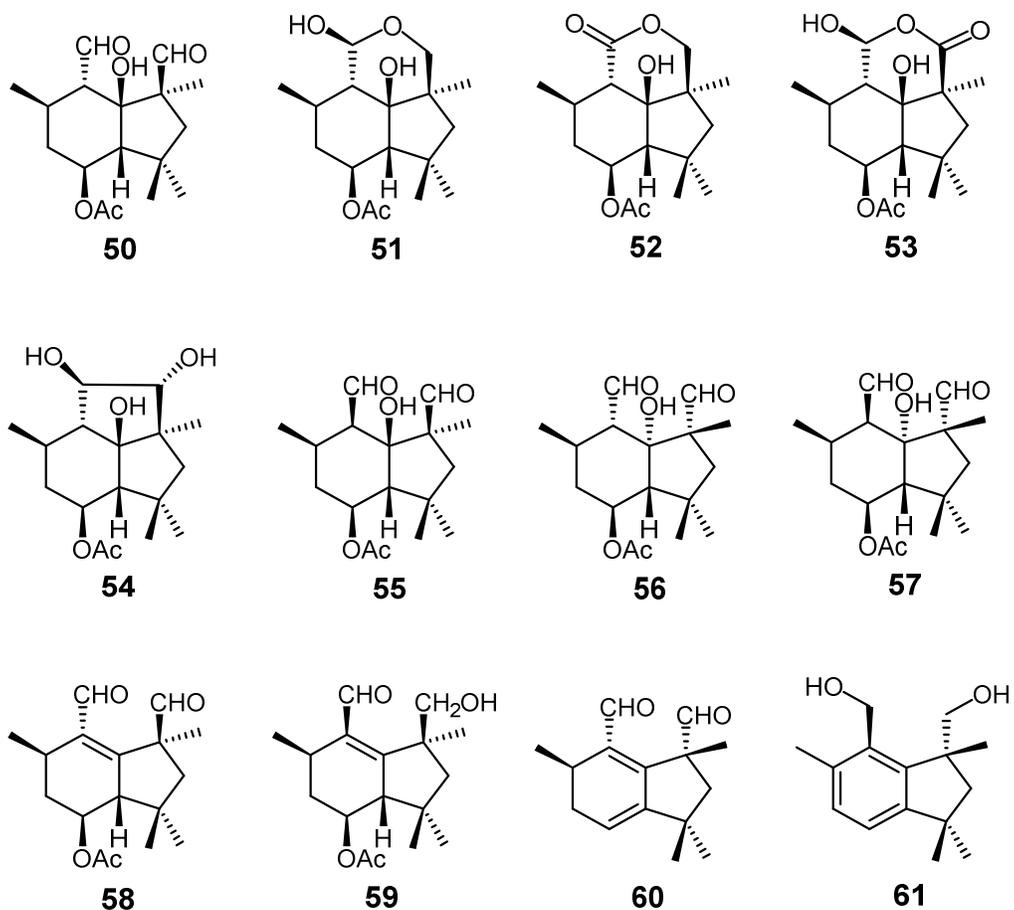


Figura 16 – Estrutura química das fitotoxinas botridianas isoladas de *B. cinerea*.

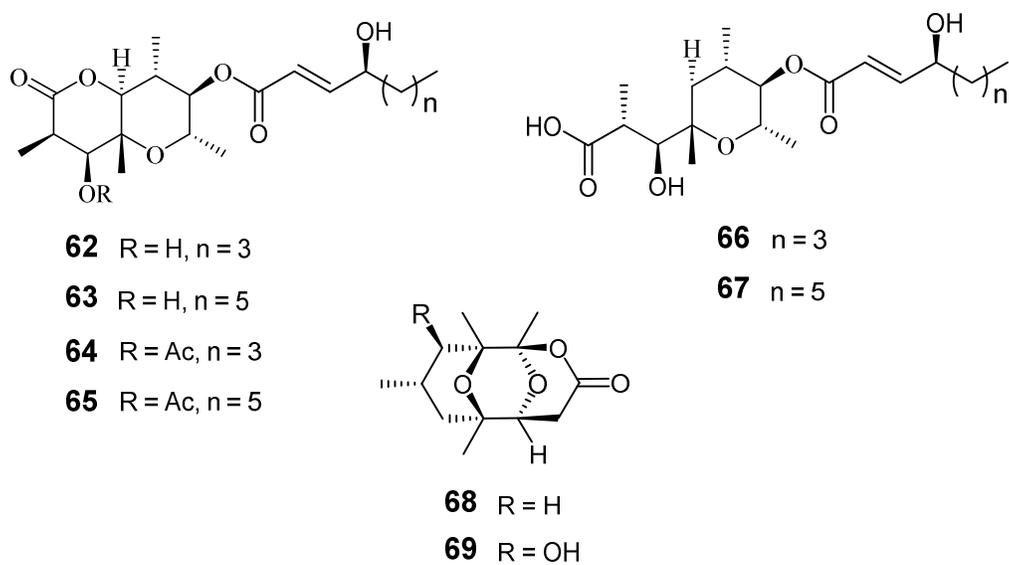


Figura 17 – Estrutura química de fitotoxinas da família das botcininas e botrilactonas.

Apesar de o fungo *B. cinerea* ser um patógeno responsável por grandes perdas econômicas, devido à sua distribuição geográfica e à quantidade de plantas que pode infectar, em determinadas ocasiões, pode-se tornar muito benéfico. Sob condições climáticas específicas, *B. cinerea* pode causar a podridão nobre em cachos de uvas, que são utilizados para a produção de vinhos doces de alto valor agregado, como os *Sauternes* da França e os *Tokaj* da Hungria. No entanto, o impacto global do *B. cinerea* ainda é negativo, mesmo na indústria do vinho (ELAD et al., 2007).

Além das toxinas produzidas por *B. cinerea*, este fungo é capaz de produzir diversos outros metabólitos secundários como sesquiterpenos eremofilenóis. Em um trabalho recente, Pinedo e colaboradores (2016) relataram o isolamento de dez eremofilenóis de *B. cinerea* (**70-79**) (Figura 18) a partir da fermentação em meio de cultura enriquecido com cobre. Nesse trabalho, os autores comprovaram que esses compostos produzidos pelo fungo são responsáveis pela sua esporulação visto que, quando adicionados ao meio de cultura, o fungo esporulou mais rapidamente do que na ausência desses compostos (PINEDO et al., 2016).

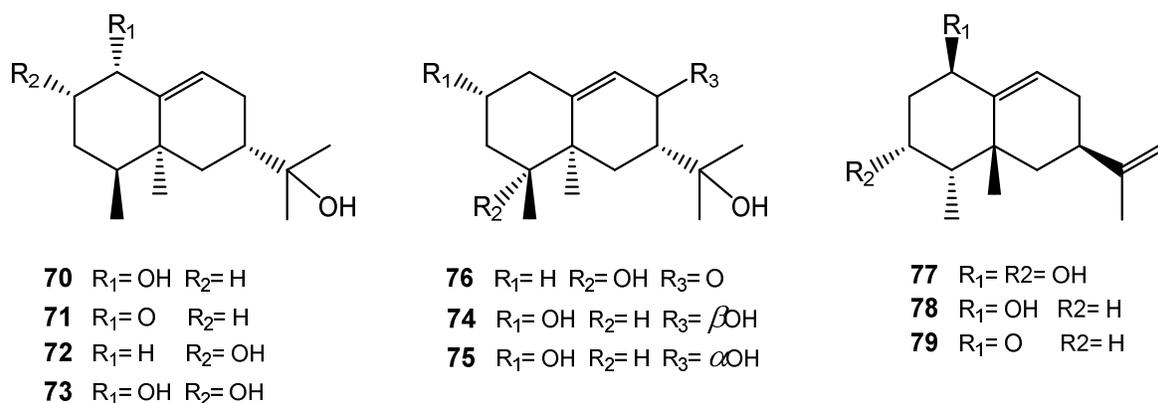


Figura 18 – Eremofilenóis isolados de *B. cinerea*.

Outros metabólitos secundários importantes produzidos por *B. cinerea* são o sesquiterpeno ácido abscísico (**80**) (Figura 19, pág. 23) e seus derivados, hormônios vegetais que atuam no controle do crescimento e desenvolvimento das plantas, bem como são sinalizadores de estresses

ambientais (SIEWERS et al., 2006; STEC et al., 2016). Mesmo sendo isolado, principalmente, de plantas, o ácido abscísico pode ser isolado de diferentes espécies de fungos patogênicos de plantas, como os do gênero *Cercospora*, *Ceratocystis*, *Fusarium* e *Rhizoctonia* (CAO et al., 2011).

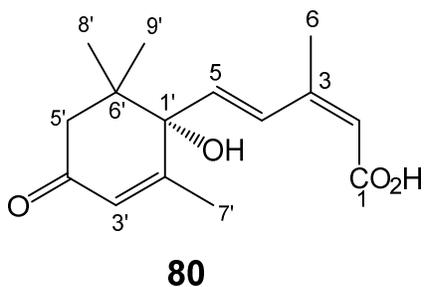


Figura 19 – Estrutura química do ácido abscísico (**80**).

2. Objetivos

2.1. Objetivos gerais

Realizar a biotransformação do ácido traquilobânico (**81**) com seis espécies de fungos de solo previamente estudadas no Laboratório de Biotecnologia e Bioensaios - UFMG. Identificar, isolar e elucidar por técnicas espectroscópicas os produtos de biotransformação. Este trabalho também teve como objetivo estudar o papel do gene *bcbot4* na produção de metabólitos secundários crípticos pelo fungo *B. cinerea*, bem como entender o papel dos genes *bcaba1-4* na biossíntese do ácido abscísico (**80**).

2.2. Objetivos específicos

- Selecionar seis espécies de fungos de solos a partir da coleção de fungos do Laboratório de Biotecnologia e Bioensaios – UFMG;
- Realizar a biotransformação do ácido traquilobânico (**81**) pelas espécies de fungos selecionadas, assim como o isolamento e determinação estrutural dos produtos obtidos;
- Avaliar o potencial biológico das substâncias obtidas para inibir a acetilcolinesterase, enzima relacionada ao Mal de Alzheimer;
- Estudar o metabolismo secundário do mutante nulo $\Delta bcbot4$ de *B. cinerea*;
- Estudar os intermediários biossintéticos do ácido abscísico por meio do estudo dos metabólitos secundários dos mutantes nulos $\Delta bcaba1-4$.

3. Biotransformação do ácido traquilobânico por fungos de solos

3.1. Introdução

Os diterpenos compõem uma classe de produtos naturais, na qual podem ser encontrados compostos com diversas atividades biológicas (TAKAHASHI et al., 2014). Este é o caso dos diterpenos traquilobânicos, que podem ser encontrados em plantas do gênero *Xylopi*a (TAKAHASHI et al., 2001; DOS SANTOS et al., 2013), *Helianthus* (PYREK, 1970; MITSCHER et al., 1983; ALFATAFTA & MULLIN, 1992), *Croton* (BACCELLI et al., 2007; UCHÔA et al., 2013), entre outras (LEONG & HARRISON, 1997; ZGODA-POLS et al., 2002). A biossíntese do ácido traquilobânico ocorre através da formação do pirofosfato de geranilgeranila (Figura 14, pág. 15), cuja ciclização origina o pirofosfato de copalila que, por meio de reações intramoleculares, origina o cátion pimarenila (precursor dos diterpenos pimarânicos). Este, por sua vez, passa por outra reação intramolecular, formando o cátion beieranila (precursor dos diterpenos beierânicos), o qual sofre um rearranjo com perda enzimática de H⁺ para formar o esqueleto traquilobânico (Figura 20, pág.26) (DEWICK, 2009).

O baixo número de relatos na literatura, a grande distribuição na natureza (TAKAHASHI et al., 2001, BACCELLI et al., 2007, DOS SANTOS et al., 2013, UCHÔA et al., 2013) e a possibilidade de rearranjos, fazem com que o ácido traquilobânico seja um alvo muito interessante para pesquisa. A literatura relata hidroxilações em diterpenos traquilobânicos em diferentes posições. A biotransformação do ácido traquilobânico (**81**) por *Rhizopus stolonifer*, com 20 dias de crescimento em temperatura ambiente e a 150 rpm de agitação, levou à formação dos produtos **82** e **83**, com hidroxilações nas posições 7 β e 17, respectivamente (Figura 21, pág. 26) (SILVA et al., 2002). Entretanto, o 18,19-di-hidroxitraquilobano (**84**), que possui duas hidroxilas, quando submetido a biotransformação por *R. stolonifer*, com 21 dias de crescimento em temperatura ambiente e a 150 rpm de agitação, levou à formação de um produto diferente, hidroxilado na posição 11 β (Figura 21) (VASCONCELOS et al., 2015). A

hidroxilação em carbonos diferentes, realizada pelo mesmo fungo de estudo, ocorre devido às seletividades das enzimas.

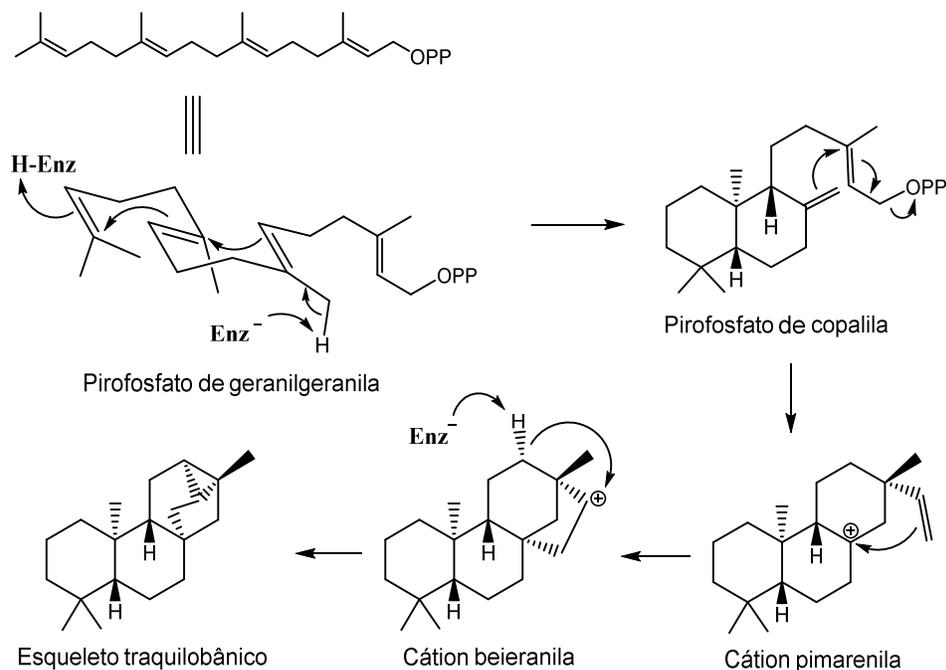


Figura 20 – Rota biossintética para formação dos diterpenos traquilobânicos

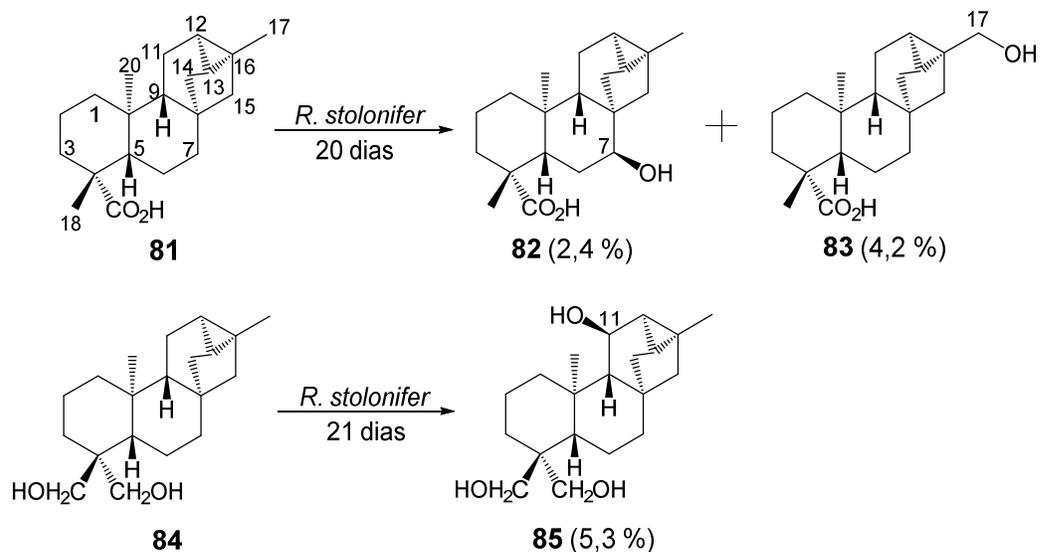


Figura 21 – Hidroxilações regio- e estereosseletivas catalisadas por *R. stolonifer* nos diterpenos traquilobânicos **81** e **84**.

A hidroxilação do ácido traquiloban-18-oico (**86**) por *Rhizopus arrhizus*, realizada sob agitação de 200 rpm em temperatura ambiente por 14 dias,

levou à formação de dois produtos de hidroxilação (**87** e **88**), nas posições 1 α e 17, respectivamente (Figura 22) (LEVERRIER et al., 2010). A hidroxilação no carbono 1 não havia sido observada por biotransformação com *R. stolonifer*, entretanto mesmo com a diferença de substrato (o composto **81** possui um carbono carboxílico em C-19, e o composto **86** em C-18), a hidroxilação no carbono 17 foi relatada para as duas espécies de *Rhizopus* estudadas.

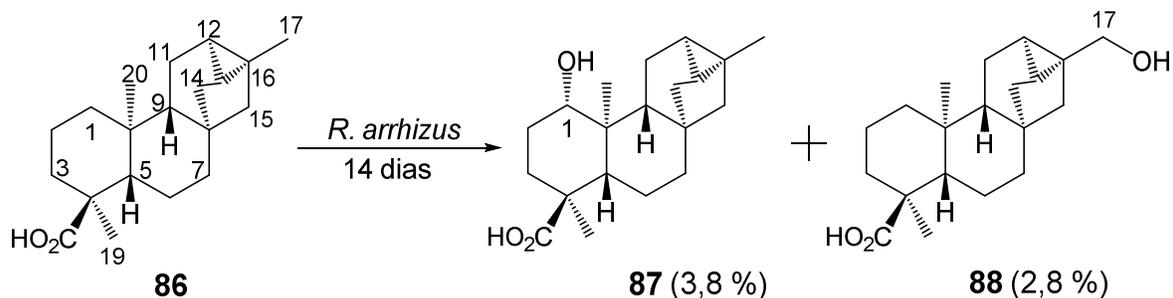


Figura 22 – Hidroxilações regio- e estereosseletivas do diterpeno **86** por *R. arrhizus*.

Outro fungo que se mostrou capaz de realizar biotransformação de diterpenos traquilobânicos foi o *G. fujikuroi*. A biotransformação do acetato de traquinol (**89**) ocorreu com agitação na temperatura ambiente por 6 dias, produzindo apenas um produto hidroxilado no carbono 19 (**90**) (Figura 23) (FRAGA et al., 2012).

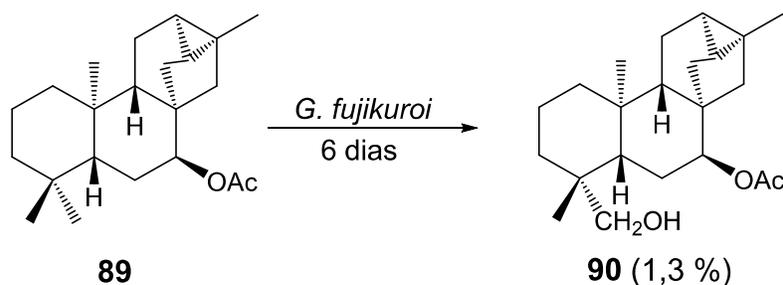


Figura 23 – Hidroxilação regioseletiva do diterpeno **89** por *G. fujikuroi*.

Biotransformações de diterpenos traquilobânicos também podem levar a rearranjos estruturais. O principal deles conduz a diterpenos da classe dos cauranos, como na biotransformação de **81** formando **91** e **92** como produtos de

rearranjo (SILVA et al., 2002); e na biotransformação do **84**, formando outros dois produtos de rearranjos (**93** e **94**) (VASCONCELOS et al., 2015). Em ambos os casos, as biotransformações foram realizadas pelo fungo *R. stolonifer* (Figura 24).

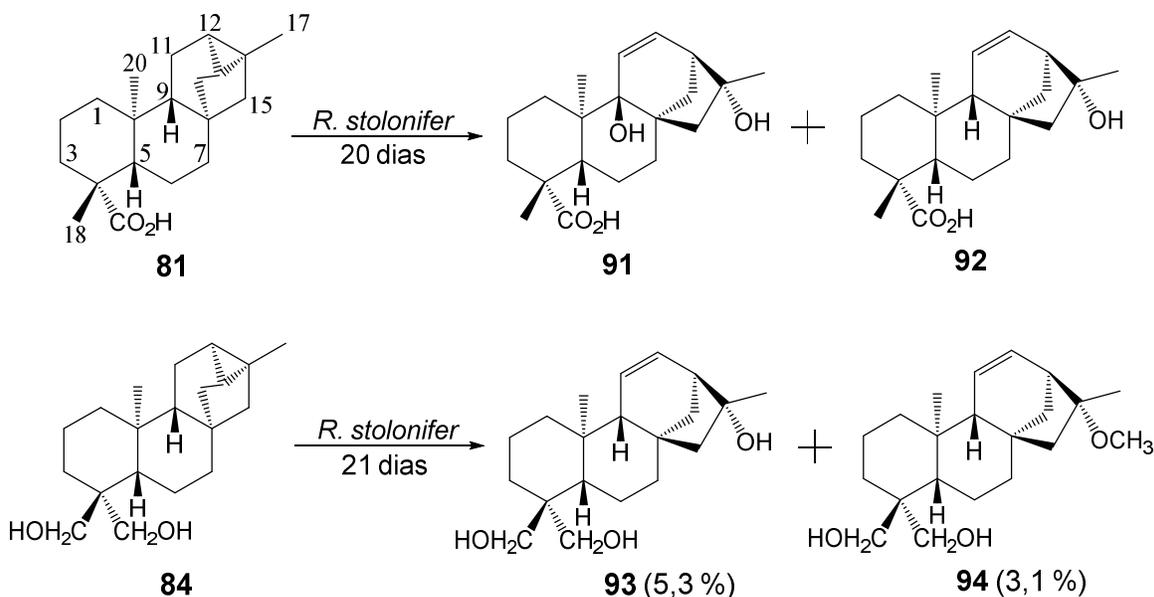


Figura 24 – Biotransformações dos traquilobanos **81** e **84** com rearranjo para produtos de esqueleto caurânicos (**91-94**).

Os fungos da ordem Mucorales são fungos saprófitas e oportunistas amplamente distribuídos na natureza, sendo frequentemente encontrados no solo, ar e detritos vegetais e animais. Algumas espécies desta ordem também são conhecidos por serem causadores da patogenicidade mucormicose (ALEXOPOULOS et al., 1996; SINGH et al., 2016), doença fúngica que afeta severamente pacientes imunocomprometidos e com diabetes descontrolado, entre outros (ALANIO et al., 2015). Ao mesmo tempo que o fungo causa a infecção no hospedeiro humano, necessita adaptar-se, sobrevivendo a altas temperaturas, baixas concentrações de oxigênio e, principalmente, à falta de nutrientes. As altas taxas de crescimento e termotolerância dos fungos da ordem Mucorales são responsáveis pela adaptação desses ao corpo humano e a diferentes ambientes (SINGH et al., 2016).

Além das características citadas anteriormente, os fungos dessa ordem possuem modesta produção de metabólitos secundários e rico sistema

enzimático, que pode ser usado em diversas aplicações como em biotransformações e biocatálise (QUINTANA et al., 2013; SILVA et al., 2013), produção de enzimas celulolíticas, lipolíticas e proteolíticas (TAKÓ et al., 2015), biofilmes (SINGH et al., 2011) e lipídeos (BELLOU et al., 2012). Devido a estas características, entre os seis fungos usados para a biotransformação do ácido traquilobânico, foram incluídas as espécies *M. plumbeus* e *S. racemosum*, da ordem Mucorales. Além destes, foram usados *A. tubingensis*, *F. proliferatum*, *P. lilacinus* e *P. minioluteum*, os quais foram escolhidos por apresentarem resultados promissores em trabalhos realizados pelo grupo de pesquisa. *A. tubingensis* se mostrou um ótimo agente para biorremediação de compostos orgânicos (LYRA, 2016); *P. lilacinus* se mostrou capaz de sintetizar substâncias com pronunciada atividade inibidora de acetilcolinesterase (TELES & TAKAHASHI, 2013), *F. proliferatum* foi hábil em hidroxilar carbonos não ativados de diterpenos (ROCHA et al., 2010); e *P. minioluteum* forneceu produtos de rearranjo e de hidroxilação de sesquiterpenos (DE SOUZA et al., 2012).

3.2. Métodos experimentais

3.2.1. Reagentes e materiais

Cromatografia em camada delgada: Placas de sílica gel Merck com indicador fluorescente.

Cromatografia em coluna: Sílica gel 70-230 Mesh e Sílica gel 230-400 Mesh.

Solventes: Solventes PA Merck®, Synth, Vetex, Reagen e outros; solventes deuterados Merck® e Aldrich® (98,0 – 99,9 %) para a obtenção dos espectros de RMN.

Revelador vanilina para CCD: Solução de ácido sulfúrico, etanol 96% e vanilina, em proporção 4:29:2.

Meios de cultura: BDA (Batata inglesa, dextrose e ágar) da Himedia®; meio complexo: FeSO₄·7H₂O (0,01 g/L), MgSO₄·7H₂O (0,5 g/L), KCl (0,5 g/L), K₂HPO₄

(1 g/L), NaNO₃ (3 g/L), sacarose (20 g/L) e extrato de levedura (10 g/L) em água destilada.

Reagentes para bioensaio da AChE: 5',5-ditio-bis-(2-nitrobenzoato) ($\leq 98,0 \%$), acetilcolinesterase de *Electrophorus electricus* (≤ 1000 U/mg de proteína) e iodeto de acetiltiocolina ($\leq 99,0 \%$) da Sigma Aldrich®.

3.2.2. Equipamentos

Espectrômetros de RMN: AVANCE DPX 200; AVANCE DRX 400

Microscópio ótico Olympus CX40

Espectrômetro de Infravermelho: Thermo Scientific Nicolet operando na região de 4000 a 600 cm⁻¹

Espectrômetro de massas de alta resolução: Shimadzu IT-TOF com ionização electrospray

Leitor de microplaca de 96 poços Biotec ELX 800

Evaporadores rotativos: Evaporador rotatório IKA RV10 e rotaevaporador Buchi R-114

Câmaras de fluxo laminar: Veco e Biohazard

Autoclaves verticais: Phoenix e Fanen 415

Mesas incubadoras rotativas: Tecnal TE 420, Tecnal TE 421 e IKA KS 4000i control

Balança analítica Shimadzu AUW220D

Balança semianalítica Shimadzu BL320H

Estufas de secagem: Quimis e Fanem 002 CB

3.2.3. Metodologia

3.2.3.1. Identificação, cultivo e armazenamento dos fungos

Os fungos de solo utilizados nesse trabalho, *P. lilacinus*, *F. proliferatum*, *P. minioluteum*, *A. tubingensis*, *M. plumbeus* e *S. racemosum*,

pertencem à coleção de fungos do Laboratório de Biotecnologia e Bioensaios (Departamento de Química – UFMG) e são mantidos preservados no método de Castellane. Os fungos *P. lilacinus*, *P. minioluteum*, e *S. racemosum* foram isolados de solo na cidade de Santana do Riacho – MG, enquanto *A. tubingensis* foi isolado de areia de praia na cidade de Vitória – ES. Os fungos *F. proliferatum* e *M. plumbeus* foram doados pela Universidade Federal de Lavras (UFLA) e Fundação André Toselo, respectivamente. Todos os fungos foram cultivados em tubos contendo meio sólido BDA e armazenados em temperatura ambiente. Posteriormente, realizaram-se microcultivos com todas as espécies fúngicas estudadas para analisar a pureza das cepas em microscopia óptica. O microcultivo foi realizado em placas de Petri contendo uma lâmina de microscópio suspensa na placa, a fim de não entrar em contato com a água depositada no fundo, utilizada para garantir a presença de umidade durante o experimento. Sobre a lâmina foi adicionado um pequeno fragmento de aproximadamente 1 cm² de meio sólido BDA e sobre este meio, uma lamínula de microscópio. O fungo foi inoculado no fragmento do meio de cultura e, após 48 horas, a lâmina e lamínula foram observadas em microscópio óptico a fim de visualizar as unidades reprodutivas do fungo. Na Figura 25 pode-se observar como foi realizado o microcultivo.

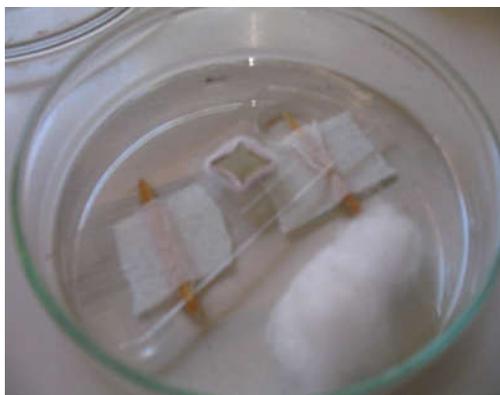


Figura 25 – Exemplo de microcultivo das espécies estudadas.

Após certificar a pureza dos fungos, estes foram cultivados em meio BDA para a realização dos experimentos de biotransformação e repicados periodicamente para manter as células sempre viáveis.

3.2.3.2. Caracterização do substrato

O diterpeno ácido traquilobânico (**81**) foi isolado de *Xylopiia sericea* segundo metodologia descrita por Takahashi et al. (2001) e sua estrutura foi confirmada por RMN de ^1H e de ^{13}C .

3.2.3.3. Biotransformação do ácido traquilobânico em escala reduzida pelos fungos *A. tubingensis*, *F. proliferatum*, *P. lilacinus*, *P. minioluteum*, *M. plumbeus* e *S. racemosum*

Foram realizadas biotransformações do ácido traquilobânico com os fungos *A. tubingensis*, *F. proliferatum*, *P. lilacinus*, *P. minioluteum*, *M. plumbeus* e *S. racemosum*, cultivados em meio complexo (item 3.2.1, pág. 30). Foram utilizados somente cinco erlenmeyers de 250 mL contendo 75 mL de meio de cultura para cada fungo e 8 mg/100 mL de meio de **81**, a fim de se verificar a capacidade de biotransformação antes de realizar experimentos em escala ampliada. Os fungos *A. tubingensis*, *F. proliferatum*, *P. lilacinus* e *P. minioluteum* foram mantidos em crescimento por 14 dias, enquanto que os fungos *M. plumbeus* e *S. racemosum* por somente 9 dias, devido ao fato desses fungos terem um metabolismo mais acelerado, ambos com agitação à 120 rpm e temperatura de 28 °C (KARAMI & ZAMANI, 2013; MANGARAJ et al., 2014). No final dos experimentos, foram realizados quatro extrações com acetato de etila para cada fungo, gerando separadamente os extratos da fase aquosa e do micélio. Todos os extratos foram analisados por cromatografia em camada delgada (CCD) e por RMN de ^1H . Por RMN de ^1H não se verificou a presença de produto de biotransformação em nenhum dos extratos, porém por CCD, o fungo *A. tubingensis*, *M. plumbeus* e *S. racemosum* se mostraram promissores e seus cultivos foram realizados em escala ampliada.

3.2.3.4. Biotransformação do ácido traquilobânico por *A. tubingensis*

Primeiramente o fungo foi cultivado em meio de cultivo BDA em tubo inclinado por sete dias. Após este período, foi preparada uma suspensão com os esporos, que foi distribuída homoganeamente nos frascos utilizados para os experimentos de biotransformação. A biotransformação do ácido traquilobânico por *A. tubingensis* foi repetida com 36 erlenmeyers de 500 mL contendo 150 mL de meio de cultura complexo, ao qual foi adicionado ácido traquilobânico (8 mg/100 mL de meio) em acetato de etila (13 mL/L de meio). Após 14 dias de crescimento com o substrato, o micélio foi filtrado e o meio líquido foi particionado quatro vezes com 250 mL/L de acetato de etila. Ao micélio foi adicionado acetato de etila e os frascos foram armazenados por 48 horas para extração dos constituintes. Os solventes foram secados em evaporador rotatório e os extratos ATTA_A (do caldo) e ATTA_B (do micélio) foram obtidos. Os extratos foram reunidos (727 mg) e purificados em coluna de sílica.

3.2.3.5. Biotransformação do ácido traquilobânico pelo fungo *M. plumbeus*

Inicialmente, o fungo foi cultivado em meio BDA inclinado por sete dias. Após este período, foi preparada uma suspensão com os esporos, que foi distribuída homoganeamente em 58 erlenmeyers contendo um total de 7,2 L de meio de cultura complexo contendo $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,01 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5 g/L), KCl (0,5 g/L), K_2HPO_4 (1 g/L), NaNO_3 (3 g/L), sacarose (20 g/L) e extrato de levedura (10 g/L) em água destilada (NUNES et al., 2013), previamente autoclavado. Após 48 h de crescimento fúngico à 120 rpm e temperatura ambiente, foi adicionado o ácido traquilobânico (8 mg/100 mL de meio) em acetato de etila (13 mL/L de meio). O experimento foi mantido sob agitação por mais nove dias. Após o período de incubação, o micélio foi removido por filtração à vácuo e a fase líquida foi particionada quatro vezes com 250 mL/L de acetato de etila. O

solvente foi removido em evaporador rotatório e o extrato obtido foi pesado (859 mg) e armazenado.

O extrato resultante foi incorporado em sílica e submetido à cromatografia em coluna, em modo gradiente, iniciando-se a eluição com hexano/acetona 15%, até acetona 100%, e posteriormente com mistura de acetona/metanol, até metanol 100%. O produto **95** (5 mg e 0,9 % de rendimento) foi eluído com hexano/acetona 15% e o produto **96** (25 mg e 4,3 % de rendimento) foi eluído com acetona 100%.

Ácido 7 β -hidroxitraquiloban-19-oico (**95**): sólido branco; P.F. 219-227 °C; $[\alpha]^{20}_D$ -151,38 (c 1, piridina); IV (ATR) v_{max}/cm^{-1} 3401, 3000, 2905, 1659, 1016; HRMS (ESI): m/z 341,2057 $[M+Na]^+$ (calculado para $C_{20}H_{30}O_3$ $[M+Na]^+$: 341,2093).

Traquiloban-19-oato de β -D-glicopiranosila (**96**): sólido branco; P.F. 155-168 °C; $[\alpha]^{20}_D$ 333,33 (c 1, metanol); IV (ATR) v_{max}/cm^{-1} 3394, 1657, 1022, 998; HRMS (ESI): m/z 487,2775 $[M+Na]^+$ (calculado para $C_{26}H_{40}O_7$ $[M+Na]^+$: 487,2672).

3.2.3.6. Biotransformação do ácido traquilobânico pelo fungo *S. racemosum*

O fungo foi cultivado em meio sólido BDA. Após sete dias, foi preparada uma suspensão de esporos, distribuída homoganeamente em 36 erlenmeyers contendo um total de 5,4 L de meio de cultura complexo (item 3.2.1, pág. 30). O fungo cresceu durante 24 h à 120 rpm em temperatura ambiente, sendo, então, adicionado o ácido traquilobânico (8 mg/100 mL de meio) em acetato de etila (13 mL/L de meio). O experimento foi mantido sob agitação por mais nove dias nas mesmas condições. O micélio foi removido por filtração à vácuo e a fase líquida foi particionada quatro vezes com 250 mL/L de acetato de etila. Ao micélio foi adicionado acetato de etila e os frascos foram armazenados por 48 horas para extração dos constituintes. O solvente foi removido em evaporador rotatório e os extratos SRTA_A (fase líquida) e SRTA_B (micélio)

foram obtidos. Após uma análise em CCD dos dois extratos foram combinados devido a sua similaridade.

O extrato resultante foi pesado (672 mg), incorporado em sílica e submetido à purificação por cromatografia em coluna. A eluição iniciou-se com hexano/acetona 15%. Após a retirada de 40 frações, a polaridade da fase móvel foi aumentada de forma gradiente com acetona até acetona 100%, e depois, foi adicionado metanol em acetona, até metanol 100%.

As frações SRТА29 (**97**) (13 mg e 3,0 % de rendimento), SRТА33 (**98**) (29 mg e 6,7 % de rendimento) a SRТА39 (**99**) (16 mg e 3,7 % de rendimento) eluídas com fase móvel de hexano/acetona 60% foram submetidas a análise por RMN de ^1H e de ^{13}C e indicaram ser produtos de biotransformação.

Ácido 17-hidroxitraquiloban-19-oico (**97**): Sólido branco; P.F. 126-128 °C; $[\alpha]^{20}_{\text{D}}$ 77,59 (c 1, Acetona); IV (KBr) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 3427, 3184, 2926, 2856, 1705, 1464, 1234, 1013; EMAR (ESI): m/z 317,2121 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{29}\text{O}_3$ $[\text{M}-\text{H}]^-$: 317,2117).

Ácido traquiloban-17,19-dioico (**98**): Sólido branco; P.F. 268-270 °C; $[\alpha]^{20}_{\text{D}}$ -33,48 (c 1, MeOH); IV (KBr) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 3433, 2930, 1686, 1464, 1435, 1262, 1230; EMAR (ESI): m/z 331,1825 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_3$ $[\text{M}-\text{H}]^-$: 331,1909).

Ácido *ent*-16 β ,17-di-hidroxicaur-11-en-19-oico (**99**): Sólido branco; P.F. 278-280 °C; $[\alpha]^{20}_{\text{D}}$ -288,46 (c 1, MeOH); IV (KBr) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 3420, 2947, 2843, 1696, 1228, 1172; EMAR (ESI): m/z 333,2041 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}_4$: 333,2066).

3.2.3.7. Bioensaio de inibição da acetilcolinesterase (AChE)

Foi realizado o bioensaio de inibição da AChE com os produtos de biotransformação **95**, **96**, **97**, **98**, **99**, com o ácido traquilobânico (**81**) e com a galantamina, usada como controle positivo para validação do experimento. O ensaio foi realizado em microplacas de Elisa utilizando a metodologia

espectrofotométrica de Ellman (ELLMAN et al., 1961). Utilizaram-se 25 µL de iodeto de acetilcolina (15 mM), 125 µL de reagente de Ellman ou ácido 5',5-ditio-bis-(2-nitrobenzoato) (3 mM) e 50 µL do tampão Tris/HCl (50 mM) pH 8, contendo 0,1 % albumina sérica bovina e 25 µL de solução de amostra (DMSO, 10 mg/mL). Os ensaios foram realizados em quintuplicata e a absorbância medida na faixa de 405 nm. Adicionaram-se aos poços 25 µL da solução de AChE (0,222 U/mL) e mediu-se a absorvância novamente. As porcentagens de inibição foram calculadas comparando as absorvâncias das amostras com a absorvância do branco, de acordo com a fórmula mostrada abaixo.

Inibição (%) = $100 - [(RS_{amostra} / RB_{controle}) * 100]$, onde

RS_{amostra} = razão entre a leitura com enzima e sem enzima da amostra

RB_{controle} = razão entre a leitura com enzima e sem enzima do branco.

3.3. Resultados e discussões

3.3.1. Caracterização dos fungos

Todos os fungos selecionados foram transferidos do tubo inclinado contendo ágar inclinado e transferidos para placas de Petri de microcultivo com meio sólido BDA, a fim de assegurar a pureza dos fungos, antes de iniciar os trabalhos. As características observadas são listadas a seguir.

3.3.1.1. *A. tubingensis*

Fungos do gênero *Aspergillus* são frequentemente isolados de diferentes ambientes e possuem uma grande variedade de espécies. O gênero *Aspergillus* pertence ao filo Ascomicota e à família Trichocomacea. O fungo *A. tubingensis* (Figura 26, pág. 37) apresentou coloração branca nos primeiros dias e aparência aveludada de coloração negra nos dias subsequentes, devido a formação dos conidióforos (hifas onde são originados os esporos, também chamados de conidiósporo ou conídio). *A. tubingensis* apresenta hifas septadas

com conidióforo simples, sem ramificação, o qual termina em uma vesícula, onde ficam inseridas as fiáldes (HYDE et al., 2016).

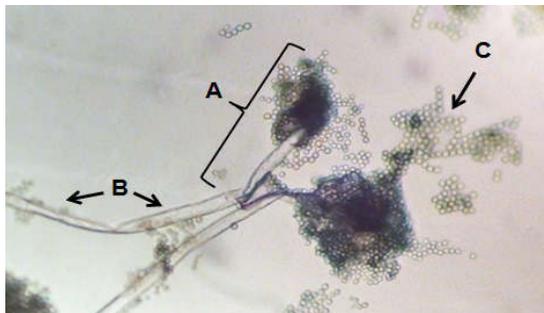


Figura 26 – Imagem de microscopia óptica (40x) de *Aspergillus* sp. (A) conidióforo ou conídio, (B) hifa, (C) conidiósporo ou esporo. FONTE: acervo de Gabriel Franco dos Santos

3.3.1.2. *P. minioluteum*

Fungos do gênero *Penicillium* são extremamente conhecidos por estarem entre os fungos mais encontrados na natureza, como também por ter sido, a partir desse gênero, isolado pela primeira vez a penicilina (KARDOS & DEMAIN, 2011). Outra aplicação muito comum do gênero é na produção de queijos. Fungos do gênero *Penicillium* pertencem ao filo Ascomicota, que são fungos filamentosos de hifa septada, e à família Trichocomaceae. Fungos desse gênero geralmente possuem coloração acinzentada em placas. Esses fungos apresentam conidióforos ramificados com fiáldes nas quais se encontram os conídios, porém sem a formação de vesícula (VISAGIE et al., 2014). *P. minioluteum* (Figura 27, pág. 38) é uma entre as muitas espécies do gênero.

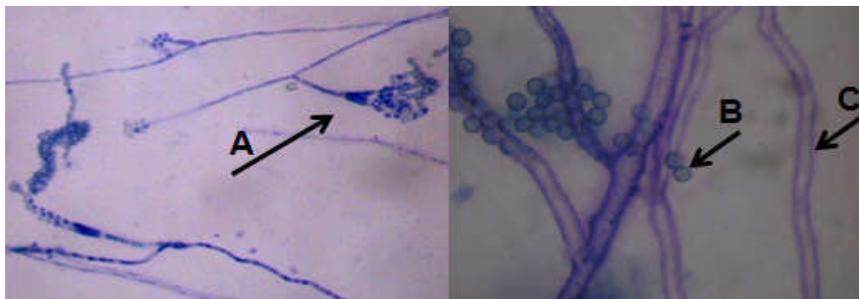


Figura 27 – Imagem de microscopia óptica (10x e 40x) de *P. minioluteum*. (A) conidióforo, (B) conidiósporo, (C) hifa. FONTE: acervo de Gabriel Franco dos Santos

3.3.1.3. *F. proliferatum*

O fungo *F. proliferatum* (Figura 28) pertence ao filo Ascomycota e à família Nectriaceae. Esse fungo possui micélio de coloração branca quando jovem e adulto. Fungos do gênero *Fusarium* são facilmente reconhecidos por apresentarem esporos em forma de meia-lua ou grão de arroz que podem ser visualizadas no microscópio (SECOR et al., 2014).

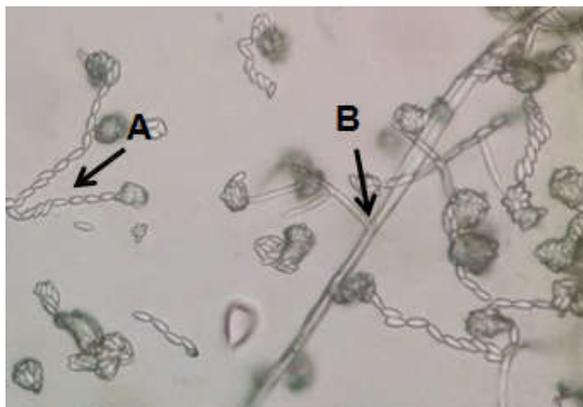


Figura 28 – Imagem de microscopia óptica (40x) de *F. proliferatum* (A) conidiósporos e (B) hifas. FONTE: acervo de Gabriel Franco dos Santos

3.3.1.4. *P. lilacinus*

Fungos do gênero *Paecilomyces* possuem características semelhantes às de espécies do gênero *Penicillium* por serem da mesma família. Esses fungos são frequentemente isolados de solos e costumam apresentar atividade contra nematoides. *P. lilacinus* (Figura 29) possui micélio branco quando jovem e lilás quando adulto, além de apresentar pequena coloração do meio. Esse fungo também possui as hifas septadas, presença de conidióforo ramificado e conidiósporos.

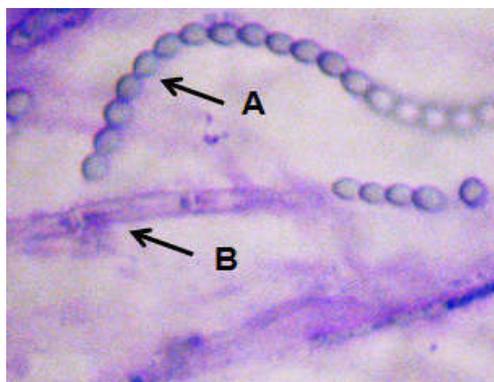


Figura 29 – Imagem de microscopia óptica do fungo *P.lilacinus*. (A) conidiósporos e (B) hifa. FONTE: acervo de Gabriel Franco dos Santos

3.3.1.5. *M. plumbeus*

O fungo *M. plumbeus* pertence à ordem Mucorales e à família Mucoraceae. *M. plumbeus* e demais fungos desse gênero, possuem crescimento rápido, rico sistema enzimático e são termotolerantes (KARAMI & ZAMANI, 2013). Esse fungo apresenta micélio abundante de coloração marrom-acinzentado, hifas cenocíticas (que não apresentam septos) e esporângios globulares com presença de columela (onde são formados os esporos). A hifa, na qual ocorrem as formações dos esporangiósoros (conídios para os Ascomicetos), nesse gênero possui o nome de esporangióforo (conidióforo para os Ascomicetos). Na Figura 30 (pág. 40) observa-se os esporangiósoros, hifas e columelas de *Mucor* sp.

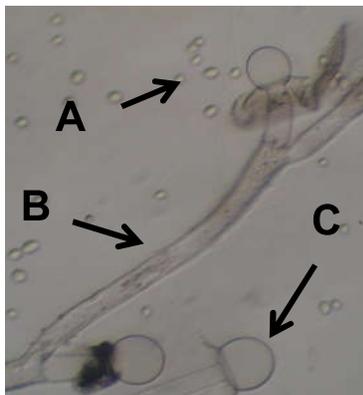


Figura 30 – Imagem de *Mucor* sp. (A) esporangiósporos ou esporos, (B) hifa e (C) columela. FONTE: acervo de Gabriel Franco dos Santos.

3.3.1.6. *S. racemosum*

O fungo *S. racemosum* (Figura 31) pertence à ordem Mucorales e à família Syncephalastraceae. É um fungo de crescimento rápido, e que possui rico sistema enzimático (MANGARAJ et al., 2014). Esse fungo também apresenta micélio abundante de coloração marrom-acinzentado, hifas cenocíticas e esporângios globulares com a presença de columela.

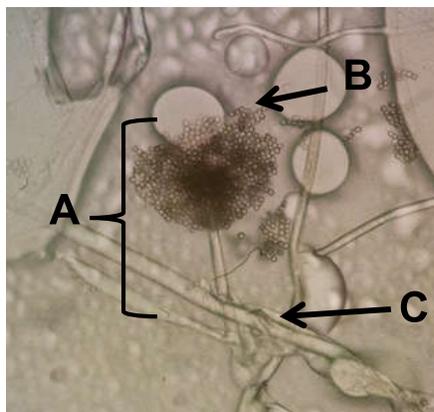


Figura 31 – Imagem de microscopia de *S. racemosum*. (A) esporangióforo, (B) esporangiósporos ou esporos, (C) hifa. FONTE: acervo de Gabriel Franco dos Santos.

3.3.2. Caracterização do ácido traquilobânico

O substrato foi submetido a uma recristalização em acetona/metanol 10% para garantir uma maior pureza, como também, submetido à análise por RMN de ^1H e de ^{13}C , e teve seu ponto de fusão determinado. A faixa de fusão da substância utilizada foi 142-146 °C, sendo o valor uma média de três leituras. Na literatura, os pontos de fusão encontrados para o ácido traquilobânico são variados e não apresentam concordância entre eles, sendo citado por Vieira (2010) o valor de 129-130 °C, por Pyrek (1970) o valor de 98-100 °C, por Leong e Harrison (1997) o valor de 125-127 °C, por Ngamrojnavanich e colaboradores (2003) o valor de 128-131 °C, por Silva e colaboradores (2002) o valor de 160-162 °C e por Mistcher e colaboradores (1983) o valor de 164-166 °C.

As análises por RMN de ^1H e de ^{13}C estão de acordo com o esperado para o ácido traquilobânico e condizem com os dados encontrados na literatura (SILVA et al., 2012). O espectro de RMN de ^1H (Figura 32) apresenta três sinais em δ 0,88, 1,13 e 1,21 ppm, referentes aos átomos de hidrogênio dos três carbonos metílicos (H-20, H-17 e H-18, respectivamente), além de um multiplete centrado em δ 0,55 ppm, referente ao hidrogênio H-12 do anel ciclopropânico do ácido traquilobânico (**81**).

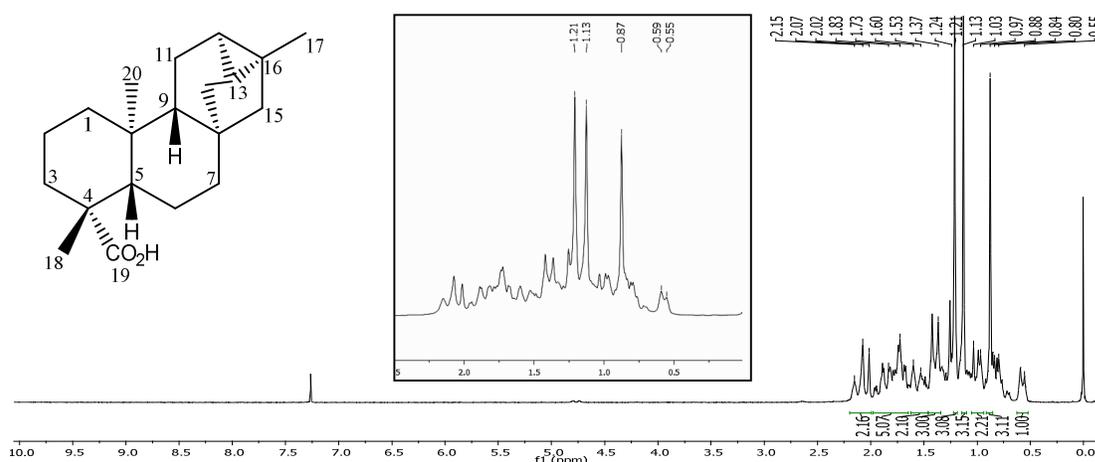


Figura 32 – Espectro de RMN de ^1H do ácido traquilobânico (**81**) (200 MHz, CDCl_3).

O espectro de RMN de ^{13}C do ácido traquilobânico (**81**) é apresentado na Figura 33, ressaltando-se um sinal em δ 185,0 ppm, do carbono carboxílico C-19.

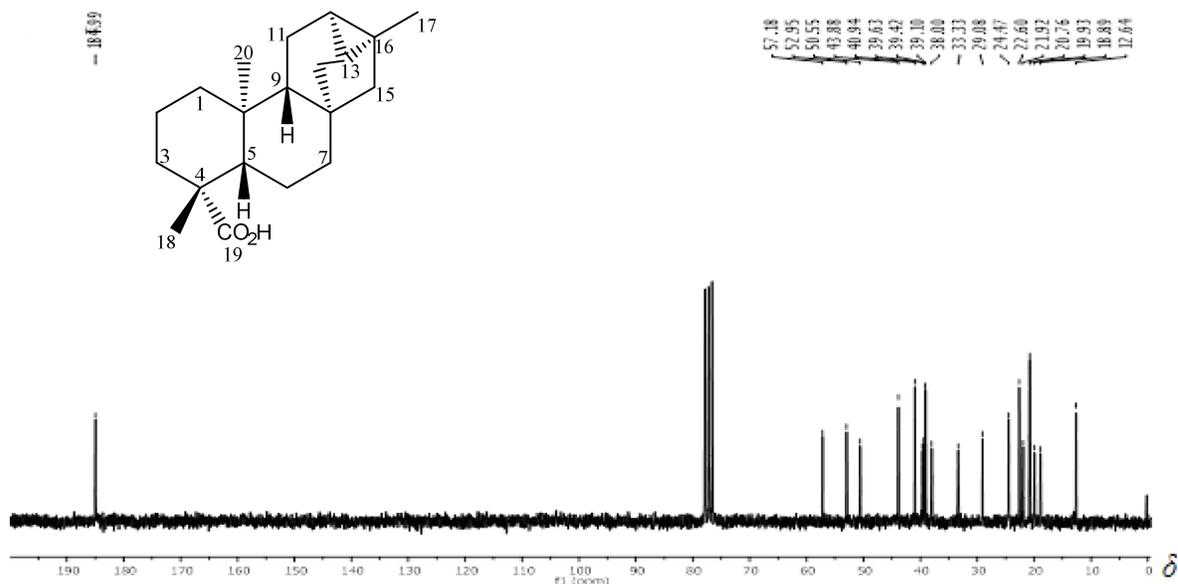


Figura 33 – Espectro de RMN de ^{13}C do ácido traquilobânico (**81**) (50 MHz, CDCl_3).

3.3.3. Biotransformação do ácido traquilobânico em escala reduzida.

Os experimentos de biotransformação do ácido traquilobânico (**81**) com os fungos *A. tubingensis*, *F. proliferatum*, *M. plumbeus*, *P. minioluteum*, *P. lilacinus* e *S. racemosum* foram realizados em escala reduzida com meio de cultura complexo. Todos os extratos resultantes foram analisados por CCD e RMN de ^1H . Entretanto, somente os dos fungos *A. tubingensis*, *M. plumbeus* e *S. racemosum* apresentaram, por CCD, novas manchas com possibilidade de serem produtos de biotransformação. A biotransformação realizada com o fungo *A. tubingensis*, que por CCD foram observados o aparecimento de novas manchas (Figura 34, pág 43), foi repetido em escala ampliada, como também, se repetiram os experimentos com *M. plumbeus* e *S. racemosum* (item 3.3.4 e 3.3.5, pág. 43 e 55). Entretanto, no caso da biotransformação de **81** por *A. tubingensis*, a

purificação dos seus extratos não levou ao isolamento de produtos de biotransformação.



Figura 34 – Imagem da CCD (Hexano/Acetona 20 %) do experimento de biotransformação do ácido traquilobânico por *A. tubingensis*. (A) meio + **81**, (B) meio + fungo, (C) meio + fungo + **81** (extração da fase aquosa), (D) meio + fungo + **81** (extração do micélio), (E) meio + fungo (micélio), (F) **81** padrão. O círculo vermelho indica a mancha de um possível produto.

3.3.4. Biotransformação do ácido traquilobânico (**81**) pelo fungo *M. plumbeus*

No experimento de biotransformação com *M. plumbeus*, o meio de cultura escolhido foi o meio complexo, baseado em dados de biotransformações da literatura (ASCARI et al., 2011; NUNES et al., 2013). Entretanto, optou-se por diminuir a disponibilidade de fonte de carbono, forçando o fungo a utilizar o substrato adicionado (o composto **81** poderia ser utilizado pelo fungo como fonte de carbonos em um meio de cultura pobre), além de se utilizar uma fonte de nitrogênio biológico, visando facilitar a interação entre o substrato e enzimas presentes no fungo. O tempo de cultivo também foi reduzido baseando-se em experimentos anteriores e na literatura, nos quais um fungo do gênero *Mucor* foi capaz de realizar uma biotransformação com 96 % de conversão em apenas 4 h de experimento (NUNES et al., 2013), já que fungos da ordem Mucorales

possuem metabolismo mais acelerado (GOMES et al., 2011, KARAMI & ZAMANI, 2013).

O extrato gerado a partir da biotransformação do ácido traquilobânico por *M. plumbeus* foi submetido à cromatografia em coluna com sílica gel (230-400 mesh), sendo isolados dois produtos de biotransformação denominados **95** e **96** (Figura 35).

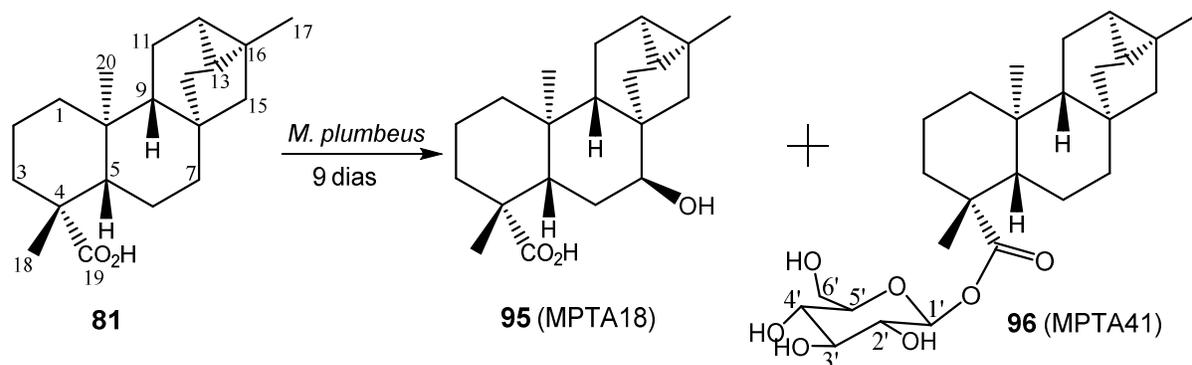


Figura 35 – Biotransformação do ácido traquilobânico (**81**) por *M. plumbeus*.

3.3.4.1. Identificação do ácido 7β-hidroxitraquiloban-19-oico (**95**)

O produto de biotransformação MPTA18, ácido 7β-hidroxitraquiloban-19-oico (**95**) (5 mg) foi isolado como um sólido (P.F.: 219-227 °C) amorfo de coloração branca. A substância apresentou-se pouco solúvel nos solventes hexano, acetona, acetato de etila, clorofórmio e metanol, mas é totalmente solúvel em piridina. A substância foi submetida à análise por RMN de 1D e 2D. No espectro de RMN de ¹H (Figura 36, pág. 45) observaram-se um multiplete centrado em δ 0,63 ppm, característico do hidrogênio H-12 do anel ciclopropânico do ácido traquilobânico; um tripleto em δ 3,87 ppm indicando uma hidroxilação do composto e sinais de hidrogênios metílicos em δ 1,22 ppm (H-17 e H-20) e δ 1,41 ppm (H-18). A partir da comparação do espectro de RMN de ¹³C (Figura 37, pág. 46) e o subespectro DEPT-135 (Figura 38. Pág, 46) do produto isolado com o espectro de RMN de ¹³C do ácido traquilobânico (**81**), pôde-se

perceber que a maioria dos sinais de carbono do material de partida apareceram no espectro do produto, com exceção de um sinal de carbono metilênico em δ 39,2 ppm, além do surgimento de um sinal de carbono carbinólico em δ 75,1 ppm, indicando que um grupo CH_2 foi hidroxilado.

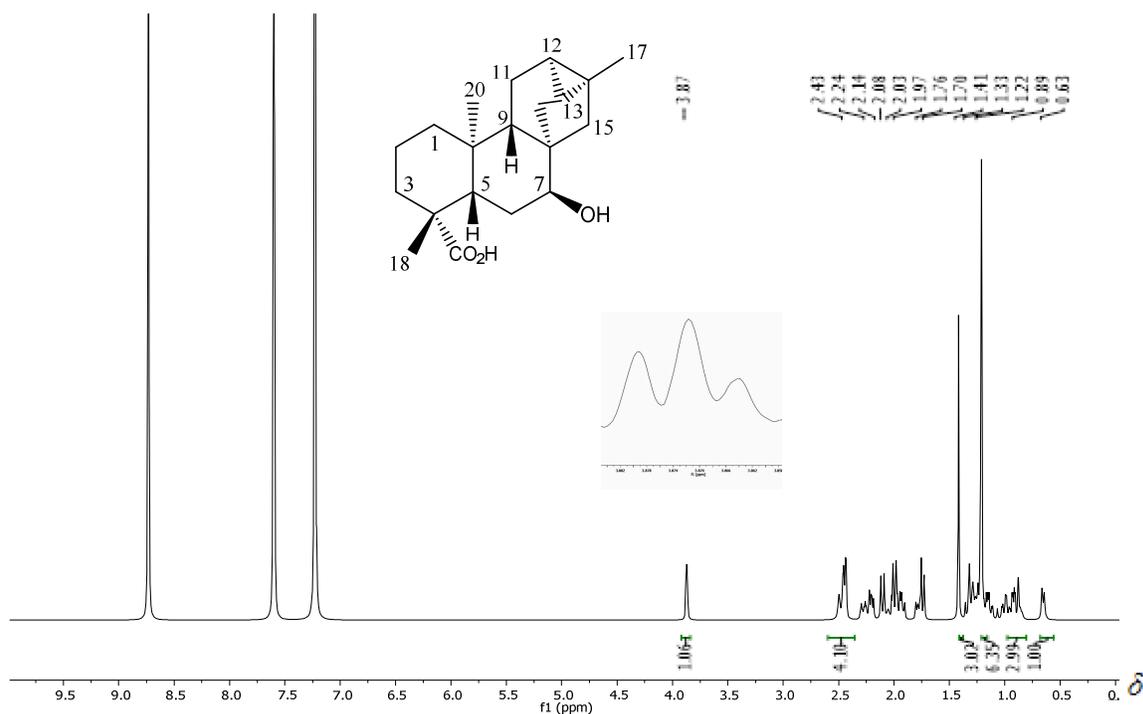


Figura 36 – Espectro de RMN de ^1H do 7 β -hidroxitraquiloban-19-oico (**95**) (400 MHz, piridina- d_5), e ampliação do sinal em 3,87 ppm com apodização em seno.

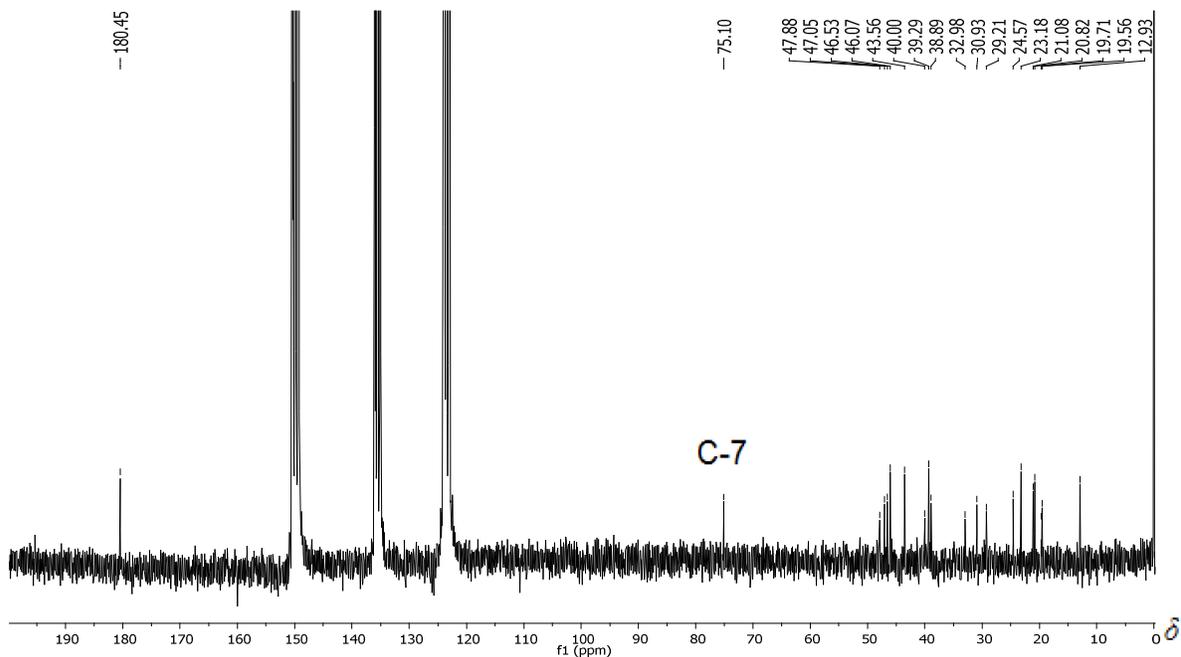


Figura 37 – Espectro de ^{13}C do 7β -hidroxitraquiloban-19-oico (**95**) (100 MHz, piridina- d_5).

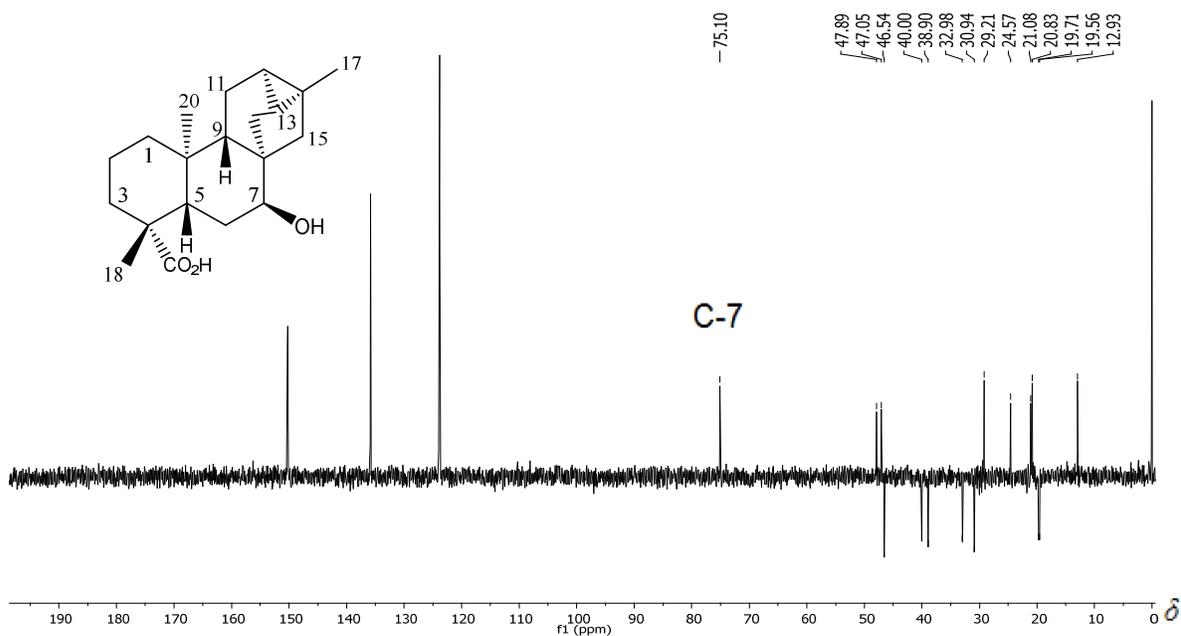


Figura 38 – Subespectro DEPT-135 do 7β -hidroxitraquiloban-19-oico (**95**) (100 MHz, piridina- d_5).

No mapa de contornos COSY (Figura 39, pág. 47), o sinal de hidrogênio H-7 (um tripleto) do carbono carbinólico correlaciona com o sinal de

hidrogênio H-6. Foram também observadas correlações dos dois hidrogênios H-14 e do H-12 com H-13 e do H-1 com H-2.

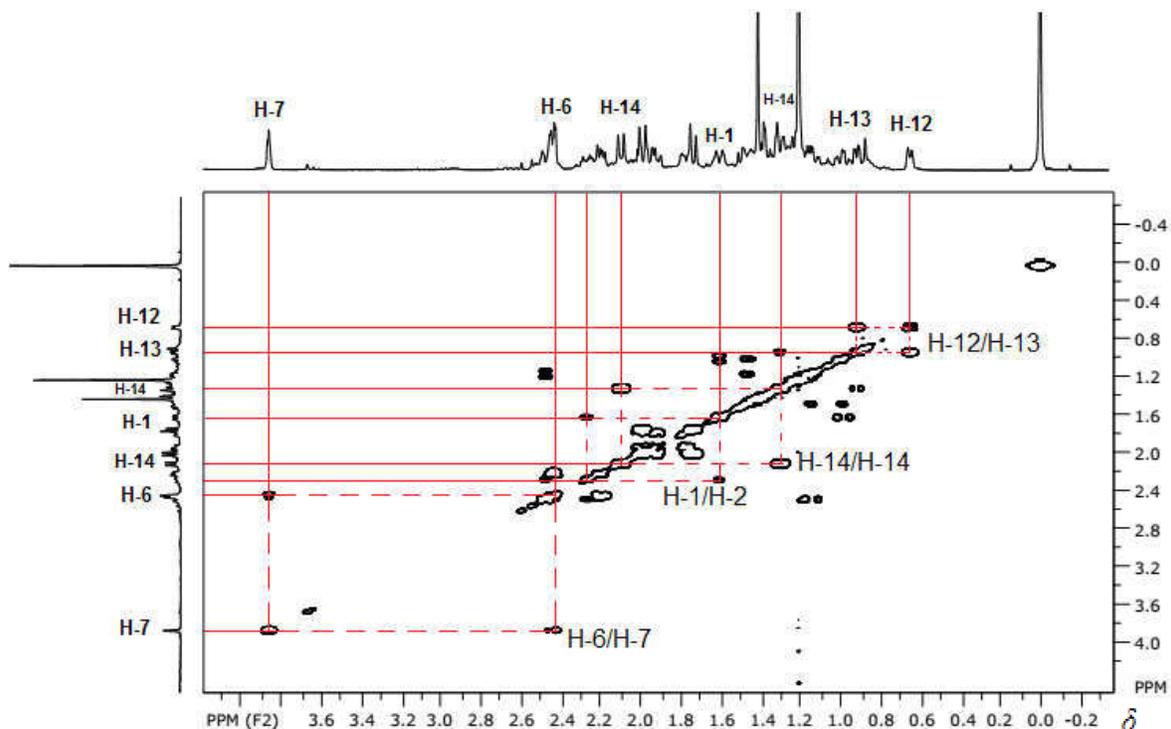


Figura 39 – Seção expandida do mapa de contornos COSY do 7 β -hidroxitraquiloban-19-oico (**95**) na região de 0,4-4,2 ppm (400 MHz, piridina- d_5).

Devido a essas observações, somadas com as atribuições a partir do espectro de RMN de ^{13}C e do mapa de correlações HMBC, concluiu-se que a hidroxilação ocorreu em C-7. A atribuição completa dos sinais de RMN de ^{13}C para o **95** encontra-se na Tabela 3 (pág. 55).

A atribuição dos sinais dos átomos de carbonos foi realizada com o auxílio do mapa de contornos HSQC (Figura 40, pág. 48) e, em seguida, foi necessário identificar a posição espacial do grupamento OH.

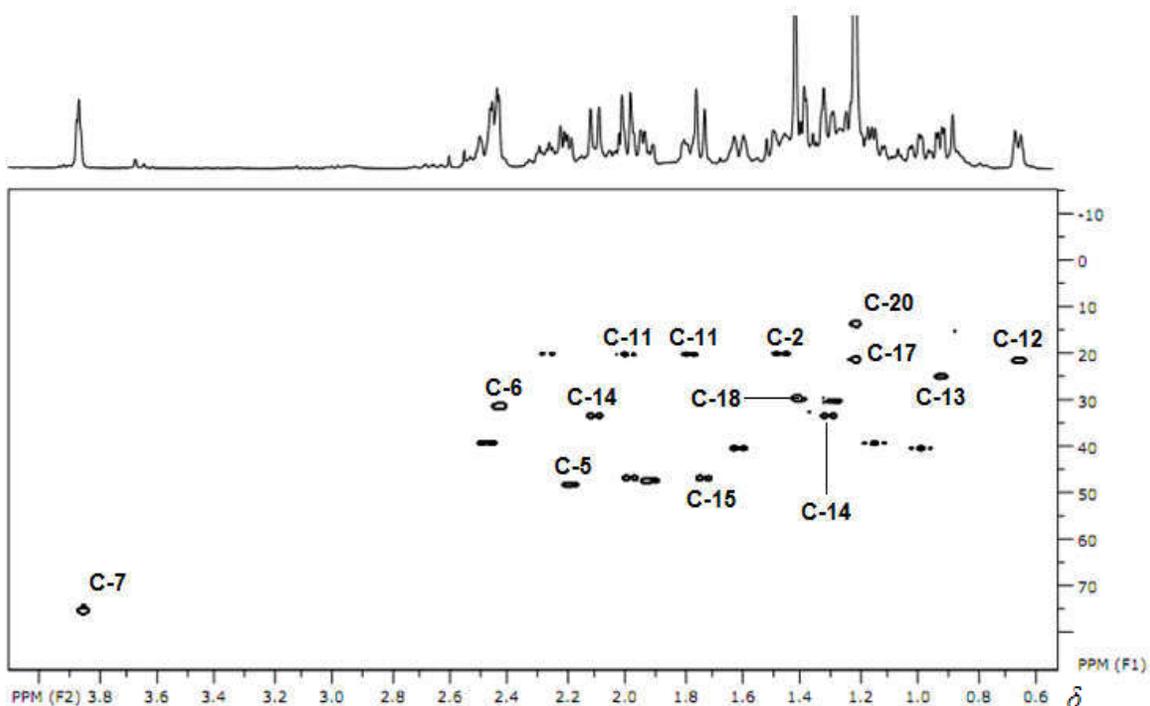


Figura 40 – Seção expandida do mapa de contornos HSQC do 7 β -hidroxitraquiloban-19-oico (**95**) (400 MHz, piridina- d_5).

A partir da análise do mapa de contornos NOESY (Figura 41, pág. 49) indicou que o sinal do hidrogênio do carbono carbinólico correlaciona-se com os sinais de hidrogênios H-6 β , H-14 β e H-15 α . Observando a figura tridimensional do produto isolado (Figura 42, pág. 49), notam-se que estas correlações estão de acordo com a hidroxila na posição β (correlação espacial entre H-7 α e H-14 β , de modo que se pode afirmar que o produto isolado é o ácido 7 β -hidroxitraquiloban-19-oico (**95**) isolado e descrito anteriormente por Silva e colaboradores (2002) como produto de biotransformação do ácido traquilobânico por *Rhizopus stolonifer*. O espectro no IV, e o mapa de contornos HMBC para o composto **95** podem ser observados no anexo (Figura A1 e A2, pág 151).

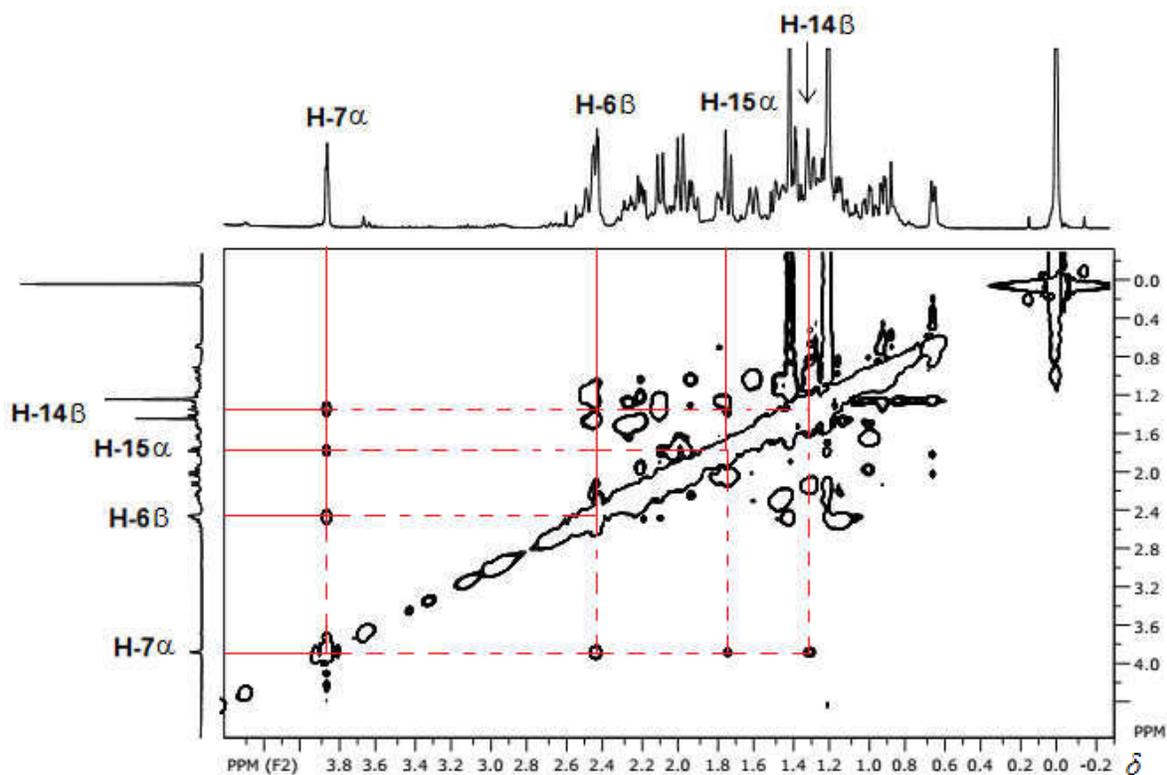


Figura 41 – Seção expandida do mapa de contornos NOESY do 7 β -hidroxitraquiloban-19-oico (**95**) (400 MHz, piridina- d_5). As linhas indicam o acoplamento no espaço de H-7 α com H-6 β , H-14 β e H-15 α .

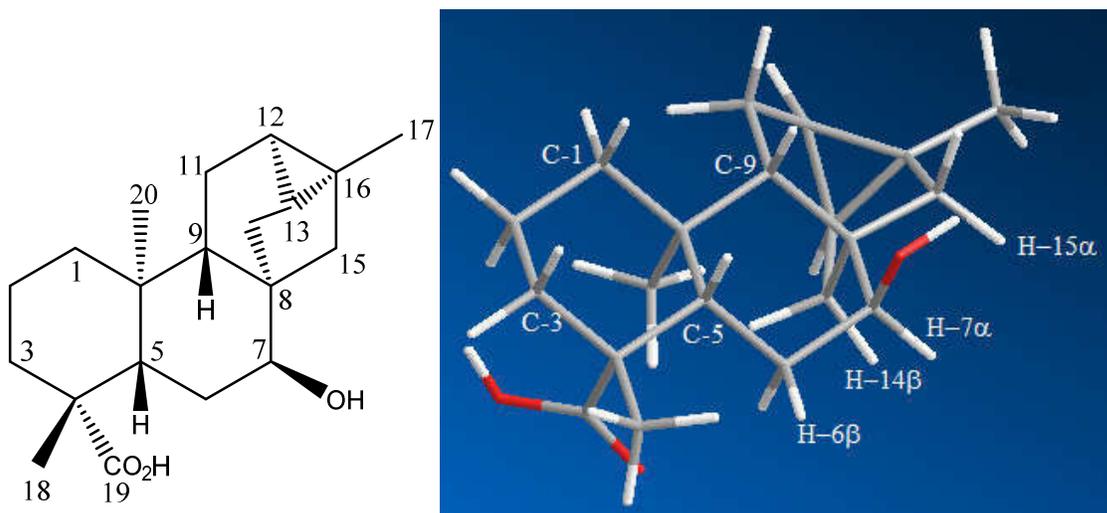


Figura 42 – Estrutura tridimensional do 7 β -hidroxitraquiloban-19-oico (**95**).

3.3.4.2. Elucidação da estrutura do traquiloban-19-oato de β -D-glicopiranosila (96)

O produto de biotransformação denominado **96**, traquiloban-19-oato de β -D-glicopiranosila é um sólido (P.F.: 155-168 °C) de coloração branca (25 mg). Esta substância apresentou elevada polaridade, sendo muito solúvel em metanol e DMSO. No espectro de RMN de ^1H (Figura 43, pág. 51) destacaram-se os sinais característicos do ácido traquilobânico, como os três sinais de átomos de hidrogênios metílicos referentes ao CH_3 -17 (δ 1,14 ppm), CH_3 -18 (δ 1,14 ppm) e CH_3 -20 (δ 0,82 ppm) e um multiplete referente ao hidrogênio H-12 do anel ciclopropânico em δ 0,59 ppm. Também foram observados vários sinais de átomos de hidrogênios ligados a carbonos carbinólicos o que indica a presença de hidroxilas na molécula.

Todos os sinais referentes aos respectivos carbonos do ácido traquilobânico (**81**) puderam ser atribuídos no espectro de RMN de ^{13}C (Figura 44, pág. 51), além de seis sinais de carbono na região de carbono carbinólico (δ 60,0-94,0 ppm) (PAVIA et al., 2001). Além disso, o sinal do carbono carboxílico apresentou mudança de deslocamento químico significativa (de δ 185,0 para 175,4 ppm) sugerindo a esterificação do ácido carboxílico. No subespectro DEPT-135 (Figura 45, pág. 52) foram observados que, dos novos sinais de átomos de carbono, cinco são metínicos e um é metilênico. A partir destas informações e de consultas à literatura (SHIMODA et al., 2006; HU et al., 2012), concluiu-se que este produto possui uma hexose ligada ao grupamento ácido do substrato.

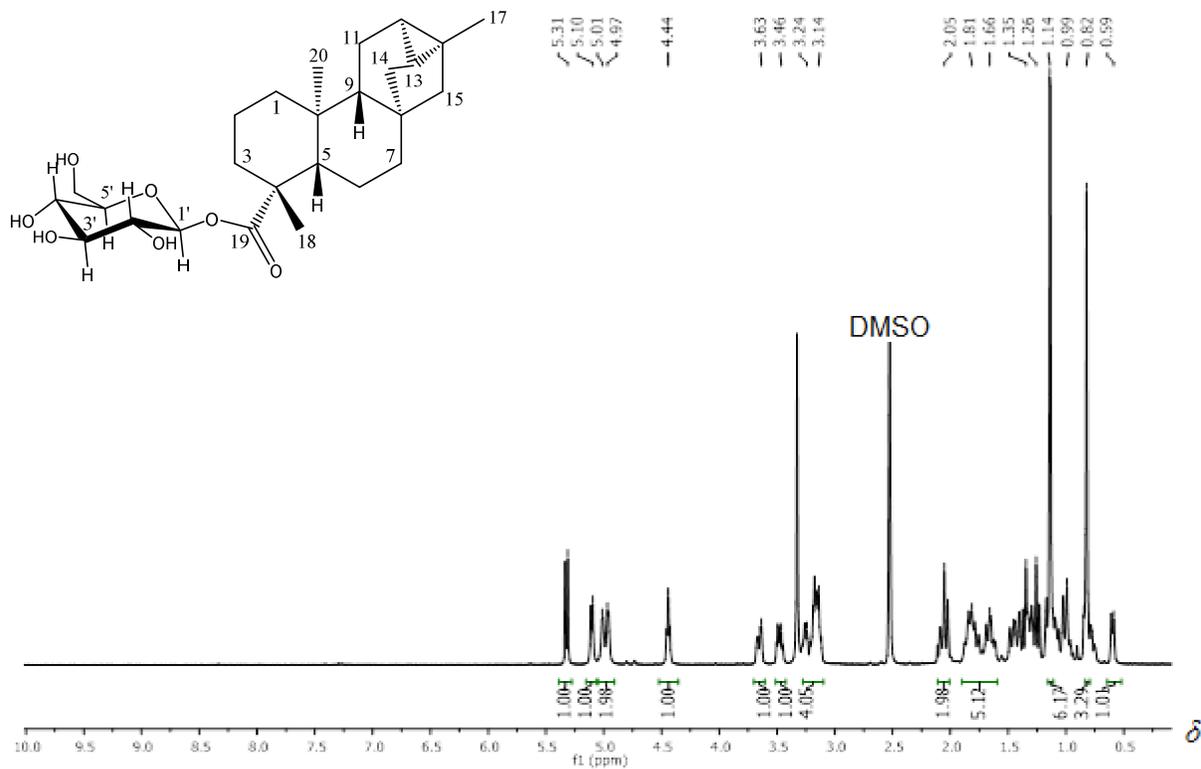


Figura 43 – Espectro de RMN de ^1H do traquiloban-19-oato de β -D-glicopiranosila (96) (400 MHz, DMSO-d_6).

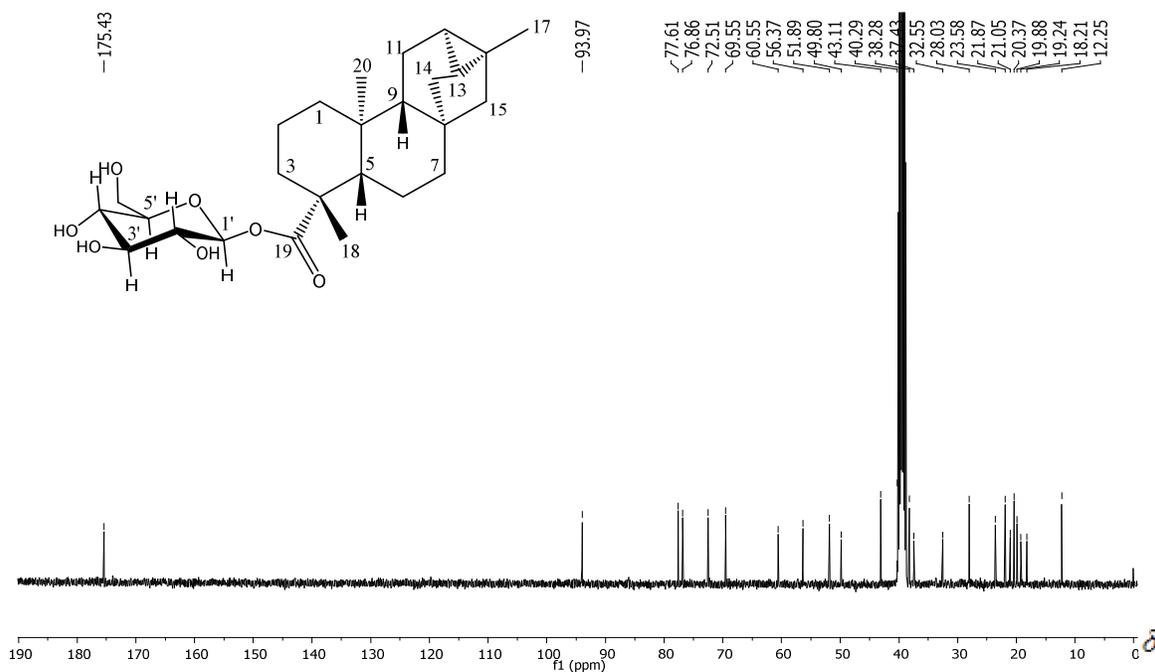


Figura 44 – Espectro de RMN de ^{13}C do traquiloban-19-oato de β -D-glicopiranosila (96) (100 MHz, DMSO-d_6).

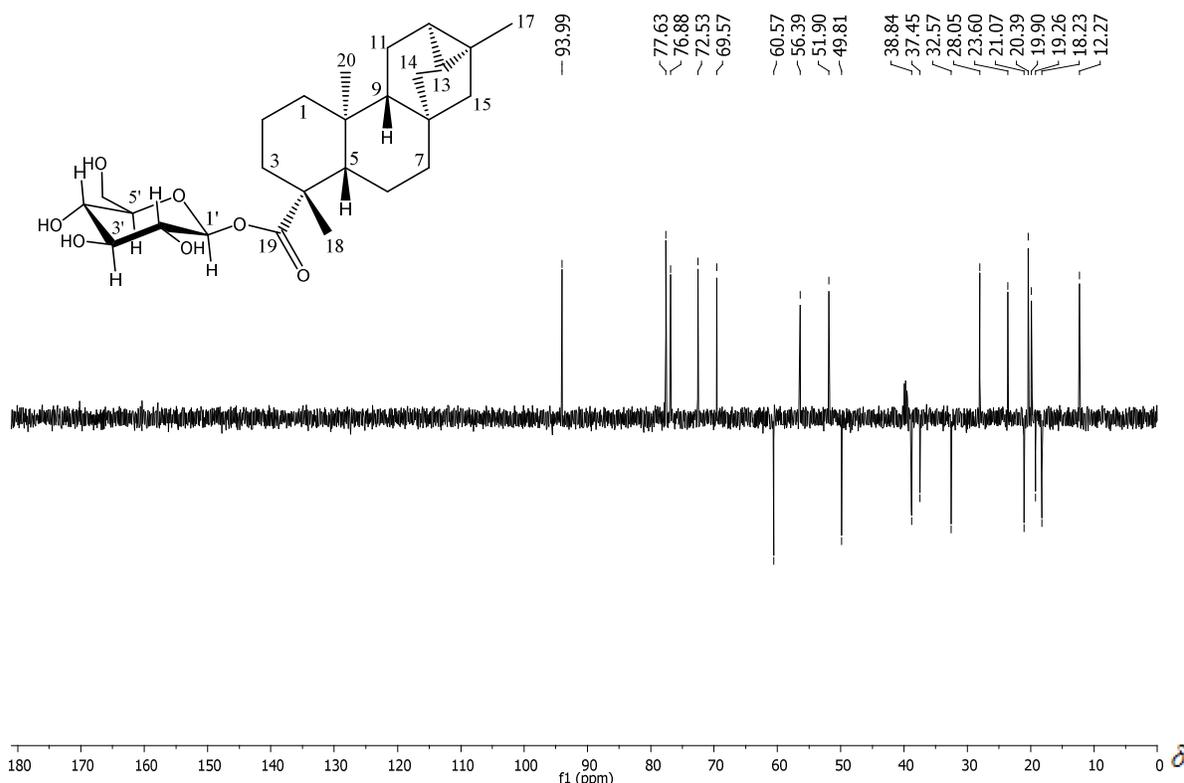


Figura 45 – Subespectro DEPT-135 do traquiloban-19-oato de β -D-glicopiranosila (**96**) (100 MHz, DMSO- d_6).

No mapa de contornos HMBC (Figura 46, pág. 53) pôde-se visualizar um acoplamento do hidrogênio H-1' (δ 5,31 ppm) do carbono anomérico com o carbono C-19 indicando, desse modo, a posição de ligação da hexose no ácido traquilobânico. A constante de acoplamento escalar de H-1' ($J = 8,2$ Hz) indica que esse hidrogênio deve estar em axial (SHIMODA et al., 2006). Por comparação dos dados de RMN de ^{13}C com a literatura, a hexose presente na estrutura de **96** foi identificada como β -D-glicopiranosila (HU et al., 2012, ZHANG et al., 2015).

O produto **96** obtido da biotransformação do ácido traquilobânico trata-se do traquiloban-19-oato de β -D-glicopiranosila, o qual é descrito pela primeira vez na literatura neste trabalho. As atribuições completas dos dados de RMN de ^1H e de ^{13}C , assim como as correlações HMBC (Figura 47, pág. 53) para o composto **96** estão listadas na Tabela 4 (pág. 54). O espectro no IV e os mapas

de contornos COSY, HSQC e NOESY para **96** são apresentados nas Figuras A3-A6 (pág. 152 e 153).

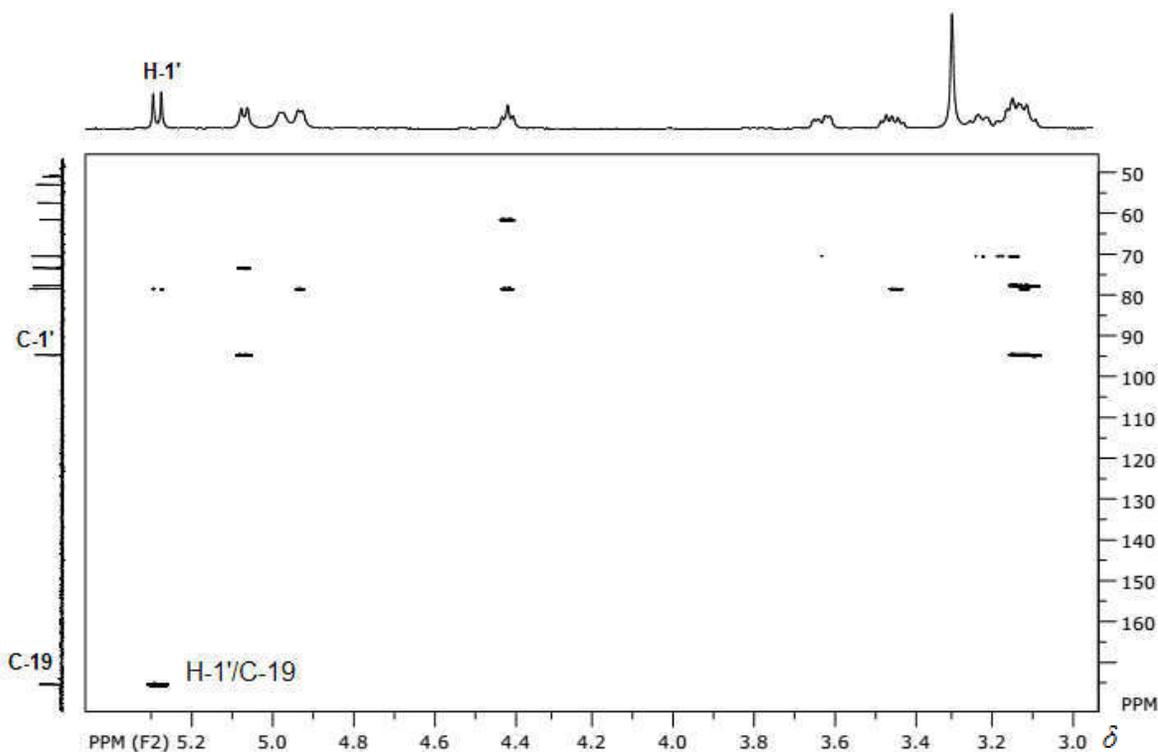


Figura 46 – Seção expandida do mapa de contornos HMBC do traquiloban-19-oato de β -D-glicopiranosila (**96**) (400 MHz, DMSO- d_6).

Os dados de RMN de ^{13}C dos produtos de biotransformação, **95** e **96**, por *M. plumbeus*, do substrato ácido traquilobânico (**81**) e a comparação com a literatura são apresentados na Tabela 3 (pág. 55).

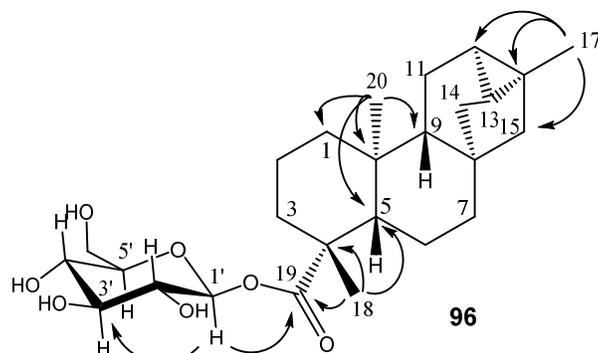


Figura 47 – Estrutura do traquiloban-19-oato de β -D-glicopiranosila (**96**) e algumas correlações HMBC.

Tabela 4 – Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C e correlações HMBC para o composto traquiloban-19-oato de β -D-glicopiranosila (**96**) ($\text{DMSO-}d_6$)

Posição	δ_c	δ_H (J em Hz)	HMBC
1	38,2	0,74, dd (3,6 e 13,4)	
		1,26, m	
2	18,1	1,26, m	
		1,30, m	
3	37,4	0,97, m	C-1, C-4, C-6, C-18
		2,06, m	
4	43,0	-	
5	56,3	0,99, dd (2,1 e 9,5)	
6	21,0	1,65, m	
7	38,2	1,42, m	
8	40,8	-	
9	51,9	1,15, m	
10	39,3	-	
11	19,2	1,61, m	C-7, C-9, C-12, C-16
		1,81, m	
12	19,8	0,59, td (2,6 e 7,7)	C-9, C-17
13	23,5	0,82, dd (2,9 e 7,7)	
14	32,5	1,14, m	
		2,01, m	C-8, C-9, C-13, C-15, C-16
15	49,7	1,22, d (11,3)	
		1,33, d (11,3)	C-8, C-9, C-12, C-16
16	21,8	-	
17	20,3	1,11, s	C-12, C-13, C-15, C-16
18	28,0	1,12, s	C-3, C-4, C-5, C-19
19	175,4	-	
20	12,2	0,80, s	C-1, C-5, C-9, C-10
1'	94,0	5,30, d (8,2)	C-19, C-3'
2'	72,5	3,14, m	
3'	77,6	3,15, m	
4'	69,5	3,14, m	
5'	76,8	3,24, m	
6'	60,5	3,45, dd (5,5 e 11,5)	C-5'
		3,63, dd (4,5 e 11,5)	C-4'

Tabela 5 – Dados de RMN de ^{13}C para o ácido traquilobânico **81** (CDCl_3) e para os produtos de biotransformação **95** (piridina- d_5) e **96** ($\text{DMSO}-d_6$).

Posição	δ_c (ppm)			
	81*	81	95	96
1	39,4	39,6	40,0	38,2
2	18,7	18,9	19,6	18,1
3	37,8	38,0	38,9	37,4
4	43,7	43,9	43,6	43,0
5	57,0	57,2	47,9	56,3
6	21,7	21,9	31,0	21,0
7	39,2	39,4	75,1	38,2
8	40,7	40,9	46,1	40,8
9	52,7	53,0	47,1	51,9
10	38,9	39,1	39,3	39,3
11	19,7	20,0	19,7	19,2
12	20,6	20,8	21,1	19,8
13	24,3	24,5	24,6	23,5
14	33,1	33,3	33,0	32,5
15	50,4	50,6	46,5	49,7
16	22,4	22,6	23,2	21,8
17	20,6	20,8	20,8	20,3
18	28,9	29,1	29,2	28,0
19	184,9	185,0	180,5	175,4
20	12,4	12,6	12,9	12,2
1'				94,0
2'				72,5
3'				77,6
4'				69,5
5'				76,8
6'				60,5

* SILVA et al., 2002 (CDCl_3)

3.3.5. Biotransformação do ácido traquilobânico pelo fungo *Syncephalastrum racemosum*

A partir do experimento de biotransformação do ácido traquilobânico por *S. racemosum* obtiveram-se dois extratos, um proveniente da extração da fase líquida e outro da extração do micélio. Os dois extratos foram combinados, pois apresentaram perfil semelhante em CCD e submetidos à cromatografia em coluna, com eluição em gradiente utilizando hexano/acetona 15% a metanol 100%, sendo coletadas 56 frações. As frações 29, 33 e 39, coletadas com fase móvel hexano/acetona 60%, apresentaram manchas com R_f diferentes do R_f do ácido

traquilobânico, as quais também não foram identificadas no controle do fungo. Diante disso, essas frações foram analisadas por RMN de ^1H e de ^{13}C , verificando a presença de três produtos de biotransformação denominados **97**, **98** e **99** (Figura 48).

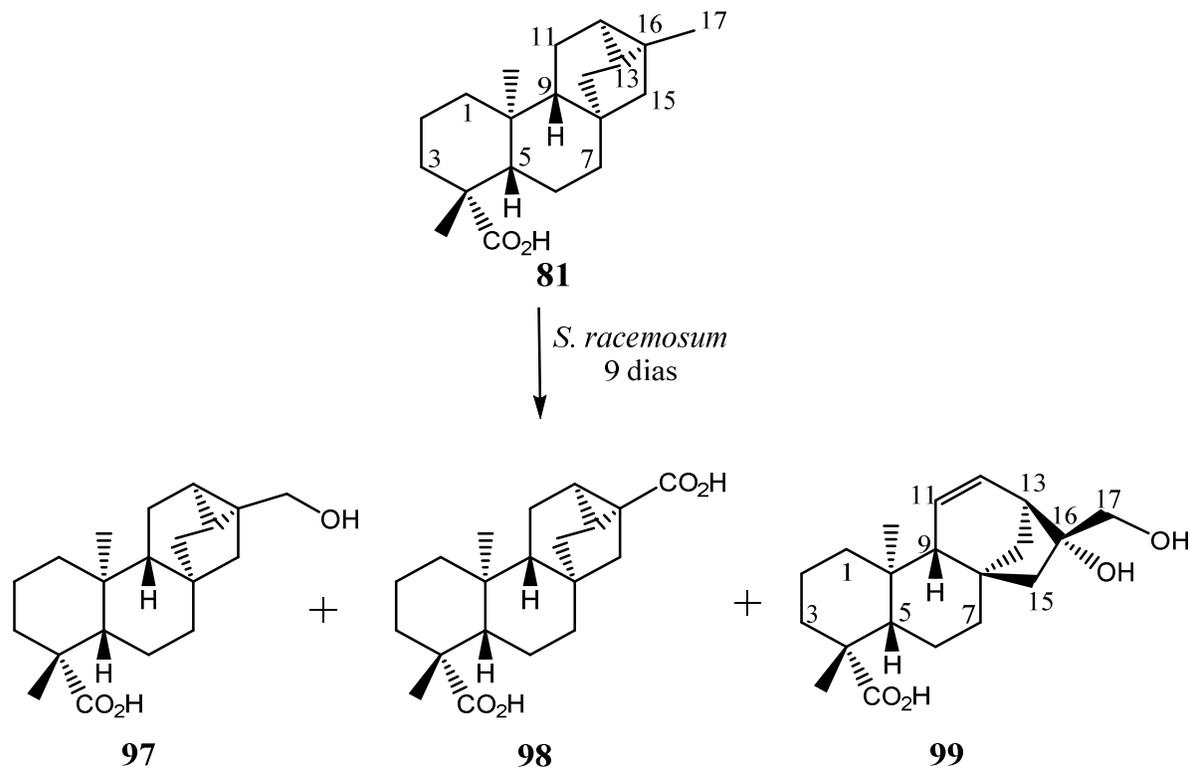


Figura 48 – Biotransformação do ácido traquilobânico (**81**) por *S. racemosum* formando os produtos **97**, **98** e **99**.

3.3.5.1. Identificação da estrutura do ácido 17-hidroxitraquiloban-19-oico (**97**)

O produto de biotransformação denominado **97** foi isolado como um sólido branco (13 mg) com P.F. = 126-128 °C. No espectro de RMN de ^1H (Figura 49, pág. 57) observaram-se dois sinais de hidrogênios metílicos, referentes a H-18 (δ 1,36 ppm) e H-20 (δ 1,16 ppm), além do sinal de $\text{CH}_2\text{-OH}$ em δ 3,94 ppm referente ao H-17 que, neste composto, foi hidroxilado. Também observaram-se

que o multipletto do hidrogênio H-12 do anel ciclopropânico foi deslocado de δ 0,55 ppm no material de partida para δ 1,03 ppm, devido à hidroxilação no carbono 17. No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 50, pág. 58) foram observados sinais de 20 carbonos, sendo um deles carboxílico (δ 180,3 ppm) e um carbinólico (δ 66,8 ppm). Por meio do mapa de contornos HMBC (Figura A10, pág. 155) visualizaram-se as correlações de H-17 com os carbonos C-16, C-15, C-13 e C-12 confirmando, portando, que a hidroxilação ocorreu no carbono 17. Comparando os dados de RMN de ^{13}C do composto **81** com o **97** e, utilizando dos dados de RMN de 1D e 2D, **97** foi identificado como o ácido 17-hidroxitraquiloban-19-oico. Este composto foi isolado e caracterizado anteriormente por Silva e colaboradores (2002) como um produto de biotransformação do ácido traquilobânico por *Rhizopus stolonifer*. Os dados de RMN de ^{13}C para o composto **97** estão disponíveis na Tabela 5, pág 73. O espectro no IV e os mapas de contornos HSQC e HMBC são apresentados nas Figuras A7-A10, pág. 154 e 155.

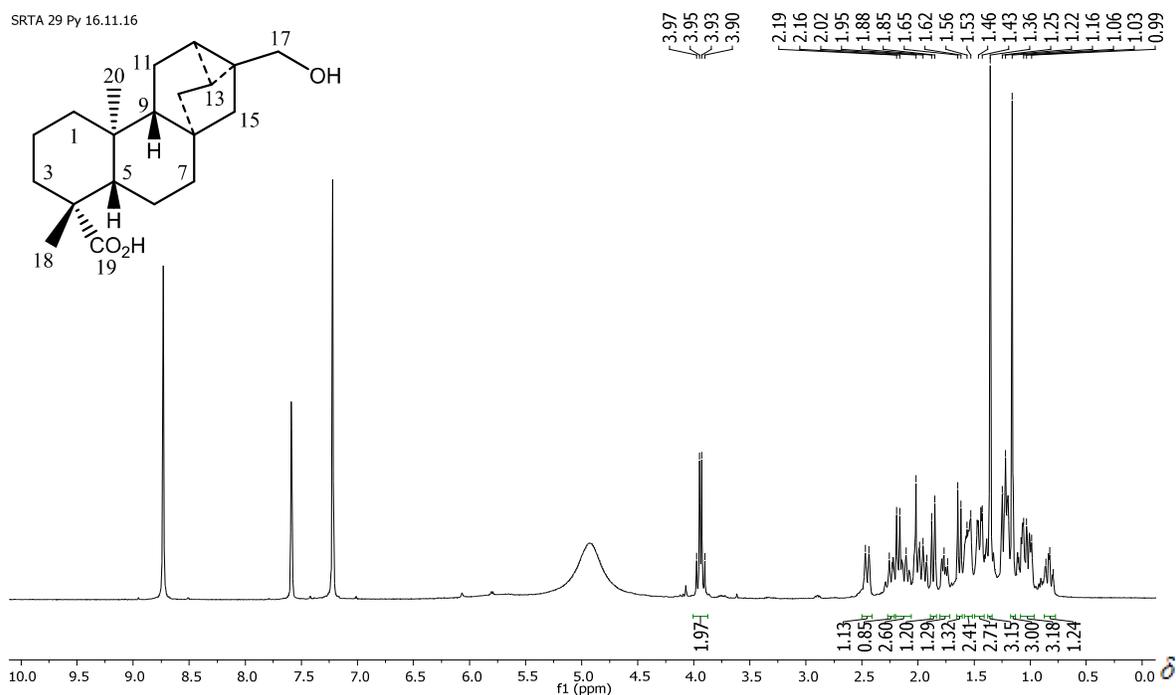


Figura 49 – Espectro de RMN de ^1H de **97** (400 MHz, piridina- d_5).

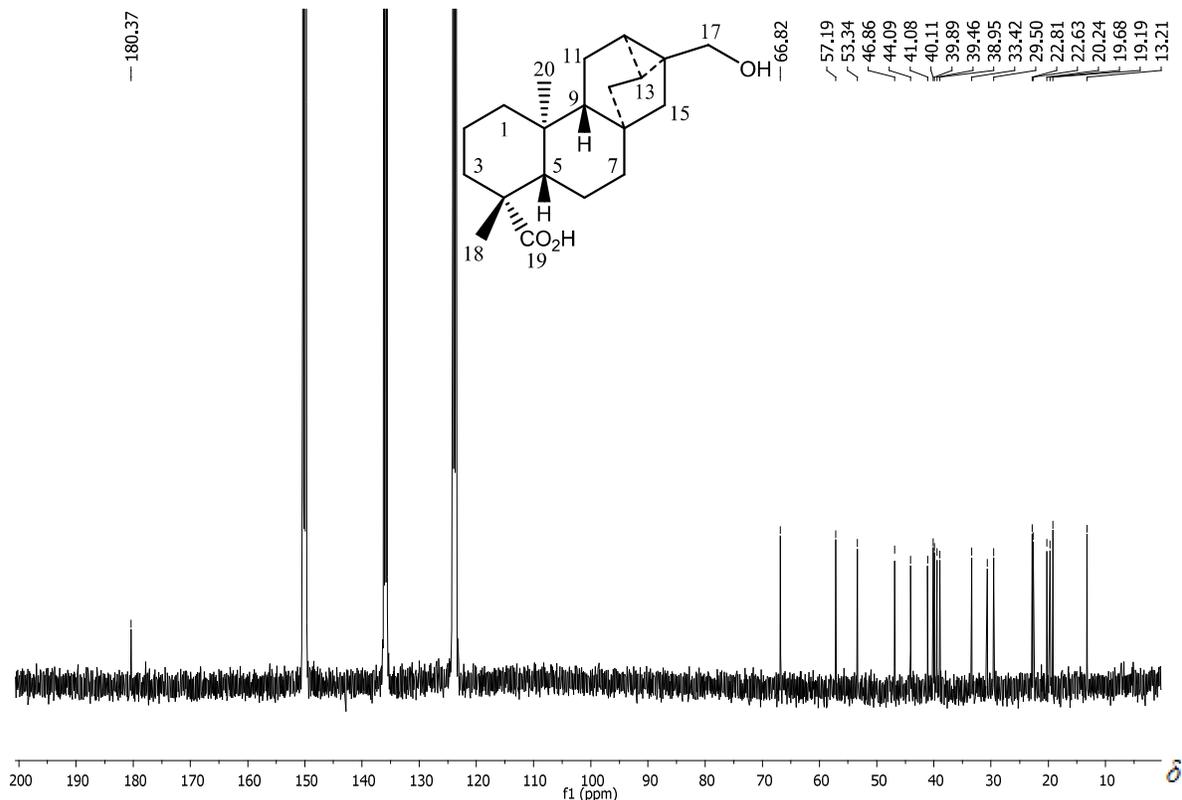


Figura 50 – Espectro de RMN de ^{13}C do produto **97** (100 MHz, piridina- d_5).

3.3.5.2. Elucidação da estrutura do ácido traquiloban-17,19-dioico (**98**)

O produto de biotransformação denominado SRTA33 (**98**) foi isolado como um sólido branco (29 mg) com P.F. = 268-270 °C. No espectro de RMN de ^1H (Figura 51, pág. 59) observaram-se a presença de dois sinais de CH_3 em δ 1,11 (H-20) e 1,34 (H-18); como também um sinal em δ 1.98-2.01, integrando para 3 hidrogênios, o quais foram atribuídos a H-6 β , H-12 e H-13. Além disso, não foram encontrados sinais de hidrogênios olefínicos ou ligados a carbonos carbinólicos. No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 52, pág. 59) observaram-se dois sinais de carbonos carboxílicos (δ 177,4 e 180,0 ppm), indicando uma possível oxidação de um dos grupamentos metílicos.

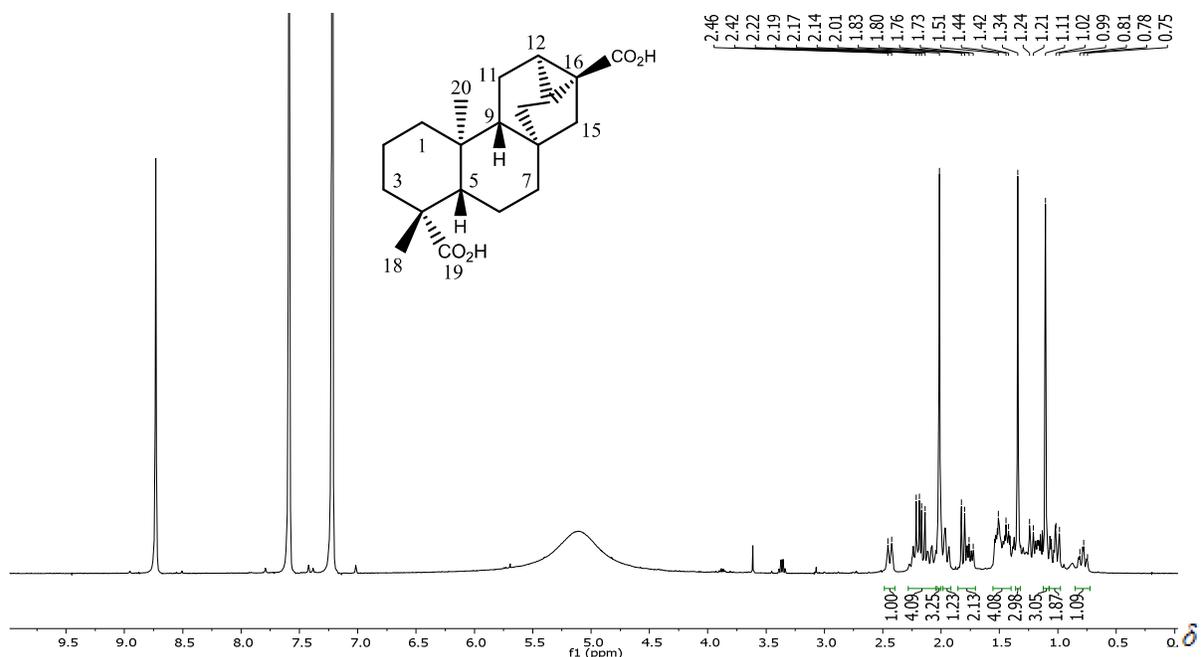


Figura 51 – Espectro de RMN de ^1H do ácido traquiloban-17,19-dioico (**98**) (400 MHz, piridina- d_5).

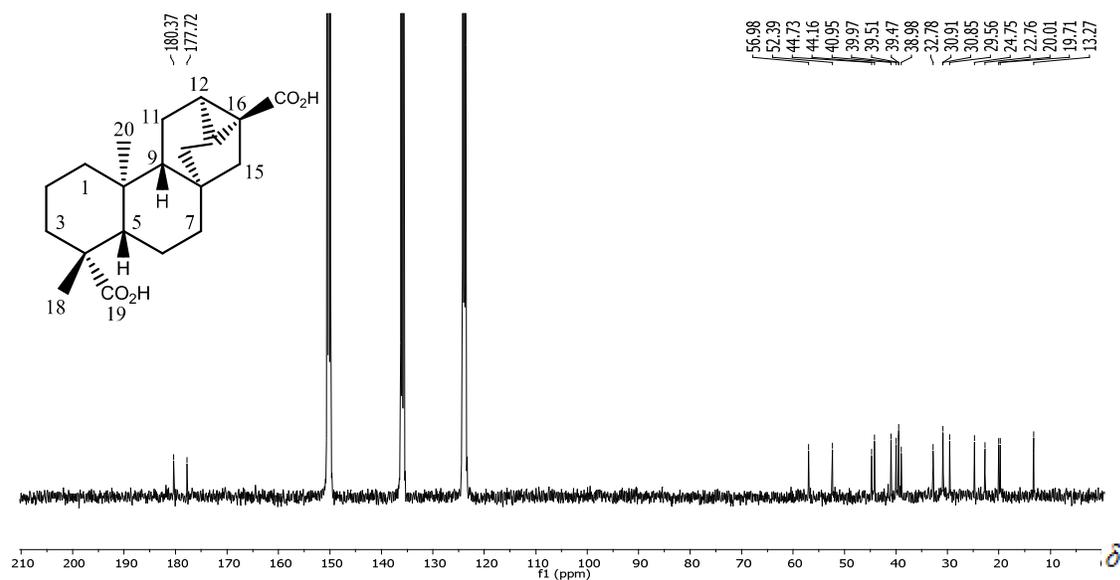


Figura 52 – Espectro de RMN de ^{13}C do ácido traquiloban-17,19-dioico (**98**) (100 MHz, piridina- d_5).

No subspectro DEPT 135 (Figura 53, pág. 60) foi possível verificar que, dos vinte carbonos encontrados, oito são CH_2 , dois são CH_3 , quatro são CH e seis são não hidrogenados.

Quando comparados os dados de RMN de ^{13}C do composto **81** com aqueles de **98**, observaram-se que os sinais de RMN dos carbonos de 1 a 10 possuem poucas variações entre eles, indicando que a modificação ocorreu no anel C. Já que no espectro de RMN de ^1H verificou-se a presença de apenas dois grupamentos metílicos (o composto **81** apresenta três grupos metílicos), enquanto no espectro de RMN de ^{13}C verificou-se a presença de dois sinais de carbonos carbonílicos, é possível concluir que o composto **98** é um produto de oxidação de **81** em C-17.

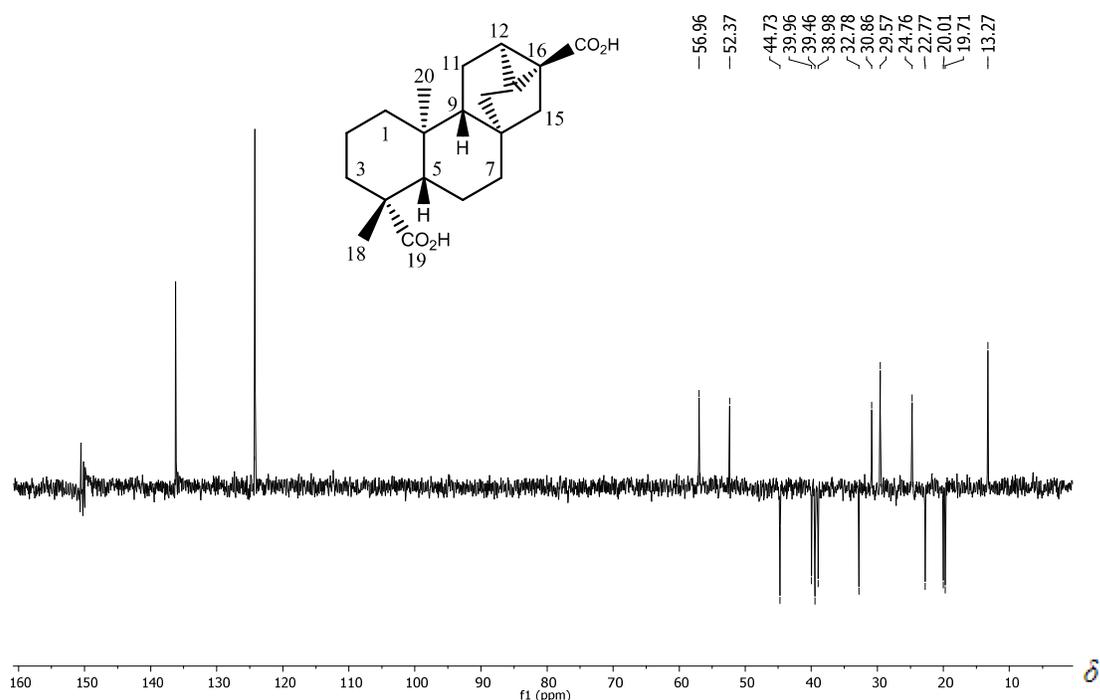


Figura 53 – Subespectro de DEPT 135 do ácido traquiloban-17,19-dioico (**98**) (100 MHz, piridina- d_5).

O mapa de contornos HMBC mostrou correlações entre os sinais H-1 α com C-2, C-9, C-10 e C-20; H-9 com C-7, C-11, C-14 e C-20; H-14b com C-7, C-9, C-13 e C-15; e H-15 α com C-7, C-8, C-9, C-16 e C-17. O mapa de contornos NOESY mostrou correlações entre H-1 β com H-9; H-3 β com H-5; H-6 α com H-20; H-9 com H-1 β , H-5 e H-15 β ; e entre H-18 com H-3 β , H-5 e H-6 β . Todas as correlações encontradas nos mapas de contornos HMBC e NOESY corroboraram com a elucidação do composto **98**.

Por meio das atribuições de RMN de ^1H e de ^{13}C , correlações HSQC (Figura 54), HMBC, COSY e NOESY, a estrutura do composto **98** foi elucidada e caracterizada como um diterpeno traquilobânico até o momento não relatado na literatura, e provavelmente, produto de uma oxidação do composto **97**. Na Tabela 6 (pág. 62) são mostrados atribuições de RMN de 1D e 2D utilizadas para a caracterização deste composto.

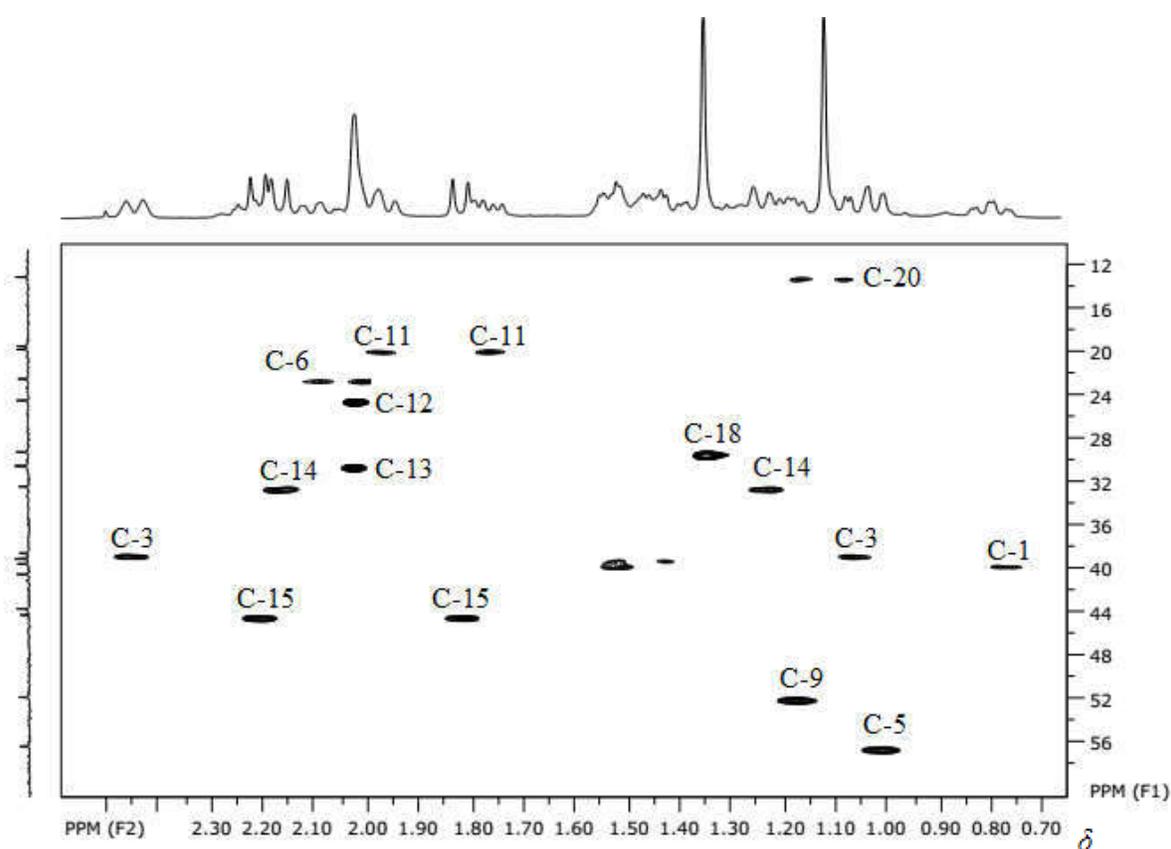


Figura 54 – Mapa de contornos HSQC do ácido traquiloban-17,19-dioico (**98**) (400 MHz, piridina- d_5).

Tabela 6 – Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C e correlações HMBC e NOESY do ácido traquiloban-17,19-dioico (**98**) (piridina- d_5)

Posição	δ_{C}	δ_{H} (J em Hz)	HBMC	NOESY
1 α	40,0	0,80 (td; J = 13,2 e 3,5; 1H)	C-2, C-9, C-10, C-20	H-2
1 β		1,54 (m; 1H)		H-9
2a	19,7	1,45 (m; 1H)		
2b		2,24 (m; 1H)		
3 α	38,9	1,06 (m; 1H)		
3 β		2,45 (d; J = 12,7; 1H)	C-5	H-5
4	44,2	-		
5	57,0	1,02 (m; 1H)		
6 α	22,8	2,11 (d; J = 15,0; 1H)	C-4, C-8, C-9, C-13	H-20
6 β		1,98-2,01 (sobreposto)		
7	39,5	1,45 (m; 2H)	C-5	
8	41,0	-		
9	52,4	1,18 (dd; J = 14,7 e 7,2; 1H)	C-7, C-11, C-14, C-20	H-1 β , H-5, H-15 β
10	39,5	-		
11 α	20,0	1,77 (dd; J = 14,7 e 7,2; 1H)	C-7, C-12	H-12, H-20
11 β		1,96 (m; 1H)		H-9
12	24,8	1,98-2,01 (sobreposto)		
13	30,8	1,98-2,01 (sobreposto)		
14a	32,8	1,24 (d; J = 12,6; 1H)		H-14b, H-20
14b		2,17 (d; J = 12,6; 1H)	C-7, C-9, C-13, C-15	H-7, H-14a
15 α	44,7	2,21 (d; J = 11,8; 1H)	C-7, C-8, C-9, C-16, C-17	H-7, H-15 β
15 β		1,82 (d; J = 11,8; 1H)	C-7, C-9, C-13, C-14	H-9, H-15 α
16	30,9	-		
17	177,7	-		
18	29,6	1,34 (s; 3H)	C-3, C-4, C-5, C-19	H-3 β , H-5, H-6 β
19	180,4	-		
20	13,3	1,11 (s; 3H)	C-5, C-9, C-10	H-6 α , H-11 α

3.3.5.3. Elucidação da estrutura do ácido 16 α ,17-di-hidroxicaur-11(12)en-19-oico (**99**)

O produto de biotransformação denominado **99** foi isolado como um sólido de coloração branca (16 mg) com P.F. = 278-280 °C. A amostra foi submetida à análise por RMN e o conjunto de dados obtidos indicou a ocorrência de rearranjo na formação deste produto, já que o sinal de RMN de ^1H do H-12 do substrato (δ 0,55 ppm) não foi encontrado nesse produto.

Os diterpenos traquilobânicos submetidos às biotransformações podem sofrer rearranjos estruturais, sendo que o mais comum é levar à diterpenos caurânicos. Na Figura 55 (pág. 59) mostra-se uma proposta de rearranjo enzimático do ácido traquilobânico formando um diterpeno caurânico (FRAGA, 1994). Por esta razão, avaliou-se primeiramente a possibilidade de **99** possuir esqueleto caurânico.

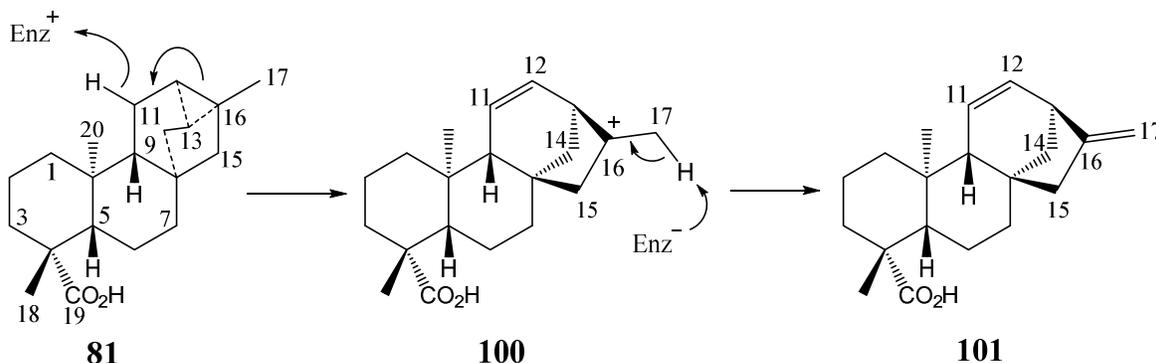


Figura 55 – Proposta de rearranjo do ácido traquilobânico (**81**) para formação de diterpenos caurânicos (FRAGA, 1994).

No espectro de RMN de ¹H (Figura 56, pág. 64) verificou-se a presença de dois dupletos em δ 4,01 e 4,17 ppm, ambos com $J = 10,6$ Hz, indicando a presença de um grupo CH₂-OH em **99**. Como os dados de RMN indicam a presença de dois grupos metila, compatíveis com o CH₃-18 (δ_H 1,38; δ_C 29,7) e o CH₃-20 (δ_H 1,18; δ_C 16,4), sugeriu-se que o grupo CH₂OH estivesse em C-17. Também foram visualizados dois sinais de hidrogênios olefínicos, um duplete duplo em δ 5,64 ppm ($J = 3,6$ e 9,8 Hz) e outro duplete duplo em δ 6,21 ppm ($J = 6,4$ e 9,8 Hz). Estes valores são compatíveis com os dados relatados por Uchôa et al. (2013) para um diterpeno caurânico contendo uma ligação dupla entre C-11 (δ_H 5,56) e C-12 (δ_H 5,91).

A análise do subespectro DEPT 135 (Figura 57, pág. 65) indicaram que o produto **99** possui dois CH₃, oito CH₂, cinco CH e cinco carbonos não hidrogenados.

Pelos dados obtidos no espectro de RMN de ^{13}C (Figura 58, pág. 61), este produto contém, ainda, outra hidroxila, a qual deve estar ligada a C-16, devido à multiplicidade dos sinais dos hidrogênios de C-17 (dupletos) e, além disso, no subespectro DEPT 135 observaram-se que a molécula possui um carbono não hidrogenado em δ_{C} 87,2 ppm, que ainda não havia sido atribuído.

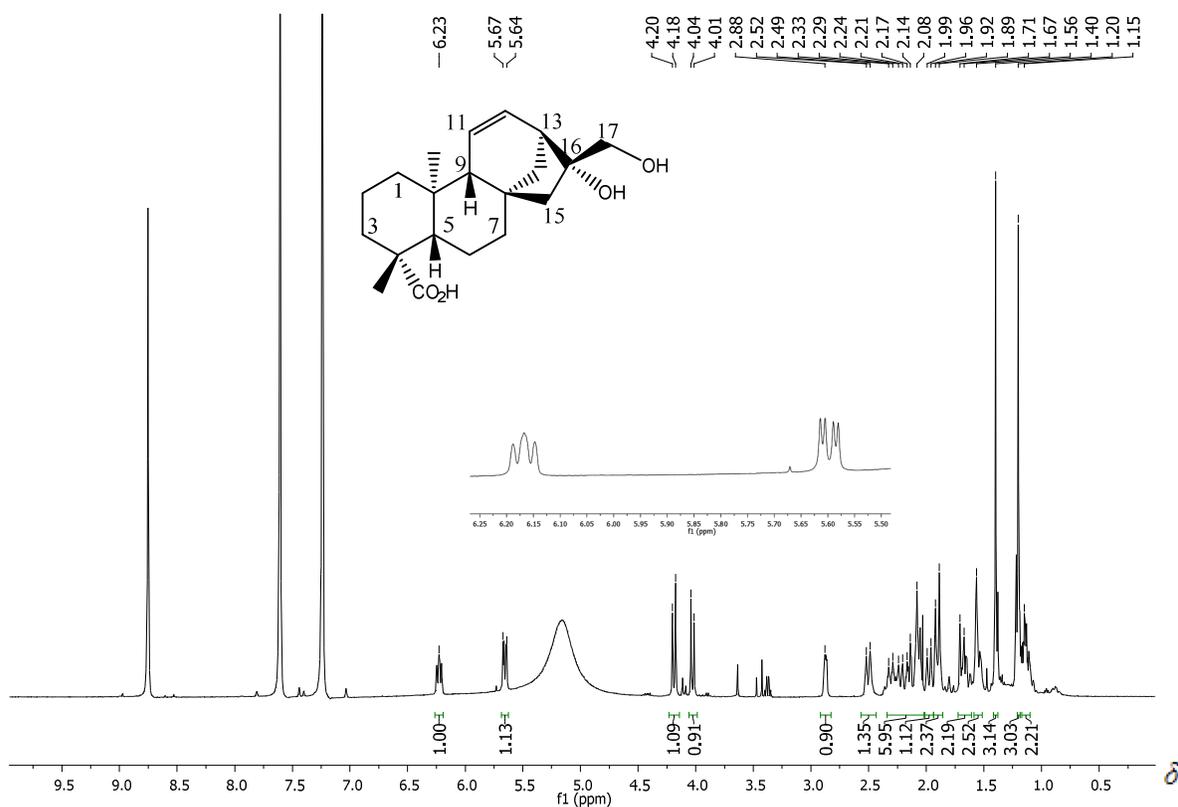


Figura 56 – Espectro de RMN de ^1H do ácido 16 α ,17-di-hidroxicaur-11(12)en-19-oico (**99**) (400 MHz, piridina- d_5).

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 58, pág. 65) estão presentes um sinal de carbono carboxílico (δ 180,4 ppm), dois sinais na região de carbonos olefinicos (δ 128,0 e 133,1 ppm) e dois sinais de carbonos carbinólicos (δ 67,9 e 87,2 ppm).

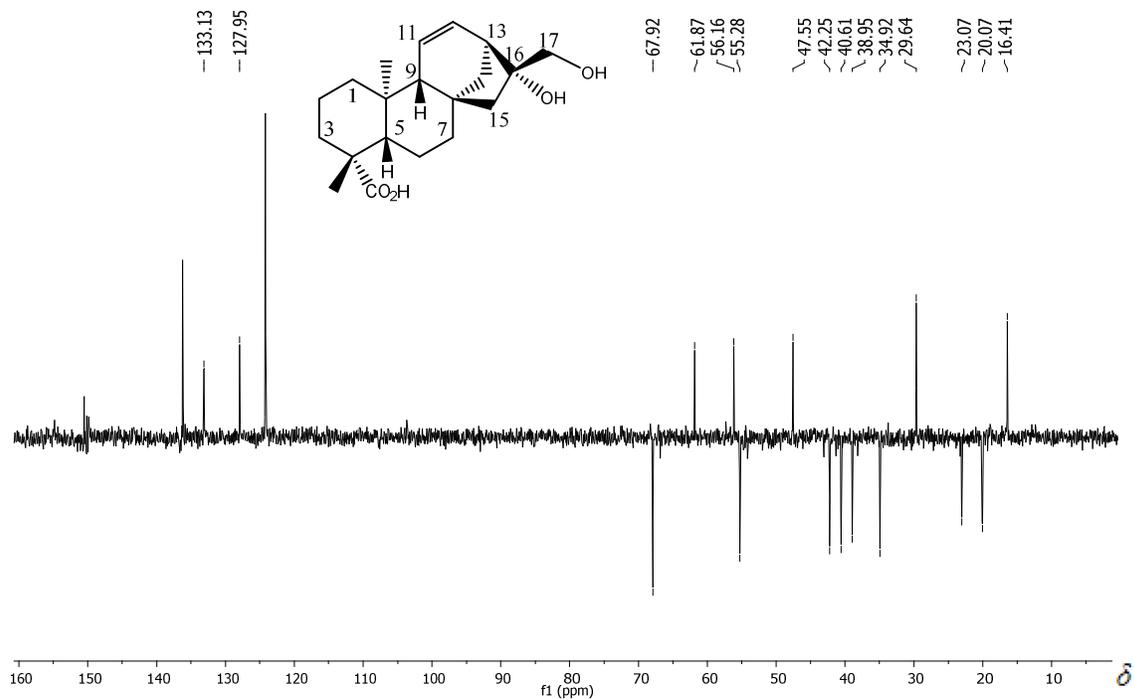


Figura 57 – Subespectro de DEPT 135 do ácido 16 α ,17-di-hidroxicaur-11(12)en-19-oico (**99**) (100 MHz, piridina- d_5).

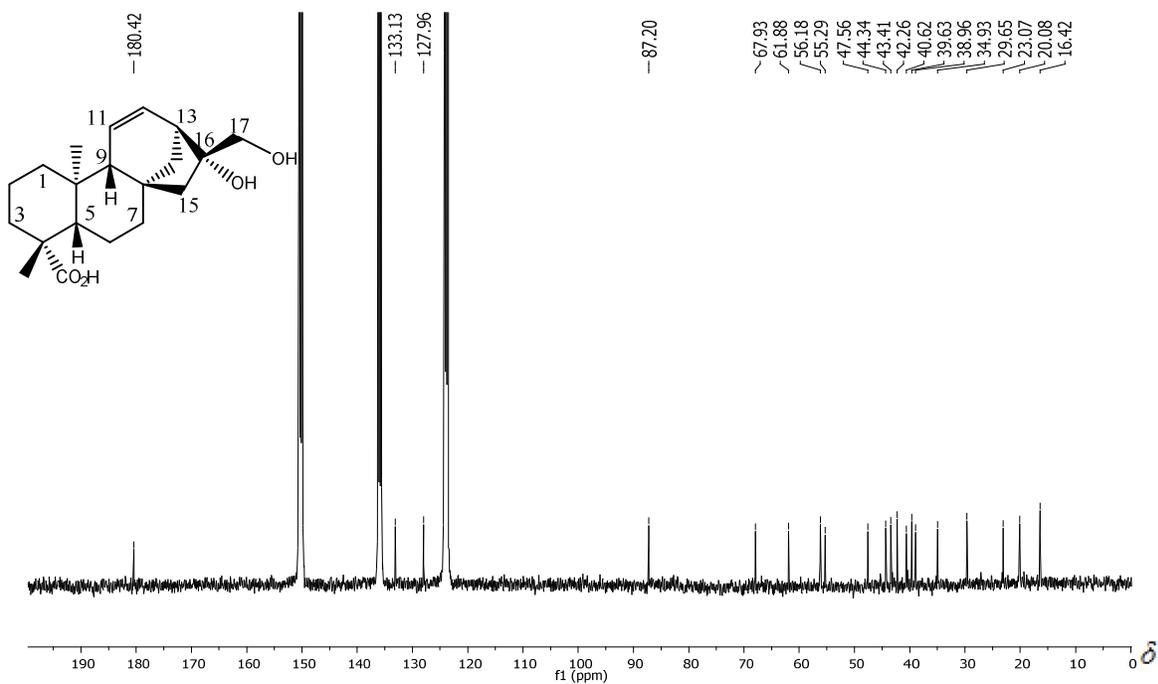


Figura 58 – Espectro de RMN de ^{13}C do ácido 16 α ,17-di-hidroxicaur-11(12)en-19-oico (**99**) (100 MHz, piridina- d_5).

No mapa de contornos HSQC (Figura 59) observaram-se as correlações do sinal em δ 67,9 ppm, atribuído a C-17, com os sinais em δ 4,01 e 4,17 ppm, atribuídos, portanto, aos hidrogênios H-17. Em relação à ligação dupla entre C-11 (δ 128,0 ppm) e C-12 (δ 133,1 ppm), os respectivos hidrogênios olefinicos foram correlacionados no mapa de contornos HSQC, o que permitiu atribuir os sinais em δ 5,64 ppm (H-11) e δ 6,21 ppm (H-12).

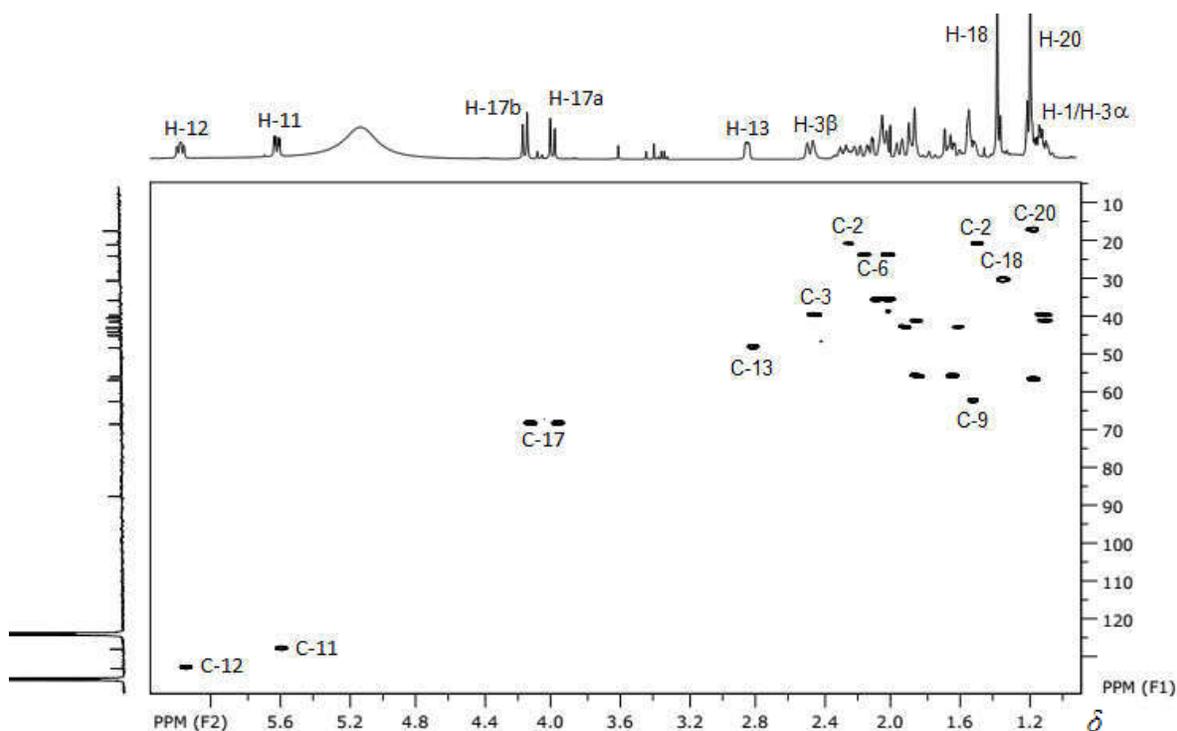


Figura 59 – Mapa de contornos HSQC do ácido 16 α ,17-di-hidroxicaur-11(12)en-19-oico (**99**) (400 MHz, piridina-*d*₅).

No mapa de correlações NOESY (Figura 60, pág. 67) observaram-se os sinais das correlações espaciais entre H-12 e H-13 com H-17. Desse modo, para que o produto de biotransformação **99** atenda a essas correlações, a estereoquímica do C-17 deve ser β (Figura 61, pág. 67). As atribuições dos dados de RMN de 1D e 2D, apresentados na Tabela 7 (pág. 64), são compatíveis com a do ácido 16 α ,17-di-hidroxicaur-11(12)en-19-oico (**99**). O espectro no IV e os

mapas de correlações COSY e NOESY para o composto **99** são apresentados nas Figuras A14-A16, pág. 154 e 155.

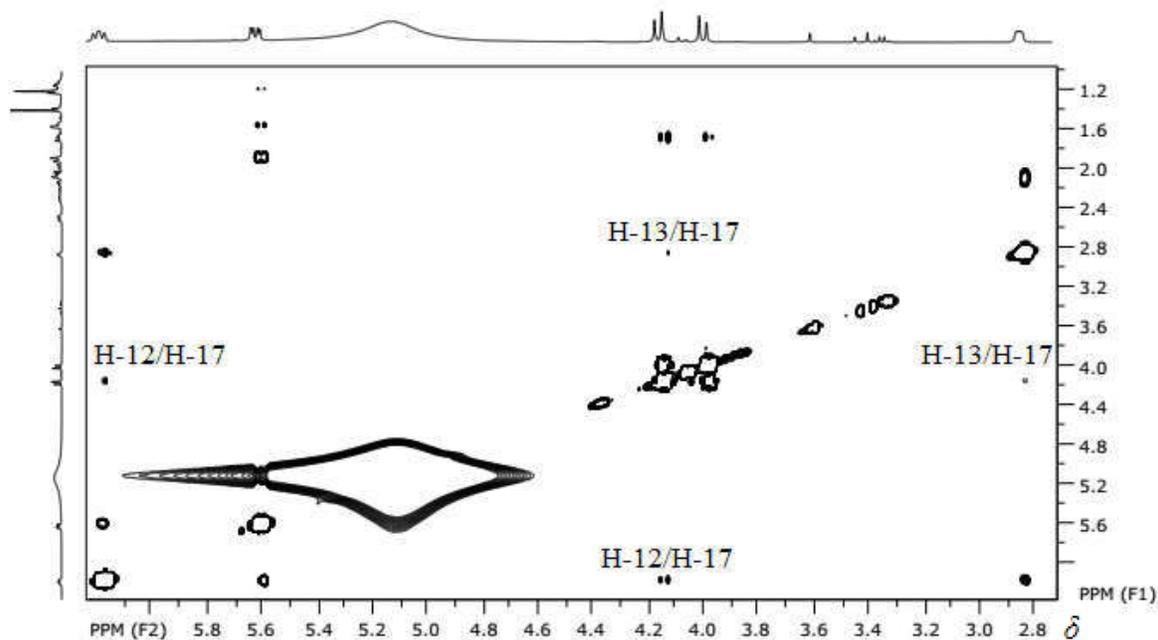


Figura 60 – Seção expandida do mapa de contornos NOESY do composto **99** ampliado na região de 2,6 a 6,2 ppm (400 MHz, piridina- d_5).

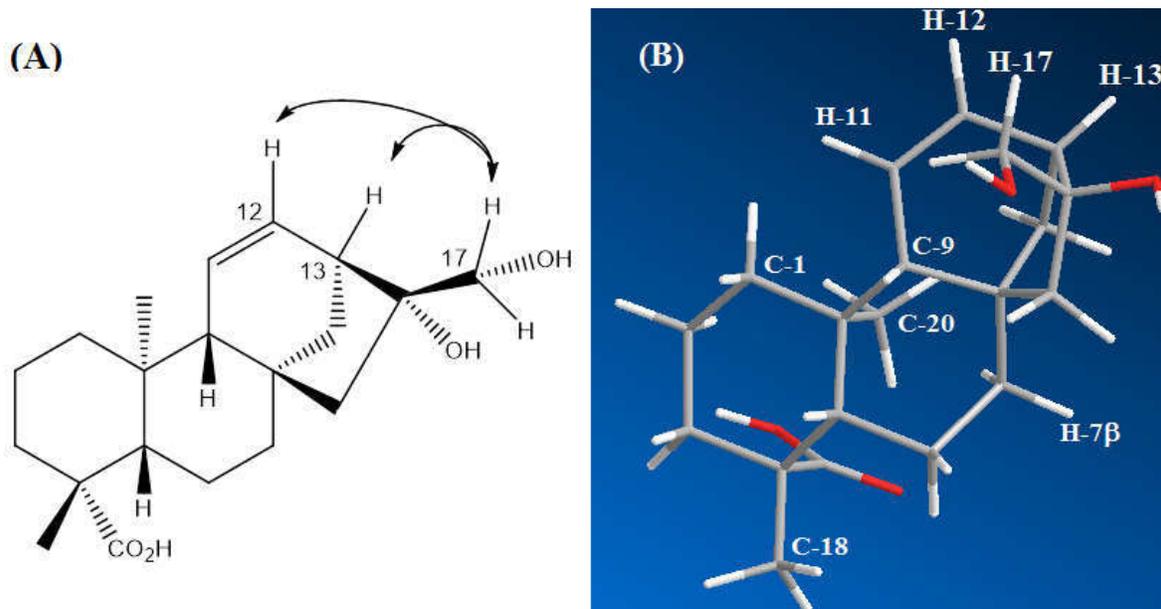


Figura 61 – Estrutura química do composto **99**. (A) Correlação NOESY entre os hidrogênios H-12 e H-13 com H-17; (B) Estrutura tridimensional.

Tabela 7 – Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C e correlações HMBC do composto ácido 16 α ,17-di-hidroxicaur-11-en-19-oico (**99**) (piridina- d_5)

Posição	δ_c	δ_H (J in Hz)	HBMC	NOESY
1 α	40,6	1,88 (m; 1H)		
1 β		1,12 (m; 1H)		H-3 β
2 α	20,1	2,29 (dt; 3,7 e 13,7; 1H)	C-3, C-1	H-2 β
2 β		1,52 (m; 1H)		H-2 α
3 α	39,0	1,13 (m, 1H)		
3 β		2,48 (d; 13,1; 1H)	C-2, C-4, C-5	H-1 β , H-2 β , H-18
4	44,3	-		
5	56,2	1,20 (m; 1H)	C-4, C-6, C-1, C-19, C-20	
6 α	23,1	2,20 (m; 1H)		H-20
6 β		2,06 (m; 1H)		H-18
7 α	42,3	1,96 (m; 1H)	C-5, C-6, C-8, C-9, C-14	H-14b
7 β		1,64 (m; 1H)		
8	43,4	-		
9	61,9	1,55 (m; 1H)		H-11
10	39,6	-		
11	128,0	5,64 (dd; 3,6 e 9,8; 1H)	C-7, C-8, C-9, C-10, C-13, C-14, C-16	H-1 α , H-1 β , H-9, H-12
12	133,1	6,21 (dd; 6,4 e 9,8; 1H)	C-9, C-13, C-14	H-11, H-13, H-17
13	47,6	2,86 (dd; 3,4 e 6,4; 1H)	C-8, C-11, C-12, C-15, C-16	H-12, H-14a, H-17b
14a	35,0	2,04 (m; 1H)		
14b		2,13 (dd; 3,4 e 10,6; 1H)	C-7, C-8, C-9, C-12, C-13	H-7 α
15 α	55,3	1,88 (m; 1H)		
15 β		1,67 (m; 1H)		
16	87,2	-		
17a	67,9	4,01 (d; 10,6; 1H)	C-13, C-15, C-16	H-15 β , H-17b
17b		4,17 (d; 10,6; 1H)	C-13, C-15	H-12, H-13, H-15 β , H-17a
18	29,7	1,38 (s; 3H)	C-2, C-3, C-4, C-5, C-19	H-3 β , H-6 β
19	180,4	-		
20	16,4	1,18 (s; 3H)	C-5, C-9, C-10	H-6 α , H-7 α

O composto **99**, até o momento ainda não havia sido relatado na literatura. Um diterpeno com estrutura parecida, porém hidrogenado em C-11/C-12 foi isolado de *Annona reticulata* (ETSE et al., 1987). Um diterpeno caurânico contendo a ligação dupla em C-11/C-12, porém não hidroxilado em C-17 foi isolado de *Croton floribundus* (**102**) (Figura 62, pág. 69) (UCHÔA et al., 2013).

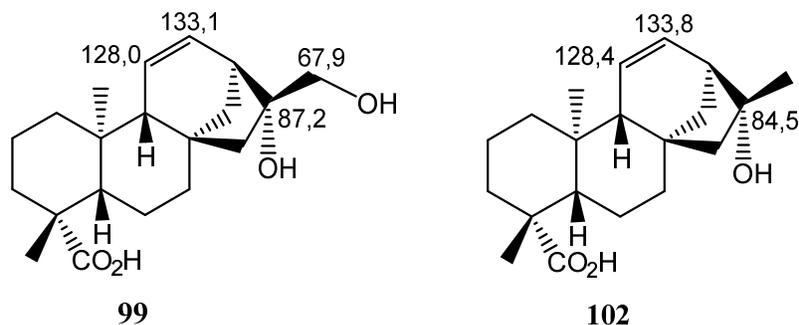


Figura 62 – Estrutura química e dados de RMN de ^{13}C de alguns carbonos do produto **99** e do derivado **102** (UCHÔA et al., 2013).

Os dados de RMN de ^{13}C do substrato **81** e dos produtos **97**, **98** e **99** estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 – Dados de RMN de ^{13}C do ácido traquilobânico (**81**) e produtos de biotransformação deste por *S. racemosum* (**81** em CDCl_3 ; **97**, **98** e **99** em piridina- d_5)

Posição	δ_c (ppm)			
	81	97	98	99
1	39,6	40,1	40,0	42,3
2	18,9	19,7	19,7	20,1
3	38,0	39,0	38,9	39,0
4	43,9	44,1	44,2	44,4
5	57,2	57,2	57,0	56,2
6	21,9	22,8	22,8	23,1
7	39,4	39,9	39,5	40,6
8	40,9	41,1	41,0	43,4
9	53,0	53,4	52,4	61,9
10	39,1	39,5	39,5	39,6
11	20,0	20,3	20,0	128,0
12	20,8	19,2	24,8	133,1
13	24,5	22,7	30,8	47,6
14	33,3	33,5	32,8	35,0
15	50,6	46,9	44,7	55,3
16	22,6	30,7	30,9	87,2
17	20,8	66,8	177,7	67,9
18	29,1	29,6	29,6	29,7
19	185,0	180,3	180,4	180,4
20	12,6	13,2	13,3	16,4

3.3.6. Bioensaio de inibição da acetilcolinesterase (AChE)

Foi realizado o bioensaio de inibição da AChE com os produtos de biotransformação **95**, **96**, **97**, **98**, **99** e com o substrato **81** para comparação. Os reagentes foram adicionados na placa de Elisa e a absorbância foi mensurada sem e com a adição da AChE. Os valores de absorbância foram processados e foram calculadas as porcentagens de inibição desses compostos (Figura 63). Nas concentrações de 10 mg/mL, todos os compostos apresentaram uma atividade de inibição superior a do ácido traquilobânico (**81**) ($52,23 \pm 4,1$ %), exceto o produto **95** ($51,95 \pm 1,9$ %), entretanto, os três compostos inéditos (**96**, **98** e **99**) apresentaram atividade de inibição superior a 80%. O composto **96** foi o único composto testado a apresentar atividade de inibição acima de 90% ($92,89 \pm 0,2$ %). Portanto, foi realizado um bioensaio para avaliar o IC_{50} com o composto **96** nas concentrações de 10; 5; 2,5; 1,25 e 0,75 mg/mL (Figura 64, pág. 71). O composto **96**, apresentou $IC_{50} = 1,17$ mg/mL. O cálculo de IC_{50} no bioensaio de inibição da AChE para o composto **96** foi realizado através do gráfico pelo software Origin®.

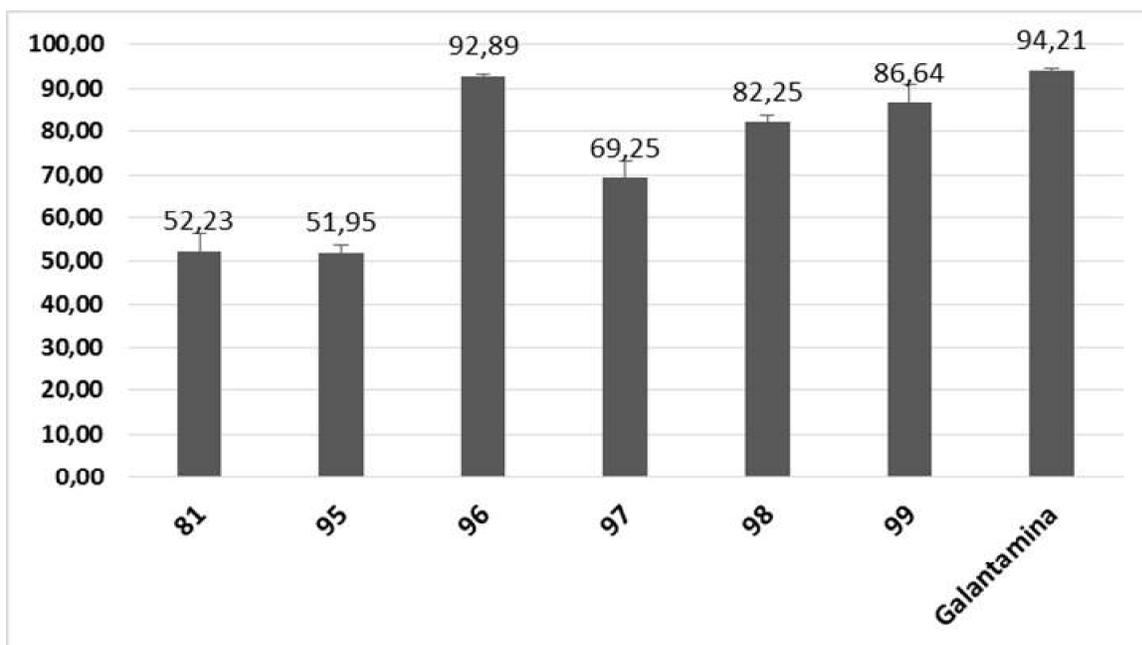


Figura 63 – Porcentagem de inibição da AChE pelos compostos **81**, **95**, **96**, **97**, **98**, **99** e galantamina como controle.

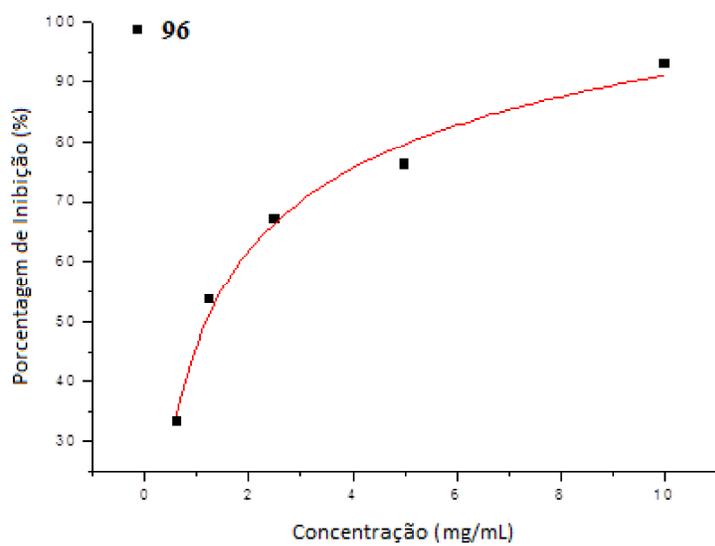


Figura 64 – Perfil de inibição da AChE por **96** nas concentrações de 10; 5; 2,5; 1,25 e 0,75 mg/mL.

4. Estudo dos mutantes *Δbcaba1*, *Δbcaba2*, *Δbcaba3* e *Δbcaba4*

4.1. Introdução

Diversos micro-organismos são conhecidos pela capacidade de produzir hormônios de plantas, sendo que, provavelmente, o exemplo mais conhecido seja a produção das giberelinas pelo fungo *Gibberella fujikuroi* (SIEWERS et al., 2006).

O ácido abscísico (ABA) (**80**) (Figura 65) é um sesquiterpeno conhecido como hormônio de plantas, sendo produzido por fungos dos gêneros *Cercospora*, *Ceratocystis*, *Fusarium*, *Rhizoctonia* e *Botrytis* (CAO et al., 2011; COLLADO & VIAUD, 2016). Na China, fermentações de *B. cinerea* são usadas para a produção industrial de ABA.

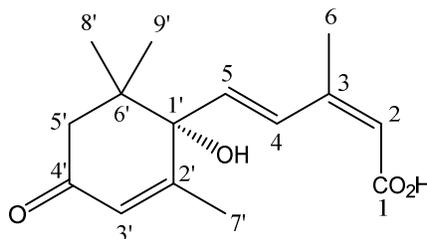


Figura 65 – Estrutura química do ácido abscísico (**80**).

ABA é um hormônio de planta associado à resposta ao estresse abiótico, principalmente à seca, atuando também em resposta das plantas a patógenos (SIVAKUMARAN et al., 2016). Diferente de outros hormônios que promovem crescimento, ABA está relacionado com a inibição do crescimento de plantas em determinadas épocas do ano, favorecendo para que diversas plantas possam estabelecer-se em lugares com condições e climas desfavoráveis, além de acarretar dormência das sementes, para que não germinem em condições desfavoráveis (DÖRFFLING, 2015). Além do ABA, alguns sesquiterpenos derivados dessa classe de compostos foram isolados de *B. cinerea*, como o 1',4'-

trans-ABA-diol (**103**), γ -abscisolactona (**104**), ácido botritisico A (**105**) e ácido botritisico B (**106**) (Figura 66) (WANG et al., 2008; COLLADO & VIAUD, 2016).

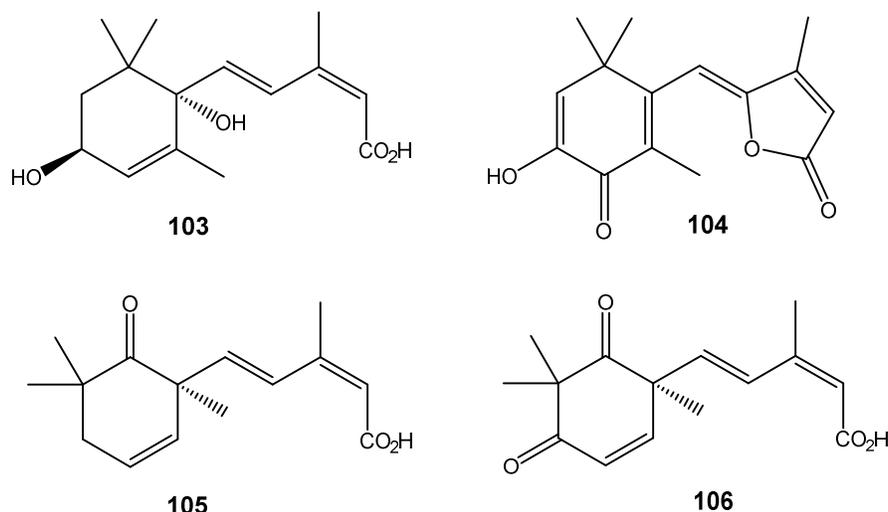


Figura 66 – Estrutura química dos derivados **103-106** do ácido abscísico (**80**).

A biossíntese de ABA por plantas é amplamente conhecida, sendo o composto produzido a partir da junção de duas unidades de pirofosfato de geranylgeranila, na rota biossintética dos carotenoides, como mostrado na Figura 67 (pág. 74) (SEO & KOSHIMA, 2012). Sendo assim, estudos da biossíntese de ABA identificaram um *cluster* de pelo menos quatro genes responsáveis por esta via em *B. cinerea*: dois genes que codificam a monooxigenase P450 (*bcaba1* e *bcaba2*), um gene até o momento desconhecido quanto à sua participação na biossíntese (*bcaba3*) e um gene que codifica provavelmente uma desidrogenase/reductase de cadeia curta (*bcaba4*) (SIEWERS et al., 2006). Até o momento, a sesquiterpeno ciclase envolvida na biossíntese de ABA não foi identificada e pode estar em um *cluster* diferente de genes. Entretanto, estudos recentes desses genes comprovam que a biossíntese de ABA por fungos não acontece como nas plantas.

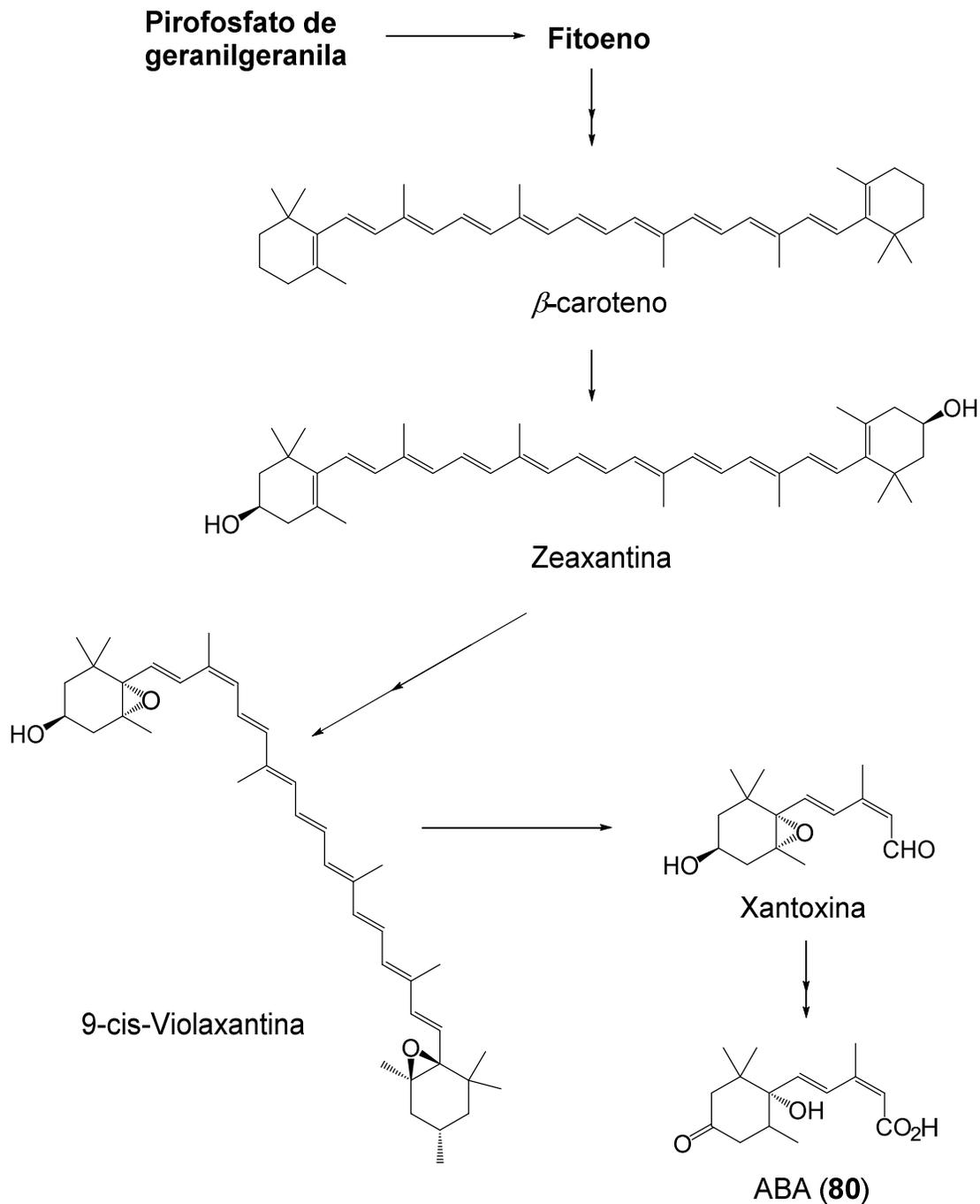


Figura 67 – Rota biossintética de ABA por plantas.

O estudo da rota biossintética de ABA por *B. cinerea* foi realizado por Inomata et al. (2004), segundo os quais a biossíntese desse composto acontece pela via do ionilideneetano, que é uma via direta e diferente da rota dos carotenoides. Por meio de marcação isotópica com $^{18}\text{O}_2$ e H_2^{18}O , os intermediários

4.2. Métodos experimentais

4.2.1. Reagentes e materiais cromatográficos

Cromatografia em camada delgada: Placas de sílica gel Merck com indicador fluorescente.

Cromatografia em coluna: Sílica gel Merck de 60-200 micrometros.

Solventes: Solventes PA Merck®, Synth®, Vetex®, Reagen® e outros; solventes deuterados Merck® e Aldrich® (98,0 – 99,9 %).

Meio de cultura Batata-Dextrose: Himedia®

Revelador vanilina: Solução de ácido sulfúrico, etanol 96% e vanilina, em proporção 4:29:2.

4.2.2. Equipamentos

Espectrômetros de RMN: Agilent Inova 400 MHz, Agilent Inova 500 MHz e Agilent Inova 600 MHz.

Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE): Merck Hitach LaChrom com detector de IR Hitach L-2490 e detector UV L-2400.

Cromatógrafo líquido acoplado à espectrometria de massas (CL-MS/MS): LCQ THERMO com ionização electrospray (ESI) em modo positivo e negativo e analisador de armadilha de íons (IT).

Autoclave: Selecta

4.2.3. Metodologia

As cepas mutantes *Δbcaba1*, *Δbcaba2*, *Δbcaba3* e *Δbcaba4* foram elaboradas pela professora Muriel Viaud (INRA, BIOGER, Thiverval-Grignon, França). Os mutantes foram inoculados em placas de petri contendo meio sólido BDA e, após 7 dias de crescimento, foram inoculados em 40 frascos roux com 150 mL de meio líquido BD (Batata-Dextrose) (Himedia®) para cada mutante e

mantidos em estufa com controle de iluminação (foto período de 12 h) e controle de temperatura (22 °C). Após o crescimento por 17 dias, os micélios foram filtrados a vácuo, e as fases aquosas foram extraídas por quatro vezes cada com acetato de etila. O solvente foi eliminado em evaporador rotatório e os extratos resultantes foram pesados e armazenados.

O extrato resultante da cepa mutante *Δbcaba1* (1,100 g) foi submetido à coluna cromatográfica clássica utilizando hexano, acetato de etila e metanol em gradiente de polaridade, sendo retirado um total de 80 frações. As frações 60 a 70 (109 mg) foram reunidas e foi submetida a uma nova coluna cromatográfica com gradiente de hexano-acetato de etila. Desta nova coluna, as frações 35 a 39 (17 mg) foram reunidas e a fração resultante foi injetada em HPLC semipreparativo (coluna LiChroCart® de fase normal) em fase isocrática (hexano-acetato de etila 40%) com um fluxo de 3 mL/min. O intermediário **bcaba1-3-7 (110)** (tr= 33 min) (1,92 mg) se mostrou puro e foi submetido a análise por RMN de 1D e 2D para elucidação estrutural.

O extrato resultante da cepa mutante *Δbcaba2* (990,90 mg) foi submetido a fracionamento em coluna cromatográfica usando como eluente hexano, acetato de etila e metanol em gradiente de polaridade. Desta coluna foram obtidas as frações em hexano-acetato de etila 20% (8,29 mg), hexano-acetato de etila 40% (71,58 mg), hexano-acetato de etila 60 % (247 mg), hexano-acetato de etila 80 % (104 mg), acetato de etila-metanol 10% (167 mg), acetato de etila-metanol 40 % (133 mg) e metanol 100% (228 mg). Todas as frações foram analisadas por RMN de ¹H para verificar a presença de intermediários de ABA. A fração resultante da eluição em acetato de etila-metanol 10% se mostrou promissora e foi novamente submetida à coluna cromatográfica com fase isocrática (hexano-acetato de etila 60%), sendo isolado **bcaba2-4 (111)** (6,76 mg).

O extrato do mutante *Δbcaba3* (2,02 g) foi submetido a fracionamento em coluna cromatográfica usando como eluente hexano, acetato de etila e metanol em gradiente de polaridade. Desta coluna foram obtidas as frações em hexano-acetato de etila 20% (18 mg), hexano-acetato de etila 60% (806,84 mg), hexano-acetato de etila 90% (368,67 mg), acetato de etila-metanol 40% (451

mg) e metanol 100% (347 mg). As frações obtidas foram submetidas a colunas cromatográficas e foram analisadas por RMN de ^1H . Entretanto, não foi possível detectar intermediário biossintético de ABA no mutante $\Delta bcaba3$.

O extrato do mutante $\Delta bcaba4$ (1,400 g) foi submetido à coluna cromatográfica clássica com fase móvel gradiente, porém o estudo das frações não resultou no isolamento de intermediário biossintético de ABA até o momento. O trabalho continua sendo desenvolvido pela doutoranda Inmaculada Izquierdo Bueno, filiada à Universidad de Cádiz.

4.3. Resultados e discussões

Com o estudo dos metabólitos secundários das cepas mutantes $\Delta bcaba1-4$ foram isolados dois compostos puros, que posteriormente, foram classificados como derivados do ABA e possíveis intermediários biossintéticos. A partir do estudo cromatográfico do extrato resultante da cepa mutante $\Delta bcaba1$ foi possível isolar o composto bcaba1-3-7 (**110**) e, a partir do estudo do extrato resultante da cepa mutante $\Delta bcaba2$, foi possível o isolamento do composto bcaba2-4 (**111**). Com o estudo da cepa mutante $\Delta bcaba3$ não foi possível detectar derivado de ABA. Da cepa mutante $\Delta bcaba4$ foram identificados derivados de ABA em mistura com outros compostos nos extratos, através de RMN de ^1H , porém os compostos ainda não foram purificados e elucidados. O estudo do extrato resultante da cepa mutante $\Delta bcaba4$ continua sendo realizado pela Ms. Inmaculada Izquierdo Bueno. Todos os intermediários isolados (Figura 69, pág. 79) foram elucidados e caracterizados por RMN de 1D e 2D para confirmação estrutural.

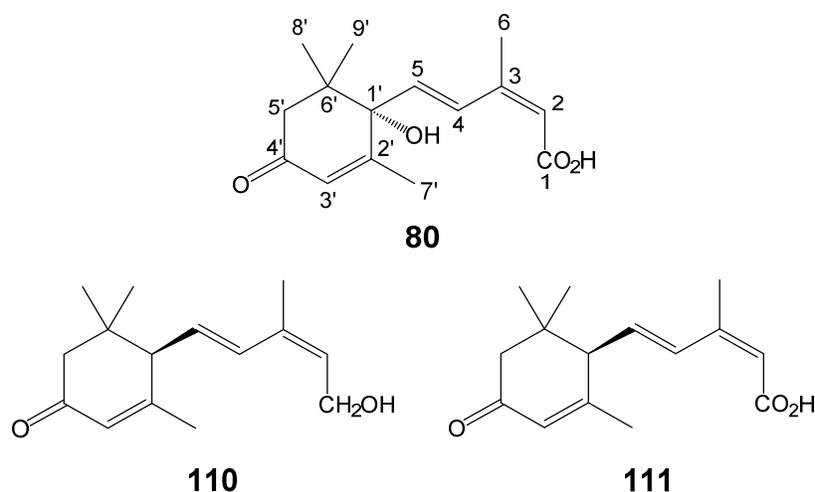


Figura 69 – Estrutura química dos intermediários **110** e **111** isolados das cepas mutantes $\Delta bcaba1$ e $\Delta bcaba2$, respectivamente, e do ácido abscísico (**80**).

4.3.1. Elucidação estrutural do bcaba1-3-7 (**110**)

O composto bcaba1-3-7 (**110**), foi isolado por HPLC como um óleo incolor (1,92 mg). A partir do espectro de RMN de ^1H (Figura 70, pág. 80) se observaram quatro simpletos referentes aos hidrogênios metílicos H-8', H-9', H-6 e H-7', em δ 0,96; 1,05; 1,86 e 1,90 ppm, respectivamente. No espectro observou-se um duplete, integrado para dois hidrogênios, em δ 4,30 ppm, referente ao H-1, que deve ser um CH_2OH . Também observaram-se os sinais dos hidrogênios olefínicos H-2, H-4, H-5 e H-3' encontrados entre δ 5,57 a 6,55 ppm. No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 71, pág. 80) foram observados seis sinais de carbonos olefínicos de C-3', C-2, C-4, C-5, C-3 e C-2' em δ 125,8; 128,2; 128,8; 130,1; 134,8 e 161,9 ppm, respectivamente; um sinal de carbono carbonílico C-4' em δ 199,2 ppm, e quatro sinais de carbonos metílicos em δ 20,6; 23,6; 27,3 e 27,9 ppm.

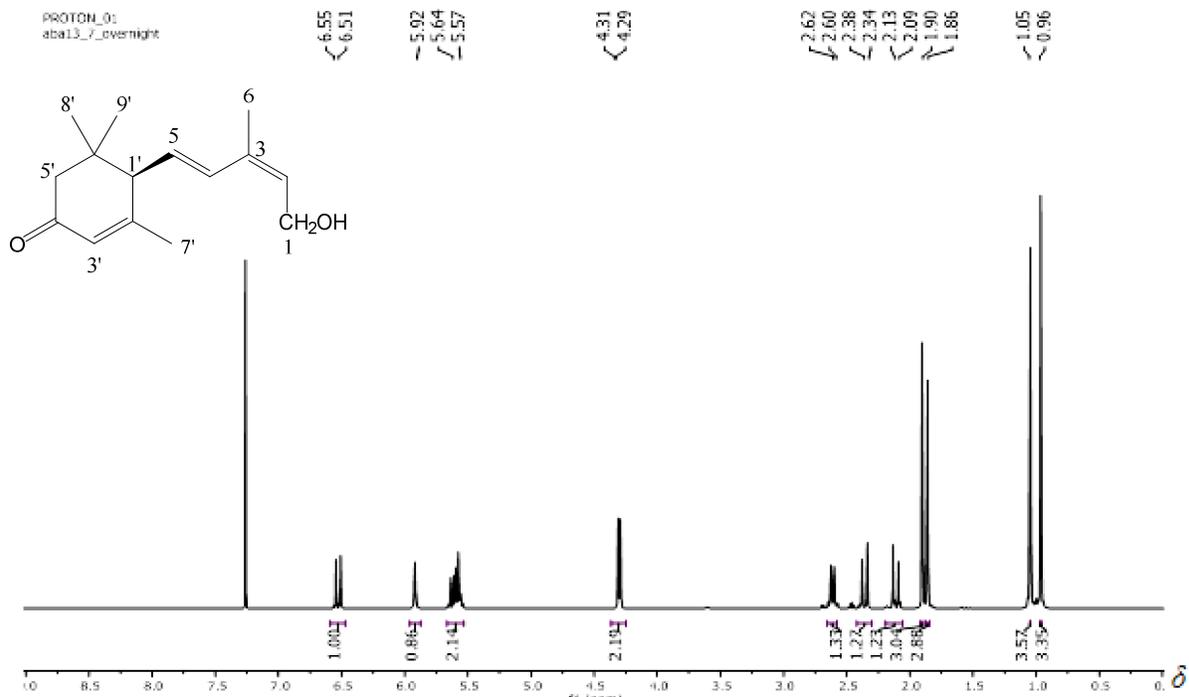


Figura 70 – Espectro de RMN de ¹H do bcaba1-3-7 (110) (500 MHz, CDCl₃).

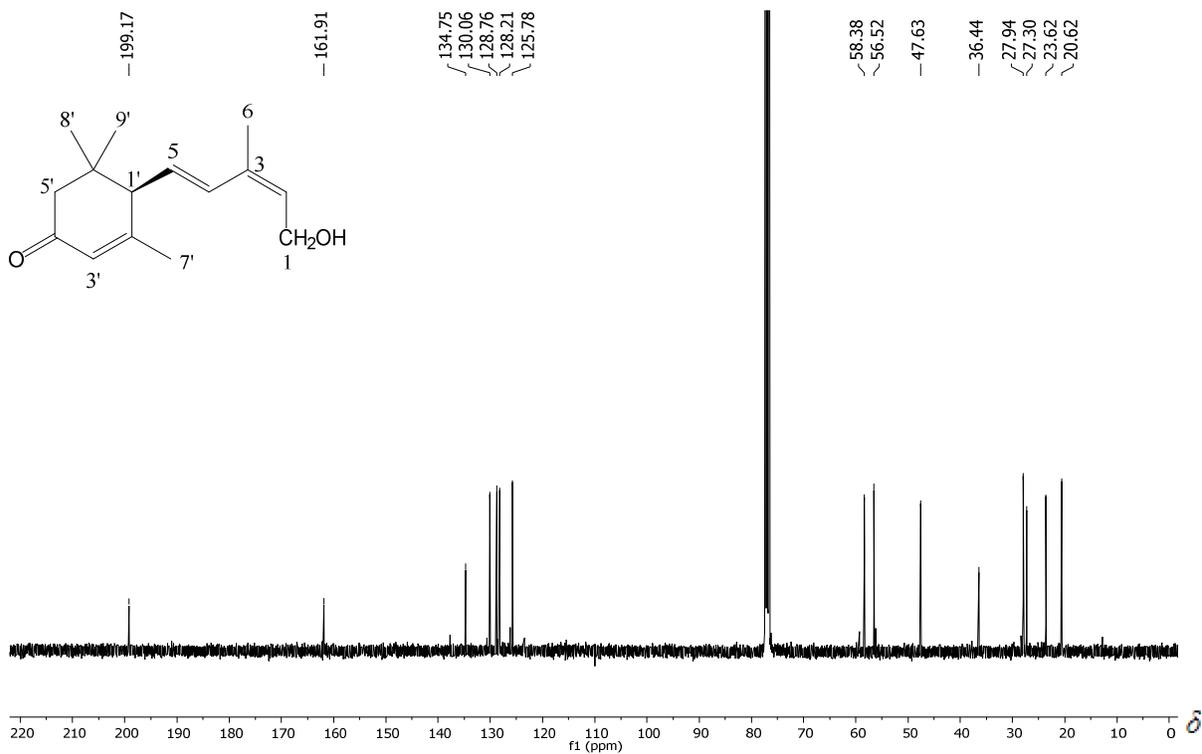


Figura 71 – Espectro de RMN de ¹³C do bcaba1-3-7 (110) (125 MHz, CDCl₃).

Com a interpretação do mapa de contornos HMBC observaram-se as correlações entre H-2 e C-3, C-4 e C-6; H-5 com C-3, C-4, C-6 e C-1'; e H-1' com C-4, C-5, C-2', C-3' e C-5'; entre outras, reforçando a identificação do composto. A partir das análises de RMN de 1D e 2D, foi possível identificar o composto **110** como um intermediário biossintético de ABA. Na Tabela 8 é apresentado a atribuição completa de RMN. Os mapas de contornos COSY, HSQC e HMBC são apresentados no anexo (Figuras A17-A19, pág. 156 e 157).

Neste intermediário, comparado com o ácido abscísico (**80**), não se observou a hidroxila na posição C-1', além da posição C-1 encontrar-se hidroxilada, e não como um grupo carboxila, como encontrado no composto **80**.

Tabela 3 – Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C e correlações HMBC para o composto bcaba1-3-7 (**110**) (CDCl_3)

Posição	δ_{C}	δ_{H} (J em Hz)	HMBC
1	58,4	4,30 (d, $J = 7,0$, 2H)	C-2, C-3
2	128,2	5,58 (sobreposto, 1H)	C-3, C-4, C-6
3	134,8	-	-
4	128,8	5,61 (sobreposto, 1H)	
5	130,1	6,53 (d, $J = 15,3$, 1H)	C-3, C-4, C-6, C-1'
6	20,6	1,86 (s, 3H)	C-2, C-3, C-5
1'	56,5	2,61 (d, $J = 9,6$, 1H)	C-4, C-5, C-2', C-3', C-5'
2'	161,9	-	-
3'	125,8	5,92 (s, 1H)	C-1', C-5'
4'	199,2	-	-
5'	47,6	2,11 (d, $J = 16,8$, 1H) 2,36 (d, $J = 16,8$, 1H)	C-1', C-2', C-4', C-6', C-8', C-9' C-1', C-4', C-6', C-8', C-9'
6'	36,4	-	-
7'	23,6	1,90 (d, $J = 1,3$, 3H)	C-2', C-3'
8'	27,3	0,96 (s, 3H)	C-1', C-5', C-6', C-9'
9'	27,9	1,05 (s, 3H)	C-1', C-5', C-6', C-8'

4.3.2. Elucidação estrutural do bcaba2-4 (111) de *Δbcaba2*

O composto bcaba2-4 (**111**) foi isolado por fracionamento em coluna clássica como um óleo incolor (6,76 mg). No espectro de RMN de ^1H (Figura 72) foi possível identificar quatro simpletos referentes aos hidrogênios metílicos H-8', H-9', H-7' e H-6 encontrados em δ 0,97; 1,06; 1,91 e 2,03 ppm, respectivamente. Também foi possível observar que esse composto não possui hidrogênio ligado a carbono carbinólico. Os sinais de RMN de ^1H dos hidrogênios olefínicos H-2, H-4, H-5 e H-3' foram encontrados entre δ 5,73 a 7,70 ppm. No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 73, pág. 83) observaram-se o sinal de carbono carbonílico C-4' em δ 199,3 ppm, os seis sinais dos carbonos olefínicos C-2, C-3, C-4, C-5, C-2' e C-3' em δ 117,0; 152,5; 131,5; 135,4; 161,8 e 126,2 ppm, respectivamente.

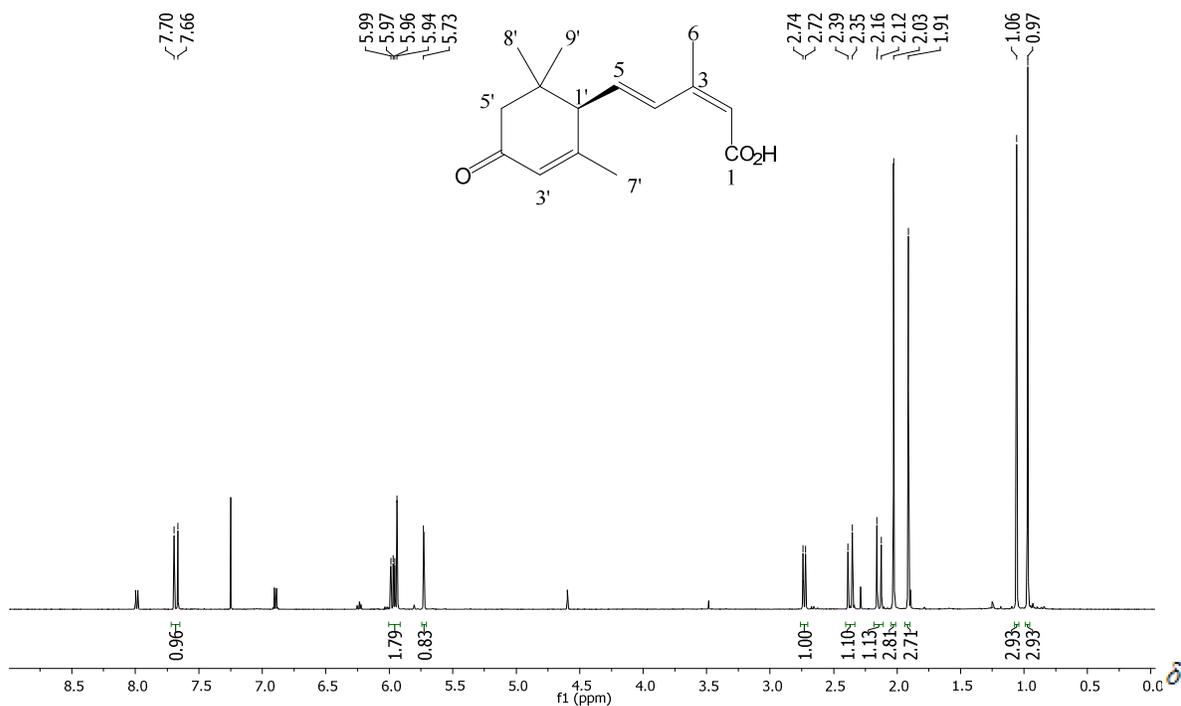


Figura 72 – Espectro de RMN de ^1H do bcaba2-4 (**111**) (500 MHz, CDCl_3).

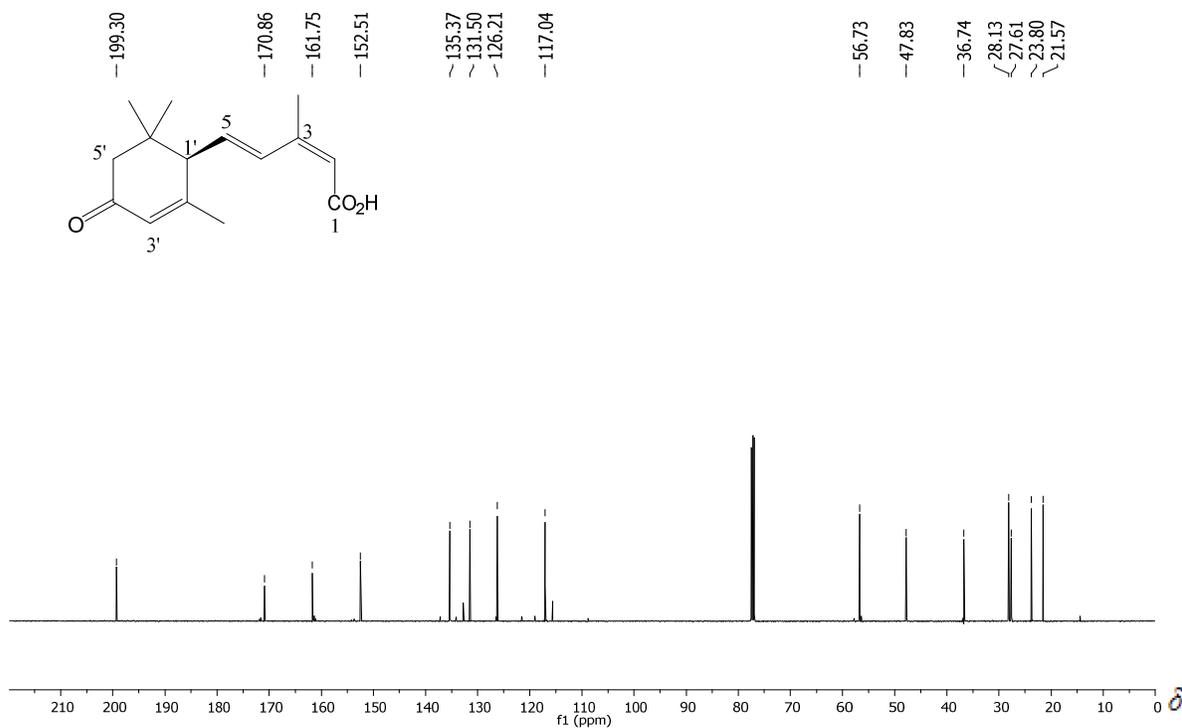


Figura 73 – Espectro de RMN de ^{13}C do aba2-4 (**111**) (125 MHz, CDCl_3).

Por meio da análise do mapa de contornos HMBC foram verificados as correlações dos hidrogênios com os carbonos, possibilitando todas as atribuições de RMN de ^1H e de ^{13}C para o composto **111** (Tabela 9, pág. 84).

Por meio das atribuições de RMN de 1D e 2D foi possível constatar que o composto **111** é um intermediário biossintético de ABA. Os mapas de contornos COSY, HSQC e HMBC para o composto **111** são apresentados no anexo (Figuras A20-A22, pág. 157 e 158).

Com o isolamento do composto **111** na cepa mutante $\Delta bcaba2$, pode-se sugerir que o gene *bcaba2* é responsável pela hidroxilação na posição 1' na biossíntese de **80**.

Tabela 4 – Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C e correlações HMBC para o composto *bcaba2-4* (**111**) (CDCl_3)

Posição	δ_{C}	δ_{H} (J em Hz)	HMBC
1	170,9	-	
2	117,0	5,73 (s, 1H)	C-1, C-3, C-4, C-6
3	152,5	-	
4	131,5	7,68 (d, J = 15,7, 1H)	C-2, C-3, C-6, C-1'
5	135,4	5,97 (m, 1H)	
6	21,6	2,03 (d, J = 1,2, 3H)	C-2, C-3, C-4
1'	56,7	2,73 (d, J = 9,6, 1H)	C-4, C-5, C-2', C-3', C-5', C-6', C-7', C-9'
2'	161,8	-	
3'	126,2	5,94 (d, J = 0,5, 1H)	
4'	199,3	-	
5'	47,8	2,14 (d, J = 16,9, 1H)	C-1', C-3', C-4', C-6', C-8'
		2,37 (d, J = 16,9, 1H)	C-1', C-4', C-6', C-9'
6'	36,7	-	
7'	23,8	1,91 (d, J = 1,2, 3H)	C-1', C-2', C-3'
8'	27,6	0,97 (s, 3H)	C-1', C-5', C-6', C-9'
9'	28,1	1,06 (s, 3H)	C-1', C-5', C-6', C-8'

4.3.3. Biossíntese de ácido abscísico

A partir dos intermediários isolados dos mutantes empregados foi possível propor uma relação entre os genes estudados na rota biossintética do ácido abscísico (Figura 74, pág. 85). A formação do ionilideneetano ocorreria por meio de uma sesquiterpeno ciclase (STC5) atualmente desconhecida. O gene *bcaba1* atuaria na oxidação do grupamento álcool da posição C-1 para formar o ácido intermediário, enquanto o gene *bcaba2* atuaria na hidroxilação na posição C-1' para a formação do ácido abscísico. Os papéis dos genes *bcaba3* e *bcaba4* não puderam ser relatados até o momento.

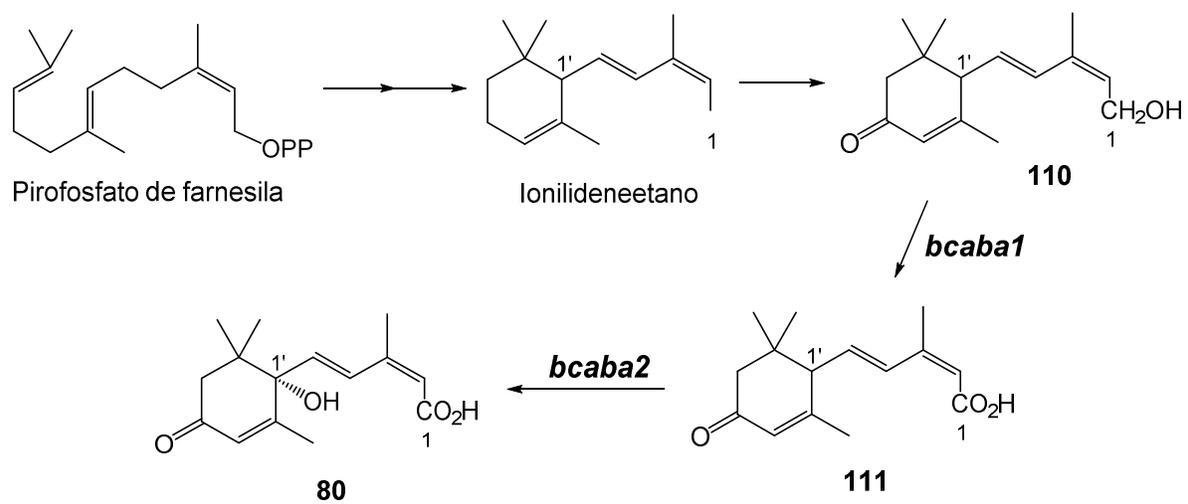


Figura 74 – Proposta biossintética de ABA (**80**) a partir dos intermediários **110** e **111** isolados.

5. Estudo do mutante $\Delta bcbot4$

5.1. Introdução

Como mencionado anteriormente, *B. cinerea* é um fitopatógeno de diversas espécies de plantas conhecido como podridão cinzenta, sendo o segundo maior patógeno do mundo, causando menos danos apenas que o patógeno de arroz *Magnaporthe oryzae* (DEAN et al., 2012). As despesas no controle de *B. cinerea*, no âmbito mundial, ultrapassa facilmente o montante de um bilhão de euros por ano (DEAN et al., 2012). Como mecanismo de ataque, *B. cinerea* produz diversas fitotoxinas para degradar o tecido vegetal. Dessa maneira, o fungo consegue penetrar o hospedeiro e extrair seus nutrientes. Entre as diversas toxinas produzidas por essa espécie, o botridial (**50**) (Figura 75) é o mais importante e também o que apresenta a maior toxicidade (COLLADO & VIAUD, 2016). Em um estudo realizado pelo grupo do Dr. Isidro Collado (Departamento de Química Orgânica, Universidad de Cádiz - Espanha), o composto botridial foi administrado em folhas de *Phaseolus vulgaris* em diferentes concentrações, mostrando que botridial apresenta uma elevada toxicidade em solução a 250 ppm. Além de toxicidade em concentrações de até 100 ppm (Dados não publicados). Desse modo, pôde-se confirmar a grande toxicidade de botridial isolado de *B. cinerea* para degradar o tecido vegetal.

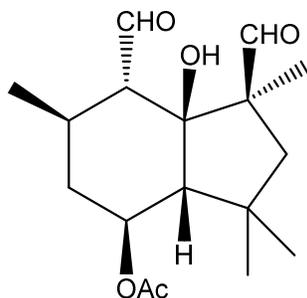


Figura 75 – Estrutura química de botridial (**50**).

O sequenciamento do genoma de *B. cinerea* revelou 40 *clusters* de genes responsáveis pela biossíntese de diversas classes de metabólitos secundários, indicando o potencial desse fungo em produzir muitos metabólitos até o momento não descritos (COLLADO & VIAUD, 2016).

Pesquisas realizadas permitiram identificar um destes 40 *clusters*, constituído pelos genes *bcbot1-5*, responsável pela biossíntese do botridial (**50**). A partir do estudo dos mutantes nulos nestes genes foram isolados todos os intermediários biossintéticos do botridial (MORAGA et al., 2016). Assim, pôde-se propor a rota biossintética e atribuir as funções de cada gene na produção desse composto (Figura 76, pág. 88) (MORAGA et al., 2016). Nesta proposta, o gene *bcbot2* foi atribuído à etapa de ciclização do pirofosfato de farnesila, dando início ao primeiro composto (**112**) da classe dos botridianos. Na sequência, *bcbot4* se mostrou responsável pela hidroxilação em C-4 do sesquiterpeno; o gene *bcbot1* foi responsável pela hidroxilação em C-15; o gene *bcbot3* foi responsável pela hidroxilação em C-10; e o gene *bcbot5* foi responsável pela acetilação da hidroxila em C-4.

A partir desta proposta de biossíntese do botridial, a quebra desta rota pode afetar a produção de metabólitos crípticos (metabólitos secundários não produzidos em condições normais de cultivo) dos mutantes. O que motivou o estudo dos metabólitos crípticos produzidos com a anulação do gene *bcbot4*.

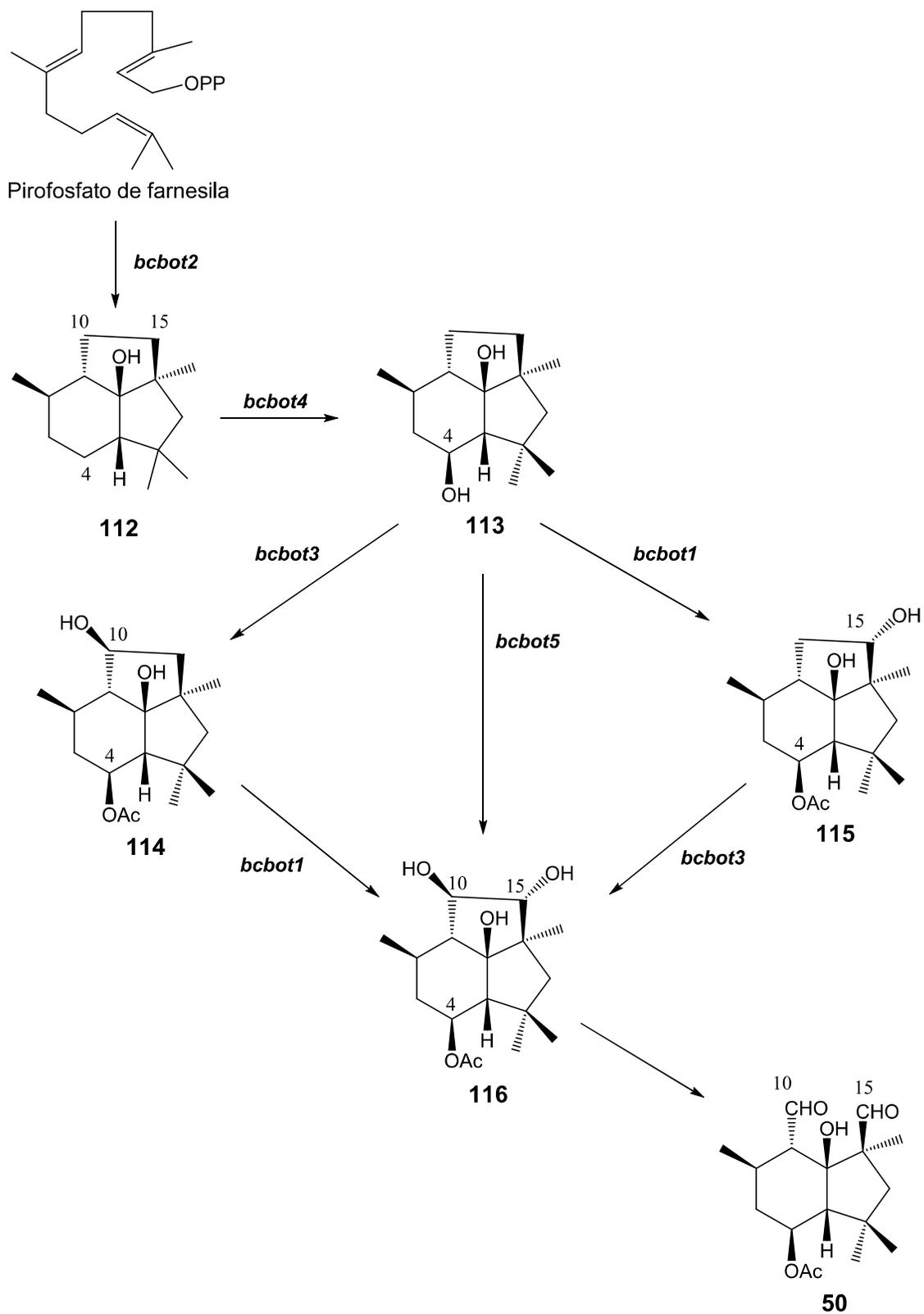


Figura 76 – Rota biossintética do botridial (**50**) por *B. cinerea* (MORAGA et al., 2016).

5.2. Métodos experimentais

5.2.1. Reagentes e materiais cromatográficos

Como descrito no item 4.2.1. (pág. 76)

Meio de cultura ágar-malte: *D*-glicose (20 g/L), malte (20 g/L), peptona (1 g/L) e ágar (20 g/L) em água destilada.

5.2.2. Equipamentos

Como descrito no item 4.2.2. (pág. 76)

5.2.3. Metodologia

A cepa mutante *Δbcbot4* (MORAGA et al., 2016) de *Botrytis cinerea* foi cultivada em 200 placas de Petri de 15 cm de diâmetro com 100 mL de meio sólido ágar-malte por 17 dias. Após o tempo de crescimento, os meios sólidos com fungo foram transferidos para frascos erlenmeyers e extraído com acetato de etila (suficiente para cobrir o fungo) por 24 horas. O solvente foi concentrado em evaporador rotatório e o extrato foi pesado (6,68 g) e armazenado. Com o extrato foi realizado um fracionamento em coluna de sílica usando como eluente hexano, acetato de etila e metanol. Foram obtidas frações com os eluentes hexano 100% (5,33 mg), hexano-acetato de etila 30% (1,71 g), hexano-acetato de etila 60% (2,08 g), hexano-acetato de etila 90% (1,25 g), acetato de etila-metanol 30% (1,30 g) e metanol 100% (303,83 mg).

Com a fração hexano-acetato de etila 30% (1,71 g) foi realizada uma coluna cromatográfica com gradiente de hexano 100% a metanol 100%, sendo retiradas 102 frações. As frações **A-59-67 (117)** (425,32 mg) e **A-68-72 (118)** (72,80 mg) foram submetidas à análise de RMN de ¹H e ¹³C para caracterização e foram identificadas como botcininas. A fração A-83-89 (30,62 mg) foi analisada em RMN de ¹H e submetida a outra coluna cromatográfica. Desta coluna, a fração B-

20-26 (24,40 mg) ainda impura foi submetida a uma nova coluna cromatográfica, e foi isolado o composto **C-8 (119)** (4,70 mg) como um sólido branco. Este composto foi analisado por RMN de 1D e 2D para caracterização.

Com a fração hexano-acetato de etila 60% (2,08 g) foi realizado um fracionamento em coluna com gradiente de hexano 100% a metanol 100%, sendo recolhidas no total 84 frações. Desta coluna, as frações **D-45-47 (120)** (33,65 mg) e **D-56-57 (121)** (45,73 mg) foram submetidas à análise de RMN de ^1H e de ^{13}C para caracterização e foram identificadas como duas botrilactonas.

Com a fração hexano-acetato de etila 90% (1,25 g) foi realizada uma coluna cromatográfica com gradiente de hexano 100% a metanol 100%, sendo retiradas um total de 68 frações. A fração E-62-63 (467,16 mg) foi fracionada em nova coluna cromatográfica em modo gradiente de hexano-acetato de etila 50% a metanol 100%, sendo obtidas 71 frações. A fração F-58-68 (303 mg) apresentou compostos majoritários de interesse em análise de RMN de ^1H . Uma nova coluna cromatográfica gradiente de hexano-acetato de etila 80% a metanol 100% com a fração F-58-68 resultou no isolamento dos compostos **G-17-19 (122)** (6,71 mg) e **G-49-54 (123)** (60 mg) que foram analisados por RMN de 1D e 2D para elucidação estrutural.

Com o fracionamento cromatográfico da fração E-54-59 (413 mg) em modo gradiente de hexano 100% a metanol 100% obtiveram-se cristais insolúveis em clorofórmio das frações H-48 a H-54. O composto **H-48-54 (124)** (93 mg) foi submetido à análise de RMN de 1D e 2D, além de uma recristalização em acetona-metanol 10% para obtenção de monocristais. Os monocristais foram enviados para análise de raios-X no laboratório de cristalografia da Universidad de Alicante. A fração E-64-68 (574,54 mg) foi submetida a uma nova cromatografia em coluna de fase gradiente de hexano-acetato de etila 40% a metanol 100%. A fração I-13-14 (80,94 mg) foi cromatografada em CLAE com fase móvel isocrática de hexano-acetato de etila 55%, utilizando uma coluna de fase normal com um fluxo de 3,5 mL/min, na qual as frações **J-2 (125)** (1,2 mg) e **J-8 (126)** (6,3 mg), recolhidas em 32 min e 53 min, respectivamente, foram identificadas como dois eremofilenos. A fração J_7 (43 min, 8,22 mg) foi injetada novamente em CLAE

analítico com fase móvel isocrática de hexano-acetato de etila 80% e fluxo de 3,5 mL/min e a fração **K-5 (127)** (0,32 mg) foi identificada como um sesquiterpeno não conhecido, porém, a pouca quantidade de amostra isolada, não permitiu as análises de RMN de 2D, e conseqüentemente, sua identificação. A fração I-4-12 foi submetida à cromatografia em fase móvel gradiente, utilizando como fase móvel uma mistura de hexano-acetato de etila 60% até metanol 100%. Dessa coluna foi obtida a fração **L-1 (128)** (2,68 mg) que foi submetida à análise de RMN de 1D e 2D para elucidação estrutural.

Com a fração E-41-49 (245 mg) foi realizada uma coluna cromatográfica, da qual a fração resultante M-42-47 (105 mg) foi submetida a outra coluna cromatográfica para purificação. A fração N-20-22 (102 mg) foi injetada em CLAE semipreparativo em fase isocrática de hexano-acetato de etila 55% com uma coluna de fase normal com fluxo de 3,5 mL/min, sendo que a fração **O-10 (129)** (23 mg) recolhida em 53 min foi submetida a análise de RMN 1D e 2D para elucidação estrutural. Com a fração E_50-53 foi feita uma cromatografia em coluna gradiente com hexano-acetato de etila 10% a metanol 100%. Sendo então isolado um composto nomeado **P-21-23 (130)** (3,27 mg). Esse composto foi submetido à análise de RMN de ^1H e de ^{13}C para elucidação, sendo então identificado como uma botcinina. Para os compostos isolados **119**, **124** e **129**, que não são descritos na literatura, foram adicionados os dados de infravermelho (IV) e espectro de massas de alta resolução (EMAR) abaixo.

7 α -hidroxicameronan-14,5-dioico 7,14-lactona (**119**). Sólido branco; P.F. 114 °C; $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ -28,97 (c 0,58 em CHCl_3); IV em filme) ν_{max} 2959, 1811, 1699 cm^{-1} ; EMAR (ESI): m/z 221,1541 $[\text{M}-\text{CO}_2+\text{H}]^+$ (calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{O}_2$ $[\text{M}-\text{CO}_2+\text{H}]^+$: 221,1542).

Presilfiperfolan-8 β ,10 β ,14-triol (**124**). Sólido branco; P.F. 162 °C; $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ -1,02 (c 10,5 em CH_3OH); IV (filme): ν_{max} 3293, 2948, 2874, 1455, 1047 cm^{-1} ; EMAR (ESI): m/z 219,1744 $[\text{M}-2\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$ (calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{23}\text{O}$ $[\text{M}-2\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$: 219,1749).

Cameroonan-7 α ,10 β ,14-triol (**129**). Óleo incolor; $[\alpha]_D^{20}$ -6,47 (c 9,15 em CHCl₃); IV (filme) ν_{max} 3364, 2957, 2870, 1731, 1455, 1043, 756 cm⁻¹; EMAR (ESI): m/z 219,1748 [M-2H₂O+H]⁺ (calculado para C₁₅H₂₃O [M-2H₂O+H]⁺: 219,1749).

5.3. Resultados e discussões

Com o estudo químico do mutante nulo $\Delta bcbot4$ foi possível o isolamento de diversos metabólitos secundários, sendo que alguns desses compostos são crípticos quando *B. cinerea* não apresenta nenhum gene silenciado e alguns desses compostos são inéditos até o momento. Dentre os compostos isolados conhecidos têm-se três botcininas (**117**, **118** e **130**), duas botrilactonas (**120** e **121**), um policetídeo (**123**) e dois sesquiterpenos erimofilenos (**125** e **126**) (Figura 80). Entre os compostos inéditos foram isolados três sesquiterpenos (**119**, **124** e **129**) e um policetídeo aromático (**128**) (Figura 77). Dentre os sesquiterpenos inéditos isolados, um pertence à classe dos botridianos (**124**) e os outros dois a classe dos cameroonano (**119** e **129**) (Figura 78, pág. 93).

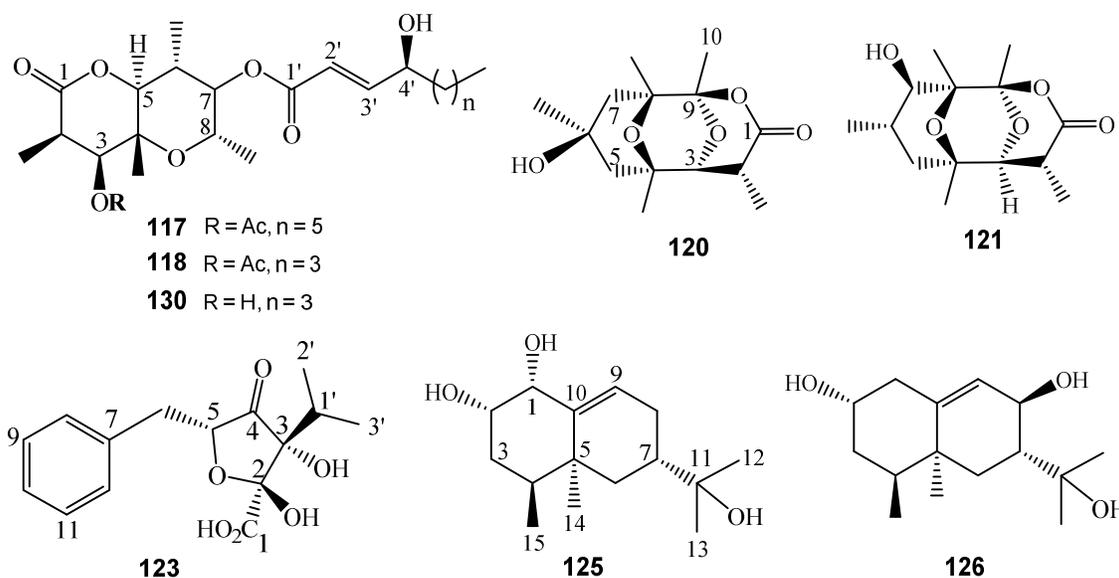


Figura 77 – Metabólitos secundários isolados da cepa mutante $\Delta bcbot4$, que foram isolados anteriormente de *B. cinerea* (MASSAROLI et al., 2013; TANI et al., 2015; PINEDO et al., 2016).

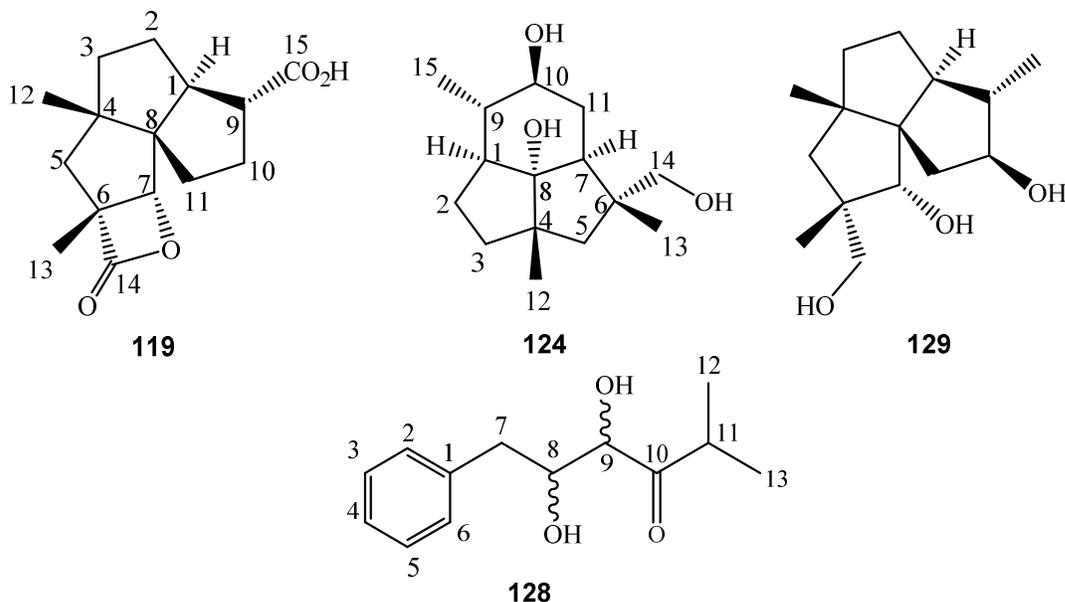


Figura 78 – Metabólitos secundários inéditos, isolados do mutante nulo $\Delta bcbot4$.

Com a perda da hidroxila em C-8 do esqueleto dos botridianos, pode ocorrer o rearranjo mostrado na Figura 79 levando aos sesquiterpenos cameroonano (COATES et al., 1996).

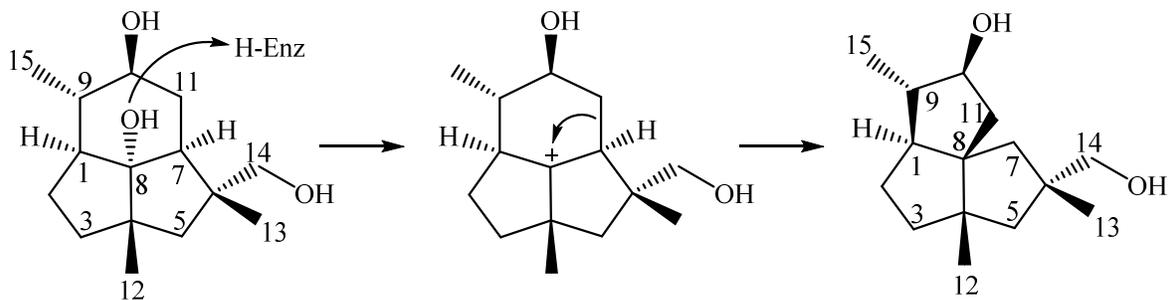


Figura 79 – Rearranjo estrutural de sesquiterpeno botridiano para um cameroonano (COATES et al., 1996).

5.3.1. Identificação das botcininas B (117) A (118) e E (130)

Dentre os metabólitos isolados de *B. cinerea*, as botcininas se destacam por serem também toxinas utilizadas pelo fungo como estratégia para

degradar o tecido vegetal e, assim, atacar seus hospedeiros. Além disto, o fungo é capaz de produzir esses compostos em grandes quantidades e com diferentes estruturas (TANI et al., 2006, MASSAROLI et al., 2013). Do mutante estudado, 6,4 % do extrato correspondem a botcinina B (**117**), o que comprova a grande produção de botcininas por *B. cinerea*. Botcinina A (**118**) (72,80 mg) e botcinina B (**117**) (425,32 mg) apresentam espectros de RMN de ^1H (Figuras 80 e Figura 82, pág. 95) extremamente similares, ambos apresentando três dupletos referentes ao C2-CH₃, C6-CH₃ e C8-CH₃, que na botcinina A (**118**) são observados entre δ 1,03 à 1,09 ppm e na botcinina B (**117**) de δ 1,00 à 1,06 ppm. Também é possível identificar os sinais dos hidrogênios olefínicos H-2' e H-3' em δ 6,05 e 7,00 ppm (**118**), e δ 6,02 e 6,97 ppm (**117**), respectivamente.

Os espectros de RMN de ^{13}C (Figuras 81, pág. 95 e Figura 83, pág. 96) das botcininas A e B, são semelhantes, ressalvando que no composto **118** a cadeia alifática lateral possui dois carbonos a menos, resultado da junção de uma unidade a menos de acetil-CoA na biossíntese do policetídeo.

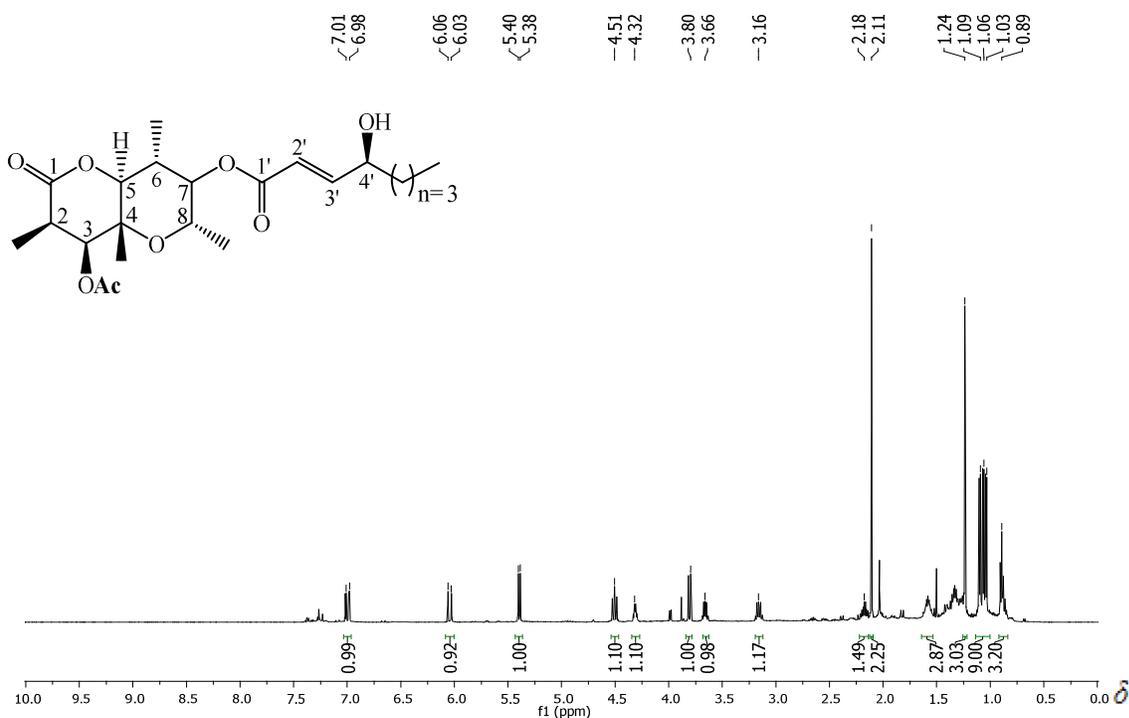


Figura 80 – Espectro de RMN de ^1H da botcinina A (**118**) (CDCl_3 em 400 MHz).

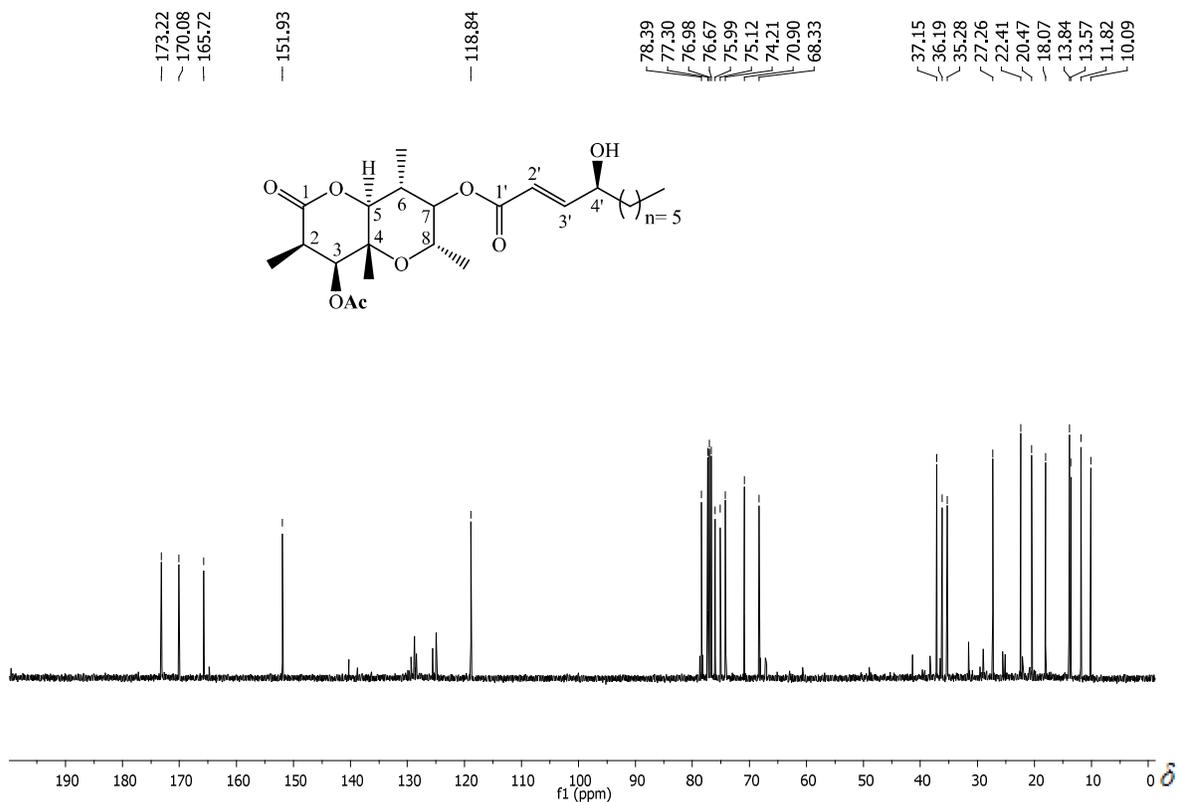


Figura 81 – Espectro de RMN de ^{13}C da botcinina A (118) (CDCl₃ em 100 MHz).

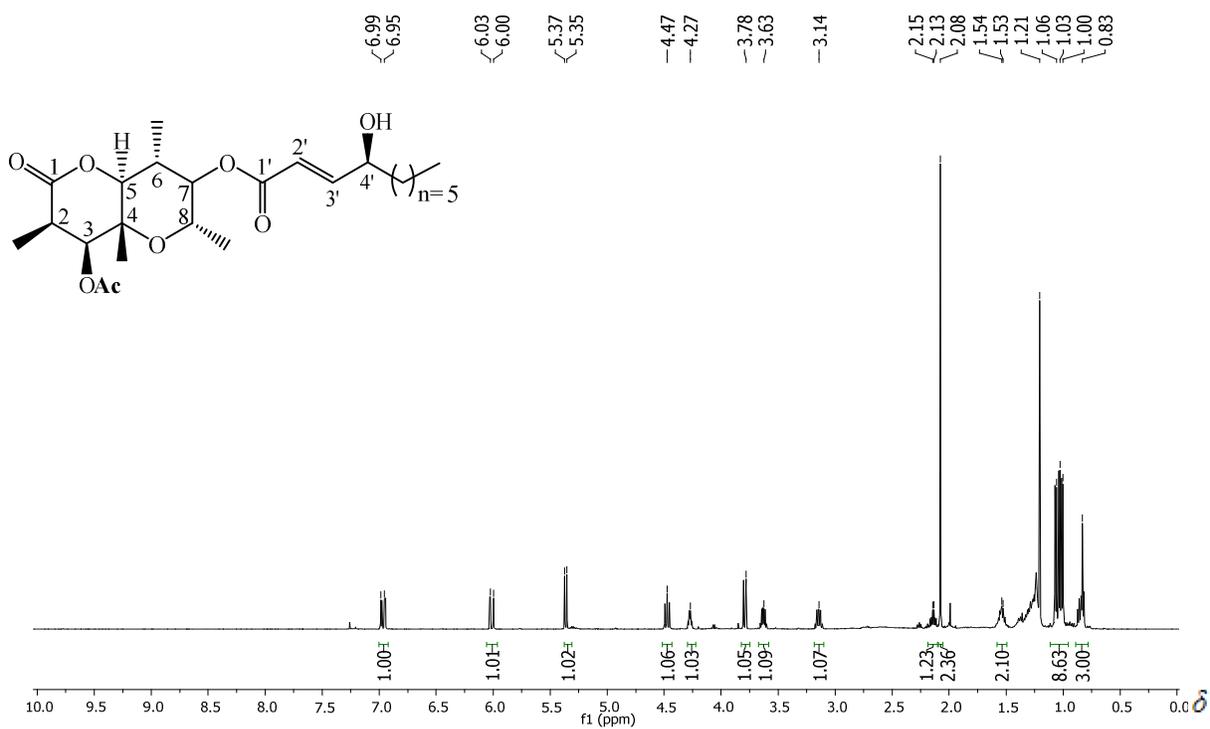


Figura 82 – Espectro de RMN de ^1H da botcinina B (117) (CDCl₃ em 400 MHz).

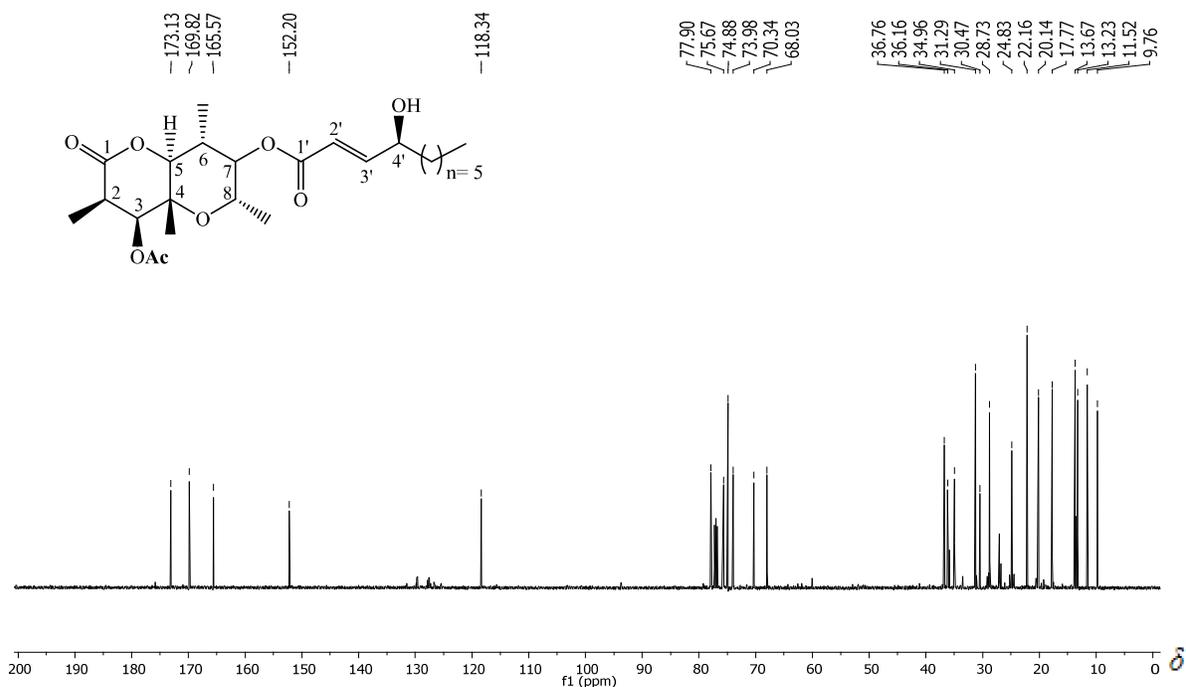


Figura 83 – Espectro de RMN de ¹³C da botcinina B (**117**) (CDCl₃ em 100 MHz).

O composto **130**, isolado como um óleo de coloração amarelada (3,27 mg), apresentou o espectro de RMN de ¹H (Figura 84, pág. 97) similar aos espectros de RMN de ¹H das duas botcininas anteriormente relatadas. Porém com uma pequena mudança nos deslocamentos dos grupamentos metílicos em H-2, H-6 e H-8; encontrados em δ 1,05, 1,11 e 1,27 ppm, respectivamente. Entretanto, a diferença mais relevante entre os espectros de RMN de ¹H do composto **130**, quando comparado aos espectros das botcininas A e B, é a ausência do simpleto em δ 2,11 ppm, que é encontrado no espectro da botcinina A (**118**), sendo esse sinal referente ao CH₃ do grupo acetila. No espectro de RMN de ¹³C (Figura 85, pág. 97) se observou que o composto possui 20 carbonos, sendo dois carboxílicos em δ 174,0 e 165,8 ppm; dois olefínicos em δ 151,8 e 119,1 ppm e seis carbinólicos em δ 68,4; 71,1; 74,0; 76,2; 76,3 e 78,4 ppm. Comparando os dados de RMN de ¹³C com a literatura (TANI et al., 2006) verificou-se que o composto isolado se trata da botcinina E, que corresponde, a botcinina A sem o grupo acetila. Na Tabela 10 (pág. 98) encontram-se os dados de RMN de ¹³C para os compostos **117**, **118** e **130**, bem como a comparação com os dados da literatura.

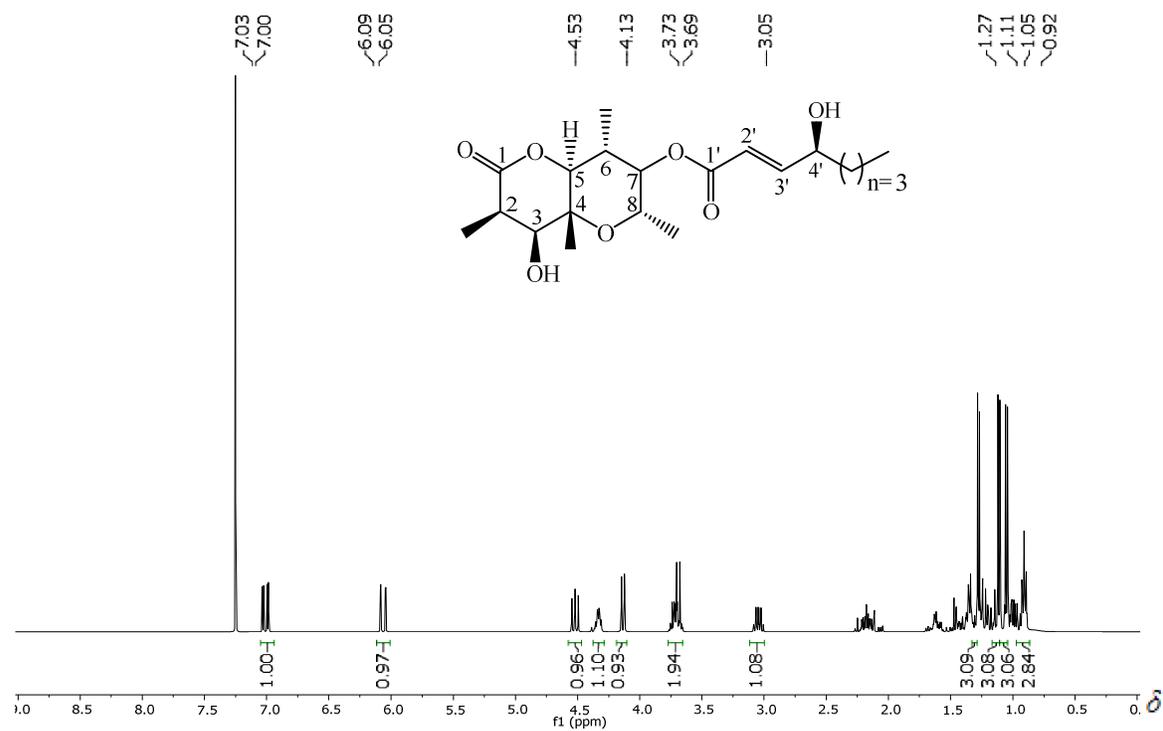


Figura 84 – Espectro de RMN de ¹H da botcinina E (130) (CDCl₃ em 400 MHz).

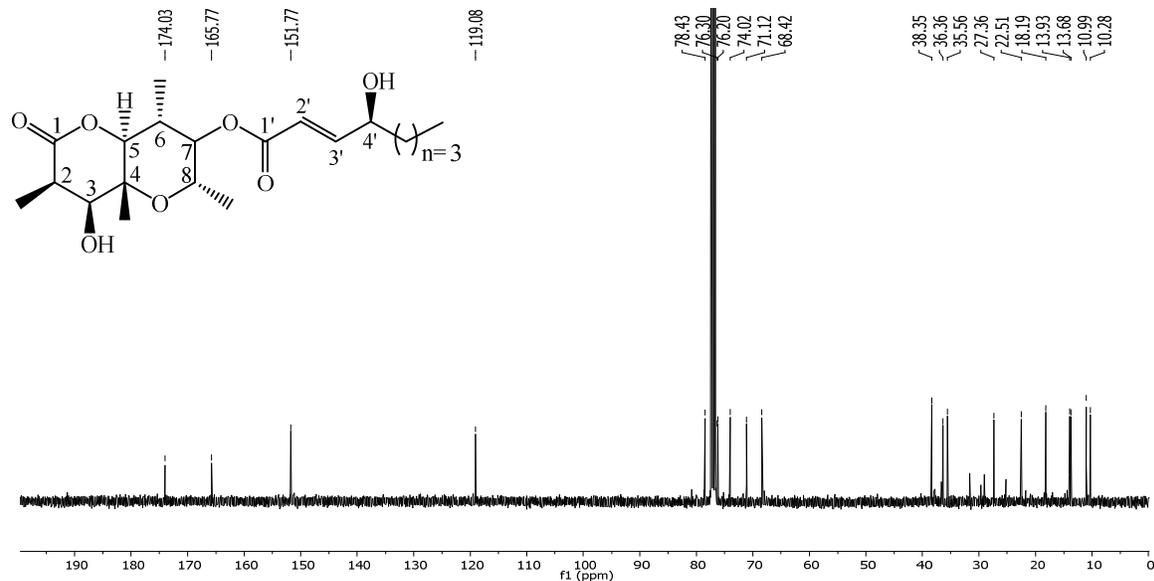


Figura 85 – Espectro de RMN de ¹³C da botcinina E (130) (CDCl₃ em 100 MHz).

Tabela 5 – Dados de RMN de ^{13}C das botcininas A (**118**), B (**117**) e C (**130**)

Posição	δ_c (ppm)					
	118	118*	117	117*	130	130**
1	173,2	173,8	173,1	173,2	174,0	174,0
2	37,2	37,3	36,7	37,3	38,4	38,4
2-CH ₃	10,1	10,2	9,8	10,2	10,3	10,3
3	74,2	74,2	74,0	74,3	74,0	74,0
4	75,1	75,2	74,9	75,2	76,3	-
4-CH ₃	11,8	11,9	11,5	11,9	11,0	11,0
5	78,4	78,5	77,9	78,6	78,4	78,4
6	35,3	35,4	34,9	35,4	35,6	35,6
6-CH ₃	13,6	13,7	13,2	13,7	13,7	13,7
7	76,0	76,0	75,7	76,1	76,2	76,2
8	68,4	68,4	68,0	68,4	68,4	68,4
8-CH ₃	18,1	18,2	17,8	18,2	18,2	18,2
1'	165,7	165,9	165,6	165,7	165,8	165,8
2'	118,9	119,0	118,3	119,1	119,1	119,1
3'	151,9	151,8	152,2	151,8	151,8	151,8
4'	70,9	71,1	70,3	71,1	71,1	71,1
5'	36,2	36,3	36,2	36,7	36,4	36,4
6'	27,3	27,3	24,8	25,2	27,4	27,4
7'	22,4	22,5	28,7	29,1	22,5	22,5
8'	13,9	13,9	31,3	31,7	13,9	13,9
9'	-	-	22,1	22,5	-	-
10'	-	-	13,7	14,0	-	-
CH ₃ CO	20,5	20,6	20,1	20,6	-	-
CH ₃ CO	170,1	170,1	169,8	170,1	-	-

* MASSAROLI et al., 2013; ** TANI et al., 2006

5.3.2. Identificação da botrilactona (**120**) e 6-hidroxi botrilactona (**121**)

Os compostos **120** (33,65 mg) e **121** (45,73 mg) foram isolados como óleos de coloração amarelada. O espectro de RMN de ^1H do composto **120** (Figura 86, pág. 99) apresentou sinais em δ 3,26 e 3,39 ppm, referente aos hidrogênios H-3 e H-7, os quais estão ligados a carbonos carbinólicos. Também se observou um sinal em δ 2,68 ppm, integrando para um hidrogênio, referente a H-2, e cinco sinais em δ 1,04, 1,13, 1,15, 1,42 e 1,50 ppm, cada um deles integrando para 3 hidrogênios. Esses cinco sinais observados correspondem aos hidrogênios metílicos C6-CH₃, C4-CH₃, C8-CH₃, C2-CH₃, H-10, respectivamente.

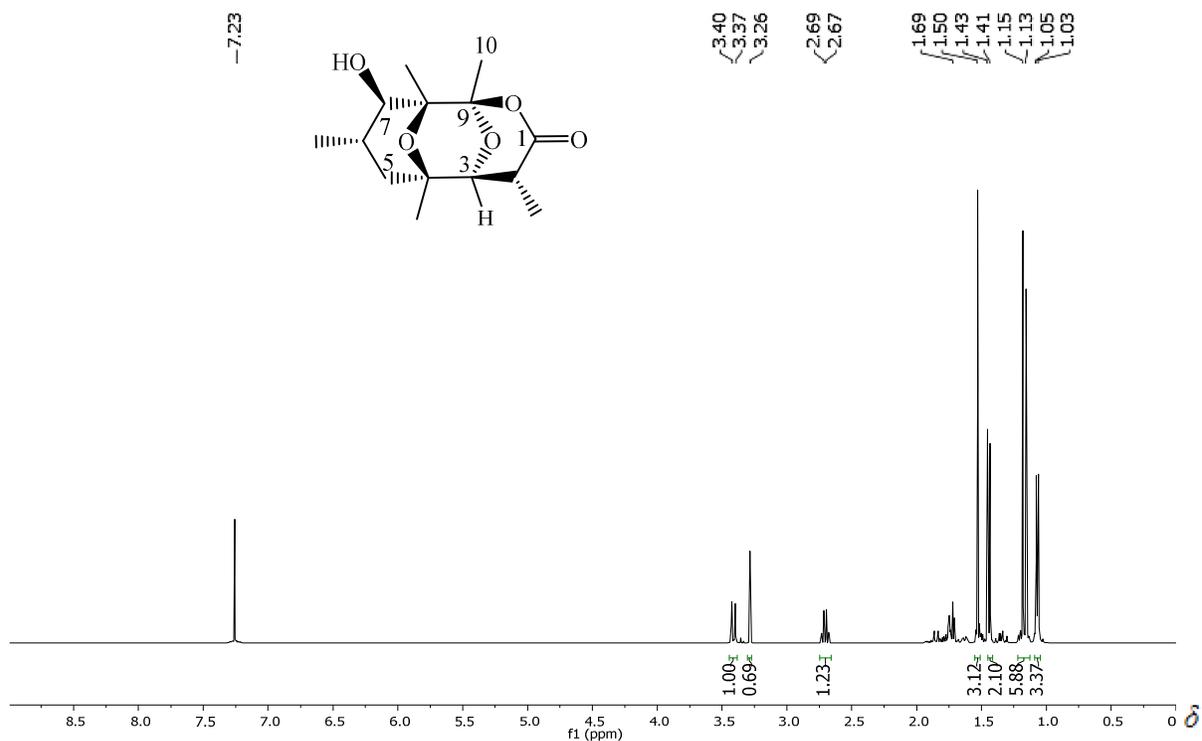


Figura 86 – Espectro de RMN de ^1H da botrilactona (**120**) (CDCl_3 em 400 MHz).

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 87, pág. 100) apresentou, quatorze sinais de carbonos. Entre eles há aquele sinal em δ 171,1 ppm, referente à carbonila C-1 da lactona; o sinal em δ 104,1 ppm, referente ao C-9, duplamente oxigenado; e os sinais em δ 81,7, 80,4, 76,1 e 71,2 ppm, referentes aos carbonos oxigenados C-3, C-8, C-7 e C-4, respectivamente. Após as comparações entre os dados de RMN de ^{13}C obtidos para o composto **120** com aqueles disponíveis na literatura (MASSAROLI et al., 2013), pôde-se identificar o composto **120** como a botrilactona.

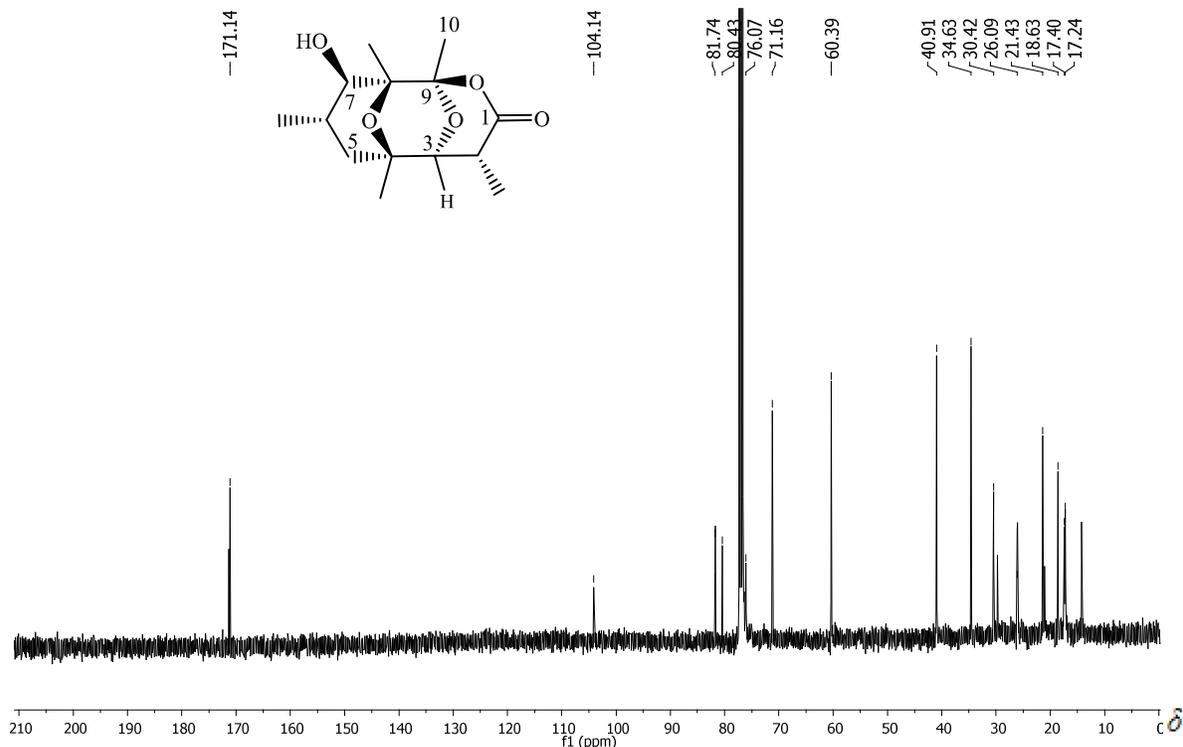


Figura 87 – Espectro de RMN de ^{13}C da botrilactona (**120**) (CDCl_3 em 100 MHz).

No espectro de RMN de ^1H (Figura 88, pág. 101) do composto **121**, foi observado um sinal em δ 3,31 ppm, referente ao hidrogênio H-3, o qual está ligado a um carbono carbinólico. Também foi identificado um sinal em δ 2,73 ppm, pertencente ao hidrogênio H-2. Ambos os sinais não apresentaram grande variação ao serem comparados com a botrilactona **120**. No entanto, o desaparecimento do sinal em δ 3,26 ppm encontrado para o composto **120** indica que o composto **121** não possui uma hidroxilação na posição 7. Outra variação observada nos espectros foi o sinal em δ 1,14 ppm no composto **120** referente ao grupo metila C6- CH_3 , que no composto **120** é um duplete. Observa-se que, no composto **121**, o sinal referente a este grupo (C6- CH_3) aparece como um simpleto, mostrando que C-6 é um carbono não hidrogenado.

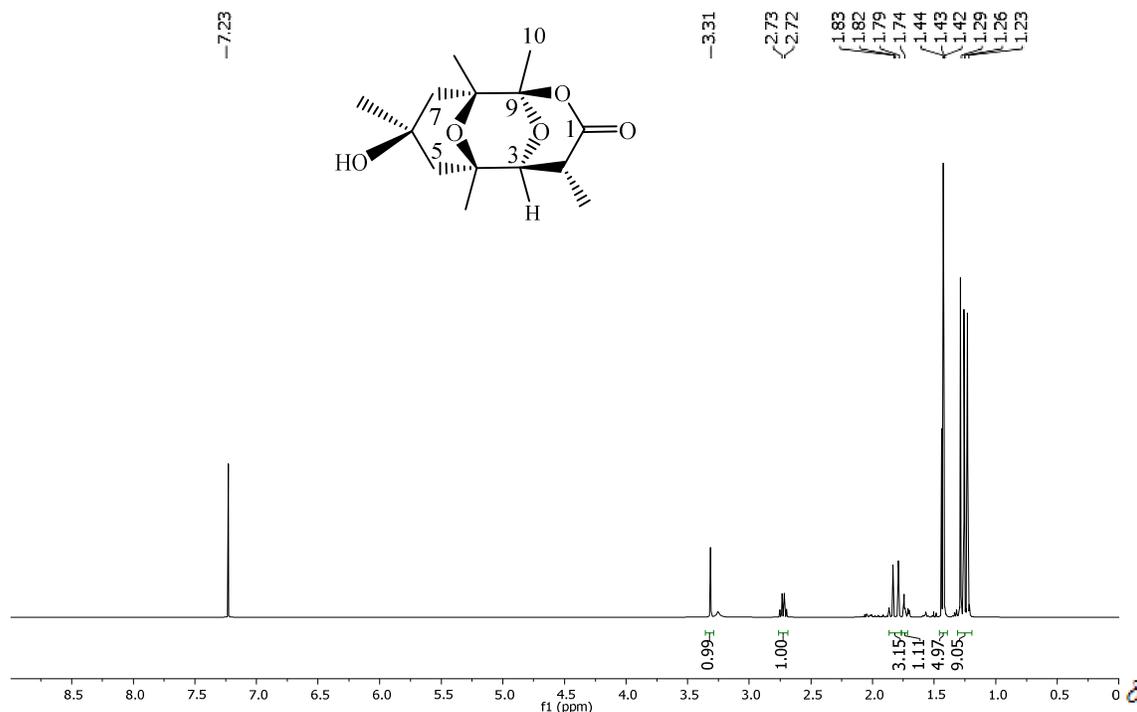


Figura 88 – Espectro de RMN de ¹H da 6-hidroxiotrilactona (**121**) (CDCl₃ em 400 MHz).

No espectro de RMN de ¹³C (Figura 89, pág. 102) do composto **121** podem-se observar o sinal em δ 171,1 ppm, referente a carbonila da lactona, como também três sinais em δ 81,6, 72,8 e 70,4 ppm, referentes aos carbonos carbinólicos C-3, C-4 e C-6, respectivamente. O sinal do carbono C-8 encontrou-se sobreposto com o do CDCl₃, não sendo possível mensurá-lo. Após as comparações entre os dados de RMN de ¹³C obtidos para o composto **121** e aqueles da literatura (MORAGA et al., 2016), pôde-se identificar o composto **121** como a 6-hidroxiotrilactona. Na Tabela 11 (pág. 102) podem-se observar os dados de RMN de ¹³C para os compostos **120** e **121**, e também a comparação com os dados da literatura.

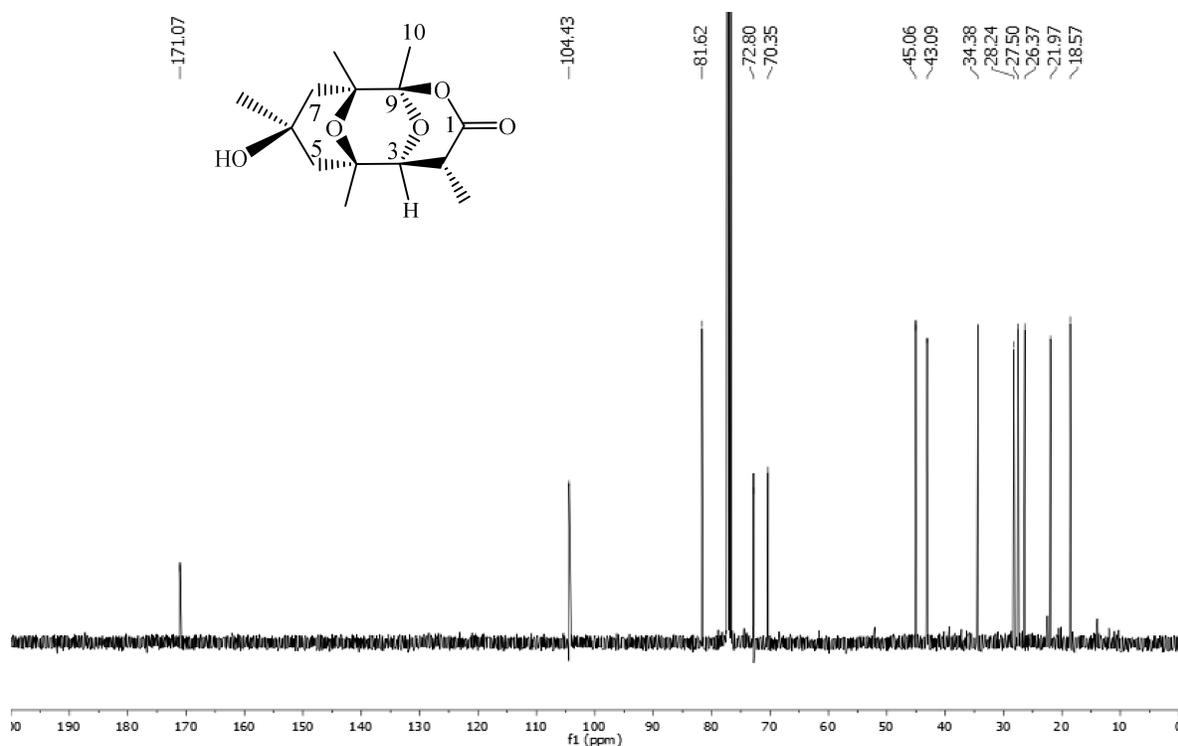


Figura 89 – Espectro de RMN de ^{13}C da 6-hidroxibotrilactona (**121**) (CDCl_3 em 100 MHz).

Tabela 6 – Dados de RMN de ^{13}C da botrilactona (**120**) e 6-hidroxibotrilactona (**121**) comparadas com a literatura (MASSAROLI et al., 2013; MORAGA et al., 2016)

Posição	δ_c (ppm)			
	120	120*	121	121**
1	171,1	171,3	171,1	171,1
2	34,6	34,6	34,4	34,4
2- CH_3	18,6	18,7	18,6	18,6
3	81,7	81,7	81,6	81,6
4	71,2	71,2	72,8	72,8
4- CH_3	26,1	26,1	27,5	27,5
5	40,9	40,9	45,1	45,0
6	30,4	30,4	70,4	70,3
6- CH_3	17,4	17,4	28,2	28,2
7	76,1	76,1	43,1	43,1
8	80,4	80,4	Sobreposto com CDCl_3	76,5
8- CH_3	17,2	17,2	26,4	26,4
9	104,1	104,1	104,4	104,4
10	21,4	21,4	22,0	22,1

* MASSAROLI et al., 2013; ** MORAGA et al., 2016

5.3.3. Elucidação dos sesquiterpenos eremofilenos 4-epieremofil-9-ene-1 α ,2 α ,11-triol (125) e 4-epieremofil-9-en-2 α ,8 β ,11-triol (126)

Os compostos **125** (1,2 mg) e **126** (6,3 mg) foram isolados como óleos incolores. O espectro de RMN de ^1H (Figura 90) do composto **125** apresentou um sinal em δ 5,96 ppm pertencente ao hidrogênio olefínico H-9; dois sinais em δ 3,77 e 4,20 ppm, referentes aos hidrogênios ligados a carbonos carbinólicos, H-2 e H-1, respectivamente; e, também, apresentou os sinais em δ 0,97, 1,17, 1,18 e 1,32 ppm, referentes aos grupos metilas C-15, C-12, C-13 e C-14, respectivamente. Comparando os dados de RMN de ^1H com os dados e espectros encontrados na literatura (PINEDO et al., 2016), verificou-se que o composto isolado (**125**) é o (+)-4-epieremofil-9-ene-1 α ,2 α ,11-triol, isolado anteriormente do mesmo fungo pelo mesmo grupo de trabalho.

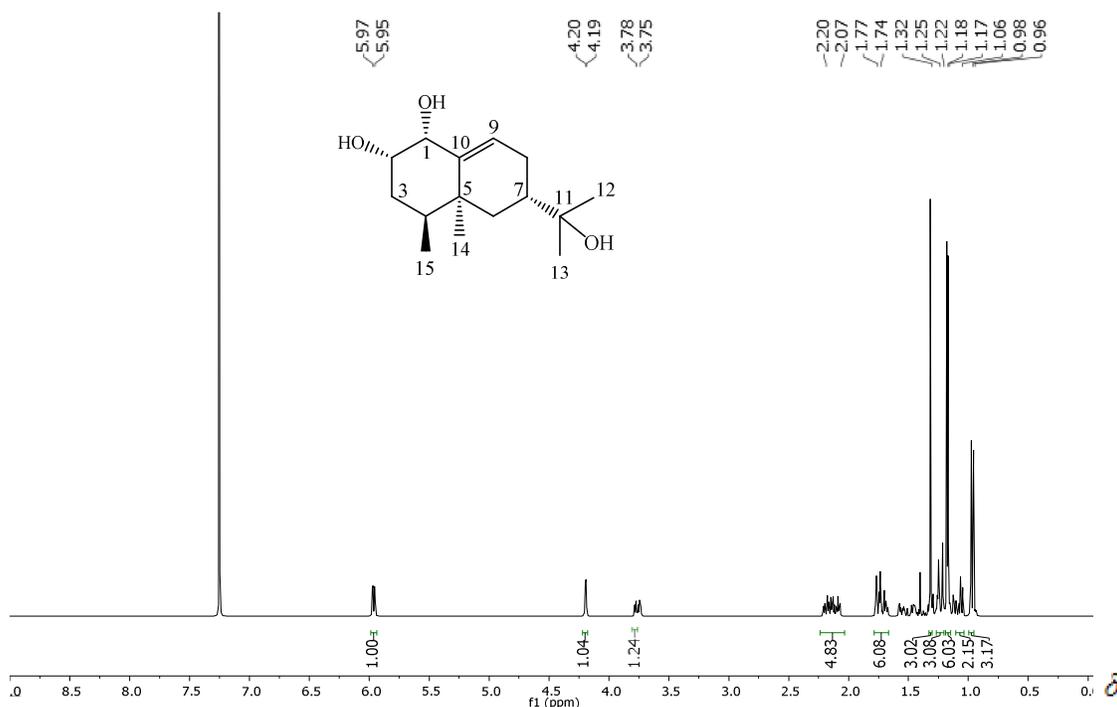


Figura 90 – Espectro de RMN de ^1H (+)-4-epieremofil-9-ene-1 α ,2 α ,11-triol (**125**) (CDCl_3 em 400 MHz).

O espectro de RMN de ^1H (Figura 91) do composto **126** apresentou um sinal em δ 5,50 ppm, pertencente ao hidrogênio olefínico H-9; dois sinais em δ 3,80 e 4,25 ppm referentes aos hidrogênios ligados a carbonos carbinólicos - H-2 e H-8, respectivamente, e, também, apresentou os sinais em δ 1,04, 1,15, 1,20 e 1,29 ppm referentes aos grupamentos metílicos C-15, C-12, C-13 e C-14, respectivamente. O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 92, pág. 105) apresentou sinais de carbonos olefínicos C-9 e C-10 em δ 128,7 e 138,4 ppm, respectivamente, e, sinais de carbonos carbinólicos C-2, C-8 e C-11 em δ 67,1, 69,4 e 75,4 ppm, respectivamente. Os sinais dos carbonos metílicos C-12, C-13, C-14 e C-15 foram observados em δ 30,1, 23,7, 30,4 e 18,6 ppm. Após as comparações entre os dados de RMN de ^{13}C obtidos para o composto **126** e dados da literatura (PINEDO et al., 2016), pôde-se identificar o composto **126** como o 4-epieremofil-9-en-2 α ,8 β ,11-triol. Na Tabela 12 (pág. 105) podem-se observar os dados de RMN de ^{13}C para os compostos **126** e comparação com os dados da literatura.

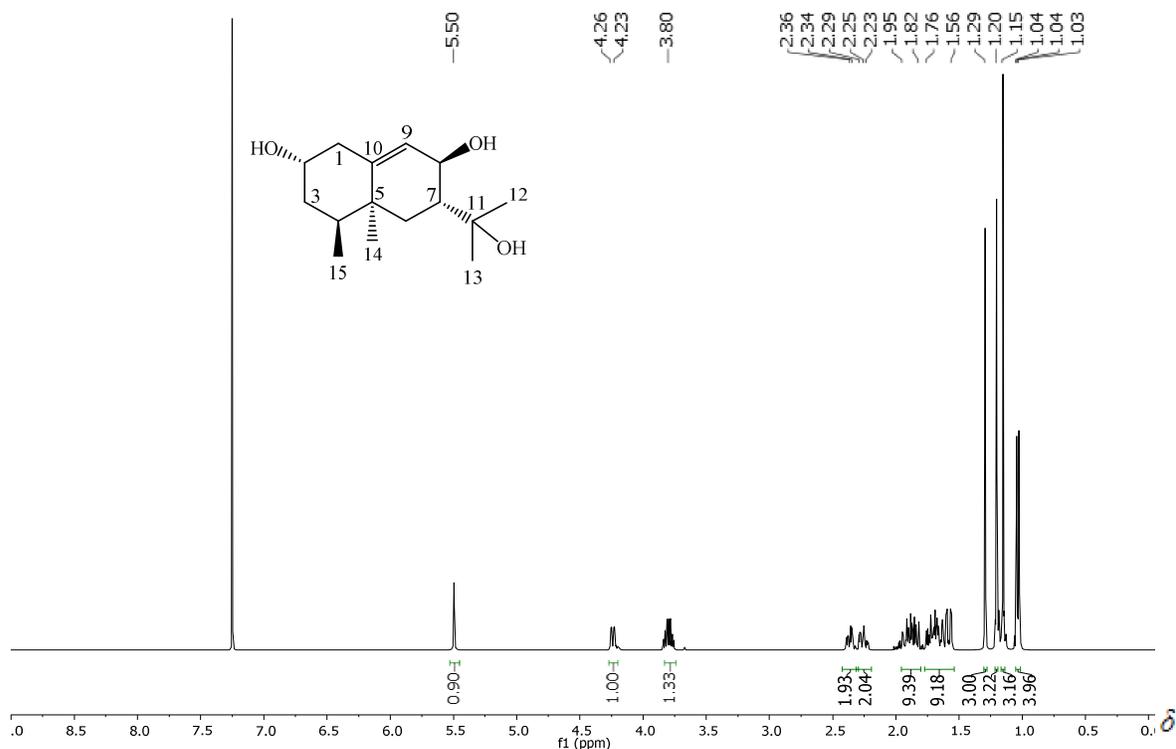


Figura 91 – Espectro de RMN de ^1H do 4-epieremofil-9-en-2 α ,8 β ,11-triol (**126**) (CDCl₃ em 400 MHz).

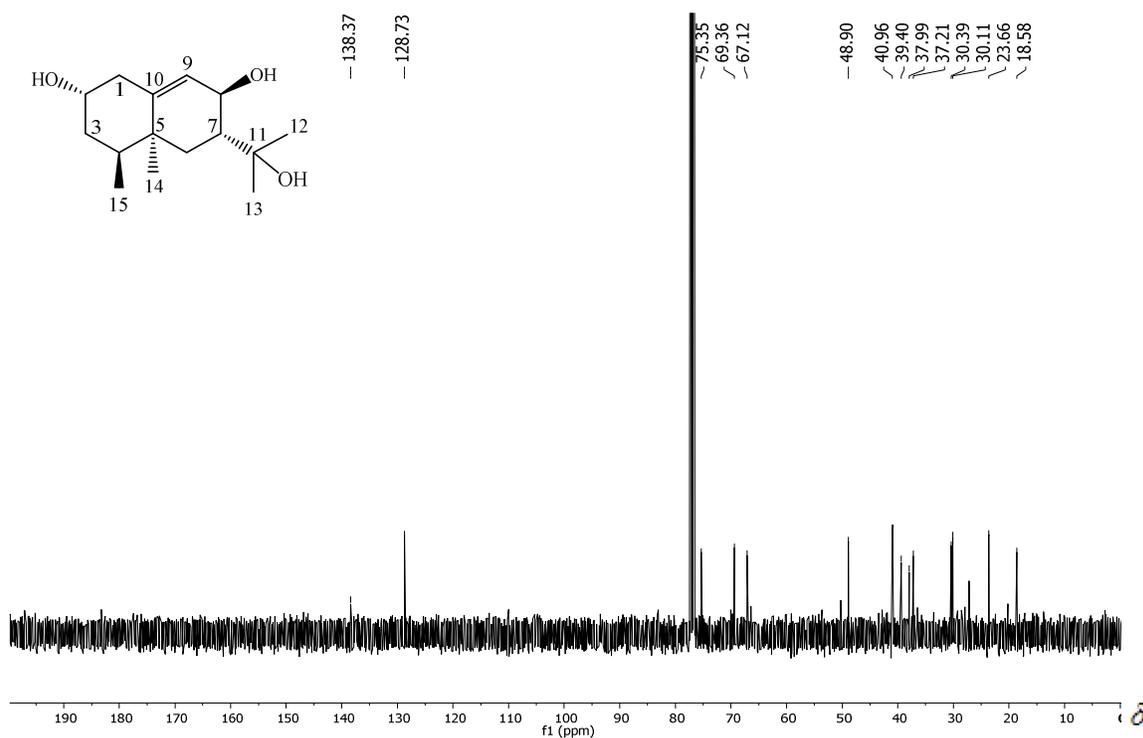


Figura 92 – Espectro de RMN de ^{13}C do 4-epieremofil-9-en-2 α ,8 β ,11-triol (**126**) (CDCl₃ em 100 MHz).

Tabela 7 – Dados de RMN de ^{13}C do eremofileno **126** comparado com a literatura (PINEDO et al., 2016)

Posição	δ_{C} (ppm)		
	126	126*	125*
1	41,0	40,9	77,2
2	67,1	67,1	68,1
3	39,4	39,4	34,0
4	41,0	40,9	41,6
5	38,0	38,0	37,7
6	37,2	37,2	39,4
7	48,9	48,9	43,2
8	69,4	69,3	26,3
9	128,7	128,7	129,9
10	138,4	138,4	139,8
11	75,4	75,3	75,5
12	30,1	30,1	27,0
13	23,7	23,6	27,2
14	30,4	30,4	32,7
15	18,6	18,6	17,9

* PINEDO et al., 2016

5.3.4. Elucidação dos policetídeos monômero (123) e 4,5-di-hidroxi-2-metil-6-fenilexan-3-ona (128)

O composto **123** foi isolado como um sólido branco solúvel em metanol. No espectro de RMN de ^1H (Figura 93) observaram-se sinais na região entre δ 7,14 e 7,31 ppm referentes aos hidrogênios H-8, H-9, H-10, H-11 e H-12, todos de anel aromático. Também observaram-se um duplete duplo em δ 4,19 ppm ($J = 9,6$ e $3,6$ Hz), pertencente ao hidrogênio H-5, um multiplete centrado em δ 3,03 ppm referente aos dois hidrogênios em H-6, um hepteto em δ 2,07 ppm referentes a H-1' e dois dupletos em δ 0,93 ($J = 6,8$ Hz) e 1,12 ppm ($J = 6,8$ Hz), referentes aos hidrogênicos metílicos H-3' e H-2', respectivamente.

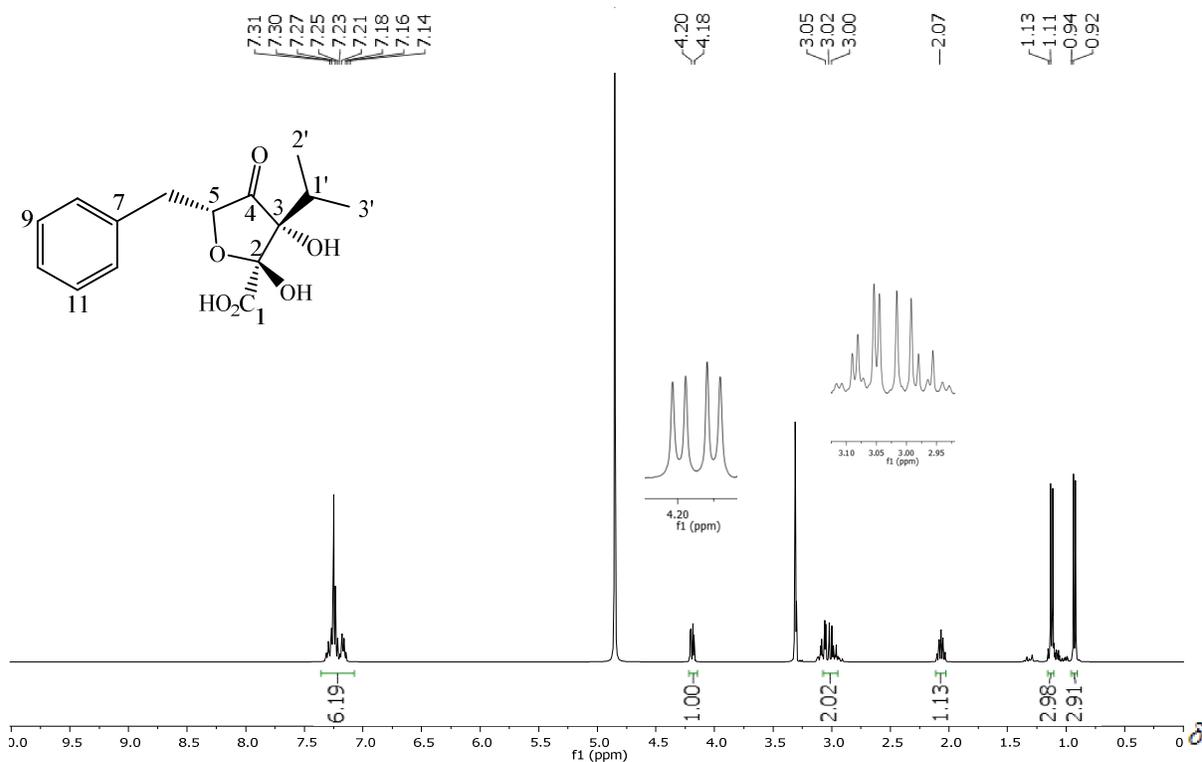


Figura 93 – Espectro de RMN de ^1H do monômero (**123**) (CD_3OD em 500 MHz).

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 94, pág. 107) foi observado um sinal em δ 213,3 ppm, referente ao carbono cetônico C-4, um sinal em δ 176,3 ppm, referente ao carbono do grupo carboxila C-1; quatro sinais de carbonos

aromáticos em δ 139,8, 130,4, 129,4 e 127,5 ppm, referentes aos carbonos C-7, C-8/C-12, C-9/C-11 e C-10, respectivamente. Após análise completa dos espectros de RMN de 1D e 2D (Figuras A23-A25, pág. 159 e 160) foi possível atribuir todos os deslocamentos químicos dos átomos de C e H do composto **123** (Tabela 13, pág. 108), e identificar o composto **123** como um composto anteriormente isolado por Javier Barua pelo mesmo grupo de pesquisa e, até o momento não publicado, que foi nomeado de monômero.

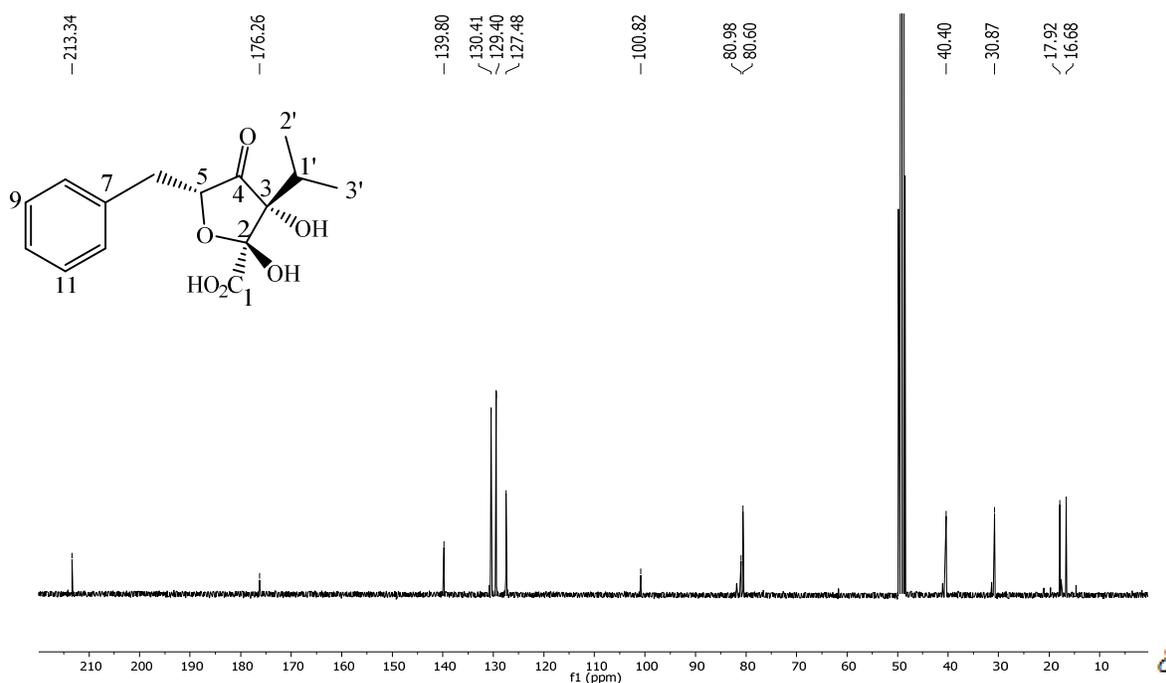


Figura 94 – Espectro de RMN de ¹H do monômero (**123**) (CD₃OD em 125 MHz).

O composto **128** (2,68 mg) foi isolado como um sólido branco. No espectro de RMN de ¹H (Figura 95, pág. 108) foram observados sinais de hidrogênios aromáticos em δ 7,17, 7,21 e 7,29 ppm, referentes aos hidrogênios H-3/H-5, H-4 e H-2/H-6, respectivamente. Também observaram-se dois sinais em δ 4,41 e 3,98 ppm, referentes aos hidrogênios H-9 e H-8, ambos ligados a carbonos carbinólicos. Os dois dupletos referentes aos dois grupos metilas H-12 e H-13 foram observados em δ 1,03 e 1,12 ppm.

Tabela 8 – Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C e correlações HMBC para o policetídeo **123** (CD_3OD)

Posição	δ_{C}	δ_{H} (J em Hz)	HMBC
1	176,3	-	-
2	100,8	-	-
3	81,0	-	-
4	213,3	-	-
5	80,6	4,19 (dd, $J = 9,6$ e $3,6$, 1H)	C-4, C-6, C-7
6	40,4	3,03 (m, 2H)	C-4, C-5, C-7, C-8
7	139,8	-	-
8, 12	130,4	7,23 (m, 2H)	C-6, C-9, C-10, C-11
9, 11	129,4	7,23 (m, 2H)	C-8, C-12
10	127,5	7,23 (m, 1H)	C-8, C-9, C-11, C-12
1'	30,9	2,05 (hept, $J = 6,8$, 1H)	C-2, C-3, C-4, C-2', C-3'
2'	17,9	1,12 (d, $J = 6,8$, 3H)	C-1', C-3'
3'	16,7	0,93 (d, $J = 6,8$, 3H)	C-1', C-2'

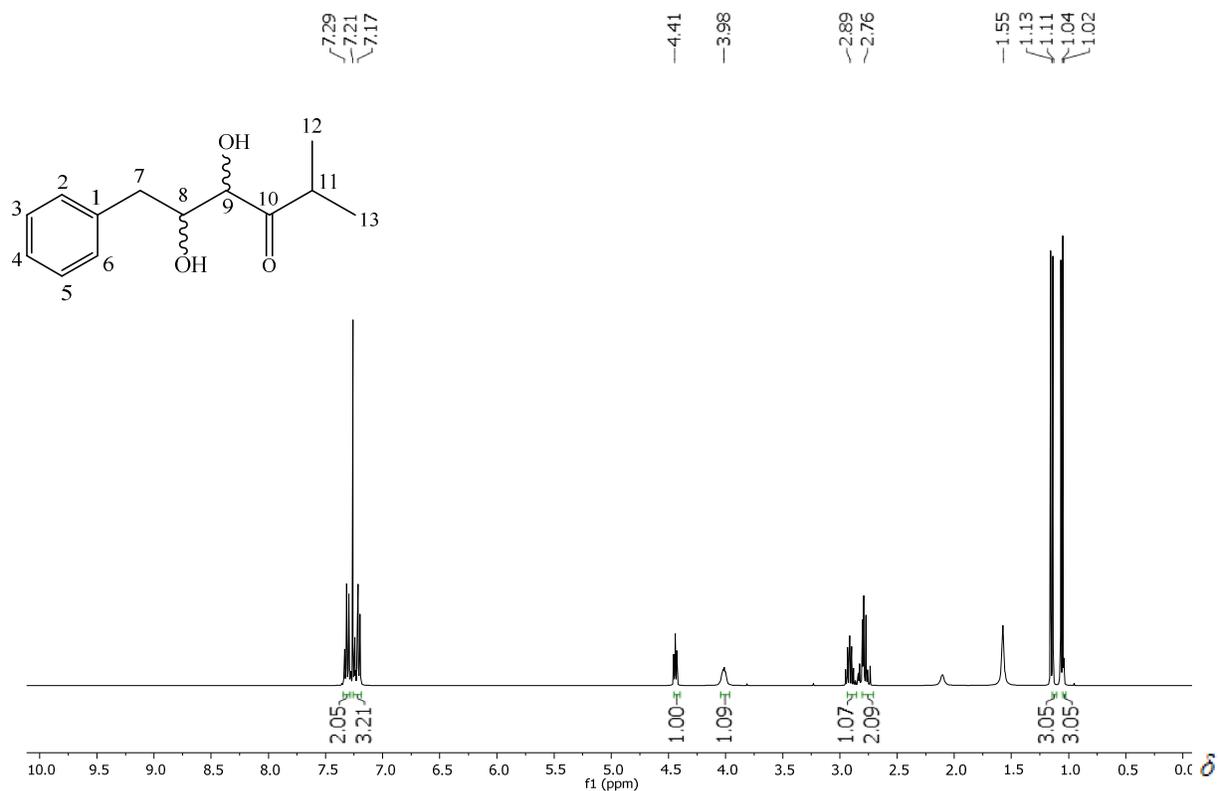


Figura 95 – Espectro de RMN de ^1H 4,5-di-hidroxi-2-metil-6-fenilexan-3-ona (**128**) (CDCl_3 em 400 MHz).

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 96) foi observado um sinal em δ 214,9 ppm, referente ao carbono cetônico C-10; quatro sinais de carbonos aromáticos em δ 137,2, 129,5, 128,7 e 126,6 ppm, referentes aos carbonos C-1, C-3/C-5, C-2/C-6 e C-4, respectivamente; dois sinais de carbonos carbinólicos em δ 77,6 e 74,0 ppm, referentes aos carbonos C-9 e C-8, respectivamente e dois sinais de carbonos metílicos em δ 19,4 e 17,1 ppm, referentes aos carbonos C-12 e C-13. A partir das atribuições dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C , como também o mapa de contornos HMBC (Tabela 14, pág. 110), foi possível a identificação do composto **128** como o policetídeo 4,5-di-hidroxi-2-metil-6-fenilexan-3-ona. Os mapas de correlações COSY, HSQC e NOESY para o composto **128** são observados nas Figuras A26-A28, pág. 160 e 161.



Figura 96 – Espectro de RMN de ^{13}C do 4,5-di-hidroxi-2-metil-6-fenilexan-3-ona (**128**) (CDCl_3 em 100 MHz).

Tabela 9 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C e correlações observadas no HMBC para o policetídeo 4,5-di-hidroxi-2-metil-6-fenilexan-3-ona (**128**) (CDCl_3)

Posição	δ_{C}	δ_{H} (J em Hz)	HMBC
1	137,2	-	-
2, 6	128,7	7,29 (m, 1H)	C-1, C-2,6
3, 5	129,5	7,17 (m, 1H)	C-3,5, C-4, C-7
4	126,8	7,21 (m, 1H)	
7	39,0	2,76 (m, 2H)	C-1, C-3,5, C-8, C-9
8	74,0	3,98 (m, 1H)	
9	77,6	4,41 (t, J = 5,4, 1H)	C-7, C-8, C-10
10	214,9	-	-
11	37,8	2,89 (sept, J = 6,7, 1H)	C-10, C-12, C-13
12	19,4	1,12 (d, J = 6,7, 1H)	C-10, C-11, C-13
13	17,1	1,03 (d, J = 6,7, 1H)	C-10, C-11, C-12

5.3.5. Elucidação dos sesquiterpenos inéditos do ácido 7 α -hidroxicameronan-14,15-dioico 7,14-lactona (119**), presilfiperfolan-8 α ,10 β ,14-triol (**124**), e cameroonan-7 α ,10 β ,14-triol (**129**)**

O composto **119** foi obtido como um sólido incolor (4,70 mg). No espectro de RMN de ^1H (Figura 97, pág. 111) se observou um sinal de hidrogênio ligado a um carbono carbinólico em δ 4,27 ppm, referente a H-7. O sinal em δ 3,01 ppm, foi atribuído a H-1, este hidrogênio está mais afastado que o TMS. Também observaram-se em δ 1,07 e 1,40 ppm os hidrogênios metílicos pertencentes ao H-12 e H-13, respectivamente. No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 98, pág. 111) foram observados sinais em δ 180,6, 175,7 e 93,6 ppm, indicando três carbonos ligados a heteroátomos em C-15, C-14 e C-7, respectivamente. Os sinais em δ 180,6 e 175,8 correspondem a duas carbonilas em C-15 e C-14, respectivamente, sendo o primeiro um grupo ácido e o segundo uma lactona. O sinal em δ 93,6 ppm, pertencente a C-7, trata-se de um carbono carbinólico.

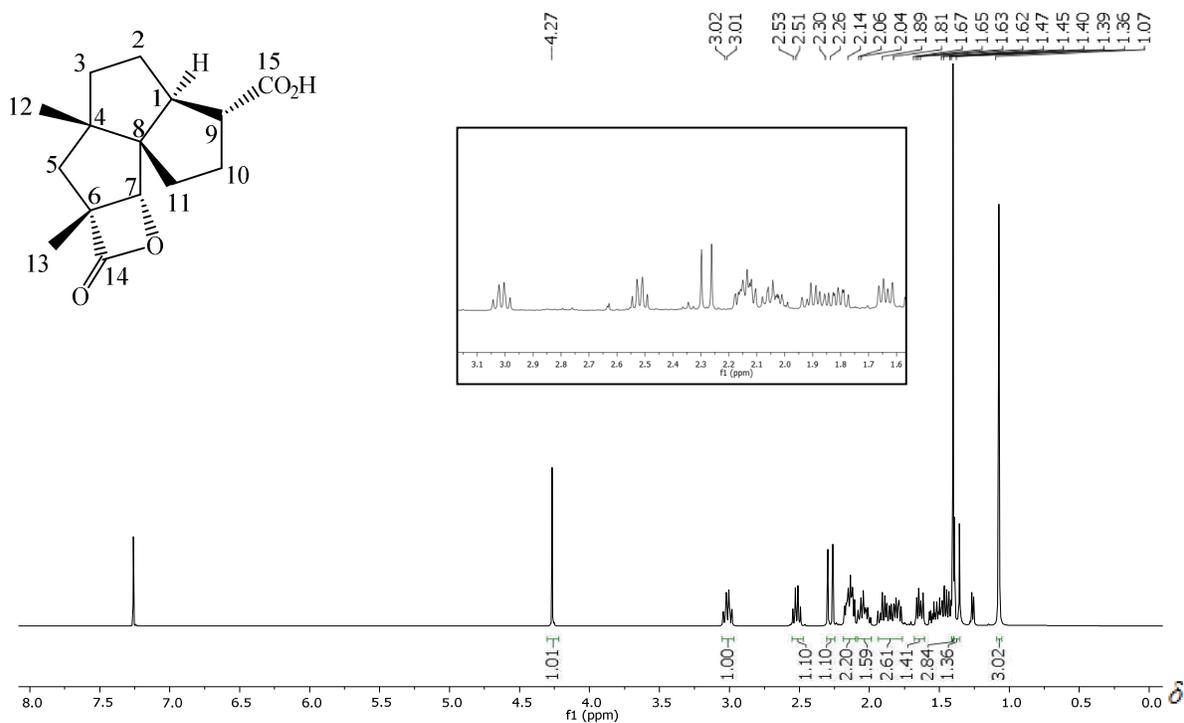


Figura 97 – Espectro de RMN de ^1H do ácido 7α -hidroxycameroonan-14,15-dioico 7,14-lactona (**119**) (CDCl_3 em 500 MHz).

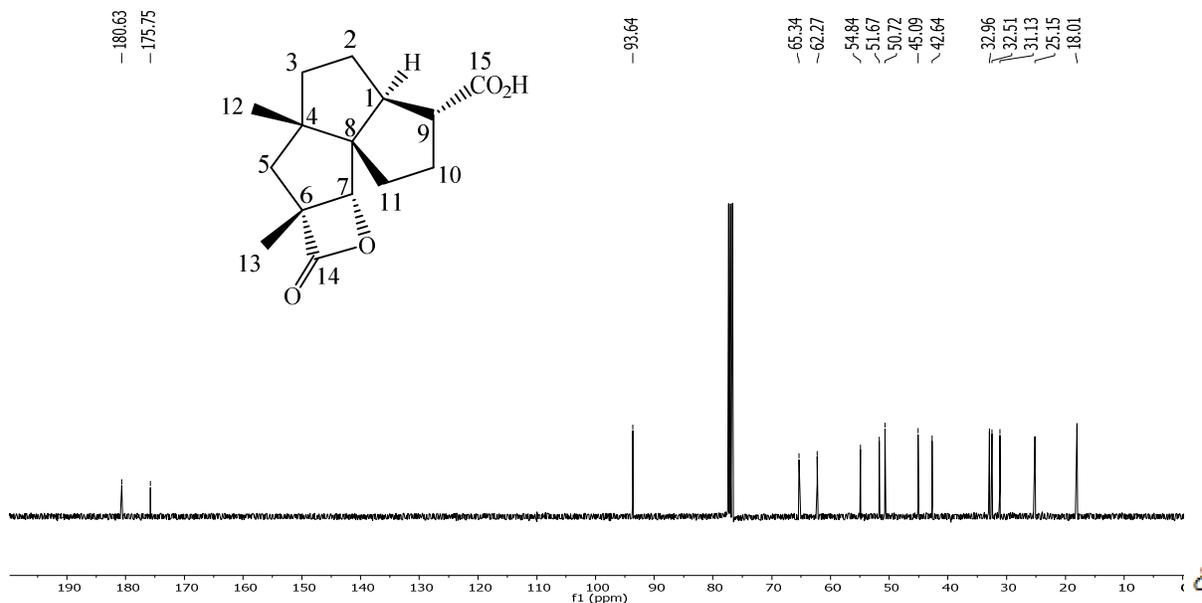


Figura 98 – Espectro de RMN de ^{13}C do ácido 7α -hidroxycameroonan-14,15-dioico 7,14-lactona (**119**) (CDCl_3 em 125 MHz).

A partir das análises dos espectros de RMN de 1D e 2D (Figuras A29-A31, pag 162-163) foi possível atribuir o deslocamento químico de todos os

carbonos e hidrogênios do composto **119**. No mapa de contornos NOESY se observaram correlações do hidrogênio em δ 1,40 (H-13) com os sinais em 1,37 (H-5 β), 4,27 (H-7 β) e 1,07 (H-12) e entre os sinais em δ 2,52 (H-9 β) e 2,04 (H-10 β) (Figura 99, pág. 113). Por meio da atribuição completa dos dados de RMN (Tabela 15), o composto isolado (**119**) foi identificado como ácido 7 α -hidroxicameronan-14,15-dioico 7,14-lactona.

Tabela 10 – Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C e correlações HMBC para o ácido 7 α -hidroxicameronan-14,15-dioico 7,14-lactona (**119**) (CDCl_3)

Posição	δ_{H} (J em Hz)	δ_{C}	NOESY	HMBC
1 α	3,01 (td, $J = 6,7$ e $8,3$, 1H)	50,7		C-2, C-4, C-7, C-8, C-9, C-11, C-15
2	1,52 (m, 1H) 2,14 (sobreposto)	32,5		C-1, C-3, C-9 -
3 α	1,90 (m, 1H)			C-2, C-4, C-5, C-12
3 β	1,64 (dd, $J = 12,7$ e $6,7$ 1H)	42,6		C-1, C-2, C-4, C-8, C-12
4	-	54,8		-
5 α	2,28 (d, $J = 14,4$, 1H)			C-3, C-4, C-6, C-8, C-14
5 β	1,37 (d, $J = 14,4$, 1H)	45,1	H-12, H-13	C-3, C-4, C-6, C-12, C-13, C-14
6	-	62,3		-
7 β	4,27 (s, 1H)	93,6	H-13	C-4, C-5, C-8, C-11, C-13, C-14
8	-	65,3		-
9 β	2,52 (td, $J = 6,7$ e $8,3$, 1H)	51,7	H-10 β	C-1, C-2, C-8, C-10, C-11, C-15
10 α	2,14 (sobreposto)			-
10 β	2,04 (m, 1H)	33,0		C-1, C-8, C-9, C-11, C-15
11 α	1,44 (dd, $J = 13,2$ e $6,4$, 1H)	31,1		C-1, C-4, C-7, C-8, C-9, C-10
11 β	1,80 (m, 1H)			C-4, C-7, C-8, C-9, C-10
12	1,07 (s, 3H)	25,1	H-3 β , H-5 β , H-11 β	C-3, C-4, C-5, C-8
13	1,40 (3H, s)	18,0	H-5 β , H-7 β	C-5, C-6, C-7, C-14
14	-	175,8		-
15	-	180,6		-

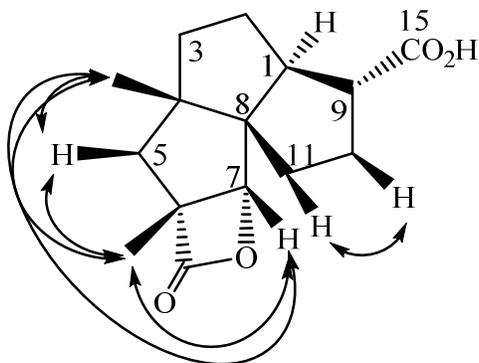


Figura 99 – Estrutura química do composto **119** e algumas de suas correlações NOESY.

O composto **124** foi obtido como um sólido incolor (93 mg). No espectro de RMN de ^1H (Figura 100) observaram-se sinais em δ 3,39 (CH₂) e 3,28 (CH), os quais foram atribuídos a H-14 e H-10 α , respectivamente, os quais são hidrogênios ligados a carbonos carbinólicos. Também foram observados os sinais em δ 1,39, 1,21 e 1,02 ppm, referentes aos três grupos metila H-12, H-13 e H-15, respectivamente.

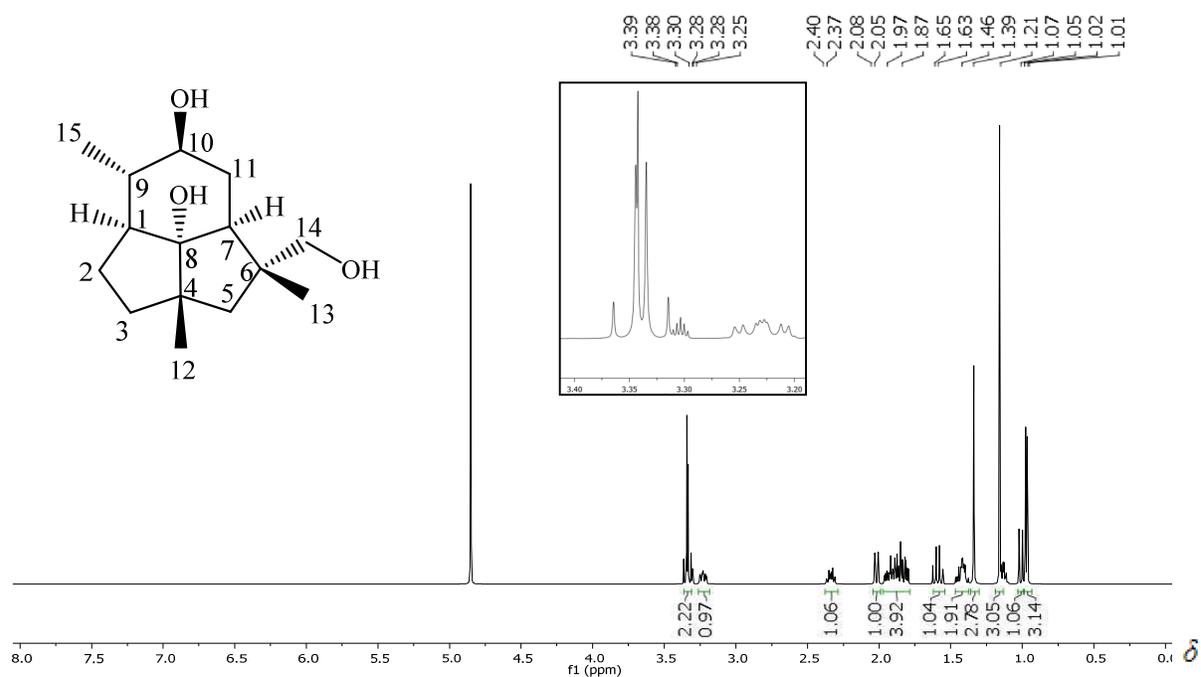


Figura 100 – Espectro de RMN de ^1H do presilfiperfolan-8 α ,10 β ,14-triol (**124**) (CD₃OD em 500 MHz).

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 101) foram observados sinais de carbonos oxigenados em δ 95,5, 76,5 e 72,7 ppm, pertencentes a C-8, C-10 e C-14, respectivamente, sendo que o carbono C-8 com δ 95,5 é mais desblindado que os outros carbonos por se tratar de um carbono não hidrogenado. Também foram observados os sinais de carbonos metílico C-12, C-13 e C-15 em δ 29,2, 23,0 e 18,2 ppm.

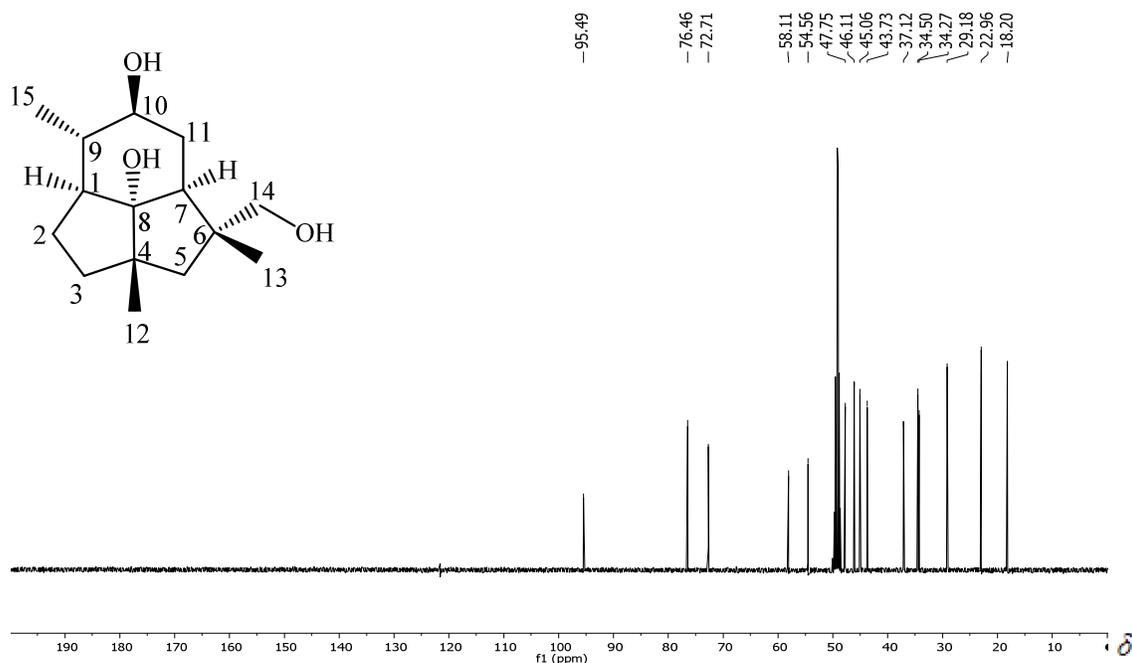


Figura 101 – Espectro de RMN de ^{13}C do presilfiperfolan-8 α ,10 β ,14-triol (**124**) (CD_3OD em 125 MHz).

No mapa de contornos NOESY (Figura A35, pág 165) observaram-se correlações entre os sinais δ 1,02 (H-15 α), 1,48 (H-1 α) e 3,28 (H-10 α) e entre os sinais δ 3,39 (H-14), 2,07 (H-5 α) e 1,91 (H-7 α), possibilitando a atribuição da estereoquímica do composto isolado e, conseqüentemente, a identificação dele como presilphiperfolan-8 α ,10 β ,14-triol (**124**). Na Tabela 16 (pág. 115) estão sumariadas as atribuições completas dos dados de RMN de ^1H , de ^{13}C e correlações HMBC e NOESY para o composto **124**. O composto isolado, foi recristalizado e os cristais obtidos foram submetidos à análise por cristalografia de raios-X. Na Figura 102 (pág. 116) pode-se verificar a representação em

perspectiva ORTEP para o composto **124**, o qual confirma a estereoquímica proposta por análise de RMN de 1D e 2D. Os mapas de correlações COSY, HSQC e HMBC para o composto **124** são apresentados nas Figuras A32-A34, pág. 163 e 164.

Tabela 11 – Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C e correlações HMBC para o presilfiperfolan-8 α ,10 β ,14-triol (**124**) (CD_3OD).

Posição	δ_{H} (Hz)	δ_{C}	NOESY	HMBC
1 α	1,48 (m, 1H)	45,1		C-2, C-9, C-10, C-11, C-15
2 α	1,97 (m, 1H)		H-2 β , H-3 α	C-1, C-3, C-9
2 β	2,39 (m, 1H)	34,5	H-2 α , H-3 β , H-9 β	C-1, C-3, C-4, C-8, C-9
3 α	1,97 (m, 1H)		H-2 α , H-3 β	C-1, C-3
3 β	1,18 (m, 1H)	34,3		C-4, C-8, C-12
4	-	58,1	-	-
5 α	2,07 (d, $J = 12,1$, 1H)		H-5 β , H-14	C-3, C-4, C-6, C-12, C-13, C-14,
5 β	1,06 (d, $J = 12,1$, 1H)	43,7	H-5 α , H-12, H-13	C-4, C-6, C-7, C-8, C-12, C-13
6	-	54,6	-	-
7 α	1,91 (m, 1H)	46,1	H-11 α , H-14	C-4, C-6, C-8, C-10, C-11, C-13, C-14
8	-	95,5	-	-
9 β	1,46 (m, 1H)	47,8		
10 α	3,28 (ddd, $J = 10,7$, 9,4 e 3,4, 1H)	76,5	H-7 α , H-15	C-7, C-9, C-11, C-15
11 α	1,87 (m, 1H)			C-7, C-8, C-10
11 β	1,64 (q, $J = 11,9$, 1H)	37,1	H-12, H-13	C-6, C-7, C-8, C-10
12	1,39 (s, 3H)	29,2	H-13	C-3, C-4, C-5, C-8
13	1,21 (s, 3H)	23,0	H-12	C-5, C-6, C-7, C-14
14	3,39 (m, 2H)	72,7	H-5 α , H-7 α	C-5, C-6, C-7, C-13
15	1,02 (d, $J = 5,7$, 3H)	18,2	H-1 α , H-10 α	C-1, C-9, C-10,

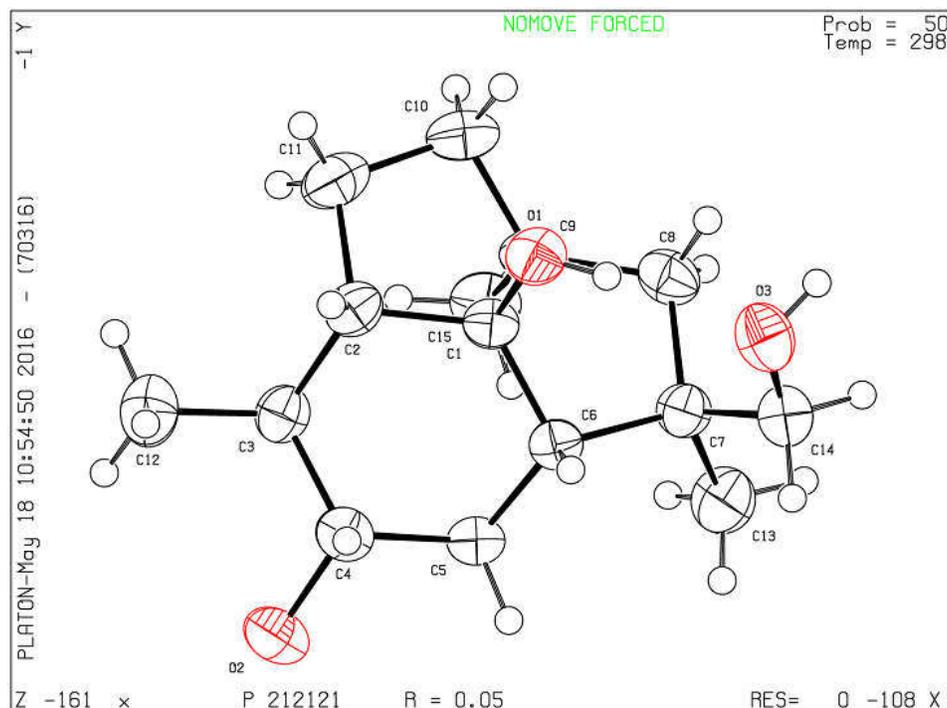


Figura 102 – Representação em perspectiva ORTEP da estrutura obtida por cristalografia de raios-X para o presiliperfolan-8 α ,10 β ,14-triol (**124**).

O composto **129** foi isolado como um óleo incolor (23 mg). O espectro de RMN de ^1H (Figura 103, pág. 117) observaram-se sinais em δ 3,89, 3,82, 3,72 e 3,22 ppm, que foram atribuídos aos hidrogênios oxigenados H-7 β , H-14b, H-10 α e H-14a, respectivamente. Também foram observados sinais em δ 1,00, 1,20 e 1,05 ppm, referentes aos três grupos metilas em H-12, H-13 e H-15, respectivamente. O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 104, pág. 117) observaram-se sinais em δ 91,5, 77,5 e 69,6 ppm, indicando três carbonos carbinólicos em C-7, C-10 e C-14, respectivamente. O sinal em δ 62,8 ppm foi caracterizado como o carbono central quaternário em C-8. Os sinais dos carbonos metílicos C-12, C-13 e C-15 foram observados em δ 25,0, 27,4 e 16,4 ppm, respectivamente. No espectro de DEPT 135 (Figura 105, pág. 118) observaram-se que o carbono oxigenado C-14 é um grupo metileno, enquanto C-7 e C-10 são grupos metínicos. Por meio do mapa de contornos HMBC (Figura A38, pág. 166) e das atribuições de RMN de ^1H e ^{13}C pôde-se propor que o composto é um sesquiterpeno cameroonano.

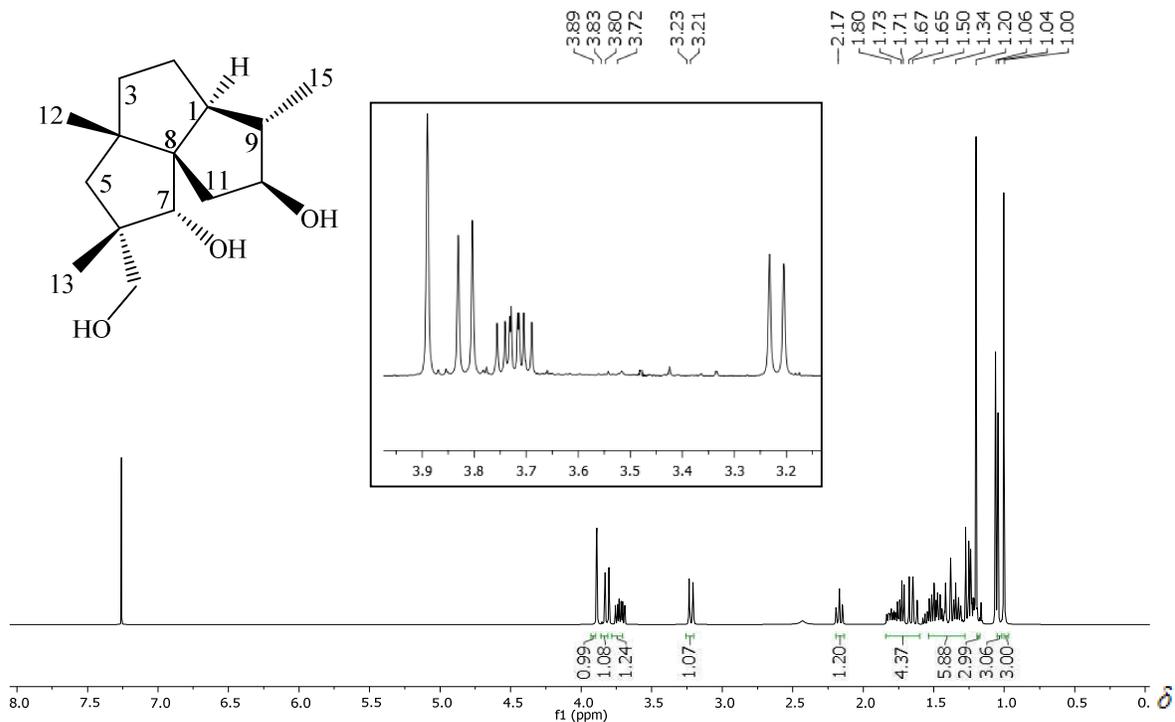


Figura 103 – Espectro de RMN de ^1H do cameroonan-7 α ,10 β ,14-triol (129) (CDCl_3 em 500 MHz).

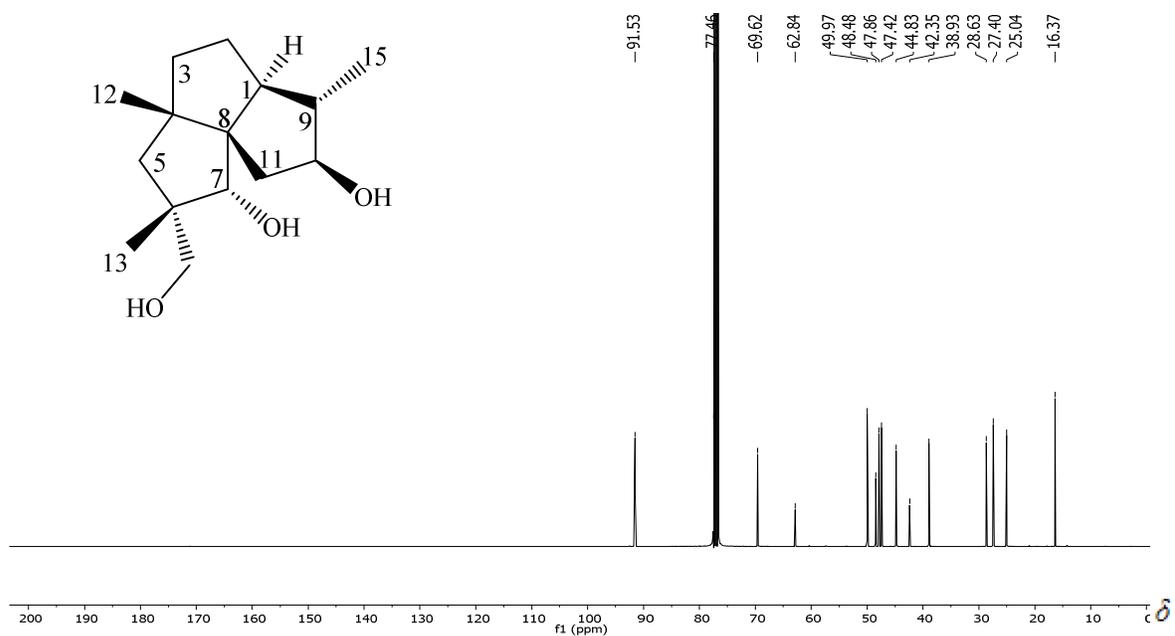


Figura 104 – Espectro de RMN de ^{13}C do cameroonan-7 α ,10 β ,14-triol (129) (CDCl_3 em 125 MHz).

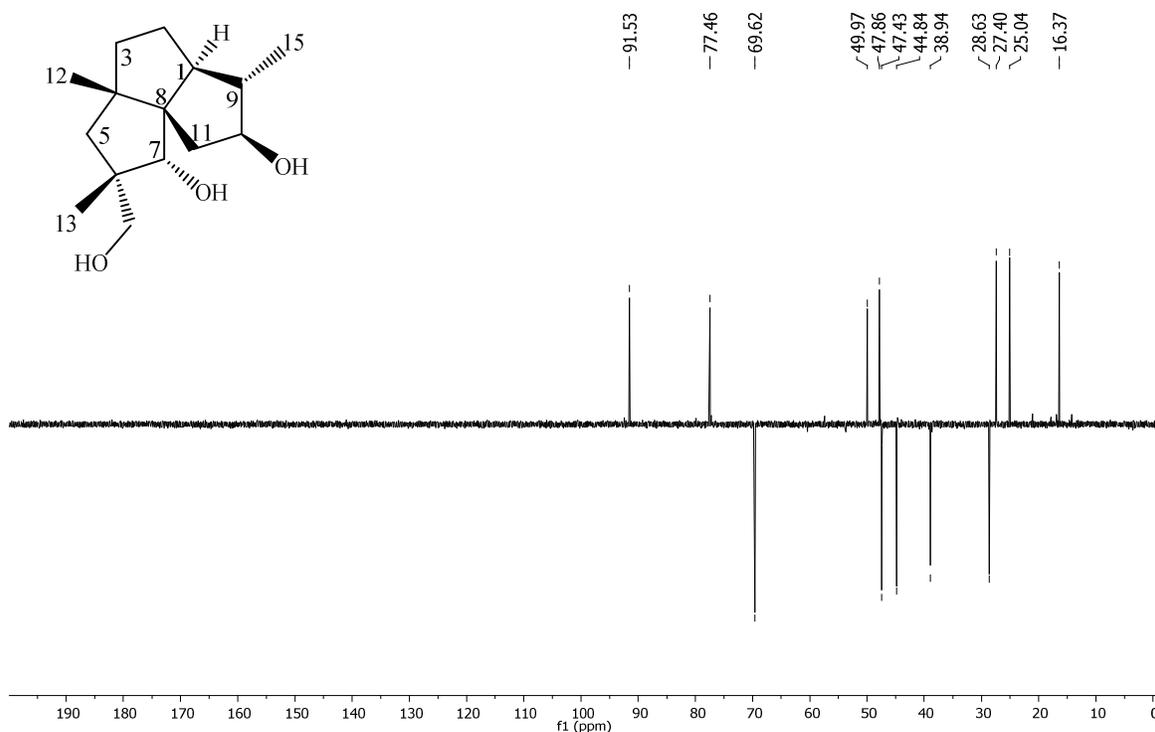


Figura 105 – Subespectro DEPT 135 do composto 129 ().

No mapa de contornos NOESY (Figura 106, pág. 119) observaram-se as correlações entre o sinal δ 3,89 (H-7 β) com 1,20 (H-13) e 1,00 (H-12) ppm; como também, correlações entre δ 3,72 (H-10 α) com 1,05 (H-15) ppm e correlação entre δ 3,82 (H-14) com 2,17 (H-1 α) ppm, dando suporte a elucidação do composto **129** como sendo o cameroonan-7 α ,10 β ,14-triol. Na tabela 17 (pág. 120) podem-se observar os dados de RMN de ^1H , ^{13}C e correlações HMBC e NOESY. Os mapas de correlações COSY e HSQC para o composto **129** são apresentados nas Figuras A36-A37, pág. 165 e 166.

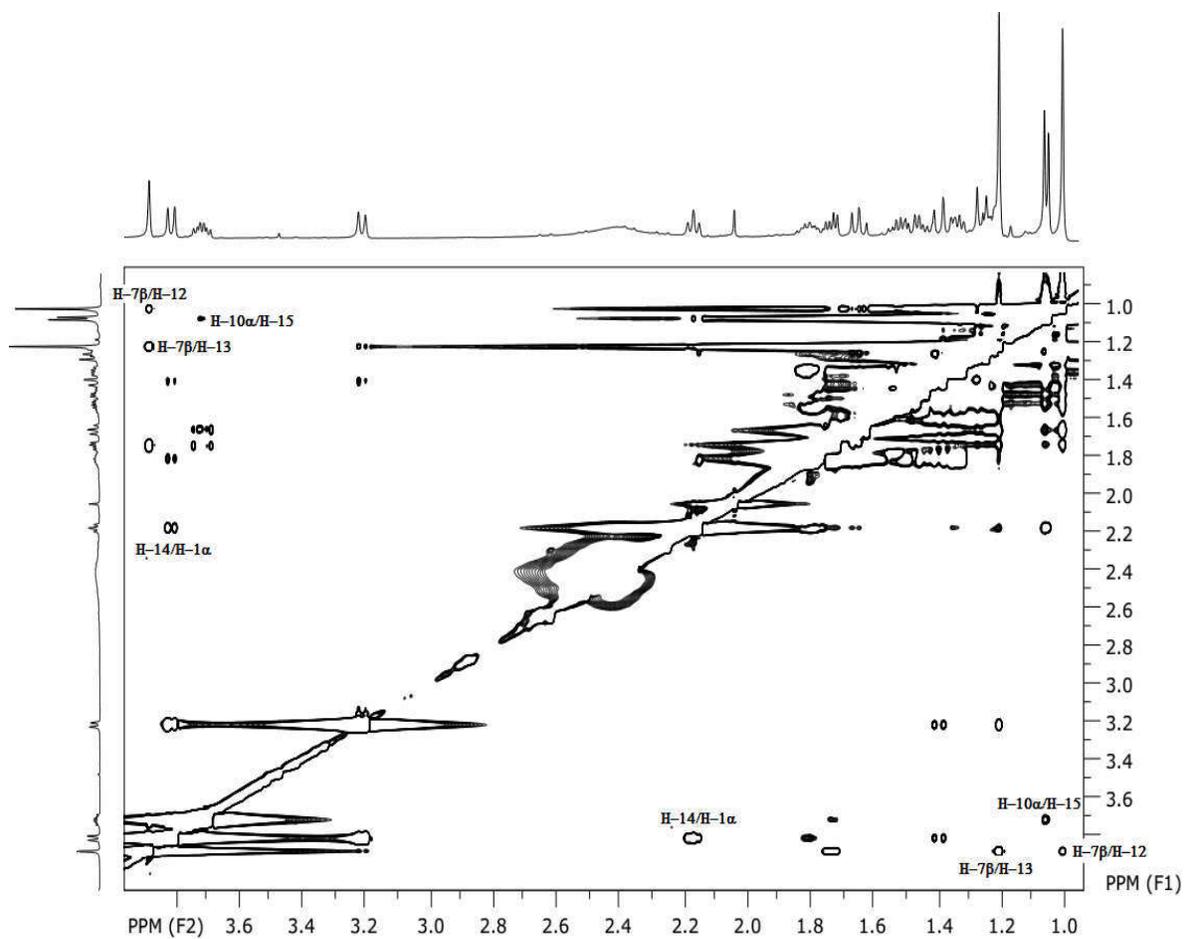


Figura 106 – Seção expandida do mapa de contornos NOESY do cameroonan-7 α ,10 β ,14-triol (**129**) (CDCl₃ em 500 MHz).

Tabela 12 – Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C e correlações observadas no HMBC para o cameroonan-7 α ,10 β ,14-triol (**129**) (CDCl_3)

Posição	δ_{H} (Hz)	δ_{C}	NOESY	HMBC
1 α	2,17 (t, $J = 9,0$, 1H)	47,9	H-14, H-15	C-2, C-4, C-7, C-8, C-9, C-11, C-15
2	1,34 (m, 1H)	28,6		C-4, C-8, C-9
	1,80 (m, 1H)			C-1, C-3, C-9
3	1,49 (m, 2H)	38,9		C-2, C-4, C-12
4	-	48,5	-	-
5	1,27 (m, 1H)	47,5		C-3, C-4, C-6, C-7, C-8, C-12, C-13, C-14
	1,40 (m, 1H)			C-3, C-4, C-6, C-7, C-12, C-13, C-14
6	-	42,4	-	-
7 β	3,89 (m, 1H)	91,5	H-11, H-12, H-13	C-1, C-6, C-8, C-11, C-14, C-13
8	-	62,8	-	-
9 β	1,22 (m, 1H)	50,0		
10 α	3,72 (m, 1H)	77,5	H-11 α , H-11 β , H-15	C-9, C-15
11	1,65 (m, 1H)	44,8	H-10 α	C-4, C-7, C-8, C-10
11	1,73 (m, 1H)		H-7 β , H-10 α	C-1, C-7, C-8, C-9
12	1,00 (s, 3H)	25,0	H-9 β , H-11, H-3	C-1, C-3, C-8
13	1,20 (s, 3H)	27,4	H-7 β , H-14	C-5, C-6, C-7, C-14
14a	3,22 (d, $J = 10,9$, 1H)	69,6	H-5, H-14b	C-5, C-6, C-7, C-13
14b	3,82 (d, $J = 10,9$, 1H)		H-1, H-5, H-2, H-14a	C-5, C-6, C-7, C-13
15	1,05 (d, $J = 6,5$, 3H)	16,4	H-1 α , H-10 α	C-1, C-9, C-10

5.3.6. Compostos não identificados (122 e 127)

O composto **122** foi isolado como um óleo de coloração amarelada. Por meio dos espectros de RMN de ^1H (Figura 107, pág. 121) e de ^{13}C (Figura 108, pág. 121), verificaram-se que esse composto, que provavelmente pertence a classe dos sesquiterpenos (por possuir 15 carbonos em seu esqueleto), não foi isolado anteriormente pelo grupo de pesquisas “Diseño Biosintético de Fungicidas” e, até o momento, esse composto não foi elucidado.

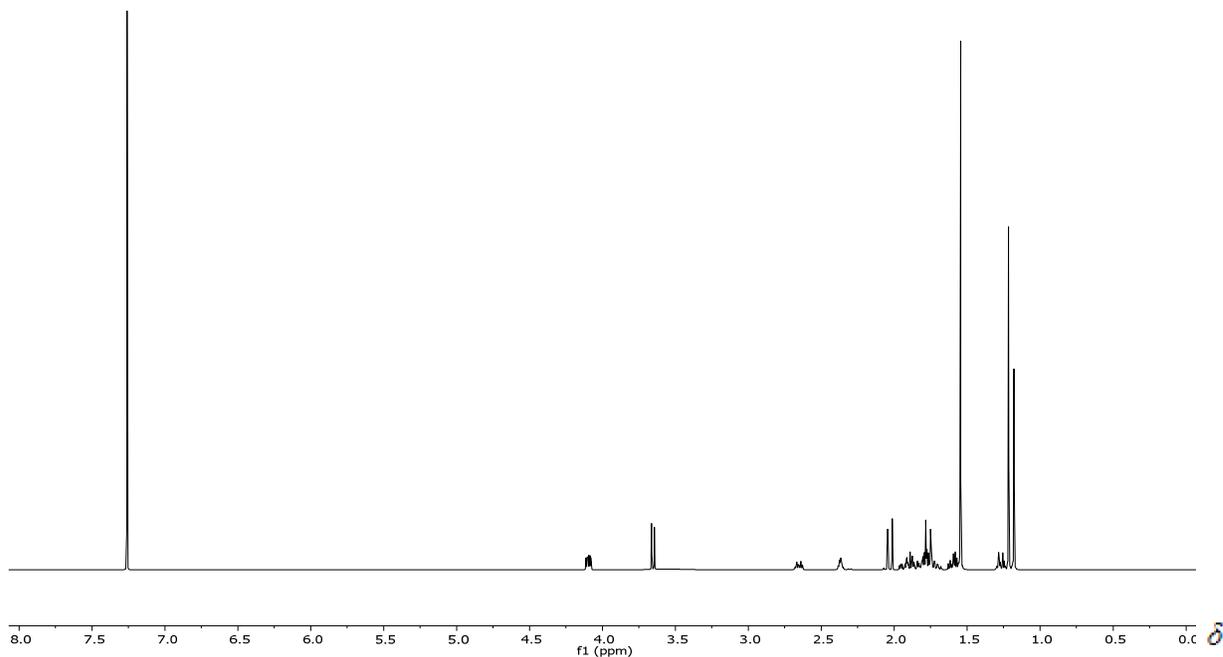


Figura 107 – Espectro de RMN de ^1H do composto **122** (CDCl_3 em 500 MHz).

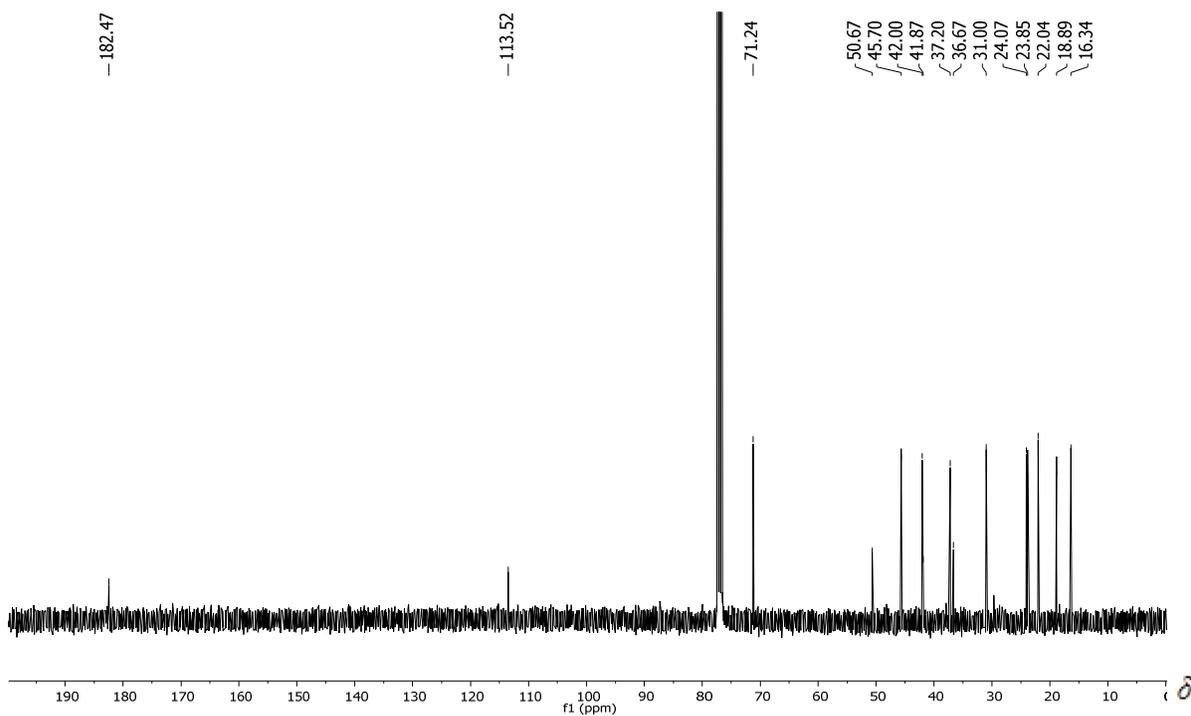


Figura 108 – Espectro de RMN de ^{13}C do composto **122** (CDCl_3 at 125 MHz).

O composto **127** foi isolado como um óleo incolor e o espectro de RMN de ^1H (Figura 109, pág. 122) apresentou três sinais de hidrogênios metílicos,

além de sinais que correspondem a hidrogênios metilênicos e metínicos, sugerindo que o composto pertence a classe dos sesquiterpenos. Entretanto, devido a pequena quantidade isolada (0,3 mg) não foi possível realizar a análise de RMN de ^{13}C e, conseqüentemente, sua identificação.

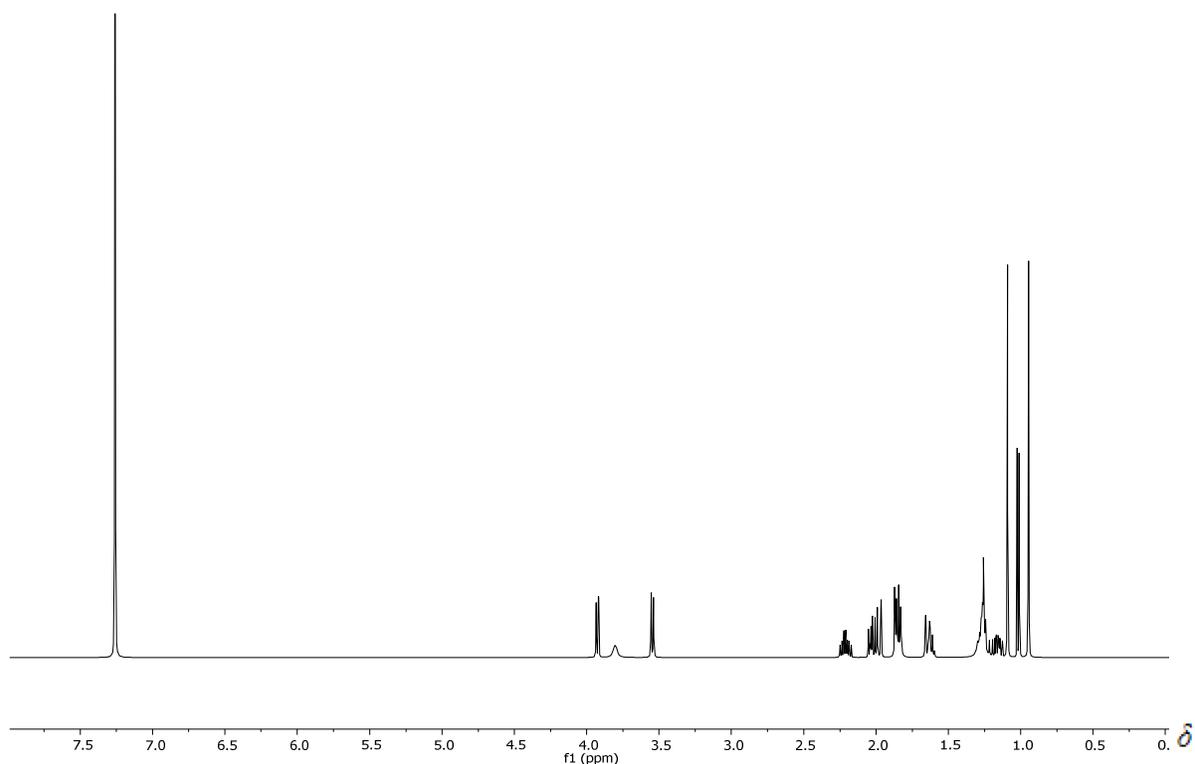


Figura 109 – Espectro de RMN de ^1H do composto **127** (CDCl_3 em 500 MHz)

6. Conclusões

Esse trabalho possibilitou observar a capacidade de biotransformação do ácido traquilobânico por seis espécies fúngicas, sendo que quatro dessas espécies não apresentaram potencial para modificar esse composto. O fungo *M. plumbeus* foi capaz de biotransformar o ácido traquilobânico em dois compostos, o ácido 7 β -hidroxitraquiloban-19-oico e o traquiloban-19-oato de β -D-glicopiranosila, este último até então não relatado na literatura. Já o fungo *S. racemosum* foi capaz de biotransformar o ácido traquilobânico em três compostos, o ácido 17-hidroxitraquiloban-19-oico, o ácido 16 α ,17-di-hidroxicaur-11(12)en-19-oico e o ácido sincefaloico, os dois últimos também nunca antes relatados. Ambos os produtos de biotransformação, avaliados quanto a atividade inibidora da AChE, apresentaram atividades de inibição maior que 50 %, com melhor resultado para o traquiloban-19-oato de β -D-glicopiranosila com 92,89 % de inibição a 10 mg/mL, e com **IC₅₀ = 1,17 mg/mL**.

No estudo das cepas mutantes $\Delta bcaba1$ a $\Delta bcaba4$ foram isolados dois intermediários biossintéticos do ácido abscísico. O 1-hidroxiabscísico, isolado de $\Delta bcaba1$ e o 1'-H-abscísico, isolado de $\Delta bcaba2$. A partir dos intermediários isolados, verificou-se que o gene *bcaba1* atua na oxidação de uma hidroxila a ácido carboxílico, enquanto o gene *bcaba2* atua na hidroxilação de um carbono não reativo, na última etapa da biossíntese do ácido abscísico. O papel dos genes *bcaba3* e *bcaba4* não pôde ser determinado até o momento.

Por meio do estudo de metabólitos secundários da cepa mutante $\Delta bcbot4$ do fungo *B. cinerea*, obtiveram-se diferentes compostos conhecidos e que já foram isolados de *B. cinerea* em diferentes condições de cultivos, foram eles: botcinina A, B e E, botrilactona, 6-hidroxibotrilactona, monômero, 4-epieremofil-9-ene-1 α ,2 α ,11-triol e 4-epieremofil-9-ene-2 α ,8 β ,11-triol. Esses compostos pertencentes a classe das botcininas, botrilactonas e eremofinenos. Além disso, esse estudo possibilitou o isolamento de compostos inéditos, como um sesquiterpeno botridiano (presilfiperfolan-8 α ,10 β ,14-triol) e dois sesquiterpenos cameroonanos (ácido 7 α -hidroxicameronan-14,15-dioico 7,14-

lactona e cameroonano-7 α ,10 β ,14-triol). Nesse trabalho foi relatada, pela primeira vez, a produção de sesquiterpenos cameroonanos pelo fungo *B. cinerea*. A produção desses sesquiterpenos provavelmente foi induzida devido ao acúmulo de intermediário botridiano na rota de biossíntese do botridial, levando a rearranjos para a classe dos cameroonanos.

7. Referências bibliográficas

ADELIN, E.; SERVY, C.; CORTIAL, S.; LÉVAIQUE, H.; GALLARD, J. F.; MARTIN, M.-T.; RETAILLEAU, P.; BUSSABAN, B.; LUMYONG, S.; OUAZZANI, J. Biotransformation of natural compounds. Oxido-reduction of Sch-642305 by *Aspergillus ochraceus* ATCC 1009. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 21, 2456-2459, **2011**.

ALAM, M.; HANSON, J. R., Biosynthetically directed microbiological transformations with the fungus *Trichothecium roseum*. *Phytochemistry*, 29, 3801-3803, **1990**.

ALANIO, A.; GARCIA-HERMOSO, D.; MERCIER-DELARUE, S.; LANTERNIER, F.; GITS-MUSELLI, M.; MENOTTI, J.; DENIS, B.; BERGERON, A.; LEGRAND, M.; LORTHOLARY, O.; BRETAGNE, S. Molecular identification of Mucorales in human tissues: contribution of PCR electrospray-ionization mass spectrometry. *Clinical Microbiology and Infection*, 21, 594.e1–594.e5, **2015**.

ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. Phylum zygomycota: class zygomycetes. In: *Introductory mycology*. New York: John Wiley & Sons, 127-171, **1996**.

ALFATAFTA, A. A.; MULLIN, C. A. Epicuticular terpenoids and an aurone from flowers of *Helianthus annuus*. *Phytochemistry*, 31, 4109-4113, **1992**.

ASCARI, J.; BOAVENTURA, M. A. D.; TAKAHASHI, J. A.; DURÁN-PATRÓN, R.; HERNÁNDEZ-GALÁN, R.; MACÍAS-SÁNCHEZ, A. J.; COLLADO, I. G. Biotransformation of bioactive isocaryolanes by *Botrytis cinerea*. *Journal of Natural Products*, 74, 1707–1712, **2011**.

AVALOS, J.; LIMÓN, M. C. Biological roles of fungal carotenoids. *Current Genetics*, 61, 309–324, **2015**.

BACCELLI, C.; NAVARRO, I.; BLOCK, S.; ABAD, A.; MOREL, N.; QUETIN-LECLERCQ, J. Vasorelaxant activity of diterpenes from *Croton zambesicus* and synthetic trachylobanes and their structure-activity relationships. *Journal of Natural Products*, 70, 910-917, **2007**.

BEALE, M. H.; BEARDER, J. R.; MACMILLAN, J.; MATSUO, A.; PHINNEY, B. O. Diterpene acids from *Helianthus* species and their microbiological conversion by *Gibberella fujikuroi*, mutant B1-41a. *Phytochemistry*, 22, 875-881, **1983**.

BELLOU, S.; MOUSTOGIANNI, A.; MAKRI, A.; AGGELIS, G. Lipids containing polyunsaturated fatty acids synthesized by zygomycetes grown on glycerol. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 166, 146–158, **2012**.

BERGER, R. G. Aroma biotechnology. Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag, **1995**.

BUCHHOLZ, K.; COLLINS, J. The roots - a short history of industrial microbiology and biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97, 3747-3762, **2013**.

CAO, F. Y.; YOSHIOKA, K.; DESVEAUX, D. The roles of ABA in plant–pathogen interactions. *Journal of Plant Research*, 124, 489–499, **2011**.

CHEN, L. -X.; ZHAO, Q.; ZHANG, M.; LIANG, Y. -Y.; MA, J. -H.; ZHANG, X.; DING, L. -Q.; ZHAO, F.; QIU, F. Biotransformation of curcumenol by *Mucor polymorphosporus*. *Journal of Natural Products*, 78, 674–680, **2015**.

CHEN, H. -W.; HE, X. -H.; YUAN, R.; WEI, B. -J.; CHEN, Z.; DONG, J. -X.; WANG, J. Sesquiterpenes and a monoterpene with acetylcholinesterase (AChE)

inhibitory activity from *Valeriana officinalis* var. *latifolia* in vitro and in vivo. *Fitoterapia*, 110, 142–149, **2016**.

CHOMCHEON, P., Aromatase inhibitory, radical scavenging, and antioxidant activities of depsidones and diaryl ethers from the endophytic fungus *Corynespora cassiicola* L36. *Phytochemistry*, 70, 407–413, **2009**.

COATES, R. M.; HO, Z.; KLOBUS M.; WILSON, S. R. Stereochemistry and reactions of presilphiperfolanol: A branch point marker in triquinane sesquiterpene biogenesis. *Journal of the American Chemical Society*, 118, 9249–9254, **1996**.

COLLADO, I. G.; HERNÁNDEZ-GALÁN, R.; DURÁN-PATRÓN, R.; CANTORAL, J. M. Metabolites from a shake culture of *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry*, 38, 647–650, **1995**.

COLLADO, I. G.; MACIAS-SÁNCHEZ, A. J.; HANSON, J. R. Fungal terpene metabolites: biosynthetic relationships and the control of the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Natural Product Reports*, 24, 674–686, **2007**.

COLLADO, I. G.; VIAUD, M. Secondary metabolism in *Botrytis cinerea*: Combining genomic and metabolomic approaches. In: FILLINGER, S.; ELAD, Y. (Ed.) *Botrytis: the fungus, the pathogen and its management in agricultural systems*. Springer, **2016**.

DASTAN, D.; SALEHI, P.; GOHARI, A. R.; EBRAHIMI, S. N.; ALIAHMADI, A.; HAMBURGER, M. Bioactive sesquiterpene coumarins from *Ferula pseudalliacea*. *Planta Medica*, 80, 1118–1123, **2014**.

DAVIES, F. K.; JINKERSON, R. E.; POSEWITZ, M. C. Toward a photosynthetic microbial platform for terpenoid engineering. *Photosynthesis Research*, 123, 265–284, **2015**.

DE SOUZA, G. G.; OLIVEIRA, T. S.; TAKAHASHI, J. A.; COLLADO, I. G.; MACÍAS-SÁNCHEZ, A. J.; HERNÁNDEZ-GALÁN, R. Biotransformation of clovane derivatives. Whole cell fungi mediated domino synthesis of rumphellclovane A. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 10, 3315–3320, **2012**.

DEAN, R.; VAN KAN, J. A. L.; PRETORIUS, Z. A.; HAMMOND-KOSACK, K. E.; DI PIETRO, A.; SPANU, P. D.; RUDD, J. J.; DICKMAN, M.; KAHMANN, R.; ELLIS, J.; FOSTER, G. D. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13, 414-430, **2012**.

DEMAIN, A. L., Importance of microbial natural products and the need to revitalize their discovery. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 41, 185-201, **2014**.

DEMAIN, A. L., Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 52, 455-463, **1999**.

DEMYTTENAERE, J. C. R.; POOTER, H. L. Biotransformation of geraniol and nerol by spores of *Penicillium italicum*. *Phytochemistry*, 41(4), 1079-1082, **1996**.

DEWICK, P.M. Medicinal Natural Products. A biosynthetic approach. 3^o Edition. Englan: John Wiley & Sons. **2009**.

DICKSCHAT, J. S. Bacterial terpene cyclases. *Natural Product Reports*, 33, 87–110, **2016**.

DONOVA, M. V.; EGOROVA, O. V., Microbial steroid transformations: current state and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 94, 1423-1447, **2012**.

DÖRFFLING, K. The discovery of abscisic acid: a retrospect. *Journal of Plant Growth Regulation*, 34, 795–808, **2015**.

DOS SANTOS, P. F.; DUARTE, M. C.; BEZERRA, D. A. C.; AGRA, M. F.; BARBOSA FILHO, J. M.; DA SILVA, M. S.; TAVARES, J. F. Diterpenes from *Xylopia langsdorffiana*. *Helvetica Chimica Acta*, 96, **2013**.

DURÁN-PATRÓN, R.; HERNÁNDEZ-GALÁN, R.; COLLADO, I. G. Secobotrytriendiol and related sesquiterpenoids: New phytotoxic metabolites from *Botrytis cinerea*. *Journal of Natural Products*, 63, 182–184, **2000**.

DURÁN-PATRÓN, R.; HERNÁNDEZ-GALÁN, R.; REBORDINOS, L. G.; CANTORAL, J. M.; COLLADO, I. G. Structure-activity relationships of new phytotoxic metabolites with the botryane skeleton from *Botrytis cinerea*. *Tetrahedron*, 55, 2389–2400, **1999**.

ELAD, Y.; WILLIAMSON, B.; TUDZYNSKI, P.; DELEN, N. *Botrytis spp. and diseases they cause in agricultural systems - An introduction*. In: *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Eds.: ELAD, Y.; WILLIAMSON, B.; TUDZYNSKI, P.; DELEN, N., **2007**.

ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRES JR, V.; FEATHERSTONE, R. M., A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7, 88-90, **1961**.

ETSE, J. T.; GRAY, A. I.; WATERMAN, P. G. Chemistry in the Annonacea, XXIV. Kaurane and kaur-16-ene diterpenes from the stem bark of *Annona reticulata*. *Journal of Natural Products*, 50, 979-983, **1987**.

FABER, K., *Biotransformations in Organic Chemistry*. 6th edition ed. **2004**.

FENG, L.-M.; JI, S.; QIAO, X.; LI, Z.-W.; LIN, X.-H.; YE, M. Biocatalysis of cycloastragenol by *Syncephalastrum racemosum* and *Alternaria alternata* to discover anti-aging derivatives. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 357, 1928–1940, **2015**.

FENG, X.; LUAN, J.; GUO, F. F.; LI, D. P.; CHU, Z. Y., Microbial transformation of maslinic acid by *Cunninghamella blakesleana*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 82, 127-130, **2012**.

FRAGA, B. M., The trachylobane diterpenes. *Phytochemical analysis*, 5, 49-56, **1994**.

FRAGA, B. M.; BRESSA, C.; GONZÁLEZ-VALLEJO, V.; GONZÁLEZ, P.; GUILLERMO, R. Biotransformation of ent-kaur-16-ene and ent-trachylobane 7 β -acetoxo derivatives by the fungus *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium fujikuroi*). *Phytochemistry*, 81, 60–70, **2012**.

FU, S.-B.; YANG, J.-S.; CUI, J.-L.; SUN, D.-A. Biotransformation of ursolic acid by *Syncephalastrum racemosum* CGMCC 3.2500 and anti-HCV activity. *Fitoterapia*, 86, 123–128, **2013**.

GANASAN, A., The impact of natural products upon modern drug discovery. *Current Opinion in Chemical Biology*, 12, 306-317, **2008**.

GARIBALDI, A.; BERTETTI, D.; ORTEGA, S. F.; GIULLINO, M. L. First report of botrytis blight caused by *Botrytis cinerea* on fruit-scented sage in Italy. *Journal of Plant Pathology*, 98, 171-185, **2016**.

GHASEMI, S.; MOHAJERI, M.; HABIBI, Z., Biotransformation of testosterone and testosterone heptanoate by four filamentous fungi. *Steroids*, 92, 7-12, **2014**.

GOMES, M. Z. R.; LEWIS, R. E.; KONTOYIANNIS, D. P., Mucormycosis caused by unusual Mucormycetes, non-*Rhizopus*, -*Mucor*, and -*Lichtheimia* species. *Clinical Microbiology Reviews*, 24, 411–445, **2011**.

HANSON, J. R.; HITCHCOCK, P. B.; TAKAHASHI, J. A. Biotransformation of *ent*-16 β ,19-dihydroxykaurane by *Cephalosporium aphidicola*. *Phytochemistry*, 40, 797-800, **1995**.

HARVEY, A. L., Natural products in drug discovery. *Drug Discovery Today*, 13, 894-901, **2008**.

HEDDEN, P.; SPONSEL, V. A Century of Gibberellin Research. *Journal of Plant Growth Regulation*, 34, 740–760, **2015**.

HOLLMANN, F.; ARENDS, I. W. C. E.; HOLTSMANN, D., Enzymatic reductions for the chemist. *Green Chemistry*, 13, 2285-2313, **2011**.

HU, J.; SHI, X.; DING, W.; CHEN, J.; LI, C. Phenylpropanoid glycosides from *Conyza japonica*. *Chemistry of Natural Compounds*, 48, 782-784, **2012**.

HUANG, F. C.; HINKELMANN, J.; SCHWAB, W. Glucosylation of aroma chemicals and hydroxy fatty acids. *Journal of Biotechnology*, 216, 100–109, **2015**.

HUANG, L.-H.; LI, J. X., G.; ZHANG, X.-H.; WANG, Y.-G.; YIN, Y.-L.; LIU, H.-M., Biotransformation of dehydroepiandrosterone (DHEA) with *Penicillium griseopurpureum* Smith and *Penicillium glabrum* (Wehmer) Westling. *Steroids*, 75, 1039-1046, **2010**.

HUO, X.; LIU, Q.; WANG, C.; MENG, Q.; SUN, H.; PENG, J.; MA, X.; SUN, P.; LIU, K., Inhibitory effect of valsartan on the intestinal absorption and renal

excretion of bestatin in rats. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 103, 719-729, **2014**.

HUTCHINSON, C. R., Manipulation microbial metabolites for drug discovery and production. In *Natural products: drug discovery and therapeutic medicine*, ZANG, L., DEMAIN, A.L., Ed. Huma press. Totowa, **2005**.

HYDE, K. D.; HONGSANAN, S.; JEEWON, R.; BHAT, D. J.; MCKENZIE, E. H. C.; JONES, E. B. G.; PHOOKAMSAK, R.; ARIYAWANSA, H. A.; BOONMEE, S.; ZHAO, Q.; ABDEL-AZIZ, F. A.; ABDEL-WAHAB, M. A.; BANMAI, S.; CHOMNUNTI, P.; CUI, B. -K.; DARANAGAMA, D. A.; DAS, K.; DAYARATHNE, M. C.; DE SILVA, N. I.; DISSANAYAKE, A. J.; DOILOM, M.; EKANAYAKA, A. H.; GIBERTONI, T. B.; GÓES-NETO, A. G.; HUANG, S. -K.; JAYASIRI, S. C.; JAYAWARDENA, R. S.; KONTA, S.; LEE, H. B.; LI, W. -J.; LIN, C. -G.; LIU, J. -K.; LU, Y. -Z.; LUO, Z. -L.; MANAWASINGHE, I. S.; MANIMOHAN, P.; MAPOOK, A.; NISKANEN, T.; NORPHANPHOUN, C.; PAPIZADEH, M.; PERERA, R. H.; PHUKHAMSAKDA, C.; RICHTER, C.; SANTIAGO, A. L. C. M. A.; DRECHSLER-SANTOS, E. R.; SENANAYAKE, I. C.; TANAKA, K., Fungal diversity notes 367–490: taxonomic and phylogenetic contributions to fungal taxa. *Fungal Diversity*, 80, 1–270, **2016**.

INOMATA, M.; HIRAI, N.; YOSHIDA, R.; OHIGASHI, H., The biosynthetic pathway to abscisic acid via ionylideneethane in the fungus *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry*, 65, 2667–2678, **2004**.

KARAMI, K.; ZAMANI, A., *Mucor indicus*: Biology and industrial application perspectives: A review. *Biotechnology Advances*, 31, 466–481, **2013**.

KARDOS, N.; DEMAIN, A. L., Penicillin: the medicine with the greatest impact on therapeutic outcomes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 92, 677-687, **2011**.

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

KING, A. J.; DICKINSON, J. R. Biotransformation of aroma terpenoids by ale and lager yeast. *FEMS Yeast Research*, 3, 53-62, **2003**.

KOLMAN, A.; KOTOVA, N.; GRAWÉ, J. Aphidicolin induces 6-thioguanine resistant mutants in human diploid fibroblasts. *Mutation Research*, 499, 227-233, **2002**.

KRUPINSKI, M.; JANICKI, T.; PAŁECZ, B.; DŁUGONSKI, Biodegradation and utilization of 4-n-nonylphenol by *Aspergillus versicolor* as a sole carbon and energy source. *Journal of Hazardous Materials*, 280, 678-684, **2014**.

KUMAR, S.; SRIVASTAVAB, N.; GUPTAC, B. S.; KUHADD, R. C.; GOMES, J., Lovastatin production by *Aspergillus terreus* using lignocellulose biomass in large scale packed bed reactor. *Food and Bioproducts Processing*, 92, 416-424, **2014**.

KUSARI, S.; SINGH, S.; JAYABASKARAN, C., Rethinking production of Taxol (paclitaxel) using endophyte biotechnology. *Trends in Biotechnology*, 32, 304-311, **2014**.

LAURENZA, A.; SUTKOWSKI, E. M.; SEAMON, K. B. Forskolin: a specific stimulator of adenylyl cyclase or a diterpene with multiple sites of action? *Trends in Pharmacological Sciences*, 10, **1989**.

LEE, S.-Y.; KIM, S.-H.; HONG, C.-Y.; KIM, H.-Y.; RYU, S.-H.; CHOI, I.-G. Biotransformation of (-)- α -pinene by whole cells of white rot fungi, *Ceriporia sp.* ZLY-2010 and *Stereum hirsutum*. *Mycobiology*, 43, 297-302, **2015**.

LEONG, Y.-W.; HARRISON, L. J. *ent*-Trachylobane diterpenoids from the liverwort *Mastigophora diclados*. *Phytochemistry*, 45, 7, 1457–1459, **1997**.

LEROCH, M., KRETSCHMER, M.; HAHN, M. Fungicide resistance phenotypes of *Botrytis cinerea* isolates from commercial vineyards in South West Germany. *Journal of Phytopathology*, 159, 63–65, **2011**.

LEVERRIER, A.; MARTIN, M. T.; SERVY, C.; OUAZZANI, J.; RETAILLEAU, P.; AWANG, K.; MUKHTAR, M. R.; GUÉRITTE, F.; LITAUDON, M. Rearranged diterpenoids from the biotransformation of *ent*-trachyloban-18-oic acid by *Rhizopus arrhizus*. *Journal of Natural Products*, 73, 1121–1125, **2010**.

LI, R.; MORRIS-NATSCHKE, S. L.; LEE, K.-H. Clerodane diterpenes: sources, structures, and biological activities. *Natural Product Reports*, 33, 1166–1226, **2016a**.

LI, Y.; SUN, S.; DU, C.; XU, C.; ZHANG, J.; DUAN, C.; ZHU, Z. A new disease of mung bean caused by *Botrytis cinerea*. *Crop Protection*, 85, 52–56, **2016b**.

LIN, J.; Chen, X.; Cai, X.; Yu, X.; Liu, X.; Cao, Y.; Che, Y. Isolation and characterization of aphidicolin and chlamydosporol derivatives from *Tolypocladium inflatum*. *Journal of Natural Products*, 74, 1798–1804, **2011**.

LIU, C.; DUTTA, D.; MITSCHER, L., Design and synthesis of new cephalosporin antibiotics. *Monatshefte für Chemie*, 145, 633–638, **2014**.

LIU, W. C.; GONG, T.; ZHU, P. Advances in exploring alternative Taxol sources. *RSC Advances*, 6, 48800–48809, **2016**.

LUO, J.; LIANG, Q.; SHEN, Y.; CHEN, X.; YIN, Z.; WANG, M., Biotransformation of bavachinin by three fungal cell cultures. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 117, 191-196, **2014**.

LYRA, F. H. Aplicações de fungos marinhos na produção otimizada de produtos naturais bioativos e em testes de biorremediação. Tese de doutorado, Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, **2016**.

MANGARAJ, S.; SETHY, G.; PATRO, M. K.; PADHI, S., A rare case of subcutaneous mucormycosis due to *Syncephalastrum racemosum*: Case report and review of literature. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 32, 448-451, **2014**.

MALMIERCA, M. G.; IZQUIERDO-BUENO, I.; MCCORMICK, S. P.; CARDOZA, R. E.; ALEXANDER, N. J.; MORAGA, J.; GOMES, E. V.; PROCTOR, R. H.; COLLADO, I. G.; MONTE, E.; GUTIÉRREZ, S. Botrydial and botcinins produced by *Botrytis cinerea* regulate the expression of *Trichoderma arundinaceum* genes involved in trichothecene biosynthesis. *Molecular Plant Pathology*, 17, 1017–1031, **2016**.

MAO, D. -B.; FENG, Y. -Q.; BAI, Y. -H.; XU, C. -P. Novel biotransformation of betulin to produce betulone by *Rhodotorula mucilaginosa*. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 43, 825–829, **2012**.

MARTINEZ, A.; PEROJIL, A.; RIVAS, F.; PARRA, A.; GARCIA-GRANADOS, A.; FERNANDEZ-VIVAS, A. Biotransformation of oleanolic and maslinic methyl esters by *Rhizomucor miehei* CECT 2749. *Phytochemistry*, 117, 500–508, **2015**.

MALONEK, S.; BÖMKE, C.; BORNBERG-BAUER, E.; ROJAS, M. C.; HEDDEN, P.; HOPKINS, P.; TUDZYNSKI, B. Distribution of gibberellin biosynthetic genes and gibberellin production in the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Phytochemistry* 66, 1296–1311, **2005**.

MARTIN, L. L.; KUBEIL, C.; SIMONOV, A. N.; KUZNETSOV, V. L.; CORBIN, C. J.; AUCHUS, R. J.; CONLEY, A. J.; BOND, A. M.; RODGERS, R. J. Electrochemistry of cytochrome P450 17 α -hydroxylase/17,20-lyase (P450c17). *Molecular and Cellular Endocrinology*, 441, 62–67, **2017**.

MASSAROLI, M.; MORAGA, J.; BORGES, K. B.; RAMÍREZ-FERNÁNDEZ, J.; VIAUD, M.; COLLADO, I. G.; DURÁN-PATRÓN, R.; HERNÁNDEZ-GALÁN, R. A shared biosynthetic pathway for botcinins and botrylactones revealed through gene deletions. *ChemBioChem*, 14, 132 – 136, **2013**.

MEI, Y.-Z.; LIU, R.-X.; WANG, D.-P.; WANG, X. D., C. -C. Biocatalysis and biotransformation of resveratrol in microorganisms. *Biotechnology Letters*, 37, 9-18, **2015**.

MIR, R. A.; KAUSHIK, P. S.; CHOWDERY, R. A.; ANURADHA, M. Elicitation of forskolin in cultures of *Rhizactonia bataticola*-a phytochemical synthesizing endophytic fungi. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 7, 185-189, **2015**.

MITSCHER, L. A.; RAO, G. S. R.; VEYSOGLU, T.; DRAKE, S.; HAAS, T., Isolation and identification of trachyloban-19-oic and (-)-kaur-16-en-19-oic acids as antimicrobial agents from the prairie sunflower, *Helianthus annuus*. *Journal of Natural Products*, 46, 745–746, **1983**.

MOJABI, F. Antimalarial natural products: a review. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 2, 52-62, **2012**.

MORAGA, J.; DALMAIS, B.; IZQUIERDO-BUENO, I.; ALEU, J.; HANSON, J. R.; HERNÁNDEZ-GALÁN; VIAUD, M.; COLLADO, I. G. Genetic and molecular basis

of botrydial biosynthesis: connecting cytochrome P450-encoding genes to biosynthetic intermediates. *ACS Chemical Biology*, 11, 2838–2846, **2016**.

MORAGA, J.; PINEDO, C.; DURÁN-PATRÓN, R.; COLLADO, I. G.; HERNÁNDEZ-GALÁN, R. Botrylactone: new interest in an old molecule—review of its absolute configuration and related compounds. *Tetrahedron*, 67, 417-420, **2011**.

MOSER, R., PERTOT, I., ELAD, Y. & RAFFAELLI, R. Farmers' attitudes toward the use of biocontrol agents in IPM strawberry production in three countries. *Biological Control*, 47, 125-132, **2008**.

MUELLER, G. M.; SCHMIT, J. P., Fungal biodiversity: what do we know? What can we predict? *Biodiversity and Conservation*, 16, 1-5, **2007**.

MUSHARRAF, S. G.; UDDIN, J.; AKHTER, M.; PARVEZ, M.; SAIFULLAHA; KHAN, S.; YOUSUF, S.; KHAN, S.; CHOUDHARY, M. I. Biotransformation of an antimalarial drug, artemether by plant and fungal cell cultures. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 82, 80–85, **2012**.

NGAMROJNAVANICH, N.; TONSIENGSON, S.; LERTPRATCHYA, P.; ROENGSUMRAN, S.; PUTHONG, S.; PETSOM, A. Diterpenoids from the stem barks of *Croton robustus*. *Archives of Pharmacal Research*, 26, 898, **2003**.

NUNES, F. M.; DOS SANTOS, G. F.; SARAIVA, N. N.; TRAPP, M. A.; DE MATTOS, M. C.; OLIVEIRA, M. C. F.; RODRIGUES-FILHO, E., New fungi for whole-cell biotransformation of carvone enantiomers. Novel p-menthane-2,8,9-triols production. *Applied Catalysis A: General*, 468, 88-94, **2013**.

PARSHIKOV, I. A.; NETRUSOV, A. I.; SUTHERLAND, J. B., Microbial transformation of antimalarial terpenoids. *Biotechnology Advances*, 30, 1516-1523, **2012**.

PATEL, R. N., Synthesis of chiral pharmaceutical intermediates by biocatalysis. *Coordination Chemistry Reviews*, 258, 659-701, **2008**.

PATEL, R. N., Stereoselective biotransformations in synthesis of some pharmaceutical intermediates. *Advances in Applied Microbiology*, 43, 91-140, **1997**.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S., Introduction to spectroscopy. 3^a ed., **2001**.

PELÁEZ, F., The historical delivery of antibiotics from microbial natural products - Can history repeat? *Biochemical Pharmacology*, 71, 981-990, **2006**.

PERLMAN, R. L.; RAO, P. S., Quality of life of older patients undergoing renal transplantation: finding the right immunosuppressive treatment. *Drugs and Aging*, 31, 103-109, **2014**.

PETERSON, D. H.; MURRAY, H. C., Microbiological oxygenation of steroids at carbon 11. *Journal of the American Chemical Society*, 74, 1871-1872, **1952**.

PINEDO, C.; MORAGA, J.; BARUA, J.; GONZALEZ-RODRÍGUEZ, V. E.; ALEU, J.; DURÁN-PATRÓN, R.; MACÍAS-SÁNCHEZ, A. J.; HANSON, J. R.; VIAUD, M.; HERNÁNDEZ-GALÁN, R.; GARRIDO, C.; COLLADO, I. G. Chemically induced cryptic sesquiterpenoids and expression of sesquiterpene cyclases in *Botrytis cinerea* revealed new sporogenic (+)-4-epieremophil-9-en-11-ols. *ACS Chemical Biology*, 11, 1391-1400, **2016**.

PUEPPKE, S. G.; VANETTEN, H. D., Accumulation of pisatin and three additional antifungal pterocarpanes in *Fusarium solani*-infected tissues of *Pisum sativum*. *Phytopathological Plant Pathology*, 8, 51-61, **1976**.

PYREK, J. ST. New pentacyclic diterpene acid trachyloban-19-oic acid from sunflower. *Tetrahedron*, 26, 5029-5032, **1970**.

QIAO, L.; JI, C.; ZHANG, D.; YANG, L.; CHEN, R.; ZHANG, J.; DAI, J., Microbial transformations of buagarofuran, an anti-anxietic agent. *Tetrahedron*, 70, 3560-3569, **2014**.

QUINTANA, P. G.; ROMERO, S. M.; VAAMONDE, G.; BALDESSARI, A. New metabolites of drospirenone obtained in Mucorales fungi culture. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 97, 110–117, **2013**.

RAMOS, A. S.; RIBEIRO, J. B.; TEIXEIRA, B. G.; FERREIRA, J. L. P.; SILVA, J. R. A.; FERREIRA, A. A.; DE SOUZA, R. O. M. A.; AMARAL, A. C. F. Hydroxylation of 1,8-cineole by *Mucor ramannianus* and *Aspergillus niger*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46, 261-264, **2015**.

RICO-MARTÍNEZ, M.; MEDINA, F. G.; MARRERO, J. G.; OSEGUEDA-ROBLES, S., Biotransformation of diterpenes. *RSC Advances*, 4, 10627-10647, **2014**.

ROCHA, A. D.; DOS SANTOS, G. C.; FERNANDES, N. G.; PFENNING, L. H.; TAKAHASHI, J. A.; BOAVENTURA, M. A. D., Hydroxylation at carbon-2 of *ent*-16-oxo-17-norkauran-19-oic acid by *Fusarium proliferatum*. *Journal of Natural Products*, 73, 1431–1433, **2010**.

RODRIGUES, D.; ALVES, C.; HORTA, A.; PINTEUS, S.; SILVA, J.; CULIOLI, G.; THOMAS, O. P.; PEDROSA, R. Antitumor and antimicrobial potential of bromoditerpenes isolated from the red alga, *Sphaerococcus coronopifolius*. *Marine Drugs*, 13, 713-726, **2015**.

SECOR, G. A.; RIVERA-VARAS, V.; CHRIST, D. S.; MATHEW, F. M.; KHAN, M. F. R.; VARRELMANN, M.; BOLTON, M. D., Characterization of *Fusarium secorum*, a new species causing *Fusarium* yellowing decline of sugar beet in north central USA. *Fungal Biology*, 118, 764-775, **2014**.

SEO, M.; KOSHIMA, T. Complex regulation of ABA biosynthesis in plants. *Trends in Plant Science*, 7, 41-48, **2002**.

SEVERIANO, M. E.; SIMÃO, M. R.; RAMOS, H. P.; PARREIRA, R. L. T.; ARAKAWA, N. S.; SAID, S.; FURTADO, N. A. J. C.; DE OLIVEIRA, D. C. R.; GREGÓRIO, L. E.; TIRAPELLI, C. R.; VENEZIANI, R. C. S.; AMBRÓSIO, S. R. Biotransformation of *ent*-pimaradienoic acid by cell cultures of *Aspergillus niger*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 21, 5870–5875, **2013**.

SHIMODA, K.; KONDO, Y.; NISHIDA, T.; HAMADA, H.; NAKAJIMA, N.; HAMADA, H. Biotransformation of thymol, carvacrol, and eugenol by cultured cells of *Eucalyptus perriniana*. *Phytochemistry*, 67, 2256–2261, **2006**.

SIEWERS V, KOKKELINK L, SMEDSGAARD J, TUDZYNSKI P. Identification of an abscisic acid gene cluster in the grey mold *Botrytis cinerea*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 4619-4626, **2006**.

SILVA, E. A.; TAKAHASHI, J. A.; OLIVEIRA, A. B., An interesting backbone rearrangement and novel derivatives from the biotransformation of trachyloban-19-oic acid by *Rhizopus stolonifer*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 13, 101-105, **2002**.

SILVA, E. O.; FURTADO, N. A. J. C.; ALEU, J.; COLLADO, I. G. Non-terpenoid biotransformations by *Mucor* species. *Phytochemistry Review*, 14, 745–764, **2015**.

SILVA, E. O.; FURTADO, N. A. J. C.; ALEU, J.; COLLADO, I. G. Terpenoid biotransformations by *Mucor* species. *Phytochemistry Review*, 12, 857–876, **2013**.

SILVA, M. A.; CORRÊA, F. R.; PINHO, D. B.; PEREIRA, O. L.; FURTADO, G. Q. First report of *Botrytis cinerea* on *Miconia cinnamomifolia*. *Australasian Plant Disease Notes*, 11, 26, **2016**.

SINGH P., PAUL S., SHIVAPRAKASH M.R., CHAKRABARTI A., GHOSH A.K. Stress response in medically important Mucorales. *Mycoses*, 59, 628–635, **2016**.

SINGH, R.; SHIVAPRAKASH, M. R.; CHAKRABARTI, A. Biofilm formation by zygomycetes: quantification, structure and matrix composition. *Microbiology*, 157, 2611–2618, **2011**.

SIVAKUMARAN, A.; AKINYEMI, A.; MANDON, J.; CRISTESCU, S. M.; HALL, M. A.; HARREN, F. J. M.; MUR, L. A. J. ABA suppresses *Botrytis cinerea* elicited NO production in tomato to influence H₂O₂ generation and increase host susceptibility. *Frontiers in Plant Science*, 7, 709, **2016**.

SORDON, S.; POPŁOŃSKI, J.; HUSZCZA, E. Microbial glycosylation of flavonoids. *Polish Journal of Microbiology*, 65, 137–151, **2016**.

SRIVASTAVA, S.; LUQMAN, S.; FATIMA, A.; DAROKAR, M. P.; NEGI, A. S.; KUMAR, J. K.; K., S.; CHANOTIYA, C. S.; TANDON, S.; KHANUJA, S. P. S., Biotransformation of artemisinin mediated through fungal strains for obtaining derivatives with novel activities. *Scientia Pharmaceutica*, 77, 87–95, **2009**.

STAATS, M.; VAN BAARLEN, P.; VAN KAN, J. A. L. Molecular phylogeny of the plant pathogenic genus *Botrytis* and the evolution of host specificity. *Molecular Biology and Evolution*, 22, 333–346, **2005**.

STEC, N.; BANASIAK, J.; JASIŃSKI, M. Abscisic acid — an overlooked player in plant-microbe symbioses formation? *Acta Biochimica Polonica*, 63, 53-58, **2016**.

TAKAHASHI, J. A.; GOMES, D. C.; LYRA, F. H.; DOS SANTOS, G. F.; MARTINS, L. R., The remarkable structural diversity achieved in *ent*-kaurane diterpenes by fungal biotransformations. *Molecules*, 19, 1856-1886, **2014**.

TAKAHASHI, J. A.; VIEIRA, H. S.; BOAVENTURA, M. A. D. Mono and diterpenes from seeds of *Xylopiya sericea*. *Química Nova*, 24, 616-618, **2001**.

TAKÓ, M.; KATOGÁN, A.; KRISCH, J.; VÁGVÖLGYI, C.; MONDAL, K. C.; PAPP, T. Enhanced production of industrial enzymes in Mucoromycotina fungi during solid-state fermentation of agricultural wastes/by-products. *Acta Biologica Hungarica*, 66, 3, **2015**.

TANI, H.; KOSHINO, H.; SAKUNO, E.; CUTLER, H. G.; NAKAJIMA, H. Botcinins E and F and botcinolide from *Botrytis cinerea* and structural revision of botcinolides. *Journal of Natural Products*, 69, 722-725, **2006**.

TANI, H.; KOSHINO, H.; SAKUNO, E.; NAKAJIMA, H. Botcinins A, B, C, and D, metabolites produced by *Botrytis cinerea*, and their antifungal activity against *Magnaporthe grisea*, a pathogen of rice blast disease. *Journal of Natural Products*, 69, 722-725, **2005**.

TELES, A. P. C.; TAKAHASHI, J. A., Paecilomide, a new acetylcholinesterase inhibitor from *Paecilomyces lilacinus*. *Microbiological Research*, 168, 204–210, **2013**.

TURNER, N.; SCHNEIDER, M., Biocatalysis — molecular, structural and synthetic advances: Editorial overview. *Current Opinion in Chemical Biology*, 4, 65-67, **2000**.

UCHÔA, P. K. S.; DA SILVA JR, J. N.; SILVEIRA, E. R.; LIMA, M. A. S.; BRAZ-FILHO, R.; COSTA-LOTUFO, L. V.; ARAÚJO, A. J.; DE MORAES, M. O.; PESSOA, C. O. Trachylobane and kaurane diterpenes from *Croton floribundus* spreng. *Quimica Nova*, 36, 778-782, **2013**.

VAN DELM, T.; BENEDEN, S. V.; MOMMAERTS, V.; MELIS, P.; STOFFELS, K.; WACKERS, F.; BAETS, W. Control of *Botrytis cinerea* in strawberries with *Gliocladium catenulatum* vectored by bumblebees. *Journal of Berry Research*, 5, 23–28, **2015**.

VASCONCELOS, D. H. P.; MAFEZOLI, J.; UCHÔA, P. K. S.; SARAIVA, N. N.; LIMA, M. A. S.; SILVA JR, J. N.; BARBOSA, F. G.; MATTOS, M. C.; DE OLIVEIRA, M. C. F.; LIMA, C. S.; PESSOA, M. N. G. Biotransformation of the diterpene *ent*-18,19-dihydroxytrachylobane by *Rhizopus stolonifer*. *Journal of The Brazilian Chemical Society*, 26, 1043-1047, **2015**.

VIEIRA, M. G. S. Estudo químico de *Xylopia nitida* Dunal (Annonaceae). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Ceará, **2010**.

VISAGIE, C. M.; HOUBRAKEN, J.; FRISVAD, J. C.; HONG, S.-B.; KLAASSEN, C. H. W.; PERRONE, G.; SEIFERT, K. A.; VARGA, J.; YAGUCHI, T.; R.A., S., Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Studies in Micology*, 78, 343–371, **2014**.

VOS, C. M. F.; CREMER, K. D.; CAMMUE, B. P. A.; CONINCK, B. D. The toolbox of *Trichoderma spp.* in the biocontrol of *Botrytis cinerea* disease. *Molecular Plant Pathology*, 16, 400–412, **2015**.

WANG, C.; HUO, X.-K.; ZHANG, B.-J.; SUN, C.-P.; TIAN, X.-G.; DENG, S.; LI, B.; WANG, W.; DONG, P.-P.; MA, X.-C. Highly regioselective glucosylation of

alcoholic hydroxyls of protostane triterpenoids mediated by fungal biotransformation. *Catalysis Communications*, 89, 40–43, **2017**.

WANG, T. S.; ZHOU, J. Y.; TAN, H. Three new metabolites from *Botrytis cinerea*. *Journal of Asian Natural Products Research*, 10, 919–924, **2008**.

WILLIAMSON, B., TUDZYNSKI, B., TUDZYNSKI, P.; VAN KAN, J. A. L. *Botrytis cinerea*: The cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology*, 8, 561-580, **2007**.

XU, D.-B.; YE, W.-W.; HAN, Y.; DENG, Z.-X.; HONG, K. Natural products from mangrove *Actinomycetes*. *Marine Drugs*, 12, 2590-2613, **2014**.

YANG, B.; ZHAO, Y.; LOU, Z.; ZHAO, H. Eupalinolide O, a novel sesquiterpene lactone from *Eupatorium lindleyanum* DC, induces cell cycle arrest and apoptosis in human MDA-MB-468 breast cancer cells. *Oncology Reports*, 36, 2807-2813, **2016**.

YANG, X.; GE, H.; SONG, Y.; LI, J.; CHEN, G., Microbial transformation of 20(S)-protopanaxatriol by *Mucor spinosus*. *Biotechnology Letters*, 68, 678-680, **2015**.

YANG, X.; WANG, C.; YANG, J.; WAN, D.; LIN, Q.; YANG, G.; MEI, Z.; FENG, Y. Antimicrobial sesquiterpenes from the Chinese medicinal plant, *Chloranthus angustifolius*. *Tetrahedron Letters*, 55, 5632–5634, **2014**

YAO, J. –L.; FANG, S. –M.; LIU, R.; OPPONG, M. B.; LIU, E. –W.; FAN, G. –W.; ZHANG, H. A review on the terpenes from genus *Vitex*. *Molecules*, 21, 1179, **2016**.

YI, W.; YANG, K.; YE, J.; LONG, Y.; KE, J.; OU, H. Triphenyltin degradation and proteomic response by an engineered *Escherichia coli* expressing cytochrome P450 enzyme. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 37, 29–34, **2017**.

YU, J. S.; BAEK, J.; PARK, H. B.; MOON, E.; KIM, S. Y.; CHOI, S. U.; KIM, K. H. A New rearranged eudesmane sesquiterpene and bioactive sesquiterpenes from the twigs of *Lindera glauca* (Sieb. et Zucc.) Blume. *Archives of Pharmacal Research*, 36, 1628–1634, **2016**.

ZAKS, A.; DODDS, D. R., Application of biocatalysis and biotransformations to the synthesis of pharmaceuticals. *Drug Discovery Today*, 2, 513-531, **1997**.

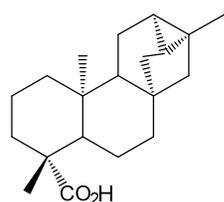
ZGODA-POLS, J. R.; FREYER, A. J.; KILLMER, L. B.; PORTER, J. R. Antimicrobial diterpenes from the stem bark of *Mitrephora celebica*. *Fitoterapia*, 73, 434-438, **2002**.

ZHAN, J.; GUNATILAKA, A. A. L. Microbial Transformation of Curvularin. *Journal of Natural Products*, 68, 1271-1273, **2005**.

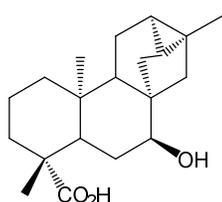
ZHANG, H.; SU, Y.; WU, Z.; GAO, X. Bergenin glycosides from *Rodgersia aesculifolia*. *Phytochemistry Letters*, 13, 114–118, **2015**.

8. Apêndice

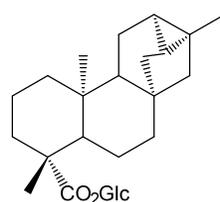
LISTA DE FIGURAS



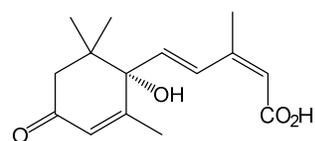
81



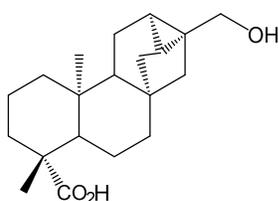
95



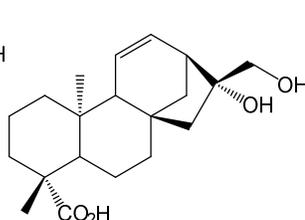
96



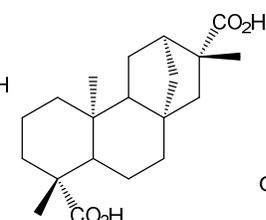
80



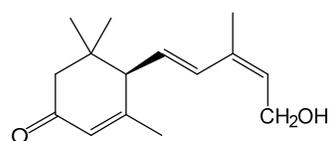
97



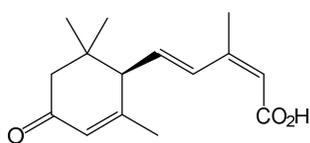
99



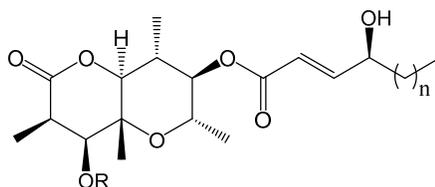
98



110



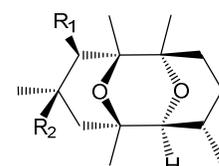
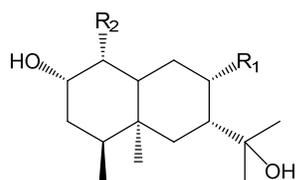
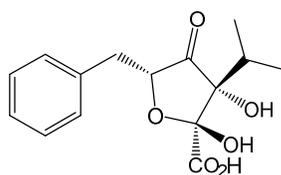
111



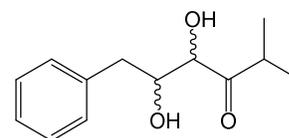
117 R= Ac, n= 5

118 R= Ac, n= 3

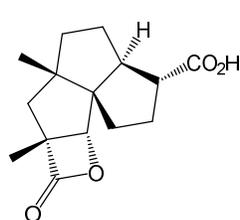
130 R= H, n=3

120 R₁= H, R₂= OH121 R₁= OH, R₂= H125 R₁= H, R₂= OH126 R₁= OH, R₂= H

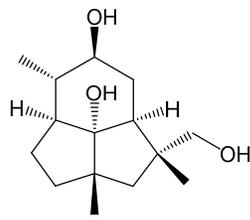
123



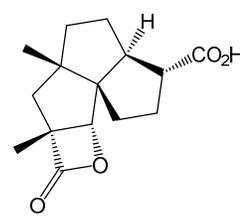
80



119



124



129

ESPECTROS

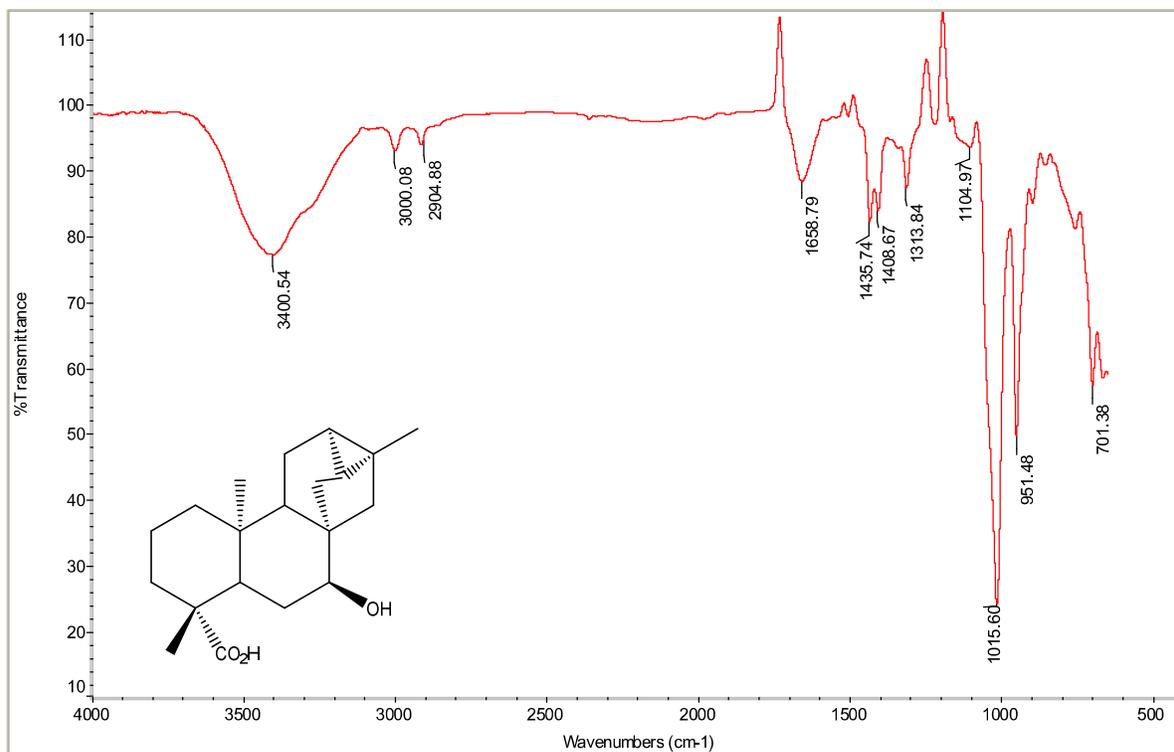


Figura A1 – Espectro no IV do composto do 7 β -hidroxitraquiloban-19-oico (**95**).

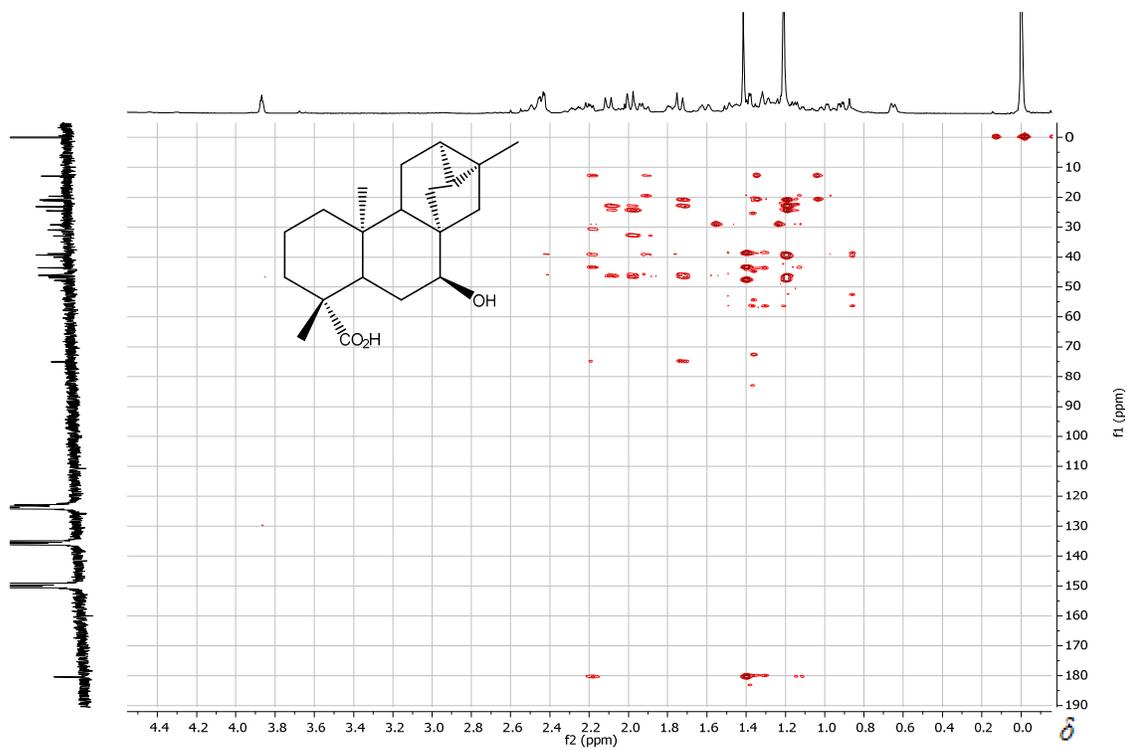


Figura A2 – Mapa de contornos HMBC do 7 β -hidroxitraquiloban-19-oico (**95**) (400 MHz, piridina- d_5).

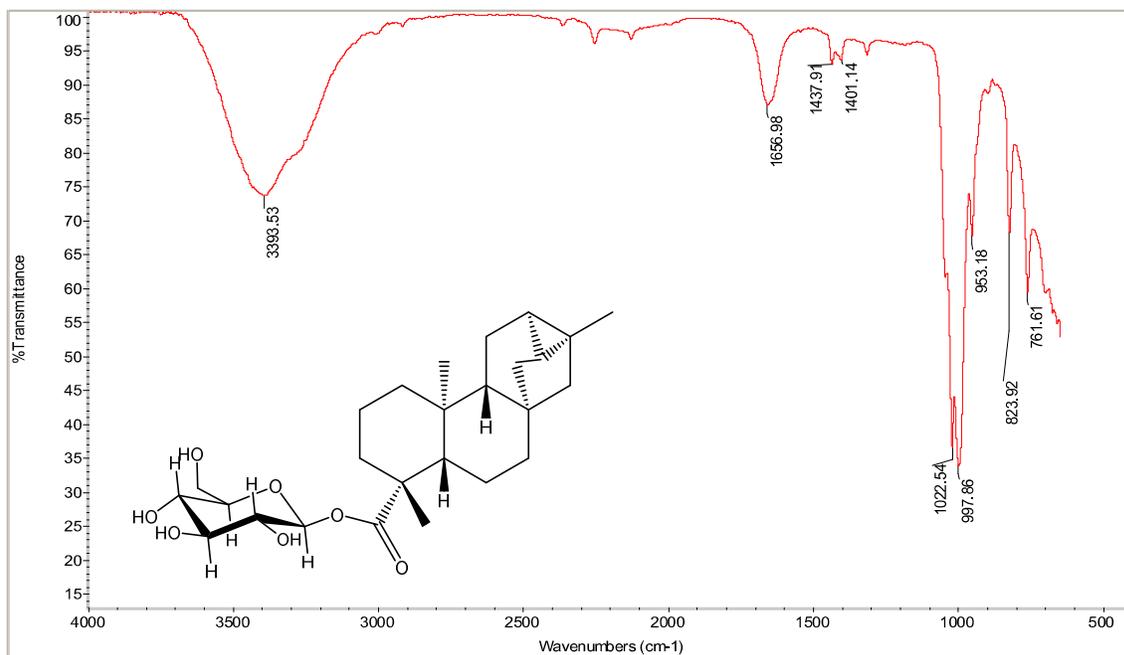


Figura A3 – Espectro no IV do tranquilban-19-oato de β -D-glicopiranosila (**96**).

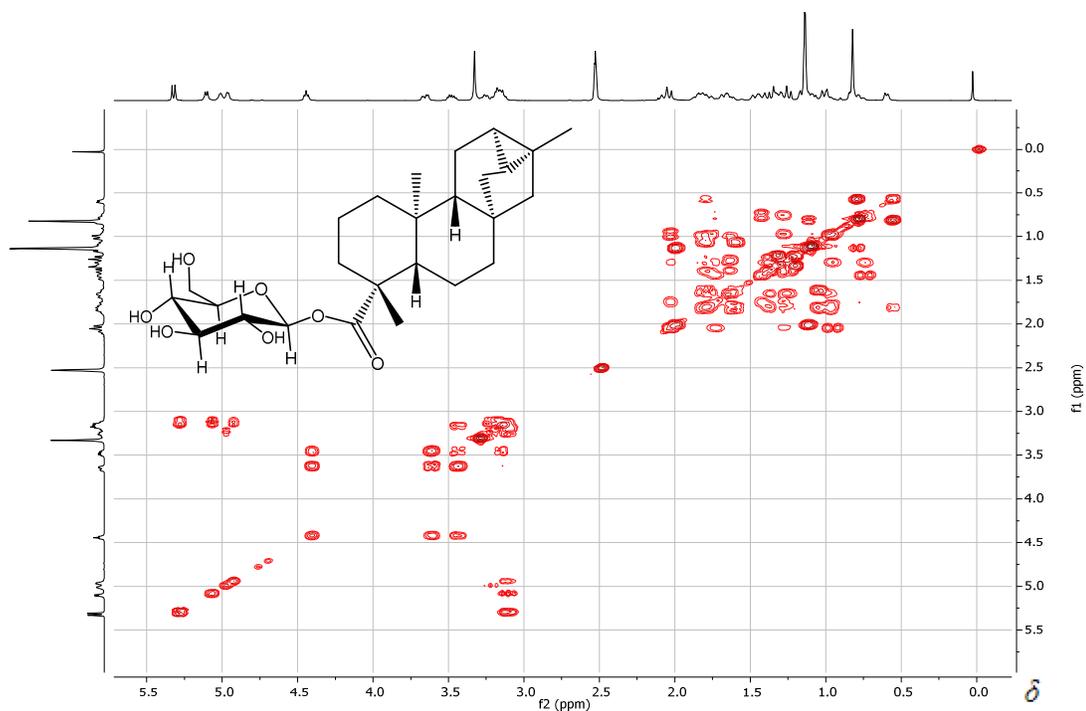


Figura A4 – Mapa de contornos COSY do tranquilban-19-oato de β -D-glicopiranosila (**96**) (400 MHz, DMSO- d_6).

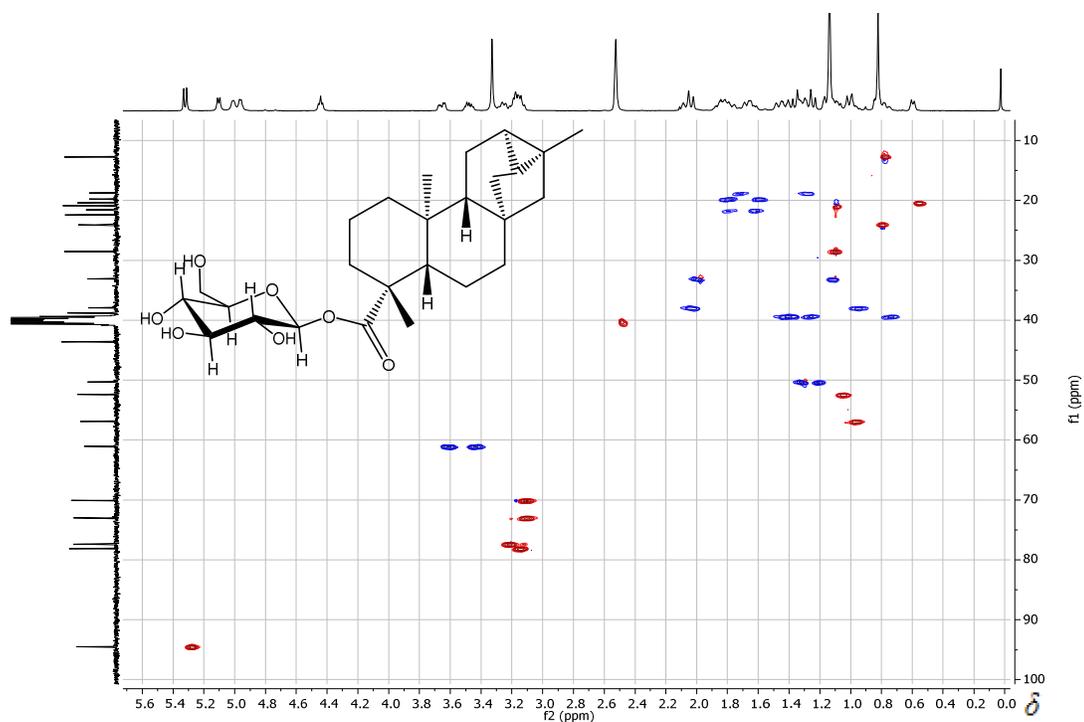


Figura A5 – Mapa de contornos HSQC do traquiloban-19-oato de β -D-glicopiranosila (**96**) (400 MHz, DMSO- d_6).

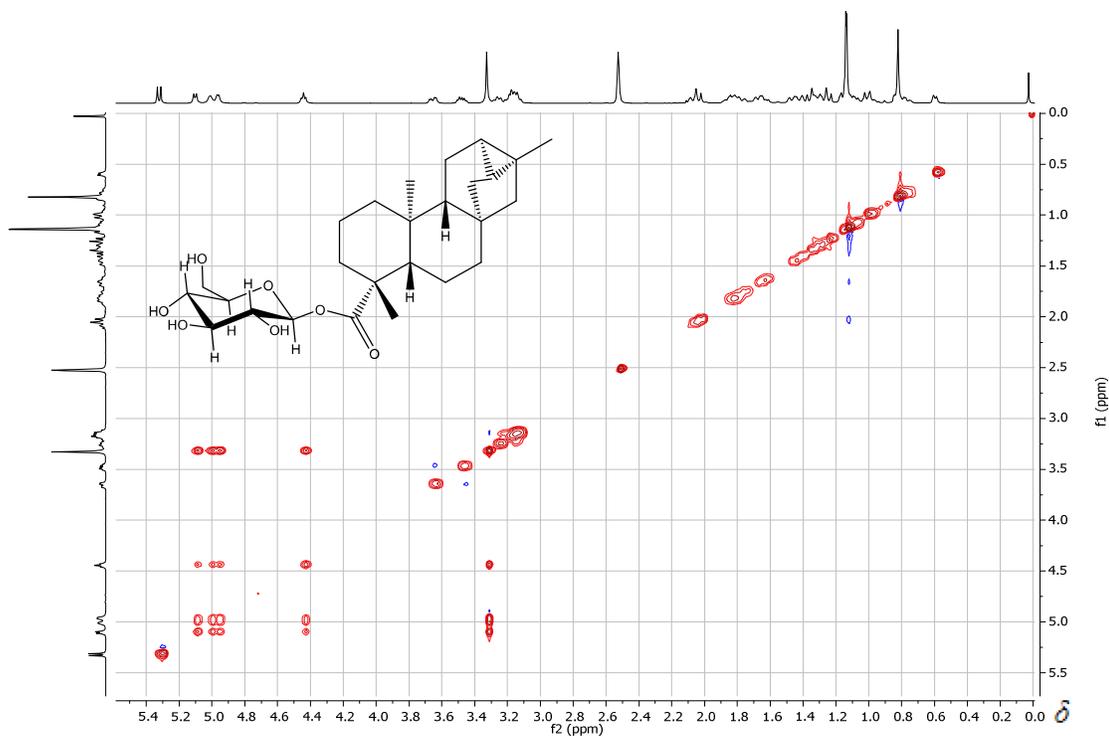


Figura A6 – Mapa de contornos NOESY do traquiloban-19-oato de β -D-glicopiranosila (**96**) (400 MHz, DMSO- d_6).

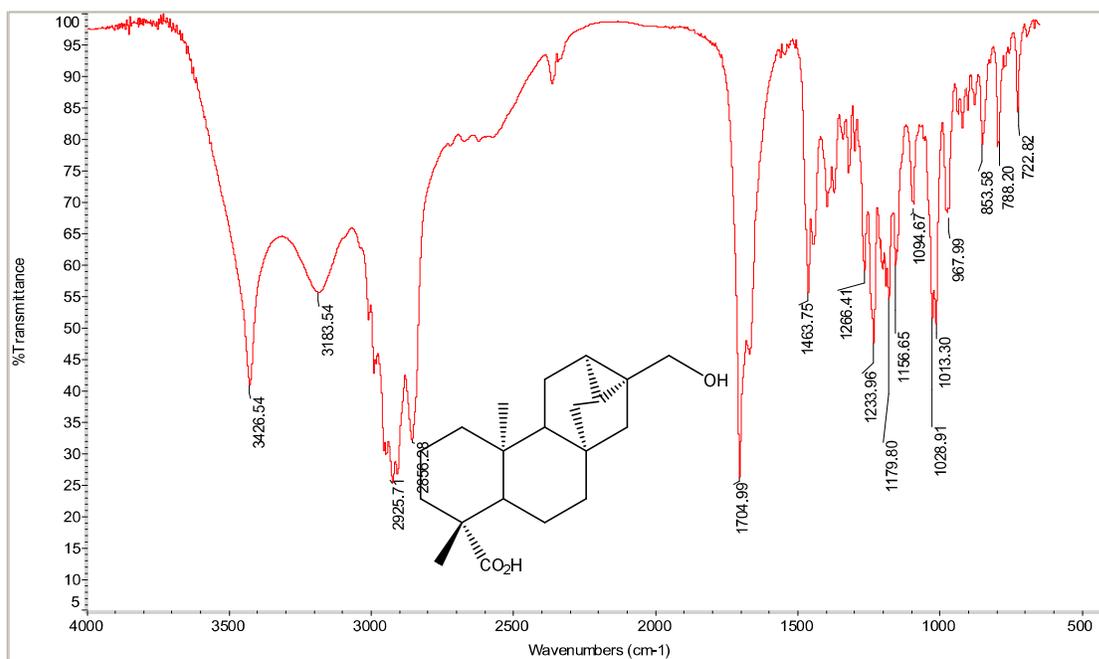


Figura A7 – Espectro no IV do ácido 17-hidroxitraquiloban-19-oico (97).

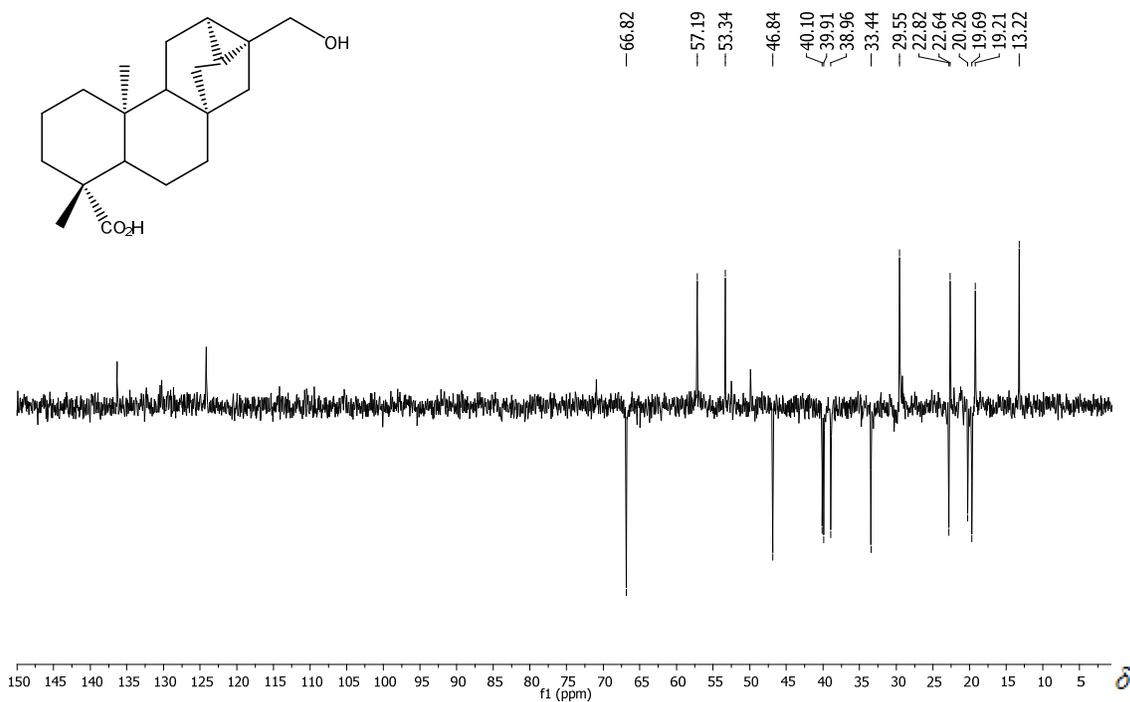


Figura A8 – Subespectro DEPT 135 do ácido 17-hidroxitraquiloban-19-oico (97) (100 MHz, piridina- d_5).

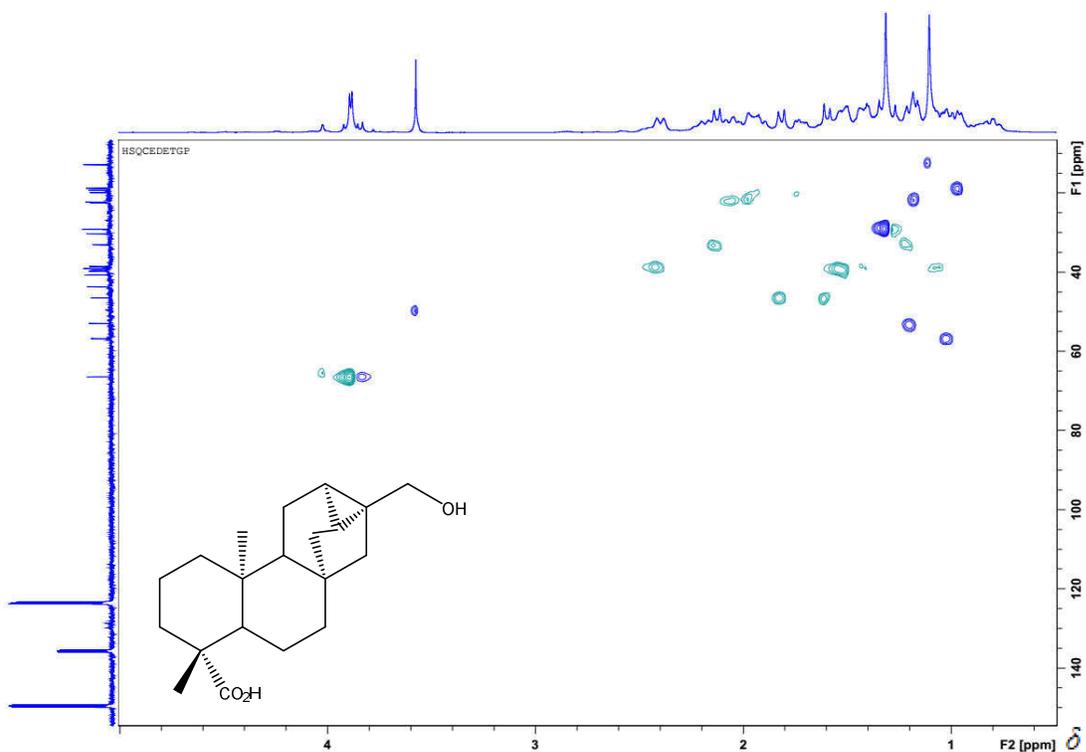


Figura A9 – Mapa de correlações HSQC do ácido 17-hidroxitraquiloban-19-oico (97) (100 MHz, piridina-*d*₅).

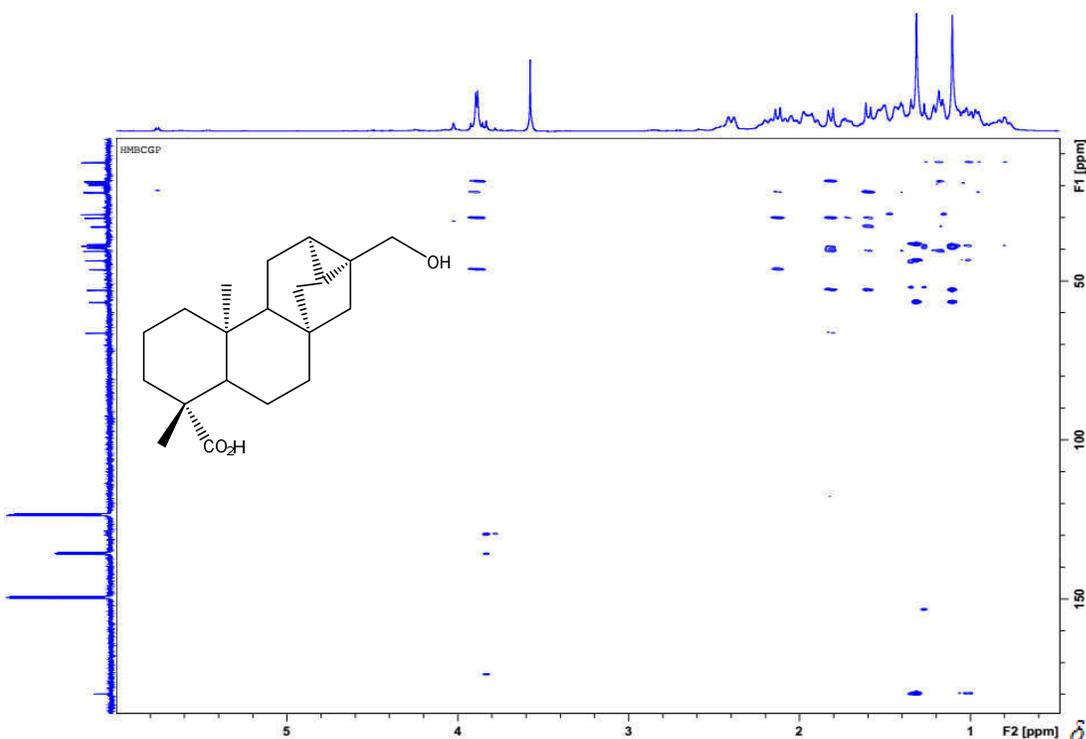


Figura A10 – Mapa de correlações HMBC do ácido 17-hidroxitraquiloban-19-oico (97) (100 MHz, piridina-*d*₅).

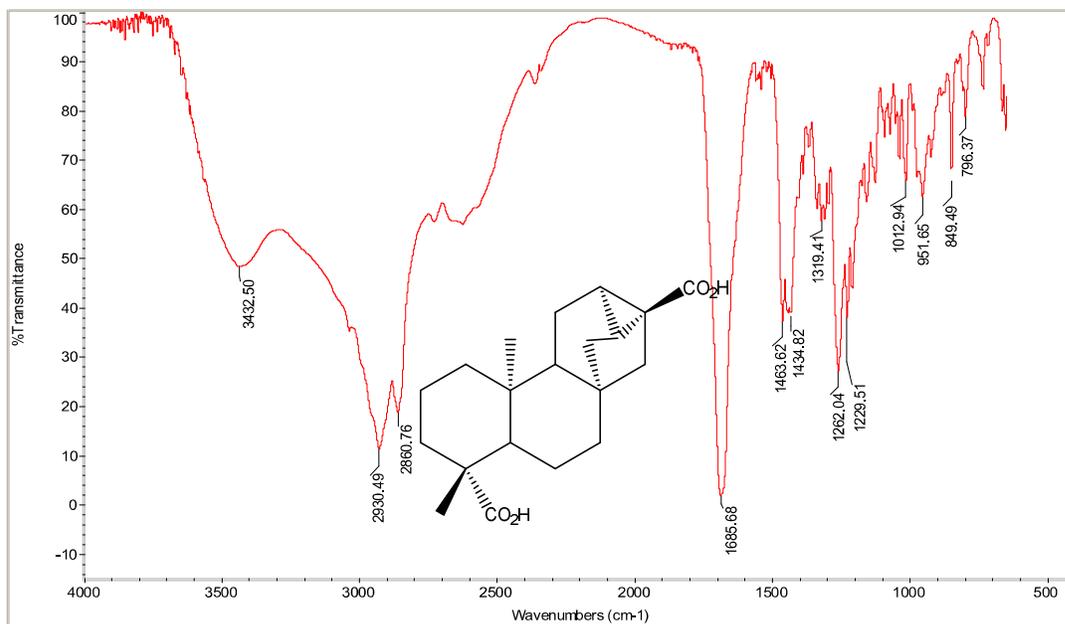


Figura A11 – Espectro no IV do ácido traquiloban-17,19-dioico (**98**).

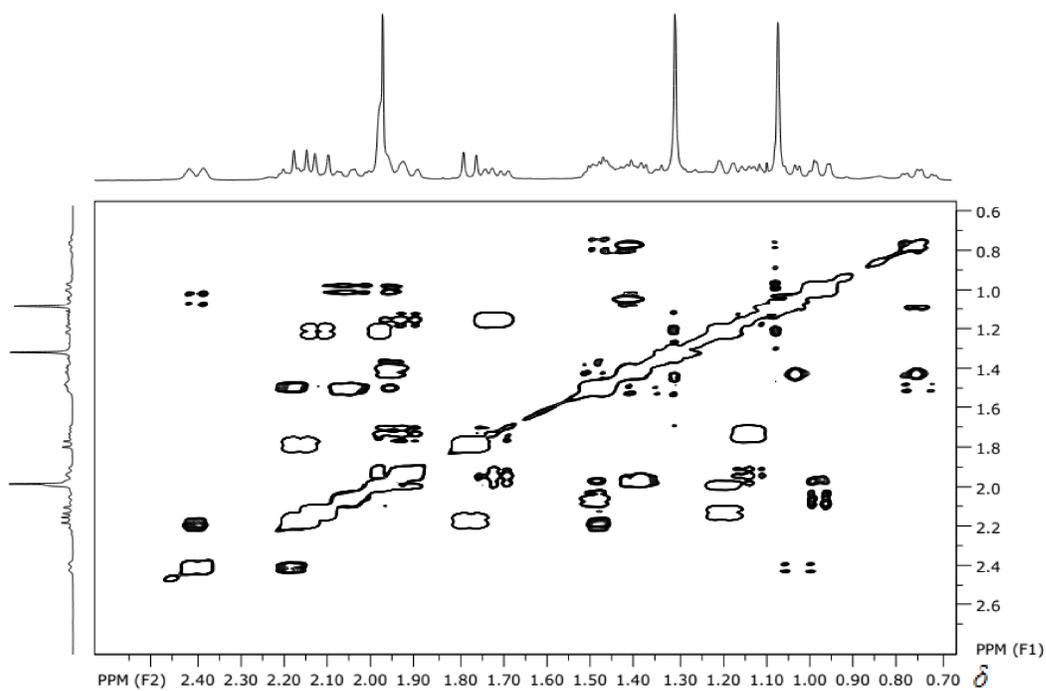


Figura A12 – Mapa de contornos COSY do ácido traquiloban-17,19-dioico (**98**) (400 MHz, piridina-*d*₅).

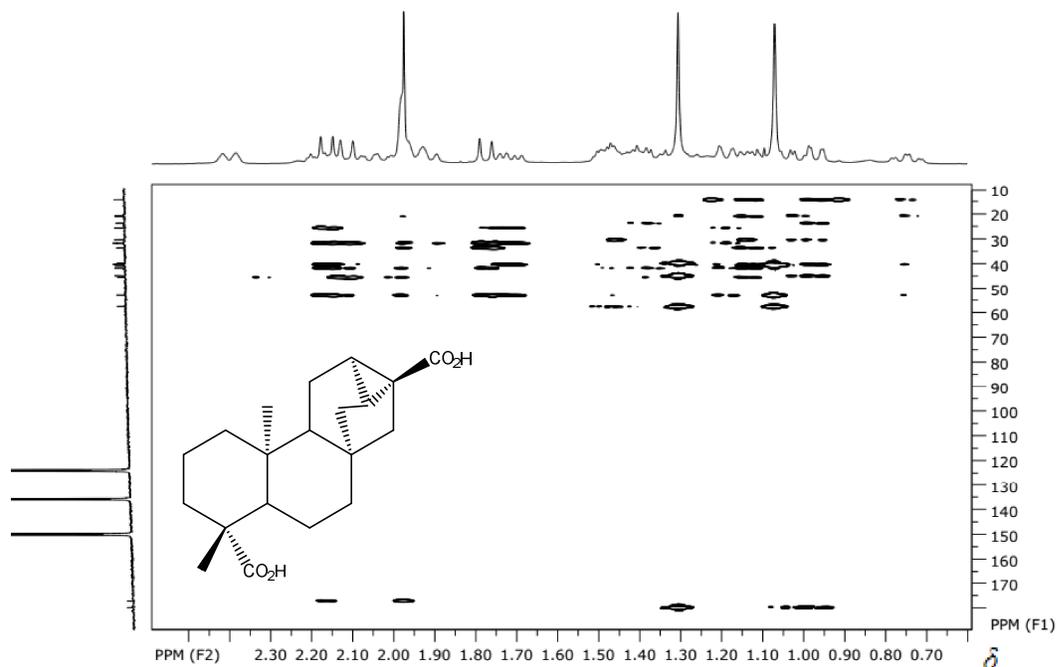


Figura A13 – Mapa de contornos HMBC do ácido traquiloban-17,19-dioico (**98**) (400 MHz, piridina- d_5).

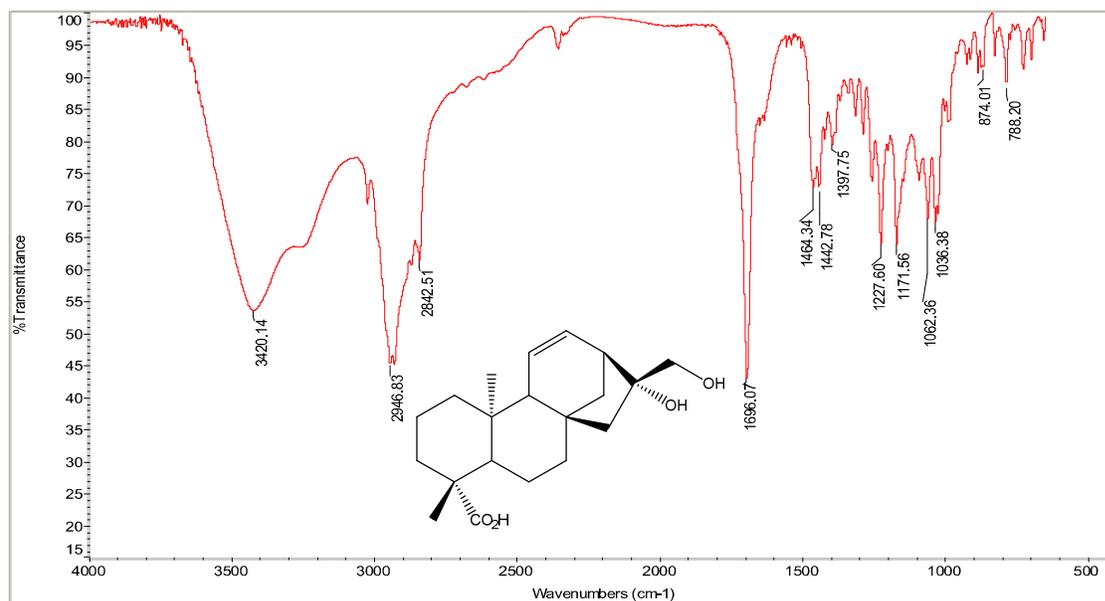


Figura A14 – Espectro no IV do ácido *ent*-16 β ,17-di-hidroxicaur-11-en-19-oico (**99**).

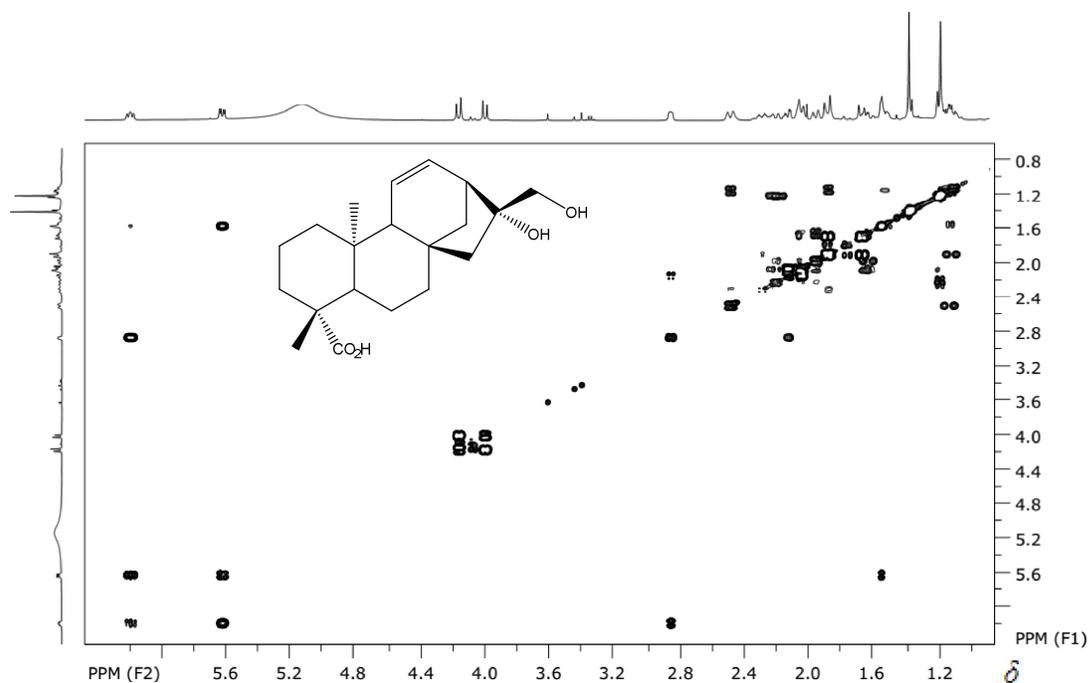


Figura A15 – Mapa de contornos COSY do *ent*-16 β ,17-di-hidroxicaur-11-en-19-oico (**99**) (400 MHz, piridina-*d*₅).

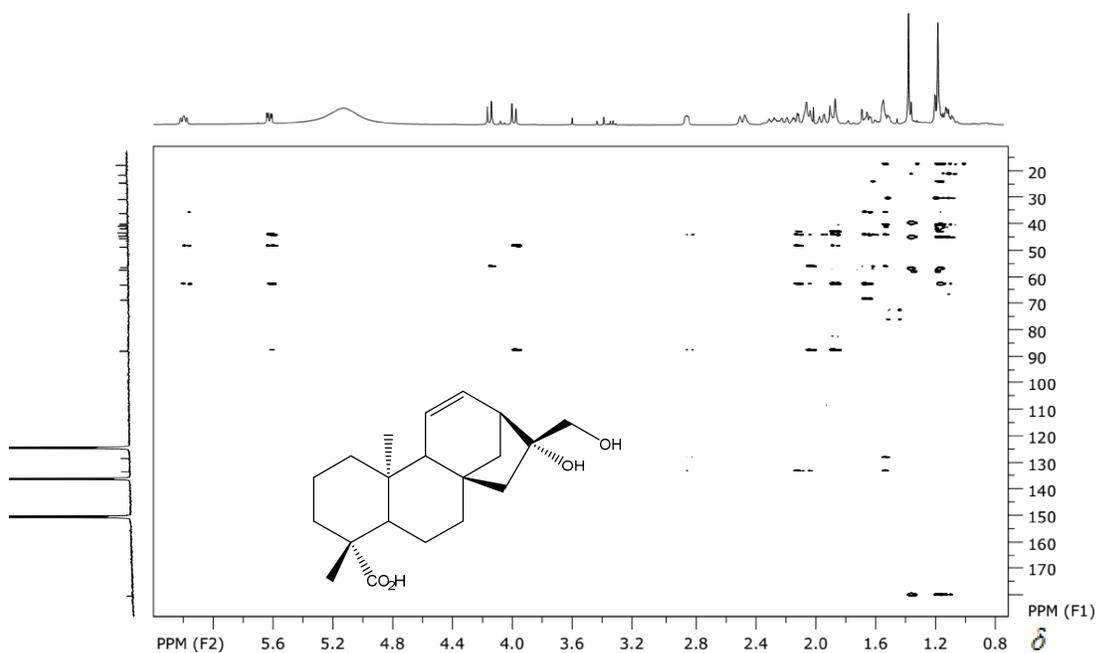


Figura A16 – Mapa de contornos HMBC do *ent*-16 β ,17-di-hidroxicaur-11-en-19-oico (**99**) (400 MHz, piridina-*d*₅).

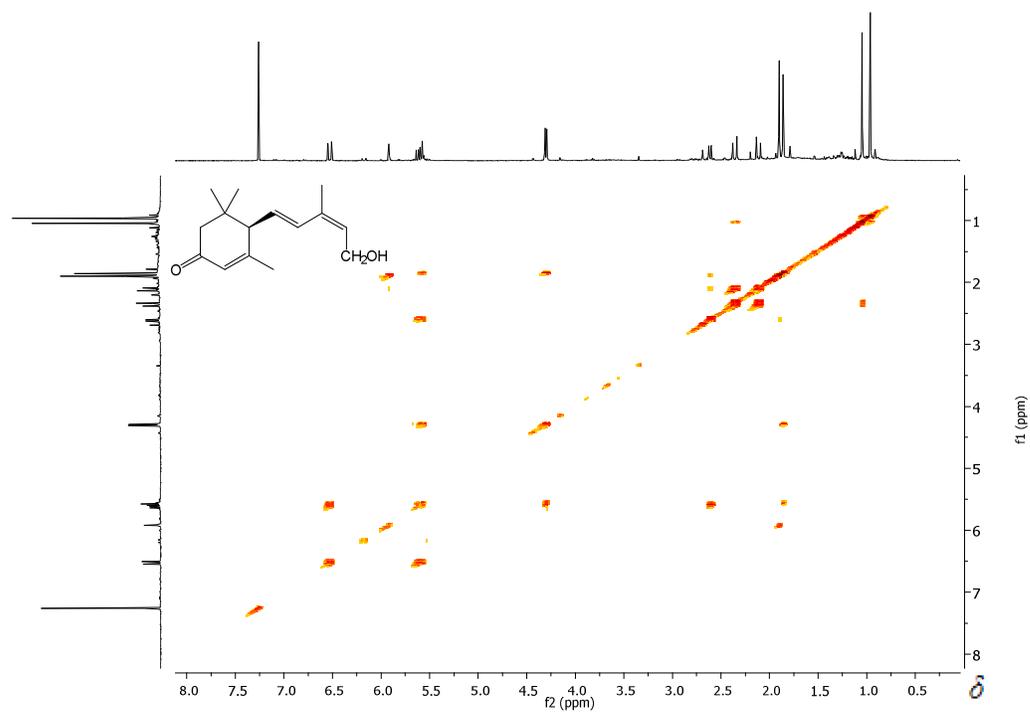


Figura A17 – Mapa de contornos COSY do 1-hidroxiabscísico (**110**) (500 MHz, CDCl₃).

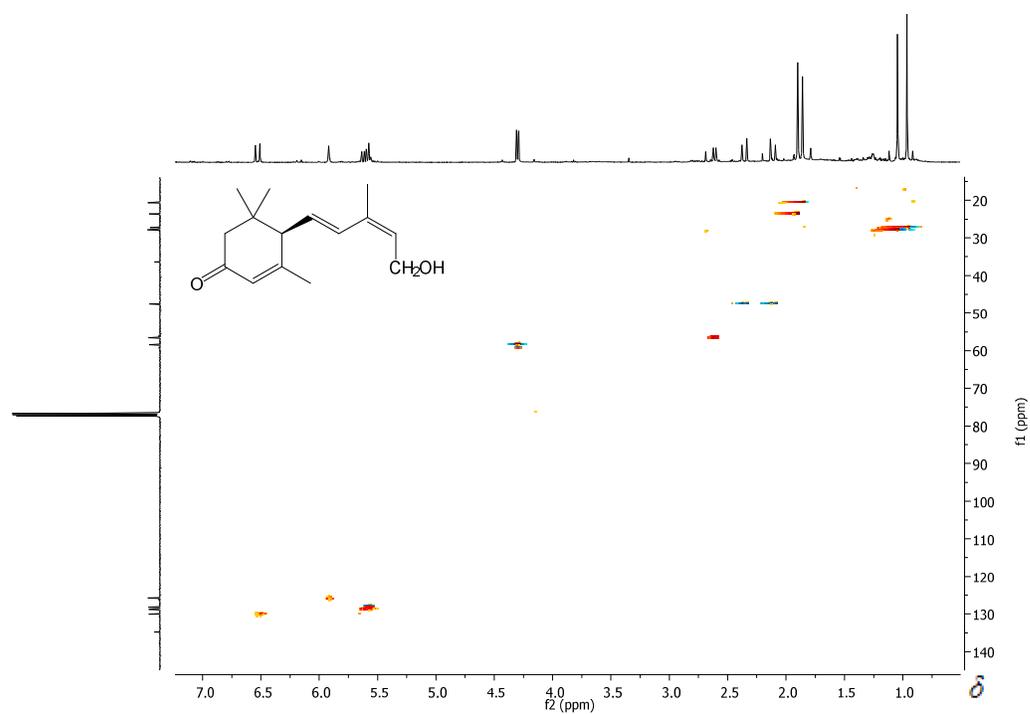


Figura A18 – Mapa de contornos HSQC do 1-hidroxiabscísico (**110**) (500 MHz, CDCl₃).

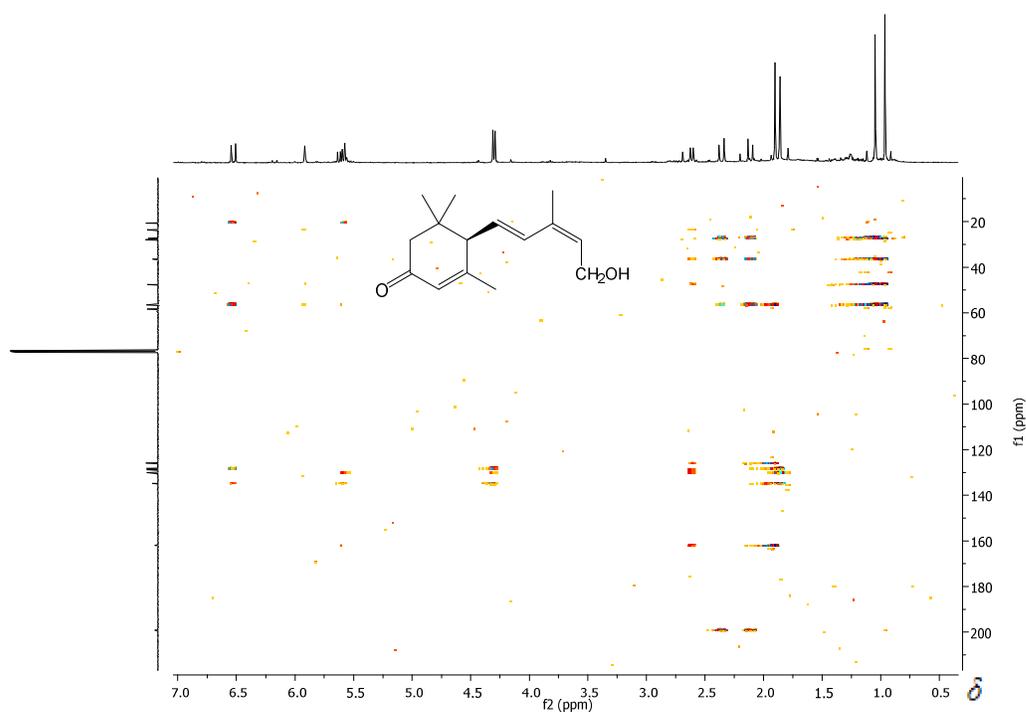


Figura A19 – Mapa de contornos HMBC do 1-hidroxiabscísico (**110**) (500 MHz, CDCl₃).

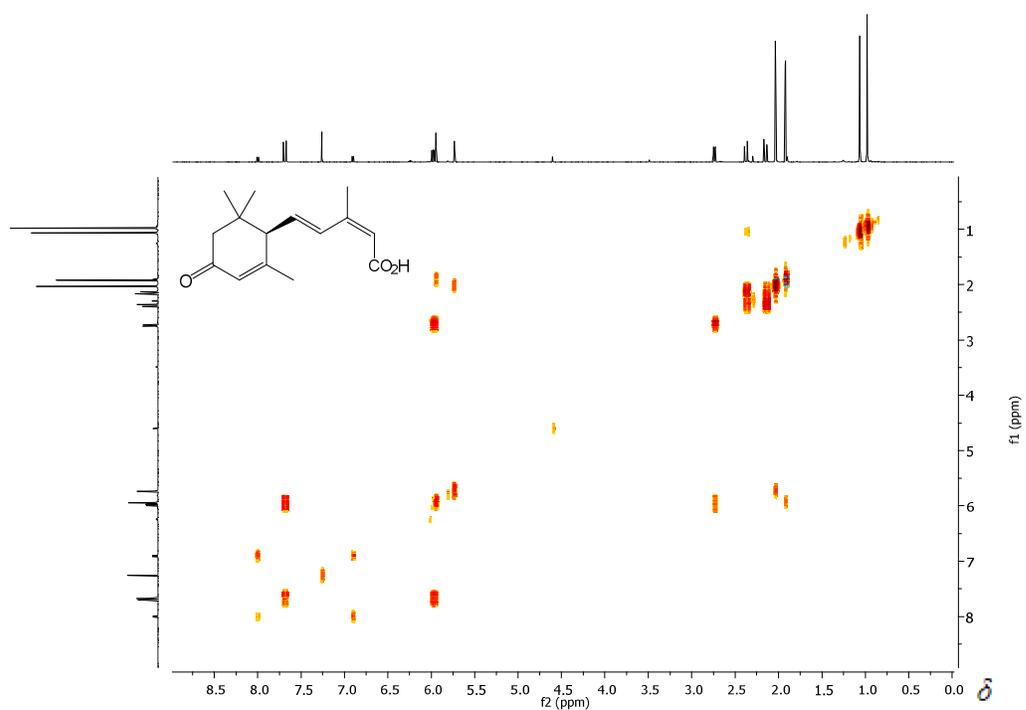


Figura A20 – Mapa de contornos COSY do 1'-H-abscísico (**111**) (500 MHz, CDCl₃).

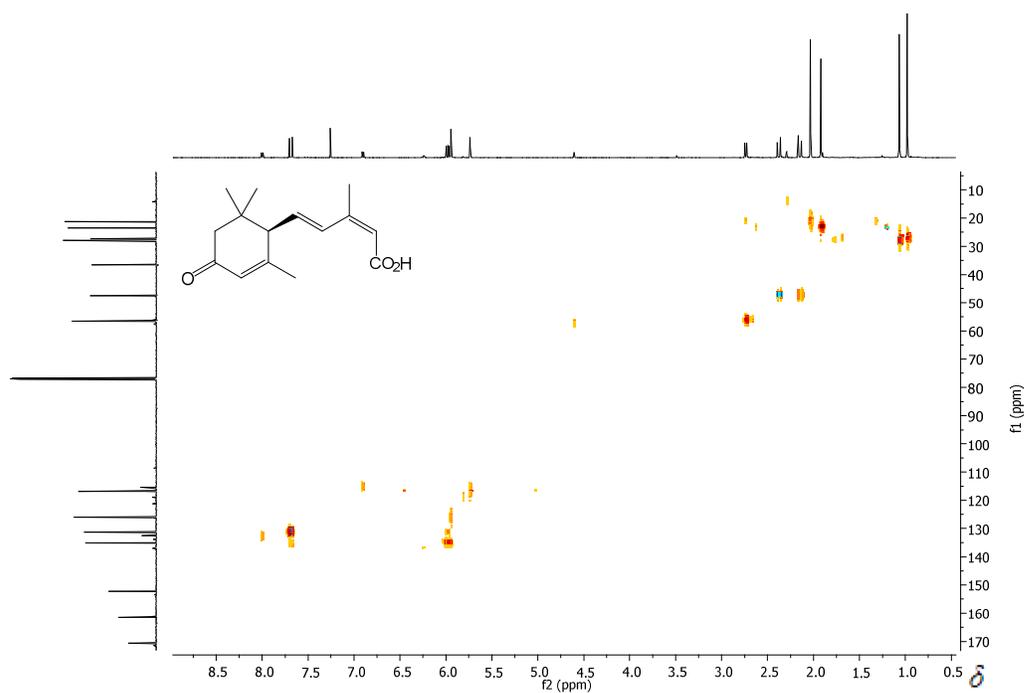


Figura A21 – Mapa de contornos HSQC do 1'-H-abscísico (**111**) (500 MHz, CDCl₃).

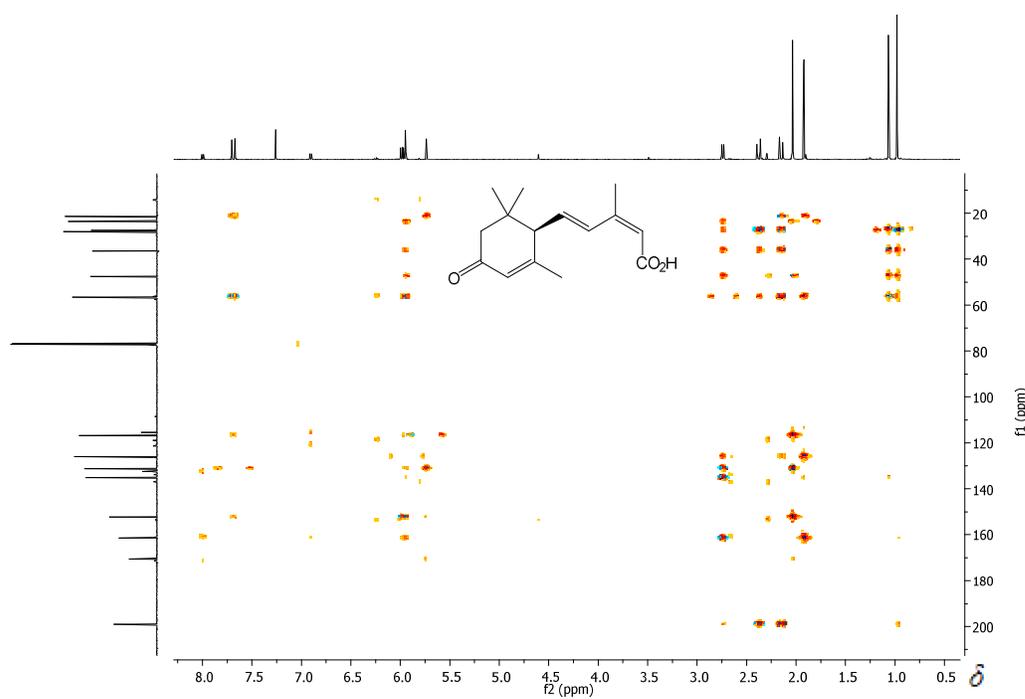


Figura A22 – Mapa de contornos HMBC do 1'-H-abscísico (**111**) (500 MHz, CDCl₃).

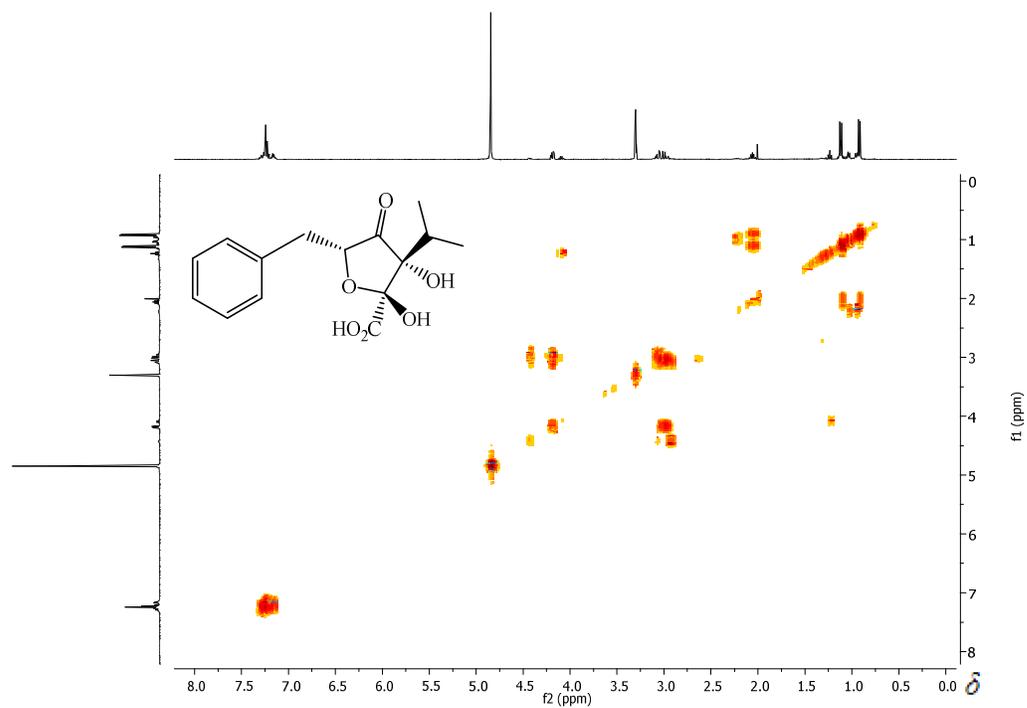


Figura A23 – Mapa de contornos COSY do monômero (**123**) (500 MHz, CD₃OD).

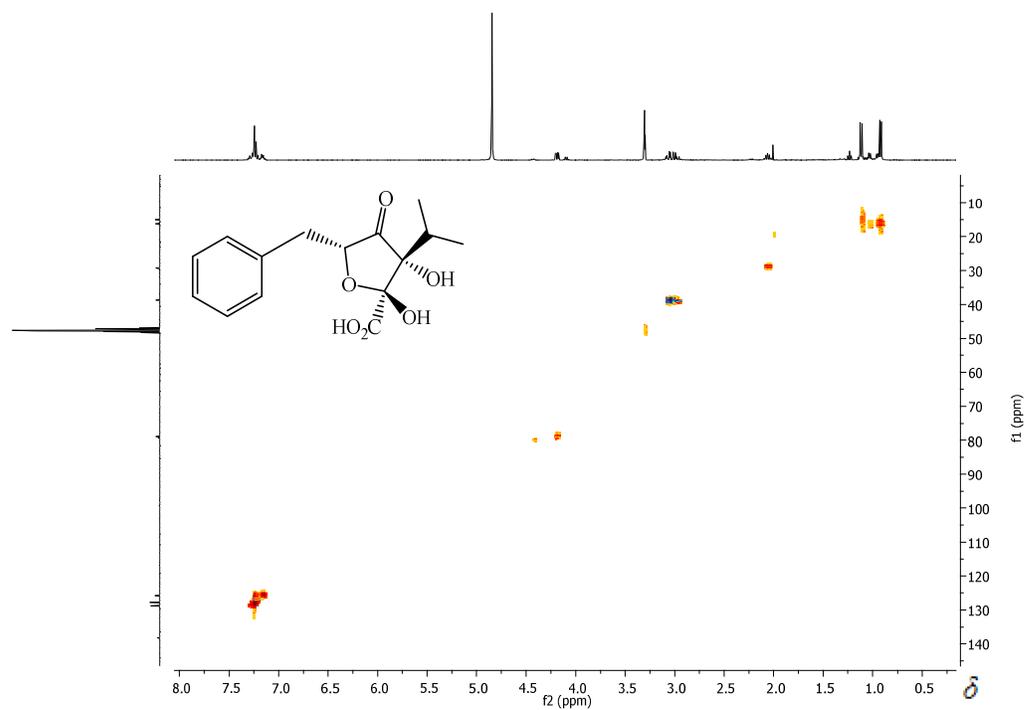


Figura A24 – Mapa de contornos HSQC do monômero (**123**) (500 MHz, CD₃OD).

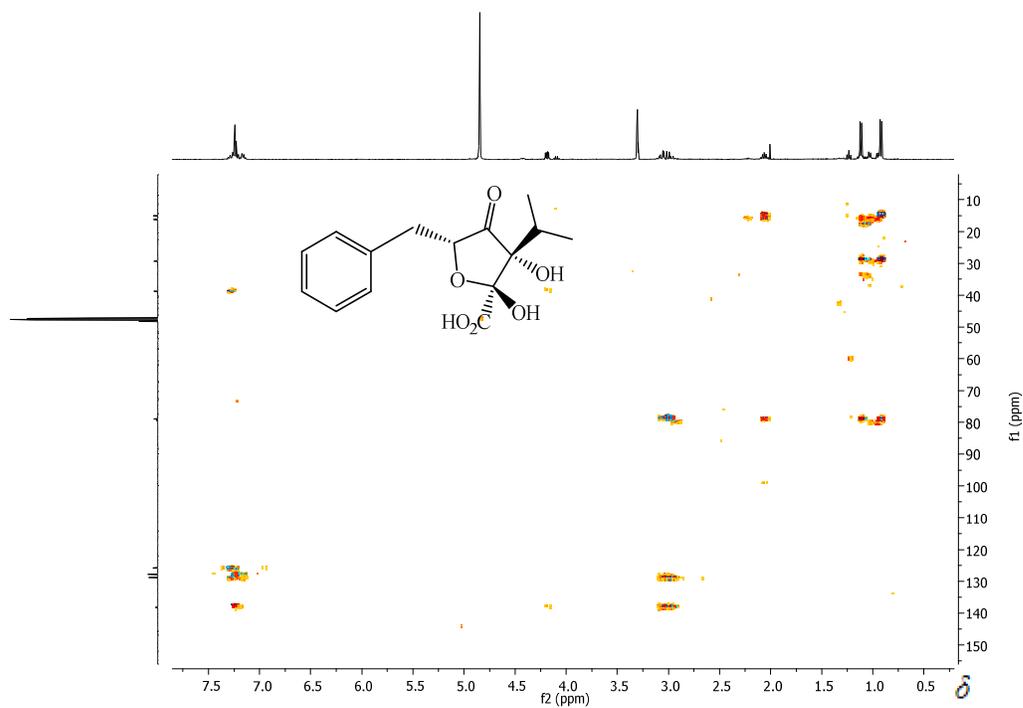


Figura A25 – Mapa de contornos HMBC do monômero (**123**) (500 MHz, CD₃OD).

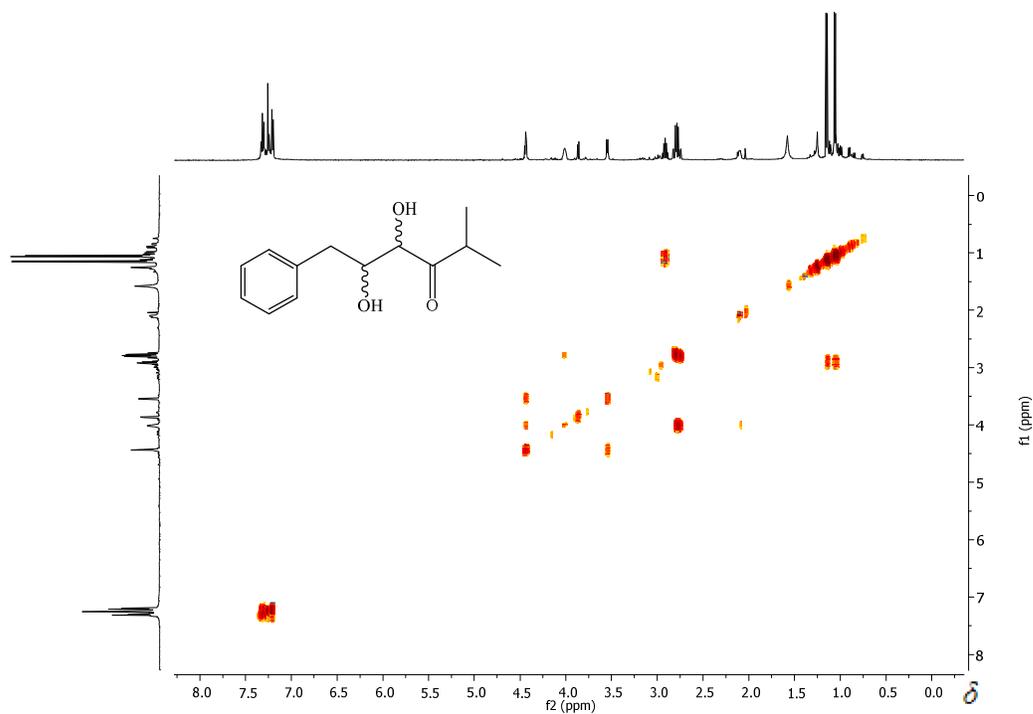


Figura A26 – Mapa de contornos COSY do 4,5-di-hidroxi-2-metil-6-fenilhexan-3-ona (**128**) (400 MHz, CD₃OD).

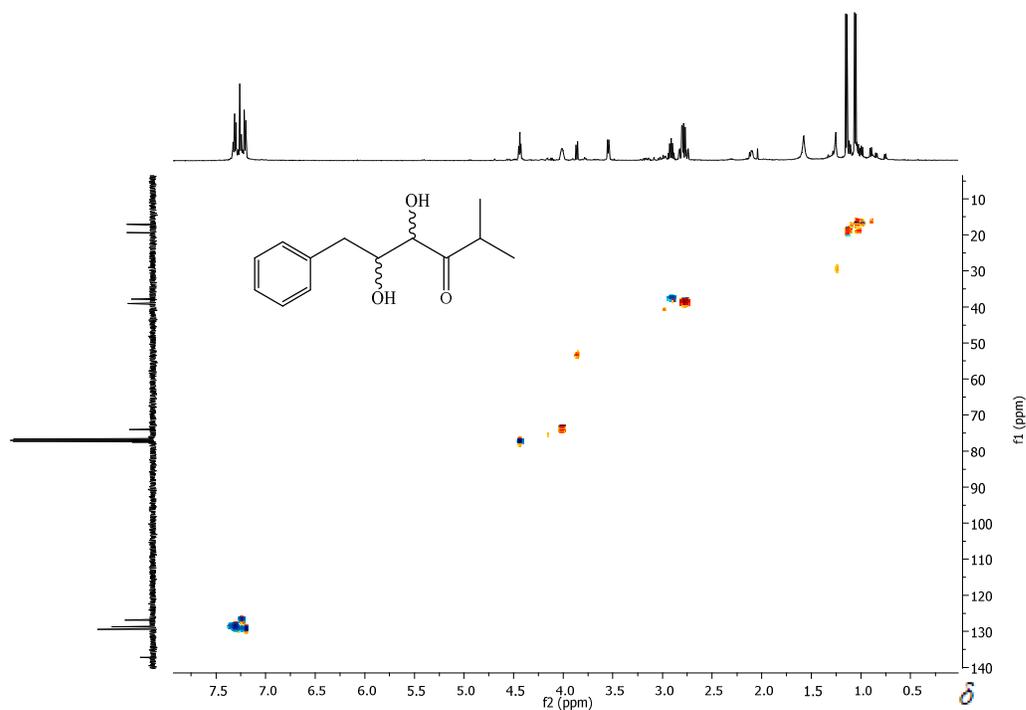


Figura A27 – Mapa de contornos HSQC do 4,5-di-hidroxi-2-metil-6-fenilhexan-3-ona (**128**) (400 MHz, CD₃OD).

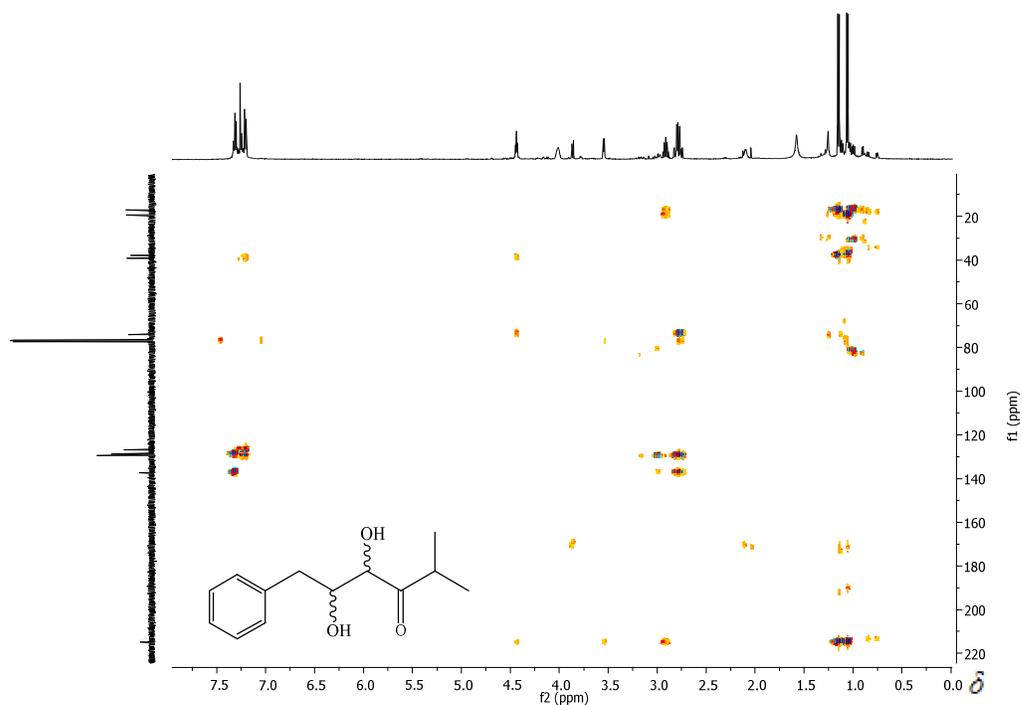


Figura A28 – Mapa de contornos HMBC do 4,5-di-hidroxi-2-metil-6-fenilhexan-3-ona (**128**) (400 MHz, CD₃OD).

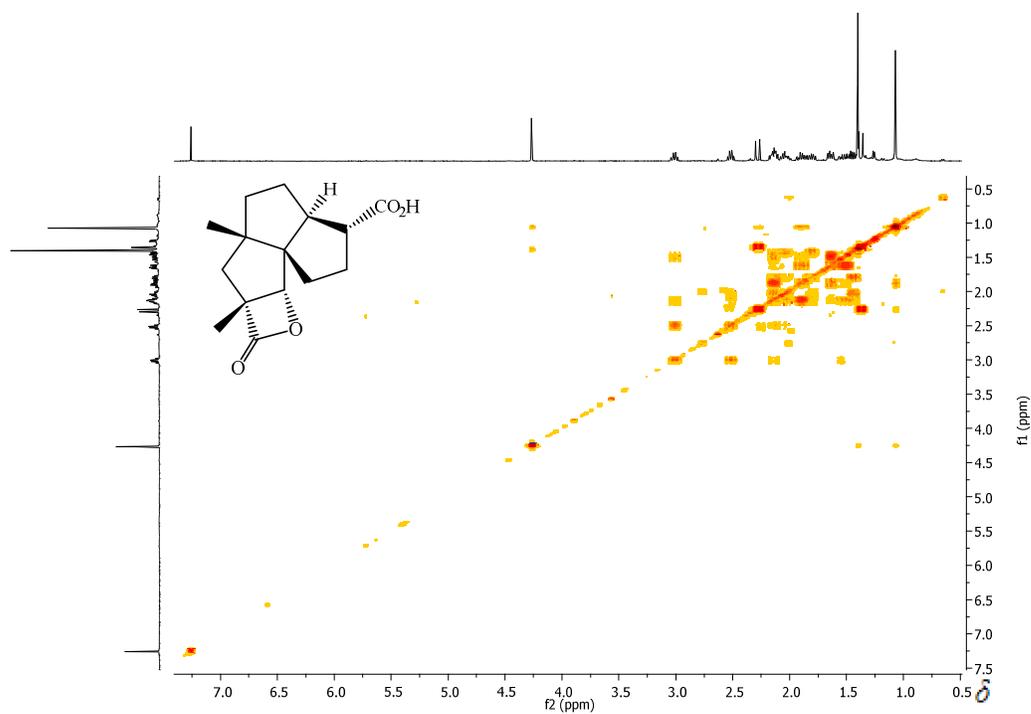


Figura A29 – Mapa de contornos COSY do 14-hidroxicarbonilcameroonan-7 α ,15-diol (**119**) (500 MHz, CDCl₃).

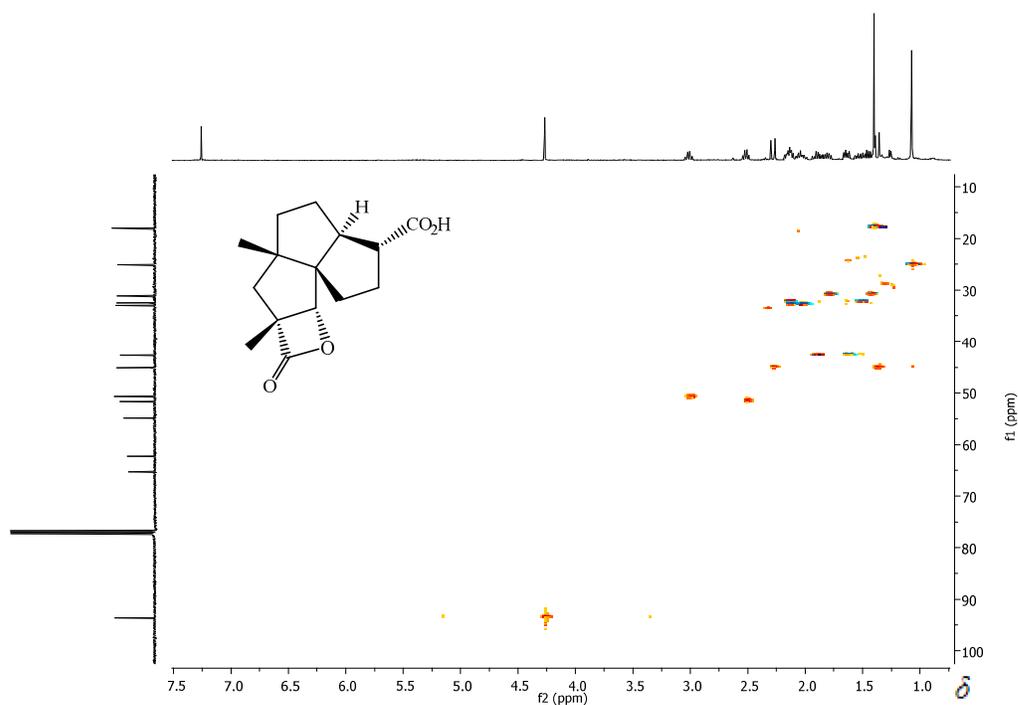


Figura A30 – Mapa de contornos HSQC do 14-hidroxicarbonilcameroonan-7 α ,15-diol (**119**) (500 MHz, CDCl₃).

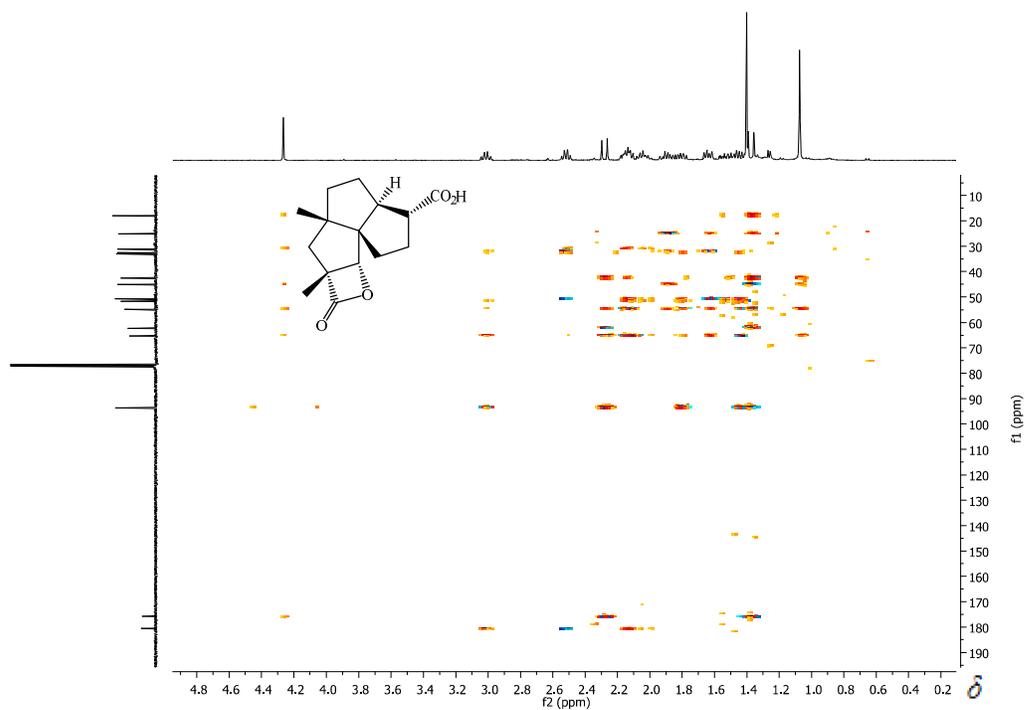


Figura A31 – Mapa de contornos HMBC do 14-hidroxycarbonilcameroonan-7 α ,15-diol (**119**) (500 MHz, CDCl_3).

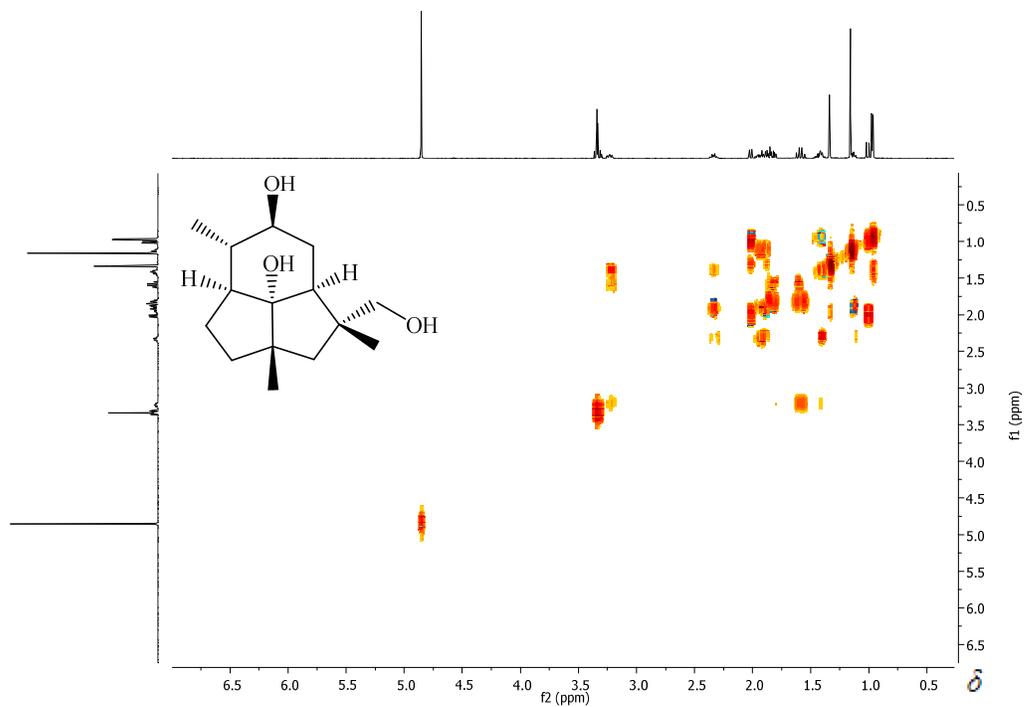


Figura A32 – Mapa de contornos COSY do presilphiperfolan-8 β ,10 β ,14-triol (**124**) (CD_3OD em 500 MHz).

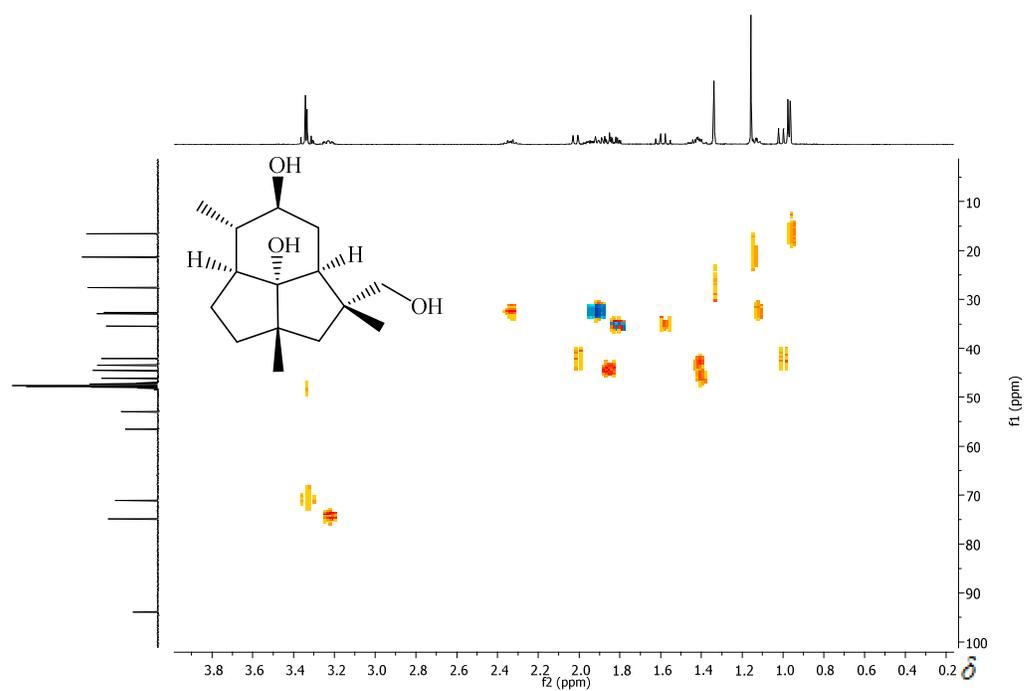


Figura A33 – Mapa de contornos HSQC do presilphiperfolan-8 β ,10 β ,14-triol (**124**) (CD₃OD em 500 MHz).

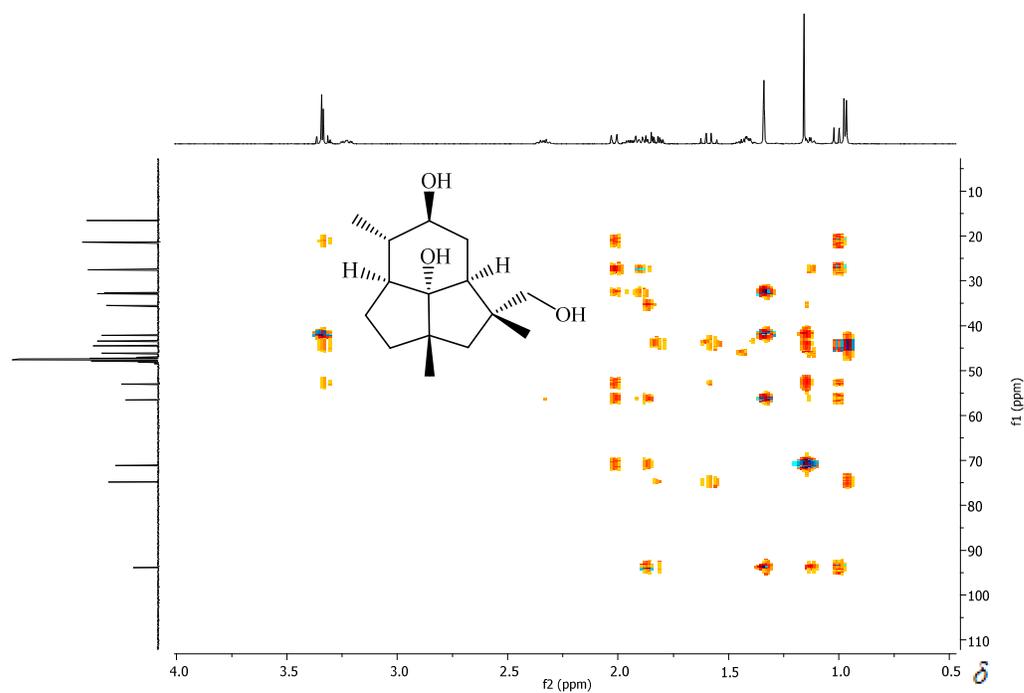


Figura A34 – Mapa de contornos HMBC do presilphiperfolan-8 β ,10 β ,14-triol (**124**) (CD₃OD em 500 MHz).

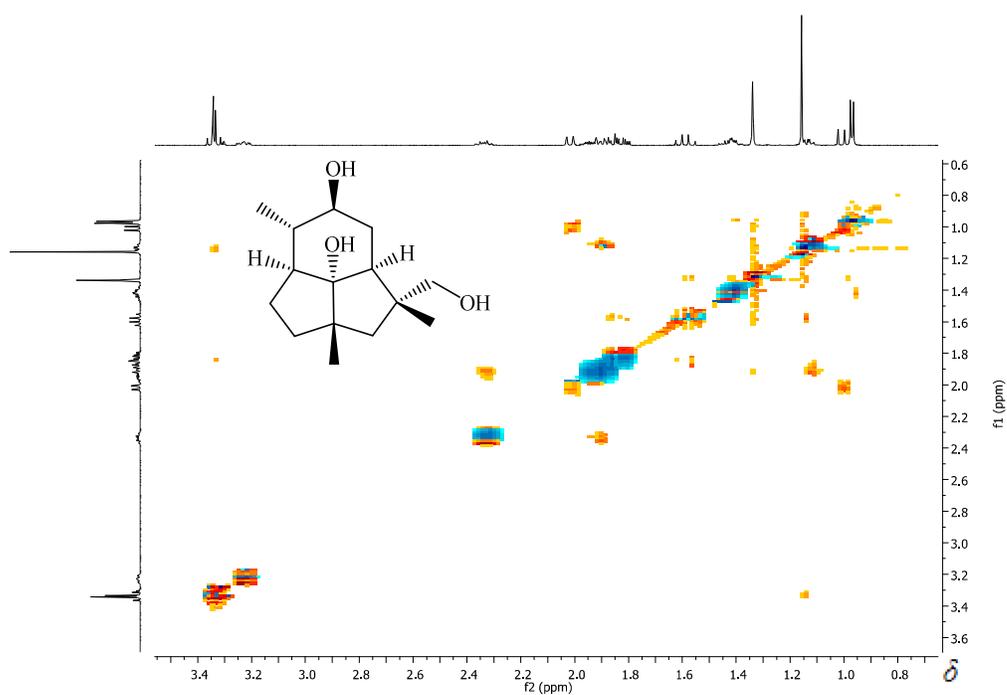


Figura A35 – Mapa de contornos NOESY do presilphiperfolan-8 β ,10 β ,14-triol (**124**) (CD₃OD em 500 MHz).

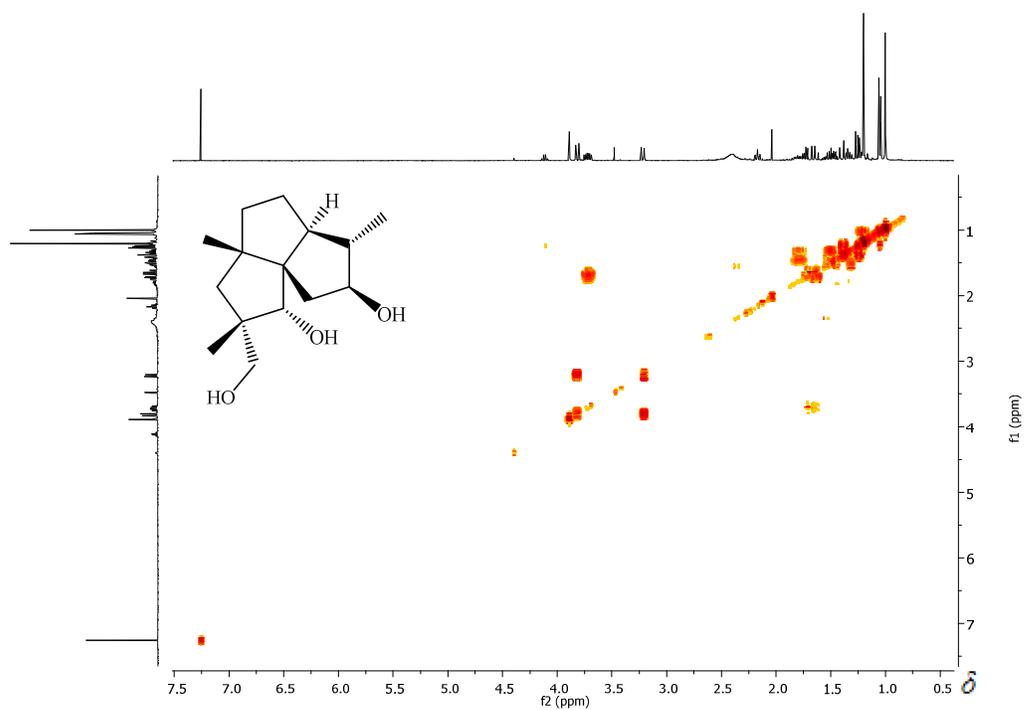


Figura A36 – Mapa de contornos COSY do cameroonan-7 α ,10 β ,14-triol (**129**) (CDCl₃ em 500 MHz).

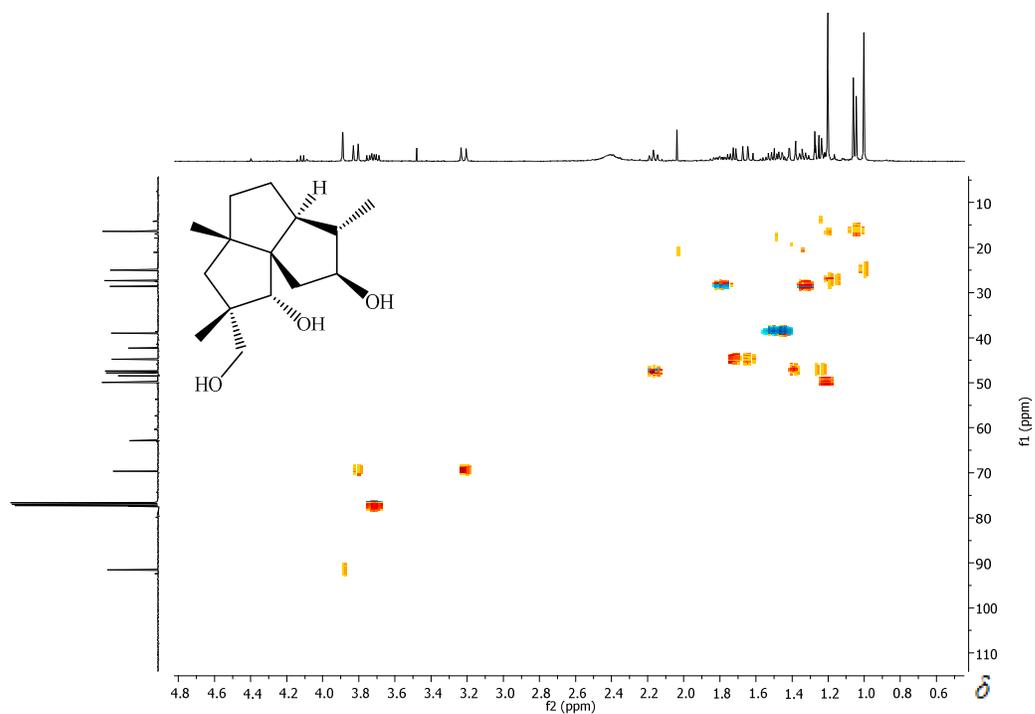


Figura A37 – Mapa de contornos HSQC do cameroonan-7 α ,10 β ,14-triol (**129**) (CDCl₃ em 500 MHz).

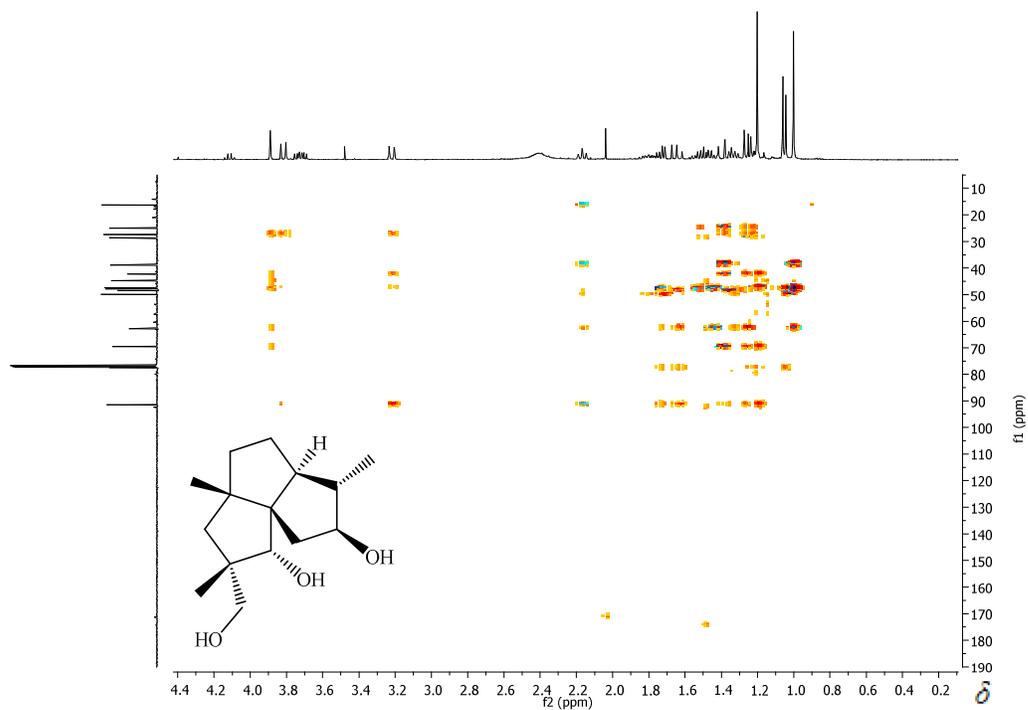


Figura A38 – Mapa de contornos HMBC do cameroonan-7 α ,10 β ,14-triol (**129**) (CDCl₃ em 500 MHz)

ARTIGOS