



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
Centro de Ciências da Natureza
Programa de Pós-Graduação em Química



Maria das Dores Alves de Oliveira

ISOLAMENTO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS E ATIVIDADES
BIOLÓGICAS DO COGUMELO BIOLUMINESCENTE *Neonothopanus gardneri*
Berk.

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

TERESINA-PI

2018

Maria das Dores Alves de Oliveira

ISOLAMENTO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS E ATIVIDADES
BIOLÓGICAS DO COGUMELO BIOLUMINESCENTE *Neonothopanus gardneri*
Berk.

Defesa de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Química – Centro de Ciências da
Natureza da Universidade Federal do
Piauí como parte dos requisitos
necessários para a obtenção do grau de
Mestre em Química – Área: Química
Orgânica.

Profa. Dra. Antônia Maria das Graças Lopes Citó
Orientadora

Prof. Dr. Joaquim Soares da Costa Júnior
Co-orientador

TERESINA-PI
2018

ISOLAMENTO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS E ATIVIDADES
BIOLÓGICAS DO COGUMELO BIOLUMINESCENTE *Neonothopanus
gardneri* Berk.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química – Centro de Ciências da Natureza da Universidade Federal do Piauí como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Química – Área: Química Orgânica

Data: ___/___/___

Aprovada por:

Profa. Dra. Antônia Maria das Graças Lopes Citó
Universidade Federal do Piauí-UFPI
(Orientadora e Presidente)

Prof. Dr. Joaquim Soares da Costa Júnior
Instituto Federal do Piauí-IFPI
(Co-orientador)

Profa. Dra. Mariana Helena Chaves
Universidade Federal do Piauí - UFPI
(Membro Titular)

Profa. Dra. Teresinha de Jesus Aguiar dos Santos Andrade
Instituto Federal de Ciências e tecnologia do Maranhão - IFMA
(Membro Titular)

Dedico.

A Deus, aos meus pais José Alves de Moura e
Francilourdes Almeida de Oliveira
e a minha madrinha Mariana Pereira Nunes.

Vocês são meu alicerce.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar os caminhos nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades.

Aos meus pais, pelo amor e confiança que sempre demonstraram nesses anos. Eu só posso retribuir tentando ser a melhor filha que pais como vocês merecem ter. Serei eternamente grata por tudo que dedicaram a mim. Eu tenho muito orgulho de ser filha de vocês e muita admiração pelos pais que tenho.

E em especial a minha segunda família, minha Madrinha Mariana e Vicente Neto e seus filhos Luana, Vicente Jr. e Juliana pelo apoio, amizade e companheirismo durante esses anos, quero que tenham uma certeza na vida de vocês, me aceitarem no lar de vocês foi um divisor de água em minha vida.

Aos amigos do Instituto Federal do Piauí-IFPI em especial minhas amigas: Mariana Chaves (não tenho palavras para agradecer por sua amizade), Yanna Brenda, Talita Teixeira, Thaila Natana, Ludmilla Raissa, Luelma Maria, Maria de Fátima Dias e Arielle Silva. Admiro vocês. Queria estar sempre perto de vocês.

Aos meus amigos e colegas jornada de Laboratório de Orgânica e Produtos Naturais –LOPN-IFPI.

Aos meus amigos e colegas do Laboratório de Geoquímica Orgânica (LAGO).

No âmbito profissional gostaria primeiramente de agradecer ao Prof. Dr. Joaquim Soares da Costa Júnior, por ter me aberto às portas de seu laboratório desde o início de minha iniciação científica. Pelos valiosos conselhos e ensinamentos que me passou durante todo esse período, pela liberdade que sempre me deu para fazer minhas escolhas e por ser sempre uma pessoa amiga.

A Profa. Dra. Teresinha de Jesus Aguiar dos Santos Andrade, por todas as inestimáveis contribuições que fez para esse trabalho. Por todo o auxílio que sempre me deu no laboratório, e por ainda hoje estar sempre se prontificando a fazer tudo o que puder para ajudar.

A minha querida orientadora Profa. Dra. Antônia Maria das Graças Lopes Citó, pelos ensinamentos, confiança, amizade e carinho. Por todo apoio e por sempre me acalmar e dar diferentes perspectivas, por não desistir do projeto apesar das dificuldades e frustrações durante todo o processo. Não podia ter escolhido, nem ter sido acolhida por uma orientadora melhor.

A Capes e CNPq pela bolsa concedida.

“A educação é o grande motor do desenvolvimento pessoal.

É através dela que a filha de um camponês se torna médica, que o filho de um mineiro pode chegar a chefe de mina, que um filho de trabalhadores rurais pode chegar a presidente de uma grande nação.”

Nelson Mandela

RESUMO

Neonothopanus gardneri Berk. (Marasmiaceae) é um cogumelo bioluminescente nativo do norte e nordeste brasileiro e poucos estudos têm investigado sua composição química e potencial biológico. O presente trabalho descreve o isolamento e a identificação dos primeiros constituintes químicos do corpo de frutificação do cogumelo com base em análises de RMN 1D e 2D, CG-EM e EM-IES, bem como a avaliação das atividades antifúngica e antiparasitária. A fração acetonitrila (F. MeCN) foi submetida a etapas de fracionamento cromatográfico incluindo o uso de CLAE. A análise de CG-EM da fração hexânica mostrou que a maioria das substâncias identificadas nessa fração são derivados de ácidos graxos. Através da investigação química da fração acetonitrila dos corpos de frutificação do cogumelo bioluminescente *N. gardneri*, foi possível isolar e caracterizar seis metabolitos secundários inéditos na espécie *N. gardneri*, quatro destes, são inéditos na literatura (**2**, **3**, **5** e **6**), sendo três amidas (*9E, 11E*)-7,8-di-hidroxi-13-oxo-heneicosa-9,11-di-enamida (**2**), (*9E, 11E*)-7,8-di-hidroxi-13-oxo-octadeca-9,11-dienamida (**3**), ((*1E'*, *3E'*, *10E'*, *2E'*-N-5', 7',14'-tri-hidroxi-15-oxo-icosa-1',3',10',12') – tetra-enil) decanamida (**5**) e o ácido (*7E*) - 10,11-di-hidroxi-octadeca-8-enóico (**6**). As substâncias (**1** e **4**) o diácido (*2E*)-dec-2-en-1,10-dióico (**1**) e uma lactona sesquiterpênica (tetraciclo[7,5,1,0^{1,6} 0^{12,15}]-5,5-dimetil-11-oxa-2-oxo-pentadec-8-en-14(13)-lactona) (**4**) são inéditas apenas na espécie. Este é o primeiro relato de metabolitos secundários isolados de basidiocarpos da espécie *N. gardneri* (Marasmiaceae). A fração acetonitrila (F. MeCN) e a subfração Ng4 foram selecionadas para o estudo antifúngico foram inativas contra os fungos patogênicos *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. tropicalis*. Os testes *in vitro* contra *Schistosoma mansoni*, da fração acetonitrila e da subfração Ng3 foram inativos nos parâmetros analisados. No entanto, a subfração Ng4 apresentou 100% de atividade contra adultos (machos e fêmeas) de *S. mansoni* em 24, 48 e 72 h. A subfração Ng1 também apresentou 100% de atividade frente ao teste contra *S. mansoni*, em 48 e 72 h. Esses resultados representam a importância do estudo do cogumelo *N. gardneri* como fonte de novos metabolitos secundários. Este trabalho é pioneiro quanto à composição química e atividade esquistossomótica e antifúngica para espécie *N. gardneri*.

Palavras-Chave: *Neonothopanus gardneri*, Cogumelo luminescente, Atividade anti-esquistossomótica, Atividade antifúngica.

ABSTRACT

Neonothopanus gardneri Berk. (Marasmiaceae) is a native bioluminescent mushroom from the north and northeast of Brazil and few studies have investigated its chemical composition and biological potential. The present work describes the identification of the first chemical constituents of the fruiting body of the bioluminescent mushroom *Neonothopanus gardneri* based on NMR, GC-MS and HRMS analysis, as well as the evaluation of antifungal and antiparasitic activities. The acetonitrile fraction (F. MeCN) was subjected to chromatographic fractionation steps including the use of HPLC. GC-MS analysis of the hexane fraction showed most substances are derivatives of fatty acids. Through chemical investigation of the fraction of acetonitrile *N. gardneri* bioluminescent mushroom fruiting bodies was possible to isolate and characterize six secondary metabolites, of these, four are novel in the literature (**2**, **3**, **5** e **6**), highlighting three amides (*9E*, *11E*)-7,8-dihydroxy-13-oxoheneicosa-9,11-dienamide (**2**), (*9E*, *11E*)-7,8-dihydroxy-13-oxooctadeca-9,11-dienamide (**3**), ((*1E'*, *3E'*, *10E'*, *12E'*)-N- 5', 7', 14'-trihydroxy-15-oxoeicosa-1', 3', 10', 12' – tetraenyl) decanamide (**5**) and the acid (*7E*)-10,11-dihydroxyoctadec-8-enoic acid (**6**). The substances (**1** and **4**) a diacid (*2E*)-dec-2-ene-1,10-dioic acid (**1**) and a sesquiterpenic lactone 5,5-dimethyl-2-oxo-11-oxatetracycle [7, 5, 1, 0^{1,6} 0^{12,15}] pentadec-8-en-14(13)-lactone (**4**), already have a description in the literature. This is the first report of isolated secondary metabolites of basidiocarps of species *N. gardneri* (Marasmiaceae). The fraction selected for the antifungal study was inactive against the pathogenic fungi *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* and *C. tropicalis*. The in vitro test against *Schistosoma mansoni*, the Ng4 subfraction showed 100% activity against adults (males and females) of *S. mansoni*. The Ng1 subfraction also showed 100% activity against the test against *S. mansoni*, at 48 and 72 h. However, the acetonitrile fraction and the Ng3 subfraction were totally inactive in the analyzed parameters. Based on these results, the importance of the study of the *N. gardneri* bioluminescent mushroom as a source of secondary metabolites and as a new source of bioactive substances for the development of new drugs can be pointed out.

These results represent the importance of the *N. gardneri* mushroom as a source of secondary metabolites. This is the first work that shows the chemical composition of *N. gardneri*.

Keywords: *Neonothopanus gardneri*, Luminescent mushroom, Antischistosomal activity, Antifungal activity

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estruturas dos constituintes químicos isolados na <i>N. nambi</i>	23
Figura 2 - Fotos da espécie <i>Neonothopanus gardneri</i> Berk.	25
Figura 3 - Proposta do mecanismo de bioluminescência	26
Figura 4 - Estruturas das luciferinas identificadas em diferentes espécies envolvidas nos mecanismos de bioluminescência.....	28
Figura 5 - Mecanismo de bioluminescência em cogumelos proposto por Kaskova et al., 2017.	29
Figura 6 - Localização geográfica do ponto de coleta: povoado Mimoso (Latitude: -6,16667; Longitude: -43,0833), no município de São Francisco, estado do Maranhão, Brasil (Imagem adaptada do Google Earth).	34
Figura 7 - Procedimento de obtenção do extrato AcOEt e frações do cogumelo <i>Neonothopanus gardneri</i>	38
Figura 8 - Procedimento de obtenção das subfrações Ng1 a Ng8 do cogumelo <i>N. gardneri</i> ..	39
Figura 9 - Procedimento de obtenção das substâncias a partir das subfrações Ng3 e Ng4.....	40
Figura 10 - Ciclo de vida de <i>S. mansoni</i> ilustrando os pontos de coleta para estudos quimioterápicos <i>in vitro</i> . Seta preta: maturação do parasita no hospedeiro final. Seta azul: fase aquática.....	42
Figura 11 - Cromatograma de íons totais da fração Hex sililada	45
Figura 12 - Substâncias isoladas das subfrações Ng3 e Ng4 de <i>N. gardneri</i>	47
Figura 13 - Espectro na região do UV registrado em 200 nm e cromatograma analítico em CLAE-DAD da substância 1	48
Figura 14 - Espectro na região do IV da substância 1	49
Figura 15 - Principais correlações gHMBC, gCOSY e interações de TOCSY da substância 150	
Figura 16 - Espectro de RMN de ¹ H da substância 1 (CD ₃ OD, 600 MHz).....	51
Figura 17 - Espectro de RMN de ¹³ C da substância 1 (CD ₃ OD, 150 MHz)	52
Figura 18 - Mapa de correlação H-C a uma ligação (gHSQC) da substância 1 (CD ₃ OD, 600 MHz).....	53
Figura 19 - Mapa de correlação H-C a longa distância (gHMBC) da substância 1 (CD ₃ OD, 600MHz).....	54
Figura 20 - Mapa de correlação gCOSY da substância 1 (CD ₃ OD, 600 MHz)	55
Figura 21 - Espectro de TOCSY-1D em 6,97 ppm da substância 1 (CD ₃ OD, 600 MHz)	56
Figura 22 - Espectro de TOCSY-1D em 2,30 ppm da substância 1 (CD ₃ OD, 600 MHz)	57

Figura 23 - Espectro de massa EM-IES (+) da molécula protonada em m/z 201,1122 $[M+H]^+$, m/z 401,2171 $[2M+H]^+$ e um aduto de sódio m/z 423,1989 $[2M+Na]^+$ da substância 1	58
Figura 24 - Espectros na região do UV registrado em 254 nm e cromatograma analítico em CLAE-DAD e da substância 2	59
Figura 25 - Espectro na região do IV da substância 2	59
Figura 26 - Principais correlações gHMBC, gCOSY e interações de TOCSY da substância 2	61
Figura 27 - Espectro de RMN de 1H da substância 2 (CD_3OD , 600 MHz).....	63
Figura 28 - Espectro de RMN de ^{13}C da substância 2 (CD_3OD , 600 MHz)	64
Figura 29 - Espectro de DEPT-135 da substância 2 (CD_3OD , 600 MHz)	65
Figura 30 - Mapa de correlação H-C a uma ligação (HSQC) da substância 2 (CD_3OD , 600 MHz).....	66
Figura 31 - Mapa de correlação H-C a longa distância (gHMBC) da substância 2 (CD_3OD , 600 MHz).....	67
Figura 32 - Mapa de correlação gCOSY da substância 2 (CD_3OD , 600 MHz)	68
Figura 33 - Espectro de TOCSY-1D da substância 2 em 2,65 ppm (CD_3OD , 600 MHz)	69
Figura 34 - Espectro de TOCSY-1D da substância 2 em 6,49 ppm (CD_3OD , 600 MHz)	70
Figura 35 - Espectro de massa EM-IES (+) da molécula ionizada em m/z 369,2271 $[M+2H]^+$ da substância (2)	71
Figura 36 - Expansão Espectro de massa EM-IES (+) da substância (2) com o íon molecular em m/z 367,2097 Da $[M]$, e o pico pseudo molecular em m/z 369,2271 $[M+2H]^{++}$	71
Figura 37 - Espectro na região do UV registrado em 254 nm e cromatograma analítico em CLAE-DAD da substância 3	72
Figura 38 - Espectro na região do IV da substância 3	73
Figura 39 - Principais correlações gHMBC, COSY e interações de TOCSY da substância 3	74
Figura 40 - Espectro de RMN de 1H da substância 3 (CD_3OD , 600 MHz).....	75
Figura 41 - Espectro de RMN de ^{13}C da substância 3 (CD_3OD , 600 MHz)	76
Figura 42 - Espectro de DEPT-135 da substância 3 (CD_3OD , 600 MHz)	77
Figura 43 - Mapa de correlação H-C a uma ligação (gHSQC) da substância 3 (CD_3OD , 600 MHz).....	78
Figura 44 - Mapa de correlação H-C a longa distância (gHMBC) da substância 3 (CD_3OD ,600 MHz).....	79
Figura 45 - Mapa de correlação gCOSY da substância 3 (CD_3OD , 600 MHz)	80
Figura 46 - Espectro de TOCSY-1D da substância 3 em 2,4ppm (CD_3OD , 600 MHz)	81
Figura 47 - Espectro de TOCSY-1D da substância 3 em 6,24ppm (CD_3OD , 600 MHz)	82

Figura 48 - Espectro de massa EM-IES (+) da molécula protonada m/z 327,2162 ($[M+2H]^+$), m/z 653,4248($[2M+3H]^+$) e o aduto de sódio m/z 349,1979 ($[M+Na]^+$) da substância (3)	83
Figura 49 - espectro na região do UV registrado em 254 nm e cromatograma analítico em CLAE-DAD e da substância 4	84
Figura 50 - Espectro na região do IV da substância 4	85
Figura 51 - Principais correlações gHMBC, gCOSY e interações de TOCSY da substância 4	86
Figura 52 - Espectro de RMN de 1H da substância 4 (CD_3OD , 600 MHz).....	88
Figura 53 - Espectro de RMN de ^{13}C da substância 4 (CD_3OD , 600 MHz)	89
Figura 54 - Espectro de TOCSY-1D da substância 4 em 2,20 ppm (CD_3OD , 600 MHz)	90
Figura 55 - Mapa de correlação gCOSY da substância 4 (CD_3OD , 600 MHz).....	91
Figura 56 - Espectro de TOCSY-1D da substância 4 , em 6,14ppm (CD_3OD , 600 MHz)	92
Figura 57 - Mapa de correlação H-C a longa distância (gHMBC) da substância 4 (CD_3OD ,600 MHz).....	93
Figura 58 - Expansão das correlações H-C a longa distância (gHMBC) da substância 4 (CD_3OD , 600MHz).....	94
Figura 59 - Espectro de DEPT 135 da substância 4 (CD_3OD , 600 MHz).....	95
Figura 60 - Mapa de correlação H-C a uma ligação (gHSQC) da substância 4 (CD_3OD , 600 MHz).....	96
Figura 61 – Espectro EM-IES no modo positivo (+) da molécula protonada m/z 263,1279 $[M+H]^+$, m/z 525,2477 $[2M+H]^+$ e o aduto de sódio m/z 547,2296 $[2M+Na]^+$ de (4)	97
Figura 62 - Espectro na região do UV registrado em 254 nm e cromatograma analítico em CLAE-DAD e da substância 5	98
Figura 63 - Espectro na região do IV da substância 5	99
Figura 64 - Principais correlações gHMBC, COSY e interações de TOCSY da substância 5	101
Figura 65 - Espectro de RMN de 1H da substância 5 (CD_3OD , 600 MHz).....	103
Figura 66 - Espectro de RMN de ^{13}C da substância 5 (CD_3OD , 600 MHz)	104
Figura 67 - Espectro de DEPT-135 da substância 5 (CD_3OD , 600 MHz)	105
Figura 68 - Mapa de correlação H-C a uma ligação (HSQC) da substância 5 (CD_3OD , 600 MHz).....	106
Figura 69 - Mapa de correlação H-C a longa distância (gHMBC) da substância 5 (CD_3OD ,600 MHz).....	107
Figura 70 - Expansão do Mapa de correlação H-C a longa distância (gHMBC) da substância 5 (CD_3OD , 600 MHz).....	108
Figura 71 - Mapa de correlação COSY da substância 5 (CD_3OD , 600 MHz)	109

Figura 72 - Espectro de TOCSY-1D da substância 5 (CD ₃ OD, 600 MHz)	110
Figura 73 - Espectro de EM-IES no modo positivo (+) apresentou a molécula ionizada em m/z 529,2731 [M+Na+H] ⁺ da substância 5	111
Figura 74 - Espectro UV registrado em 254 nm e cromatograma analítico em CLAE-DAD da substância 6	111
Figura 75 - Espectro na região do IV da substância 6	112
Figura 76 - Principais correlações gHMBC, gCOSY e interações de TOCSY da substância 6 114	
Figura 77 - Espectro de RMN de ¹ H da substância 6 (CD ₃ OD, 600 MHz).....	116
Figura 78 - Espectro de RMN de ¹³ C da substância 6 (CD ₃ OD, 600 MHz)	117
Figura 79 - Espectro de DEPT-135 da substância 6 (CD ₃ OD, 600 MHz)	118
Figura 80 - Mapa de correlação H-C a uma ligação (HSQC) da substância 6 (CD ₃ OD, 600 MHz).....	119
Figura 81 - Mapa de correlação H-C a longa distância (gHMBC) da substância 6 (CD ₃ OD, 600 MHz).....	120
Figura 82 - Mapa de correlação COSY da substância 6 (CD ₃ OD, 600 MHz)	121
Figura 83 - Espectro de TOCSY-1D da substância 6 em 4,20 ppm (CD ₃ OD, 600 MHz)	122
Figura 84 - Espectro de EM-IES no modo negativo (-) da molécula em m/z 313,4589 [M-H] ⁻ e o aduto de sódio m/z 627,2690 [2M-H] ⁻ da substância 6	123
Figura 85 - Espectro de EM-IES no modo positivo (+) apresentou os sinais em m/z 337,2327 [M+Na] ⁺ , m/z 629,4941 [2M+ H] ⁺ e m/z 651,4756 [2M+ Na] ⁺ da substância 6	123
Figura 86 - Percentuais de inibição da fração F. MeCN dos corpos de frutificação de <i>N. gardneri</i> contra a espécie <i>Candida krusei</i> e <i>Candida albicans</i> . (T1 = F. MeCN). Controle positivo Nistatina; controle negativo; PBS = tampão fosfato-salino.....	125
Figura 87 - Percentuais de inibição da fração F. MeCN dos corpos de frutificação de <i>N. gardneri</i> contra a espécie <i>Candida tropicalis</i> e <i>Candida parapsilosis</i> . (T1 = F. MeCN). Controle positivo Nistatina; controle negativo; PBS = tampão fosfato-salino.....	126
Figura 88 - Percentuais de inibição da subfração Ng4 dos corpos de frutificação de <i>N. gardneri</i> contra a espécie <i>Candida parapsilosis</i> e <i>Candida krusei</i> .. (T2 = Ng4). Controle positivo Nistatina; controle negativo PBS = tampão fosfato-salino.....	127
Figura 89 - Percentuais de inibição da subfração Ng4 dos corpos de frutificação de <i>N. gardneri</i> contra a espécie <i>C. tropicalis</i> e <i>C. albicans</i> . (T2 = Ng4). Controle positivo Nistatina; controle negativo PBS = tampão fosfato-salino.....	128

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Constituintes isolados e identificados na espécie <i>N. nambi</i>	22
Tabela 2 - Atividades biológicas relatadas para a espécie <i>N. nambi</i>	24
Tabela 3-Identificação das substâncias encontradas na fração Hex de <i>N. gardneri</i> após sililação	46
Tabela 4 - Dados de RMN ¹ H e ¹³ C do ácido (2 <i>E</i>)-dec-2-en-1,10-dióico (1) em CD ₃ OD, δ(Multiplicidade, <i>J</i> em Hz).....	50
Tabela 5 - Dados de RMN ¹ H e ¹³ C de (9 <i>E</i> , 11 <i>E</i>)-7,8-di-hidroxi-13-oxo-heneicososa-9,11-dienamida (2), em CD ₃ OD, δ (Multiplicidade, <i>J</i> em Hz).....	62
Tabela 6 - Dados de RMN ¹ H e ¹³ C de (9 <i>E</i> , 11 <i>E</i>)-7,8-di-hidroxi-13-oxo-octadeca-9,11-dienamida (3), em CD ₃ OD, δ (Multiplicidade, <i>J</i> em Hz)	74
Tabela 7 - Dados de RMN ¹ H e ¹³ C de tetraciclo [7, 5, 1, 0 ¹ , 6 ⁰ 12,15]-5,5-dimetil-11-oxa-2-oxo-pentadec-8-en-14(13)-lactona (4) em CD ₃ OD, δ (Multiplicidade, <i>J</i> em Hz).....	87
Tabela 8 - Dados de RMN 1H e 13C de ((1 <i>E</i> `, 3 <i>E</i> `, 10 <i>E</i> `, 12 <i>E</i> `-N-5`,7`,14`-tri-hidroxi-15-oxo-icosa-1`,3`,10`,12`-tetra-enil) decanamida (5) em CD3OD, δ (Multiplicidade, <i>J</i> em Hz)102	
Tabela 9 - Dados de RMN ¹ H e ¹³ C de Ácido (7 <i>E</i>)-9,10-di-hidroxi-octadeca-7-enóico (6) em CD ₃ OD, δ (Multiplicidade, <i>J</i> em Hz)	115
Tabela 10 - Efeitos <i>in vitro</i> da F. MeCN e das subfrações Ng1, Ng3 e Ng4 contra adultos de 49 dias de idade de <i>Schistosoma mansoni</i>	130

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOEt - acetato de etila

ANOVA - análise de variância

BC1- Células de câncer de mama humano

CC - cromatografia em coluna

CE₅₀ - concentração eficiente capaz reduzir 50% do crescimento

CG-EM - cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

CIM₅₀ - concentração inibitória média

CIT - cromatograma de íons totais

CLAE - cromatografia líquida de alta eficiência

CEUA- Comissão de Ética no Uso de Animais

DAD - *diode array detector*

ESI - *electrospray ionization*

Hex – hexano

HPLC - *high-performance liquid chromatography*

HSMS - *high-resolution mass spectrometry*

IV - Infravermelho

KB- Carcinoma epidermóide humano na boca

KKU-100- Adenocarcinoma pouco diferenciado

KKU-139 - Carcinoma escamoso

KKU-156- Adenocarcinoma moderadamente diferenciado

KKU-213- Carcinoma adenoescamoso

KKU-214 - Denocarcinoma moderadamente diferenciado

MCF-7- Células de câncer de mama humano

MeOH – metanol

MeCN – acetonitrila

MS - *mass spectrometry*

NCI-H187- Células humanas de câncer de pulmão pequeno

Ng - *Neonothopanus gardneri*

PBS - Tampão fosfato-salino

RMN - ressonância magnética nuclear

TR - tempo de retenção

UFC - unidade formadora de colônia

UV-Vis - ultravioleta-vísivel

SUMÁRIO

1.1	PRODUTOS NATURAIS DE COGUMELOS BIOLUMINESCENTES	19
1.2	Família Marasmiaceae	20
1.3	Gênero <i>Neonothopanus</i>	20
1.3.1	Pesquisa bibliográfica de espécies do gênero <i>Neonothopanus</i>	21
1.3.1.1	Estudos químicos e biológicos de espécies do gênero <i>Neonothopanus</i>	21
1.4	Espécie <i>Neonothopanus gardneri</i>	24
1.4.1	Bioluminescência da espécie <i>Neonothopanus gardneri</i>	25
2	OBJETIVOS.....	32
2.1	Objetivo geral	32
2.2	Objetivos específicos	32
3	PARTE EXPERIMENTAL.....	34
3.1	Material fúngico	34
3.2	Procedimentos gerais	35
3.2.1	Solventes reagentes e equipamentos.....	35
3.2.2	Cromatografia em coluna <i>flash</i>	35
3.2.3	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM).....	35
3.2.4	Derivatização por sililação	36
3.2.5	Cromatografia líquida de alta eficiência CLAE-DAD	36
3.2.6	Espectrometria de massas de alta resolução	36
3.2.7	Ressonância magnética nuclear	37
3.2.8	Espectroscopia de absorção molecular na região do ultravioleta	37
3.2.9	Espectroscopia de absorção molecular na região do infravermelho.....	37
3.3	Obtenção do extrato e frações do corpo de frutificação do <i>Neonothopanus gardneri</i> Berk.	37
3.4	Análise cromatográfica por CLAE-DAD das subfrações Ng3 e Ng4 de <i>N. gardneri</i>	39
3.4.1	Preparação das amostras para análise via CLAE-DAD (<i>clean-up</i>).....	39

3.4.2 Subfração Ng3	39
3.4.3 Subfração Ng4	40
3.5 Atividade Antifúngica	41
3.6 Avaliação da atividade antiparasitária em adultos de <i>Schistosoma mansoni</i>	41
3.6.1 Manutenção do ciclo evolutivo de <i>S. mansoni</i>	41
3.6.2 Ensaio <i>in vitro</i> com vermes adultos.....	42
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1 Análise da fração hexânica do cogumelo <i>Neonothopanus gardneri</i>	45
4.2 Determinação estrutural das substâncias isoladas da fração acetonitrila de <i>Neonothopanus gardneri</i>	47
4.2.1 Determinação estrutural da substância ácido (2 <i>E</i>)-dec-2-en-1,10-dióico (1).....	48
4.2.2 Determinação estrutural da substância (9 <i>E</i> , 11 <i>E</i>)-7,8-di-hidroxi-13-oxo-heneicosa-9,11-dienamida (2).....	58
4.2.3 Determinação estrutural da substância (9 <i>E</i> , 11 <i>E</i>)-7,8-di-hidroxi-13-oxo-octadeca-9,11-dienamida (3).....	72
4.2.4 Determinação estrutural da substância tetraciclo [7,5,1,0 ^{1,6} 0 ^{12,15}]-5,5-dimetil-11-oxa-2-oxo-pentadec-8-en-14(13)-lactona (4).....	84
4.2.5 Determinação estrutural da substância ((1 <i>E</i> ' , 3 <i>E</i> ' , 10 <i>E</i> ' , 12 <i>E</i> ' -N-5',7',14'-tri-hidroxi-15-oxo-icosa-1',3',10',12'-tetraenil) decanamida (5)	98
4.2.6 Determinação estrutural da substância ácido (7 <i>E</i>)-9,10-di-hidroxi-octadeca-7-enóico (6)	111
4.8 Atividades biológicas	124
4.8.1 Avaliação Antifúngica da fração acetonitrila (F. MeCN) e subfração Ng4.....	124
4.8.2 Efeito antiparasitário da fração acetonitrila (F. MeCN) e subfrações Ng1, Ng3 e Ng4 em adultos de <i>S. mansoni</i>	129
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	132
REFERÊNCIAS	134



INTRODUÇÃO

1.1 PRODUTOS NATURAIS DE COGUMELOS BIOLUMINESCENTES

A emissão de luz por organismos vivos tem atraído a atenção da humanidade desde o tempo de Aristóteles (384-322 a. C.) e Plínio (23-79 a.D). Há uma infinidade de espécies descritas como bioluminescentes (por exemplo, bactérias, fungos, dinoflagelados, animais marinhos e terrestres). Este fenômeno é distribuído em cerca de 700 gêneros de 16 principais filos, predominantemente encontrados nos oceanos. A distribuição de organismos bioluminescentes na árvore filogenética da vida é muito intrigante, uma vez que não há relação aparente ou regra para a sua distribuição (BONDAR; SHIMOMURA; GITELSON, 2012; HADDOCK; MOLINE; CASE, 2010; OLIVEIRA et al., 2013).

A quimiluminescência e a bioluminescência são processos muito importantes do ponto de vista químico e biológico, sendo modelos particularmente interessantes para várias pesquisas multidisciplinares como estudos mecanicistas de conversão de energia química, estrutura e função de proteínas, evolução enzimática, fotoecologia e material educativo (OLIVEIRA et al., 2013).

A exclusividade com que o reino dos cogumelos mantém a natureza viva foi perspicazmente citada pelo botânico francês e micologista Sebastien Vaillant. A extraordinária previsão, na virada dos séculos XVII e XVIII, deu-se quando nada se sabia sobre bioquímica, para não mencionar genética. No entanto, o desenvolvimento da biologia prova a equidistância do reino dos cogumelos tanto de animais quanto de plantas (BONDAR; SHIMOMURA; GITELSON, 2012).

Em relação à bioluminescência fúngica, há muitos registros históricos sobre a emissão de luz de madeira e outros materiais celulósicos em decomposição. Desde 2013, apenas 75 espécies fúngicas são conhecidas por serem terrestres e bioluminescentes. Elas pertencem a quatro linhagens evolutivas distintas na ordem Agaricales: 52 de *Micenoide* (Ásia, Europa, Américas, África, Caribe, Austrália e Ilhas do Pacífico), 5 de *Armillaria* (um nativo da Ásia do Sul/Sudeste e 4 da Europa/América do Norte), 12 da *Omphalotus* (Ásia, Europa, Américas, Caribe e Austrália) e 2 de *Lucentipes* (*Gerronemaviridilucens* e *Mycenalucentipes* encontrados no Brasil) (OLIVEIRA et al., 2012).

Os fungos bioluminescentes, são saprotróficos (fungos e outros seres que se alimentam absorvendo substâncias orgânicas normalmente provenientes de matéria orgânica em

decomposição) com exceção de alguns fitopatógenos (por exemplo, *Armillariamellea* e *Mycenacitricolor*). Eles podem ser encontrados em áreas tropicais e temperadas, onde a alta umidade e clima quente favorecem sua reprodução, crescimento e sobrevivência. Todas as espécies são basidiomicetos Agárico de “podridão branca” (*white-rot*), que produzem corpos de frutificação (cogumelos) e cujo micélio segrega enzimas extracelulares (isto é, lacases e peroxidases de manganês) capazes de degradar a lignina (DEHEYN; LATZ, 2007). A distribuição de tecidos luminosos entre espécies fúngicas não é uniforme. Em algumas espécies, tanto o micélio como todo o basidioma são luminescentes, enquanto que, em outras espécies, apenas certas partes emitem luz. Corpos de frutificação também podem brilhar apenas a partir do estipe (caule), pileus (tampa) ou lamelas. No entanto, para todas as espécies a luz é emitida como um brilho contínuo (WALDENMAIER; OLIVEIRA; STEVANI, 2012).

1.2 Família Marasmiaceae

Marasmiaceae é uma família de fungos basidiomicetos de ordem Agaricales que possuem esporos brancos. Eles têm principalmente hastes resistentes e a capacidade de encolher durante um período seco e, depois, de se recuperar. A maioria dos cogumelos dessa família é comestível. A família Marasmiaceae contém 54 gêneros e 1590 espécies (AIRTH; FOERSTER; BEHRENS, 1966).

Na América do Sul, a família Marasmiaceae está representada apenas por uma espécie, o cogumelo bioluminescente *Neonothopanus gardneri* (KIRK et al., 2001).

1.3 Gênero *Neonothopanus*

O gênero *Neonothopanus* é o menor da família Marasmiaceae, possuindo apenas três espécies de cogumelos. O gênero foi circunscrito, em 1999, por *Petersen RH e Krisai-Greilhuber I*, em 1999. A espécie *N. nambi* é encontrada na Austrália, América Central e Malásia, enquanto o *N. gardneri* é encontrado na América do Sul (CAPELARI et al., 2011). O *N. hygrophanus* é o terceiro membro do gênero, encontrado na África central, foi adicionado ao gênero em 2011.

No Brasil, o gênero *Neonothopanus* está representado pela espécie *N. gardneri*. Essa espécie é encontrada principalmente em áreas como a Mata dos Cocais, nos estados do Maranhão, Tocantins, Goiás e Piauí. Os corpos de frutificação crescem na base de palmeiras

(*Attalea humilis*, *A. funifera* e *Orbignya phalerata*), essas áreas favorecem sua reprodução, crescimento e sobrevivência (CAPELARI et al., 2011).

1.3.1 Pesquisa bibliográfica de espécies do gênero *Neonothopanus*

A pesquisa bibliográfica realizada nos bancos de dados *Scifinder*, *Web of Science*, *Science Direct*, *Scopus*, *Scielo*, *PubMed* e *Periódicos Capes*, utilizando as palavras-chave: bioluminescência, fungos, cogumelo e atividade (isoladamente ou em associação), permitiu obter uma revisão geral a cerca dos estudos químicos e biológicos das espécies pertencentes ao gênero *Neonothopanus*. Com base nas referências encontradas e considerando a pequena diversidade do gênero é possível descrever que constam informações apenas sobre estudos químicos e biológicos da espécie *Neonothopanus nambi*, e para esse estudo foram considerados publicações de todos os períodos.

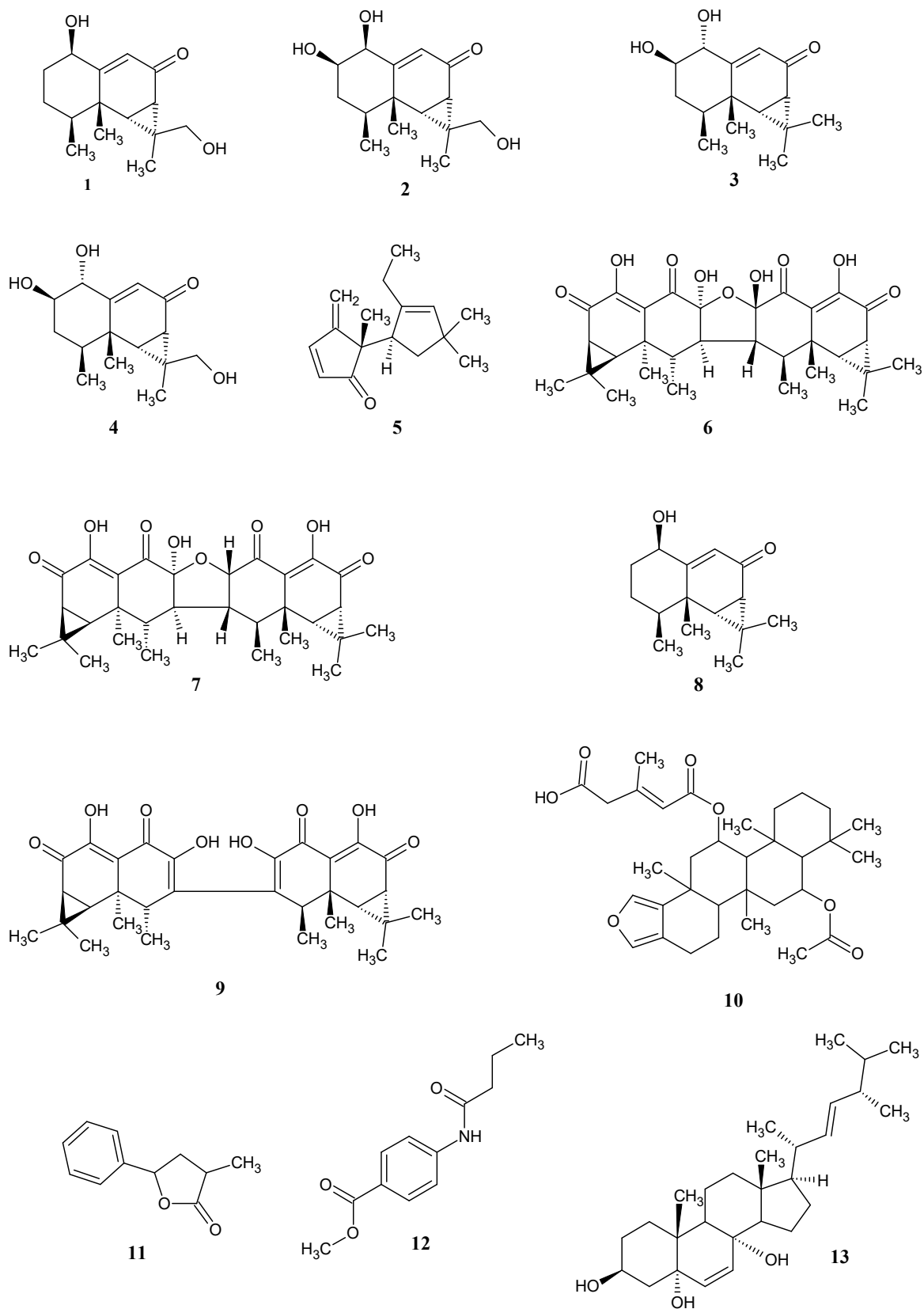
1.3.1.1 Estudos químicos e biológicos de espécies do gênero *Neonothopanus*

A investigação química e biológica de metabólitos ativos neste gênero está relacionada somente à espécie *N. nambi*. Com o avanço das pesquisas no campo dos cogumelos bioluminescente, alguns metabólitos biologicamente ativos foram identificados. KANOKMEDHAKUL et al., 2012, conseguiram isolar sete (7) substâncias do cogumelo bioluminescente *N. nambi*. Desde então, têm aumentado a atenção dos químicos de produtos naturais e a de biólogos, conforme indicado pelo aumento constante de publicações dedicadas a estes temas nos últimos anos. Tsarkova et al (2016) isolaram seis (6) metabolitos secundários, incluindo um sesterterpenóide inédito. Estes são os únicos estudos químicos envolvendo este gênero. A Tabela 1 apresenta os constituintes químicos (1 - 13) identificados na espécie *N. nambi* e a Figura 1, apresenta as respectivas estruturas químicas.

Tabela 1 - Constituintes isolados e identificados na espécie *N. nambi*

Espécie	Constituintes	Referência
<i>N. nambi</i>	Nambinona A (1)	(KANOKMEDHAKUL et al., 2012)
	Nambinona B (2)	
	Nambinona C (3)	
	1- <i>epi</i> -nambinona B (4)	
	Nambinona D (5)	(TSARKOVA et al., 2016)
	Aurisina A (6)	
	Aurisina K (7)	
	Axinisona B (8)	
	(1aS,1'aS,7R,7aS,7bR,7'R,7'aS,7'bR)	
	3,3',5,5'tetra hidroxil,1,1',1',7,7a,7',7'a-octametil-7,7a,7',7'a tetra	
	hidro1H,1'H[6,6'bi(ciclopropa[a]nafaleno)]-	
	2,2',4,4'(1aH,1'aH,7bH,7'bH)-tetraona (9)	
	(E) -5- (7-acetoxi-5b,8,8,11a, 13a-pentametil4,5,5a,5b, 6,7,7a, 8,9,10,11,11a, 11b, 12,13 , 13a-hexadeca hidrocriseno [1,2-c] furan-12-iloxi) -3-metil-5-oxopent-3 enoico	
Ácido (10)		
trans- α -hidroxi- γ -fenilbutirolactona (11)		
4-butiramidobenzoato de metila (12)		
Ergosta-6,22-dieno-3 β , 5,8 α -triol (13)		

O *N. gardneri* é a espécie encontrada na América do Sul, especificamente no norte e nordeste brasileiro. No entanto, não há estudos na literatura sobre a investigação química com ênfase em isolamento e elucidação dos metabólitos secundários do cogumelo bioluminescente *N. gardneri* (objeto deste estudo). As únicas investigações a cerca do tema que estão relacionadas a ele se referem ao mecanismo bioluminescente desenvolvido por estes cogumelos. Portanto, este trabalho descreve o isolamento, a elucidação estrutural e avaliação biológica dos extratos e frações obtidas a partir do corpo de frutificação do cogumelo *N. gardneri*.

Figura 1 - Estruturas dos constituintes químicos isolados na *N. nambi*

1.3.1.2 Estudos biológicos da espécie *N. nambi*

OLIVEIRA, M. D. A, 2018.

Há poucos relatos quanto ao potencial biológico da espécie, porém alguns incluem informações sobre seus efeitos antimaláricos contra *Plasmodium falciparum*, atividade antimicobacteriana contra *Mycobacterium tuberculosis* e citotoxicidade contra várias linhagens celulares. A Tabela 2 apresenta as atividades biológicas relatadas para as substâncias isoladas da espécie *N. nambi*.

Tabela 2 - Atividades biológicas relatadas para a espécie *N. nambi*

Espécie	Atividade	Resultado	Amostra	Referências
<i>N. nambi</i>	Antimalárica	+	Aurisina A (6) e Aurisina K (7)	
	Antimicobacteriana	+	Aurisina A (6) e Aurisina K (7)	
	Citotoxicidade NCI-H187	+	Nambinona C (3) e Aurisina A (6) e Aurisina K (7)	KANOKMEDHAKUL, et al.,2012
	Citotoxicidade BC1	+	Aurisina A (6)	
	Citotoxicidade KB	+	Aurisina K (7)	
	Citotoxicidade (KKU-100, KKU- 139, KKU-156 e KKU-213)	+	Aurisina A (6)	

LEGENDA: + = ativo

1.4 Espécie *Neonothopanus gardneri*

Neonothopanus gardneri Berk é classificado como o maior cogumelo brasileiro, e exibe luminescência excepcionalmente intensa de micélio ou basidiomas. Está distribuído por toda a mata dos cocais nos estados do Maranhão, Tocantins, Goiás e Piauí, que é um bioma de transição entre a floresta Amazônica e a Caatinga. Os basidiocarpos de *N. gardneri* crescem

em troncos de pindobas (*Attalea oleifera*) e babaçu (*Orbignya phalerata*) (CAPELARI et al., 2011).

Figura 2 - Fotos da espécie *Neonothopanus gardneri* Berk.



Fonte: Michele P. Verderane/IP-USP e C.V. STEVANI/IQ-USP

Conhecido popularmente como ‘Flor de coco’, este cogumelo foi descoberto em 1840 por Gardner, que viu garotos brincando com o que pensou serem vagalumes, na cidade de Natividade, em Tocantins (GARDNER, 1840), Gardner de início o classificou como *Agaricus gardneri*. De 1840 até 2011, este fungo passou por várias classificações como *Omphalia gardneri*, *Pleurotus gardneri*, *Omphalotus nidiformis* e, finalmente, *N. gardneri*, esta última foi realizada baseada em critérios morfológicos e de biologia molecular. Após o trabalho de reclassificação, a espécie foi inserida no gênero *Neonothopanus*, em vez de fazer parte do gênero *Omphalotus* (VENTURA; SILVA; STEVANI, 2015).

1.4.1 Bioluminescência da espécie *Neonothopanus gardneri*

Apenas recentemente, em 2017 a emissão de luz por fungos foi confirmada como resultado de um sistema bioluminescente clássico que pode ser testado misturando um extrato ‘frio’, rico em luciferase (enzima responsável pelo mecanismo de emissão de luz), com um

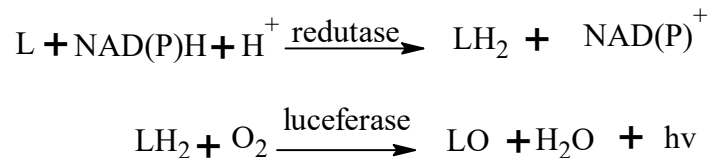
extrato 'quente', rico em luciferina, composto que em associação com a luciferase exibe luz, como descrito por Dubois, em 1887, ao estudar a bioluminescência de um besouro (Elateridae: *Pyrophorus plagiophtalamus*).

A bioluminescência fúngica apresenta uma distribuição espectral que corresponde aproximadamente à fluorescência da flavina ($\lambda_{\text{max}} = 530 \text{ nm}$) e requer uma luciferina ainda não identificada, um par de redutase dependente de luciferase termolábil/NAD(P)H e oxigênio molecular (DUBOIS, 1887; OLIVEIRA; STEVANI, 2009).

A bioluminescência fúngica depende de quatro componentes, a saber: um substrato (luciferina), uma redutase NAD(P)H dependente solúvel, uma oxigenase ligada à membrana (luciferase) e oxigênio. A luciferina ativa pode ser extraída do micélio cultivado utilizando tampão de citrato em ebulição sob atmosfera de argônio para evitar a oxidação. As enzimas também podem ser parcialmente purificadas a partir do micélio cultivado utilizando tampão de fosfato a frio, e a redutase e a luciferase subsequentemente separadas por ultracentrifugação, pois a luciferase é uma proteína de membrana insolúvel (OLIVEIRA et al., 2013).

A Figura 3 ilustra proposta do mecanismo descrita em 1960 para bioluminescência de cogumelos, adaptada por OLIVEIRA e colaboradores em 2013.

Figura 3 - Proposta do mecanismo de bioluminescência



L= luciferina, LH₂= luciferina reduzida, LO= oxiluciferin

Adaptado por (OLIVEIRA et al., 2013).

O substrato das reações bioluminescentes, a luciferina, é também exclusivo de um dado sistema luminescente, incluindo coelenterazina e luciferina de pirilampo. A coelenterazina é a luciferina de alguns organismos bioluminescentes marinhos de seis filos [Sarcomastigophora (protozoa), Cnidaria, Ctenophora, Mollusca, Arthropoda, e Chordata]. A luciferina do vagalume ocorre em todas as famílias de besouros bioluminescentes (Lampyridae, Elateridae e Phengodidae). Normalmente, tanto a luciferina como a luciferase são utilizadas como termos genéricos para se referir a qualquer substrato e enzima envolvidos num sistema bioluminescente. Além disso, a bioluminescência não deve ser confundida com a OLIVEIRA, M. D. A, 2018.

quimiluminescência ultra-leve, que é um processo ligado ao estresse oxidativo e a produção de espécies reativas de oxigênio e de peroxidação lipídica e reações entre proteínas heme e peróxidos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; SHIMOMURA, 2006).

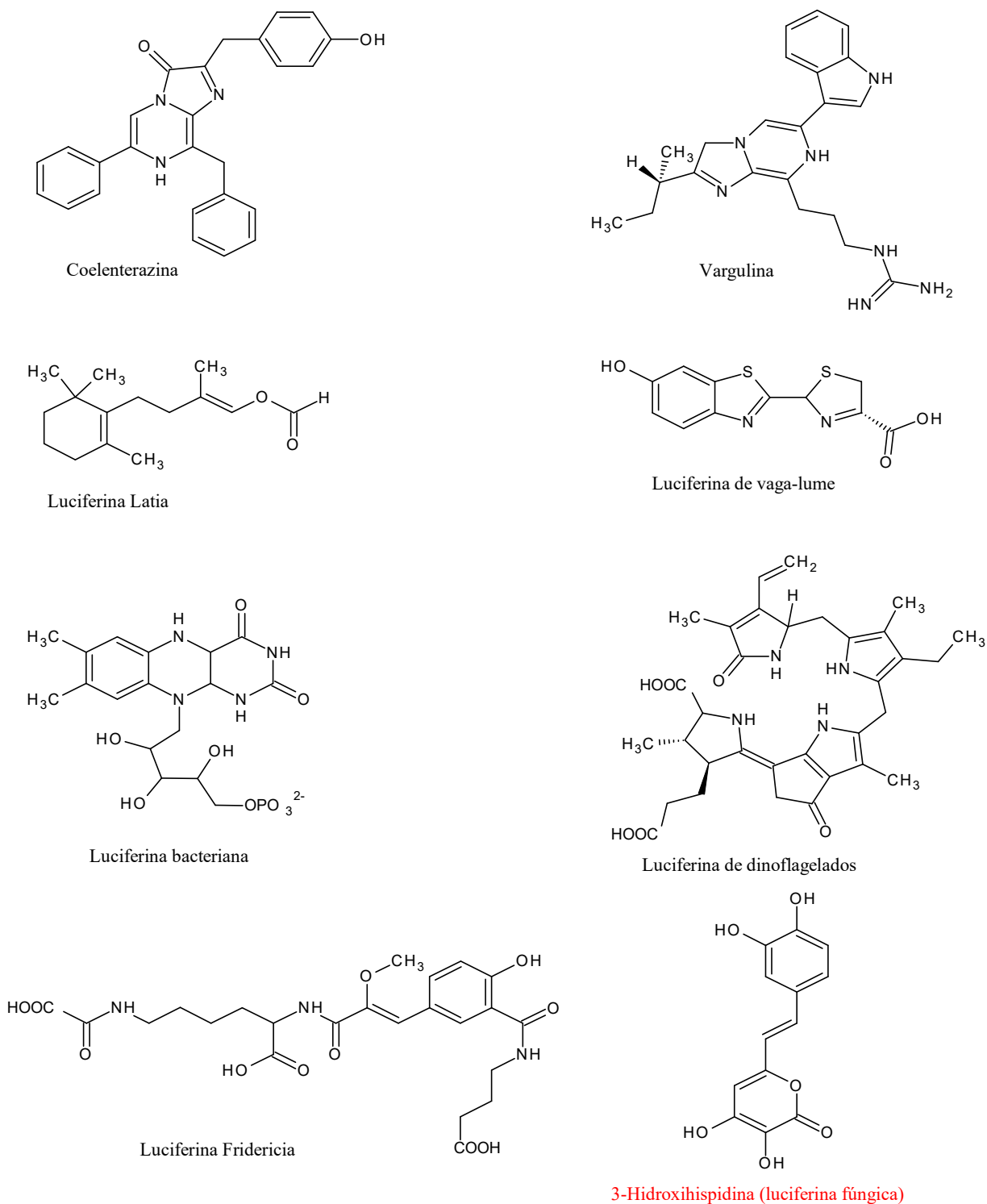
A bioluminescência em si pode cumprir uma variedade de funções biológicas e ecológicas dependendo do organismo luminoso, incluindo a atração de presas, o aposematismo, a iluminação, a defesa, o ataque, a comunicação, o cortejo sexual ou um simples subproduto metabólico (HASTINGS; WILSON, 2013).

A investigação da bioluminescência fúngica não seria completa sem o exame da sua função ecológica e da sua evolução, o que é particularmente interessante dado que poucas espécies (apenas 75) são luminescentes e estão amplamente distribuídas nos Agaricales (com 9.000 espécies), mas todas partilham de comparáveis mecanismos que conduzem à produção de luz. Ainda mais intrigante é o fato de que, ao contrário da maioria dos outros organismos bioluminescentes, os fungos não têm meios reconhecidos para detectar sua própria luz ou a luz de outros. Portanto, o significado da bioluminescência fúngica pode provavelmente envolver interações com outros organismos.

Em investigações realizadas por Sivinski (1981) foi possível apresentar algumas hipóteses para a importância ecológica da bioluminescência fúngica. A investigação teve como objetivo analisar a interação de artrópodes e fungos luminosos no início da década de 1980. Em seu trabalho, Sivinski (1981) apresentou várias hipóteses para a importância ecológica da bioluminescência fúngica: a primeira hipótese é atrair dispersores de esporos, carnívoros de fungívoros, fungívoros de outros concorrentes fúngicos ou atração de fertilizantes; a segunda seria repelir fungívoros fototróficos, e a terceira seria como um sinal aposemático. As investigações do significado ecológico da bioluminescência fúngica nos últimos anos estão sendo realizadas via experimentos no campo para abordar a função ecológica da bioluminescência fúngica em duas regiões geográficas distintas do Brasil com base em trabalhos anteriores relatados por Sivinski.

Segundo Tsarkova et al. (2016), durante os últimos 50 anos ocorreu o desenvolvimento das técnicas de isolamento e elucidação estrutural que permitiu caracterizar sete luciferinas naturais diferentes: a coelenterazina e seus derivados (utilizados por muitas espécies taxonomicamente não relacionadas), luciferinas de vagalumes, (*Dinoflagellata*) de crustáceo (*Cypridina* e *Latia lapa*) de um verme (*Diplocardia longa*). Tsarkova et al. (2016), também determinou a estrutura química da oitava luciferina e vários de seus análogos naturais (Figura 4) encontrados em um verme *Fridericia heliota*.

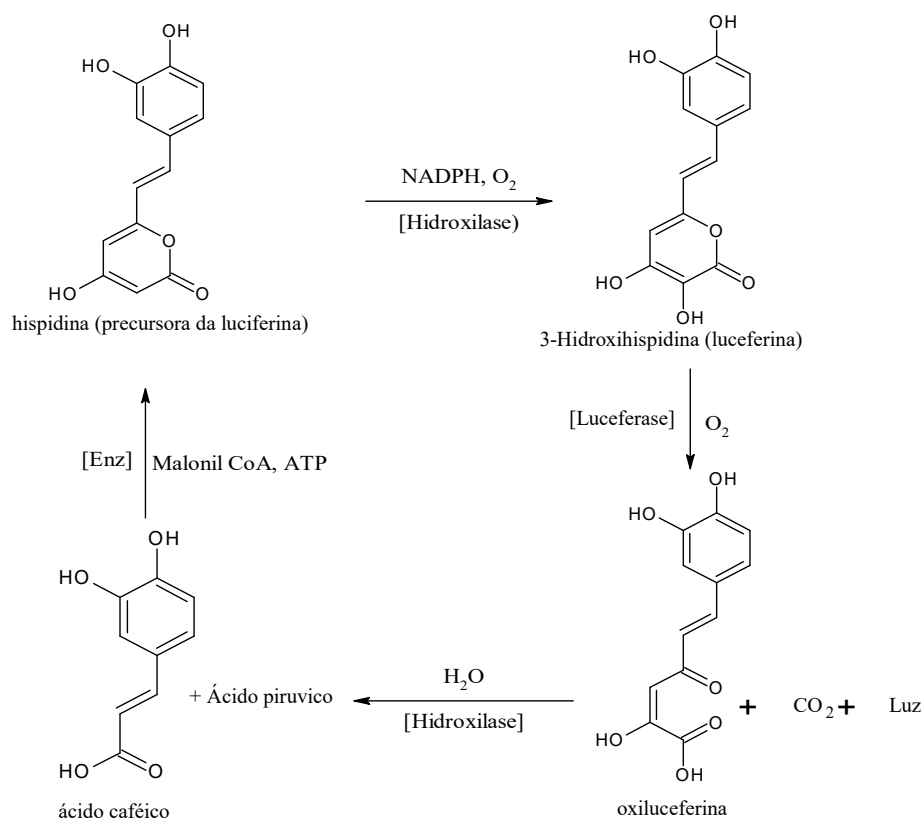
Figura 4 - Estruturas das luciferinas identificadas em diferentes espécies envolvidas nos mecanismos de bioluminescência.



De acordo com Tsarkova et al. (2016), existem muitas outras luciferinas na natureza, no entanto, suas estruturas químicas ainda são desconhecidas. Entre os mecanismos, o menos OLIVEIRA, M. D. A, 2018.

compreendido é o da bioluminescência fúngica. Todos os fungos bioluminescentes conhecidos são espécies formadoras de cogumelos pertencentes à ordem *Agaricales* e filo *Basidiomycota*. Uma hipótese recente afirma que todos os fungos luminosos compartilham o mesmo mecanismo de bioluminescência. Ao longo dos anos, muitas tentativas mal sucedidas de isolar as luciferinas fúngicas foram relatadas. No entanto, recentemente, um grupo de pesquisadores identificaram a estrutura química da luciferina fúngica a 3-hidroxihipidina e seu precursor a hispidina, usando o micélio do fungo luminoso vietnamita *N. nambi* (Figura 5). O mesmo grupo de pesquisadores também demonstrou que a hispidina produz luz verde forte pela adição do extrato de enzima bruto do corpo frutífero de *Mycena chlorophos* com NADPH. Este resultado sugeriu o envolvimento de hispidina na luminescência do corpo frutífero de *M. chlorophos*. Em 2017, Kaskova et al. (2017) conseguiram propor todo o mecanismo de emissão de luz por fungos e demonstraram que a oxiluciferina forma enolisada do ácido cafeilpiruvico é o emissor neste sistema que é hidrolisado enzimaticamente produzindo ácido caféico e, provavelmente, ácido pirúvico como ilustrado na Figura 5.

Figura 5 - Mecanismo de bioluminescência em cogumelos proposto por Kaskova et al., 2017.



Compreender a bioquímica da produção de luz em fungos ajudará a entender como interpretar mudanças na bioluminescência após exposição às condições ambientais variáveis desses espécimes de fungos raros do planeta (TSARKOVA et al., 2016).

Este trabalho constitui um estudo estudos dos corpos de frutificação de *N. gardneri*, visando contribuir com os conhecimentos disponíveis para o gênero, bem como apresentar a identificação pioneira de constituintes químicos e algumas atividades biológicas para a espécie.



2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- ✓ Isolar e elucidar a estrutura dos principais metabólitos secundários e investigar o potencial biológico do cogumelo bioluminescente *N. gardneri*.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Preparar o extrato acetato de etila (AcOEt) do cogumelo bioluminescente *N. gardneri* e submetê-lo a partição para obtenção das frações aquosa (Aquo), hexânica (Hex) e acetonitrila (MeCN)
- ✓ Isolar e identificar as estruturas dos principais metabólitos secundários da fração acetonitrila
- ✓ Identificar os compostos apolares da fração hexânica por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)
- ✓ Investigar a atividade antimicrobiana frente aos fungos do gênero *Candida* (*C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. tropicalis*)
- ✓ Avaliar o potencial antiparasitário contra *Schistosoma mansoni*.



3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Material fúngico

O cogumelo *Neonothopanus gardneri* (Berk. ex Gardner) utilizado neste estudo foi coletado no povoado Mimoso (Latitude: -6,16667; Longitude: -43,0833), localizado no município de São Francisco, estado do Maranhão, Brasil (Figura 6), no período de janeiro a maio de 2013, no horário entre 18 e 20 horas, sob autorização mediante comprovante de registro para coleta e transporte de material botânico, fúngico e microbiológico, SISBIO número 54548-1.

O material foi identificado pelo professor Dr. Cassius Vinícius Stevani e colaboradores do Laboratório de Bioluminescência de Fungos, Instituto de Química da Universidade de São Paulo (USP, São Paulo, Brasil). O extrato de número 416340 do espécime *N. gardneri* (Berk. ex Gardner) está depositado no Herbário do Instituto de Botânica de São Paulo-SP.

Figura 6 - Localização geográfica do ponto de coleta: povoado Mimoso (Latitude: -6,16667; Longitude: -43,0833), no município de São Francisco, estado do Maranhão, Brasil (Imagem adaptada do Google Earth).



Fonte: https://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Maranhao_Municip_SaoFranciscodoMaranhao.svg

3.2 Procedimentos gerais

3.2.1 Solventes reagentes e equipamentos

Os solventes utilizados na extração, partição e fracionamento cromatográfico foram de grau analítico e/ou espectroscópicos: o metanol (MeOH), acetato de etila (AcOEt), n-hexano, foram da marca Synth. Estes solventes foram usados para extração e fracionamento. A fase estacionária utilizada foi Sílica C18 (tamanho da partícula: 40-63 μm ; Merck).

Para os experimentos de cromatografia gasosa e líquida e espectrometria de massas, utilizou-se solventes grau HPLC das marcas Vetec[®], AppliChem Panreac[®] e água ultra pura (18.2 M Ω cm sistema da Elga Purelab Option-Q).

Os extratos e frações foram concentrados em evaporador rotatório da *Fisatom* modelo R-801, com auxílio de bombas de vácuo da PRSIMATEC BBV-132. As subfrações foram obtidas a partir de separações cromatográficas em coluna *flash* de vidro (ϕ x h = 4,5 x 22 cm) sob pressão reduzida.

As pesagens foram realizadas em balança analítica Bel Engineering Mark 210A, da Marconi, e balança semi-analítica Knwaagen KN4000. As transferências de líquidos foram realizadas com o auxílio de micropipetas BIO PET, LABMATE e PEG PET com volume variável de 10-100 μL , 100-1000 μL e 1000-5000 μL .

3.2.2 Cromatografia em coluna *flash*

Para o fracionamento cromatográfico em coluna aberta, foi utilizada a fase estacionária Sílica C18 (40-63 μm ; Merck), da *Sigma Aldrich*. Para a cromatografia em coluna, foi montado um sistema a vácuo. A coluna foi empacotada a seco e em seguida ativada com metanol 100%. Após esse processo, o sistema foi mantido em repouso por um período de 24 horas.

3.2.3 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)

As análises de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) foram realizadas em cromatógrafo a gás *Shimadzu* QP – 5000 com injetor automático 5000 e coluna capilar *Supelco* SPB – 5 (5% fenil polimetil siloxano de 30 m x 0,25 mm x 0,1 μm), acoplado ao espectrômetro de massas quadrupolar, faixa de massas: 50 a 500 daltons e base

de dados NIST 62TM *Library*; (Laboratório - NuBBE - Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia – UNESP-Araraquara-SP)

3.2.4 Derivatização por sililação

Uma alíquota de 1 mg da fração hexânica do cogumelo de *N. gardneri* foi submetida à reação de derivatização. Para isso, 80 µL de reagente *N*-metil-*N*-trimetilsililtrifluoroacetamida (MSTFA) foi adicionado à amostra, mantida por 30min. a 37 °C. Após esse período, a amostra foi analisada em triplicata por CG-EM (THIEL et al., 2003).

3.2.5 Cromatografia líquida de alta eficiência CLAE-DAD

As análises por CLAE-DAD foram realizadas em dois equipamentos Shimadzu com detector ultravioleta com arranjo de diodos (DAD):

Modo Analítico;

- ✓ Um Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência – CLAE, SHIMADZU®, modelo LC-20 A. Controlador CBM-20A, detector UV-Vis com arranjo de diodos (DAD), modelo SPD- M20 Coluna C-18 Phenomenex Luna (250 x 4,60 mm; 5 µm; 110Å) no modo analítico

Modo semi preparativo;

- ✓ Sistema binário Shimadzu LC-10AD com auto injetor Shimadzu SIL-10A e detector UV- detector ultravioleta com arranjo de diodos, coluna C-18 Phenomenex Luna (250 x 10,00 mm; 5 µm; 100Å) no modo semipreparativo.

- ✓ O tratamento dos dados foi obtido utilizando o software Shimadzu LC solution (versão 1.23 SP1).

3.2.6 Espectrometria de massas de alta resolução

Os espectros de massas de alta resolução (HRMS, do inglês *high resolution mass spectra*) foram obtidos em Cromatógrafo Líquido acoplado ao espectrômetro de massas (CLAE-PDA/EMIES) Thermo Instruments MS system (LTQ XL/ LTQ Orbitrap Discovery) acoplado à sistema de CLAE, binário-Thermo Fisher Scientific, detector PDA, injetor automático. As análises foram realizadas com voltagem do capilar 45 V, temperatura do capilar 260 °C, gás de arraste (N₂), fluxo 10-20 (unidades arbitrárias). O software Xcalibur

(Thermo Scientific®) foi utilizado durante a aquisição e processamento dos dados espectrométricos;

3.2.7 Ressonância magnética nuclear

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C foram obtidos em espectrômetro Bruker Avance DRX-600, operando a 600 (^1H) e 150 (^{13}C) MHz. As amostras analisadas foram dissolvidas em MeOD, sendo utilizado TMS ou o solvente residual não deuterado como referência interna.

3.2.8 Espectroscopia de absorção molecular na região do ultravioleta

As medidas de absorção molecular foram obtidas em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência – CLAE, SHIMADZU®, modelo LC-20 A, detector UV-Vis com arranjo de diodos (DAD), modelo SPD- M20 A.

3.2.9 Espectroscopia de absorção molecular na região do infravermelho

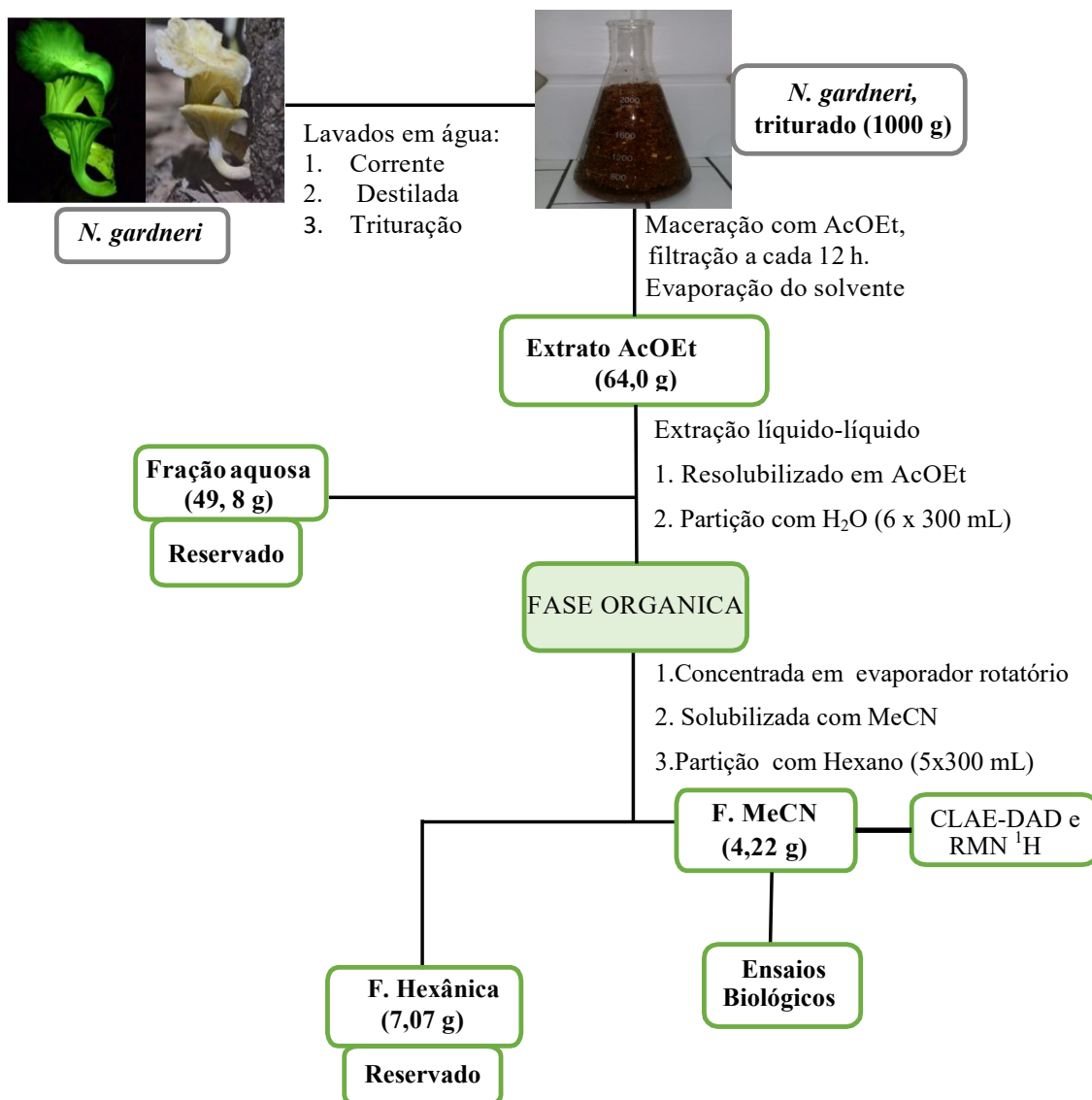
Os espectros na região do infravermelho IV foram obtidos em ATR (refletância total atenuada) com cristal de diamante puro. Foi utilizado um espectrômetro FT-IR (FTIR Cary 630 da Agilent Technologies) sob as seguintes condições: porcentagem de transmitância (%T) com acúmulo de 64 scans, com resolução de 4 cm^{-1} , na faixa de absorção de $4000 - 650\text{ cm}^{-1}$.

3.3 Obtenção do extrato e frações do corpo de frutificação do *Neonothopanus gardneri* Berk.

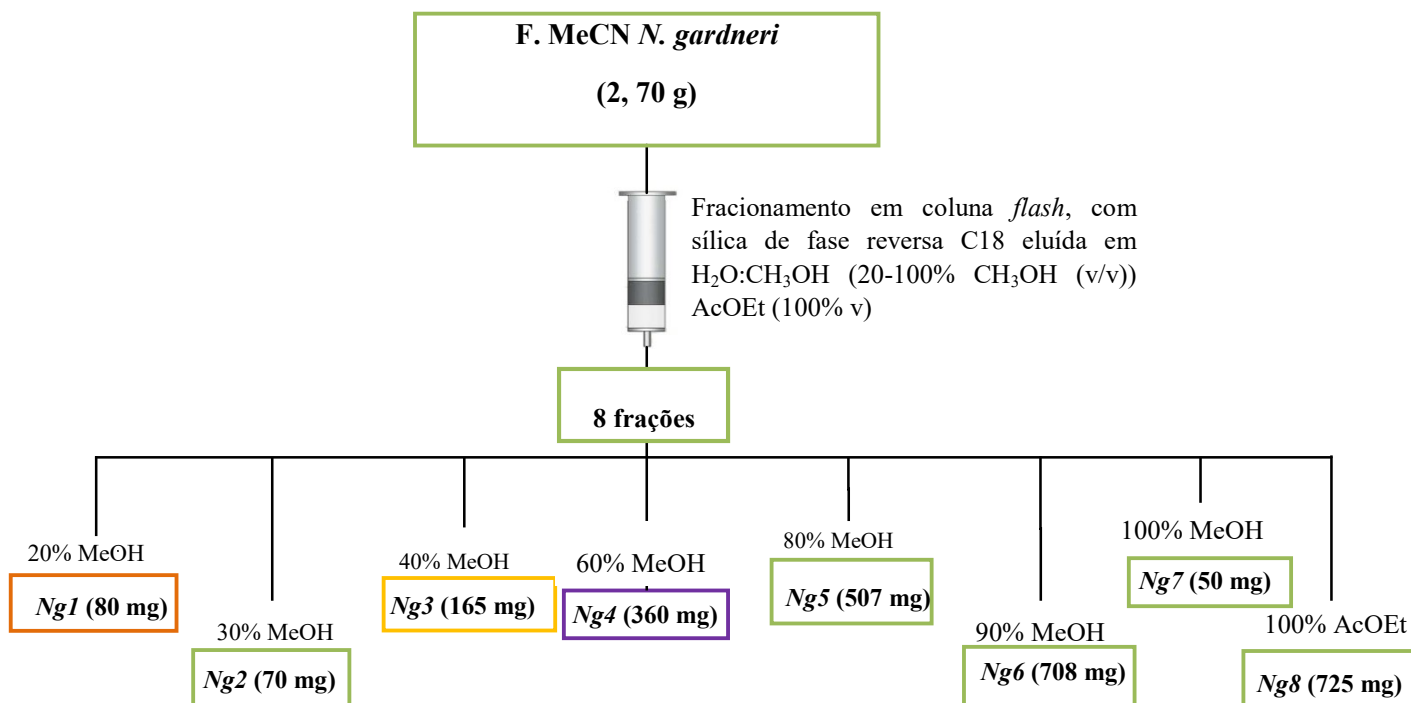
Os cogumelos foram lavados em água corrente e água destilada, em seguida, triturados com auxílio de gral pistilo. Os cogumelos triturados (1000 g) foram extraídos exaustivamente com acetato de etila na razão de 1:4 de material fúngico/solvente (m/v) por 8 dias consecutivos. A fase orgânica (sobrenadante) foi filtrada no intervalo de 12 horas e as soluções do extrato acetato de etila reunido foi concentrado em evaporador rotativo a uma temperatura máxima de $40\text{ }^\circ\text{C}$, levando a obtenção da massa do extrato bruto de 64,0 g. Parte do extrato acetato de etila (61,7 g, 95%) foi redissolvido em AcOEt e submetido a partição com água (H_2O). A fase orgânica (AcOEt) foi concentrada em rota evaporador, em seguida, foi solubilizada em MeCN submetida a nova partição com hexano. Foram obtidas 3 frações OLIVEIRA, M. D. A., 2018.

após evaporação dos solventes sendo: Fração aquosa (F. Aquo: 49,8 g, 80 %); Fração Hexânica (F. Hex: 7,07 g, 11,4 %) e a Fração Acetonitrila (F. MeCN: 4,22 g, 8,54 %), de acordo com Figura 7.

Figura 7 - Procedimento de obtenção do extrato AcOEt e frações do cogumelo *Neonothopanus gardneri*



Parte da fração MeCN (2,70 g) foi fracionada em coluna *flash* de vidro ($\phi \times h = 4,5 \times 22$ cm) sílica de fase reversa C18 (40-63 μm ; Merck), eluída em $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{OH}$ (20-100% CH_3OH) modo gradiente, obtendo 8 subfrações nomeadas de Ng1 à Ng8, como mostra a Figura 8. As subfrações obtidas foram submetidas à análise por CLAE-DAD em gradiente exploratório e análise de RMN ^1H .

Figura 8 - Procedimento de obtenção das subfrações Ng1 a Ng8 do cogumelo *N. gardneri*

3.4 Análise cromatográfica por CLAE-DAD das subfrações Ng3 e Ng4 de *N. gardneri*

As subfrações foram selecionadas para investigação química com base nas análises por CLAE-DAD em modo gradiente linear após otimização do método e, em seguida, foi estabelecida uma condição para purificação das substâncias em coluna semi preparativa C18 *Sun Fire* (10 x 250 mm, 5 µm) no sistema de solvente adequado para cada subfração.

3.4.1 Preparação das amostras para análise via CLAE-DAD (*clean-up*)

Antes das análises, as amostras foram solubilizadas em CH₃OH:H₂O (95:05) e submetidas a um “*clean up*”, utilizando cartuchos de sílica C-18 acoplado em membrana Millipore® (0,45 µm). Após este procedimento, as amostras (1,0 mg mL⁻¹) foram armazenadas em frascos para posterior análise.

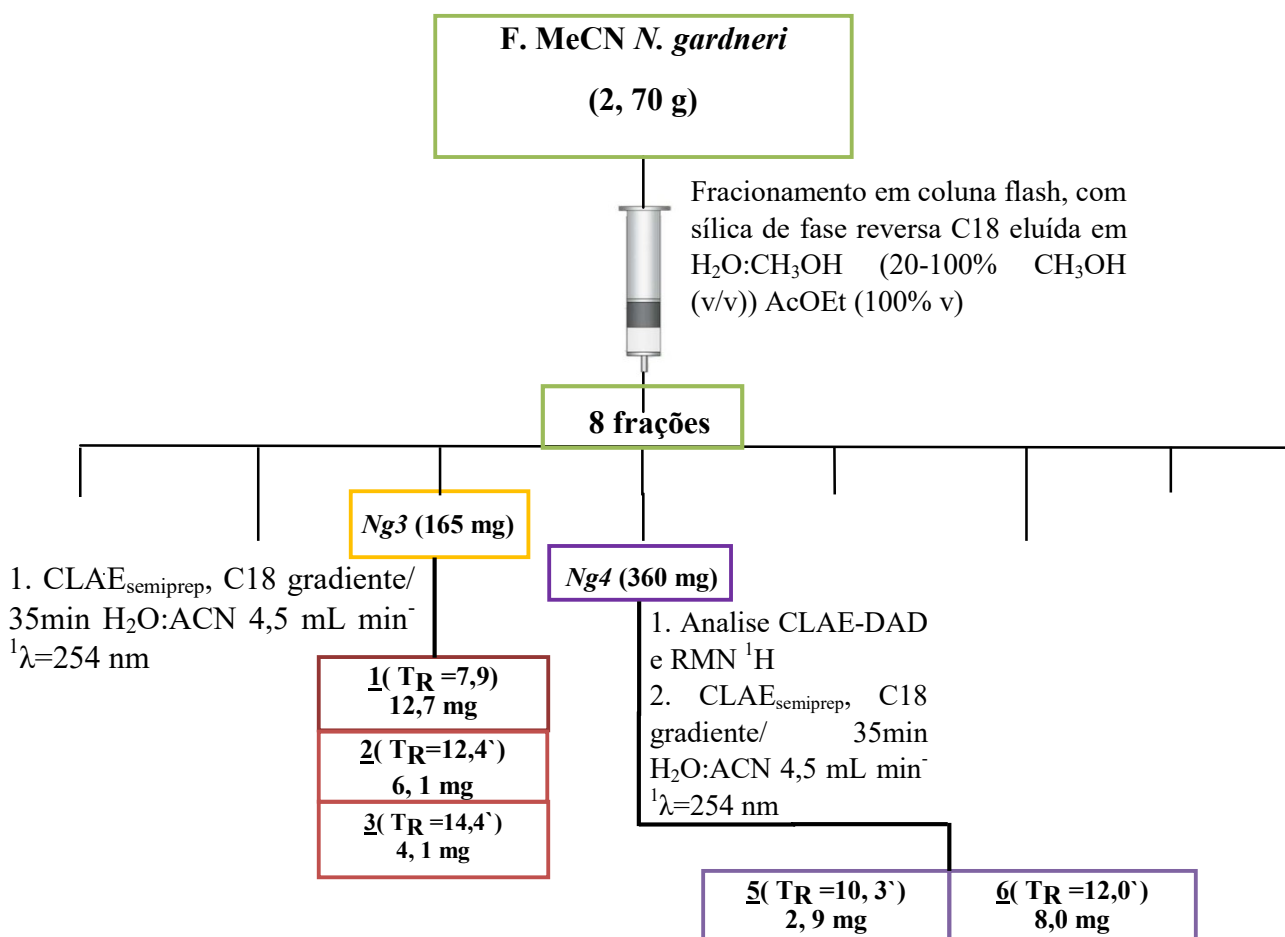
3.4.2 Subfração Ng3

A subfração Ng3 (165 mg) foi purificada por HPLC [ACN:H₂O no modo gradiente não linear 30-100% ACN em 35 min, detecção em 254 nm, e fluxo de 4,5 mL/min], obtendo-se as substâncias **1** (12,7 mg, 7,69%), **2** (6,1 mg, 3,69%), **3** (4,1 mg, 2,48%) e **4** (12,1 mg, 7,33%). De acordo com esquema geral mostrado na Figura 9.

3.4.3 Subfração Ng4

A subfração Ng4 (360 mg) foi purificada por HPLC [ACN:H₂O no modo gradiente não linear 40-100% ACN em 35 min, detecção em 254 nm, e fluxo de 4,5 mL/min], obtendo-se as substâncias **5** (8,0 mg, 2,22%) e **6** (2,9 mg, 0,80%), de acordo com esquema geral mostrado na Figura 9.

Figura 9 - Procedimento de obtenção das substâncias a partir das subfrações Ng3 e Ng4



As análises por cromatografia CLAE-DAD e análises de RMN e espectroscopia de massas foram realizadas no Laboratório - NuBBE - Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia (Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”-Araraquara-SP).

As análises espectroscópicas na região do infravermelho (IV) foram realizadas no Laboratório de Geoquímica Orgânica (LAGO)

3.5 Atividade Antifúngica

Os ensaios antifúngicos foram realizados no Laboratório de Bioensaios do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Programa de Pós-graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará – UFC.

Para a análise de inibição de crescimento dos fungos do gênero *Candida*, foram utilizadas, no bioensaio, células de leveduras (*C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. tropicalis*) as quais foram cultivadas em meio caldo batata-dextrose (pH 5,1) por 24 horas. Após este período, uma alíquota de cada inóculo foi transferida para placas contendo meio ágar batata-dextrose e, então, cultivada por 24 horas. Posteriormente, foram preparadas suspensões iniciais de cada inóculo em NaCl 0,15 mol/L até atingir o ponto 0,5 da escala de McFarland. As suspensões foram então diluídas 1000 vezes para obtenção de inóculos finais em uma faixa de 0,5 a $2,5 \times 10^3$ UFC/mL. Uma alíquota de 100 μ L de cada suspensão foi aplicada nos poços contendo 50 μ L de solução de Nistatina em diferentes concentrações e 50 μ L de meio caldo batata dextrose em concentração equivalente à 4 vezes aquela recomendada pelo fabricante. Para realização do bioensaio, a amostra foi analisada nas seguintes concentrações: (2 mg/mL; 1 mg/mL ; 0,50 mg/mL; 0,25 mg/mL e 0,12 mg/mL).

As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas e a avaliação do crescimento das leveduras foi realizada nos tempos 0 e 24 horas após o início da incubação. O crescimento das células foi mensurado em absorbância 620 nm. A Concentração Inibitória Mínima (CIM₅₀) foi definida como sendo a menor concentração da amostra capaz de produzir inibição de 50% no crescimento das leveduras.

3.6 Avaliação da atividade antiparasitária em adultos de *Schistosoma mansoni*

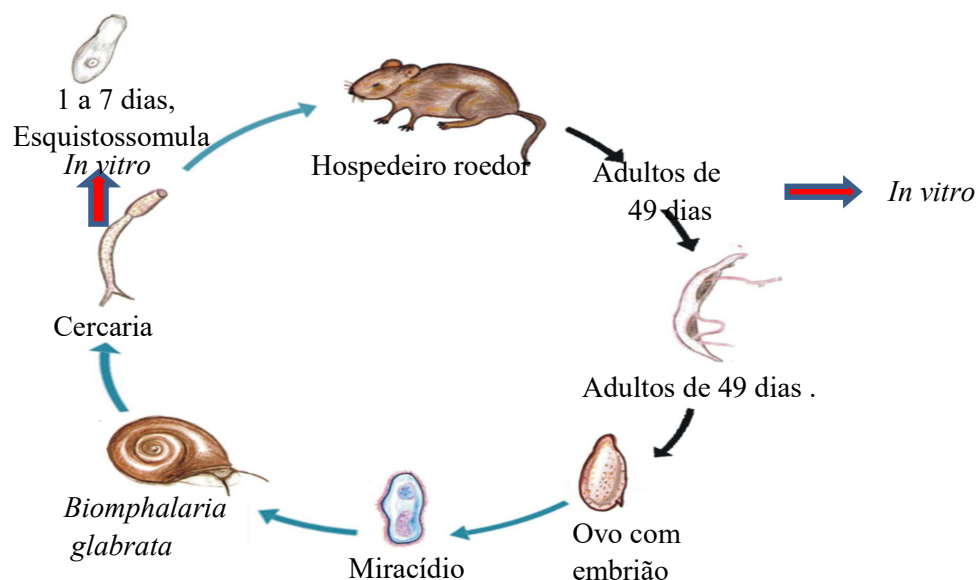
3.6.1 Manutenção do ciclo evolutivo de *S. mansoni*

Este estudo foi realizado no Núcleo de Pesquisa em Doenças Negligenciadas da Universidade Guarulhos (Guarulhos, SP). As amostras foram identificadas e armazenadas em temperatura ambiente ao abrigo da luz até a realização dos testes.

O *Schistosoma mansoni* Sambom, 1907 (linhagem BH) é rotineiramente mantido na Universidade Guarulhos (Guarulhos, SP), como descrito por Moraes (2012). Os parasitas foram mantidos em caramujos *Biomphalaria glabrata* Say, 1818 (hospedeiro intermediário), e camundongos *Mus musculus* Linnaeus, 1758 (hospedeiro definitivo). O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Guarulhos (Protocolo 031/17).

Para este teste, é necessária a manutenção do ciclo de vida de *S. mansoni* ilustrando os pontos de coleta para estudos quimioterápicos *in vitro*, de acordo com a Figura 10.

Figura 10 - Ciclo de vida de *S. mansoni* ilustrando os pontos de coleta para estudos quimioterápicos *in vitro*. Seta preta: maturação do parasita no hospedeiro final. Seta azul: fase aquática



Adaptado de Moraes, 2012.

3.6.2 Ensaio *in vitro* com vermes adultos

Após 49 dias de infecção, os parasitas retirados por perfusão portal foram lavados 2 vezes com o meio de cultura "Roswell Memorial Park Institute" (RPMI 1640), suplementado com 10% de soro fetal bovino, contendo 200 UI/mL de penicilina e 200 µg/mL de estreptomicina, e mantidos a 37 °C, 5% de CO₂ (MORAES et al., 2014). Para a realização dos ensaios *in vitro*, pares de adultos de *S. mansoni* acasalados foram transferidos em placas para

OLIVEIRA, M. D. A, 2018.

cultura de células com 24 poços contendo, por poço, 1 casal de vermes em 2 mL do meio RPMI 1640 contendo antibióticos, conforme supramencionado.

As amostras, previamente solubilizadas em dimetilsulfóxido (DMSO), foram adicionadas às culturas nas concentrações de 50 µg/mL (fração e subfrações). Praziquantel 3 µM foi utilizado como controle positivo e poços contendo somente meio de cultura e DMSO 0,5% (v/v) foram usados como controle negativo. Os helmintos foram incubados em estufa (Estufa de CO₂ para Cultivo Celular), a 37 °C, 5% de CO₂ e monitorados por 72 horas com o auxílio de um microscópio invertido e um estereomicroscópio. Para avaliar a toxicidade das amostras sobre o *S. mansoni*, foram considerados os seguintes parâmetros: viabilidade, mortalidade, alterações morfológicas no tegumento e a capacidade reprodutiva (MAFUD et al., 2016; MORAES et al., 2014).



RESULTADOS E DISCUSSÃO

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise da fração hexânica do cogumelo *Neonothopanus gardneri*

Os metabólitos das frações hexânicas geralmente são encontrados em misturas de difícil separação e elucidação estrutural. A identificação destas substâncias pode então ser realizada por CG-EM, pois este permite a identificação rápida de grande quantidade de constituintes sem a necessidade de isolar estas substâncias em escala preparativa. A amostra foi submetida à sililação antes da análise

A reação de derivatização com MSTFA é também chamada de sililação por acrescentar um grupo trimetilsilil ao composto em análise tornando o composto menos polar e termicamente mais estável, permitindo a análise por CG-EM (KNAPP, 1979).

A identificação das substâncias obtidas da amostra de *N. gardneri* foi realizada a partir da comparação dos tempos de retenção, considerando-se percentuais de similaridade de no mínimo 85% e comparação dos espectros de massas obtidos para cada pico na análise por CG-EM com aqueles das bibliotecas NIST e WILEY, por meio do software GCMS solutions.

O cromatograma apresentado na Figura 11 foi obtido para a fração hexânica (fração Hex sililada) de *N. gardneri*. A Tabela 3 correlaciona o índice de retenção (IR) com as estruturas identificadas. Os dados do cromatograma da Figura 11 permitiram identificar **8** substâncias na fração hexânica.

Figura 11 - Cromatograma de íons totais da fração Hex sililada

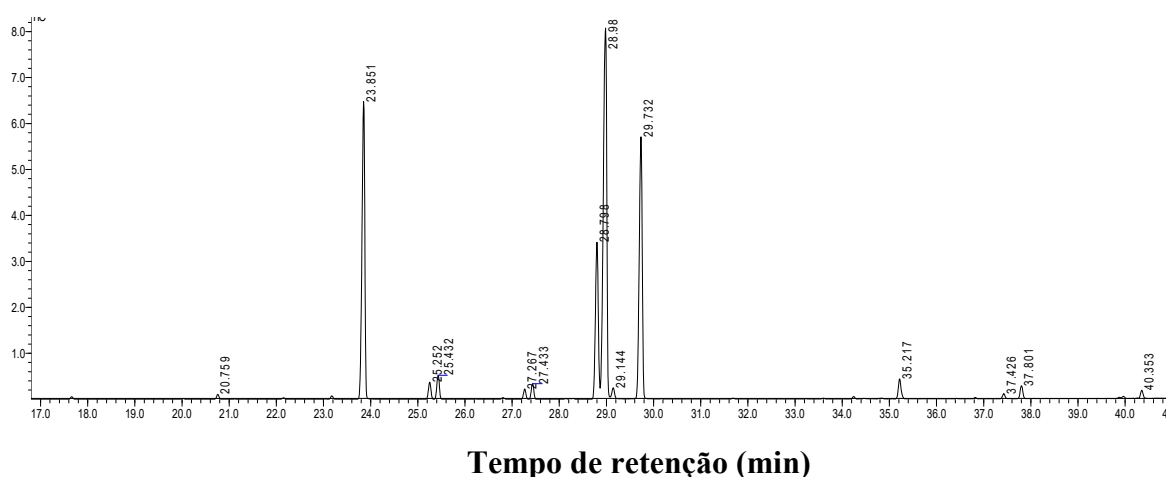
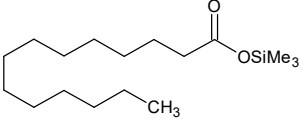
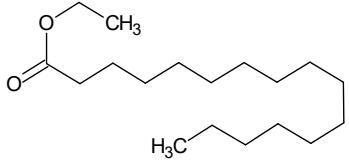
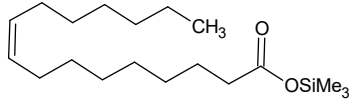
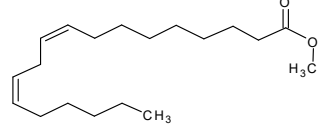
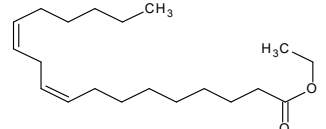
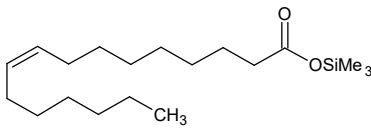
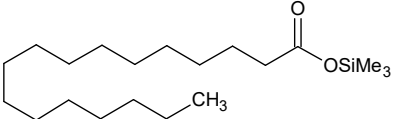
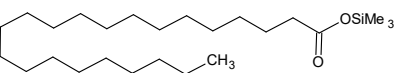


Tabela 3-Identificação das substâncias encontradas na fração Hex de *N. gardneri* após siliilação

Tr (min)	Constituinte	Área (%)	Estrutura	Princip. Fragmentos [m/z (X%)]
20,75	Tetradecanoato de trimetilsilila	0,27		117 (100); 73 (75); 129 (75); 75 (90); 227 (M ⁺)
22,16	Hexanoato de etila	0,25		88 (100); 101 (65); 55 (60); 73 (50); 44(51); 273(M ⁺)
23,83	Hexadec-9-enato de trimetilsilila	21,85		75 (100); 117 (76); 129 (55); 73 (90); 253 (M ⁺)
25,25	(Z, Z) - Octadeca-9,12-dienoato de metila	1,09		81 (100); 95 (75); 131 (23); 79 (55); 279 (M ⁺)
27,27	(Z, Z) - Octadeca-9,12-decanoato de etila	11,63		81 (100); 95 (75); 262(23); 79 (55); 307 (M ⁺)
28,95	(Z) - Octadec-9-enoato de trimetilsilila	33,19		117 (100); 75 (66); 129 (55); 73 (90); 281 (M ⁺)
35,21	Eicosanoato de trimetilsilila	1,43		117 (100); 75 (66); 129 (55); 73 (65); 281 (M ⁺)
40,36	Docosanoato de trimetilsilila	0,51		117 (100); 75 (66); 145 (55); 73 (90); 339 (M ⁺)
Total identificado		8		

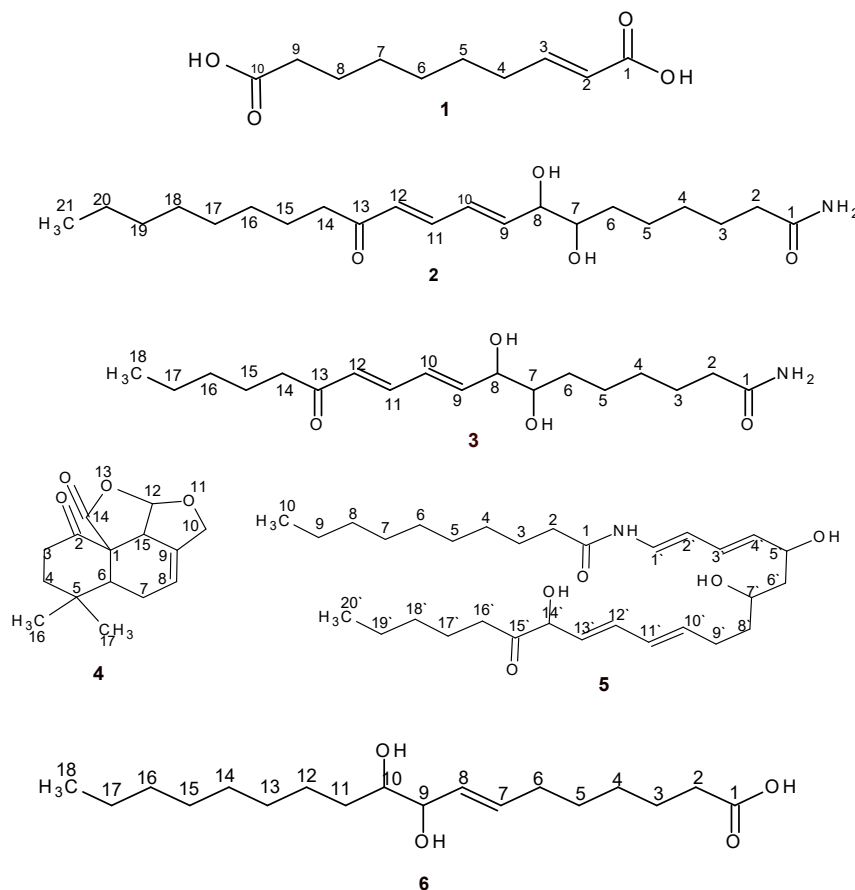
A abundância relativa (%), íon e fórmula molecular, e tempo de retenção dos compostos identificados na fração hexânica por análise de CG-EM são mostrados na Tabela 3. A identificação dos compostos foi realizada utilizando a interpretação dos espectros de massas íon molecular $[M^+]$ e pico base em comparação com os espectros de massas dos compostos isolados, nas bibliotecas computacionais e literatura como supramencionado.

4.2 Determinação estrutural das substâncias isoladas da fração acetonitrila de *Neonothopanus gardneri*

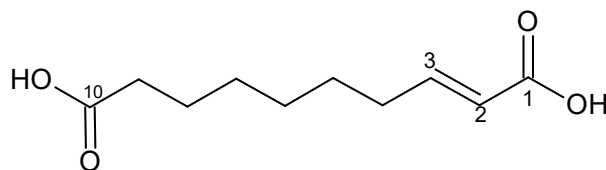
O estudo químico da fração acetonitrila do cogumelo bioluminescente *N. gardneri* resultou no isolamento e identificação de 6 substâncias (Figura 12).

As substâncias **1**, **2**, **3** e **4** foram isoladas da subfração Ng3, e **5** e **6** em Ng4. Todas as substâncias são inéditas na espécie *N. gardneri* e as substâncias **2**, **3**, **5** e **6** são inéditas na literatura. A determinação estrutural das substâncias foi efetuada com base nas análises dos dados espectrométricos de RMN de ^1H e de ^{13}C uni e bidimensionais (HSQC, HMBC, COSY, TOCSY- 1D), EM-MS, IV, UV-Vis e comparação com a literatura.

Figura 12 - Substâncias isoladas das subfrações Ng3 e Ng4 de *N. gardneri*



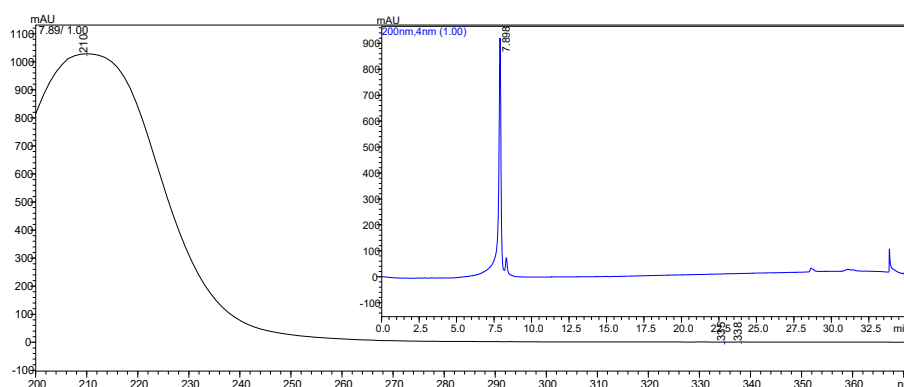
4.2.1 Determinação estrutural da substância ácido (2E)-dec-2-en-1,10-dióico (1)



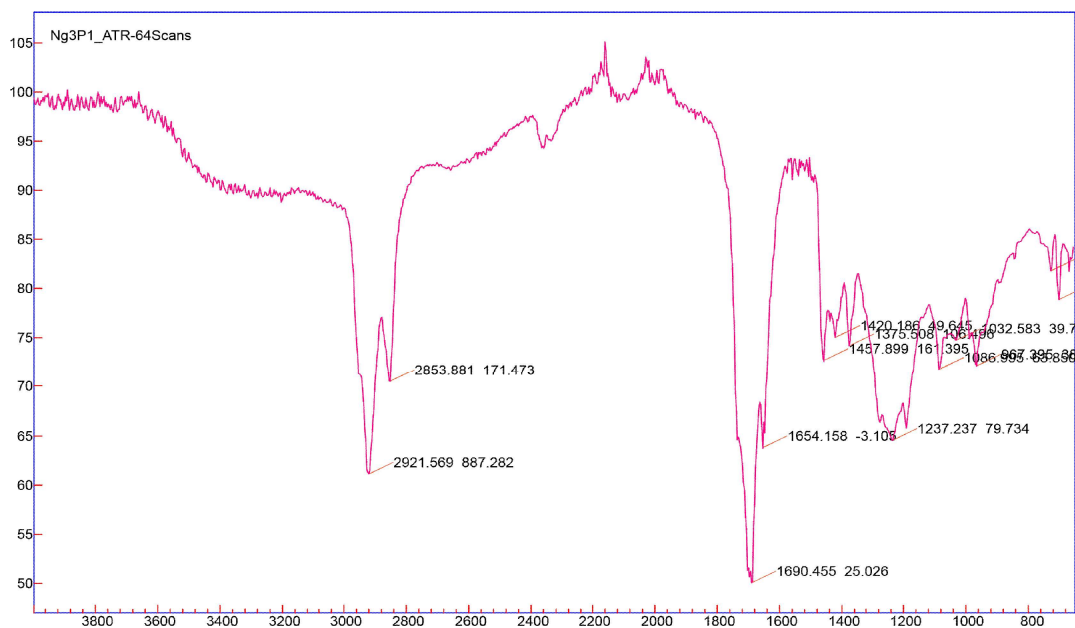
A substância **1** (12,7 mg) foi isolada a partir de análise por CLAE semi preparativo descrito na seção 3.4.2. O espectro de massas (Figura 23) de alta resolução EM-IES (+) (espectrometria de massas com ionização por "*electrospray*" no modo positivo) da substância **1** apresentou picos em m/z 201,1122 $[M+H]^+$ e m/z 423,1999 $[2M+Na]^+$ para molécula ionizada. As análises dos espectros de massas de alta resolução EM-IES (+) e RMN ^{13}C indicaram a fórmula molecular $C_{10}H_{16}O_4$, com IDH igual a 3, correspondendo a duas carbonilas e uma ligação dupla.

Por meio da análise de CLAE-DAD da substância **1** foi obtido o cromatograma analítico (Figura 13) e o espectro de absorção na região do ultravioleta (Figura 13) que apresentou absorção máxima em λ_{max} 210 nm correspondendo a conjugação entre o sistema olefínico e a carbonila do ácido.

Figura 13 - Espectro na região do UV registrado em 200 nm e cromatograma analítico em CLAE-DAD da substância **1**



O espectro na região do infravermelho IV (Figura 14) mostrou absorção em 3400 cm^{-1} correspondente a grupos hidroxilas e dois estiramentos, um em 1650 cm^{-1} , sendo atribuída a ligação $C=O$ α, β insaturada, e em 1690 cm^{-1} , referente à ligação $C=O$ da carbonila dez. Foram observados também estiramentos bem definidos em 2921 e 2853 cm^{-1} correspondentes às ligações $C-H$ de carbonos sp^3 .

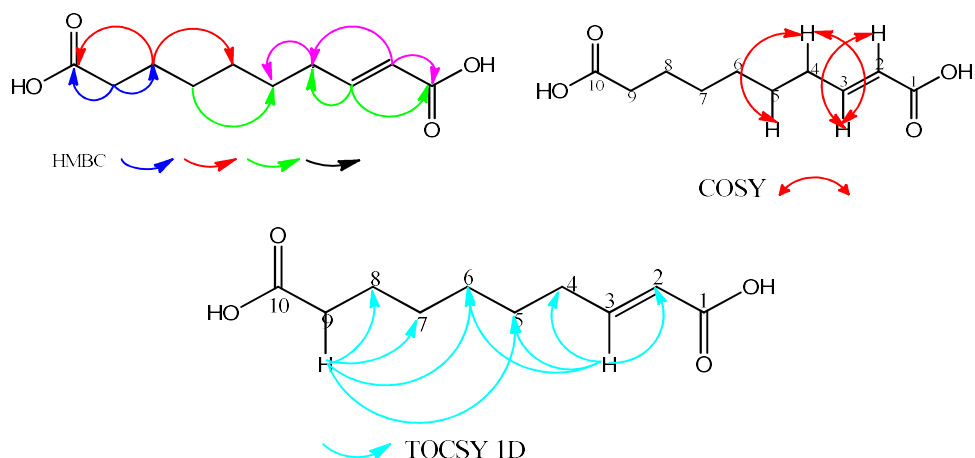
Figura 14 - Espectro na região do IV da substância **1**

O espectro de RMN de ^1H , ^{13}C (Figuras 16 e 17) e HSQC (Figura 18) de **1** apresentou dois duplos tripletos em δ 5,82 (dt, $J = 15,5, 1,6$ Hz, 1H; H-2) e δ 6,97 (dt, $J = 15,5, 7,0$ Hz, 1H; H-3) atribuídos aos hidrogênios olefínico. Adicionalmente, foram observados um tripleto e um multipeto em δ 2,28 (t, $J = 7,4$ Hz, 2H; H-9) e δ 2,25 (m, 2H; H-4), atribuídos aos hidrogênios metilênicos alfa carbonila e hidrogênio alílico, respectivamente. Foram observados também três multipletos em δ 1,39 (m, 2H; H-6); δ 1,34 (m, 2H; H-7); δ 1,63 (m, 2H; H-8) e um tripleto de dupeto de dupeto em δ 1,47 (tdd, $J = 8,4; 7,7; 4,7$ Hz, 2H; H-5), atribuídos aos demais hidrogênios.

Através do experimento de gHMBC (Figura 19), foram atribuídos os deslocamentos químicos das duas carboxilas em δ 176,2 e δ 168,7 (Tabela 4). Adicionalmente, no mapa de contorno de gHMBC, foi possível observar as correlações entre H-8 e H-9 com C-10 (δ 176,2) e H-8 com C-9 (δ 33,4) e C-7 (δ 28,5). A correlação do H-3 com os C-1 (δ 168,7), C-4 (δ 31,6) e C-5 (δ 27,6) e correlações do H-2 com C-1 e C-4 confirmaram a ligação dupla α ao carbono C-1. Ainda no gHMBC foram observadas as correlações do H-5 com C-4 (δ 31,6) e C-6 (δ 28,5) e H-6 com C-7 (28,5).

A análise do experimento de gCOSY (Figura 20) evidenciou a correlações entre H-7, H-8 e H-9 e entre H-2 e H-4. Através do experimento de TOCSY 1D (Figura 21 e 22), foi possível observar interações comuns entre os hidrogênios H-2, H-3, H-4, H-6 e H-8. Algumas correlações de gHMBC e gCOSY da Tabela 4 estão mostrados na Figura 15.

Figura 15 - Principais correlações gHMBC, gCOSY e interações de TOCSY da substância 1

Tabela 4 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C do ácido (2E)-dec-2-en-1,10-dióico (**1**) em CD_3OD , δ (Multiplicidade, J em Hz)

C	Substância (1)				
	δ $^1\text{H}^*$	δ ^1H , multip, J em Hz	δ $^{13}\text{C}^*$	Multip.	gHMBC (H \rightarrow C) gCOSY
1	-	-	168,74	C	
2	5,79	dt, $J = 15,5; 1,6$ Hz	121,13	CH	C-1
3	6,97	dt, $J = 15,5; 7,0$ Hz	149,71	CH	C-1 H-4/ H-2
4	2,25	m	31,63	CH_2	C-3/C-2
5	1,47	td, $J = 8,4; 7,7; 4,7$ Hz	27,65	CH_2	C-3 H-4
6	1,39	m	28,54	CH_2	C-7
7	1,34	m	28,52	CH_2	
8	1,63	m	24,56	CH_2	C-7/C-9/C-10
9	2,28	t, $J = 7,4$ Hz,	33,48	CH_2	C-6/C-8/C-10
10	-	-	176,24	C	

*Espectros obtidos em CD_3OD ; * valores obtidos através das projeções de carbono do HSQC e gHMBC.

Considerando as análises de IV e RMN e EM-IES (+) no modo positivo (Figura 23), observou-se que estão em concordância com as informações encontradas na literatura (CAPON et al., 2005; SOMAN et al., 2001), evidenciando que esta substância se trata do ácido (2E)-dec-2-en-1,10-dióico, que foi isolado anteriormente dos fungos *Aspergillus unilateralise* e *Verticillium lecanii*.

Figura 16 - Espectro de RMN de ^1H da substância 1 (CD_3OD , 600 MHz)

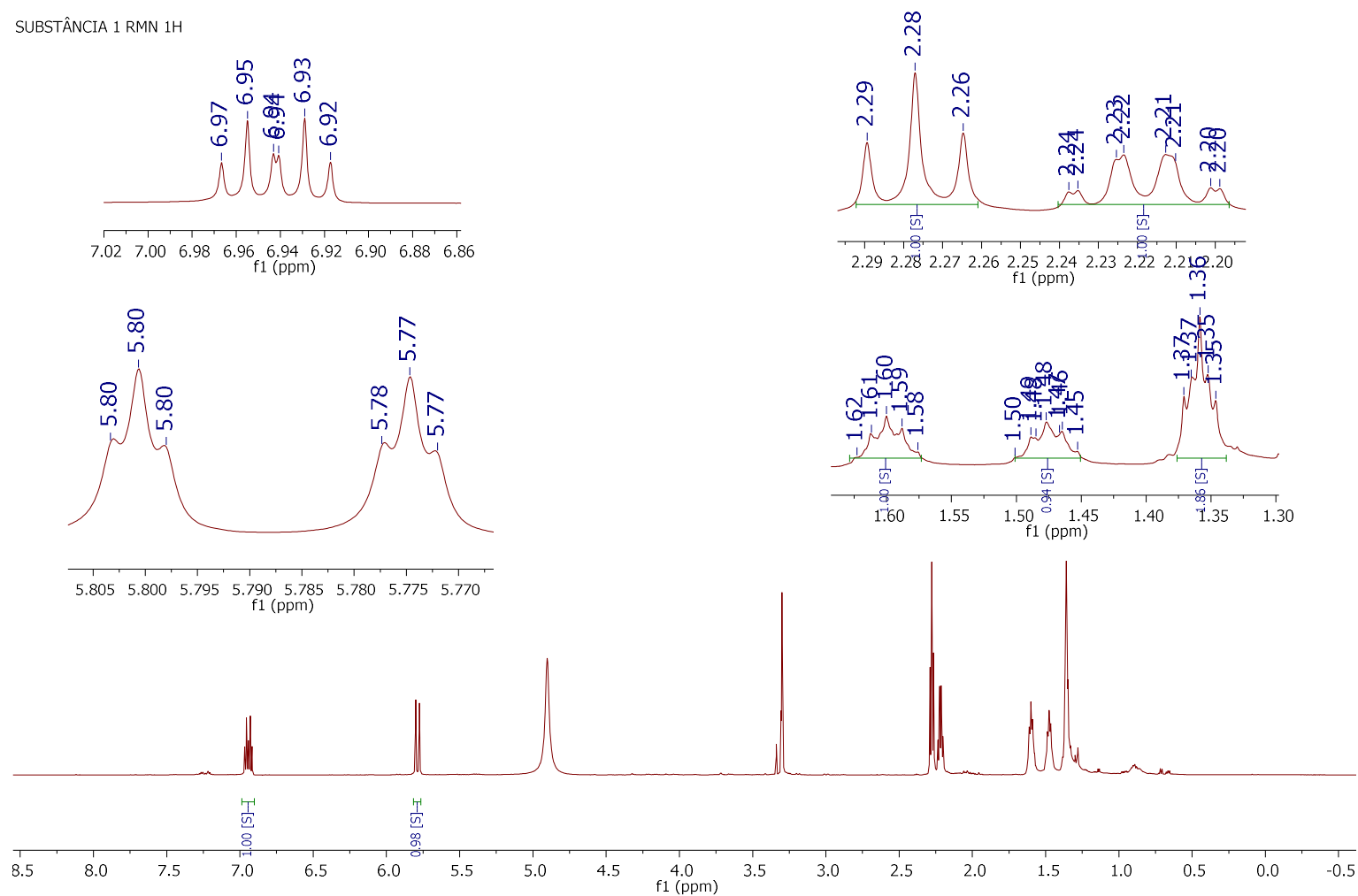


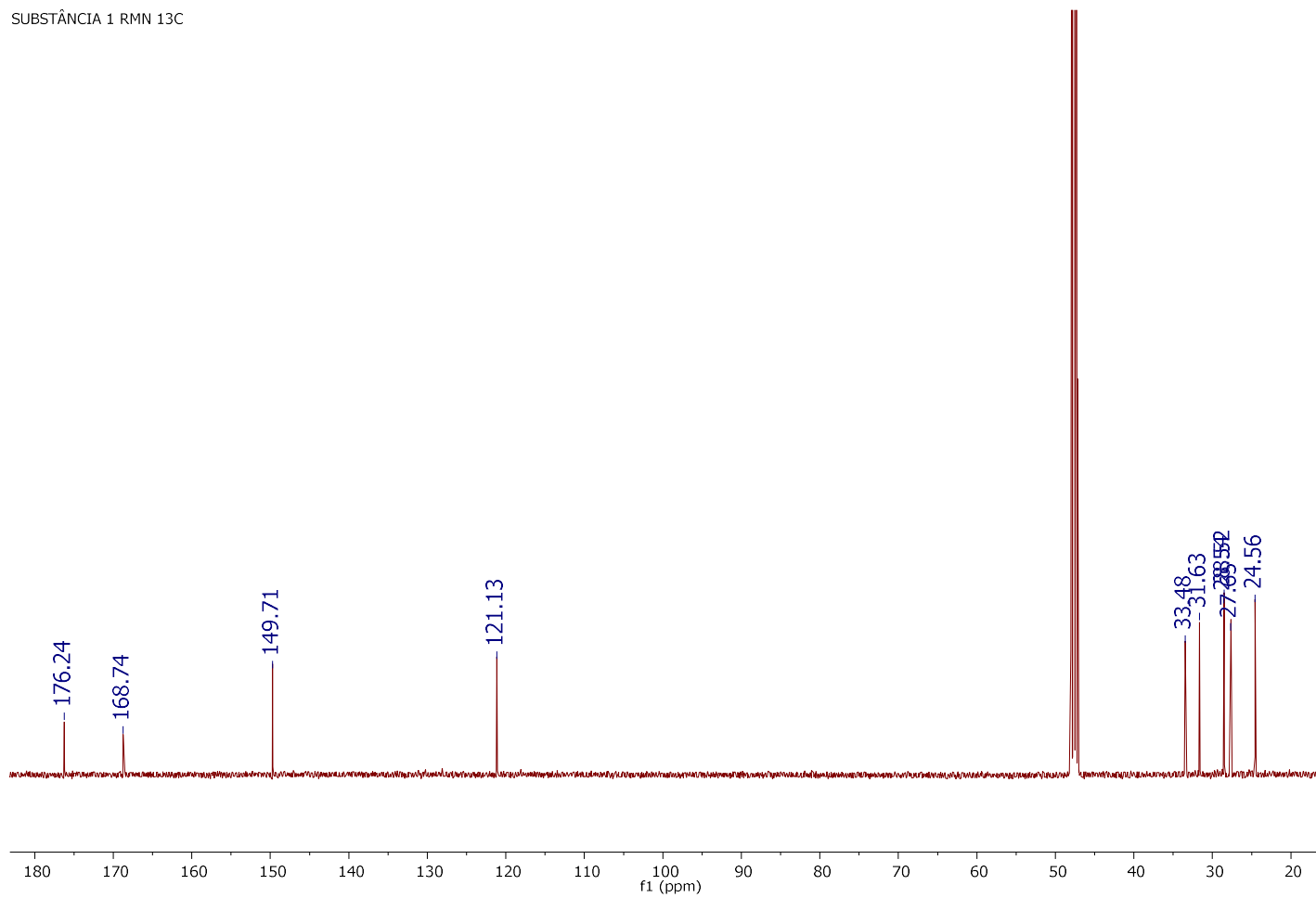
Figura 17 - Espectro de RMN de ^{13}C da substância 1 (CD_3OD , 150 MHz)

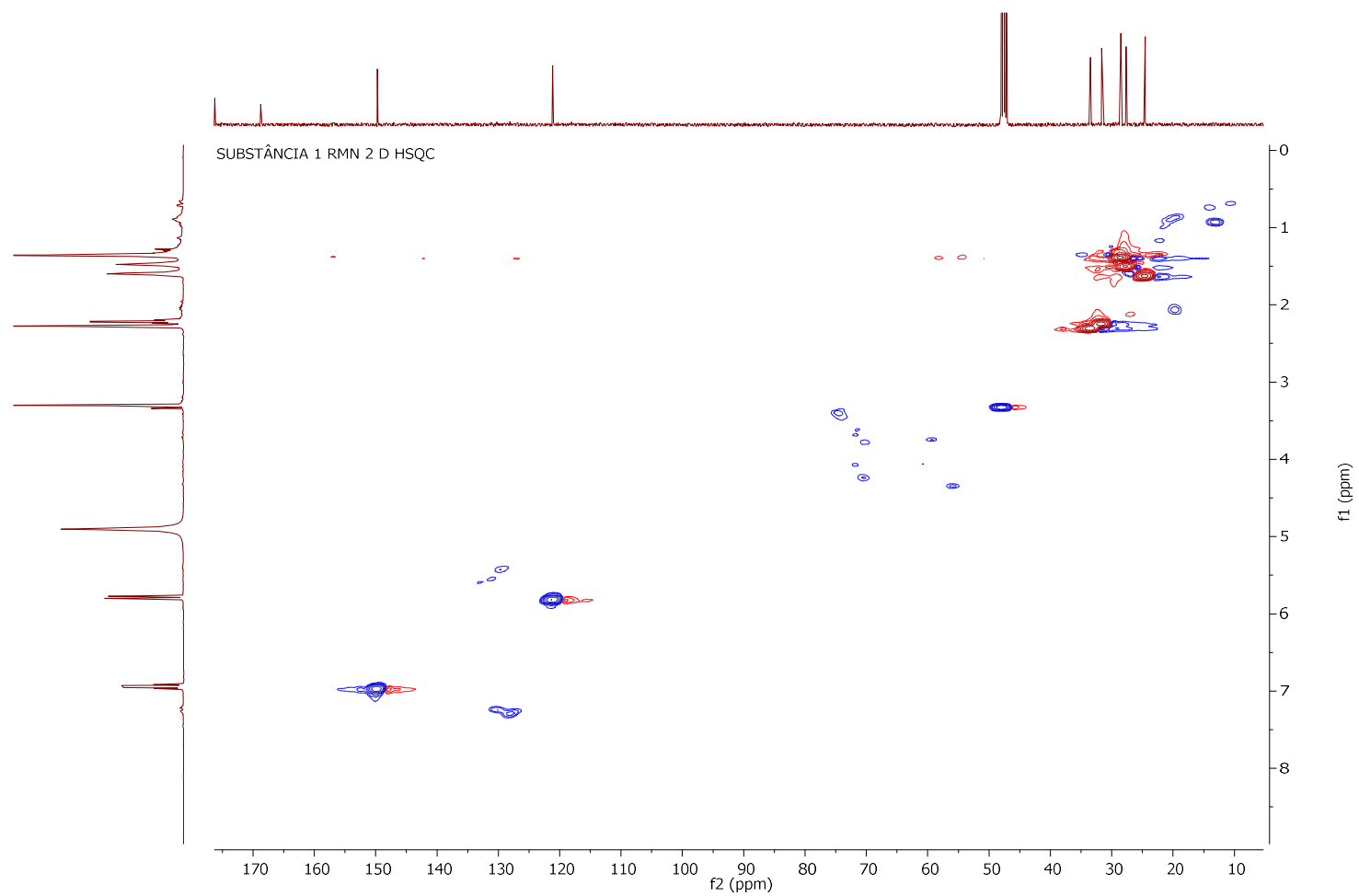
Figura 18 - Mapa de correlação H-C a uma ligação (gHSQC) da substância **1** (CD₃OD, 600 MHz)

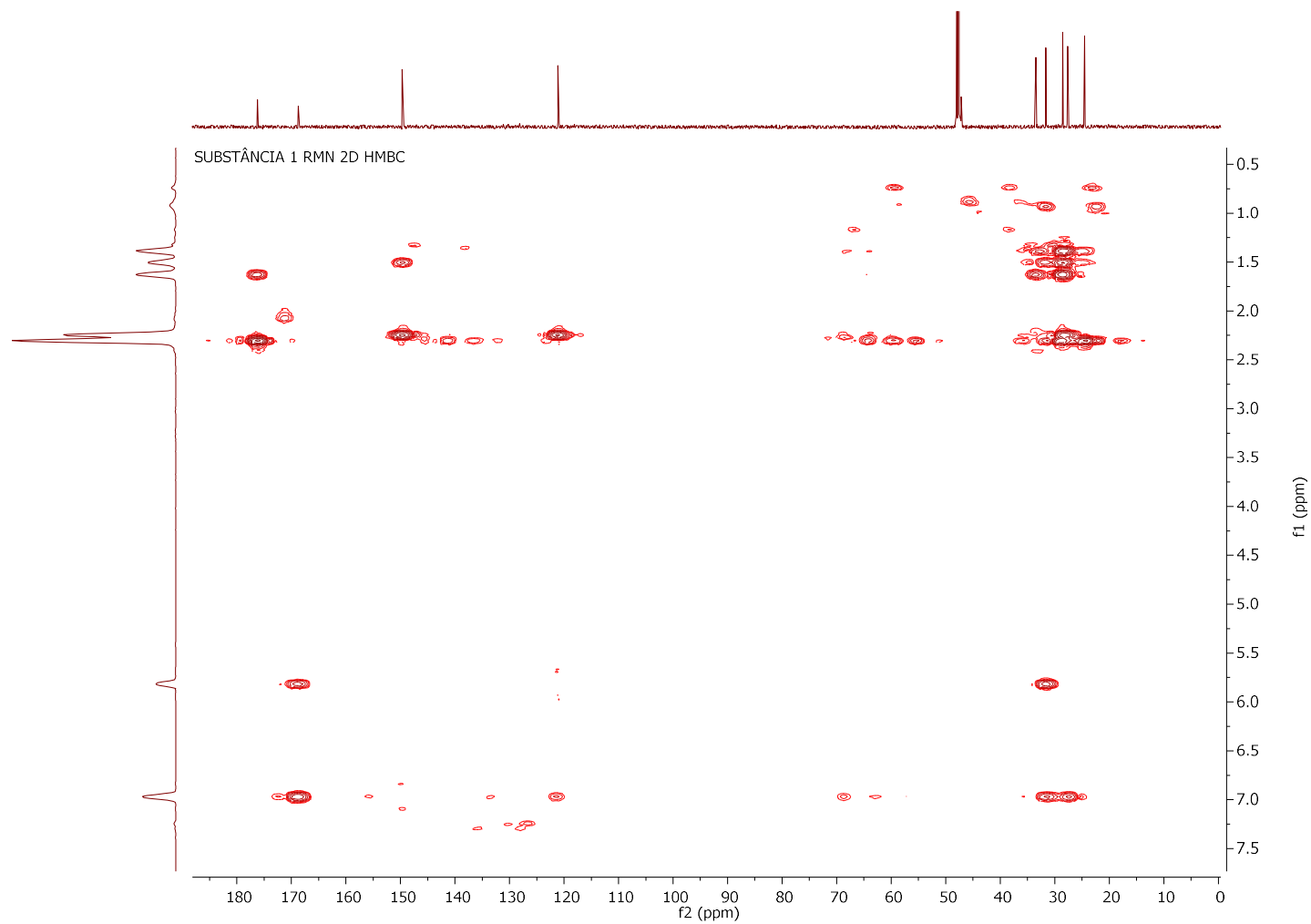
Figura 19 - Mapa de correlação H-C a longa distância (gHMBC) da substância 1 (CD₃OD, 600MHz)

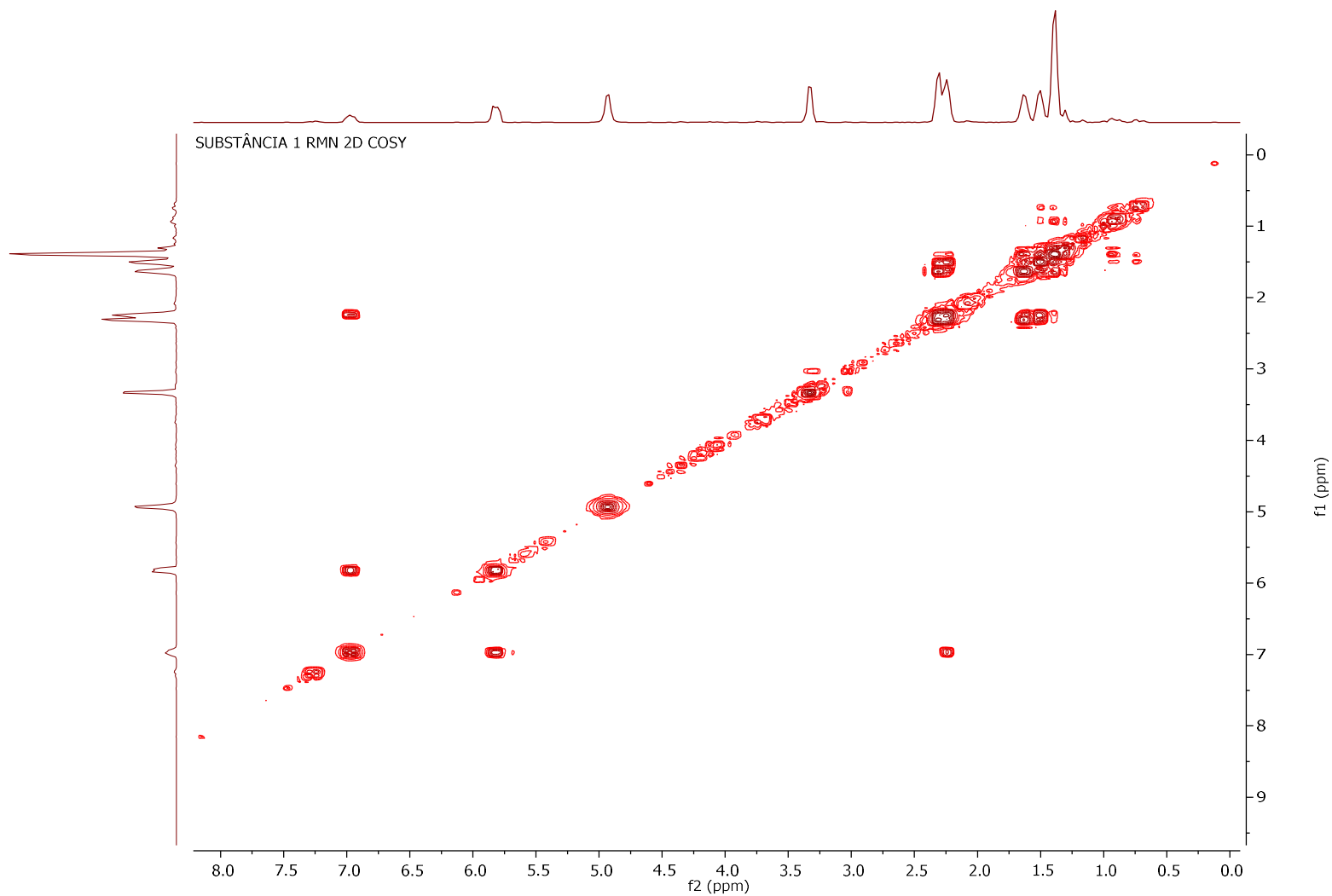
Figura 20 - Mapa de correlação gCOSY da substância 1 (CD₃OD, 600 MHz)

Figura 21 - Espectro de TOCSY-1D em 6,97 ppm da substância 1 (CD₃OD, 600 MHz)

SUBSTANCIA 1, RMN TOCSY EM 2,30 ppm

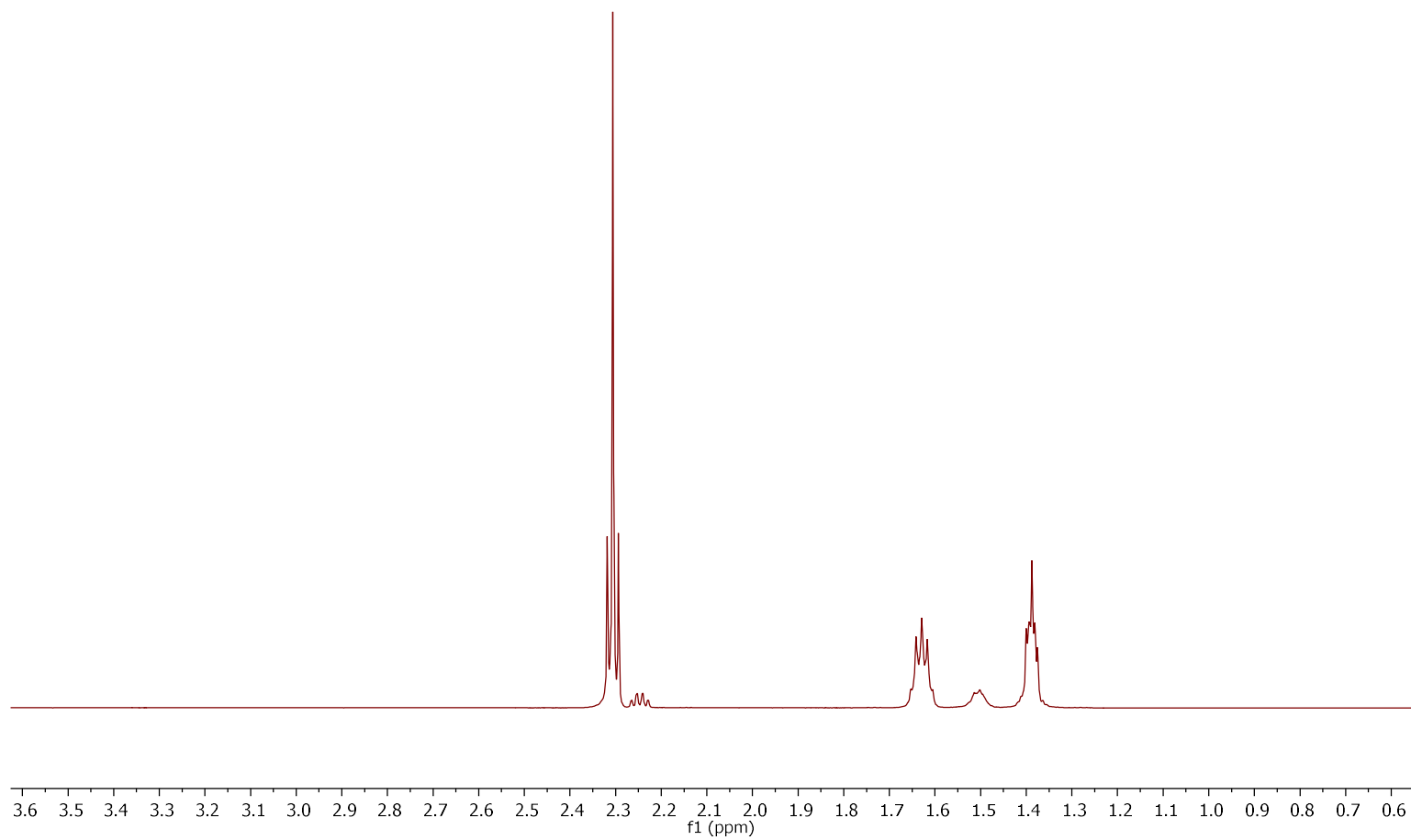


Figura 22 - Espectro de TOCSY-1D em 2,30 ppm da substância 1 (CD₃OD, 600 MHz)

SUBSTÂNCIA 1, TOCSY 1D EM 6,97 ppm

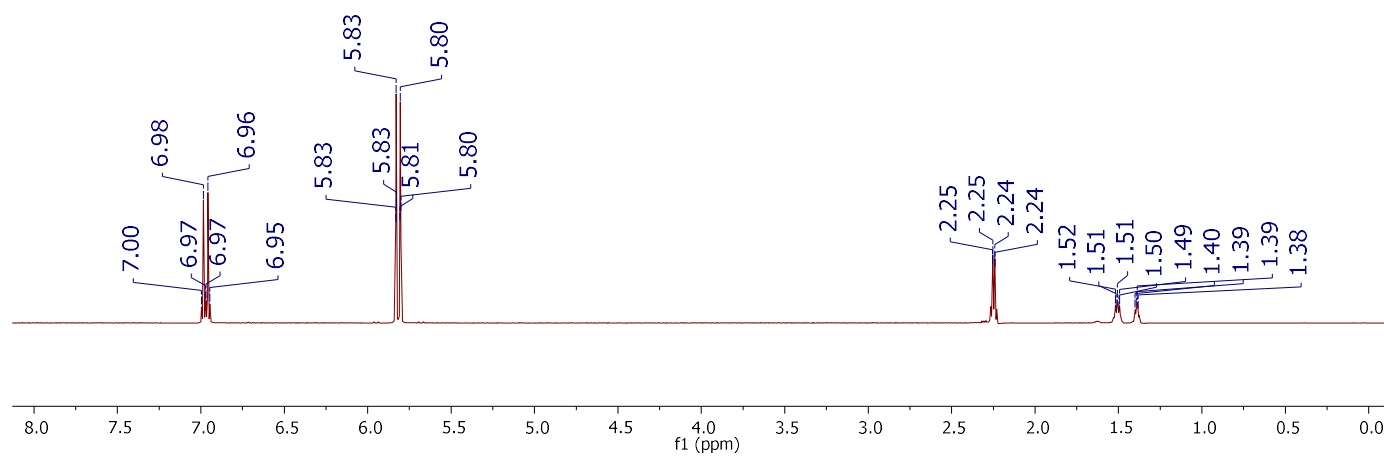
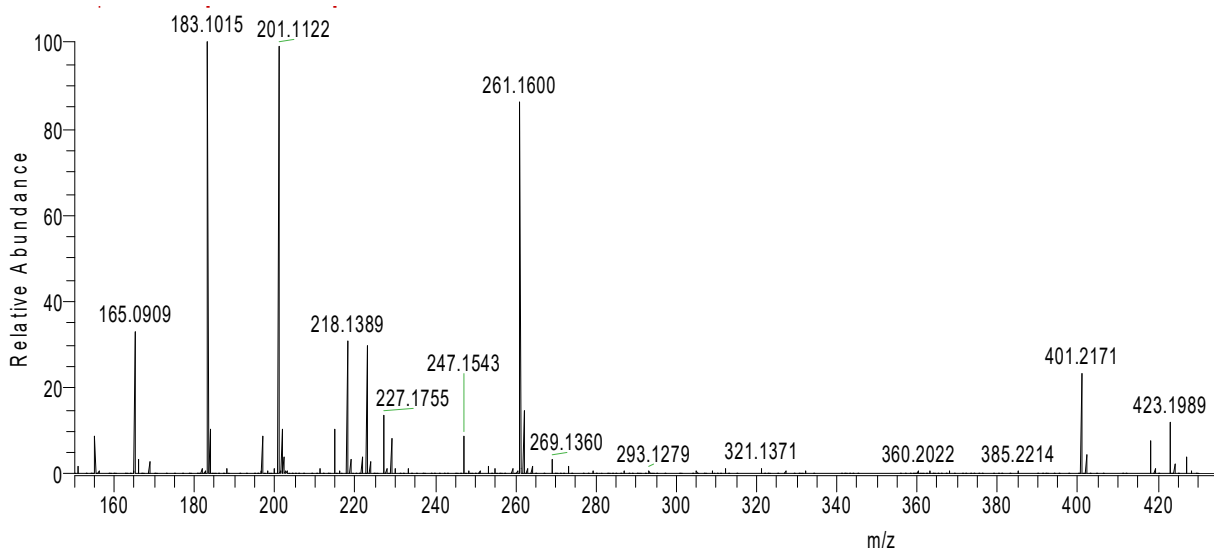
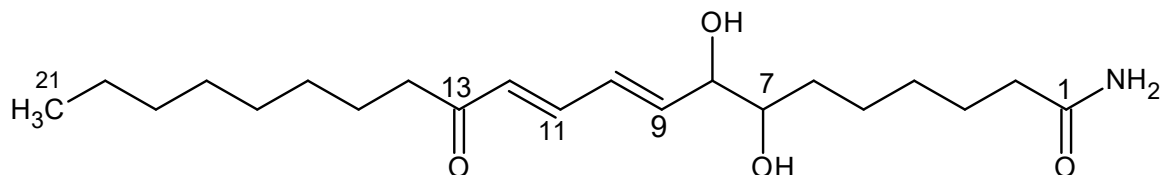


Figura 23 - Espectro de massas EM-IES (+) da molécula protonada em m/z 201,1122 $[M+H]^+$, m/z 401,2171 $[2M+H]^+$ e um aduto de sódio m/z 423,1989 $[2M+Na]^+$ da substância **1**



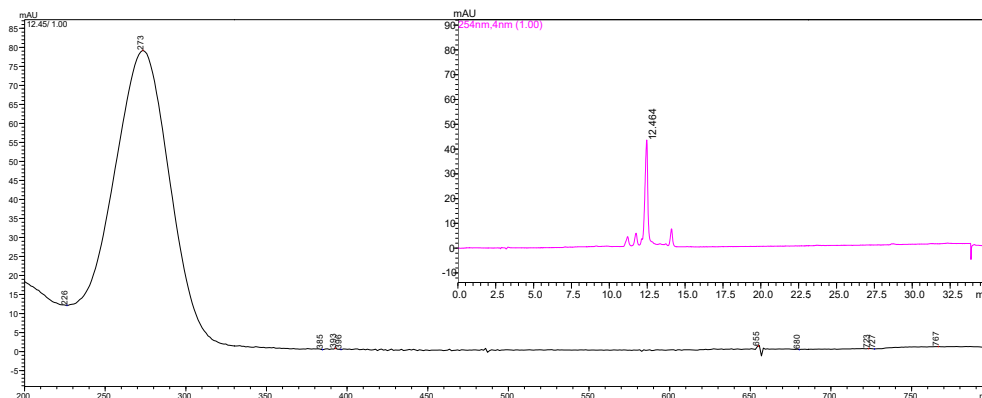
4.2.2 Determinação estrutural da substância (*9E, 11E*) - 7,8-di-hidroxi-13-oxo-heneicosa-9,11-dienamida (**2**)



A substância **2** (6,1 mg) foi obtida como um óleo amarelo claro. A análise dos dados de EM-IES no modo positivo (+) (Figura 37 e 38) indicou o pico íon pseudomolecular em m/z 369,2271 $[M+2H]^{++}$ e pico do íon molecular em m/z 367,2097 Da correspondente à fórmula $[C_{21}H_{37}NO_4]$.

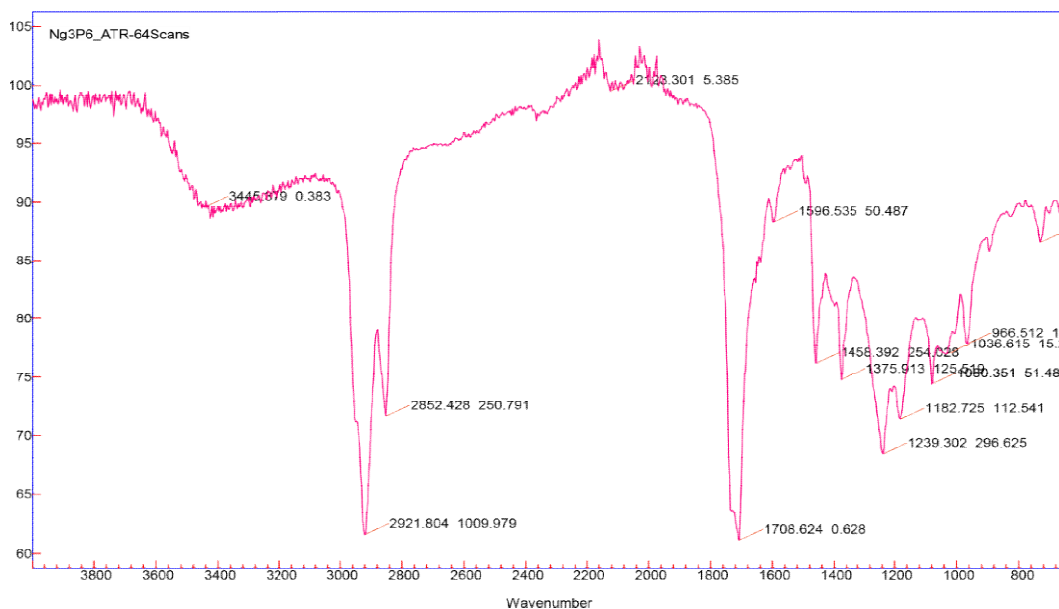
Através da análise em CLAE-DAD da substância **2** foi obtido o cromatograma analítico (Figura 24) que apresentou a pico da substância em 12,4 min, e o espectro na região do ultravioleta (Figura 24) em CH_3OH apresentou absorção máxima em λ_{max} 273 nm, característicos de enonas $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ -insaturada (PAVIA, 2001).

Figura 24 - Espectros na região do UV registrado em 254 nm e cromatograma analítico em CLAE-DAD e da substância **2**



O espectro na região do infravermelho IV (Figura 25) apresentou bandas de absorção em 3445 cm^{-1} atribuídas ao estiramento da ligação O-H da hidroxila, em 1708 cm^{-1} , estiramento atribuído à ligação C=O da carbonila cetônica e 1598 cm^{-1} , estiramento atribuído à ligação C=O da amida, e os estiramentos em 2921 e 2852 cm^{-1} atribuídos às ligações C-H de carbonos sp^3 .

Figura 25 - Espectro na região do IV da substância **2**



A análise dos espectros de RMN de ^1H , e ^{13}C (Figura 27 e 28) e o mapa de contorno do experimento gHSQC (Figura 30) permitiram visualizar um tripleto com sinal em δ 0,94 (t,

$J = 7,2$ Hz, 3H, H-21), atribuído aos hidrogênios da metila. Foram observados dois sinais hidrogênios carbinólicos δ 3,50 (ddd, $J = 8,9; 5,2; 3,3$ Hz, 1H, H-7) e δ 4,10 (t, $J = 5,6$ Hz; 1H, H-8). Quatro sinais foram atribuídos a hidrogênios olefinicos: dois duplos dupletos em δ 7,29 (dd, $J = 15,5; 10,9$ Hz; 1H; H-11) e δ 6,32 (dd, $J = 15,5; 5,9$ Hz; 1H; H-9), um duplo duplete de dupletos δ 6,49 (ddd, $J = 15,5; 10,9; 1,3$ Hz; 1H; H-10) e um duplete em δ 6,21 (d , $J = 15,5$ Hz; 1H; H-12), característicos de alcenos trans. Os dois tripletos em δ 2,63 (t, $J = 7,3$ Hz; 2H, H-14) e δ 2,29 (t; $J = 7,4$ Hz; 2H, H-2) foram atribuídos aos hidrogênios metilênicos alfa a carbonila cetônica e alfa a carbonila da amida, respectivamente. Adicionalmente foram observados dez multipletos atribuídos aos demais hidrogênios metilênicos em δ 1,49 (m; 2H, H-6) e δ 1,36 (m; 2H, H-18) e δ 1,27 (m; 2H, H-16); δ 1,63 (m; 2H, H-17) e δ 1,35 (m; 2H, H-4); e δ 1,40 (m; 2H, H-19) e δ 1,38 (m; 2H, H-3); δ 1,69 (m; 2H, H-5); δ 1,53 (m; 2H, H-15) e δ 1,34 (m; 2H, H-20).

Os espectros de RMN de ^{13}C (Figura 28) e DEPT-135 (Figura 29) associados ao experimento de gHSQC e gHMBC revelaram a existência de duas carbonilas em δ 202,4 (C-13) e δ 176,3 (C-1), seis carbonos metínicos em δ 73,9 (C-7); δ 74,5 (C-8); δ 143,8 (C-9); δ 142,7 (C-11); δ 129,0 (C-10); δ 129,0 (C-12), doze carbonos metilênicos δ 39,6 (C-14); δ 33,6 (C-6); δ 33,5 (C-2); δ 31,9 (C-19); δ 29,2 (C-16) e δ 28,5 (C-17); δ 8,5 (C-4); δ 27,8 (C-18); δ 24,6 (C-3); δ 24,4 (C-5); δ 23,9 (C-15); δ 22,3 (C-20) e um carbono metílico δ 13,0 (C-21). Todos os carbonos foram atribuídos aos respectivos átomos de hidrogênio com base nos experimentos de gHSQC.

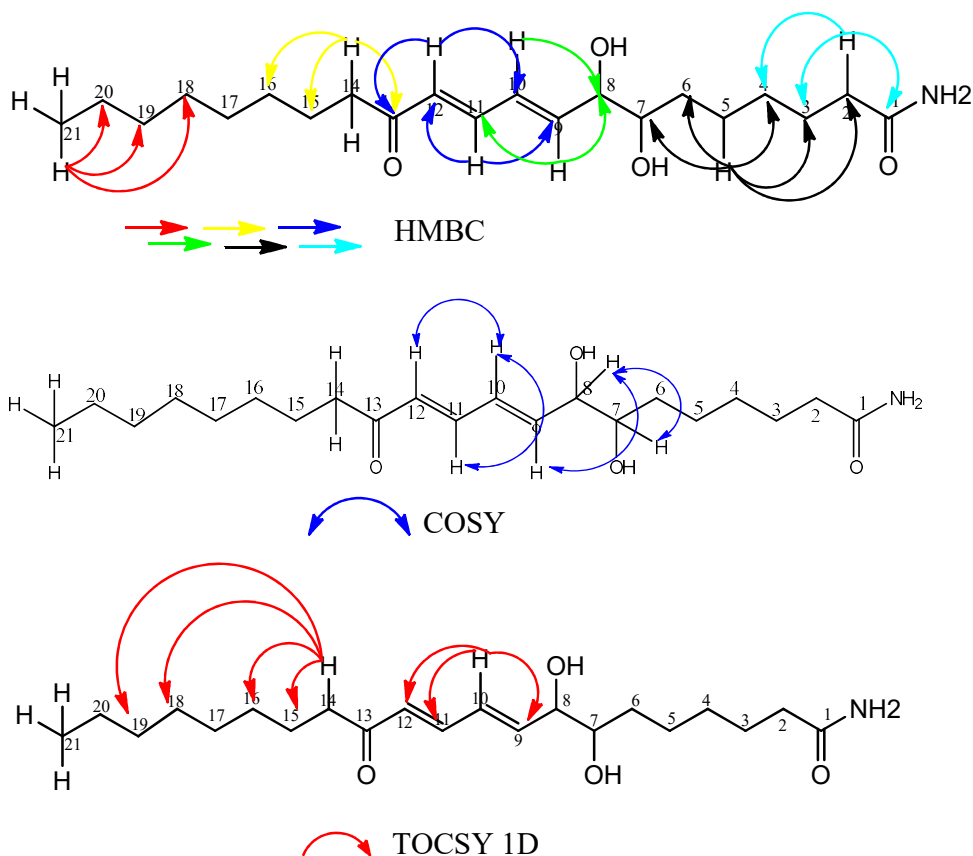
No experimento de gHMBC (Figura 31), foram observadas as correlações do H-14 com C-13 (δ 202,4), C-15 (δ 23,9) e C-16 (δ 29,2), do H-21 com C-20 (δ 22,3), C-19 (δ 27,8) e C-18 (δ 31,9), do H-19 com o C-16 (δ 29,2), do hidrogênio olefinico H-12 com os carbonos C-13 e C-10 (δ 129,0) e a correlação do H-11 com C-13 e C-9 (Tabela 5). Foram observadas também correlações em HMBC de H-2 com C-1 (δ 176,3), C-4 (δ 28,5), e C-5 (δ 24,4).

A análise do experimento de gCOSY (Figura 32) evidenciou correlações entre os hidrogênios H-10, H-11 e H-12 e entre H-8, H-7 e H-9. Estas correlações, associadas com aquelas observadas em gHMBC confirmaram a posição das ligações duplas e dos carbonos carbinólicos.

Através do experimento de TOCSY 1D (Figuras 33 e 34), pode-se observar um sistema de spin entre H-14, H-15 e H-19 a partir da irradiação em δ 2,63 e interações entre H-9, H-10, H-11 e H-12 quando irradiado em δ 6,49.

A Figura 26 apresenta as principais correlações gHMBC, COSY e interações de TOCSY da substância **2**.

Figura 26 - Principais correlações gHMBC, gCOSY e interações de TOCSY da substância **2**



Todos esses dados aliados ao espectro de massas de alta resolução no modo positivo ESI (+) (Figura 35 e 36) da substância (**2**) comprovaram a estrutura da substância com um IDH igual a 4, atribuído à duas ligações olefínicas e duas carbonilas, corroborando com os dados RMN 1D e 2D. A nomenclatura sistemática deste composto é (*9E, 11E*) - 7,8-dihidroxi-13-oxo-heneicosa-9,11-dienamida.

Tabela 5 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C de (9*E*, 11*E*) - 7,8-di-hidroxi-13-oxo-heneicosa-9,11-dienamida (2), em CD_3OD , δ (Multiplicidade, *J* em Hz)

C	Substância (2)					
	$\delta^1\text{H}$	$\delta^1\text{H}$, mult, <i>J</i> em Hz	$\delta^{13}\text{C}$	Multip.	gHMBC(H→C)	gCOSY
1	-	-	176,3	C		
2	2,29	t; <i>J</i> = 7,4 Hz	33,5	CH ₂	C-1/C-4/C-5	
3	1,38	m	24,6	CH ₂		
4	1,35	m	28,5	CH ₂		
5	1,62	m	24,4	CH ₂	C-2/C-3/C-4	
6	1,49	m	33,6	CH ₂		
7	3,50	ddd, <i>J</i> = 8,9; 5,6; 3,3 Hz	73,9	CH		H-8
8	4,10	t, <i>J</i> = 5,6 Hz	74,5	CH	C-9	H-9
9	6,32	dd, <i>J</i> = 15,5; 5,9 Hz	143,8	CH	C-11/C-8	
10	6,49	ddd, <i>J</i> = 15,5; 10,9; 1,3 Hz	129,0	CH	C-7	
11	7,29	dd, <i>J</i> = 15,5; 10,9 Hz	142,7	CH	C-13/ C-9	H-10
12	6,21	d, <i>J</i> = 15,5 Hz;	129,1	CH	C-13/C-10	H-10
13	-	-	202,4	C		
14	2,63	t, <i>J</i> = 7,3 Hz	39,6	CH ₂	C-13/C-15/C-16	
15	1,53	m	23,9	CH ₂		
16	1,27	m	29,2	CH ₂		
17	1,63	m	28,5	CH ₂		
18	1,40	m	27,8	CH ₂		
19	1,36	m	31,9	CH ₂	C-16	
20	1,34	m	22,3	CH ₂	C-17	
21	0,94	t, <i>J</i> = 7,2 Hz	13,0	CH ₃	C-20/C-19/C-18	

* Espectros obtidos em MeOD; * valores obtidos através das projeções de carbono do HSQC e HMBC.

Figura 27 - Espectro de RMN de ^1H da substância **2** (CD_3OD , 600 MHz)

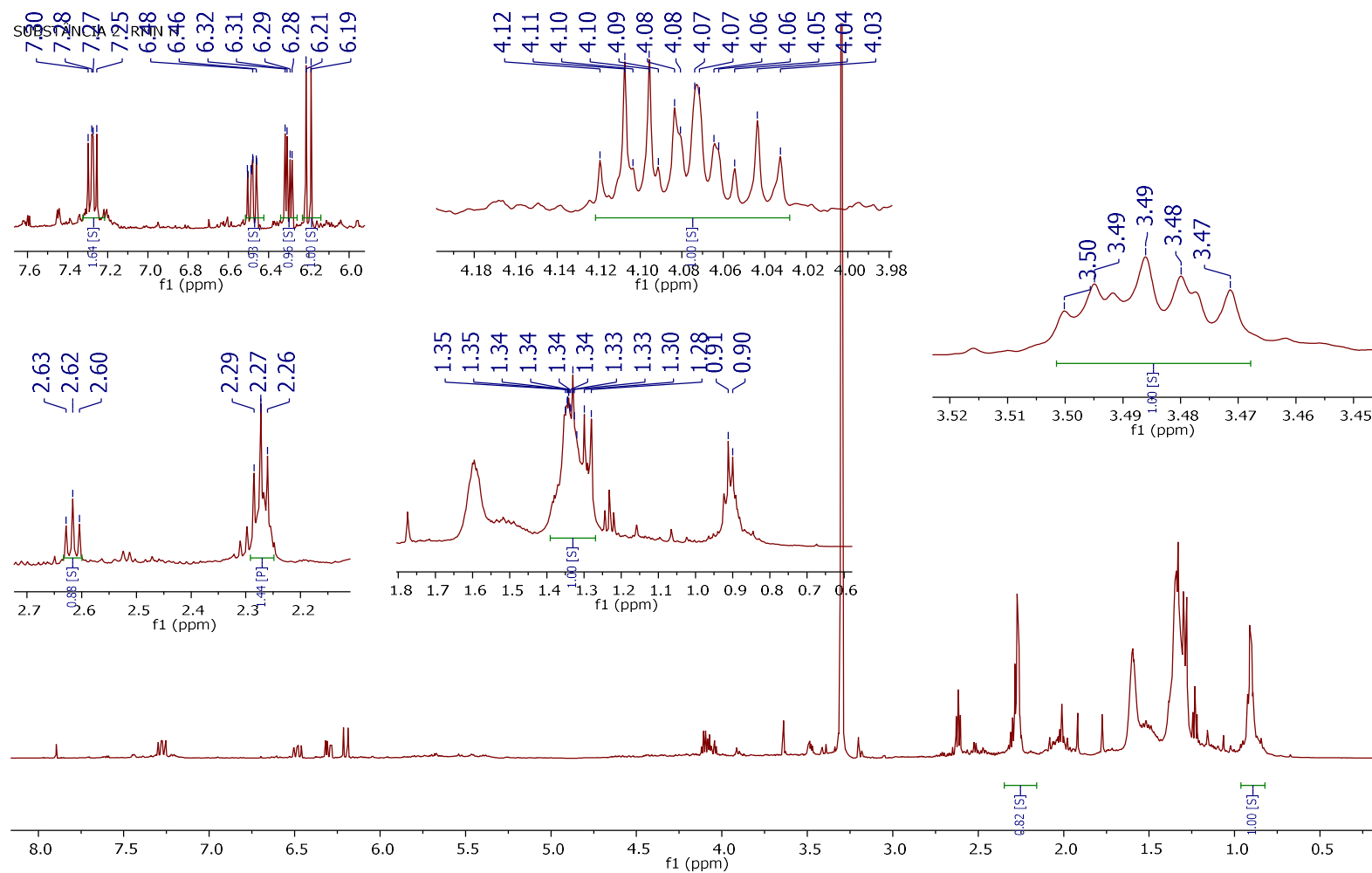


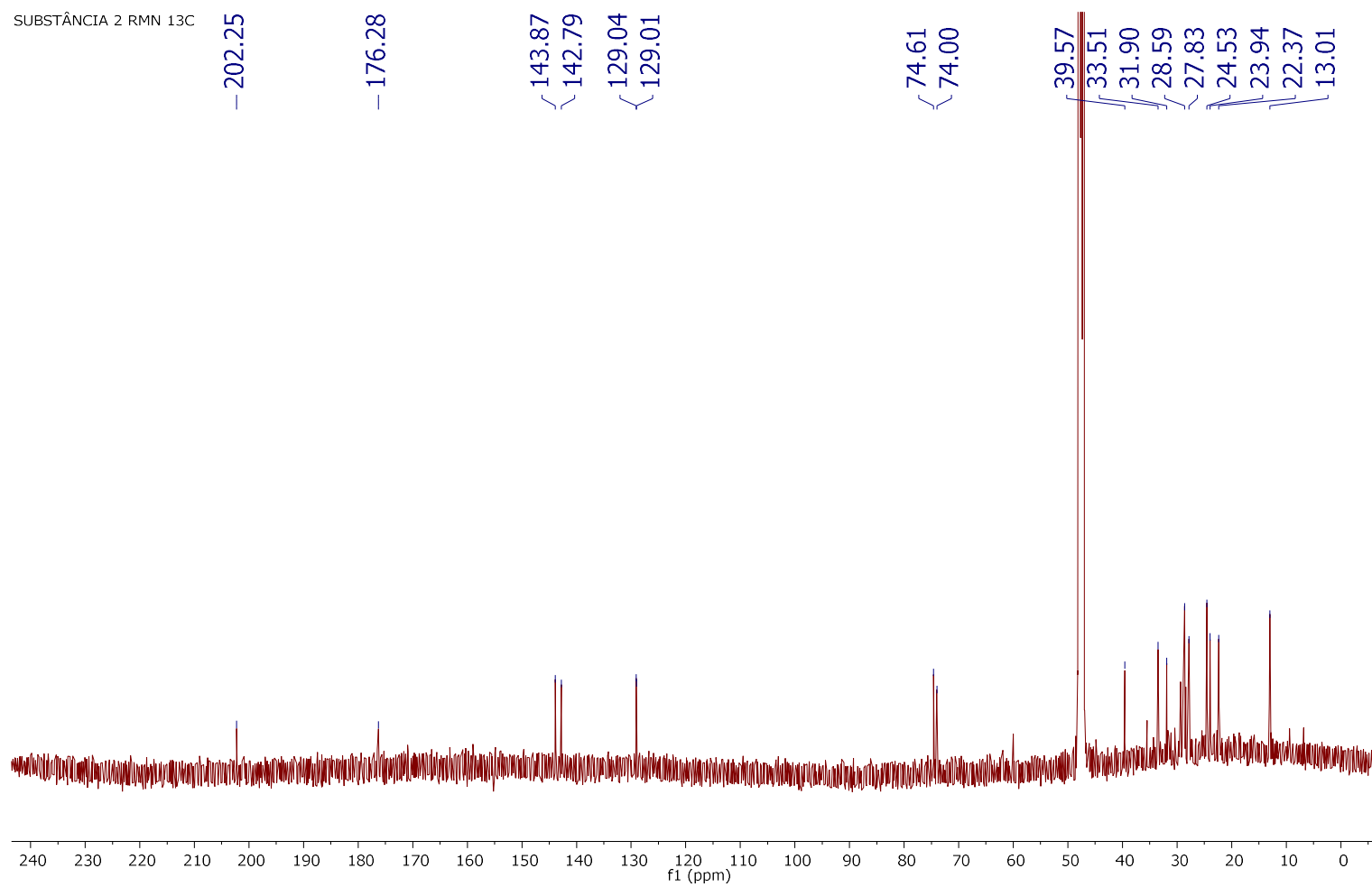
Figura 28 - Espectro de RMN de ^{13}C da substância **2** (CD_3OD , 600 MHz)

Figura 29 - Espectro de DEPT-135 da substância 2 (CD₃OD, 600 MHz)

SUBSTÂNCIA 2 DEPT-135

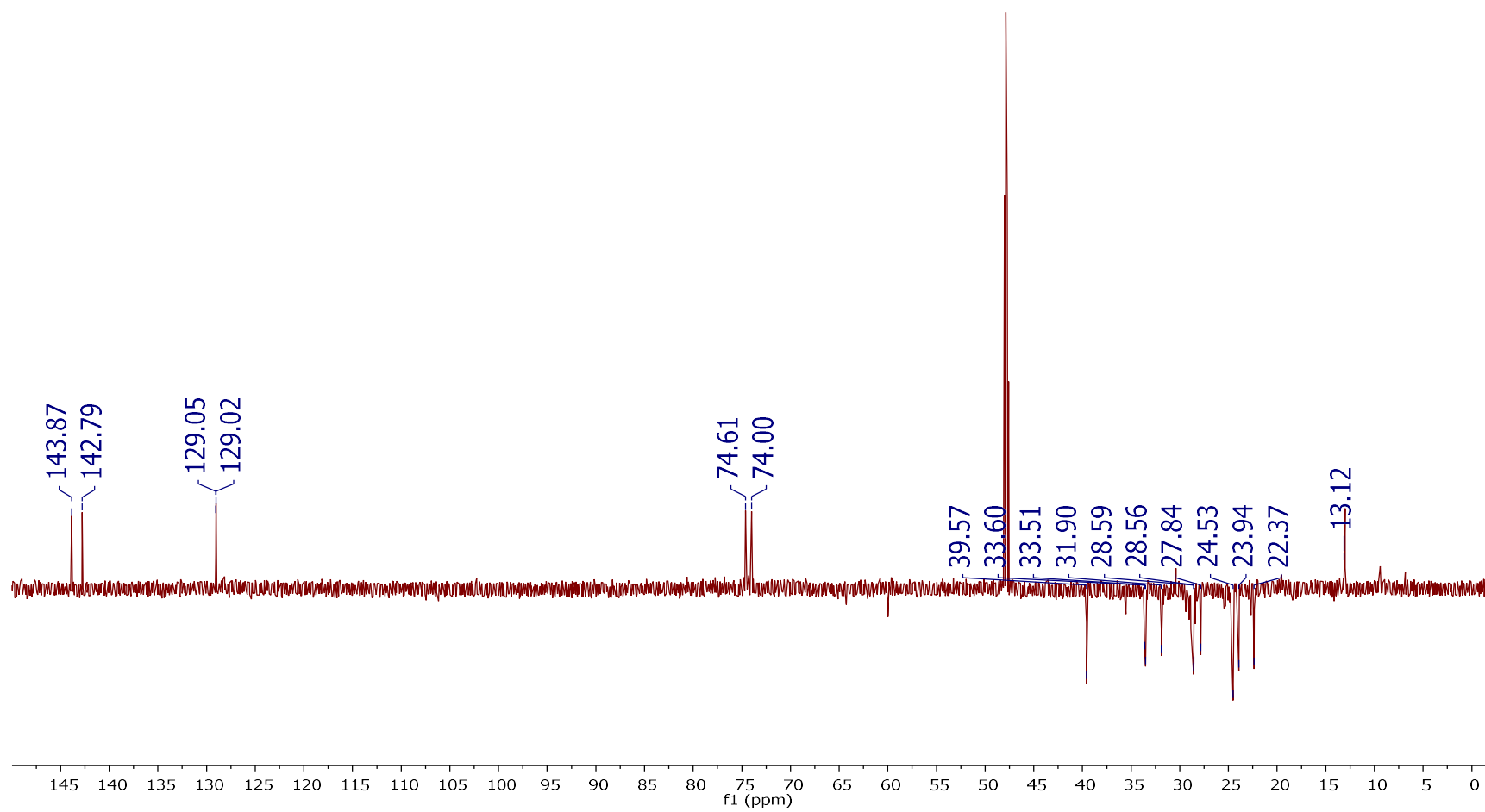


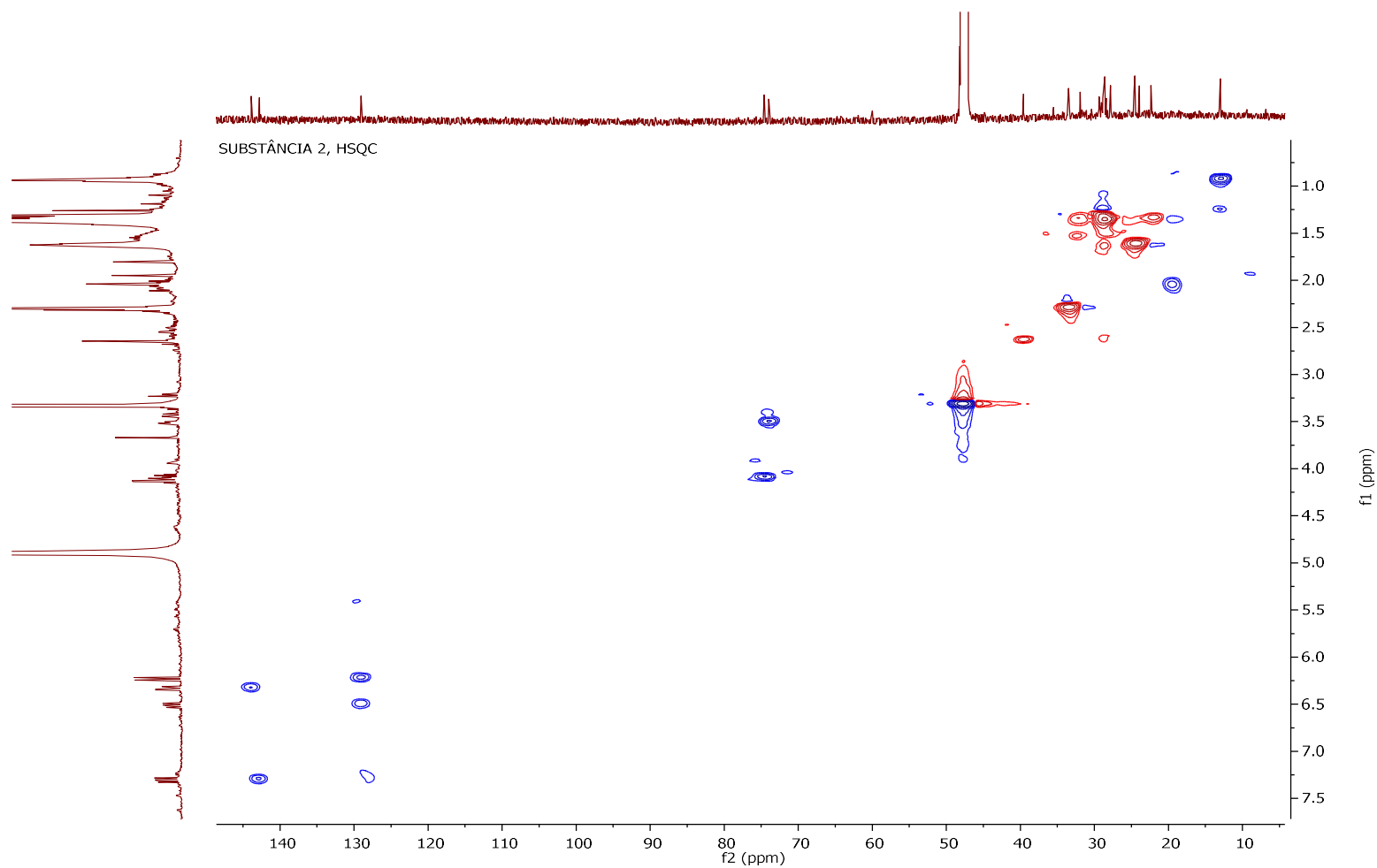
Figura 30 - Mapa de correlação H-C a uma ligação (HSQC) da substância 2 (CD₃OD, 600 MHz)

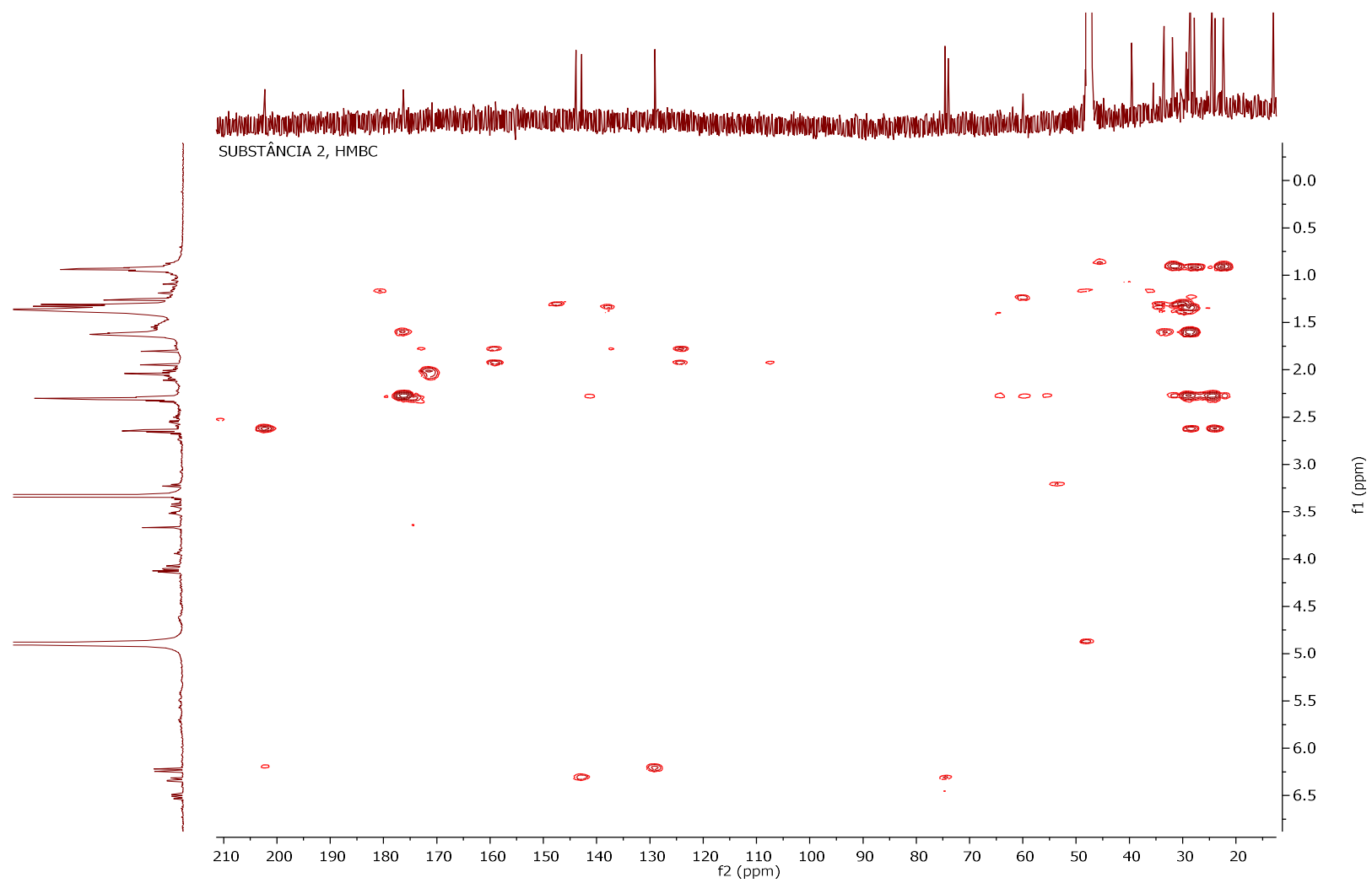
Figura 31 - Mapa de correlação H-C a longa distância (gHMBC) da substância 2 (CD₃OD, 600 MHz)

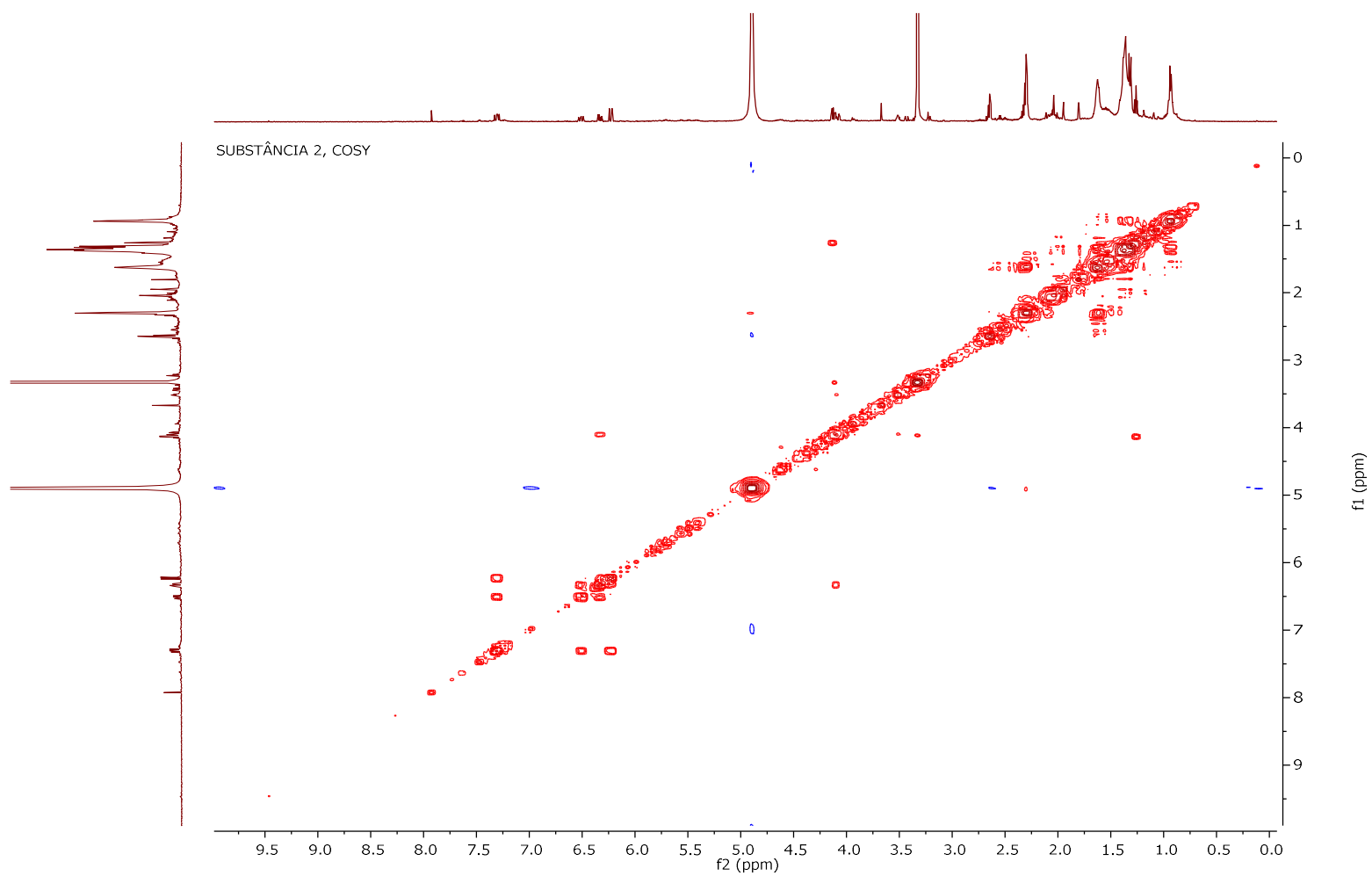
Figura 32 - Mapa de correlação gCOSY da substância 2 (CD₃OD, 600 MHz)

Figura 33 - Espectro de TOCSY-1D da substância 2 em 2,65 ppm (CD₃OD, 600 MHz)

SUBSTÂNCIA 2 TOCSY 2.65 ppm

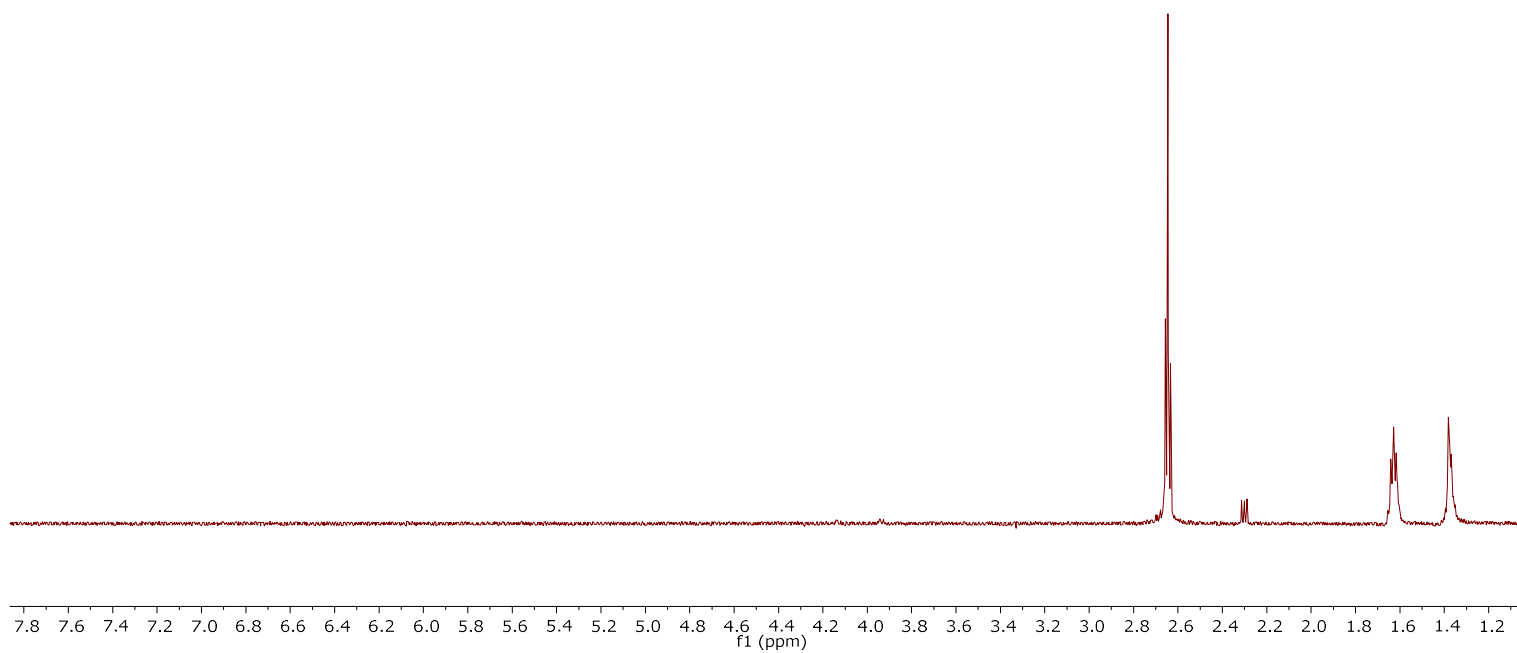


Figura 34 - Espectro de TOCSY-1D da substância 2 em 6,49 ppm (CD₃OD, 600 MHz)

SUBSTÂNCIA 2 TOCSY 6,49 ppm

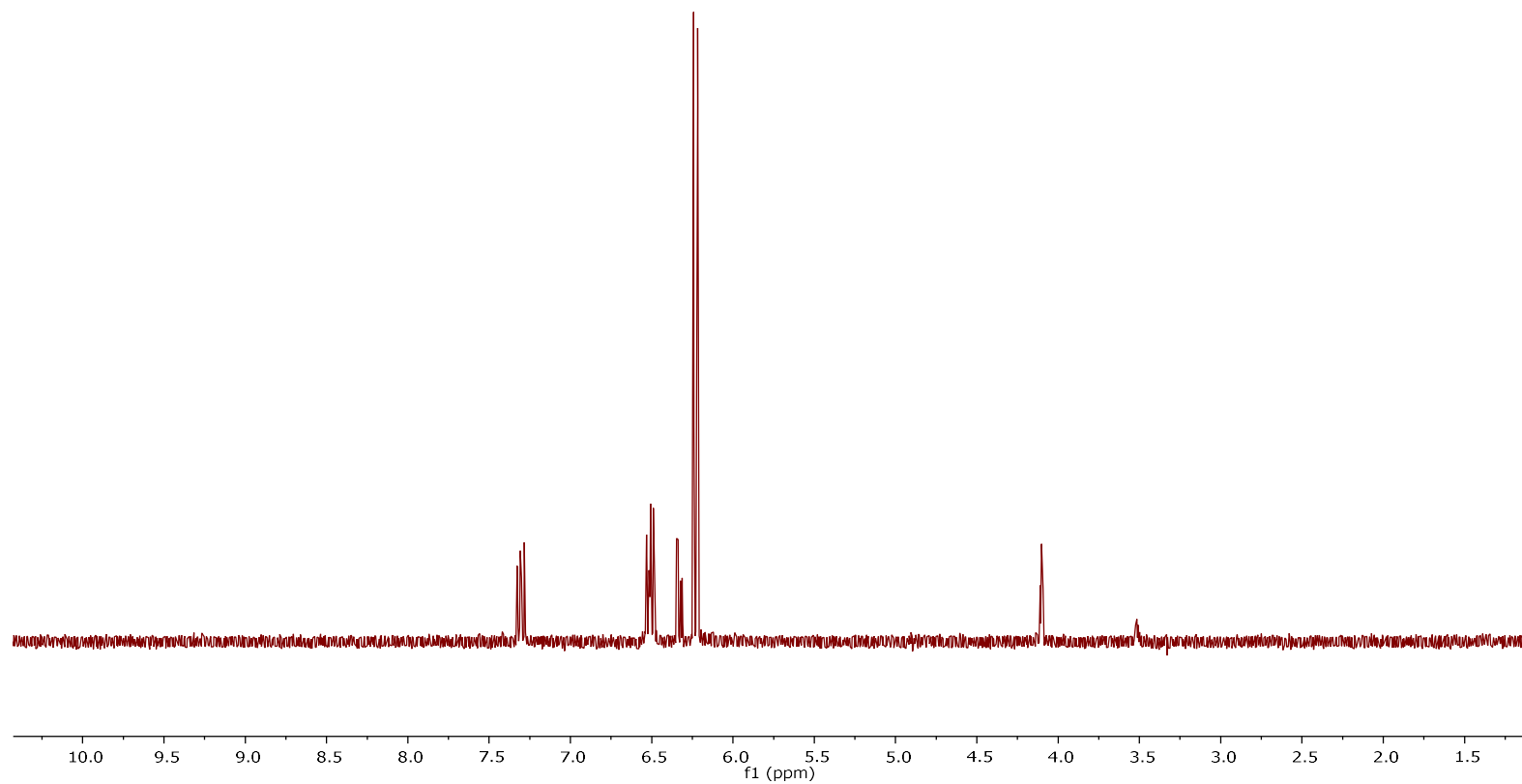


Figura 35 - Espectro de massas EM-IES (+) da molécula ionizada em m/z 369,2271 $[M+2H]^+$ da substância (2)

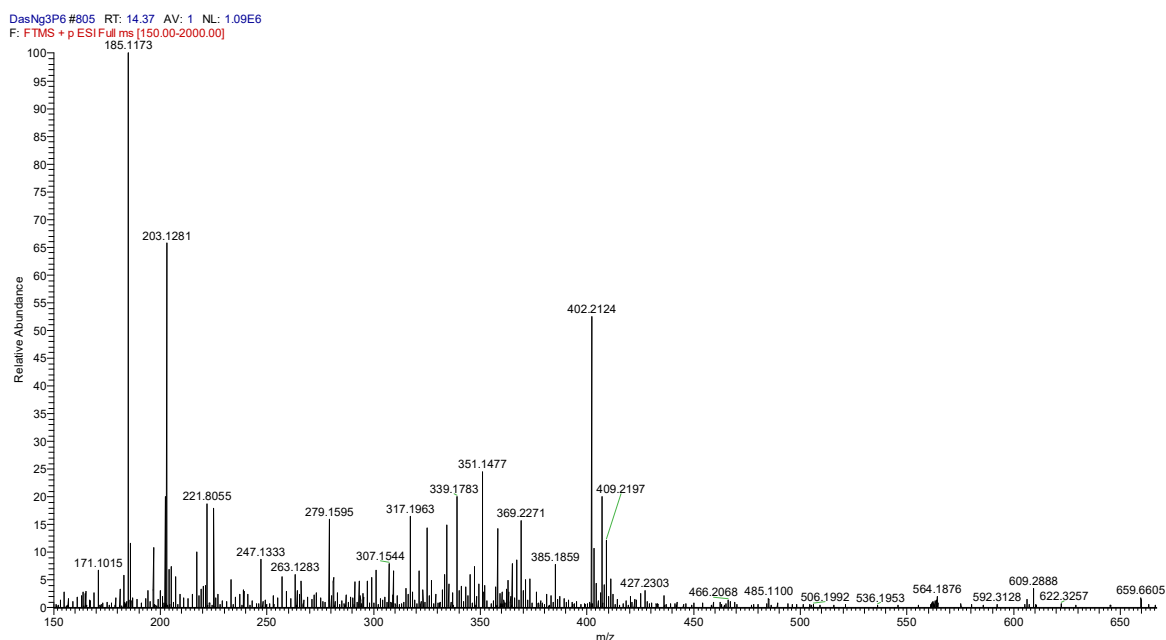
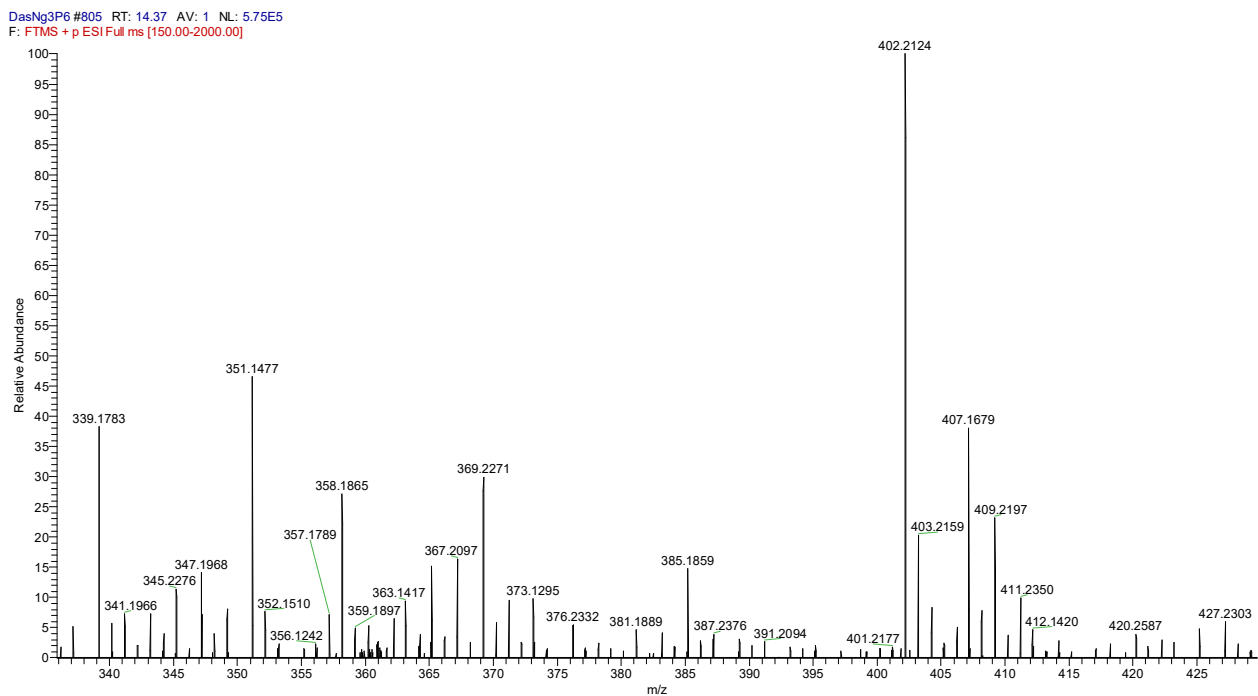
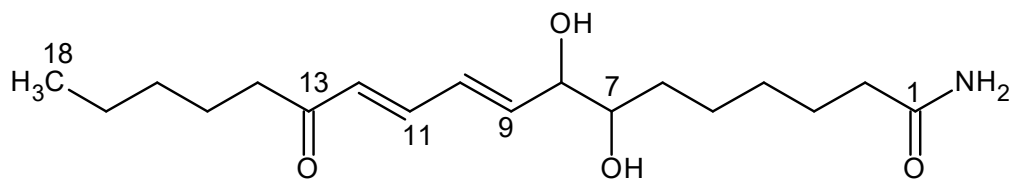


Figura 36 - Expansão Espectro de massas EM-IES (+) da substância (2) com o íon molecular em m/z 367,2097 Da $[M]$, e o pico pseudo molecular em m/z 369,2271 $[M+2H]^+$

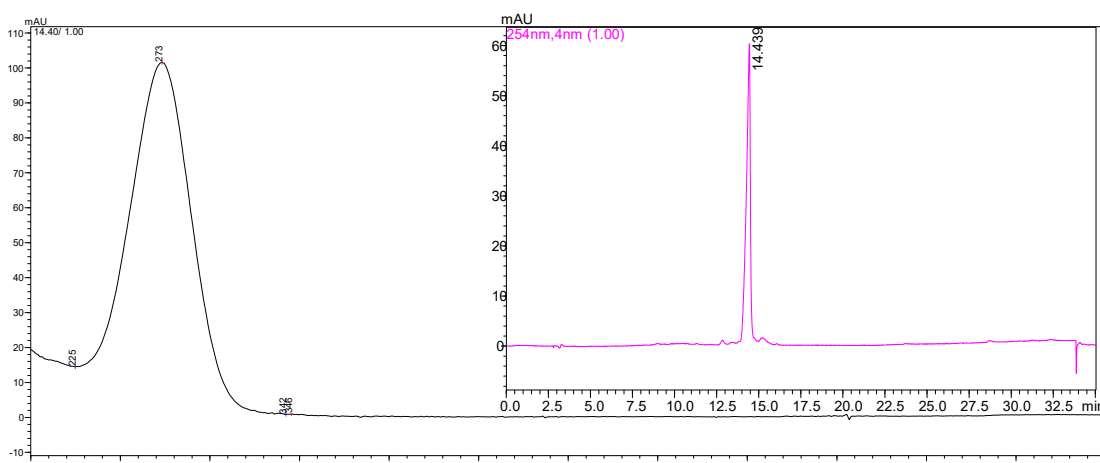


4.2.3 Determinação estrutural da substância (9E, 11E)- 7,8-di-hidroxi-13-oxo-octadeca-9,11-dienamida (3)



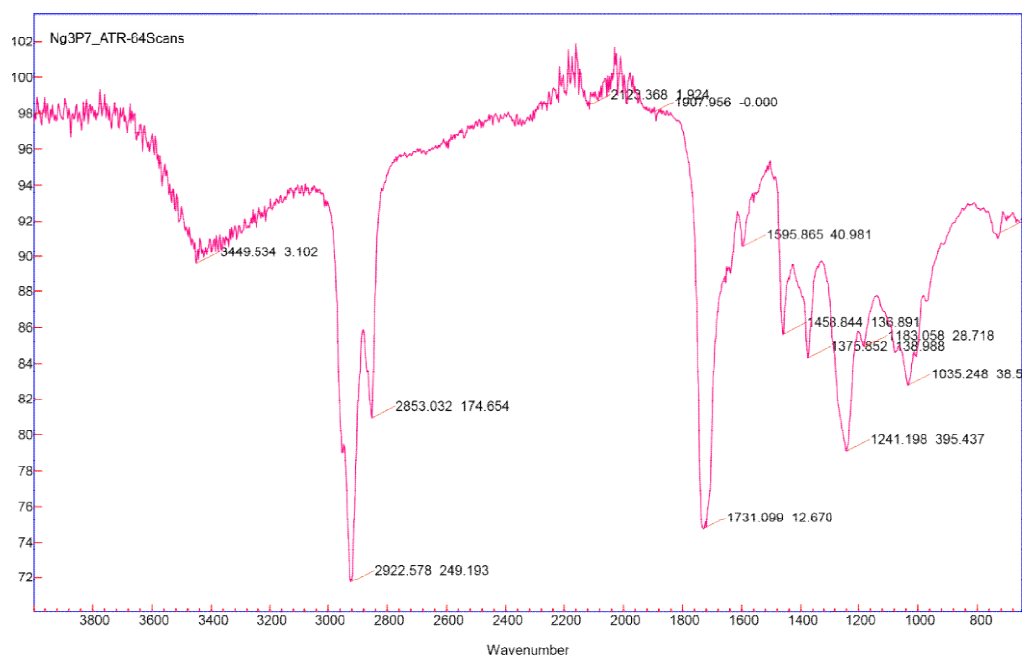
A substância **3** (4,1 mg) foi obtida como um óleo amarelo claro. O espectro na região do ultravioleta UV (Figura 37) em MeOH referente ao constituinte mostrado no cromatograma da Figura 37 apresentou absorção em λ_{\max} 273 nm, característicos de ligações duplas conjugadas.

Figura 37 - Espectro na região do UV registrado em 254 nm e cromatograma analítico em CLAE-DAD da substância **3**



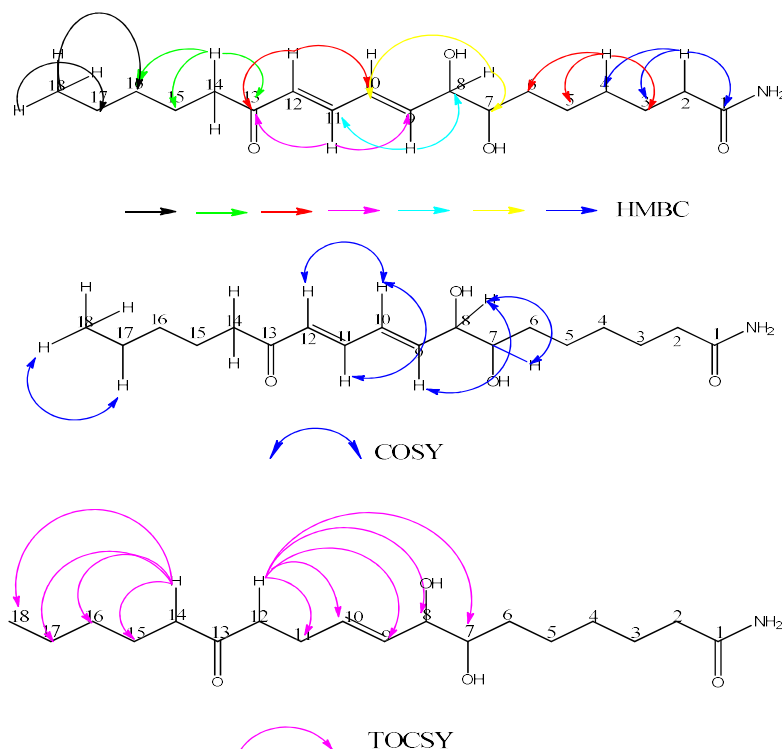
O espectro na região do infravermelho IV (Figura 38) exibiu bandas características de grupos hidroxilas em 3449 cm^{-1} , bandas em 1731 e 1595 cm^{-1} correspondentes à ligações C=O das carbonilas cetônica e amida respectivamente. Foram observados ainda estiramentos correspondentes às ligações C-H de carbonos sp^3 em 2922 - 2853 cm^{-1} .

Sua fórmula molecular foi estabelecida como $\text{C}_{18}\text{H}_{31}\text{NO}_4$ por EM-IES (Figura 48) no modo positivo (+) apresentou a molécula protonada em m/z 327, 2162 $[\text{M}+2\text{H}]^{++}$, m/z 349,1979 $[\text{M}+\text{Na}+\text{H}]^+$ e m/z 653,4246 $[2\text{M}+3\text{H}]^{+++}$.

Figura 38 - Espectro na região do IV da substância **3**

A análise e a comparação dos dados espectroscópicos (Tabela 6) de RMN ^1H (Figura 40), ^{13}C (Figura 41) e 2D de **2** e **3** indicaram a perda dos sinais em δ 1,36 (m; 2H, δ 31,9), δ 1,40 (m; 2H, δ 27,8), δ 1,34 (m; 2H, δ 22,3), atribuída aos hidrogênios metilênicos de H-18, H-19 e H-20. Em vez disso, apareceu o sinal em δ 0,93 (*t*, $J = 7,2$ Hz, 3H, δ 12,8) atribuído aos hidrogênios da metila. A análise do experimento em gHMBC (Figura 44) associado ao experimento de gCOSY (Figura 45) e TOCSY 1D (Figura 46 e 47), aliado aos dados de espectrometria de massas (Figura 48) confirmaram fórmula molecular $\text{C}_{18}\text{H}_{31}\text{NO}_4$ com IDH igual a 4, correspondendo à duas insaturações e duas carbonilas, permitindo propor a substância **3** como sendo um trisnor da substância **2**, correspondendo ao (*9E*, *11E*) - 7,8-dihidroxi-13-oxo-octadeca-9,11-dienamida. A Figura 39 apresenta as principais correlações gHMBC, gCOSY e interações de TOCSY da substância **3**.

Figura 39 - Principais correlações gHMBC, COSY e interações de TOCSY da substância 3

Tabela 6 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C de $(9E, 11E)$ -7,8-di-hidroxi-13-oxo-octadeca-9,11-dienamida (**3**), em CD_3OD , δ (Multiplicidade, J em Hz)

C	Substância (3)					
	$\delta^1\text{H}$	$\delta^1\text{H}$, mult, J em Hz	$\delta^{13}\text{C}$	Multip.	gHMBC (H \rightarrow C)	COSY
1	-	t; $J = 7,5$ Hz	176,3	C	C-1/C-3/C-4	
2	2,30	m	33,5	CH_2	C-4	
3	1,37	m	28,8	CH_2	C-1/ C-5/ C-6	
4	1,62	m	24,6	CH_2		
5	1,56	m	32,0	CH_2		
6	1,49	ddd, $J = 8,9; 6,1; 3,3$ Hz	25,2	CH_2		
7	3,52	dd; $J = 6,0$ Hz	73,9	CH	C-7/C-10	
8	4,08	dd, $J = 15,5; 6,1$ Hz	74,5	CH	C-11/C-12	H-7
9	6,33	dd, $J = 15,5; 10,9$ Hz	143,8	CH	C-8/C-11	H-8
10	6,51	dd, $J = 15,5; 10,9$ Hz	129,0	CH	C-9/C-13	H-10
11	7,30	d; $J = 15,5$ Hz	142,7	CH	C-13	H-10
12	6,23	-	129,0	CH		
13	-	dt; $J = 7,9, 4,1$ Hz	202,4	C	C-13/C-15/ C-16	
14	2,63	m	39,8	CH_2		
15	1,53	m	23,8	CH_2		
16	1,32	m	31,1	CH_2		
17	1,35	t; $J = 7,1$ Hz	22,1	CH_2	C-16/C-17	
18	0,93	t; $J = 7,5$ Hz	12,8	CH_3	C-1/C-3/C-4	H-17

*Espectros obtidos em MeOD; *valores obtidos através das projeções de carbono do HSQC e HMBC.

Figura 40 - Espectro de RMN de ^1H da substância **3** (CD_3OD , 600 MHz)

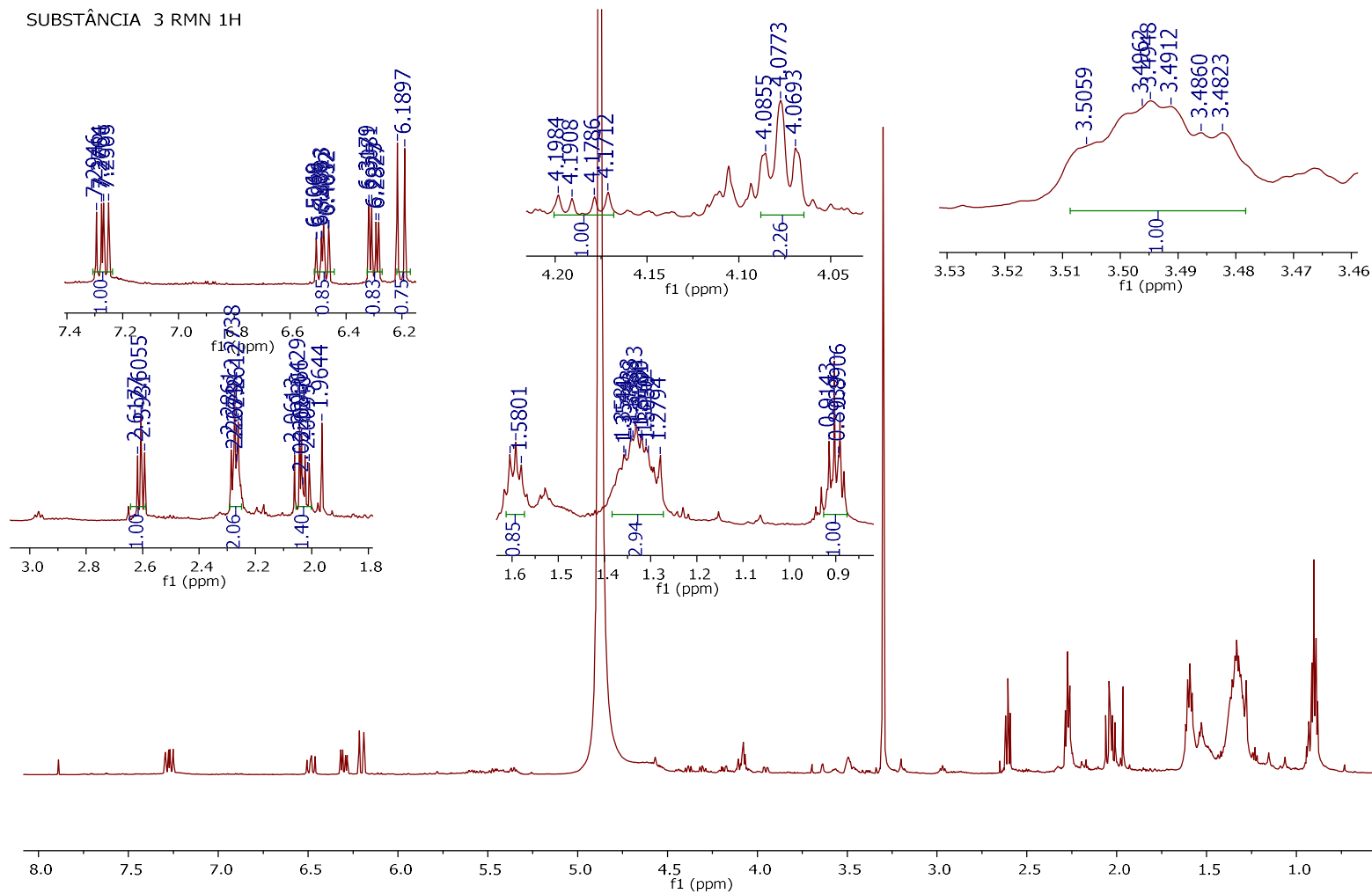


Figura 41 - Espectro de RMN de ^{13}C da substância 3 (CD₃OD, 600 MHz)

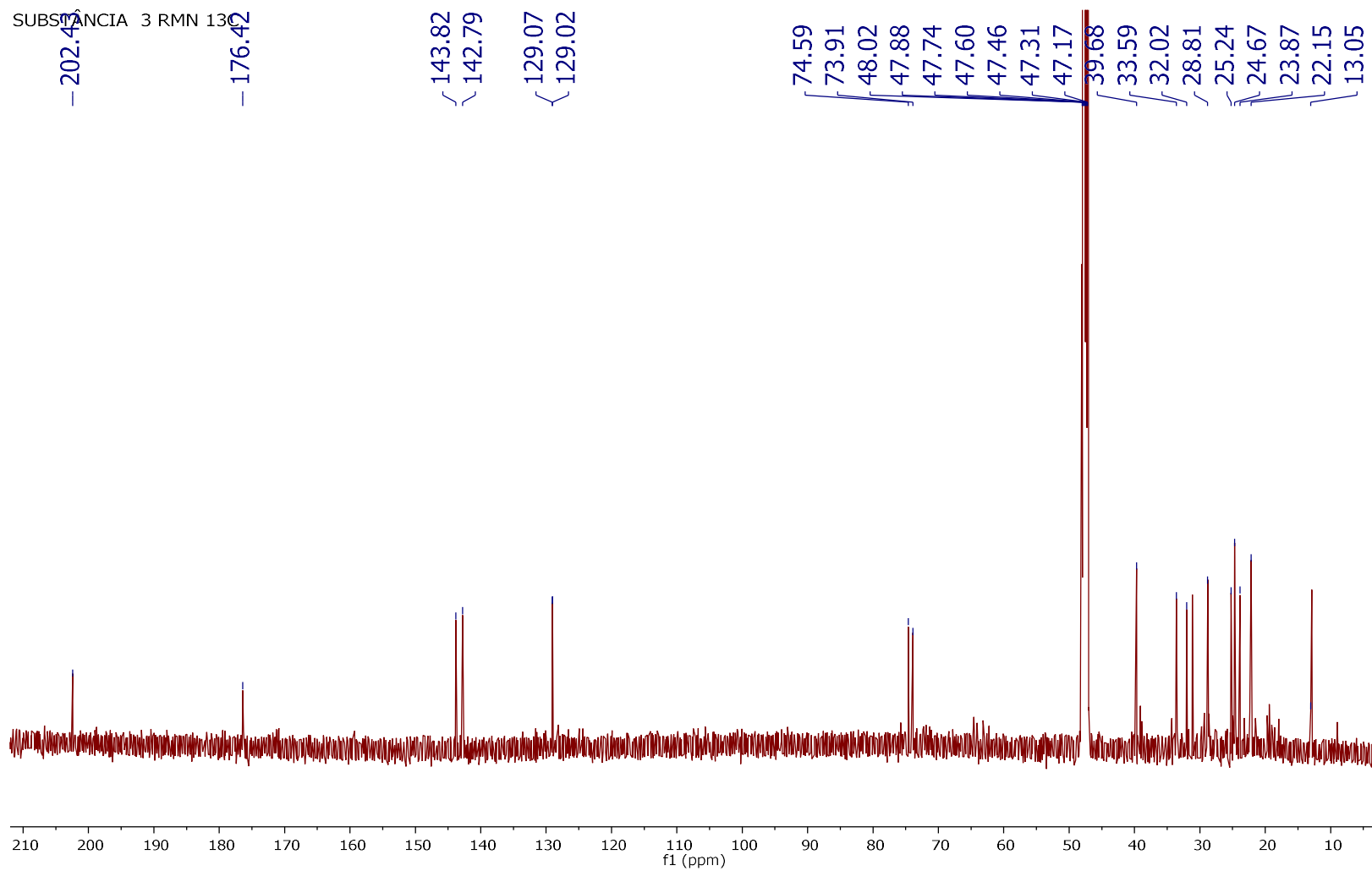


Figura 42 - Espectro de DEPT-135 da substância 3(CD₃OD, 600 MHz)

SUBSTÂNCIA 3 RMN DEPT-135

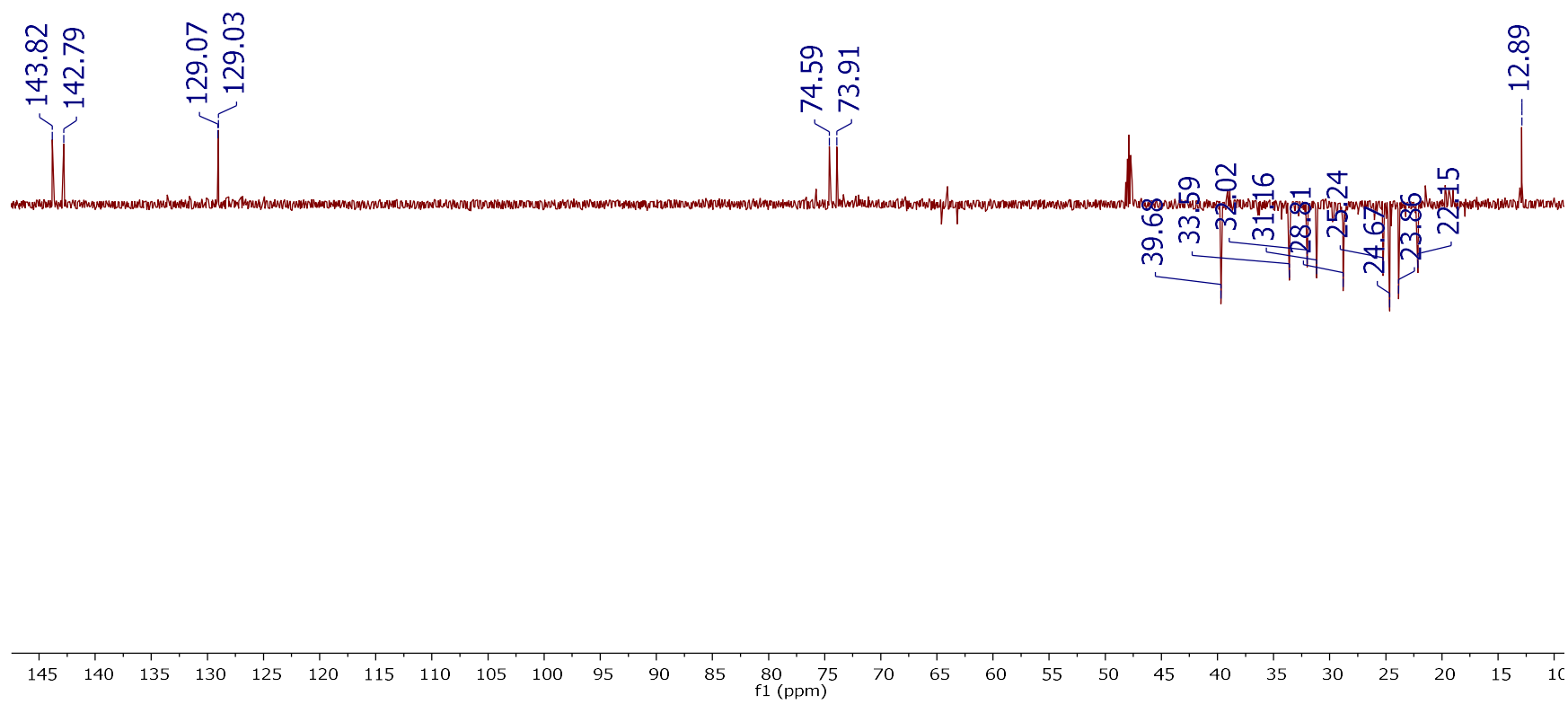


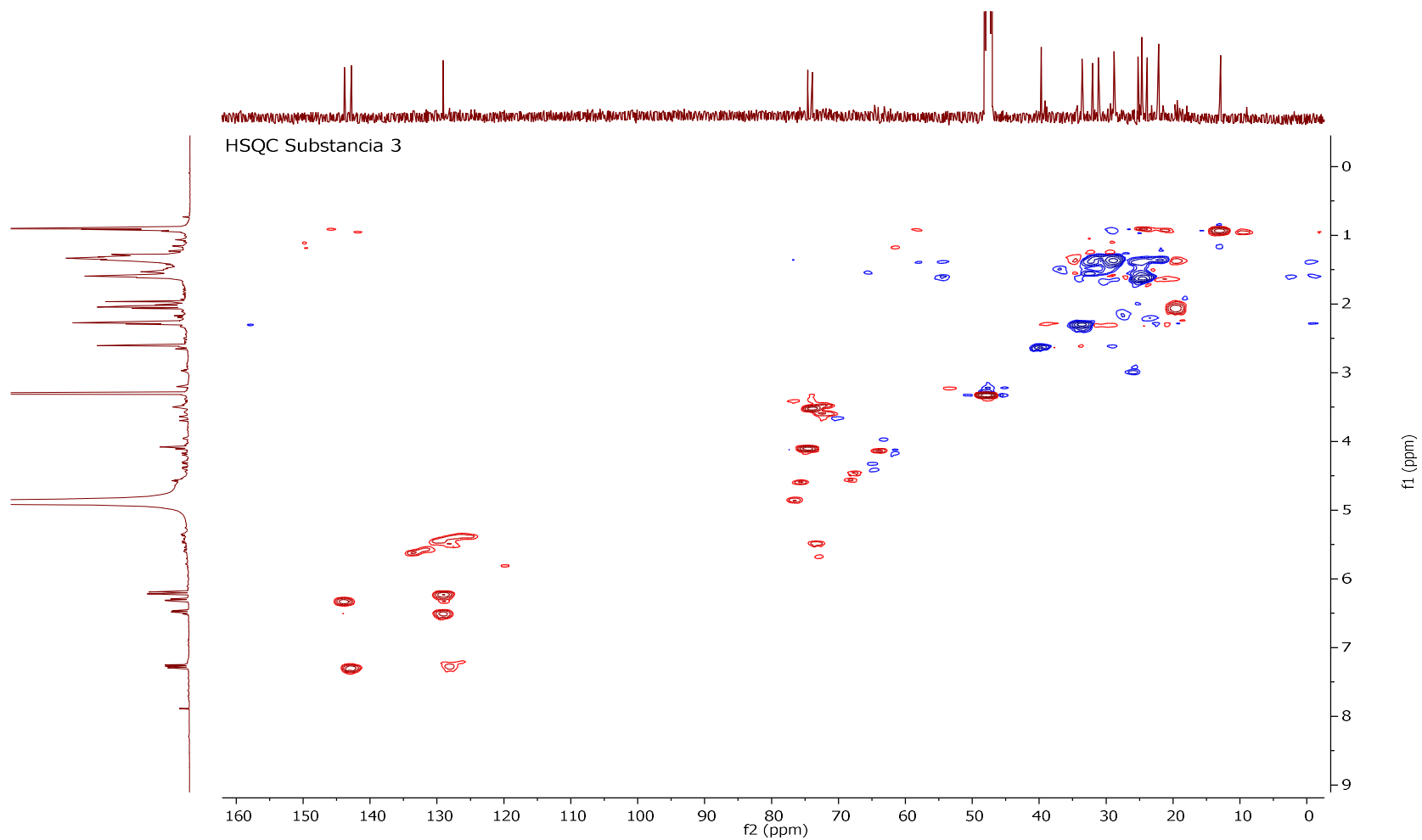
Figura 43 - Mapa de correlação H-C a uma ligação (gHSQC) da substância **3** (CD₃OD, 600 MHz)

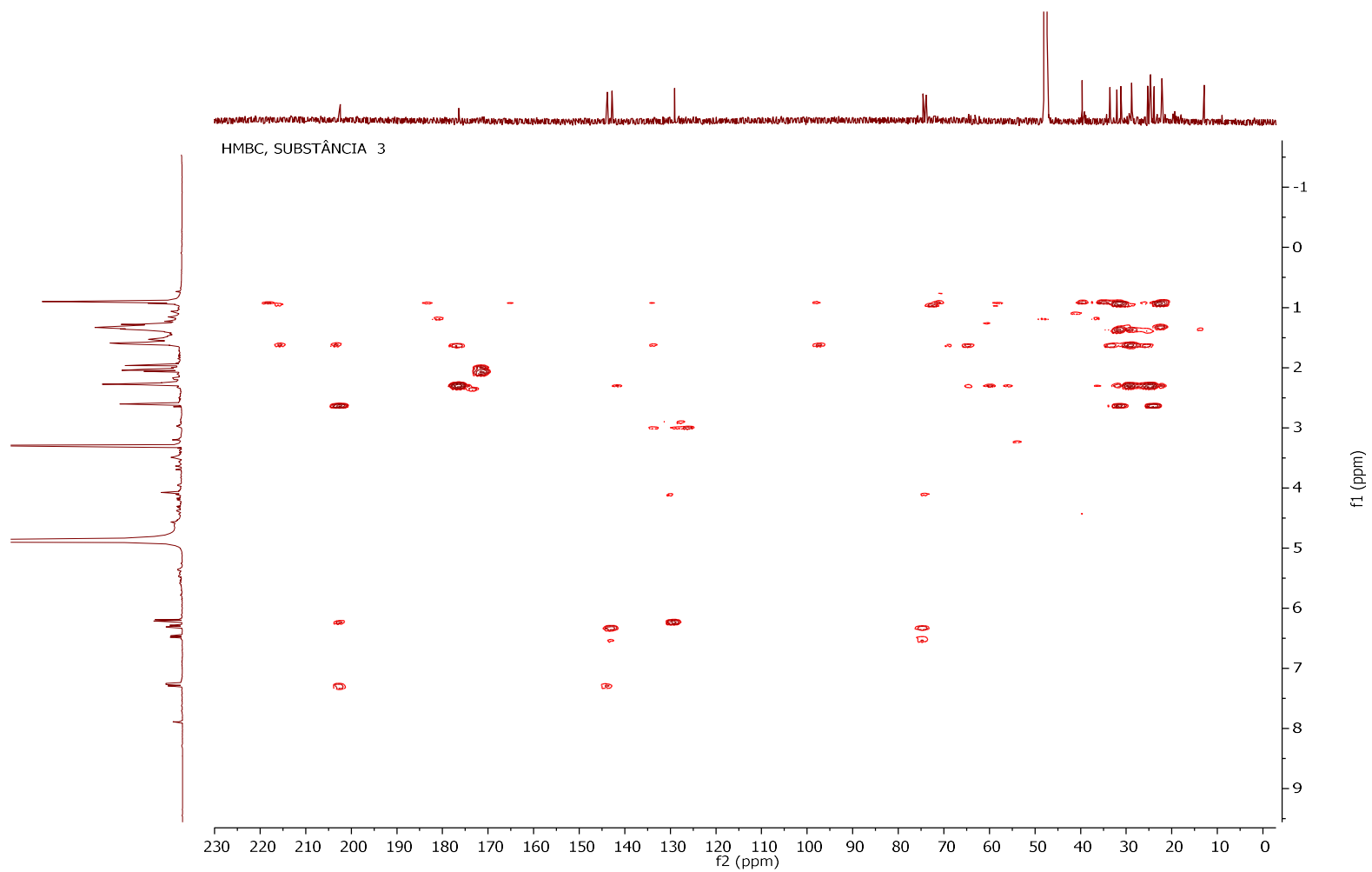
Figura 44 - Mapa de correlação H-C a longa distância (gHMBC) da substância **3** (CD₃OD, 600 MHz)

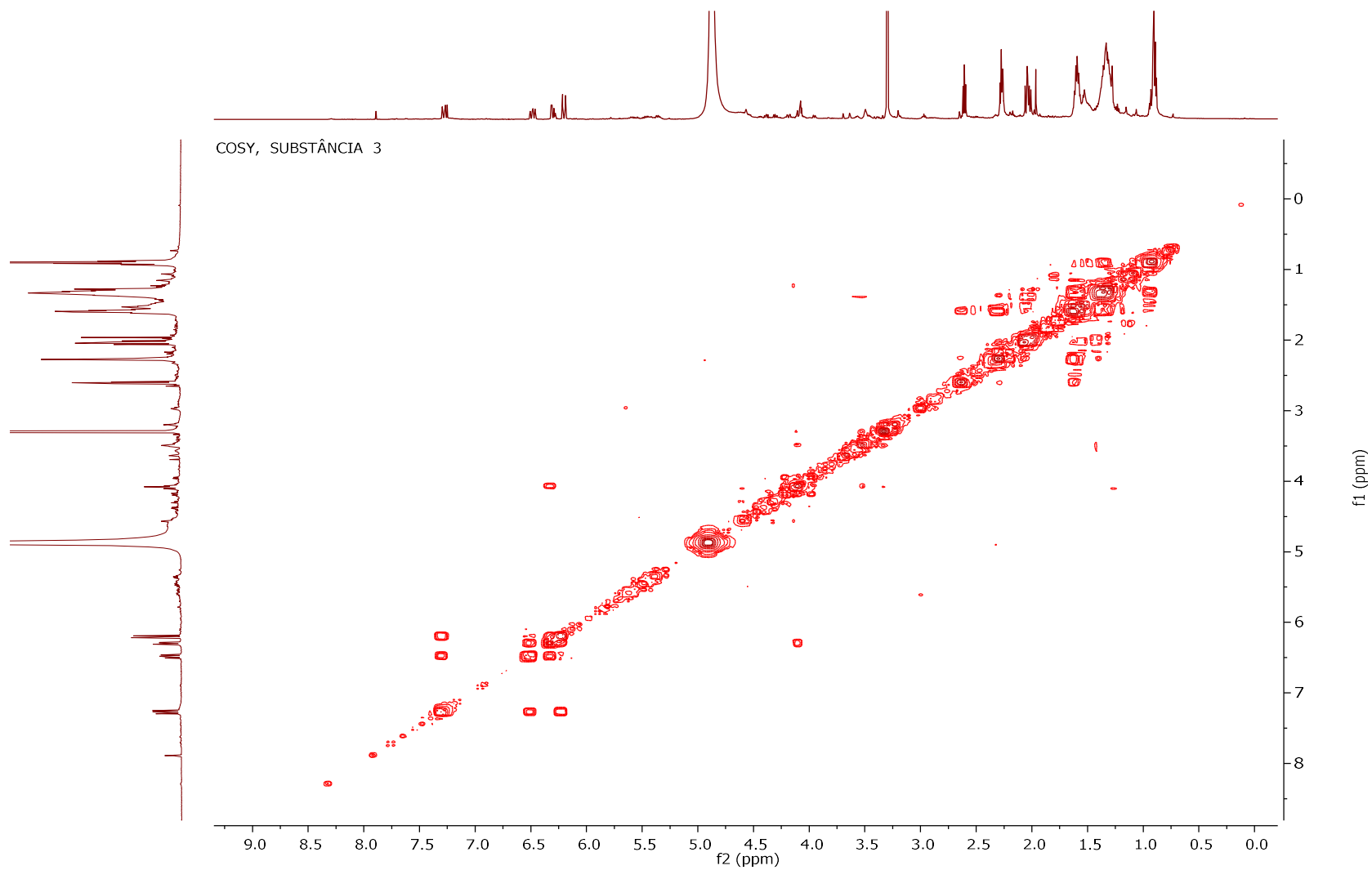
Figura 45 - Mapa de correlação gCOSY da substância 3 (CD₃OD, 600 MHz)

Figura 46 - Espectro de TOCSY-1D da substância **3** em 2,4ppm (CD₃OD, 600 MHz)

TOCSY 2,64 ppm Substância 3

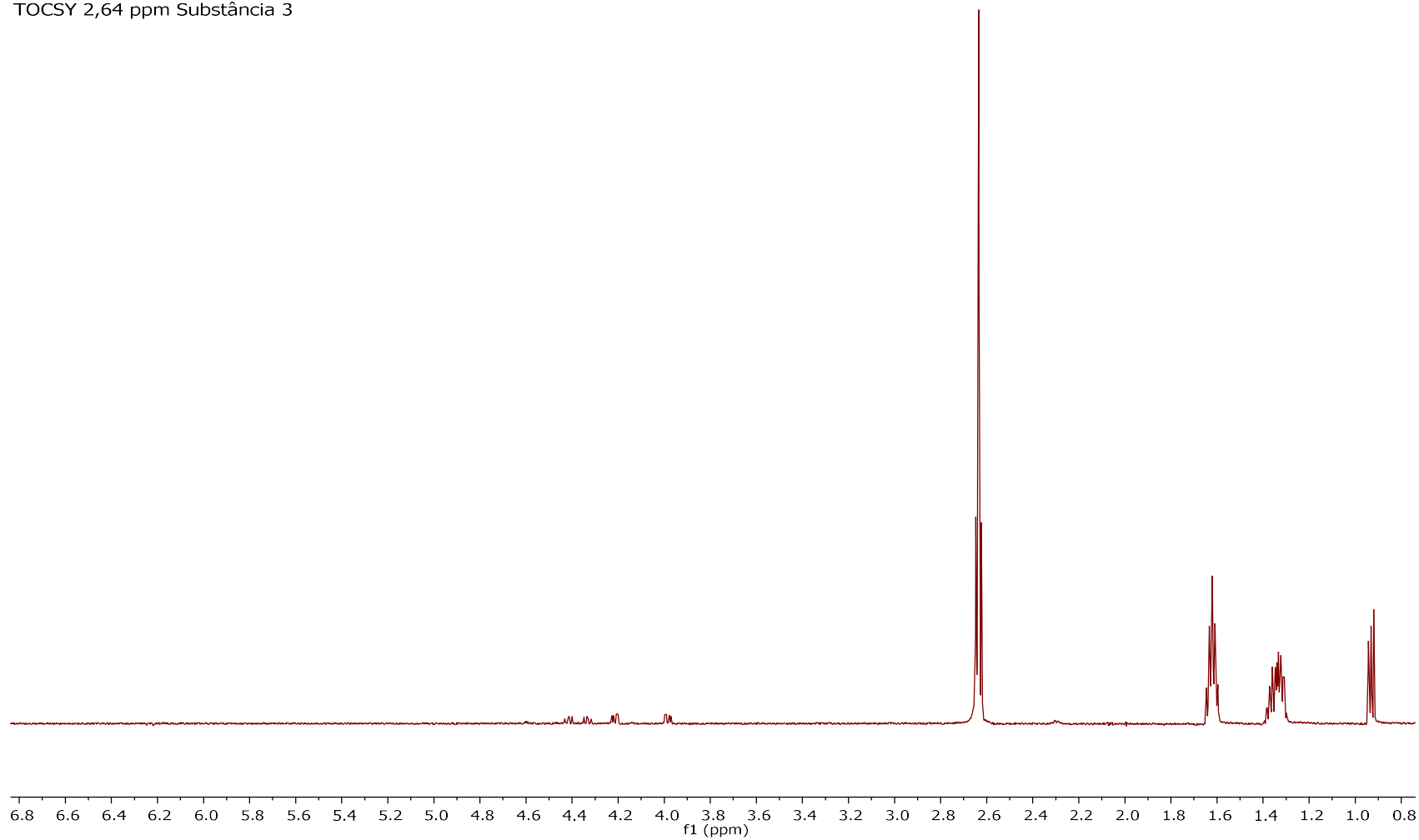


Figura 47 - Espectro de TOCSY-1D da substância **3** em 6,24ppm (CD₃OD, 600 MHz)

SUBSTÂNCIA 3, TOCSY 6,24 ppm

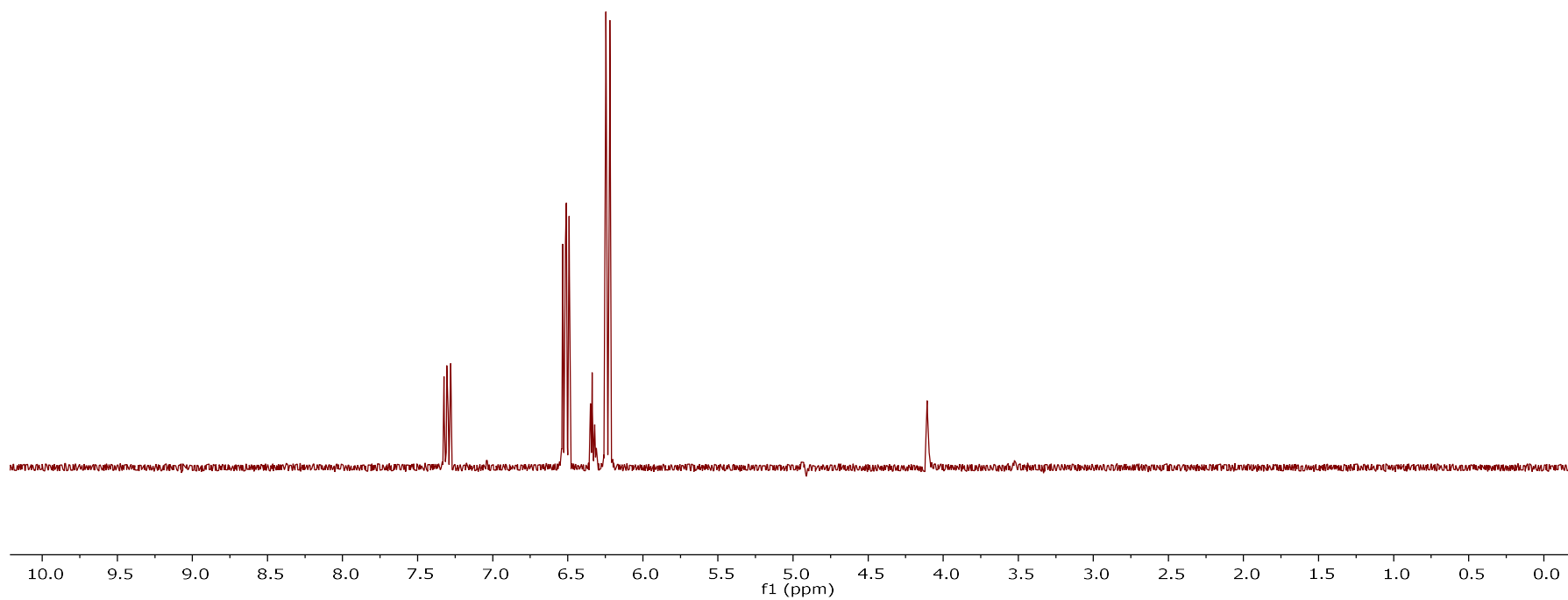
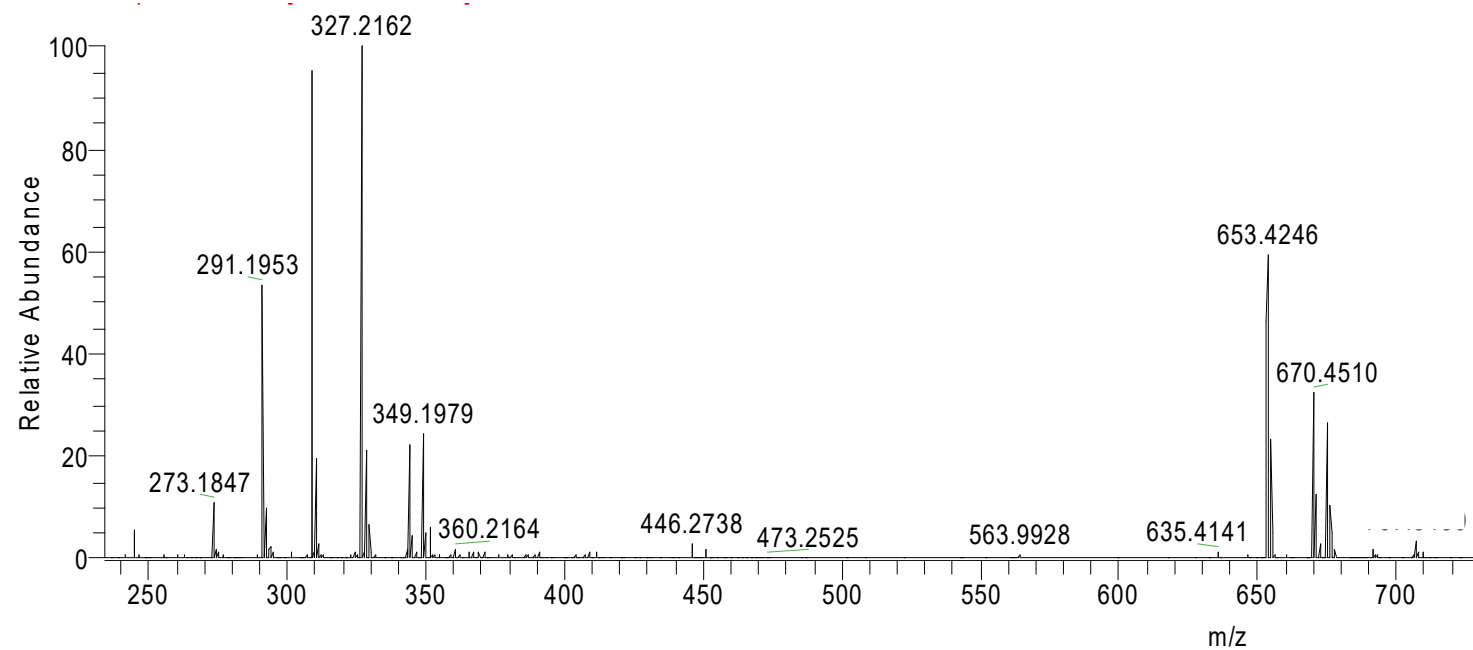
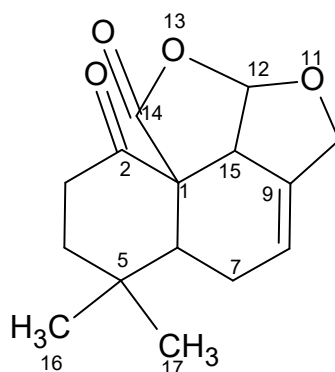


Figura 48 - Espectro de massas EM-IES (+) da molécula protonada m/z 327,2162 ($[M+2H]^+$), m/z 653,4248($[2M+3H]^+$) e o aduto de sódio m/z 349,1979 ($[M+Na]^+$) da substância (3)

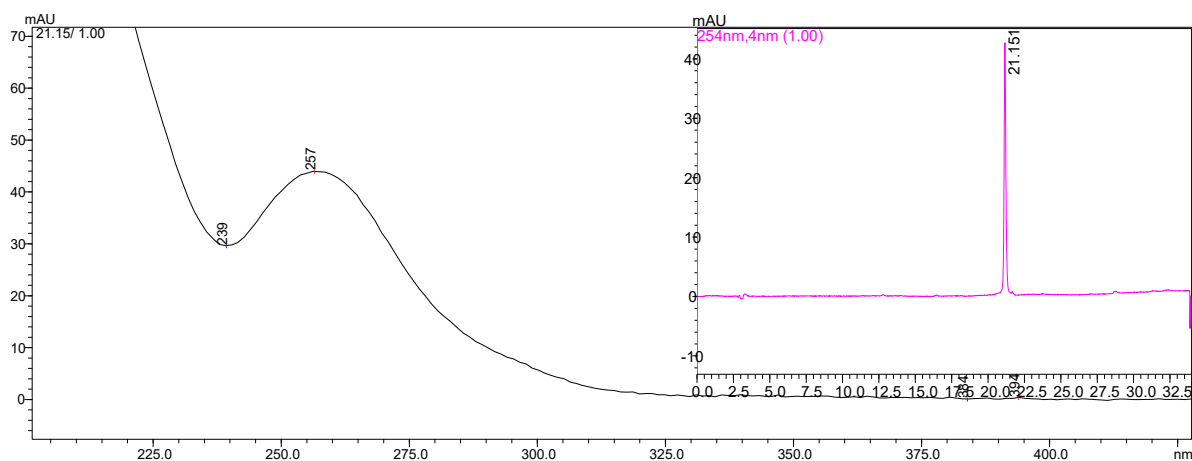


4.2.4 Determinação estrutural da substância tetraciclo [7, 5, 1, 0^{1,6}0^{12,15}]-5,5-dimetil-11-oxa-2-oxo-pentadec-8-en-14(13)-lactona (4)



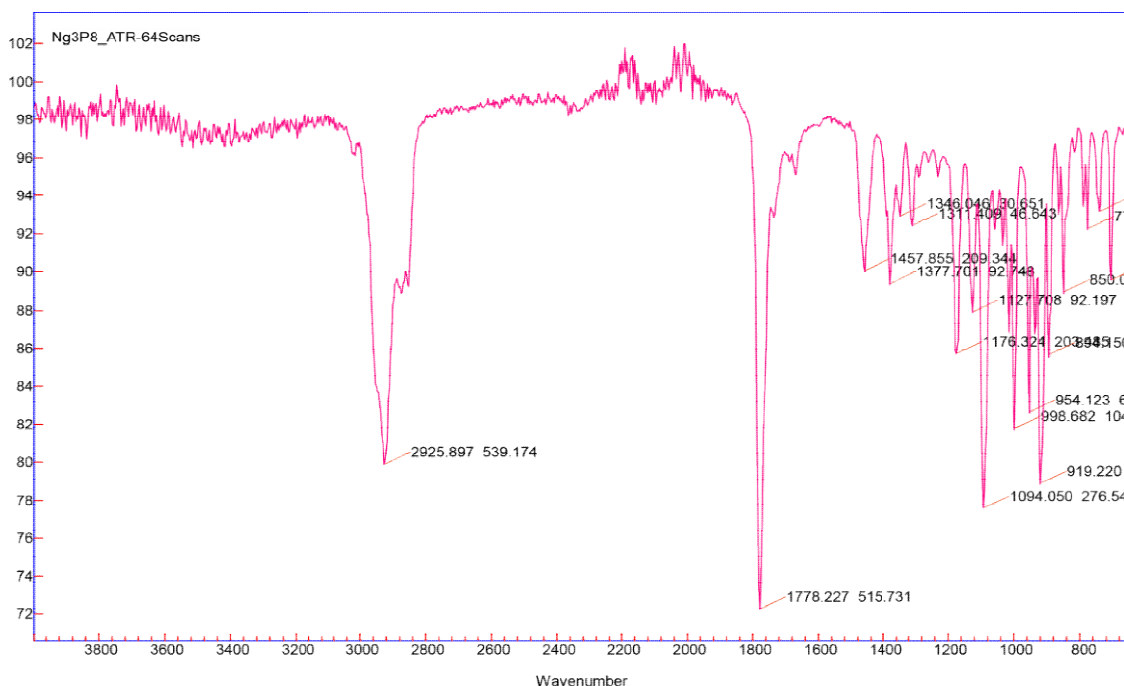
A substância **4** (12,0 mg) foi isolada como um sólido cristalino. O espectro na região do ultravioleta UV foi obtido a partir da análise em CLAE-DAD (Figura 49) em MeOH apresentou banda de absorção máxima em λ_{max} 256 nm, característicos do sistema insaturado ligação dupla exocíclica gama as carbonilas da cetona e éster.

Figura 49 - espectro na região do UV registrado em 254 nm e cromatograma analítico em CLAE-DAD e da substância **4**



O espectro na região do IV (Figura 50) apresentou bandas de absorção 1777 cm^{-1} correspondente a estiramentos C=O, atribuídos a carbonila (γ -lactona) e 1715 cm^{-1} correspondente a ciclo hexanona (AYER; CRAW, 1989), foi observado ainda estiramentos em 2924 cm^{-1} atribuídos as ligações C-H de carbonos sp^3

Figura 50 - Espectro na região do IV da substância 4



A fórmula molecular de **(4)** foi estabelecida como $C_{15}H_{19}O_4$ por EM-IES no modo positivo (+) (Figura 61) que apresentou os seguintes sinais m/z 263, 1279 $[M+H]^+$, m/z 525,2477 $[2M+H]^{++}$ e m/z 547,2296 $[2M+Na]^{++}$.

Os espectros de RMN de 1H (Figura 52) e RMN ^{13}C (Figura 53) apresentaram dois simples em δ 0,87 (s; 3H, H-16) e δ 1,42 (s; 3H, H-17), referentes aos hidrogênios metílicos. Foram observados um multipeto em δ 6,11 (m; 1H, H-8), atribuído ao hidrogênio olefínico H-8, e um dupeto em δ 6,06 (d, $J = 4,3$; Hz; 1H, H-12) o qual mostrou acoplamentos comuns entre os hidrogênios H-3, H-4 H-7 em TOCSY-1D (Figura 54).

O experimento de COSY (Figura 55) apresentou correlações entre H-3, H-4, H-16 e entre H-8, H-10 e H-15 e, através do experimento de TOCSY 1D (Figura 56), foi possível observar ainda que há hidrogênios em acoplamentos comuns entre H-6, H-8, H-10 e H-15.

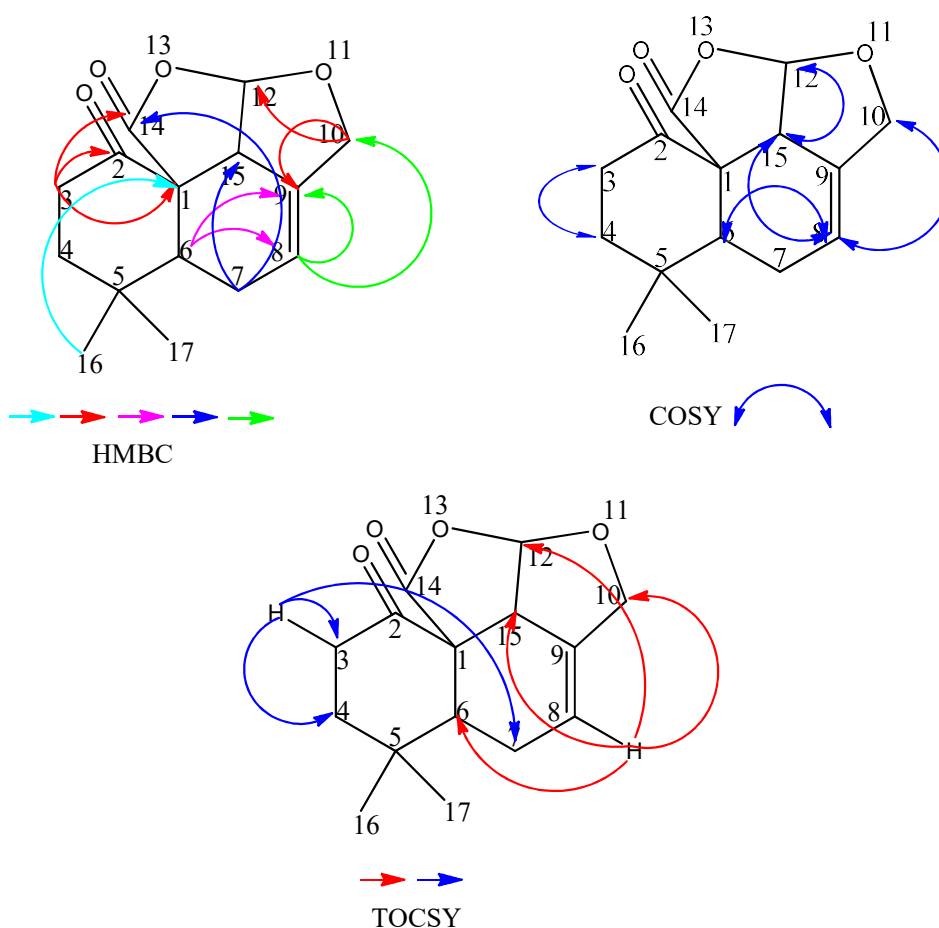
Adicionalmente, no experimento de gHMBC (Figura 57 e 58), foram observadas correlações do dupeto em δ 6,06 (d, $J = 4,4$ Hz, H-12) e do dupeto de quarteto em δ 6,11 (dq, $J = 4,3$; 2,3; Hz, H-8) com os carbonos C-9 e C-10, e um triplete em δ 4,54/4,63 (t, $J = 2,3$; 1,8 Hz, 2H, H-10) correlacionando com C-8 e C-9 e C-12. Foram observadas ainda correlações do dupeto de quarteto em δ 3,14 (dq, $J = 4,4$; 2,1 Hz, 1H, H-15) com C-14, e o dupeto em δ 3,59 (d, $J = 4,1$ Hz, 1H, H-6) com C-8 e C-9. Ainda no experimento de gHMBC, foram observados um multipeto em δ 1,59 (m, 2H; H-4) correlacionando com os

OLIVEIRA, M. D. A, 2018.

carbonos C-3/C-7/C-16, bem como as correlações do multipletto em δ 2,20/1,85 (m, 2H; H-3) com os carbonos C-1/C-4/C-14; do simpleto em δ 0,87 (s, 3H; H-16) com C-1/C-4/C-5/C-6 e C-15 e o multipletto em δ 1,66/1,84 (m, 2H; H-7) correlacionando com C-2/ C-14/ C-15. Também foi possível observar no espectro DEPT-135 (Figura 59) associado ao experimento de gHSQC (Figura 59) e gHMBC duas carbonilas em δ 174,2 (C-14) e δ 211,8 (C-2)

Todas as correlações acima descritas estão apresentadas na Tabela 7, assim como na Figura 51 apresenta as principais correlações de gHMBC, gCOSY e interações de TOCSY da substância 4

Figura 51 - Principais correlações gHMBC, gCOSY e interações de TOCSY da substância 4



A análise dos experimentos gHMBC, gCOSY 2D e TOCSY 1D associados aos dados de espectrometria de massa EM-IES (+) (Figura 61) no modo positivo permitiram propor para a substância 4 a fórmula molecular $C_{15}H_{19}O_4$, sugerindo uma molécula sesquiterpênica de esqueleto tipo drimano, com IDH igual a 7, correspondendo a quatro ciclos, duas carbonilas e uma insaturação, sendo assim a substância recebeu o nome sistemático de tetraciclo OLIVEIRA, M. D. A, 2018.

[7,5,1,0^{1,6}0^{12,15}]-5,5-dimetil-11-oxa-2-oxo-pentadec-8-en-14(13)-lactona. Em comparação com os dados da literatura (AYER; CRAW, 1989), foi possível identificar a substância **4** como marasmeno-1,15-diona. Esta substância foi obtida anteriormente por derivatização por meio de reações de oxidação e redução a partir de 1 α ,15-hidroxi-marasmeno e anidromarasmono, previamente isolados de *Marasmius oreades* (AYER; CRAW, 1989). No entanto, esta lactona em particular não havia sido isolada anteriormente de fontes naturais. Com isso, este se torna o primeiro relato onde o marasmeno-1,15-diona foi obtido a partir de fontes naturais.

Tabela 7 - Dados de RMN ¹H e ¹³C de tetraciclo [7, 5, 1, 0^{1,6}0^{12,15}]-5,5-dimetil-11-oxa-2-oxo-pentadec-8-en-14(13)-lactona (**4**) em CD₃OD, δ (Multiplicidade, *J* em Hz)

C	Substância (4)					
	δ ¹ H*	δ ¹ H, mult, <i>J</i> em Hz	δ ¹³ C*	Multip.	gHMBC(H→C)*	gCOSY
1	-	-	65,4	C		
2	-	-	211,8	C		
3	2,20/1,85	dd, <i>J</i> = 10, 4; 3,4 Hz	34,5	CH ₂	C-1/C-2/C-4/C-14	H-4
4	1,59	m	38,6	CH ₂	C-3/C-7/C-16	
5	-	-	34,3	C		
6	3,59	d, <i>J</i> = 4,1 Hz	49,7	CH ₂	C-8/C-9	
7	1,66/1,84	-	18,3	CH ₂	C-14/C-15	
8	6,11	dq, <i>J</i> = 4,3; 2,3 Hz	118,	CH	C-9/C-10	H-6/H-15
9	-	-	138,4	CH		
10	4,54/4,63	t, <i>J</i> = 2,3; 1,8 Hz,	70,3	CH ₂	C-8/C-9/C-12	H-8
O-C12	-	-	-	-		
12	6,06	d, <i>J</i> = 4,4 Hz	104,3	CH	C-9/C-10	
O-C14	-	-	-	-		
14	-	-	174,2	C		H-12
15	3,14	dq, <i>J</i> = 4,4; 2,1 Hz	52,7	CH	C-14	
16	0,87	s	25,0	CH ₃	C-1/C-4/C-5/C-6/C-15	
17	1,42	s	24,0	CH ₃	C-5	

Espectros obtidos em CD₃OD valores obtidos através das projeções de ¹³C do HSQC e gHMBC.

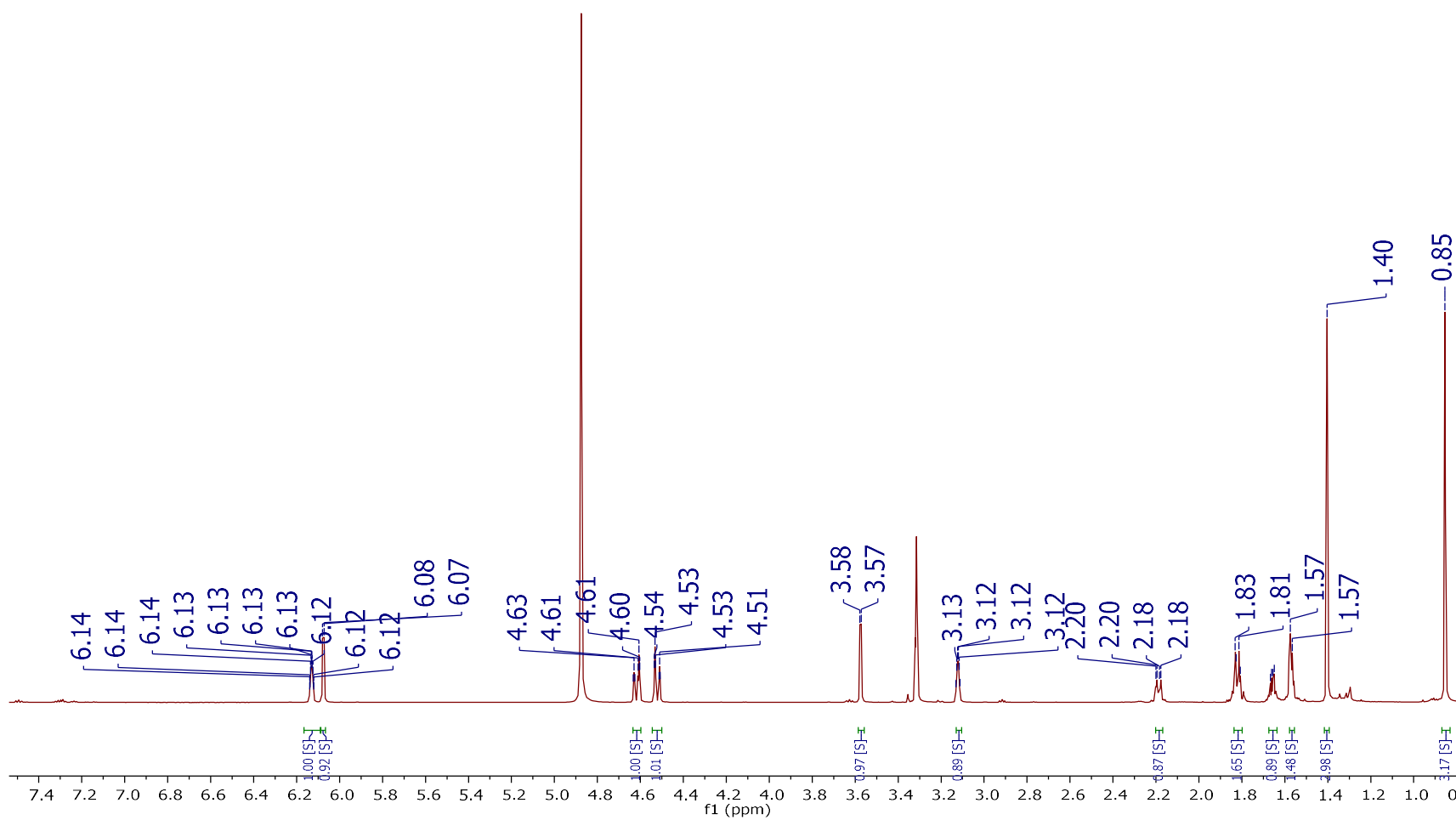
Figura 52 - Espectro de RMN de ^1H da substância 4 (CD_3OD , 600 MHz)SUBSTÂNCIA 4 RMN ^1H 

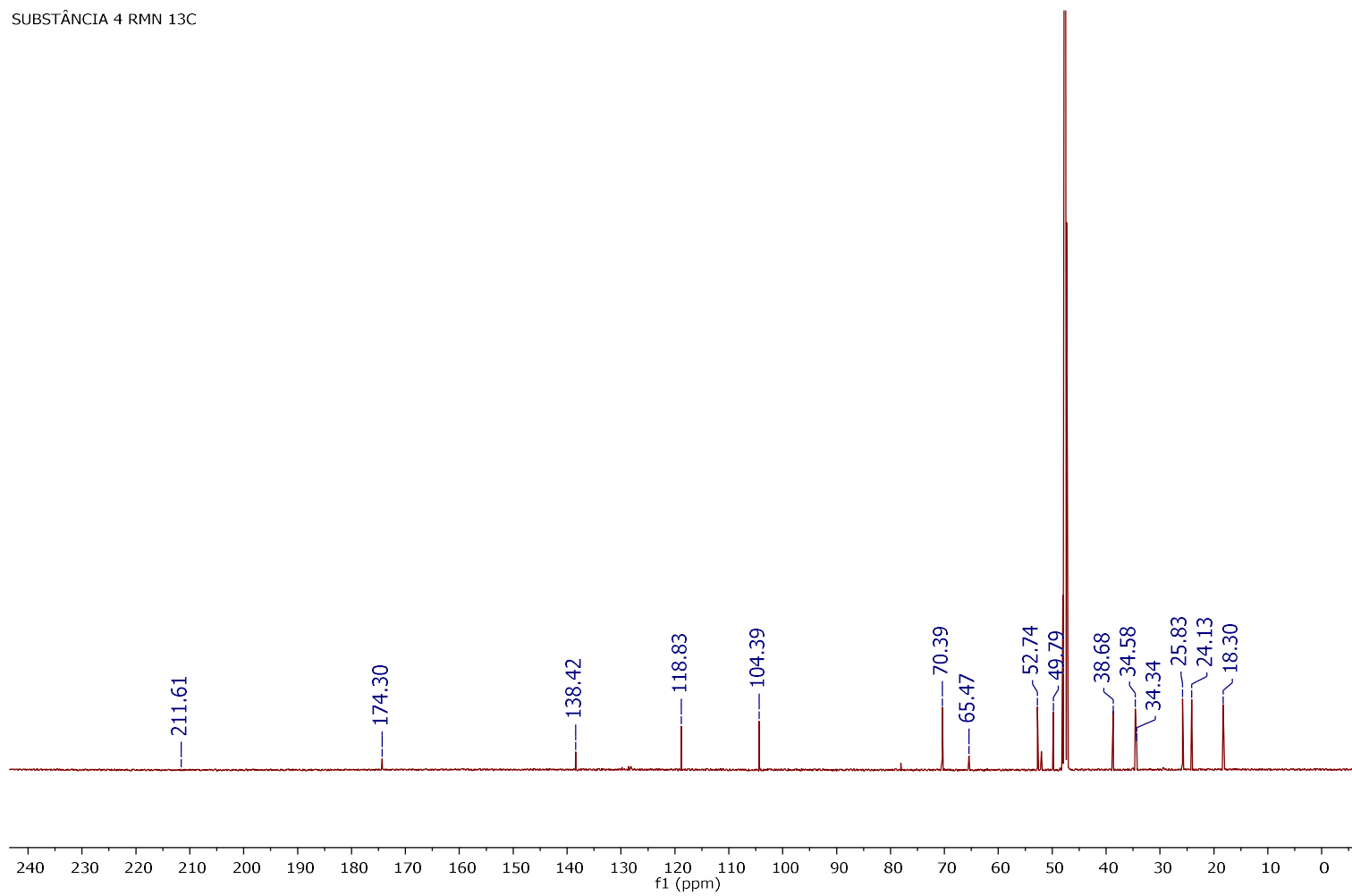
Figura 53 - Espectro de RMN de ^{13}C da substância 4 (CD_3OD , 600 MHz)

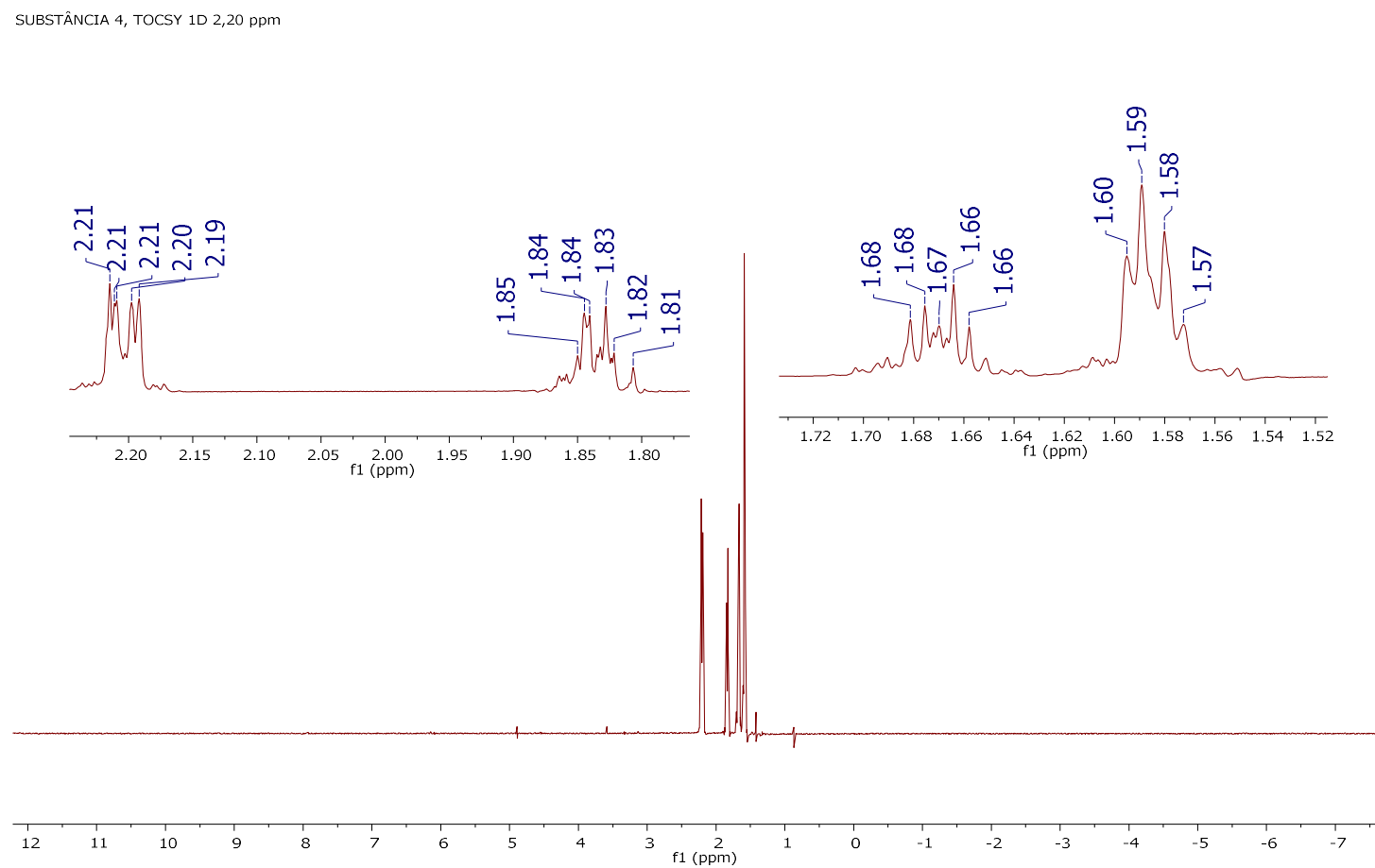
Figura 54 - Espectro de TOCSY-1D da substância 4 em 2,20 ppm (CD₃OD, 600 MHz)

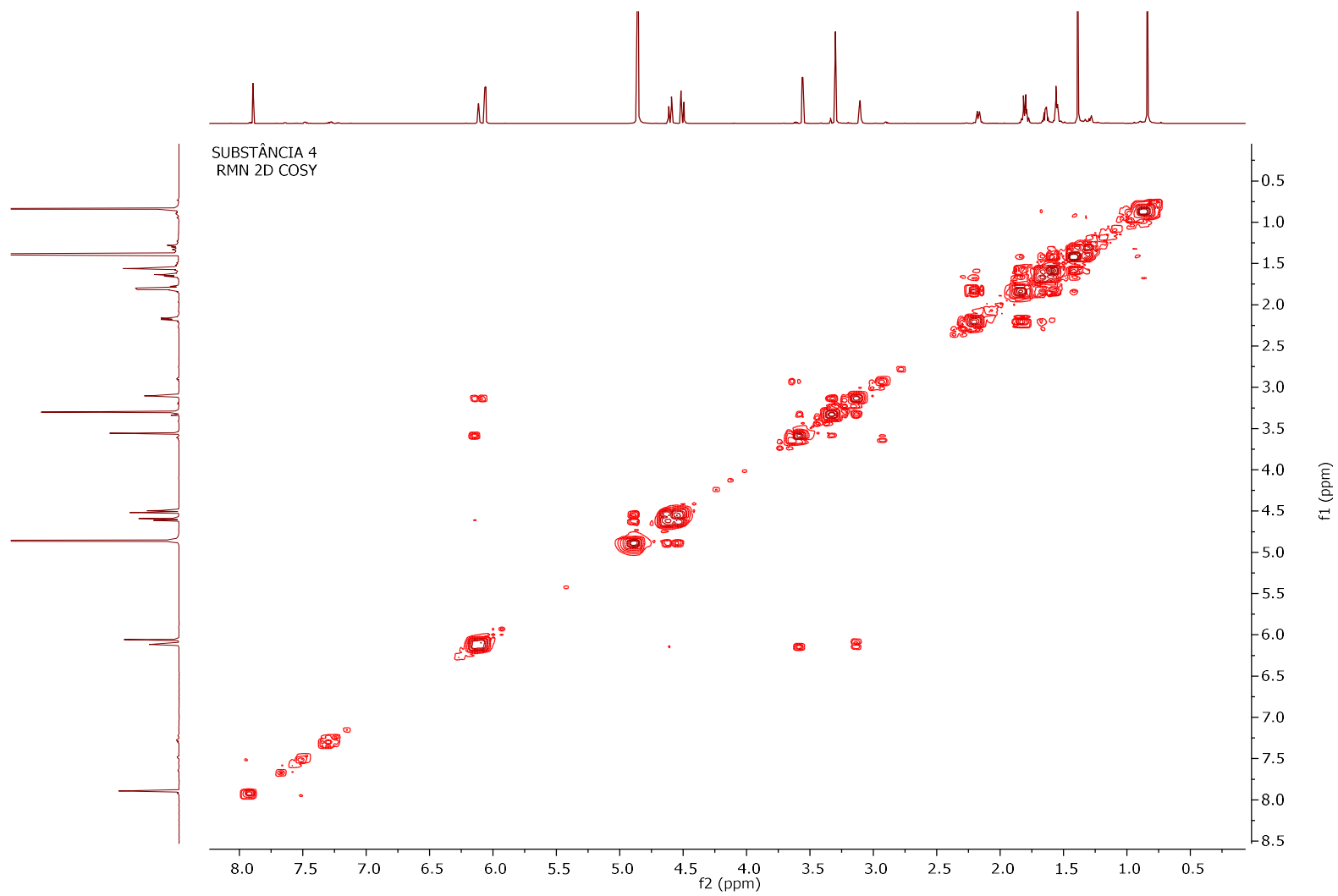
Figura 55 - Mapa de correlação gCOSY da substância 4 (CD₃OD, 600 MHz)

Figura 56 - Espectro de TOCSY-1D da substância 4, em 6,14ppm (CD₃OD, 600 MHz)

SUBSTÂNCIA 4 TOCSY 1 D 6,14 ppm

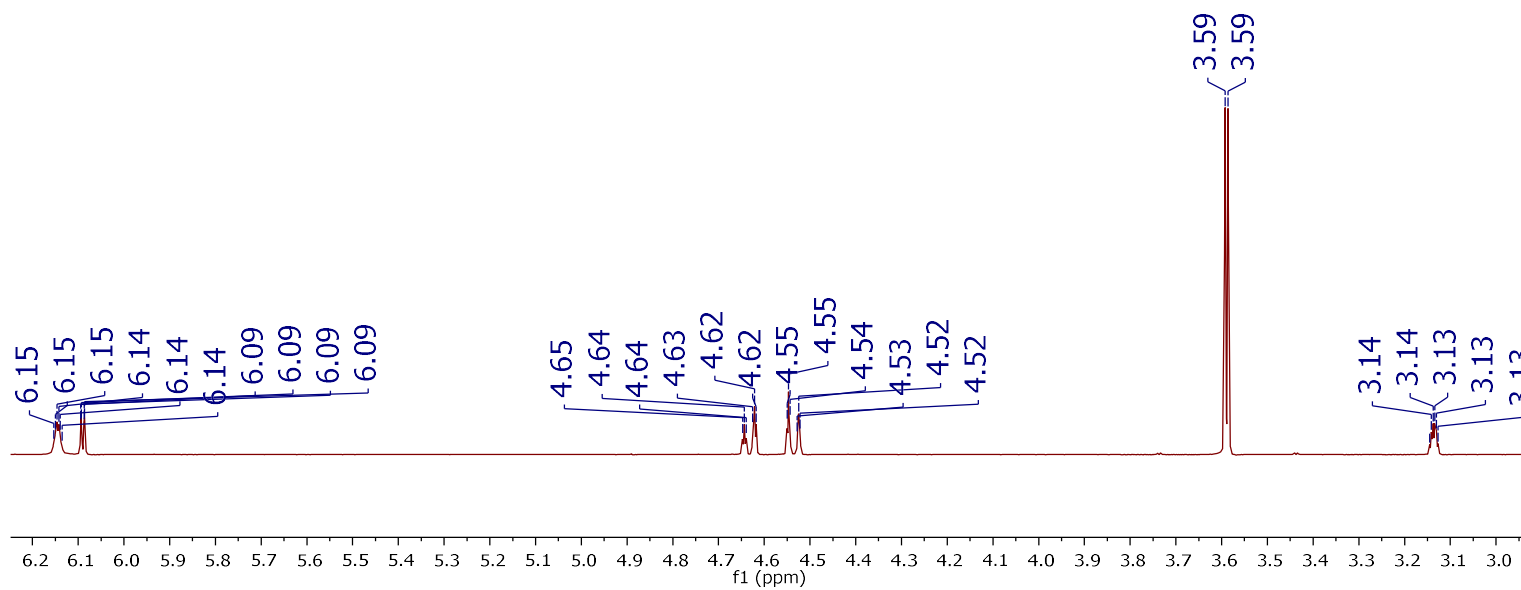


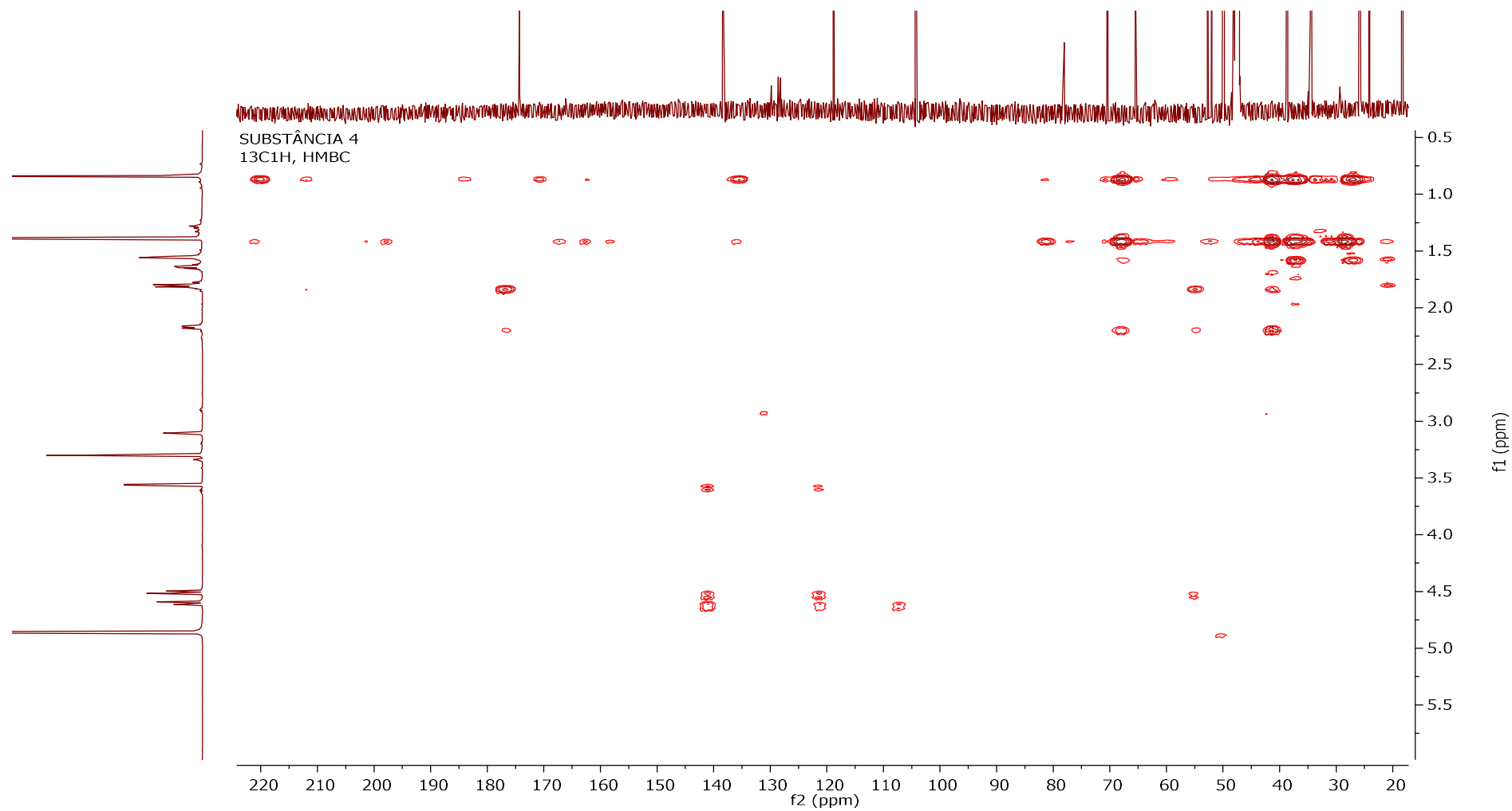
Figura 57 - Mapa de correlação H-C a longa distância (gHMBC) da substância 4 (CD₃OD, 600 MHz)

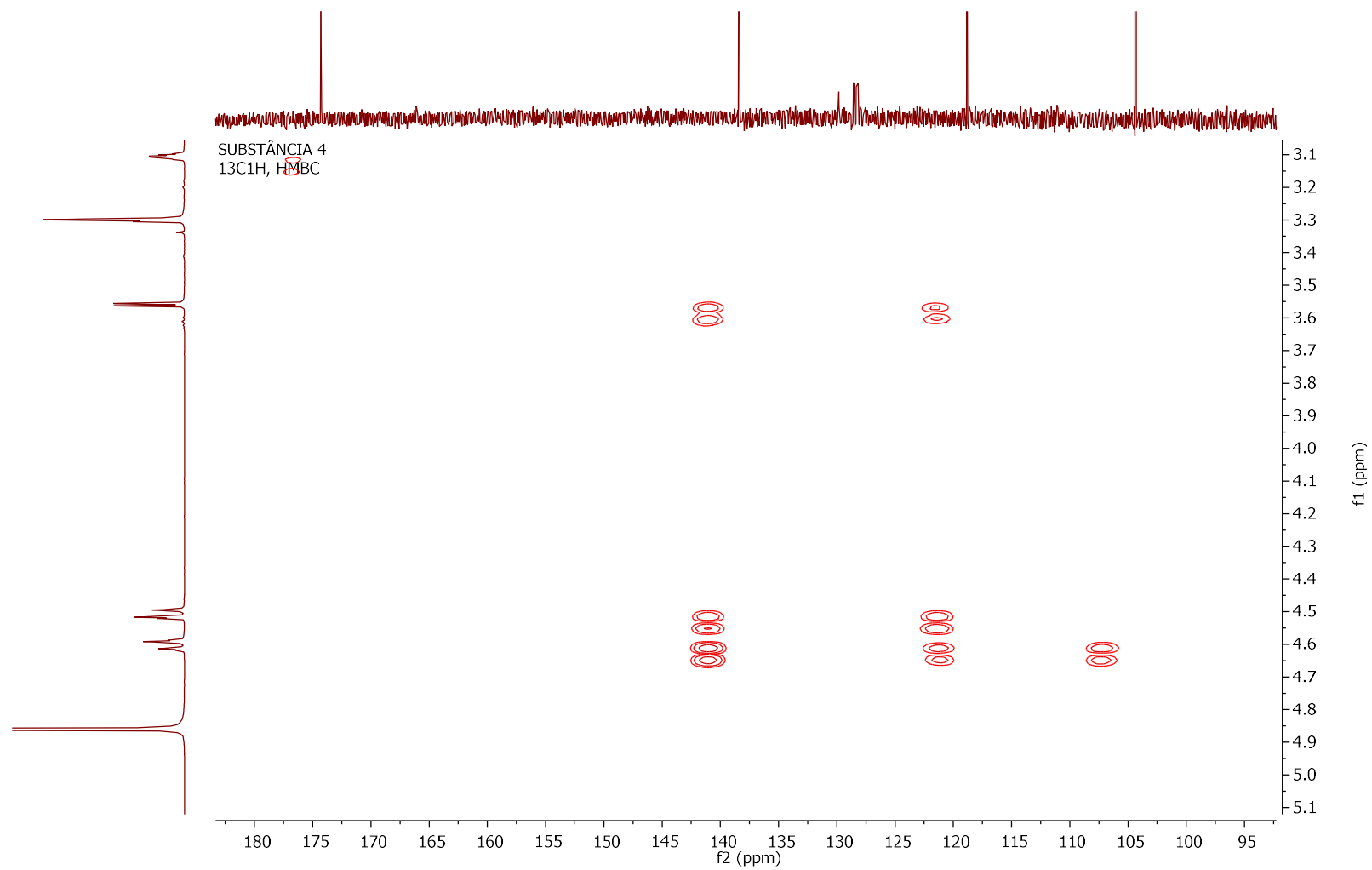
Figura 58 - Expansão das correlações H-C a longa distância (gHMBC) da substância 4 (CD₃OD, 600MHz)

Figura 59 - Espectro de DEPT 135 da substância 4 (CD₃OD, 600 MHz)

SUBSTÂNCIA 4
13C DEPT-135

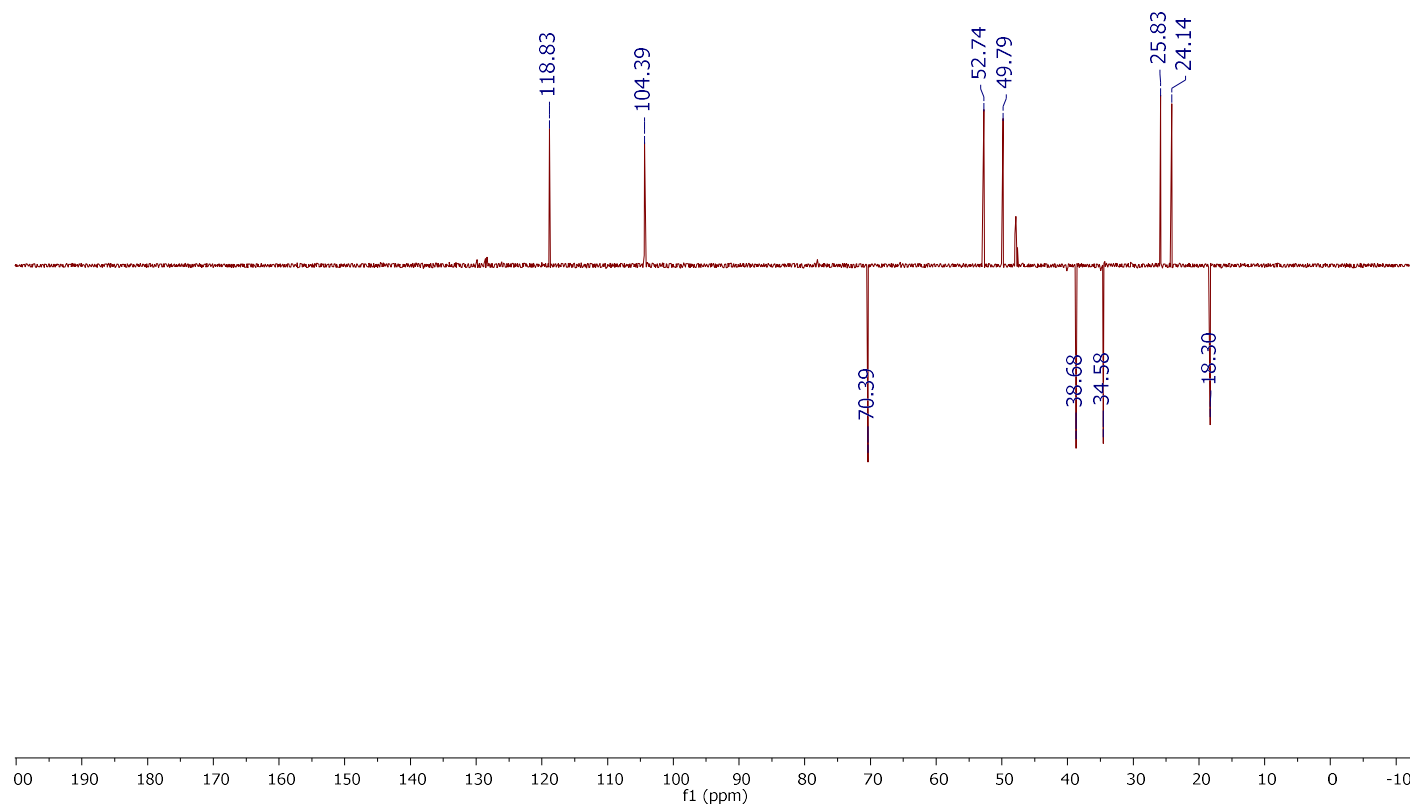


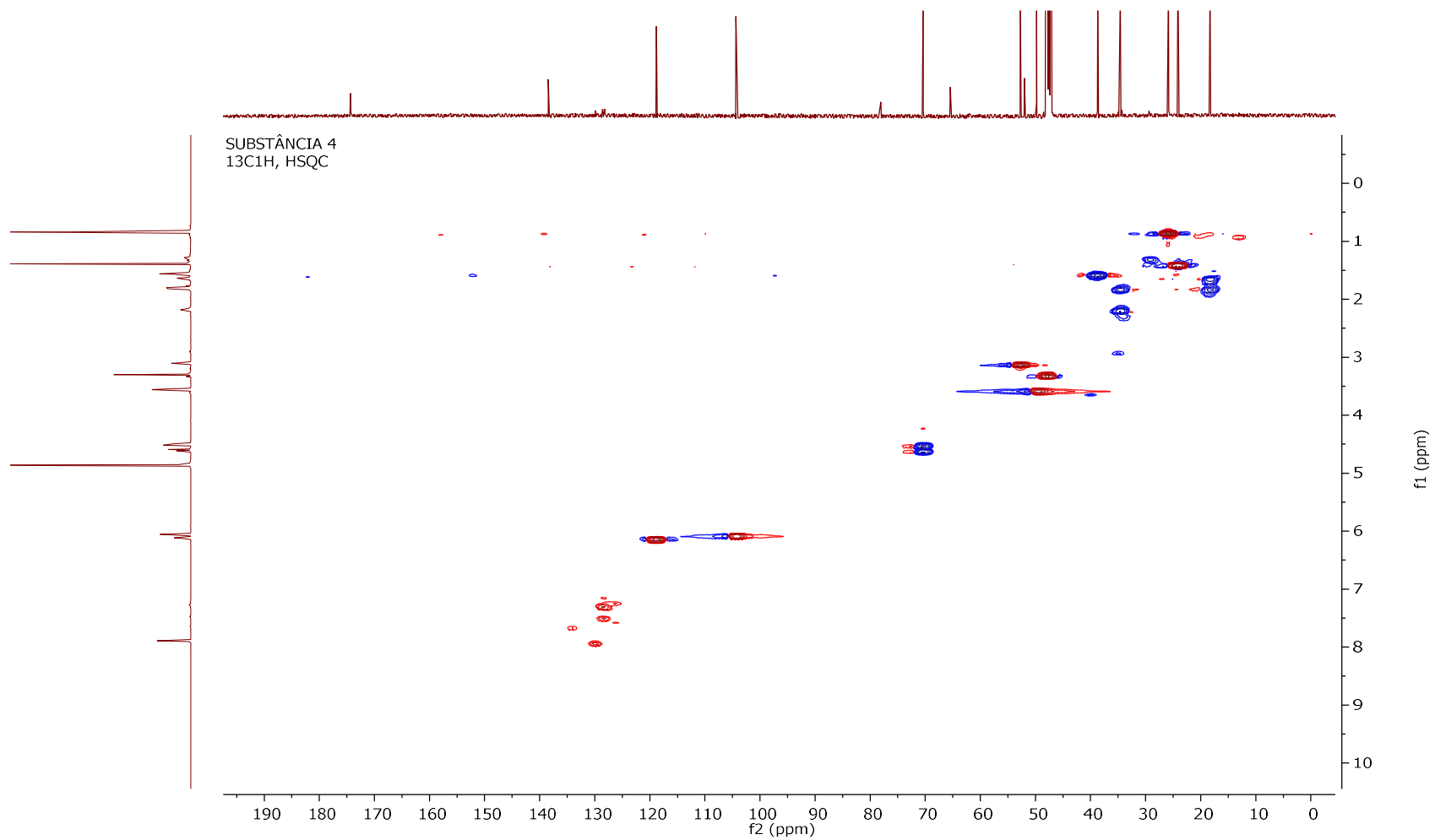
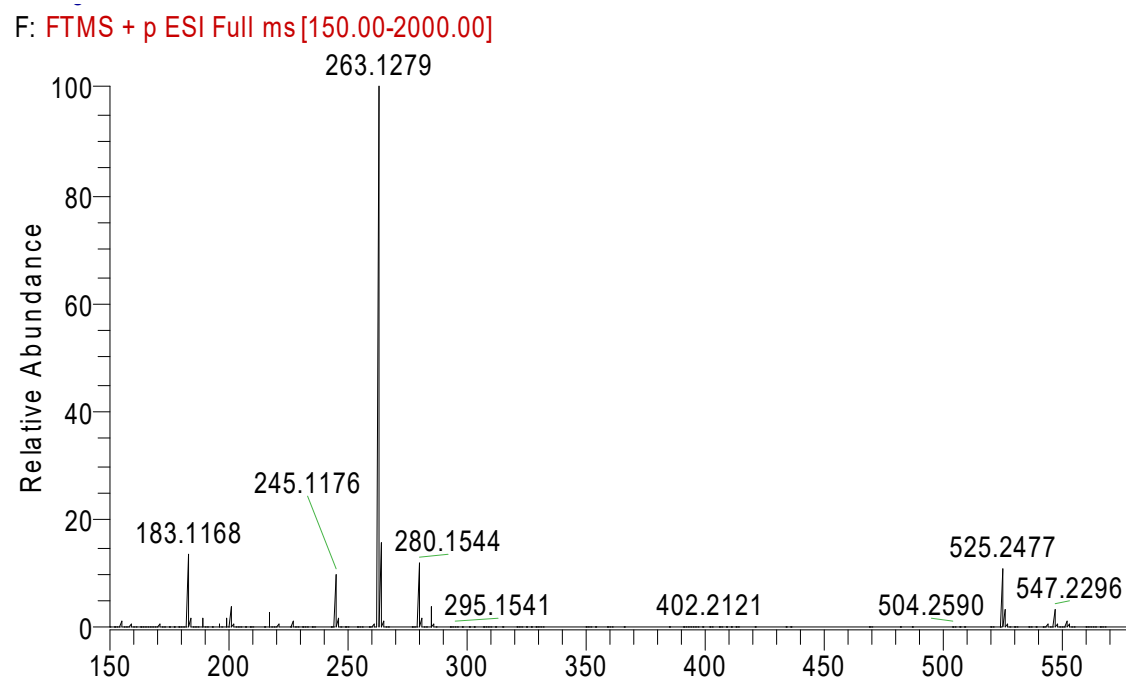
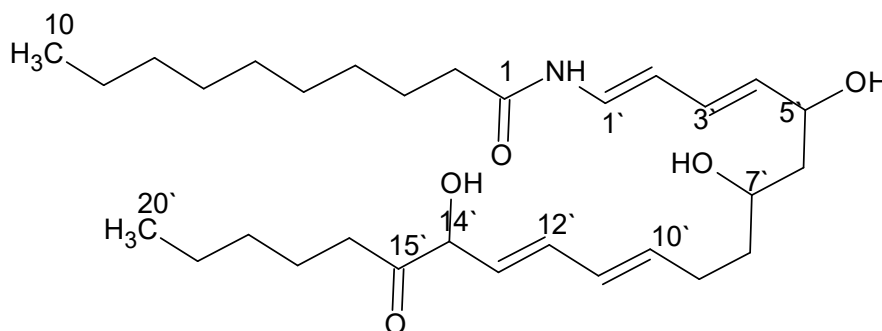
Figura 60 - Mapa de correlação H-C a uma ligação (gHSQC) da substância 4 (CD₃OD, 600 MHz)

Figura 61 – Espectro EM-IES no modo positivo (+) da molécula protonada m/z 263,1279 $[M+H]^+$, m/z 525,2477 $[2M+H]^+$ e o aduto de sódio m/z 547,2296 $[2M+Na]^+$ de (4)

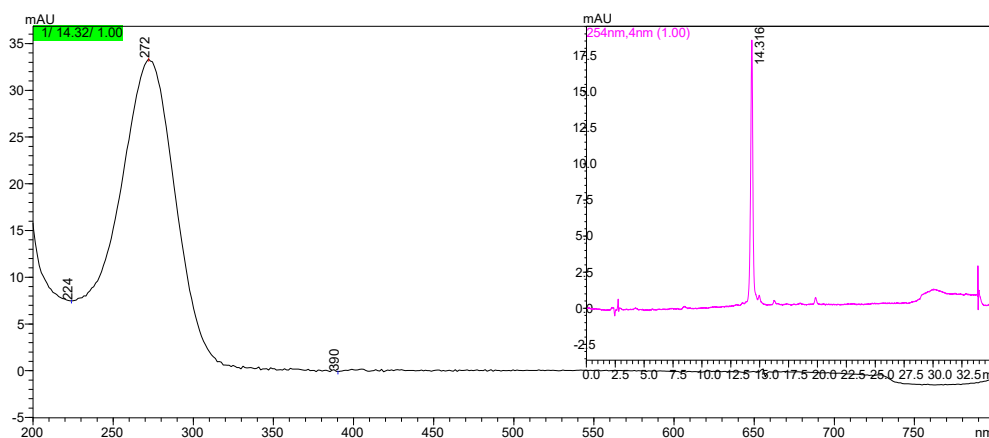


4.2.5 Determinação estrutural da substância ((1E', 3E', 10E', 12E' - N-5',7',14'-tri-hidroxi-15-oxo-icosa-1',3',10',12'-tetraenil) decanamida (5)



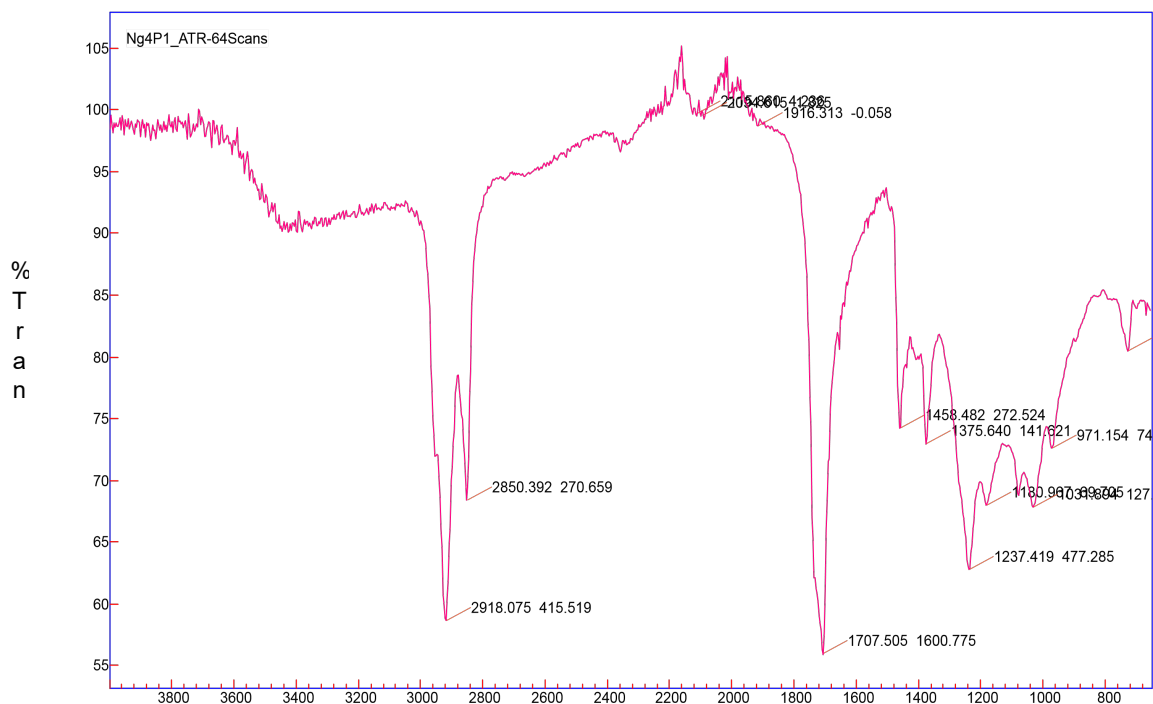
A substância **5** (12,4 mg) foi isolada como óleo amarelo claro. O espectro na região do ultravioleta UV correspondente à banda observada por meio do cromatograma analítico em CLAE-DAD (Figura 62) em MeOH apresentou banda com absorção máxima em λ_{max} 272 nm, característicos de um sistema conjugado de ligações olefínicas.

Figura 62 - Espectro na região do UV registrado em 254 nm e cromatograma analítico em CLAE-DAD e da substância **5**



O espectro na região do infravermelho IV (Figura 63) apresentou estiramento correspondente a grupos hidroxilas em 3400 cm^{-1} , grupos carbonilas em 1707 cm^{-1} e absorção atribuída às ligações C-H de carbonos sp^3 em 2918 e 2850 cm^{-1} . A fórmula molecular da substância **5** foi estabelecida como $\text{C}_{30}\text{H}_{51}\text{NO}_5$ por EM-IES (+) no modo positivo (Figura 73) pela presença do sinal m/z 529, 2731 $[\text{M}+\text{Na}+\text{H}]^+$.

Figura 63 - Espectro na região do IV da substância 5



A análise dos espectros de RMN de ^1H (Figura 65) em associação com os experimentos de RMN de ^{13}C (Figura 66), DEPT-135 (Figura 67) e o mapa de contorno do experimento gHSQC (Figura 68) permitiram visualizar um triplo em δ 0,90 (t, $J = 6,9$ Hz, 6H, H-10 e H-20'), atribuído aos hidrogênios das metilas; três hidrogênios carbinólicos, sendo dois multipletos em δ 3,48 (m, 1H, H-7'); δ 3,96 (m, 1H, H-14') e um quarteto em δ 4,15 (q, $J = 6,0$ Hz; 1H, H-5'). Foram observados ainda cinco dupletos de dupletos em δ 6,56 (dd, $J = 15,3; 11,1$ Hz, 1H, H-12'), δ 6,40 (dd, $J = 15,3; 10,9$ Hz, 1H, H-3'), δ 7,26 (dd, $J = 15,3; 10,9$ Hz, 1H, H-1'), δ 6,25 (dd, $J = 15,3; 6,5$ Hz, 1H, H-4') e δ 5,75 (dd, $J = 15,3; 7,0$ Hz, 1H, H-13'), assim como um duplete largo em δ 6,20 (dl, $J = 15,3; 1$ Hz, H-2'), um multiplete δ 5,42 (m, 1H, H-10') e um triplo em δ 6,01 (t, $J = 11,0$ Hz, 1H, H-11'), todos esses sinais se referem aos hidrogênios olefínicos. Adicionalmente, foram observados dois tripletos em δ 2,61 (t, $J = 7,4$ Hz, 2H, H-16') e em δ 2,27 (t, $J = 2,3$ Hz, 2H, H-2) correspondentes aos hidrogênios α carbonila cetônica e α carbonila da amida, e treze sinais de multipletos para hidrogênios metilênicos, descritos na Tabela 8.

O RMN de ^{13}C e DEPT-135 associado ao experimento de gHSQC exibiram duas carbonilas, uma em δ 203,5 (C-15') e a outra em 176,3 (C-1); onze carbonos metínicos em δ 76,8 (C-14'); 75,6 (C-7'); 131,6 (C-10'); 128,0 (C-11'); 126,9 (C-12'); 133,0 (C-13'), 72,5 (C-5'), 148,4 (C-4'), 127,3 (C-3'), 144,3 (C-1') e 128,9 (C-2'); quinze carbonos metilênicos

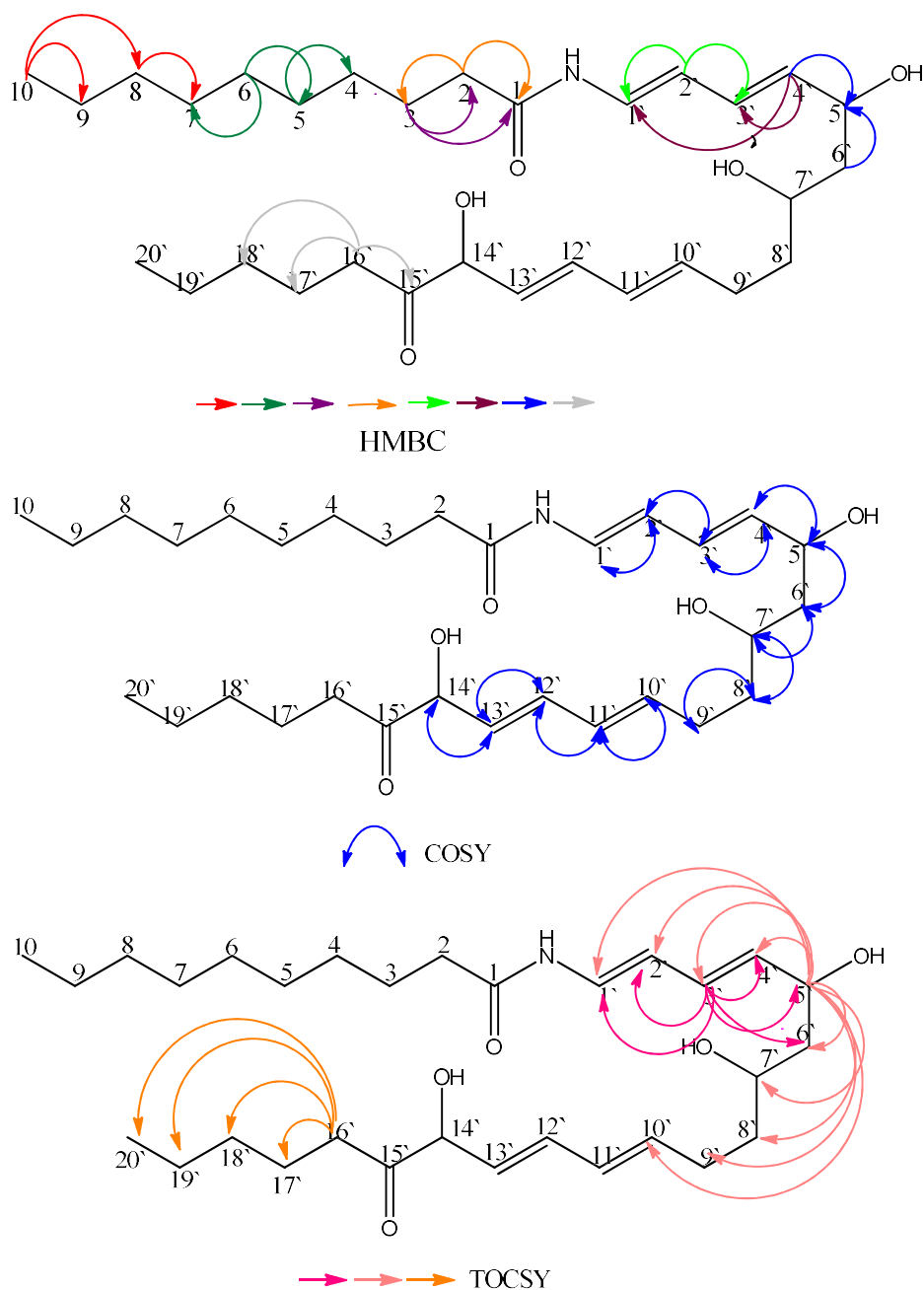
em δ 40,9 (C-16'); 37,9 (C-6'); 34,6 (C-2), 33,5 (C-9'), 31,5 (C-8); 31,1 (C-18'), 28,8 (C-7); 28,8 (C-6), 28,6 (C-18'), 28,5 (C-17'), 24,7 (C-5), 24,7 (C-3), 24,5 (C-4), 23,9 (C-19'), 22, 2 (C-9); e dois carbonos metílicos δ 14,4 (C-10) e 14,9 (C-30').

No mapa de contorno de gHMBC (Figura 69 e 70) da substância **5**, foram observadas correlações existentes entre H-10 e C-8/C-9; o H-8 com C-7; H-2 correlacionando com C-1, C-3 e C-4; e ainda correlação entre H-3 com C-1, C-2 e C-4. Foram observadas também interações entre H-2' e C-1'/C-3'; H-4' com C-1' e C-3'; e o H-5' com C-6'. Ainda no experimento de gHMBC foi possível observar as correlações entre H-9' e C-8' e o H-16' com C-15', C-17' e C-18'.

A análise do mapa de contorno de gCOSY (Figura 71) evidenciou as correlações entre H-2 e H-3, H-5 e H-6, e H-9 e H-10. Complementarmente, no experimento de gCOSY, foram observadas correlações entre o hidrogênio carbinólico H-5' e H-4'/H-6', estes associados com as correlações observadas em gHMBC entre H-5' e o C-6', H-6' com C-4', em colaboração com os valores dos deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C permitiram confirmar a posição de duas das quatro instaurações. E as correlações observadas entre os hidrogênios H-7', H-9', H-10', H-11', H-12', H-13' e H-14' confirmaram a posição das demais ligações duplas e das hidroxilas em OH-7' e OH-14'. Foi observado também correlação entre H-19' e H-20' possibilitando propor a fórmula molecular $\text{C}_{30}\text{H}_{51}\text{NO}_5$ para substância **5**.

E através do experimento de TOCSY 1D (Figura 72), foi possível observar dois sistemas de acoplamentos comuns entre hidrogênios da molécula. O primeiro foi observado quando irradiado em δ 2,61 (H-16') no qual se observou interações entre H-16' \leftrightarrow H-20', e o segundo sistema foi observado a partir da irradiação dos hidrogênios em δ 4,15 (H-5') e δ 6,40 (H-3'), observando-se as interações comuns entre H-1', H-2', H-3', H-4', H-5', H-6', H-8', H-9' e H-10' que estão em concordância com os dados de gHMBC e gCOSY.

As análises de todos esses dados estão apresentadas na Tabela 8 e as principais correlações gHMBC, gCOSY e interações de TOCSY da substância **5** estão apresentadas na Figura 64.

Figura 64 - Principais correlações gHMBC, COSY e interações de TOCSY da substância **5**

A análise de todos os dados obtidos aliados ao espectro de massas EM-IES (Figura 73) no modo positivo (+) confirmou a fórmula molecular de $C_{30}H_{51}NO_5$, permitindo propor para a substância **5** o nome de *(1E', 3E', 10E', 12E')*-N-(5', 7', 14'-tri-hidroxi-15-oxo-icosa-1', 3', 10', 12'-tetraenil)decanamida, substância inédita na literatura.

Tabela 8 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C de ((1E', 3E', 10E', 12E' - N-(5',7',14'-tri-hidroxi-15-oxo-icosa-1',3',10',12'-tetra-enil)-decanamida (5) em CD₃OD, δ (Multiplicidade, J em Hz)

C	Substância (5)					
	δH^*	$\delta^1\text{H}$, mult, J em Hz	δC^*	Multip.	gHMBC (H→C)*	gCOSY
01	-	-	176,3	C	-	
02	2,27	t, J = 2,3 Hz	34,6	CH ₂	C-1/C-3/C-4	
03	1,60	m	24,7	CH ₂	C-1/C-2/C-4	
04	1,37	m	24,5	CH ₂	C-8	
05	1,42	m	24,7	CH ₂	C-6	
06	1,39	m	28,8	CH ₂		
07	1,34	m	28,8	CH ₂	C-8	
08	1,31	m	31,5	CH ₂	C-7	
09	1,32	m	22,2	CH ₂	C-9	
10	0,90	t, J = 6,9 Hz	14,4	CH ₃	C-8/C-9	
1'	7,26	dd, J = 15,3; 10,9 Hz	144,3	CH		H-2'
2'	6,20	d, J = 15,3 Hz	128,9	CH	C-1'/C-3'	H-3'
3'	6,40	dd, J = 15,3; 10,9 Hz	127,3	CH		H-4'
4'	6,25	dd, J = 15,3; 6,5 Hz	148,4	CH	C-1'/C-3'	H-5'
5'	4,15	q, J = 6,5 Hz	72,5	CH	C-6'	H-6'
6'	1,53	m	37,9	CH ₂	C-5'	H-7'
7'	3,48	m	75,6	CH		H-8'
8'	1,41	m	28,6	CH ₂		H-9'
9'	2,22	q, J = 7,8 Hz	33,5	CH ₂	C-8'	
10'	5,42	d, J = 7,8 Hz	131,6	CH		H-11'
11'	6,01	t, J = 11,0 Hz	128,0	CH		H-12'
12'	6,56	dd, J = 15,3; 11,1 Hz	126,9	CH		H-13'
13'	5,75	dd, J = 15,3; 7,0 Hz	133,0	CH		H-14'
14'	3,96	d, J = 6,6 Hz	76,8	CH		
15'	-	-	203,5	C	-	
16'	2,61	t, J = 7,4 Hz	40,9	CH ₂	C-15'/C-17'/C-18'	
17'	1,44	m	28,5	CH ₂		
18'	1,41	m	28,6	CH ₂		
19'	1,33	m	23,9	CH ₂	C-18'	
20'	0,90	t, J = 6,9 Hz	14,9	CH ₃	C-19'	H-19'

Espectros obtidos em CD₃OD; * valores obtidos através das projeções de carbono do HSQC e gHMBC.

Figura 65 - Espectro de RMN de ^1H da substância **5** (CD_3OD , 600 MHz)

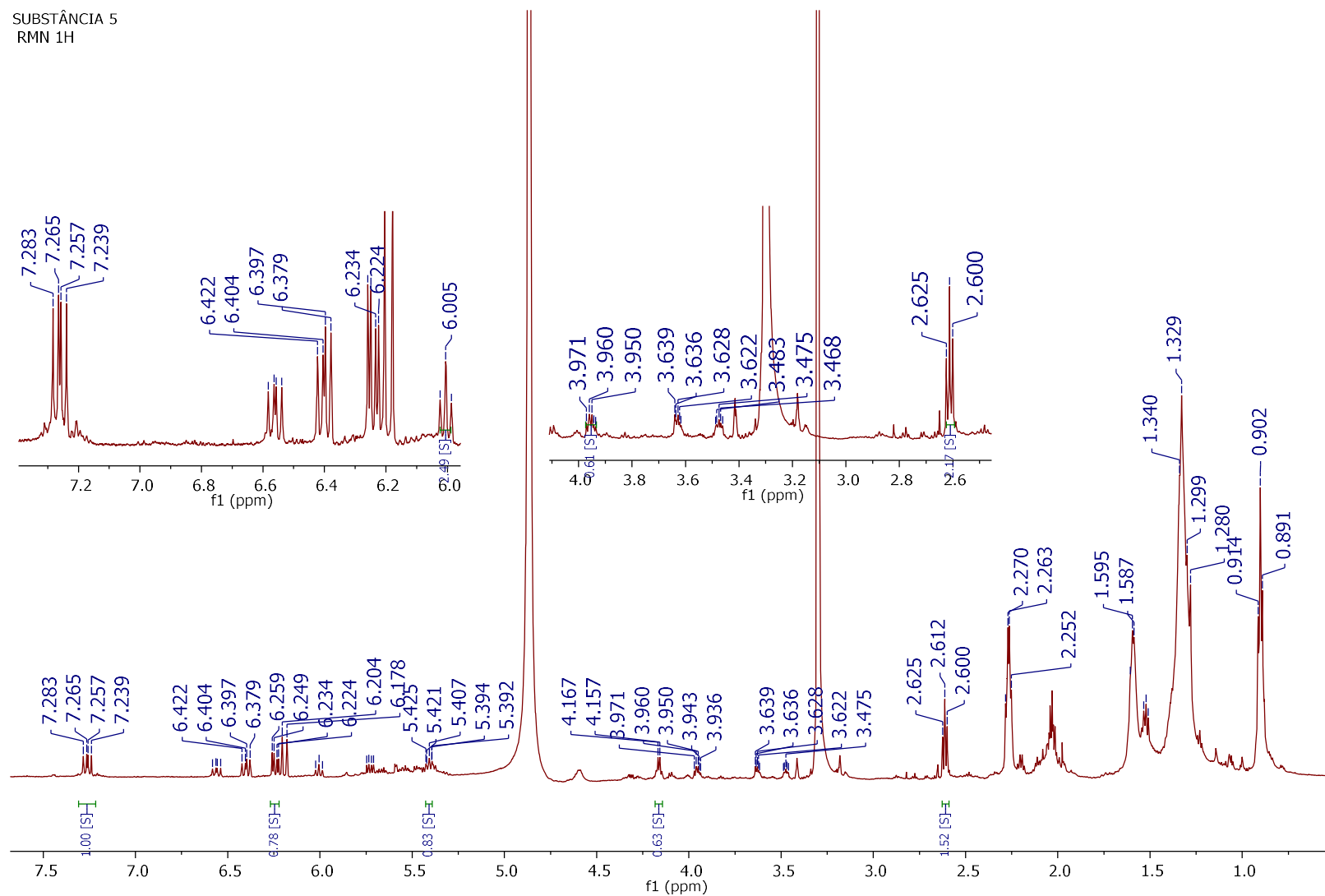


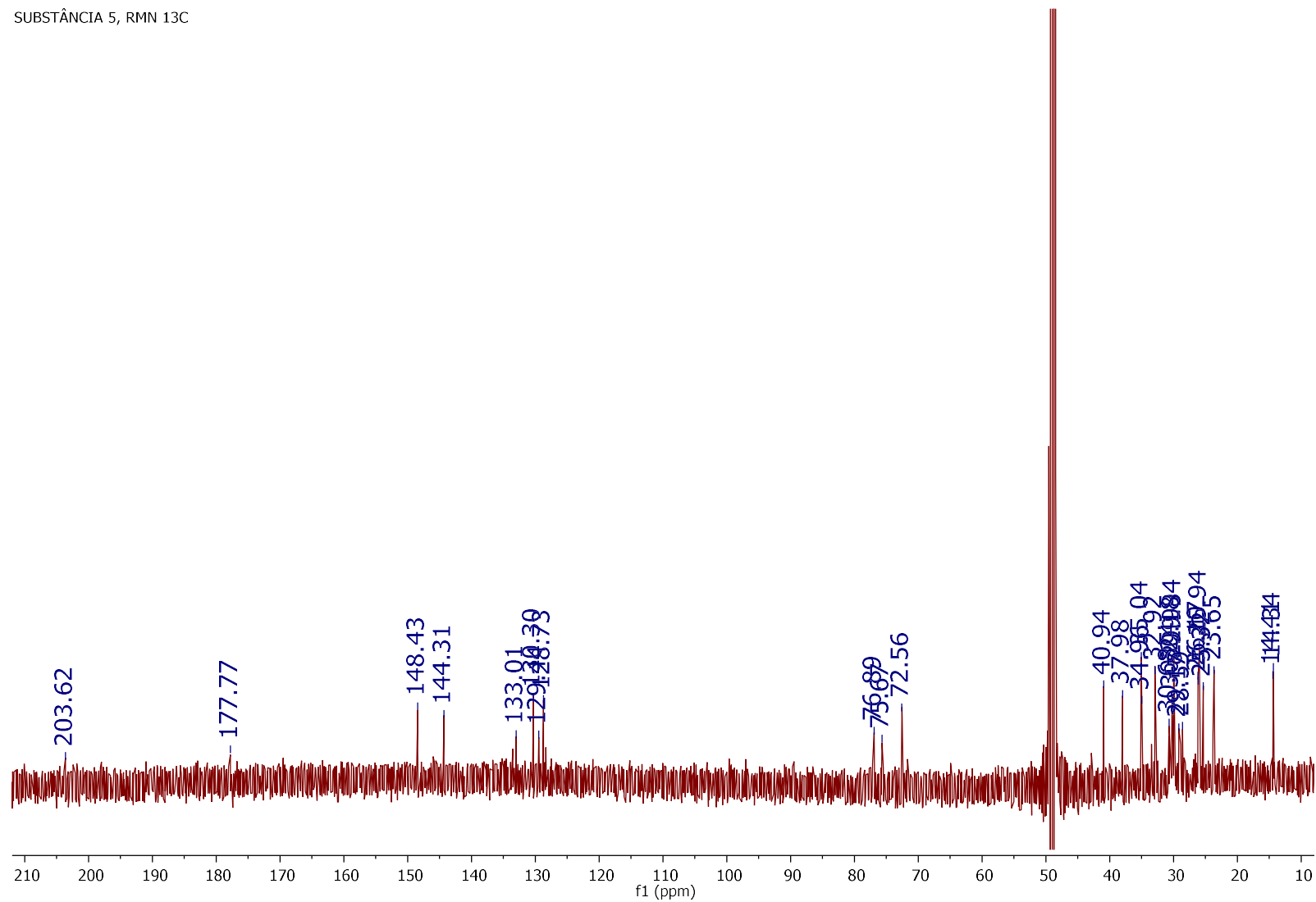
Figura 66 - Espectro de RMN de ^{13}C da substância **5** (CD_3OD , 600 MHz)SUBSTÂNCIA 5, RMN ^{13}C 

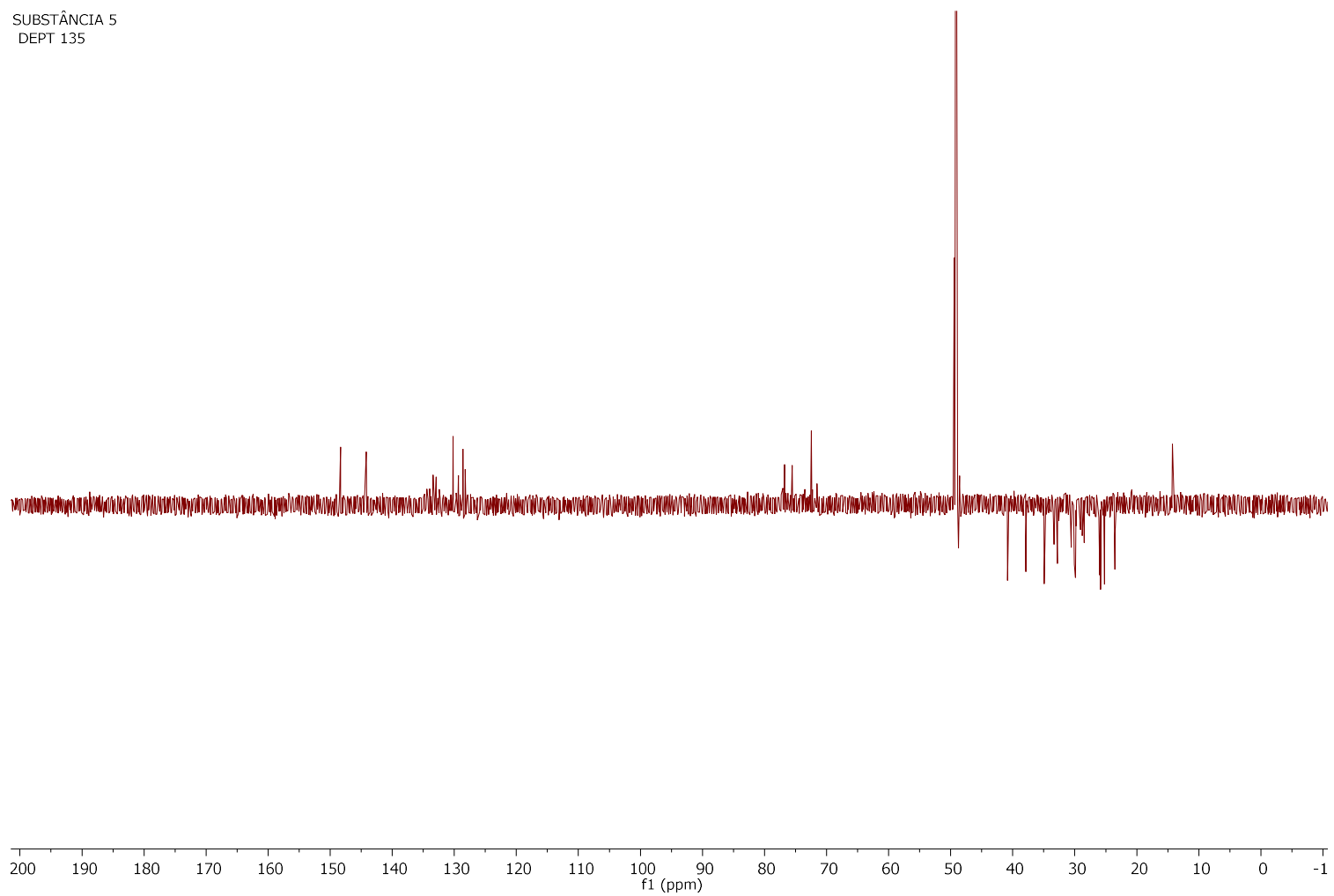
Figura 67 - Espectro de DEPT-135 da substância 5 (CD₃OD, 600 MHz)

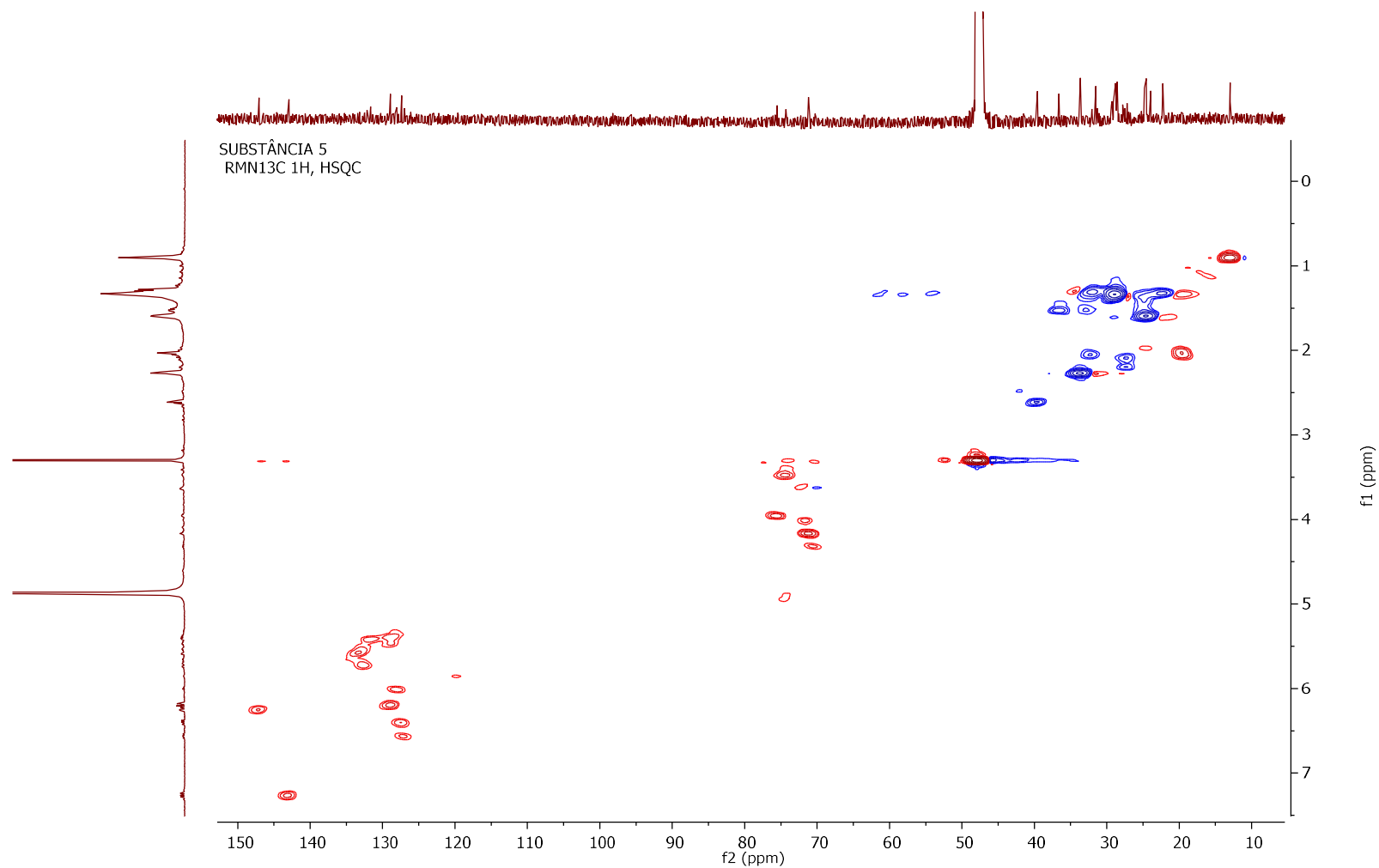
Figura 68 - Mapa de correlação H-C a uma ligação (HSQC) da substância **5** (CD₃OD, 600 MHz)

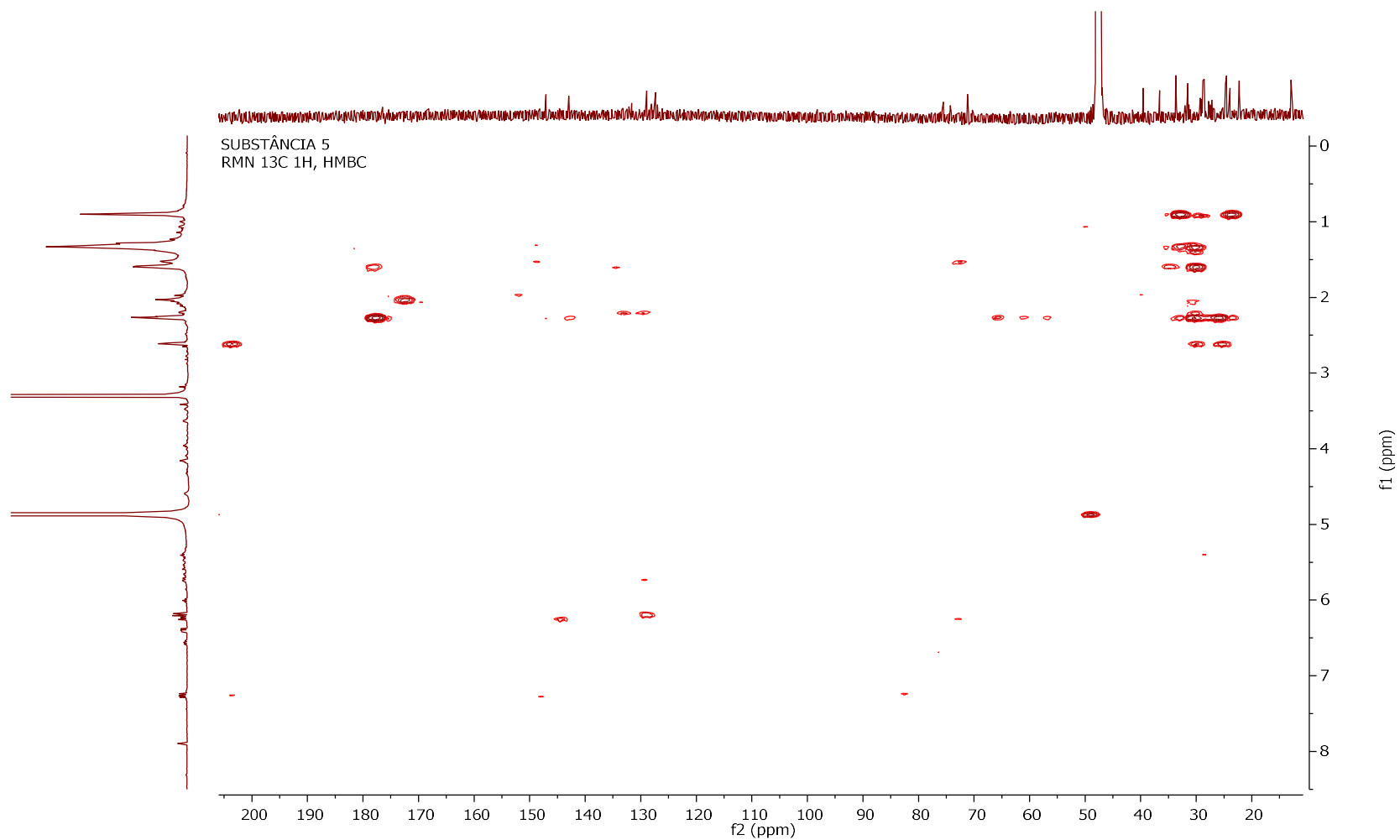
Figura 69 - Mapa de correlação H-C a longa distância (gHMBC) da substância **5** (CD₃OD, 600 MHz)

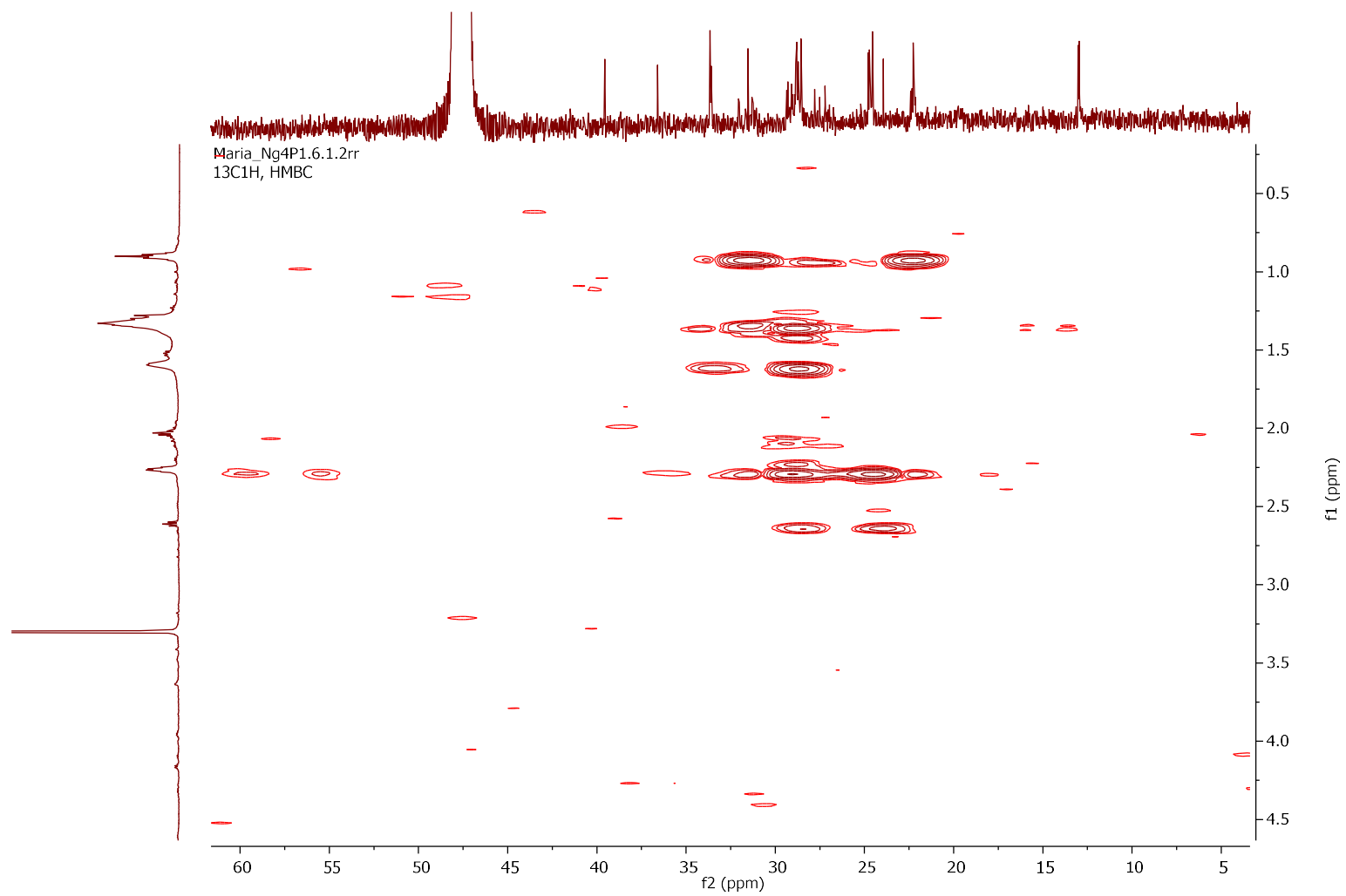
Figura 70 - Expansão do Mapa de correlação H-C a longa distância (gHMBC) da substância **5** (CD₃OD, 600 MHz)

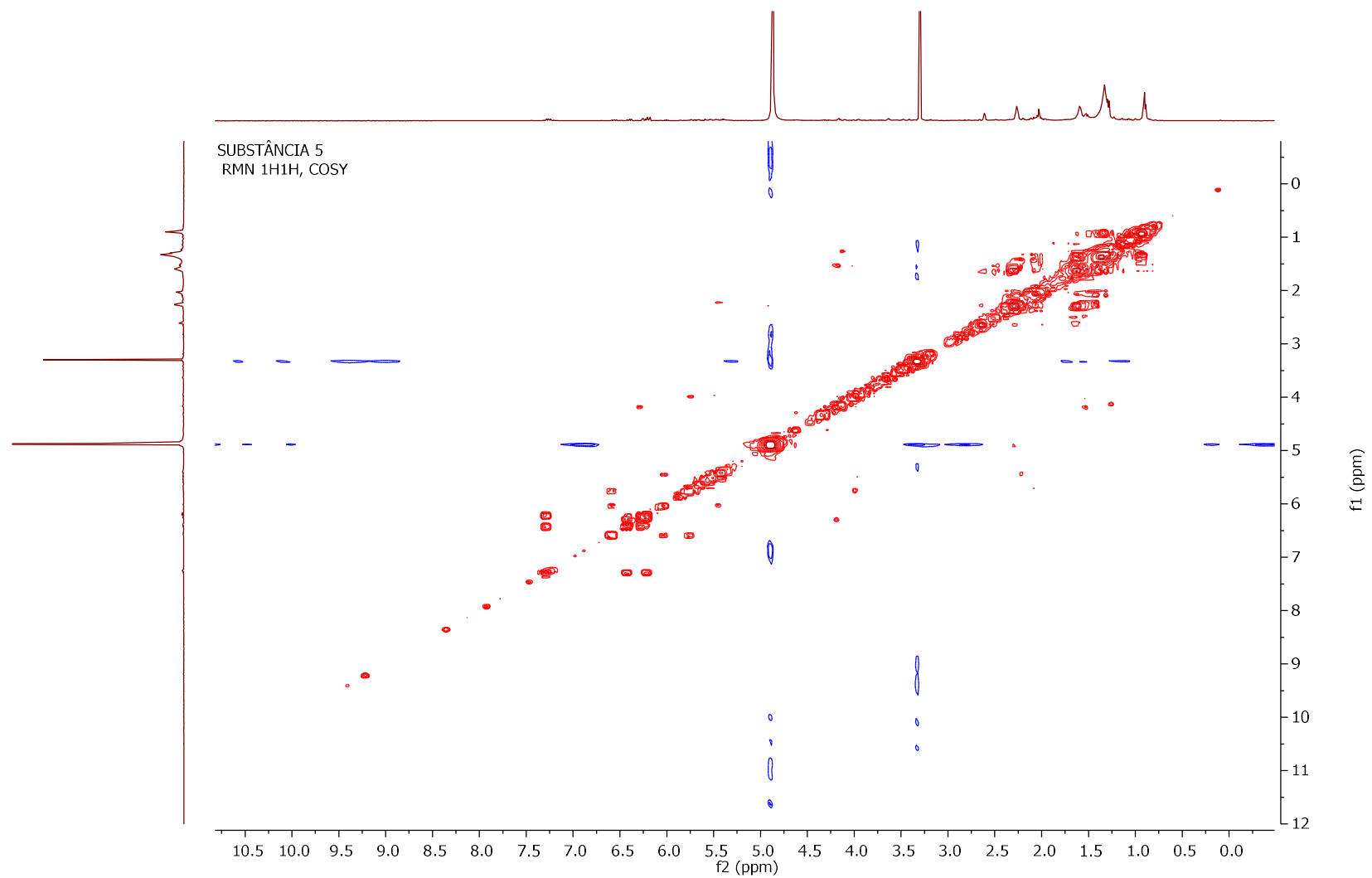
Figura 71 - Mapa de correlação COSY da substância 5 (CD₃OD, 600 MHz)

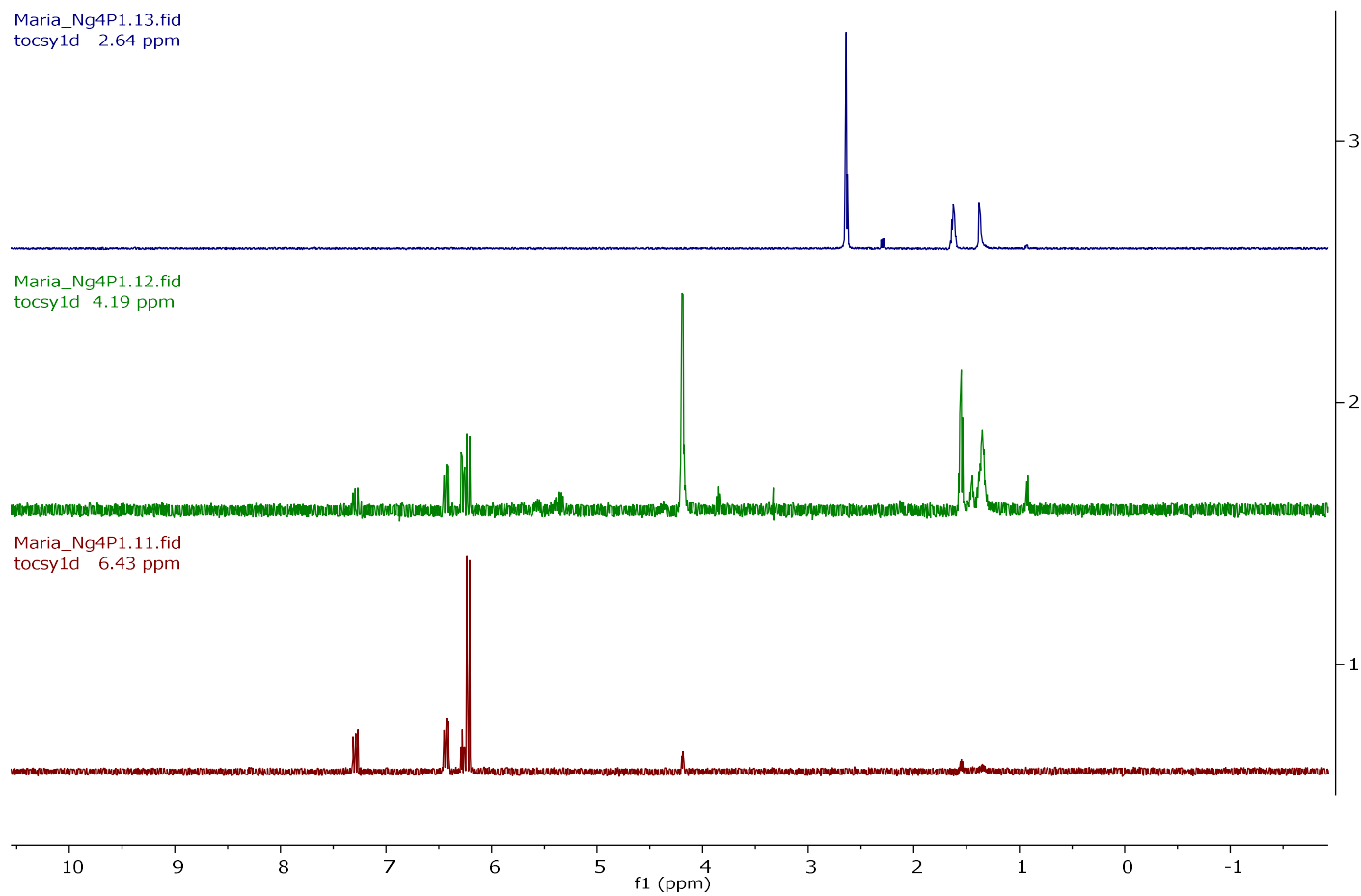
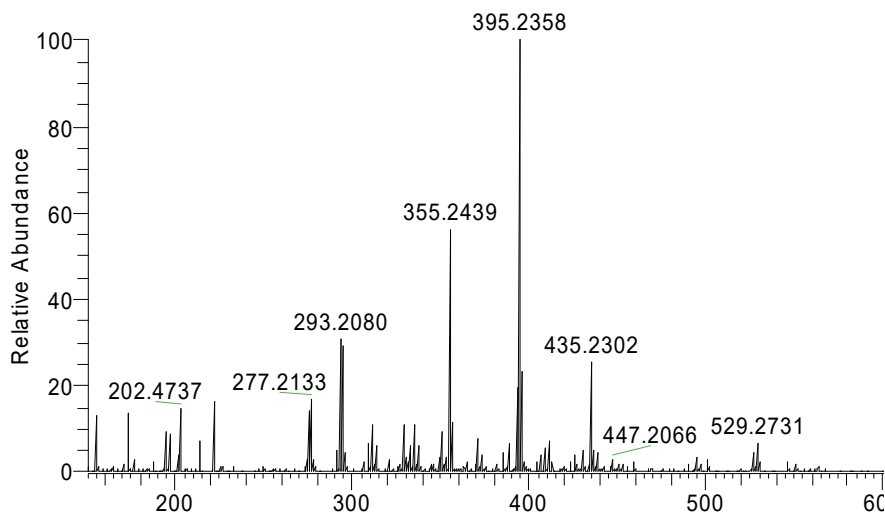
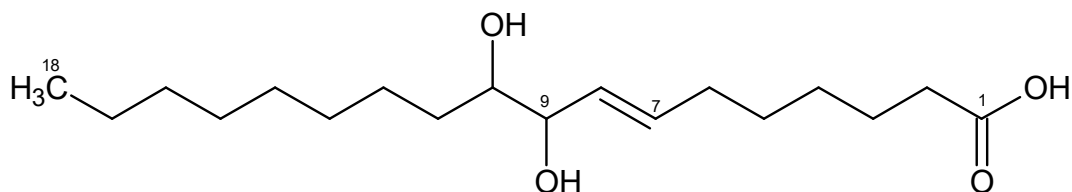
Figura 72 - Espectro de TOCSY-1D da substância **5** (CD₃OD, 600 MHz)

Figura 73 - Espectro de massas EM-IES no modo positivo (+) apresentou a molécula ionizada em m/z 529,2731 $[M+Na+H]^+$ da substância **5**

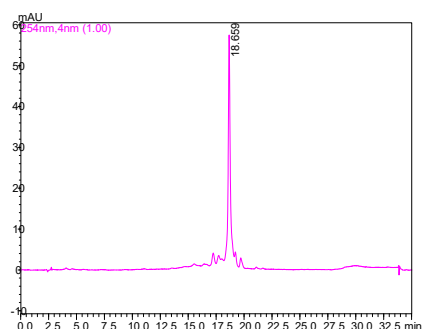


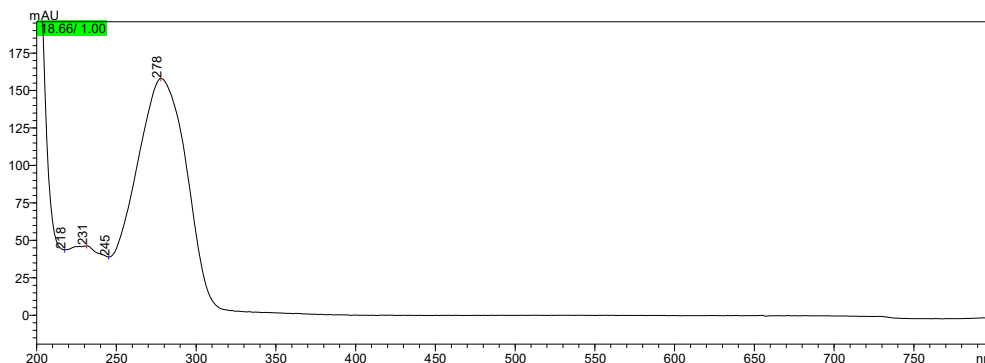
4.2.6 Determinação estrutural da substância ácido (7E) - 9,10-di-hidroxi-octadeca-7-enóico (6)



A substância **6** (12,0 mg) foi obtida como um óleo amarelado. O espectro no UV (Figura 74) em MeOH obtido a partir da análise do cromatograma em CLAE-DAD (Figura 74) apresentou uma banda de absorção máxima em λ_{\max} 278 nm, característico de insaturações presentes na molécula.

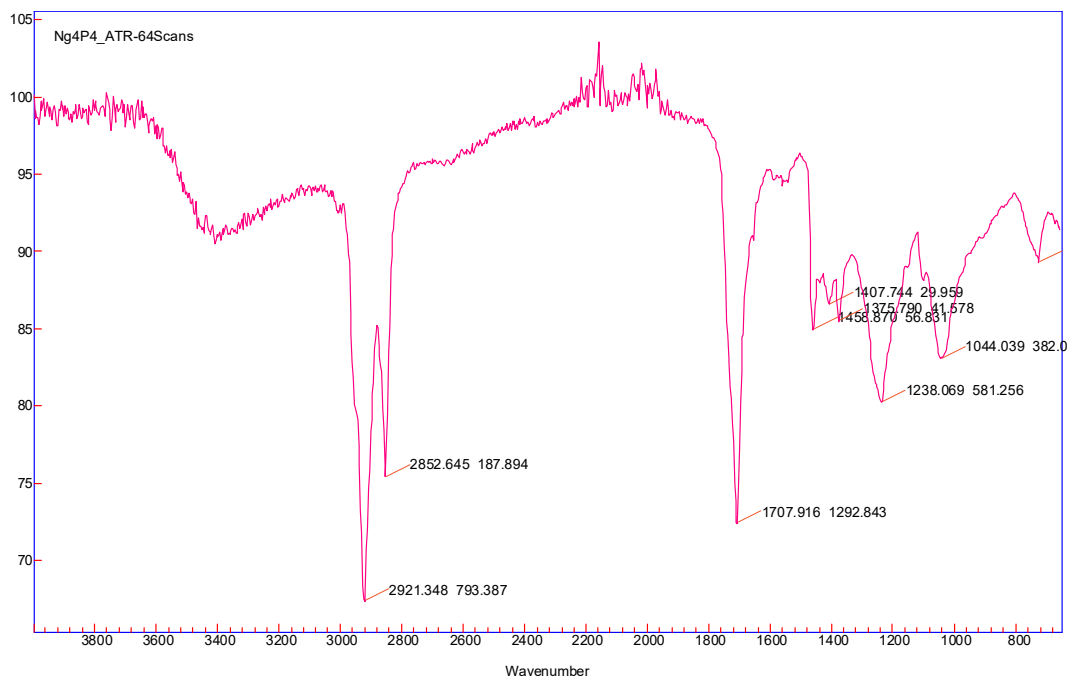
Figura 74 - Espectro UV registrado em 254 nm e cromatograma analítico em CLAE-DAD da substância **6**





O espectro na região do infravermelho IV (Figura 75) apresentou bandas de absorção em 3484 cm^{-1} atribuídas ao estiramento da ligação O-H da hidroxila, em 1707 cm^{-1} foi observado estiramento atribuído à ligação C=O da carbonila. Observou-se ainda absorção em 2924 cm^{-1} correspondente às ligações C-H de carbonos sp^3 . A fórmula molecular da substância **6** foi estabelecida como $\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_4$ por EM-IES (-) no modo negativo (Figura 84) apresentando os sinais: m/z 313, 4589 ($[\text{M}-\text{H}]^-$) e m/z 627,2690 $[2\text{M}-\text{H}]^-$, e no modo positivo EM-IES (+) m/z 337,2327 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, m/z 629,4941 $[2\text{M}+\text{H}]^+$ e m/z 651,4756 $[2\text{M}+\text{Na}]^+$ (Figura 85).

Figura 75 - Espectro na região do IV da substância **6**



O espectro de RMN ^1H (Figura 77), ^{13}C (Figura 78) associado ao experimento gHSQC (Figura 80) da substância **6** apresentou um tripleto atribuído à metila em δ 0, 92 (t; $J=7,0\text{ Hz}$; 3H, H-18); dois hidrogênios carbinólicos, sendo um duplete de duplete de

duplete δ 3,38 (ddd; $J = 8,9; 6,6; 2,7$ Hz; 1H, H-10) e um duplete de duplete em δ 4,20 (dd, $J = 9,1; 6,7$, Hz; 1H, H-9). De forma adicional, foi observado um duplete de triplete duplete em δ 5,39 (dtd, $J = 11,0; 9,3; 1,7$ Hz, 1H, H-7), um duplete de duplete largo δ 5,59 (ddl, $J = 11,1, 7,5$ Hz, 1H, H-8) atribuídos aos hidrogênios da insaturação, um triplete em δ 2,30 (t, $J = 7,5$ Hz, 1H, H-2) e um duplete de duplete de duplete δ 2,16 (ddd, $J = 11,6; 7,8; 1,5$ Hz, H-6) atribuído ao hidrogênio alfa carbonila. Foram observados também 9 sinais de multipletos atribuídos aos demais hidrogênios metilênicos da substância descritos na Tabela 9.

O espectro de RMN de ^{13}C e DEPT-135 (Figura 79) associado ao experimento de HMBC e HSQC revelou a existência de uma carbonila em δ 176,3 (C-1), dois carbonos olefinicos em δ 133,1 (C-7) e 128,9 (C-8), dois carbonos carbinólicos em δ 70,4 (C-9) /74,6 (C-10), doze carbonos metilênicos δ 33,6 (C-2); δ 32,2 (C-14); δ 31,6 (C-16); δ 29,2 (C-4) e δ 29,3 (C-5); δ 27,5 (C-6); δ 25,2 (C-11); δ 29,0 (C-12); δ 29,0 (C-13); δ 28,8 (C-15) e δ 22,3 (C-17), e um carbono metílico δ 13,0 (C-18).

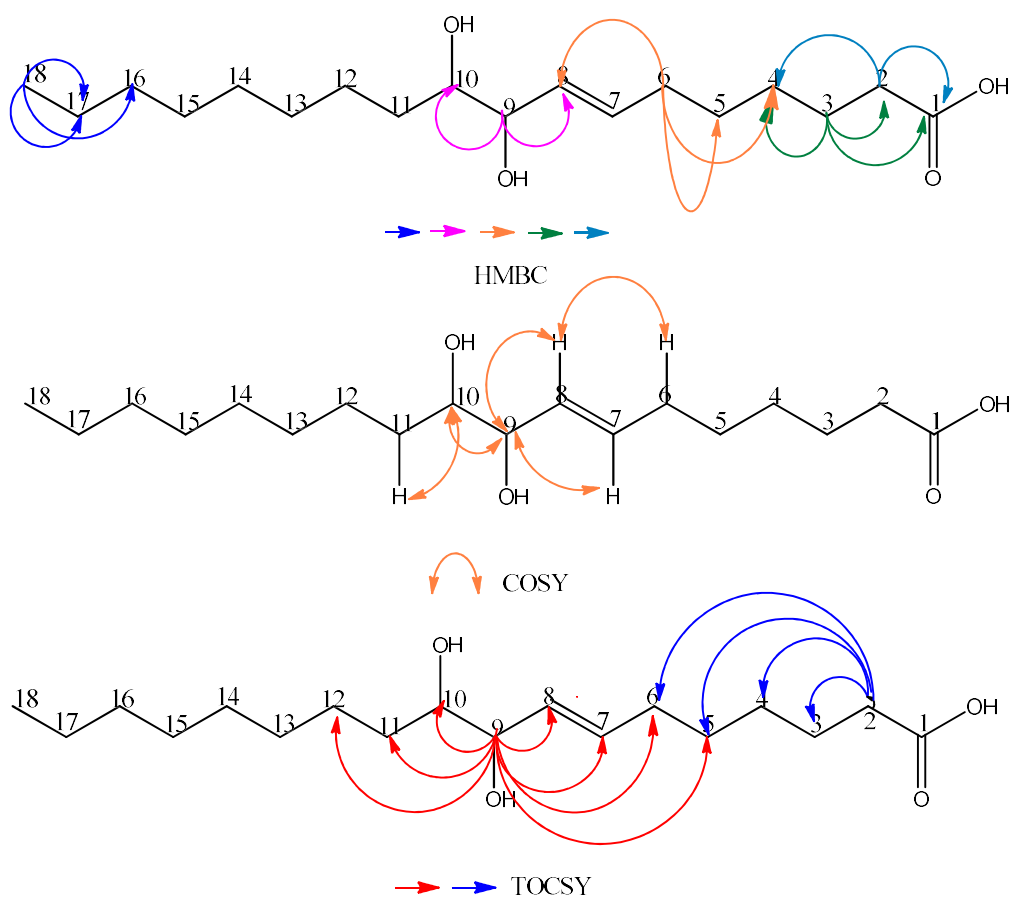
Na análise do experimento de gHMBC (Figura 81), foram observadas as correlações de H-2 com C-1 (δ 176,3), C-3 (δ 24,6) e C-4 (δ 29,2), e do H-3 com C-1, C-2 e C-4. Observou-se ainda a correlação do H-6 com o C-4, C-5 (δ 29,3), C-7 (δ 128,9) e C-8 (δ 133,1), e ainda o H-9 correlacionando com C-7/C-10 (δ 74,6) e C-12 (δ 29,0). Adicionalmente, no experimento de gHMBC, foram observadas as correlações do H-8 com os com C-6 (δ 27,5) e C-10, o H-12 correlacionando com C-13 (δ 29,0), e o H-14 com os carbonos C-13, C-15 (δ 28,8) e C-16 (δ 31,6). Foi atribuída ainda às correlações do H-17 com o C-15 e do H-18 com C-16 e C-17 (δ 22,3).

A análise do experimento de gCOSY (Figura 82) exibiu correlações entre H-2 e H-3, entre H-6 e H-8. Foi observada ainda correlação entre H-9/H-10 e entre H-10 e H-11.

No experimento de TOCSY 1D (Figura 83), foram observadas interações comuns entre H-2, H-3 e H-6, entre H-7, H-8, H-9 e H-10. Também foi possível observar interações entre H-9 e H-10 com H-7, H-8 e H-11 que, em associação com as correlações de HMBC e COSY, confirmaram a posição da insaturação e dos carbonos carbinólicos, permitindo assim propor para a substância **6** a fórmula molecular de $\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_4$.

Todas as correlações acima descritas constam na Tabela 9, assim como ilustradas na Figura 76 que apresenta as principais correlações de gHMBC, gCOSY e interações de TOCSY da substância **6**

Figura 76 - Principais correlações gHMBC, gCOSY e interações de TOCSY da substância **6**



Todas as informações dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C uni e bidimensional aliadas aos dados de espectrometria de massas obtidos por ESI (-) (Figura 84) no modo negativo, e no modo positivo ESI (+) (Figura 85), confirmaram a fórmula molecular de $\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_4$, com IDH igual a 2, sendo assim nomeada de ácido (7E) - 9,10-di-hidroxi-octadeca-7-enóico, ácido inédito na literatura.

Tabela 9 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C de Ácido (7E) - 9,10-di-hidroxi-octadeca-7-enóico (6) em CD_3OD , δ (Multiplicidade, J em Hz)

C	Substância (6)					
	δH^*	δ ^1H , mult, J em Hz	δC^*	Multip.	gHMBC (H \rightarrow C)*	COSY
1	-		176,3	C		
2	2,30	t, $J = 7,5$ Hz	33,1	CH_2	C-1/C-3/C-4	
3	1,63	m	24,6	CH_2	C-1/C-2/C-4	
4	1,26	m	29,2	CH_2		
5	1,41	m	29,3	CH_2		
6	2,16	ddd, $J = 11,6; 7,8; 1,5$ Hz	27,5	CH_2	C-4/C-5/C-7/C-8	H-8
7	5,39	ddt, $J = 11,0; 9,3; 1,7$ Hz	128,9	CH	C-9/C-6	H-9
8	5,59	dt, $J = 11,1, 7,5$ Hz	133,1	CH	C-10/C-5	H-9
9	4,20	dd, $J = 9,1; 6,7$, Hz	70,4	CH	C-7/C-8/ C-10	H-10
10	3,38	ddd; $J = 8,9; 6,6; 2,7$ Hz	74,6	CH	C-8/C-9/ C-11	
11	1,39	m	25,2	CH_2	C-12	H-10
12	1,34	m	29,6	CH_2	C-13/C-15/C-16	
13	1,45	m	29,4	CH_2		
14	1,32	m	32,2	CH_2		
15	1,52	m	28,8	CH_2		
16	1,31	m	31,6	CH_2	C-15	
17	1,35	m	22,3	CH_2		
18	0,92	t; $J=7,0$ Hz	13,7	CH_3	C-16/C-17	

*Espectros obtidos em CD_3OD ; * valores obtidos através das projeções de carbono do HSQC e HMBC.

Figura 77 - Espectro de RMN de ^1H da substância **6** (CD_3OD , 600 MHz)

SUBTÂNCIA 6, RMN
 ^1H

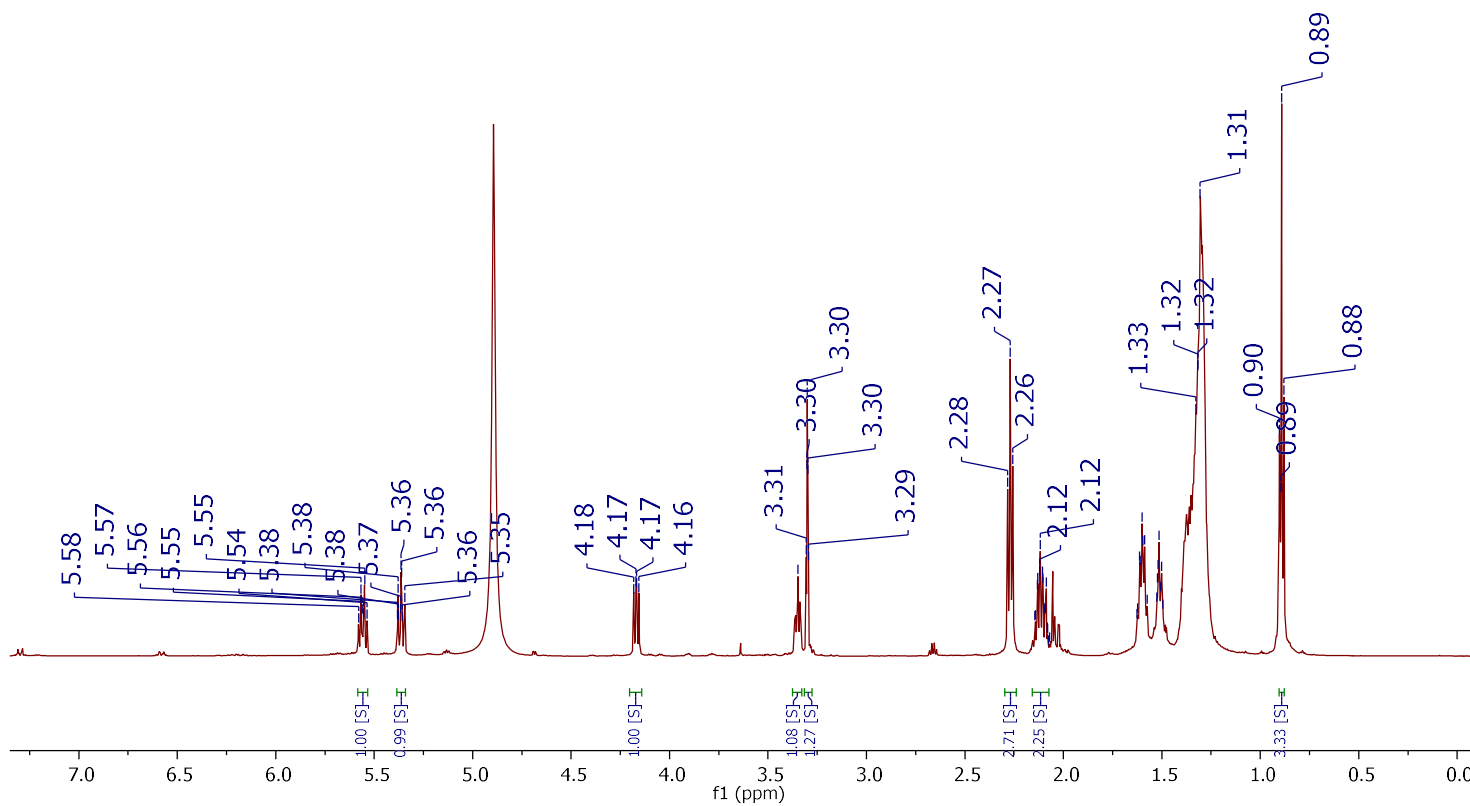


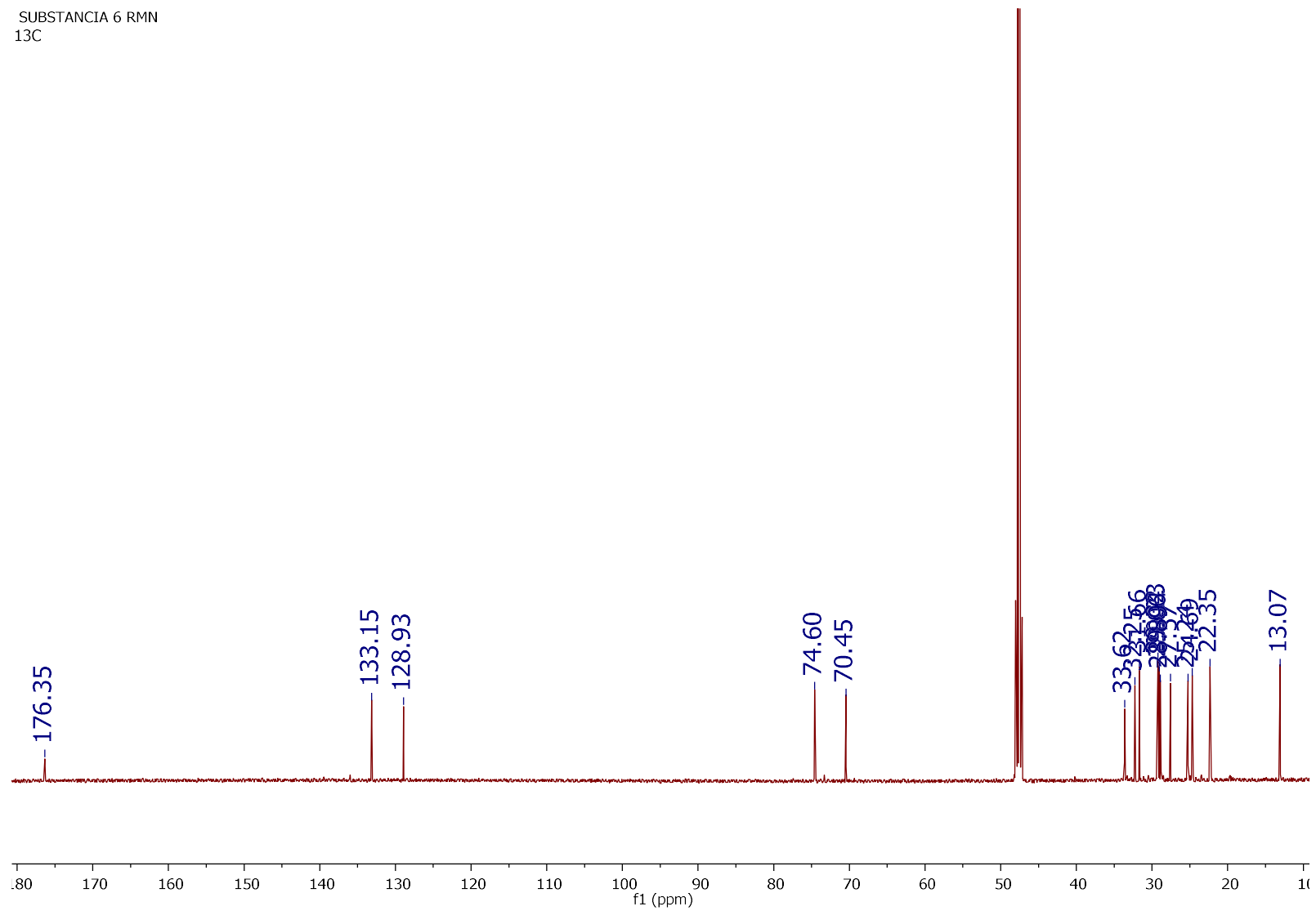
Figura 78 - Espectro de RMN de ^{13}C da substância 6 (CD_3OD , 600 MHz)

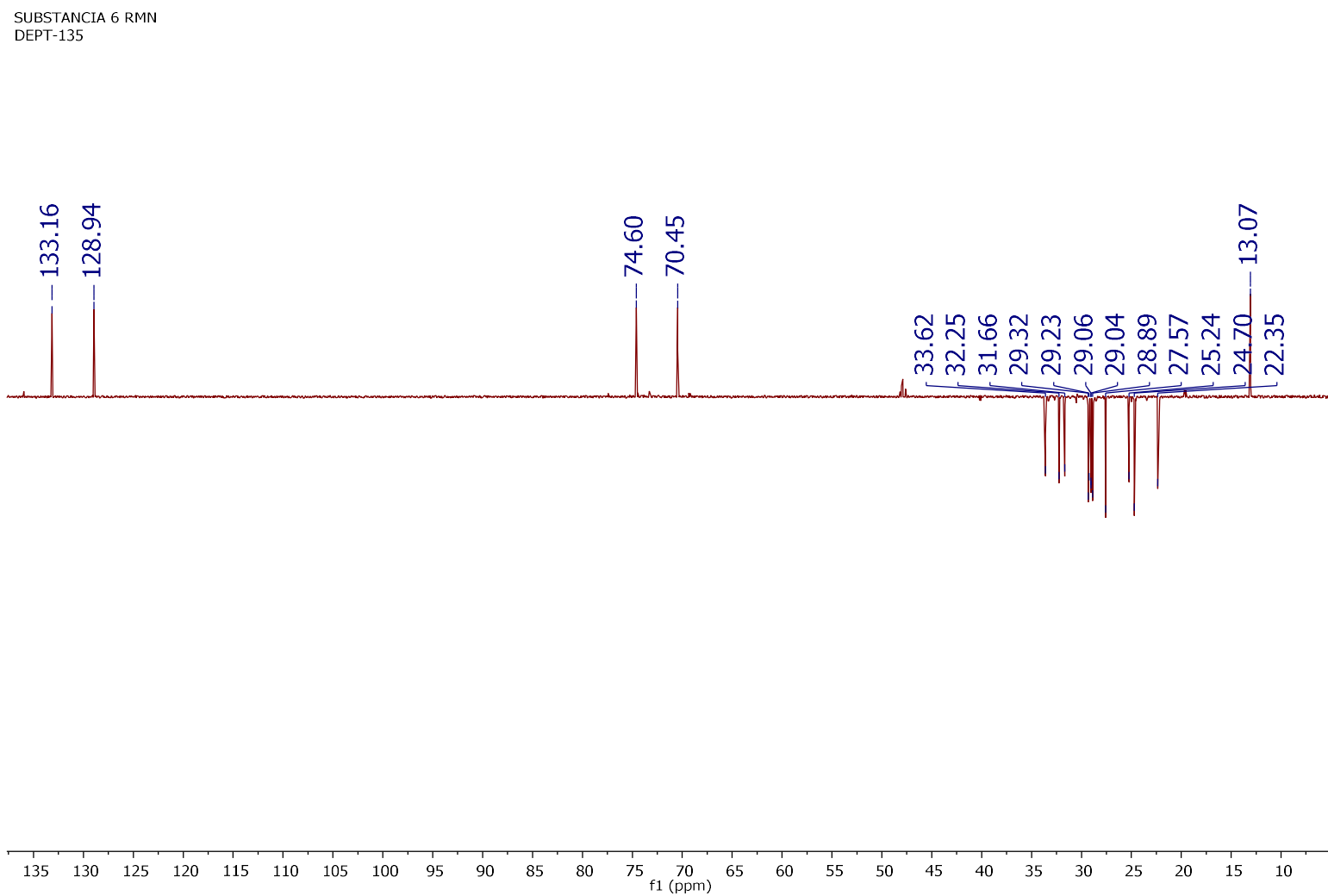
Figura 79 - Espectro de DEPT-135 da substância 6 (CD₃OD, 600 MHz)

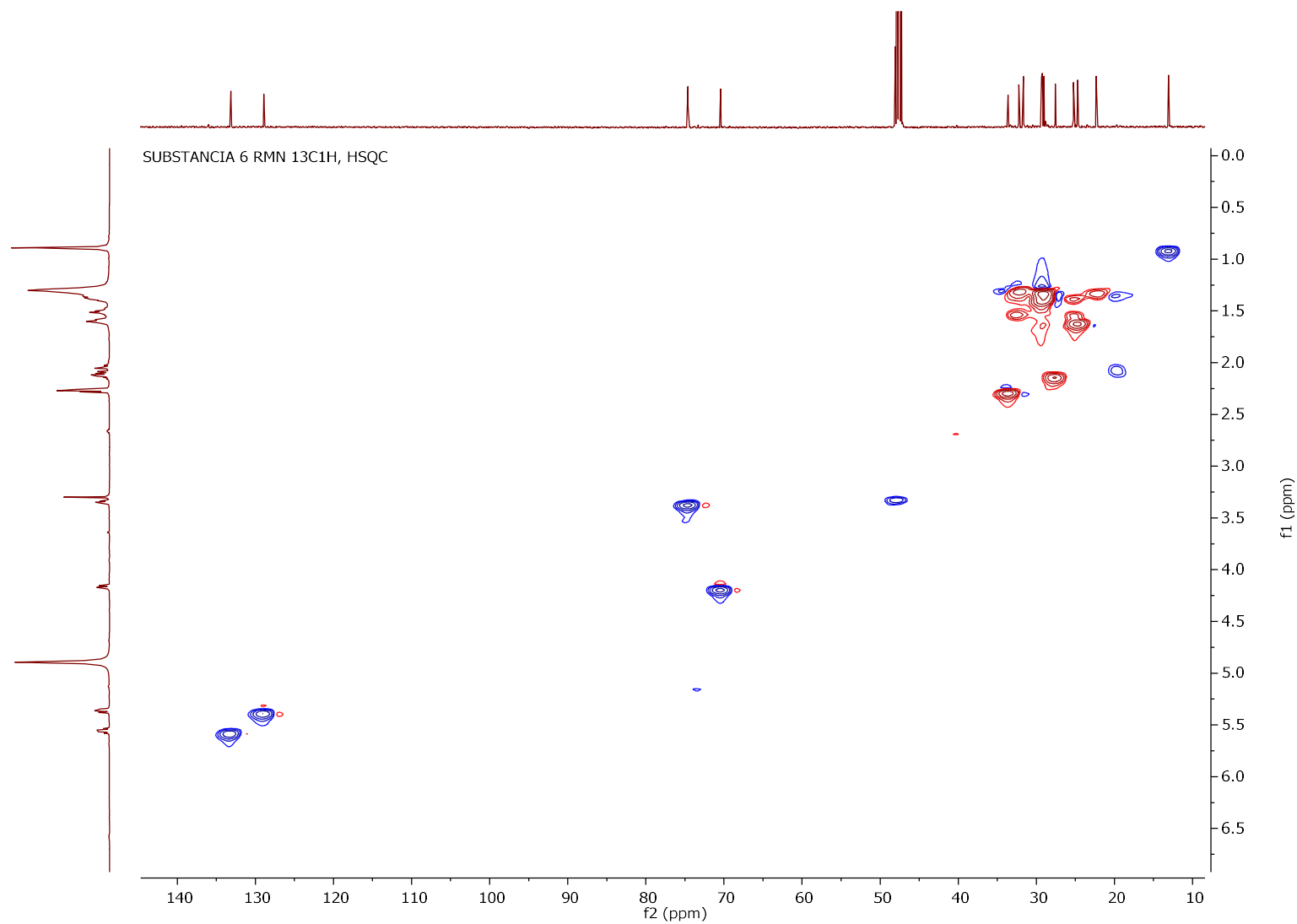
Figura 80 - Mapa de correlação H-C a uma ligação (HSQC) da substância **6** (CD₃OD, 600 MHz)

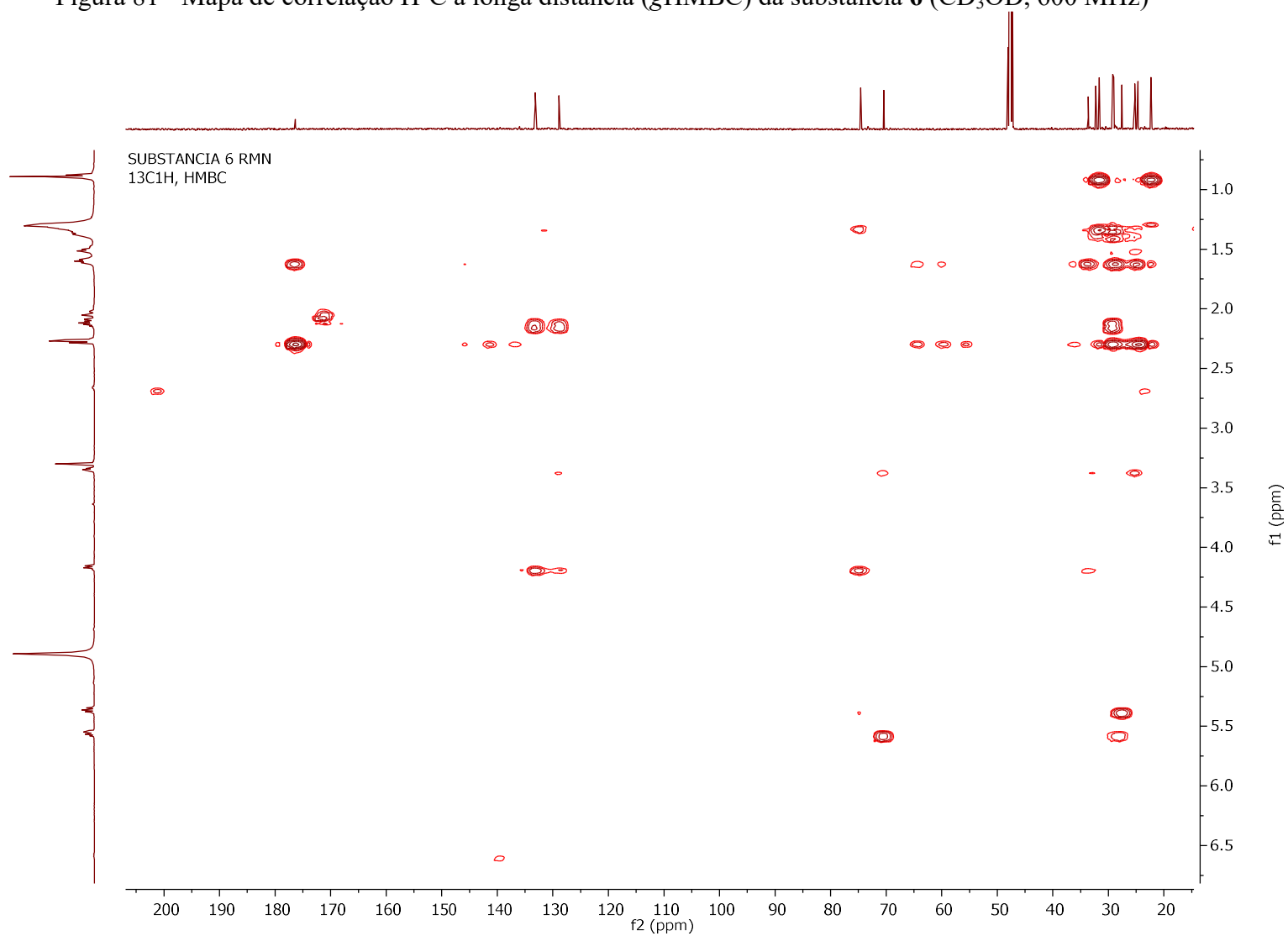
Figura 81 - Mapa de correlação H-C a longa distância (gHMBC) da substância 6 (CD₃OD, 600 MHz)

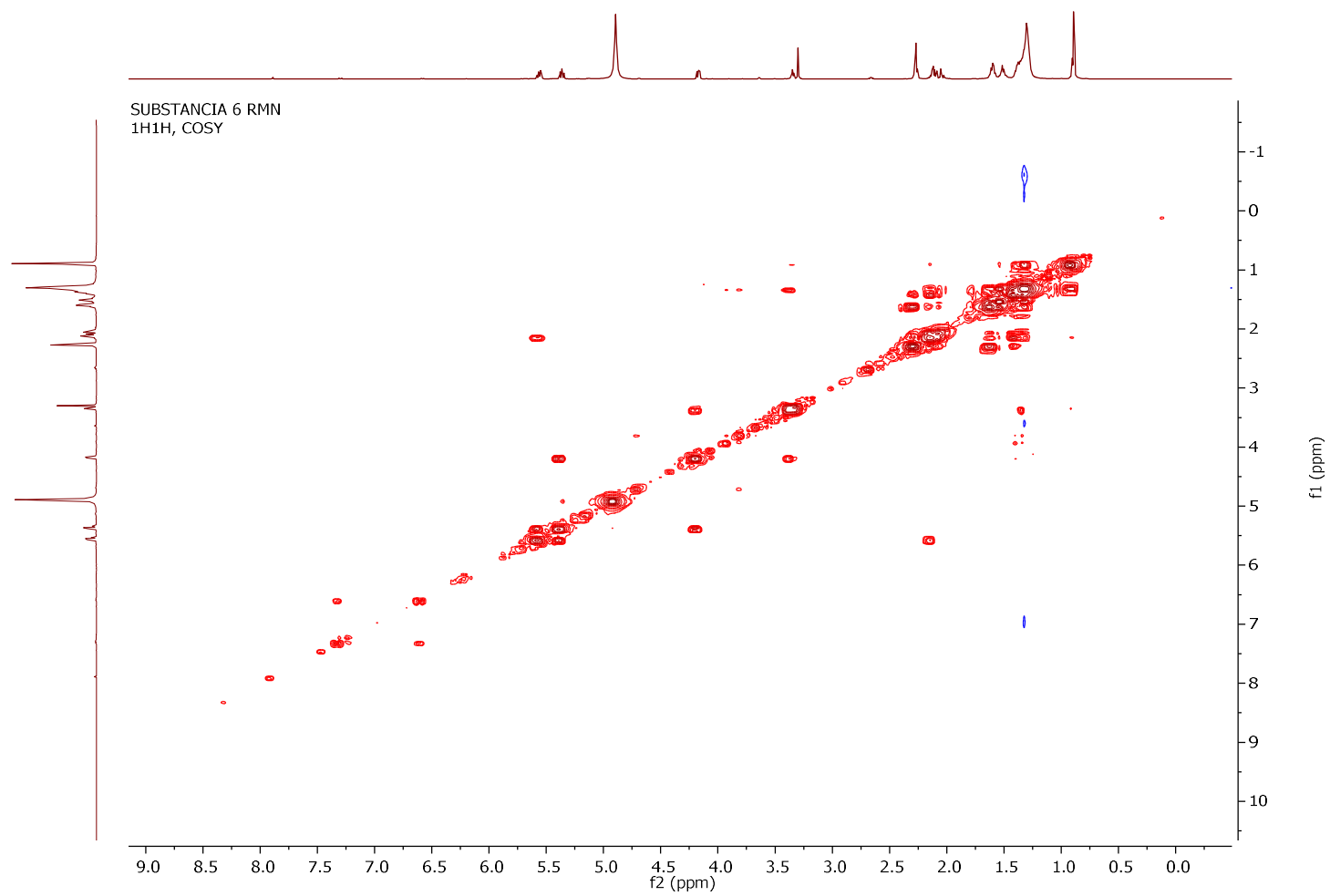
Figura 82 - Mapa de correlação COSY da substância 6 (CD₃OD, 600 MHz)

Figura 83 - Espectro de TOCSY-1D da substância 6 em 4,20 ppm (CD₃OD, 600 MHz)

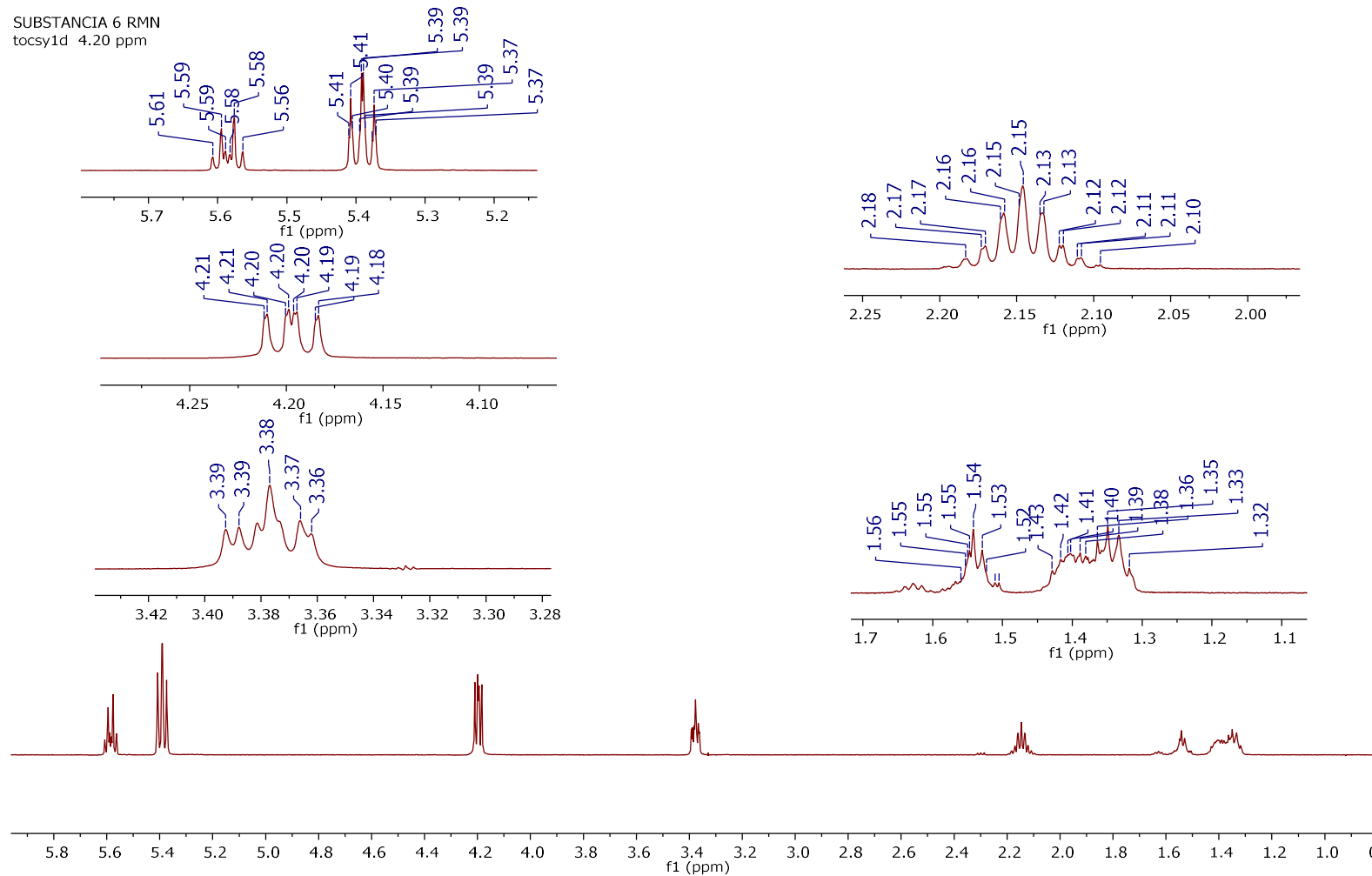


Figura 84 - Espectro de massas EM-IES no modo negativo (-) da molécula em m/z 313,4589 $[M-H]^-$ e o aduto de sódio m/z 627,2690 $[2M-H]^-$ da substância **6**

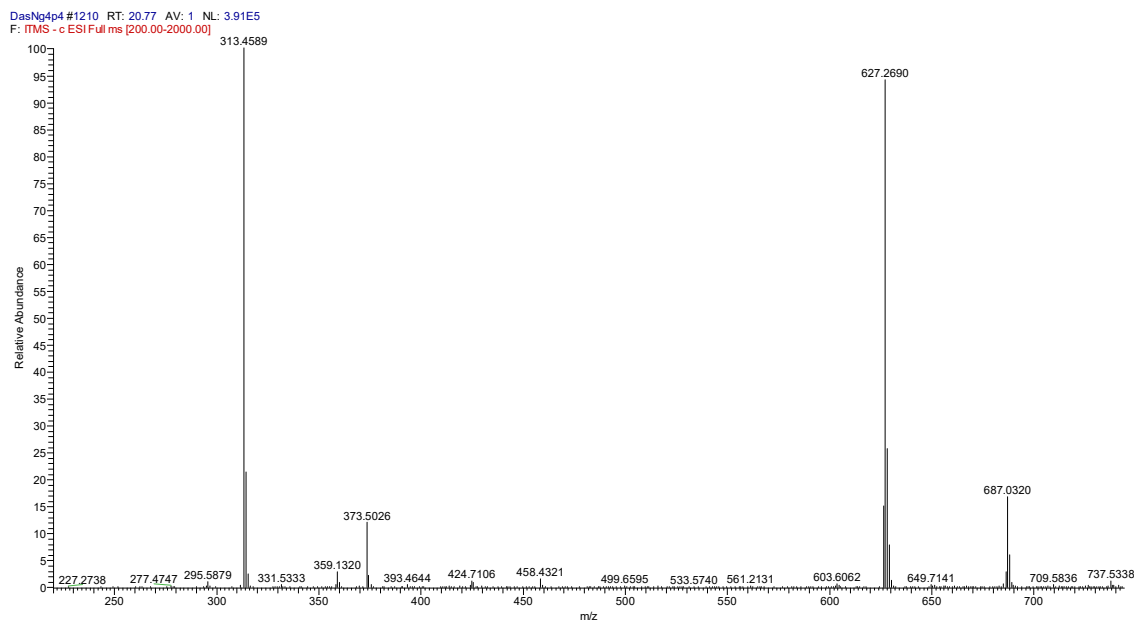
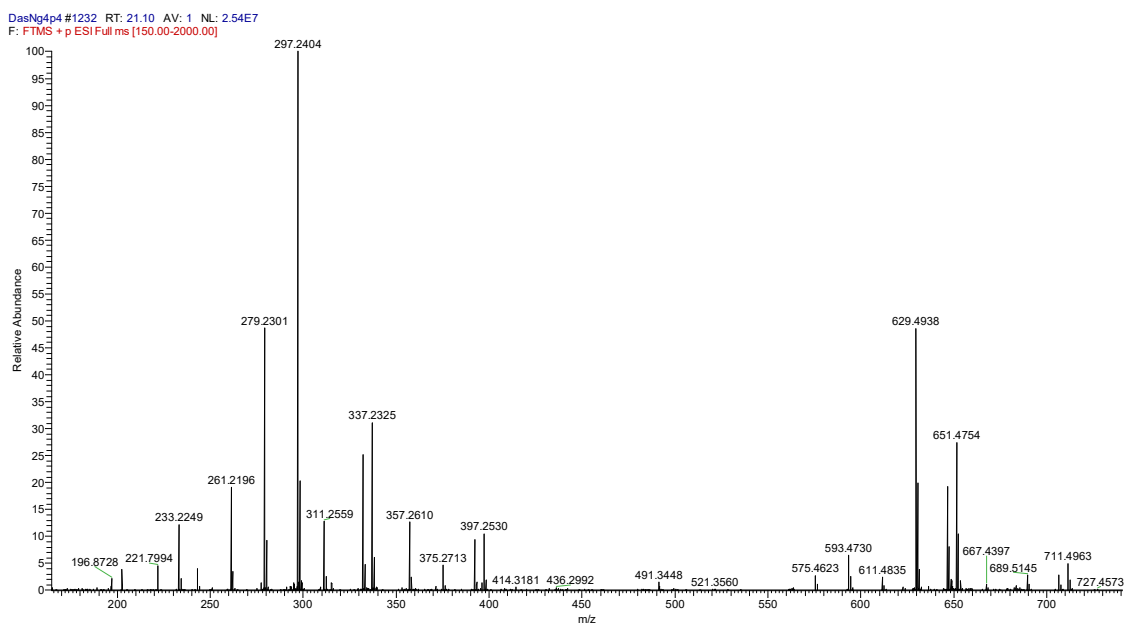


Figura 85 - Espectro de massas EM-IES no modo positivo (+) apresentou os sinais em m/z 337,2327 $[M+Na]^+$, m/z 629,4941 $[2M+H]^+$ e m/z 651,4756 $[2M+Na]^+$ da substância **6**



4.8 Atividades biológicas

4.8.1 Avaliação Antifúngica da fração acetonitrila (F.MeCN) e subfração Ng4

A avaliação antifúngica foi realizada com o objetivo de caracterizar a ação antimicrobiana da fração acetonitrila da subfração Ng4.

A atividade antimicrobiana de extratos vegetais é avaliada através da determinação de uma pequena quantidade da substância necessária para inibir o crescimento do microrganismo-teste; esse valor é conhecido como Concentração Inibitória Mínima (CIM). Um aspecto bastante relevante na determinação da CIM de extratos de produtos naturais é a preocupação em relação aos aspectos toxicológicos, microbiológicos e legais pertinentes aos compostos naturais ou suas combinações (OSTROSKY et al., 2008).

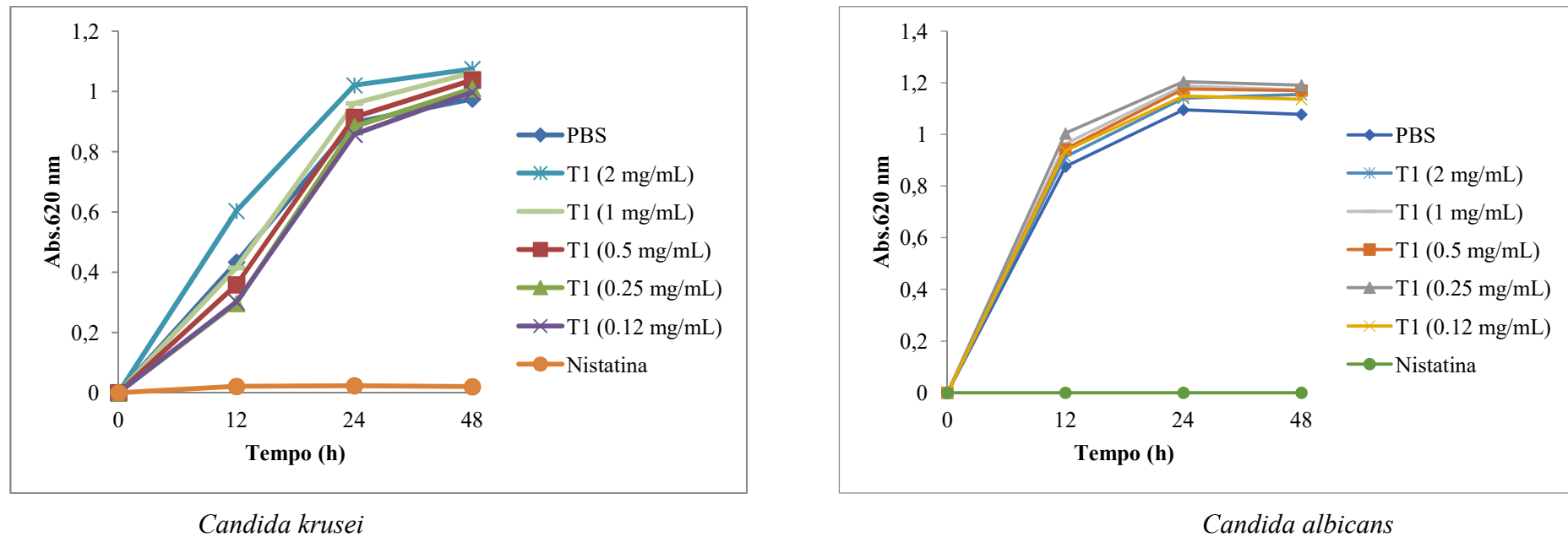
De acordo com o grande número de produtos naturais disponíveis para a análise, é primordial ter sistemas eficientes com métodos que avaliem a eficácia de plantas medicinais e outras fontes naturais como agente antimicrobiano. O estudo de agentes antimicrobianos de origem natural inicia com uma avaliação biológica completa dos extratos para garantir a eficácia e segurança, seguido pela identificação de princípios ativos, formulações de dosagem e perfil farmacocinético da nova droga (DAS et al., 2010).

Por conta da pequena quantidade de material apenas a fração acetonitrila (F. MeCN) e a subfração Ng4 foram selecionadas para serem avaliadas quanto a sua atividade antimicrobiana contra fungos (dermatófitos) do gênero *Cândida*, nas espécies *Candida albicans* (ATCC 10231), *Candida krusei* (ATCC 6258), *Candida tropicalis* (isolado clínico) e *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) que são causadoras de doenças como dermatomicose (BRITO et al., 2009).

Os resultados obtidos contribuem para o conhecimento da ação biológica dos metabólitos do cogumelo bioluminescente *Neonothopanus gardneri*, buscando contribuir com novos insumos que possam ser aplicados no controle de doenças causadas por microrganismos patogênicos.

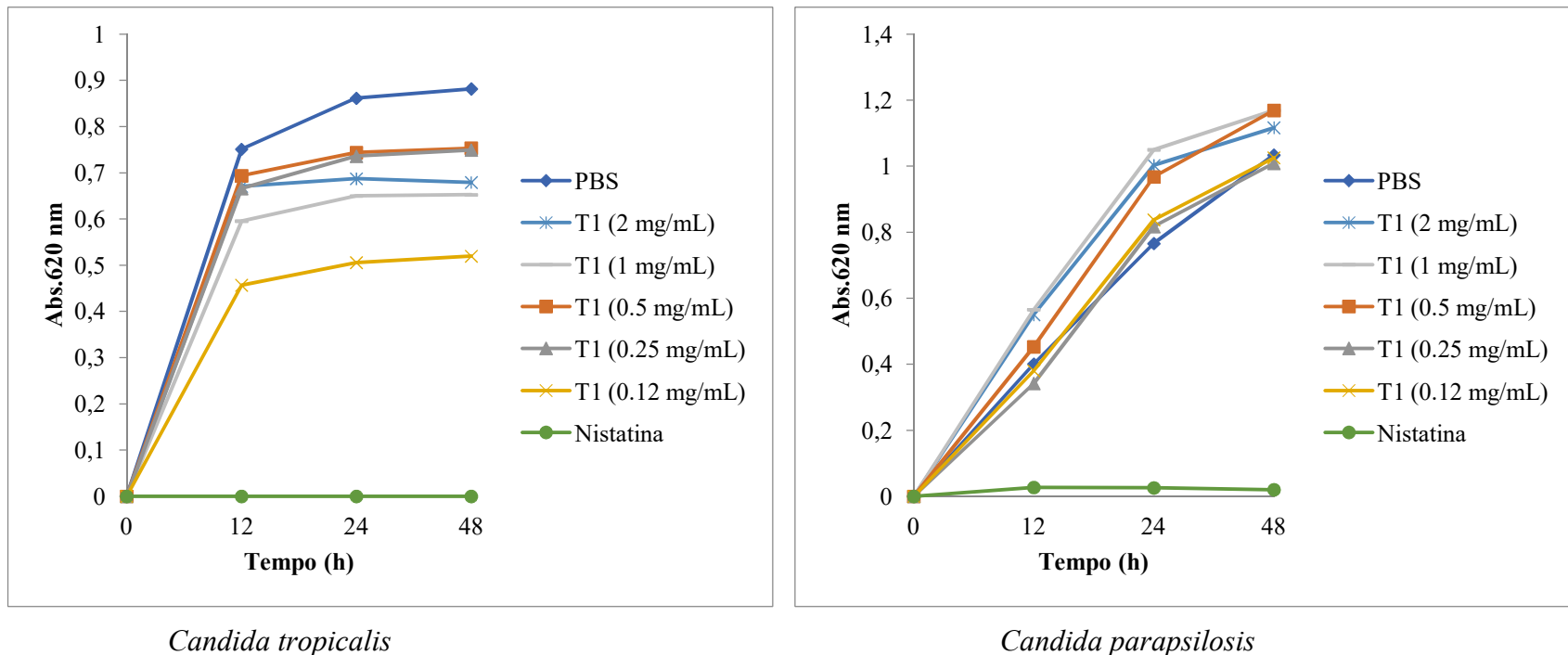
A avaliação antimicrobiana contra os dermatófitos (*C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. tropicalis*) evidenciou que a fração acetonitrila (F. MeCN) não foi totalmente ativa contra o genero *Candida*, inibiu apenas 41% do crescimento de *C. krusei*, em comparação com o padrão utilizado nistatina, de acordo com as Figura 86 e 87.

Figura 86 - Percentuais de inibição da fração F. MeCN dos corpos de frutificação de *N. gardneri* contra a espécie *Candida krusei* e *Candida albicans*. (T1 = F. MeCN). Controle positivo Nistatina; controle negativo; PBS = tampão fosfato-salino



A fração acetonitrila (F. MeCN) apresentou inibição de 41% do crescimento apenas de *C. krusei*, em comparação com o padrão utilizado (nistatina)

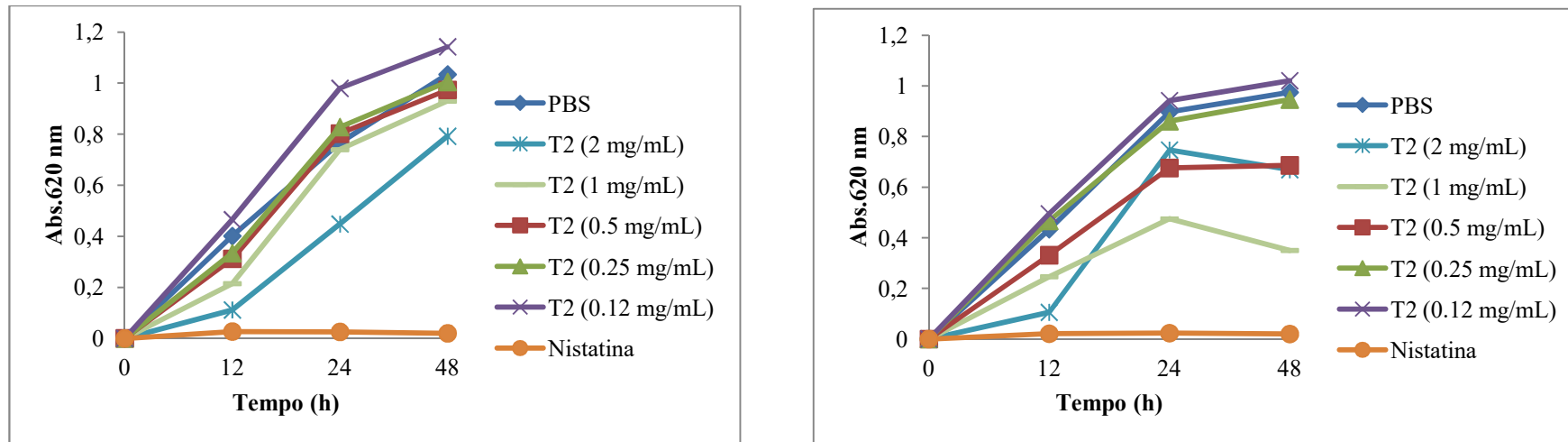
Figura 87 - Percentuais de inibição da fração F. MeCN dos corpos de frutificação de *N. gardneri* contra a espécie *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis*. (T1 = F. MeCN). Controle positivo Nistatina; controle negativo; PBS = tampão fosfato-salino



A fração acetonitrila (F. MeCN) não apresentou inibição do crescimento de *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* em comparação com o padrão utilizado (nistatina)

Os resultados dos percentuais de inibição do crescimento das espécies do gênero *cândidas* indicam que a subfração Ng4 mostrou efeito inibitório de moderado a alto contra três (*C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*) das quatro espécies testadas do gênero *cândida* como mostram as Figuras 88 e 89.

Figura 88 - Percentuais de inibição da subfração Ng4 dos corpos de frutificação de *N. gardneri* contra a espécie *Candida parapsilosis* e *Candida krusei*. (T2 = Ng4). Controle positivo Nistatina; controle negativo PBS = tampão fosfato-salino

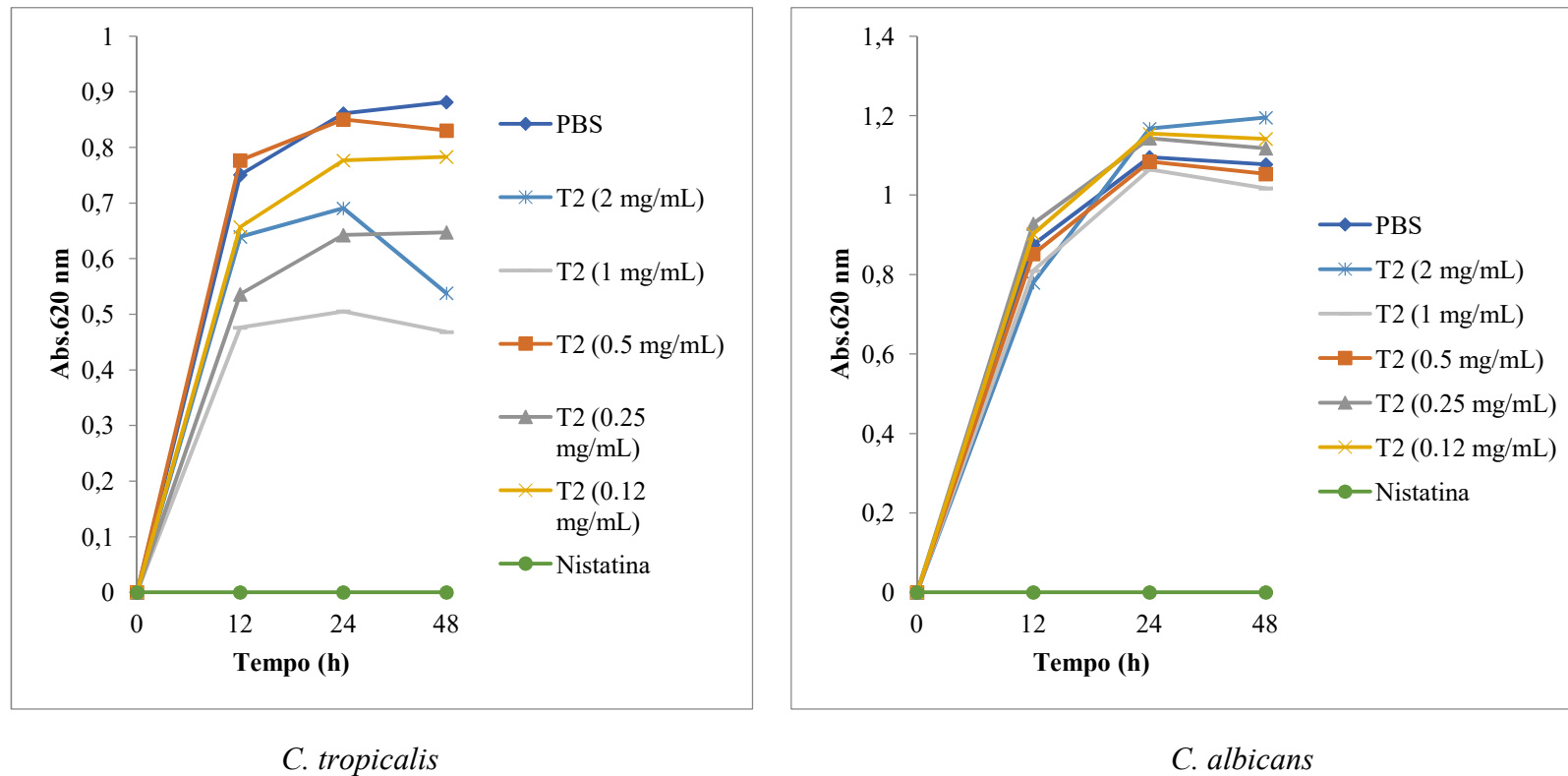


Candida parapsilosis (inibição de 23%)

Candida krusei (inibição de 64%)

Percentuais de inibição da subfração Ng4 dos corpos de frutificação de *N. gardneri* contra a espécie *C. parapsilosis* foi moderado, pois inibição ficou abaixo da concentração inibitória mínima, no entanto, contra a espécie *C. krusei* foi mais efetiva com inibição de 64% de seu crescimento.

Figura 89 - Percentuais de inibição da subfração Ng4 dos corpos de frutificação de *N. gardneri* contra a espécie *C. tropicalis* e *C. albicans*. (T2 = Ng4). Controle positivo Nistatina; controle negativo PBS = tampão fosfato-salino



A subfração Ng4 foi a mais efetiva. Inibiu o crescimento de *C. tropicalis* (inibição de 47%), *C. parapsilosis* (inibição de 23%) e *C. krusei* (inibição de 64%) com exceção da espécie *C. albicans*, onde nenhuma das amostras testadas inibiu seu crescimento.

4.8.2 Efeito antiparasitário da fração acetonitrila (F. MeCN) e subfrações Ng1, Ng3 e Ng4 em adultos de *S. mansoni*

A fração acetonitrila (F. MeCN) e as subfrações (Ng1, Ng3 e Ng4) também foram testadas para verificar o efeito antiparasitário em adultos de *Schistosoma mansoni*, causador da doença esquistossomose (MORAES et al., 2014).

A esquistossomose mansônica é uma doença causada pelo parasita *S. mansoni*, tendo a água como veículo de transmissão. A parasitose se caracteriza por uma fase aguda e muitas vezes imperceptível, e outra crônica na qual podem aparecer sintomas mais acentuados. As formas graves se evidenciam pela hipertensão portal ou pulmonar. A situação da doença ocorre em regiões sem saneamento ou com saneamento básico impróprio, e a contaminação se dá através da pele e mucosas pelo contato do homem com águas que contêm formas infectantes do *S. mansoni* (MOREIRA; CORREIA, 2017).

Na Tabela 10, é mostrado que a subfração Ng4 apresentou 100% de atividade contra adultos (machos e fêmeas) de *S. mansoni* nos tempos 24, 48 e 72 h. A subfração Ng1 também apresentou 100% de atividade frente ao teste *S. mansoni*, em 48 e 72 h. No entanto, a fração acetonitrila (F. MeCN) e a subfração Ng3 mostraram-se inativas contra *Schistosoma mansoni*, como mostra a Tabela 10.


Tabela 10 - Efeitos *in vitro* da F. MeCN e das subfrações Ng1, Ng3 e Ng4 contra adultos de 49 dias de idade de *Schistosoma mansoni*

Grupo	Período de incubação (h)	Vermes mortos (%) ^a		Redução da atividade motora (%) ^a			
		M	F	Debilitado		Significativo	
				M	F	M	F
Controle ^b	24	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0
0.5% DMSO ^c	24	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0
Praziquantel 3 µM	24	100	100	0	0	100	100
	48	100	100	0	0	100	100
	72	100	100	0	0	100	100
F. ACETONITRILA 50 µg/ml	24	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0
Ng1 50 µg/ml	24	30	0	0	0	60	100
	48	100	100	0	0	100	100
	72	100	100	0	0	100	100
Ng3 50 µg/ml	24	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0
Ng4 50 µg/ml	24	100	100	0	0	100	100
	48	100	100	0	0	100	100
	72	100	100	0	0	100	100

^a Porcentagens relativas aos 20 vermes investigados.

^b RPMI 1640.

^c DMSO 5% em RPMI 1640.



CONSIDERAÇÕES FINAIS

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo constitui o primeiro relato na literatura na busca por metabólitos secundários dos corpos de frutificação do cogumelo bioluminescente *N. gardneri*.

A partir da fração hexânica após sililação e análise por CG-EM foi possível propor a identificação de 8 ácidos graxos. A fração acetonitrila (F. MeCN) apresentou uma grande produção metabólica e perfil químico promissor na produção de metabólitos secundários. O refracionamento da fração acetonitrila (F. MeCN) conduziu ao isolamento de 6 substâncias inéditas na espécie (**1**, **2**, **3,4**, **5** e **6**), o ácido (*2E*)-dec-2-en-1,10-dióico (**1**), (*9E*, *11E*)-7,8-di-hidroxi-13-oxo-heneicoso-9,11-dienamida (**2**), (*9E*, *11E*)-7,8-di-hidroxi-13-oxo-octadeca-9,11-dienamida (**3**), tetraciclo[7,5,1,0^{1,6}0^{12,15}]-5,5-dimetil-11-oxa-2-oxo-pentadec-8-en-14(13)-lactona (**4**), ((*1E'*, *3E'*, *10E'*, *12E'*)-N-5',7',14'-tri-hidroxi-15-oxo-icosa-1',3',10',12'-tetraenil)-decanamida (**5**) e o ácido (*7E*)-9,10-di-hidroxi-octadeca-8-enóico (**6**), destas 6 substâncias isoladas 4 são inéditas na literatura, sendo 3 amidas (**2**, **3** e **5**) e um ácido carboxílico (**6**).

Suas estruturas foram estabelecidas com base nas análises espectroscópicas de RMN 1D e 2D, bem como experimentos de EM-IES, IV e UV-Vis.

A fração acetonitrila (F. MeCN) selecionada para o estudo antimicrobiano foi 100% inativa contra os fungos patogênicos *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. tropicalis*.

A subfração Ng4 da qual foi isolada as substâncias **5** e **6** foi a mais efetiva, inibindo o crescimento de *C. tropicalis* (inibição de 47%), *C. parapsilosis* (inibição de 23%) e *C. krusei* (inibição de 64%). Nenhuma das amostras testadas inibiu o crescimento da espécie *C. albicans*.

No teste *in vitro* em *S. mansoni*, a subfração Ng4 apresentou 100% de atividade contra adultos (machos e fêmeas) de *S. mansoni* em 24,48 e 72 h. A subfração Ng1 também apresentou 100% de atividade frente ao teste *S. mansoni*, em 48 e 72 h.

No entanto, a fração acetonitrila e a subfração Ng3 mostram-se inativas nos parâmetros analisados.

Os dados obtidos nesse estudo são relevantes, pois contribuem nos conhecimentos do gênero e enriquecem os relatos químicos e biológicos da espécie *N. gardneri*. Estes resultados reforçam ainda a importância da continuidade dos estudos deste cogumelo bioluminescente como fonte de metabólitos secundários e de seu potencial biológico.



REFERÊNCIAS

- AIRTH, R.; FOERSTER, G.; BEHRENS, P. *Bioluminescence in Progress*: Princeton University Press, Princeton, New Jersey 1966.
- AYER, W. A.; CRAW, P. Metabolites of the fairy ring fungus, *Marasmius oreades*. Part 2. Norsesquiterpenes, further sesquiterpenes, and agrocybin. **Canadian journal of chemistry**, v. 67, n. 9, p. 1371-1380, 1989.
- BONDAR, V. S.; SHIMOMURA, O.; GITELSON, J. I. Luminescence of higher mushrooms. **Journal of Siberian Federal University**, v. 5, n. 4, p. 331-351, 2012.
- BRITO, E. H. S. D.; FONTENELLE, R. O. D. S.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. D. A.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Candidose na medicina veterinária: um enfoque micológico, clínico e terapêutico. **Ciência Rural**, v. 39, p. 2655-2664, 2009.
- CAPELARI, M.; DESJARDIN, D. E.; PERRY, B. A.; ASAI, T.; STEVANI, C. V. *Neonothopanus gardneri*: a new combination for a bioluminescent agaric from Brazil. **Mycologia**, v. 103, n. 6, p. 1433-1440, 2011.
- CAPON, R. J.; RATNAYAKE, R.; STEWART, M.; LACEY, E.; TENNANT, S.; GILL, J. H. Aspergillazines A–E: novel heterocyclic dipeptides from an Australian strain of *Aspergillus unilateralis*. **Organic & biomolecular chemistry**, v. 3, n. 1, p. 123-129, 2005.
- DAS, K.; TIWARI, R.K.S.; SHRIVASTAVA, D.K. Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: Current methods and future trends. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, n. 2, p. 104-111, 2010.
- DEHEYN, D. D.; LATZ, M. I. Bioluminescence characteristics of a tropical terrestrial fungus (Basidiomycetes). **Luminescence**, v. 22, n. 5, p. 462-467, 2007.
- DUBOIS, R. Note sur la fonction photogénique chez la *Pholas dactylus*. **Comptes rendus des séances de la Société de biologie et de ses filiales**, v. 39, p. 564–566, 1887.
- GARDNER, G. Description of a new phosphorescent species of *Agaricus*, with remarks upon it by the Rev. Miles Joseph Berkeley. **Journal of Botany (Hooker)**, v. 2, n. 16, p. 426-428, 1840.
- HADDOCK, S. H.; MOLINE, M. A.; CASE, J. F. Bioluminescence in the sea. **Annual Review of Marine Science**, v. 2, p. 443-493, 2010.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 4 ed. Oxford University Press: Oxford, 2007.
- HASTINGS, J. W.; WILSON, T. **Bioluminescence: living lights, lights for living**. Harvard University Press, 2013. 176 p.
- OLIVEIRA, M. D. A, 2018.

KANOKMEDHAKUL, S.; LEKPHROM, R.; KANOKMEDHAKUL, K.; HAHNVAJANAWONG, C.; BUA-ART, S.; SAKSIRIRAT, W.; PRABPAI, S.; KONGSAEREE, P. Cytotoxic sesquiterpenes from luminescent mushroom *Neonothopanus nambi*. **Tetrahedron**, v. 68, n. 39, p. 8261-8266, 2012.

KASKOVA, Z. M.; DÖRR, F. A.; PETUSHKOV, V. N.; PURTOV, K. V.; TSARKOVA, A. S.; RODIONOVA, N. S.; MINEEV, K. S.; GUGLYA, E. B.; KOTLOBAY, A.; BALEEVA, N. S. Mechanism and color modulation of fungal bioluminescence. **Science advances**, v. 3, n. 4, p. e1602847, 2017.

KIRK, P. M.; CANNON, P. F.; DAVID, J. C.; STALPERS, J. A. **Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi**. 2001.

KNAPP, D. R. **Handbook of analytical derivatization reactions**. John Wiley & Sons: New York, 1979. 741 p.

MAFUD, A. C.; SILVA, M. P. N.; MONTEIRO, D. C.; OLIVEIRA, M. F.; RESENDE, J. G.; COELHO, M. L.; SOUSA, D. P.; MENDONÇA, R. Z.; PINTO, P. L. S.; FREITAS, R. M.; MASCARENHAS, Y. P.; MORAES, J. Structural parameters, molecular properties, and biological evaluation of some terpenes targeting *Schistosoma mansoni* parasite. **Chemico-Biological Interactions**, v. 244, p. 129-139, 2016/01/25/ 2016.

MORAES, J. Antischistosomal natural compounds: present challenges for new drug screens. **Current Topics in Tropical Medicine**, ed. InTech, p. 333-355, 2012.

MORAES, J.; OLIVEIRA, R. N.; COSTA, J. P.; JUNIOR, A. L. G.; SOUSA, D. P.; FREITAS, R. M.; ALLEGRETTI, S. M.; PINTO, P. L. S. Phytol, a Diterpene Alcohol from Chlorophyll, as a Drug against Neglected Tropical Disease Schistosomiasis *Mansoni*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 1, p. 2617, 2014.

MOREIRA, A. R.; CORREIA, A. A. Estudos dos casos de esquistossomose mansônica no estado de Pernambuco: uma revisão de literatura. 2017.

OLIVEIRA, A. G.; CARVALHO, R. P.; WALDENMAIER, H. E.; STEVANI, C. V. Bioluminescência de fungos: distribuição, função e mecanismo de emissão de luz. **Química Nova**, v. 36, n. 2, p. 314-319, 2013.

OLIVEIRA, A. G.; DESJARDIN, D. E.; PERRY, B. A.; STEVANI, C. V. Evidence that a single bioluminescent system is shared by all known bioluminescent fungal lineages. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 11, n. 5, p. 848-852, 2012.

OLIVEIRA, A. G.; STEVANI, C. V. The enzymatic nature of fungal bioluminescence. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 8, n. 10, p. 1416-1421, 2009.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, L.E.M.; KANEKO, M.T.; NISHIKAWA, O.S.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Rev. bras. farmacogn.**, João Pessoa, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.

OLIVEIRA, M. D. A, 2018.

- PAVIA, L. K. **Introduction to Spectroscopy**, ed. 3^a Edition, Brooks/Cole, Thomson Learning, Canada, p. 61 – 79, 2001.
- SHIMOMURA, O. **Bioluminescence: chemical principles and methods**. Singapore: World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., 2006. 494 p.
- SIVINSKI, J. Arthropods attracted to luminous fungi. **Psyche: a Journal of Entomology**, v. 88, n. 3-4, p. 383-390, 1981.
- SOMAN, A. G.; GLOER, J. B.; ANGAWI, R. F.; WICKLOW, D. T.; DOWD, P. F. Vertilecanins: New Phenopicolinic Acid Analogues from *Verticillium l ecanii*. **Journal of natural products**, v. 64, n. 2, p. 189-192, 2001.
- THIEL, V.; BLUMENBERG, M.; PAPE, T.; SEIFERT, R.; MICHAELIS, W. Unexpected occurrence of hopanoids at gas seeps in the Black Sea. **Organic Geochemistry**, v. 34, n. 1, p. 81-87, 2003.
- TSARKOVA, A. S.; DUBINNYI, M. A.; BARANOV, M. S.; OGUIENKO, A. D.; YAMPOLSKY, I. V. Nambiscalarane, a novel sesterterpenoid comprising a furan ring, and other secondary metabolites from bioluminescent fungus *Neonothopanus nambi*. **Mendeleev Communications**, v. 3, n. 26, p. 191-192, 2016.
- VENTURA, F. F.; SILVA, R. T. P.; STEVANI, C. V. História do Fungo Bioluminescente Flor-de-Coco (*Neonothopanus gardneri*) e Efeitos das Condições de Cultura Sobre a Emissão de Luz. **Revista Virtual de Química**, v.7, n.1, p.41-55, 2015.
- WALDENMAIER, H. E.; OLIVEIRA, A. G.; STEVANI, C. V. Thoughts on the diversity of convergent evolution of bioluminescence on earth. **International Journal of Astrobiology**, v. 11, n. 4, p. 335-343, 2012.