

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS**

**Isolamento e identificação de metabólitos bioativos de uma linhagem de fungo do ambiente marinho**

Reneid Emanuele Simplicio Dudu

São Carlos  
2024

RENEID EMANUELE SIMPLICIO DUDU

**Isolamento e identificação de metabólitos bioativos de uma linhagem de fungo do ambiente marinho.**

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências no Programa de Pós-Graduação em Química.

Área de concentração: Química Orgânica e Biológica

Orientador: Prof. Dr. Roberto Gomes de Souza Berlinck

São Carlos  
2024

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Assinatura: *Reneid Emanuele S. Dudu*  
Data: 07/02/24

*Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Referência e Atendimento ao Usuário do SBI/IQSC*

Dudu, Reneid Emanuele Simplicio  
Isolamento e identificação de metabólitos bioativos de uma  
linhagem de fungo do ambiente marinho / Reneid Emanuele  
Simplicio Dudu. — São Carlos, 2024.  
112 f.

Dissertação (Mestrado em Química Orgânica e Biológica) —  
Instituto de Química de São Carlos / Universidade de São Paulo,  
2024.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Gomes de Souza Berlinck

*Sonia Alves - CRB: 4280/8*



## **Agradecimentos**

Ao Prof. Dr. Roberto G. S. Berlinck, pela orientação, confiança, paciência, motivação e todo apoio necessários para a realização desta pesquisa.

Ao Dr. Marcelo Amorim quero expressar minha profunda gratidão por sua contribuição inestimável para o desenvolvimento dessa pesquisa, sobretudo no processo de elucidação estrutural dos compostos isolados. Sua orientação, experiência e dedicação foram fundamentais para o sucesso deste projeto.

Aos meus colegas de laboratório: Caroline, Pedro, Anderson, Andrés e Kamila pelo companheirismo e amizade, pela contribuições no desenvolvimento das atividades experimentais e desenvolvimento na pesquisa, além de todos os momentos agradáveis e divertidos que compartilhei com cada um de vocês.

Às técnicas do laboratório, Fabiana e Karin, pela orientação e disponibilidade em ajudar no uso dos equipamentos do laboratório e na execução das atividades experimentais.

À Central de Análises Químicas (CAQI – IQSC – USP), por disponibilizar a sua infraestrutura para a obtenção dos espectros de RMN.

Ao laboratório do Prof. Dr. Rafael Guido (IFSC/ USP) pela realização dos bioensaios de atividade antiplasmodial.

Em especial, à minha mãe Risoneide e minha avó Socorro pelas palavras de apoio e orações destinadas a mim durante todo esse período.

À minha amiga e irmã de alma Joycyely por ter sido babá dos meus bichanos durante esse período e por todo carinho e atenção.

Ao meu esposo Jonatta por ter sido amigo e companheiro durante todos os momentos, principalmente os mais difíceis que passei.

Ao Governo do Estado da Paraíba por ter concedido a licença para capacitação necessária para a realização desse estudo.

À Deus pela sua presença viva e constante em meus dias.

## Resumo

Os produtos naturais têm apresentado, ao longo do tempo, importância significativa para a saúde humana e na indústria farmacêutica. Estes podem ser isolados de diversas fontes. Entretanto, os produtos naturais isolados de organismos e microrganismos marinhos têm atraído crescente interesse em pesquisas devido à sua diversidade química e seu potencial para o desenvolvimento de novos medicamentos. Os produtos naturais marinhos têm sido encontrados em diferentes organismos marinhos, como corais, esponjas, moluscos, crustáceos, entre outros, apresentando uma ampla variedade de estruturas químicas e atividades biológicas. O extrato orgânico do meio de crescimento do fungo *Peroneutypa* sp, isolado a partir de um pepino-do-mar, exibiu atividade antiplasmodial. O fracionamento deste extrato utilizando diversas técnicas cromatográficas levou ao isolamento de cinco compostos, sendo dois deles conhecidos e os demais inéditos. Análises espectroscópicas e espectrométricas foram utilizadas para determinação estrutural dos compostos isolados. Bioensaios específicos para atividade antiplasmodial foram realizados com os compostos isolados a fim de determinar suas atividades.

**Palavras-chave:** antimalárica, produtos naturais marinhos, fungo marinho

## Abstract

Natural products have, over time, shown significant importance for human health and in the pharmaceutical industry. These can be isolated from several sources. However, natural products isolated from marine organisms and microorganisms have attracted increasing interest in research due to their chemical diversity and their potential for the development of new medicines. Marine natural products have been found in different marine organisms, such as corals, sponges, molluscs, crustaceans, among others, presenting a wide variety of chemical structures and biological activities. The organic extract from the growth medium of the fungus *Peroneutypa* sp, associated with a sea cucumber, exhibited antiplasmodial activity. Fractionation of this extract using various chromatographic techniques led to the isolation of five compounds, two of which were known and three were new. Spectroscopic and spectrometric analyzes were used to assign the structure of the isolated compounds. Specific bioassays for antiplasmodial activity were performed with the isolated compounds in order to determine their activities.

**Keywords:** antimalarial, natural marine Products, marine fungus

## Lista de figuras

Figura 1. Estruturas químicas de importantes metabólitos secundários utilizados desde as suas descobertas até os dias atuais .....	13
Figura 2. Exemplos de metabólitos secundários bioativos produzidos por fungos em meio de cultura. ....	15
Figura 3. Estruturas químicas da cloroquina e mefloquina, respectivamente. ....	17
Figura 4. Estruturas químicas da artemisinina (11) e de seus derivados semissintéticos (12-14). ....	18
Figura 5. Exemplos de produtos naturais marinhos que apresentam atividade antiplasmodial. ....	21
Figura 6. Placa de Petri inoculada com o fungo M16 (pré-cultivo em meio sólido em Marine-Ágar) .....	26
Figura 7. Fluxograma de extração para obtenção dos extratos aquoso e orgânico do fungo M16.....	27
Figura 8. Esquema de fracionamento por cromatografia de permeação em gel (CPG) do extrato M16A.....	28
Figura 9. Esquema de fracionamento por extração em fase sólida da fração M16As38 e isolamento e purificação da sub-fração M16As38A.....	29
Figura 10. Cromatograma por HPLC-UV semipreparativo da amostra M16As38A que resultou no isolamento dos compostos 38A1 e 38A2. ....	30
Figura 11. Esquema de isolamento por HPLC-UV-MS da fração M16As51 e da subfração M16As51F.....	31
Figura 12. Cromatograma por HPLC-UV semipreparativo da amostra M16As51. ....	31
Figura 13. Cromatograma por HPLC-UV semipreparativo da amostra M16As51F... ..	32
Figura 14. Esquema de isolamento por HPLC-UV da fração M16As54.....	33
Figura 15. Cromatograma por HPLC-UV semipreparativo da amostra M16As54. ....	33
Figura 16. Esquema de isolamento da fração M16As140 .....	34
Figura 17. Cromatograma por HPLC-UV semipreparativo da amostra M16As140. ...	35
Figura 18. Correlações observadas no mapa de contorno COSY para a porção decalina presente no composto M16As54I.....	38
Figura 19. Correlações observadas no mapa de contorno HMBC do composto M16As54I.....	38

Figura 20. Interações NOE observadas no espectro NOESY para determinação da configuração relativa da porção <i>trans</i> -decalina presente no composto M16As54I ...	39
Figura 21. Configuração relativa estabelecida para o composto M16As54I a partir das correlações observadas no NOESY.....	40
Figura 22. Correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC que estabelecem a estrutura do composto M16As38A2 .....	42
Figura 23. Configuração relativa estabelecida para o composto M16As38A2 a partir das correlações observadas no NOESY. ....	42
Figura 24. Estrutura química da solanapirona M ( suposto composto M16As38A1).	43
Figura 25. Correlações de HMBC, COSY e TOCSY observadas no composto M16As51F1.....	45
Figura 26. Correlações NOESY observadas no composto M16As51F1.....	46
Figura 27. Substância M16As140D e correlações chaves HMBC. ....	48



## Lista de abreviaturas e siglas

<b>[<math>\alpha</math>]<sub>D</sub></b>	Rotação óptica específica
<b>AcOEt</b>	Acetato de Etila
<b>CD<sub>3</sub>OD</b>	Metanol deuterado
<b>CET</b>	Cromatografia de exclusão por tamanho
<b>COSY</b>	<i>Correlation spectroscopy</i>
<b>d</b>	dubleto
<b>dd</b>	duplo dubleto
<b>ddd</b>	duplo duplo dubleto
<b>dt</b>	duplo tripleto
<b>DAD</b>	<i>Diode Array detector</i>
<b>DBO</b>	Demanda bioquímica de oxigênio
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DMSO-d<sub>6</sub></b>	Dimetilsulfóxido deuterado
<b>ELSD</b>	<i>Evaporating light scattering detector</i>
<b>EM</b>	Espectrometria de massas
<b>ESI</b>	<i>Electrospray ionization</i>
<b>FTIR</b>	<i>Fourier transform infrared spectroscopy</i>
<b>HL</b>	<i>Human Leukemia</i>
<b>HMBC</b>	<i>Heteronuclear multiple bond correlation</i>
<b>HPLC</b>	<i>High Perfomacy Liquid Chromatography</i>
<b>HRESIMS</b>	<i>High-resolution electrospray ionization mass spectrometry</i>
<b>HSQC</b>	<i>Heteronuclear single quantum coherence</i>
<b>IQSC</b>	Instituto de Química de São Carlos
<b>IV</b>	Infravermelho
<b>J</b>	Constante de acoplamento em Hz
<b>m</b>	multipleto

<b><i>m/z</i></b>	Razão massa/carga
<b>MA</b>	Marine ágar
<b>MeCN</b>	Acetonitrila
<b>MeOH</b>	Metanol
<b>MS</b>	<i>Mass spectrometry</i>
<b>NOESY</b>	<i>Nuclear Overhauser effect correlation spectroscopy</i>
<b>PDB</b>	<i>Potato dextrose broth</i>
<b>QOSBio</b>	Química Orgânica de Sistemas Biológicos
<b>RMN-<sup>13</sup>C</b>	Ressonância magnética nuclear de carbono
<b>RMN-<sup>1</sup>H</b>	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
<b>s</b>	singleto
<b>SPE</b>	<i>Solid Phase Extraction</i>
<b>t</b>	triplete
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>δ</b>	Deslocamento químico
<b>λ<sub>máx</sub></b>	Comprimento de onda de máxima absorção

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>16</b>
2.1 A malária.....	16
2.2 Metabólitos secundários isolados de organismos e microrganismos marinhos com atividade antiplasmodial .....	20
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>22</b>
3.1 Objetivo Geral.....	22
3.2 Objetivos Específicos .....	22
<b>4. PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	<b>23</b>
4.1 Materiais, equipamentos e técnicas utilizadas .....	23
4.1.1 <i>Fracionamento por cromatografia de exclusão por tamanho (CET)</i> .....	23
4.1.2 <i>Fracionamento por cromatografia em coluna pré-empacotada</i> .....	23
4.1.3 <i>Análises por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada aos detectores de arranjos de diodos e espalhamento de luz, e à espectrometria de massas (HPLC-DAD-ELSD-MS)</i> .....	23
4.1.4 <i>Análises por ressonância magnética nuclear (RMN)</i> .....	24
4.1.5 <i>Rotação específica <math>[\alpha]_D</math></i> .....	24
4.1.6 <i>Espectroscopia no Infravermelho (IV)</i> .....	24
4.2 Procedimentos experimentais.....	25
4.2.1 <i>Procedimentos gerais para reativação, cultivo e obtenção dos extratos da linhagem fúngica em escala ampliada</i> .....	25
4.2.2 <i>Crescimento em escala ampliada da linhagem do fungo M16</i> .....	26
4.2.3 <i>Preparação dos extratos orgânico e aquoso do meio de crescimento do fungo M16</i> .....	26
4.2.4 <i>Fracionamento por cromatografia de exclusão por tamanho (CET) do extrato M16A</i> .....	27
4.3 Isolamento dos constituintes das frações bioativas M16As38, M16As44, M16As51, M16As54 e M16As140 .....	29
4.3.1 <i>Isolamento dos constituintes da fração M16As38</i> .....	29
4.3.2 <i>Isolamento dos constituintes da fração M16As51</i> .....	30
4.3.3 <i>Isolamento dos constituintes da fração M16As54</i> .....	32
4.3.4 <i>Isolamento dos constituintes da fração M16As140</i> .....	34

4.4 Determinação da atividade antiplasmodial <i>in vitro</i> .....	35
<b>5. Resultados e discussão .....</b>	<b>36</b>
5.1 Identificação estrutural da substância M16As54I .....	36
5.2 Identificação estrutural da substância M16As38A2 .....	41
5.3 Identificação estrutural da substância M16As38A1 .....	43
5.4 Identificação estrutural da substância M16As51F1 .....	44
5.5 Identificação estrutural da substância M16As140D .....	47
5.6 Avaliação da atividade antiplasmodial dos compostos isolados .....	49
<b>6. Conclusão e perspectivas futuras .....</b>	<b>51</b>
<b>7. Referências .....</b>	<b>52</b>
<b>Apêndice.....</b>	<b>56</b>

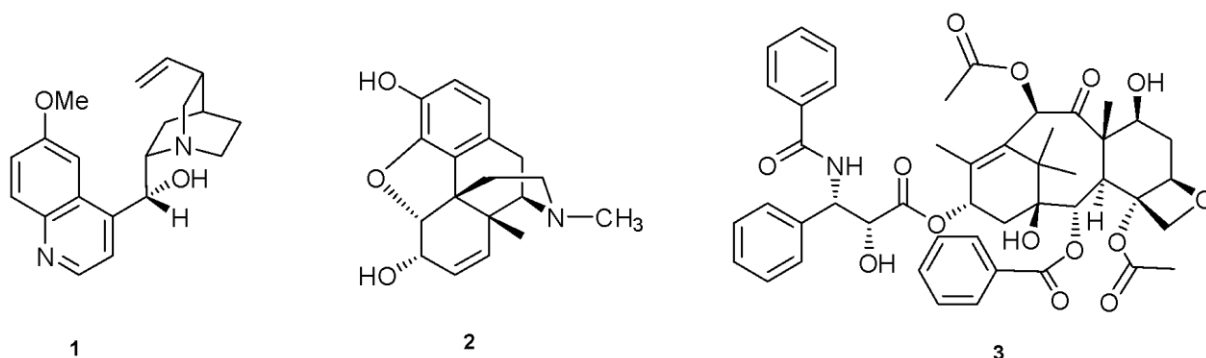
## 1. INTRODUÇÃO

Ao longo da história, metabólitos secundários de diferentes organismos têm sido uma significativa fonte de inspiração para o desenvolvimento de medicamentos, sendo constituída a maioria dos fármacos atualmente utilizados. A natureza continua sendo um reservatório inesgotável de novas moléculas com potencial interesse terapêutico.

De acordo com Newman e Gragg (2020), cerca de 45% de pequenas moléculas, novas entidades químicas, registradas como medicamentos em todo o mundo durante o período de 1981 a 2019, eram metabólitos secundários ou foram nestes inspirados, sendo derivados por sínteses totais ou semi-sínteses.

Os metabólitos secundários podem ser isolados de diversas fontes, como plantas, diferentes animais e microrganismos. Pode-se destacar três metabólitos secundários de muita importância (Figura 1). A quinina (1), um alcaloide natural encontrado na casca da árvore *Cinchona* sp. (ACHAN et al., 2011); a morfina (2), um alcaloide extraído principalmente do látex da papoula (*Papaver somniferum*), (LAUX-BIEHLMANN et al., 2013) e o taxol (3), um metabólito de origem biossintética híbrida, isolado da casca da árvore *Taxus brevifolia* (WANI et al., 1971). Estes são exemplos de descobertas revolucionárias para o tratamento da malária (1), como analgésico (2), e para o tratamento do câncer de ovário (3).

Figura 1. Estruturas químicas de importantes metabólitos secundários utilizados desde as suas descobertas até os dias atuais



Fonte: Autoria própria

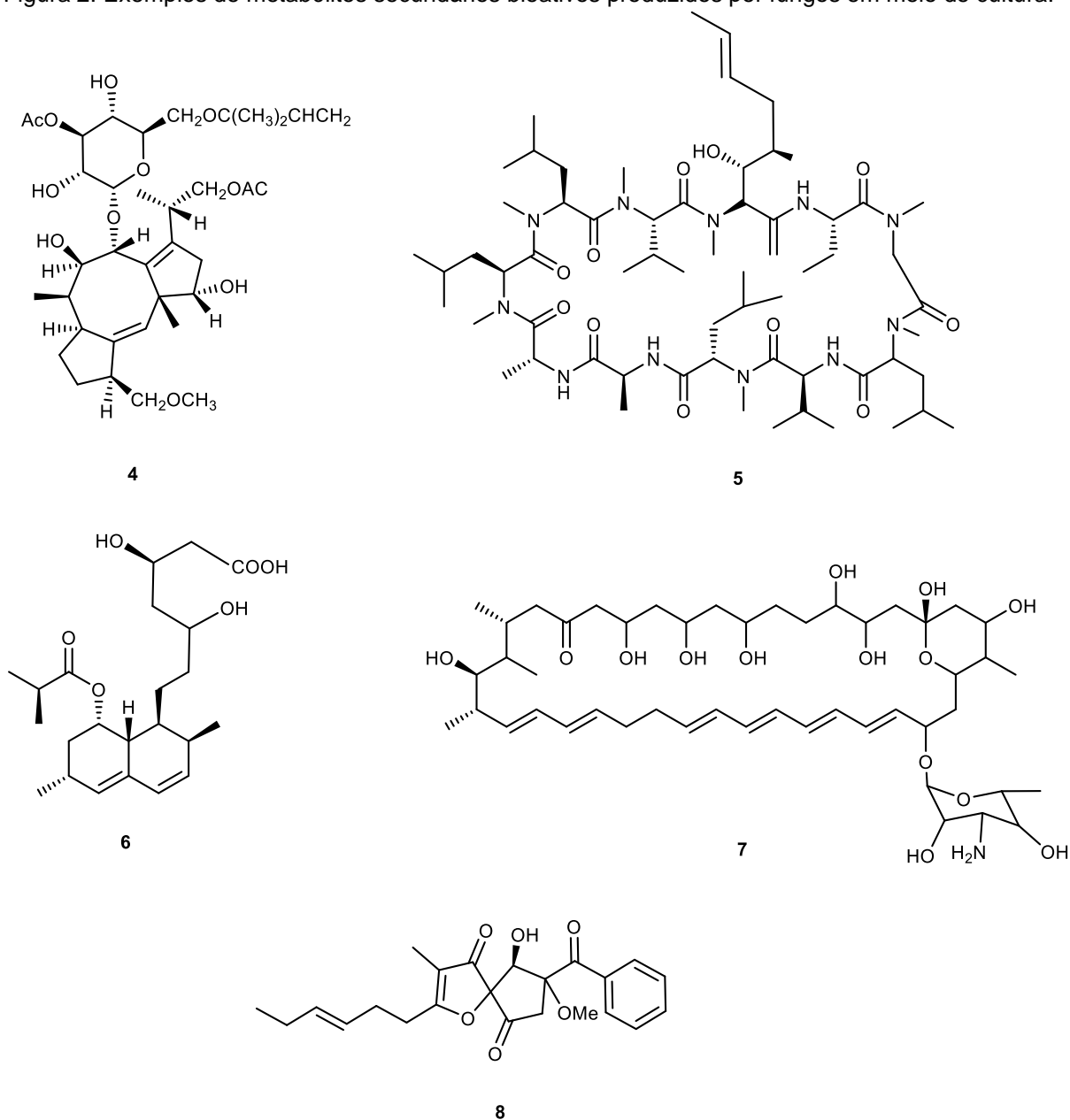
Os exemplos de metabólitos secundários da Figura 1 foram isolados de plantas. Por muitos anos, os produtos derivados de vegetais foram a principal fonte de recursos

medicinais, dominando as farmacopeias e oferecendo uma fonte inesgotável de compostos naturais com diversas atividades biológicas.

Contudo, inúmeros são os compostos bioativos produzidos em culturas de microrganismos. Por exemplo a fusicocina A (4), um glicosídeo diterpênico isolado de culturas do fungo *Fusicoccum amygdali*, diminui a proliferação celular e a migração de linhas celulares de glioblastoma multiforme humano *in vitro*, um tumor cerebral maligno (BURY et al., 2013). A ciclosporina A (5), um polipeptídeo cíclico, atua como imunossupressor e é produzido pelo fungo *Tolypocladium inflatum* (FALAH et al., 2023). A lovastatina (6), um hipolipemiante produzido pelo fungo *Aspergillus terreus* (FASELEH JAHROMI et al., 2012). A nistatina (7), um antifúngico poliênico utilizado em larga escala no tratamento de candidíases, é produzido pelo fungo *Streptomyces noursei*. (BRAUTASET et al., 2000). A cefalimisina A (8), isolada de culturas de *Aspergillus fumigatus* OPUST106B-5, apresenta atividade citotóxica significativa contra a linhagem celular de leucemia murina P-388 e a linha celular de leucemia humana HL-60, (HASAN et al., 2015). Estes são apenas alguns exemplos da enorme variedade desses compostos bioativos (Figura 2).

Metabólitos secundários produzidos por fungos isolados de organismos marinhos têm despertado especial interesse, devido à sua ampla diversidade de estruturas químicas e seu potencial para a descoberta de novos fármacos. Os fungos de origem marinha que produzem metabólitos secundários bioativos são usualmente isolados de uma grande variedade de organismos marinhos, incluindo algas, esponjas, corais, moluscos, tunicados e outros invertebrados marinhos.

Figura 2. Exemplos de metabólitos secundários bioativos produzidos por fungos em meio de cultura.



Fonte: Autoria própria

Recentemente, no Grupo de Química Orgânica de Sistemas Biológicos (QOSBio), do Instituto de Química de São Carlos (IQSC-USP), sob responsabilidade do Prof. Dr. Roberto G. S. Berlinck, foi isolado de um pepino-do-mar (ainda não identificado), o fungo *Peroneutypa* sp. M16. Na literatura, a pesquisa sobre fungos deste gênero ainda é limitada. Não existem muitos estudos que explorem seu potencial para a produção de compostos bioativos. Esta pesquisa foi motivada pela análise do metabolismo secundário do fungo *Peroneutypa* sp., associado a um

pepino-do-mar não identificado. O extrato orgânico do meio de cultivo desta linhagem fúngica apresentou atividade antiplasmodial.

Continuando os trabalhos realizados no QOSBio que tem como objetivo descobrir novos metabólitos secundários de origem marinha com atividade biológica, realizou-se o estudo químico das frações obtidas do extrato do meio de cultura produzido pelo fungo *Peroneutypa* sp. Objetivou-se realizar o isolamento e purificação, monitorados por bioensaio, de substâncias ativas contra *P. falciparum*, bem como elucidar completamente as estruturas dos metabólitos ativos isolados e purificados, empregando-se técnicas espectroscópicas e espectrométricas.

## 2. JUSTIFICATIVA

### 2.1 A malária

A malária foi descoberta em meados do século 19, por um médico militar francês chamado Charles Louis Alphonse Laveran. Presumia-se que a malária, que se traduz literalmente como ar sujo, é caracterizada por febres paroxísticas e transmitida por fumaças nocivas emanadas dos pântanos (RICH; XU, 2011). Posteriormente descobriu-se que *Plasmodium* sp. são os parasitas causadores da malária. Cinco espécies de *Plasmodium* sp. são conhecidas: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* e *P. knowlesi*. A primeira variante é causadora da forma mais grave da doença e responsável por 99% das mortes globais por malária (WHO, 2020).

Além da crise febril, característica da doença, a malária severa pode resultar em hipoglicemia, complicações respiratórias, incluindo edema pulmonar, insuficiência renal, acidose metabólica, anemia severa e malária cerebral. O conjunto deste quadro clínico severo pode ser fatal (GOMES et al, 2011; GUTERRY et al, 2012).

Cerca de 3,2 bilhões de pessoas estão em risco de contrair esta doença em todo o mundo. Em 2020 foram reportados 241 milhões de casos de malária, resultando em cerca de 627.000 mortes, a maioria na África Subsaariana, representando cerca de 94% das mortes por malária do mundo e afetando principalmente crianças com menos de cinco anos de idade (OMS, 2021).

Embora a Organização Mundial da Saúde (OMS) não mais classifique a malária e a tuberculose como doenças negligenciadas, essas enfermidades ainda representam desafios à saúde pública global, afetando uma grande parte da



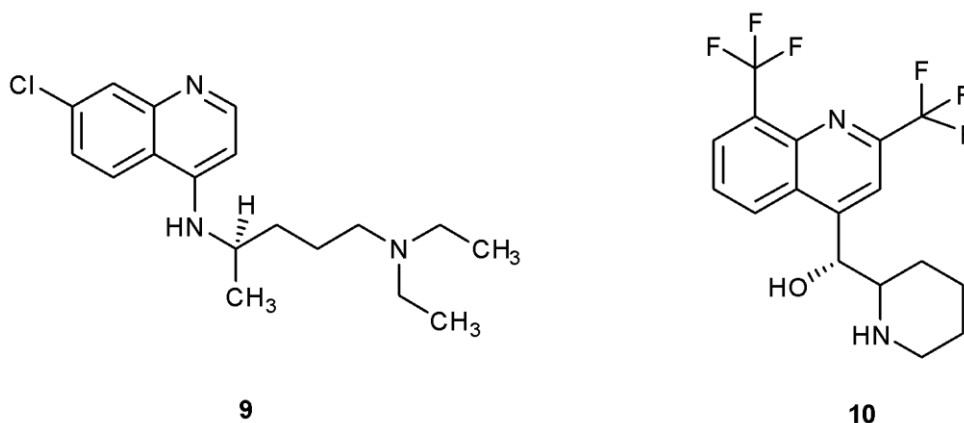
população mundial, principalmente economicamente desfavorecidos. Além disso, essas doenças enfrentam obstáculos semelhantes aos das doenças consideradas negligenciadas como a complexidade do tratamento, toxicidade dos medicamentos e resistência aos fármacos disponíveis (DE ARAUJO et al., 2020). Leishmaniose, doença do sono, malária, doença de Chagas, tripanossomíase africana, esquistossomose, dengue e tuberculose são doenças tropicais associadas diretamente à pobreza e a condições de vida inadequadas, consideradas como doenças negligenciadas (DE SOUZA et al., 2020).

No Brasil, aproximadamente 99,9% da transmissão da malária ocorre na região amazônica, sendo 33 municípios concentrando 80,0% dos 137.857 casos autóctones da doença relatados em 2021. (BRASIL, 2022).

A partir dos anos 90, houve um aumento dos gastos para combater o avanço da doença, condição resultou em uma diminuição progressiva do número de casos registrados (BRASIL, 2010). Entretanto, os gastos ainda são irrisórios quando se trata de investimentos para promover pesquisas e estudos sobre a doença, seus mecanismos patogênicos, métodos de prevenção, diagnóstico e tratamento eficaz, e descoberta de novos fármacos com potencial antimalárico, com o objetivo de que os números de casos, acima relatados, possam diminuir significativamente, e por conseguinte, diminua seu impacto na saúde pública.

A quimioterapia antimalária teve início no século XVII, quando os jesuítas notaram peruanos tratando doenças febris com ervas do gênero *Cinchona* spp. (família Rubiaceae). Na época, a planta curou a Condessa de Chinchón, Francisca Enríquez de Rivera, esposa do Vice-rei espanhol no Peru. Foi tratada com o chá de uma árvore que os indígenas peruanos chamavam de 'kinakina.

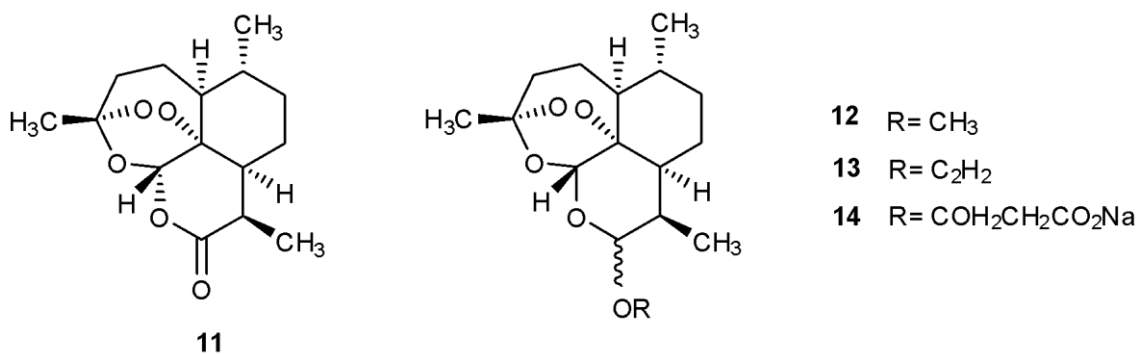
O estudo realizado sobre esta espécie resultou na descoberta da quinina (**1**), medicamento ainda hoje utilizado como tratamento de segunda linha para malária grave (ACHAN et al., 2011). Devido à toxicidade da quinina, novos antimaláricos sintéticos foram colocados no mercado, incluindo a cloroquina (**9**) e a mefloquina (**10**) (Figura 3). A cloroquina exibiu vantagens sobre a quinina, incluindo custo mais baixo e toxicidade reduzida, o que resulta em maior adesão ao tratamento (FRANÇA et al., 2008), mas há relatos de resistência dos parasitas *Plasmodium* spp. ao medicamento.



Fonte: Autoria própria

Outro fármaco também derivado de produtos naturais, mais recentemente desenvolvido, é a artemisinina (**11**) (KLAYMAN, 1985), um sesquiterpeno produzido a partir da planta *Artemisia annua*. Foi descoberta em 1972 oriunda da planta *A. annua* utilizada na China por aproximadamente 2000 anos para tratar febres e como esquizonticida sanguíneo (WIESNER et al., 2003). O arteméter (**12**), o arteéter (**13**) e o artesunato de sódio (**14**) são derivados semissintéticos das artemisinina que se encontram atualmente em uso contra malária (ÁLVAREZ-BARDÓN et al., 2020). Devido à curta meia-vida desta classe de antimaláricos, seu uso deve ser acompanhado de medidas extremas para erradicar completamente os mosquitos (WIESNER et al., 2003).

Figura 4. Estruturas químicas da artemisinina (**11**) e de seus derivados semissintéticos (**12-14**).



Fonte: autoria própria

A quinina e a artemisinina são utilizadas no tratamento da malária, especialmente em combinação com outros medicamentos, devido à sua eficácia no combate à doença, especialmente em regiões onde a resistência aos medicamentos é um problema. No entanto, é importante ressaltar que a descoberta de metabólitos secundários com atividade antiplasmodial é crucial para o desenvolvimento de novos medicamentos antimaláricos e que este continua sendo uma prioridade para a saúde pública, considerando-se a ameaça crescente da resistência dos parasitas *Plasmodium* spp. aos medicamentos existentes.

A infecção por *P. falciparum*, que responde por cerca de 10% das doenças infecciosas no Brasil, deve ser tratada com mais cuidado devido à gravidade da doença malária cerebral. A malária cerebral é a patologia mais resistente a medicamentos. Devido ao fato de que a monoterapia nunca deve ser utilizada no tratamento desta, o Ministério da Saúde fornece um manual de tratamento que aconselha artesunato e mefloquina para a causada por *P. falciparum* não complicada, com artesunato mais mefloquina ou quinina mais doxicilina como segunda opção (BRASIL, 2012).

Uma das complicações mais perigosas da malária é a resistência do protozoário à terapia. Embora *P. falciparum* não seja a única espécie de *Plasmodium* que é resistente ao tratamento, a infecção por *P. falciparum* resulta em alta taxa de mortalidade pela doença. Isso implica que existe uma demanda real para a identificação de novos fármacos para o tratamento da malária.

Por um longo tempo, a cloroquina foi amplamente utilizada no tratamento da malária, devido à sua baixa toxicidade e viabilidade econômica. Durante a Guerra do Vietnã, os militares dos EUA descobriram que os parasitas da malária haviam se tornado resistentes à cloroquina. Como consequência, mais de 300.000 compostos foram analisados como parte de um grande esforço de pesquisa para identificar novos agentes antimaláricos. Apenas dois compostos foram considerados eficazes contra cepas resistentes ao *P. falciparum*: a mefloquina e a halofantrina (FOLEY e TILLEY, 1998). Dois fármacos mais recentemente desenvolvidos foram a artemisinina (KLAYMAN, 1985) e o atovacone (BASCO, 2003).

A resistência é causada sobretudo por mudanças no DNA do protozoário, tais como alterações na seqüência de aminoácidos em diferentes códons e cromossomos. A resistência pode ser desencadeada por administração farmacêutica inadequada, características farmacológicas do composto ativo, variáveis apresentadas pelos

hospedeiros do parasita, fatores parasitários ou fatores ambientais (WINSTANLEY, 2001).

A resistência do protozoário aos fármacos antimaláricos é um grande desafio para o tratamento da doença e pode levar a um aumento da morbidade e mortalidade. Além disso, muitos dos medicamentos utilizados atualmente apresentam efeitos colaterais graves e são difíceis de administrar em áreas com recursos limitados. Portanto, a descoberta de novos agentes antimaláricos eficazes e seguros é crucial para o controle e a erradicação da malária. Estudos com metabólitos secundários de fungos e outros organismos têm mostrado resultados promissores na descoberta de agentes potenciais para o tratamento da malária, abrindo caminho para o desenvolvimento de novas terapias para a doença.

## **2.2 Metabólitos secundários isolados de organismos e microrganismos marinhos com atividade antiplasmodial**

Os produtos naturais de organismos e microrganismos marinhos apresentam grande potencial para serem desenvolvidos como fármacos para o tratamento de muitas doenças, sobretudo doenças negligenciadas para as quais existem poucos tratamentos efetivos.

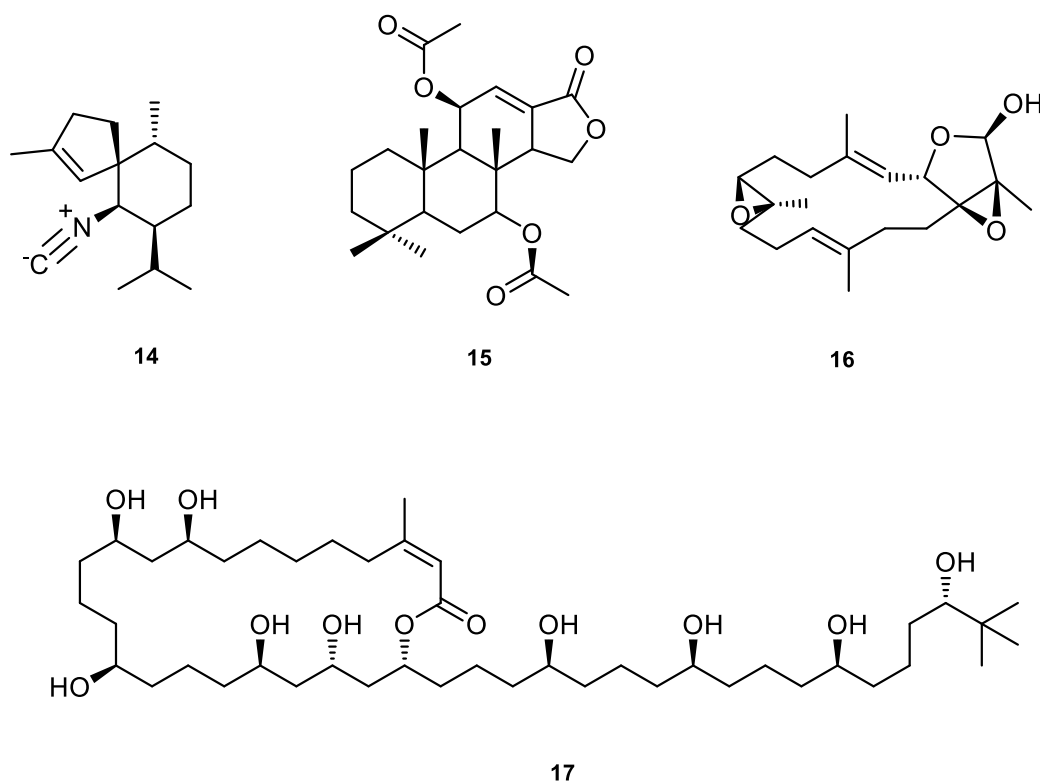
Numerosas substâncias com atividades biológicas e terapêuticas relevantes para o ser humano foram encontradas a partir de metabólitos secundários de origem marinha. Algumas tornaram-se fármacos amplamente utilizados para o tratamento de uma série de doenças, devido às suas propriedades antibacteriana, antidiabética, anti-inflamatória, antiprotozoária, antifúngica, antituberculose e antiviral (MAYER et al., 2021).

Os fungos isolados de organismos marinhos têm sido uma fonte promissora de metabólitos secundários com estruturas complexas e únicas, incluindo alcaloides, terpenóides, peptídeos e polissacarídeos. Fungos isolados de organismos marinhos são adaptados às condições extremas do ambiente marinho, como alta pressão, baixa luminosidade, variações de temperatura e salinidade (LAURITANO; IANORA, 2020).

Recente *review* sobre produtos naturais marinhos com atividade antiplasmodial apresenta inúmeros compostos oriundos de fungos marinhos (NEGM, EZZAT e ZAYED, 2023).

A axisonitrila-3 (**15**), isolada da esponja *Axinella cannabina*, demonstrou ter atividade antiplasmodial contra cepas de *P. falciparum* sensíveis à cloroquina. A dorisenona D (**16**), isolada dos extratos de esponjas marinhas dos gêneros *Spongia* e *Ircinia*, apresentou atividade antiplasmodial com  $IC_{50}=1,3 \mu M$ . O laevigatol A (**17**), isolado de extratos das algas *Laurencia obtusa* e *Laurencia glandulífera*, apresentou atividade antiplasmodial moderada, com  $IC_{50} < 5,0 \mu M$ . O bastimolídeo B (**18**), macrolídeo polihidroxilado com um grupo *tert*-butila terminal, exibiu potente atividade antimalárica contra a cepa HB3 de *P. falciparum* sensível à cloroquina ( $IC_{50} = 5,7 \mu M$ ) (Figura 5).

Figura 5. Exemplos de produtos naturais marinhos que apresentam atividade antiplasmodial.



Fonte: autoria própria

Esses e demais exemplos apresentados no *review* citado, reforçam que a busca por novos metabólitos secundários produzidos por organismos e microrganismos marinhos com potentes e específicas atividades biológicas continua sendo um importante campo de pesquisa, com potencial para descoberta de novos modelos de fármacos antimaláricos, ou para a abordagem de diversas outras doenças.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

O presente estudo pretende descobrir compostos de origem fúngica com ação inibitória contra *Plasmodium falciparum*, o parasita causador da malária.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Crescimento em escala ampliada (10 a 30 litros) de culturas de uma linhagem fúngica a fim de produzir quantidade suficiente de cultura visando o isolamento de metabólitos bioativos;
- Realização do isolamento e purificação, monitorados por bioensaio, das substâncias ativas contra *P. falciparum* produzidas pela linhagem fúngica selecionada;
- Identificação estrutural integral dos metabólitos ativos isolados e purificados, empregando-se técnicas espectroscópicas e espectrométricas;
- Avaliação da atividade antiplasmodial das substâncias puras e identificadas.

## **4. PARTE EXPERIMENTAL**

### **4.1 Materiais, equipamentos e técnicas utilizadas**

#### **4.1.1 Fracionamento por cromatografia de exclusão por tamanho (CET)**

Nas separações por cromatografia de exclusão por tamanho, foi usada uma coluna de vidro com dimensões de 170,0 cm de comprimento e 2,0 cm de diâmetro interno. Como fase estacionária, o material utilizado foi a Sephadex<sup>®</sup> LH-20 (Pharmacia Biotech<sup>®</sup>) e o MeOH grau cromatográfico utilizado para eluição.

#### **4.1.2 Fracionamento por cromatografia em coluna pré-empacotada**

De acordo com a polaridade das amostras em análise, separações cromatográficas foram executadas em colunas pré-empacotadas (marca Phenomenex<sup>®</sup>) de tamanho 5,0 g com sílica-gel derivatizada com grupos octadecilsilano – C<sub>18</sub> como fase estacionária.

#### **4.1.3 Análises por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada aos detectores de arranjos de diodos e espalhamento de luz, e à espectrometria de massas (HPLC-DAD-ELSD-MS)**

As análises de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada aos detectores de arranjos de diodos e espalhamento de luz, e à espectrometria de massas (HPLC-DAD-ELSD-MS) foram obtidas em um sistema cromatográfico Waters<sup>®</sup> constituído por um sistema de controle Alliance, modelo Waters 2695, acoplado a um detector de arranjo de fotodiodos (modelo 2696) e um detector de espectrometria de massas (modelo Waters Micromass ZQ 2000), operado pelo software Empower. O detector de UV teve seu ajuste para monitoramento na faixa compreendida entre  $\lambda_{\text{máx}}$  200 – 400 nm. O espectrômetro de massas foi ajustado de acordo com os seguintes critérios: temperatura da fonte 100 °C, voltagem do capilar 3,00 kV temperatura de dessolvatação 350 °C, ionização por electrospray (ESI) variando entre os modos positivo e negativo, e detecção na faixa de 100 – 1200 Da. O fluxo de gás no cone foi

conservado em 50 L/h e o fluxo de dessolvatação em 350 L/h. A cromatográfica de separação foi realizada com uma coluna X-terra (Waters – C<sub>18</sub>, 4,6 × 250 mm, 5 µm), com vazão de 1 mL/min da fase móvel composta por H<sub>2</sub>O (0,1% ácido fórmico) e MeOH/MeCN (1:1) (0,1% ácido fórmico). A eluição foi realizada variando-se a fase orgânica de 10% a 100%, em 22 minutos. A injeção foi de 10 µL de uma solução de [2,0 mg/mL] para extratos e frações, enquanto para substâncias isoladas de [0,5 mg/mL].

#### **4.1.4 Análises por ressonância magnética nuclear (RMN)**

Os dados de RMN foram adquiridos em um espectrômetro Bruker Avance III (600,13 MHz para <sup>1</sup>H e 150,9 MHz para <sup>13</sup>C), equipado com sonda criogênica TCI (<sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C/<sup>15</sup>N) de 5 mm. As amostras foram solubilizadas em solventes deuterados com pureza ≥ 99,9%, empregando-se como referência o sinal do resíduo do solvente não-deuterado (CD<sub>3</sub>OD ou DMSO-*d*<sub>6</sub>, Cambridge Isotope Laboratories) e analisadas em tubos de RMN de 3,0 ou 5,0 mm. Os dados foram processados com o software TopSpin versão 3.6.1 (Bruker Corporation).

#### **4.1.5 Rotação específica [α]<sub>D</sub>**

As medidas de rotação específica, para as substâncias puras, foram obtidas em um polarímetro digital P-2000 da Jasco, operando no comprimento de onda de 589 nm com uma lâmpada de sódio. As amostras foram analisadas em MeOH.

#### **4.1.6 Espectroscopia no Infravermelho (IV)**

As análises no infravermelho foram realizadas em um espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier (FTR) da marca Shimadzu, modelo IRAffinity 1 e Bomem MB-102. Solubilizou-se as amostras em MeOH e aplicadas em pastilha de silício.



## 4.2 Procedimentos experimentais

### 4.2.1 Procedimentos gerais para reativação, cultivo e obtenção dos extratos da linhagem fúngica em escala ampliada

A linhagem fúngica utilizada nesse estudo foi extraída de um pepino-do-mar (holotúria) de espécie não identificada. A holotúria foi coletada em 2017 na costa do município de Guarapari, Espírito Santo.

As linhagens fúngicas isoladas da mesma holotúria foram purificadas pela Dra. Laura Pavan Lôca durante o seu doutoramento. As linhagens foram preservadas em soluções de glicerol (25%, v/v) em freezer a – 80 °C e depositadas na coleção de linhagens do laboratório de Química Orgânica de Sistemas Biológicos (QOSBio), Instituto de Química de São Carlos (IQSC), ficando disponíveis para estudos futuros. Posteriormente, o Dr. Marcelo Rodrigues de Amorim, pós-doutorando no Grupo de Química Orgânica de Sistemas Biológicos, realizou um screening químico e biológico com as mesmas linhagens fúngicas. Após crescimento de todas as linhagens fúngicas isoladas a partir da mesma holotúria, obteve os extratos orgânicos e aquosos dos meios de cultivo de cada uma das linhagens. Alíquotas destes extratos foram encaminhadas para a avaliação em bioensaios de atividade antibacteriana, antiplasmodial e citotóxica em células tumorais nos laboratórios de pesquisadores colaboradores do prof. Roberto Berlinck.

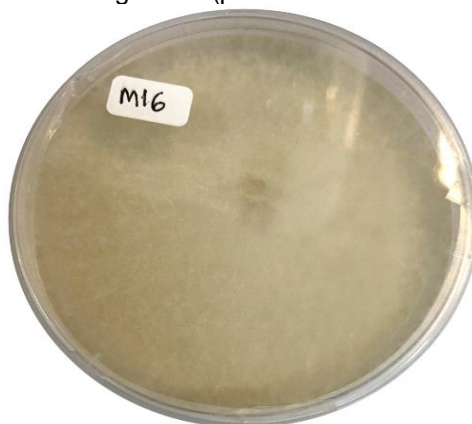
O extrato do meio de cultivo da linhagem fúngica codificada como M16, posteriormente identificada como sendo do gênero *Peroneutypa*, apresentou, em bioensaio de atividade antiplasmodial realizado pelo grupo do Prof. Rafael Guido – IFSC/USP, atividade antiplasmodial significativa e foi selecionada para o desenvolvimento dessa pesquisa.

Os procedimentos realizados para reativação, cultivo e obtenção dos extratos da linhagem fúngica *Peroneutypa* sp. M16 foram realizados em escala ampliada pelo Dr. Marcelo Rodrigues de Amorim, antes do início desse projeto de mestrado. Para a reativação da linhagem, foi realizado procedimento de inoculação em placas de Petri contendo Marine Agar (MA) na ausência de luz e conservadas em estufa incubadora de demanda bioquímica de oxigênio (DBO) por 7 dias a 28 °C.

#### 4.2.2 Crescimento em escala ampliada da linhagem do fungo M16

Para o crescimento em escala ampliada, discos de ágar, obtidos do pré-cultivo em meio sólido (Figura 6), contendo micélio ( $5 \times 0.5 \text{ cm}^2$ ), foram utilizados para inocular 75 frascos Schott de 500 mL de capacidade contendo, em cada frasco, 200 mL de meio de cultivo *Potato Dextrose Broth* (PDB) com água marinha artificial (AMA: NaCl 13,6 g/L;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  1,30 g/L;  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  4,53 g/L; KCl 0,64 g/L;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  5,94 g/L;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  10,0 mg/L;  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  2,1 mg/L). No total foram inoculados 15 litros de meio de crescimento, cultivados em DBO em modo estático e 28 °C. O nível de glicose no meio de cultivo líquido foi monitorado com tiras de medida de glicose (Uriscan®). Constatada a ausência de glicose no meio após 22 dias, o crescimento foi interrompido por meio de filtração com papel de filtro em funil de Büchner.

Figura 6. Placa de Petri inoculada com o fungo M16 (pré-cultivo em meio sólido em Marine-Ágar)

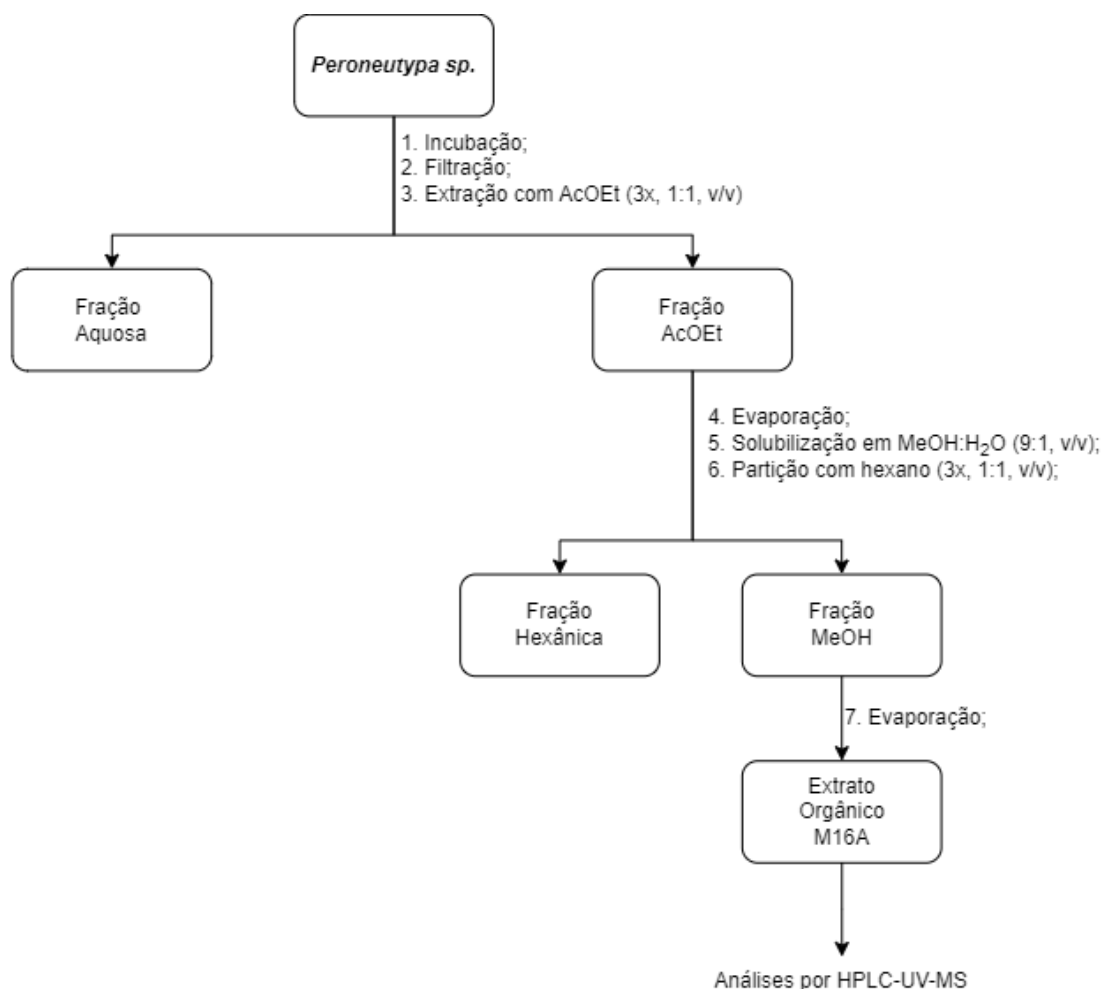


Fonte: autoria própria

#### 4.2.3 Preparação dos extratos orgânico e aquoso do meio de crescimento do fungo M16

O meio de crescimento filtrado foi particionado 3 x com AcOEt. A fração orgânica foi evaporada em rotaevaporador produzindo o extrato bruto AcOEt. Utilizou-se 150 mL MeOH para solubilizar o extrato AcOEt sendo depois particionado com hexano (3 x 150 mL), objetivando-se remover compostos de caráter lipídico (Figura 7). O extrato orgânico desengordurado (AcOEt-MeOH, de código M16A) foi transferido para frascos, evaporados, secos, sua massa obtida, sendo armazenados em geladeira a 4°C.

Figura 7. Fluxograma de extração para obtenção dos extratos aquoso e orgânico do fungo M16



Fonte: autoria própria

#### 4.2.4 Fracionamento por cromatografia de exclusão por tamanho (CET) do extrato M16A

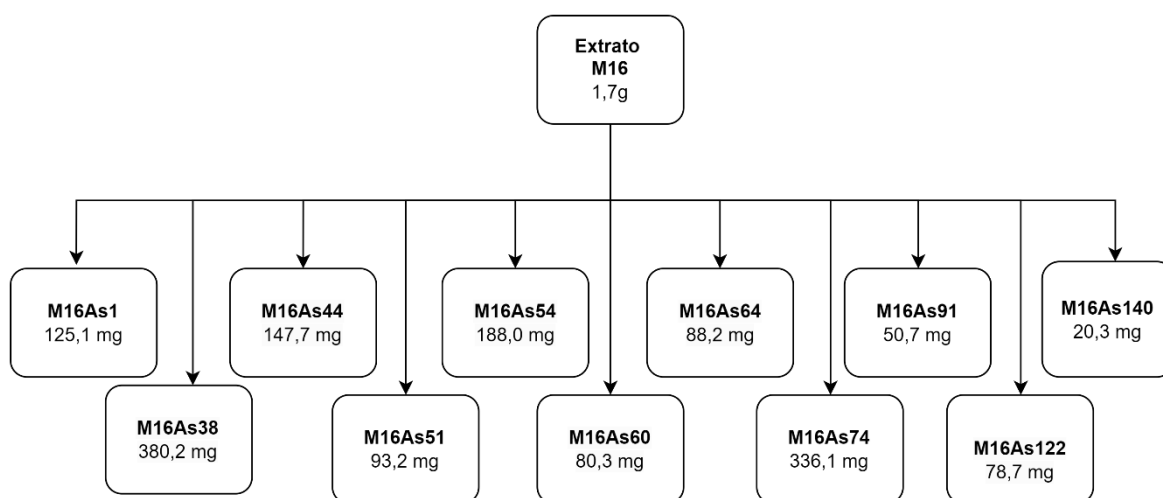
Para a realização da cromatografia de exclusão por tamanho, o extrato M16A (1,7 g) foi solubilizado em MeOH (8,0 mL), centrifugado por 10 minutos e um precipitado foi separado por filtração (32 mg). O material solúvel em MeOH foi aplicado em uma coluna (200 × 2,5 cm d.i.) tendo Sephadex<sup>®</sup> LH-20 como fase estacionária, eluída com MeOH. Após a eluição foram obtidas 167 frações de aproximadamente 13 mL cada uma, coletadas com o auxílio de um coletor automático (GE Healthcare, modelo Frac-920). Estas frações foram analisadas de 5 em 5 por HPLC-DAD-ELSD-

MS. Frações de perfil químico similar foram reunidas em 11 sub-frações finais (Figura 8 e Tabela 1).

Tabela 1. Distribuição das massas das frações após CPG do extrato M16A

FRAÇÕES	GRUPO	MASSA (mg)
<b>M16As1</b>	01-37	125,1
<b>M16As38</b>	38-43	380,2
<b>M16As44</b>	44-50	147,7
<b>M16As51</b>	51-53	93,2
<b>M16As54</b>	54-59	188,0
<b>M16As60</b>	60-63	80,3
<b>M16As64</b>	64-73	88,2
<b>M16As74</b>	74-90	336,1
<b>M16As91</b>	91-121	50,7
<b>M16As122</b>	122-139	78,7
<b>M16As140</b>	140-167	20,3
	Total	1588,5 mg

Figura 8. Esquema de fracionamento por cromatografia de permeação em gel (CPG) do extrato M16A



Fonte: autoria própria

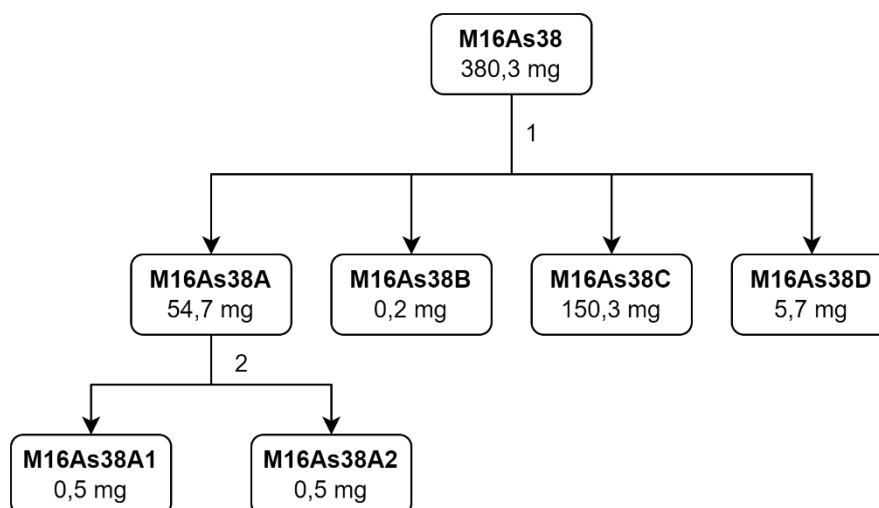
### 4.3 Isolamento dos constituintes das frações bioativas M16As38, M16As44, M16As51, M16As54 e M16As140

As frações obtidas por cromatografia de exclusão por tamanho oriundas do extrato M16A proveniente do cultivo do fungo M16 em meio de cultivo líquido PDB + AMA foram encaminhadas para avaliação da atividade antiplasmodial. Por apresentarem boa atividade antiplasmodial, as frações M16As38, M16As44, M16As51, M16As54 e M16As140 foram submetidas ao isolamento dos seus constituintes principais.

#### 4.3.1 Isolamento dos constituintes da fração M16As38

Para a fração M16As38 (380,3 mg) foi executada uma extração em fase sólida (SPE), empregando-se uma coluna pré-empacotada (Phenomenex®) com 5 g de sílica-gel derivatizada com grupos octadecilsilano-C<sub>18</sub> e eluição com um gradiente escalonado de polaridade, de maneira a fornecer cinco frações: fração A 100% H<sub>2</sub>O; fração B H<sub>2</sub>O/MeOH (3:1, v/v); fração C H<sub>2</sub>O/MeOH (1:1, v/v); fração D H<sub>2</sub>O/MeOH (1:3, v/v); fração E 100% MeOH). A fração 100% H<sub>2</sub>O foi descartada (Figura 9). As frações obtidas foram avaliadas por HPLC-DAD-MS para análise de seus perfis cromatográficos.

Figura 9. Esquema de fracionamento por extração em fase sólida da fração M16As38 e isolamento e purificação da sub-fração M16As38A.



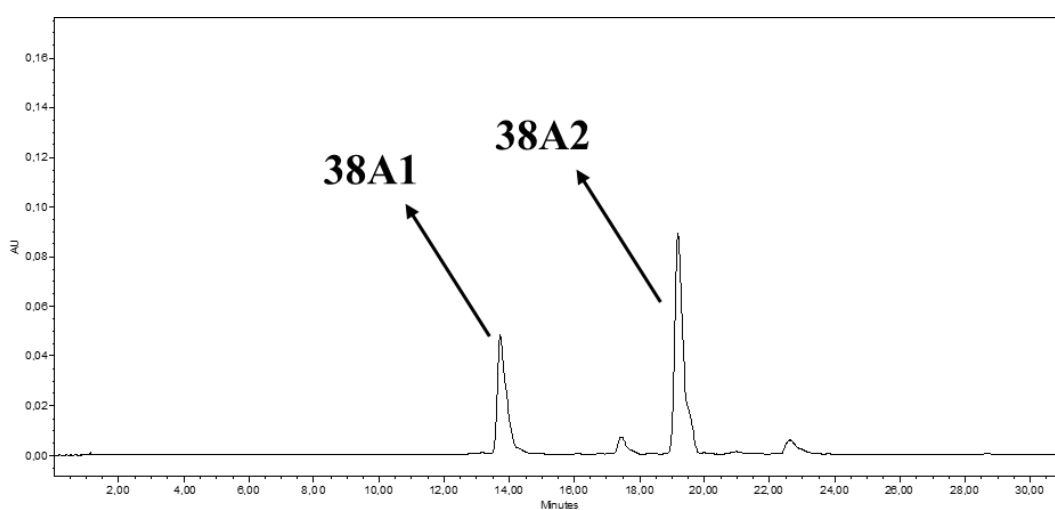
Condições de fracionamento: 1- SPE C<sub>18</sub>, eluição gradiente (100% H<sub>2</sub>O; A: H<sub>2</sub>O/MeOH (3:1, v/v); B: H<sub>2</sub>O/MeOH (1:1, v/v); C: H<sub>2</sub>O/MeOH (1:3, v/v); e D: MeOH); 2- HPLC-UV, coluna X-terra (Waters – C<sub>18</sub>, 7,8 × 150 mm, 5 µm),

vazão de 1 mL/min e modo de eluição gradiente de 30-100% de MeOH (0,1% ácido fórmico) em água por 30 minutos monitorado em 254 e 221 nm.

Fonte: autoria própria

A fração M16As38A foi fracionada por HPLC-UV, utilizando-se uma coluna X-terra (Waters – C<sub>18</sub>, 7,8 × 150 mm, 5 μm), vazão de 1 mL/min e modo de eluição gradiente de 30-100% de MeOH (0,1% ácido fórmico) em água por 30 minutos monitorando-se em 254 e 221 nm. A partir da fração M16As38A obteve-se os compostos M16As38A1 e M16As38A2 (Figura 10).

Figura 10. Cromatograma por HPLC-UV semipreparativo da amostra M16As38A que resultou no isolamento dos compostos 38A1 e 38A2.



Fonte: autoria própria

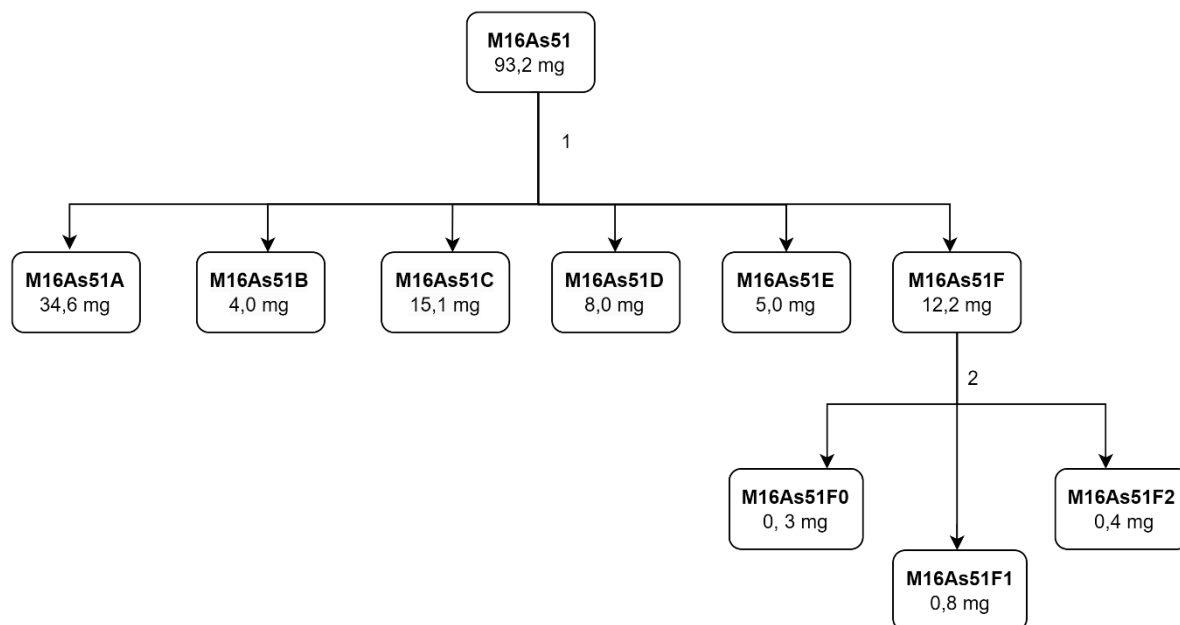
As frações M16As38A1 e M16As38A2 demonstraram um grau de pureza satisfatório e foram sujeitas a análises de RMN mono e bidimensionais.

#### 4.3.2 Isolamento dos constituintes da fração M16As51

Para o fracionamento da fração M16As51 por HPLC-UV utilizou-se inicialmente uma coluna X-terra (Waters ® C<sub>18</sub>, 7,8 × 150 mm, 5 μm), com uma vazão de 2,5 mL/min de fase móvel MeOH/MeCN 1:1 (0,1% ácido fórmico) em modo gradiente. O gradiente utilizado de 16-100% de MeOH: MeCN (1:1, v/v) em 30 minutos sendo monitoradas em 221 e 315 nm. A partir deste fracionamento foram obtidas seis sub-

frações (M16As51A, M16As51B, M16As51C, M16As51D, M16As51E e M16As51F) (Figura 11 e Figura 12).

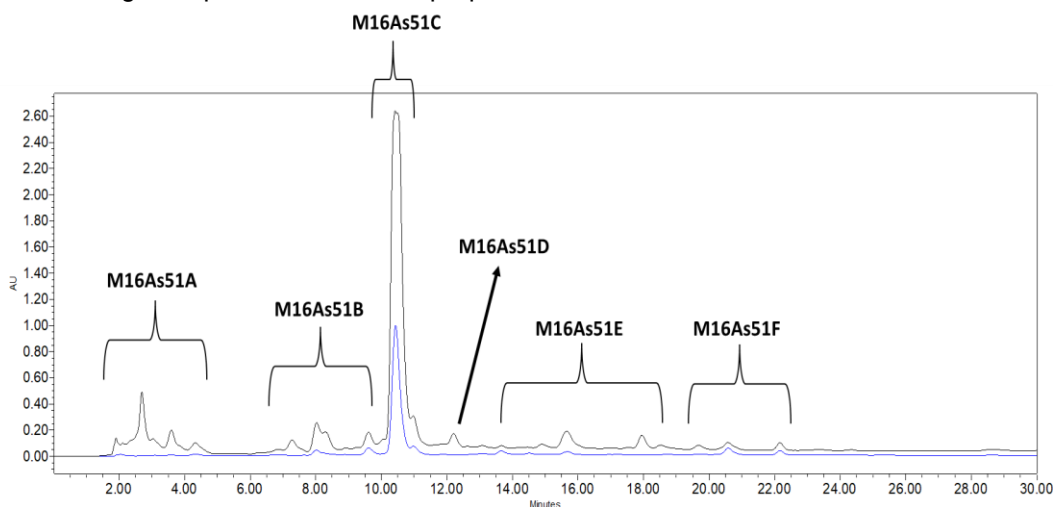
Figura 11. Esquema de isolamento por HPLC-UV-MS da fração M16As51 e da subfração M16As51F.



Legenda: Condições de fracionamento: 1- coluna X-terra (Waters – C<sub>18</sub>, 7,8 × 150 mm, 5 μm), vazão de 1 mL/min e modo de eluição gradiente de 30-100% de MeOH em água por 30 minutos monitorado em 254 e 221 nm; 2- coluna X-terra (Waters® C<sub>18</sub>, 7,8 × 150 mm, 5 μm), com uma vazão de 2,5 mL/min de fase móvel MeOH/MeCN 1:1 (0,1% ácido fórmico) em modo gradiente. O gradiente utilizado de 16-100% de MeOH:MeCN (1:1, v/v) em 30 minutos monitorado em 221 e 315 nm

Fonte: autoria própria

Figura 12. Cromatograma por HPLC-UV semipreparativo da amostra M16As51.

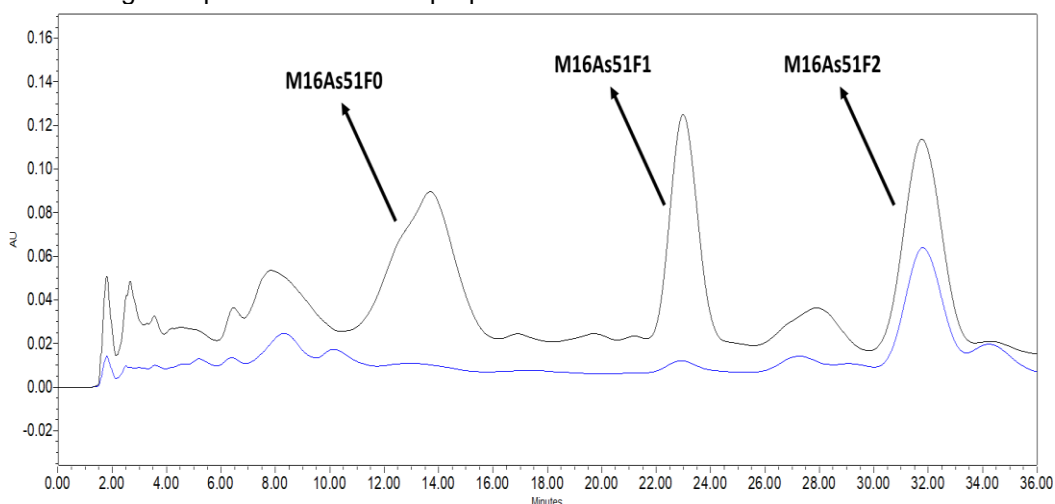


Fonte: autoria própria

Todas as sub-frações obtidas a partir do fracionamento da fração M16As51 foram analisadas por HPLC-DAD-MS.

A subfração M16As51F foi novamente submetida a um fracionamento por HPLC-UV, utilizando-se uma coluna X-terra (Waters® C18, 7,8 × 150 mm, 5 µm), com uma vazão de 2,5 mL/min com eluição isocrática de 44% de MeOH: MeCN (1:1, v/v) (0,1% ácido fórmico) em 36 minutos sendo monitorada em 254 e 331 nm (Figura 13). Foram obtidas três sub-frações M16As51F0, M16As51F1 e M16As51F2 (Figura 11), as quais foram analisadas por HPLC-DAD-MS. A subfração M16As51F1 demonstrou grau de pureza aceitável e foi analisada por RMN mono e bidimensionais.

Figura 13. Cromatograma por HPLC-UV semipreparativo da amostra M16As51F.



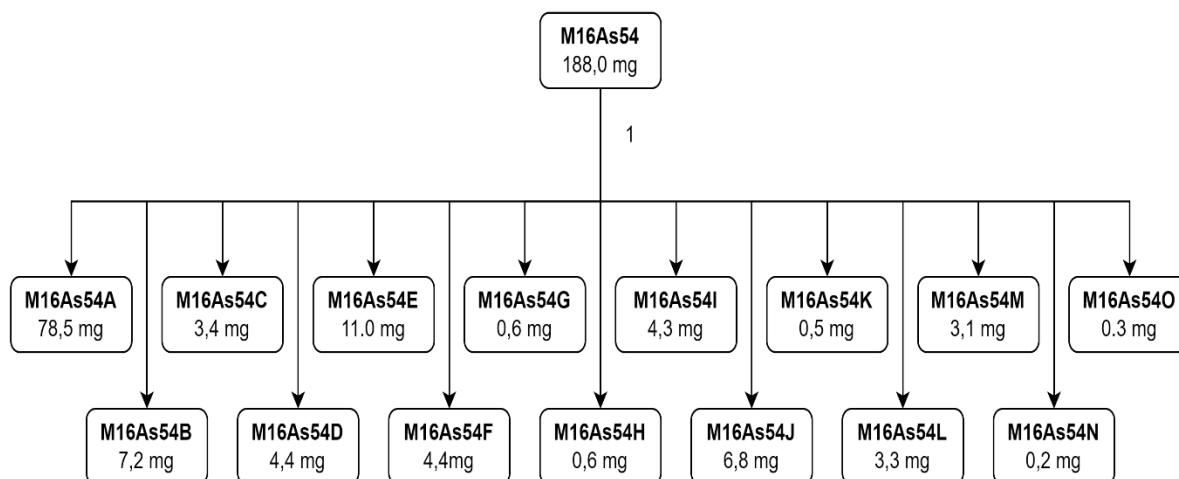
Fonte: autoria própria

#### 4.3.3 Isolamento dos constituintes da fração M16As54

Para o fracionamento da fração M16As54 por HPLC-UV, utilizou-se uma coluna X-terra (Waters® C18, 7,8 × 150 mm, 5 µm), com uma vazão de 2,5 mL/min de fase móvel MeOH/MeCN 1:1 (0,1% ácido fórmico) utilizando-se eluição em modo gradiente de 30-80% de MeOH: MeCN (1:1, v/v) em 30 minutos e verificando-se em 315 e 254 nm (Figura 15). A partir da fração M16As54 foram obtidas 14 sub-frações (Figura 14).



Figura 14. Esquema de isolamento por HPLC-UV da fração M16As54

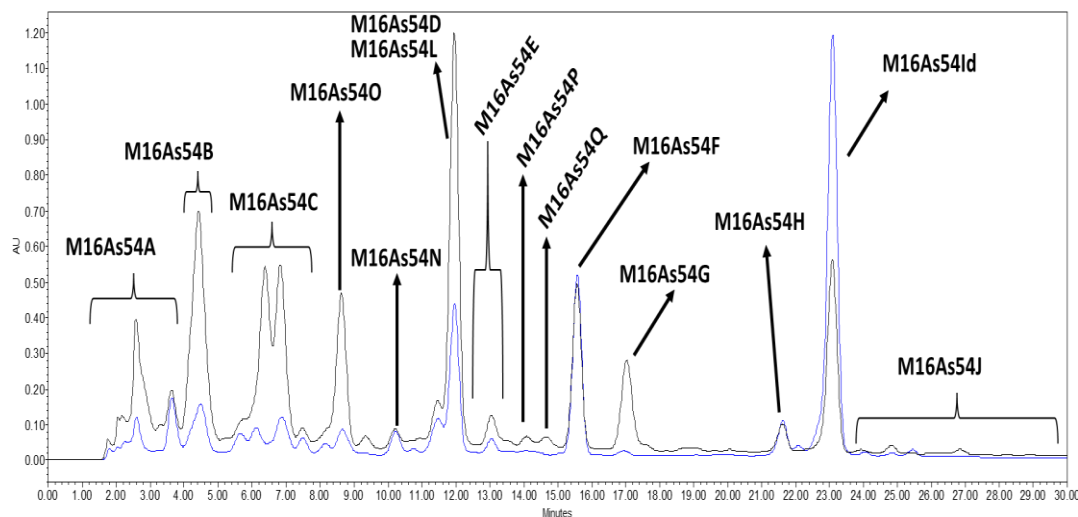


Condições de fracionamento: coluna X-terra (Waters® C18, 7,8 × 150 mm, 5 µm), com uma vazão de 2,5 mL/min de fase móvel MeOH/MeCN 1:1 (0,1% ácido fórmico) utilizando eluição em modo gradiente de 30-80% de MeOH:MeCN (1:1, v/v) em 30 minutos monitorado em 315 e 254 nm;

Fonte: autoria própria

Todas as sub-frações adquiridas pelo fracionamento da fração M16As54 foram examinadas por HPLC-DAD-MS. A subfração M16As54I apresentou grau de pureza aceitável e foi encaminhada para análise de RMN mono e bidimensionais.

Figura 15. Cromatograma por HPLC-UV semipreparativo da amostra M16As54.

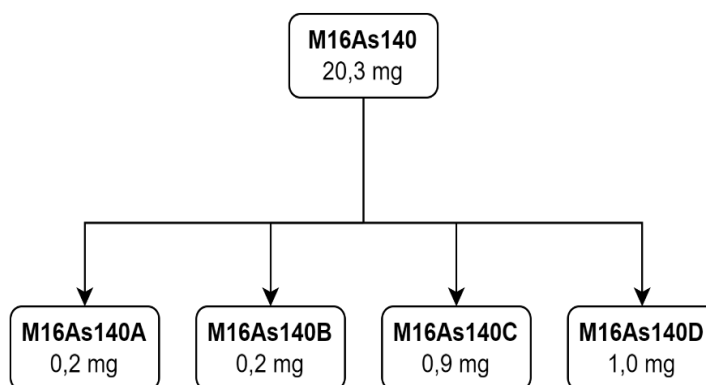


Fonte: autoria própria

#### 4.3.4 Isolamento dos constituintes da fração M16As140

Para o fracionamento da fração M16As140 por HPLC-UV utilizou-se uma coluna X-terra (Waters® C18, 7,8 × 150 mm, 5 µm), com uma vazão de 2,5 mL/min de fase móvel MeOH/MeCN 1:1 (0,1% ácido fórmico) eluída em modo gradiente de 10-50% de MeOH/MeCN (1:1, v/v) em 25 minutos sendo monitorada nos comprimentos de onda 254 e 265 nm (Figura 17). A partir da fração M16As140 foram obtidas quatro sub-frações M16As140A, M16As140B, M16As140C e M16As140D. (Figura 16).

Figura 16. Esquema de isolamento da fração M16As140

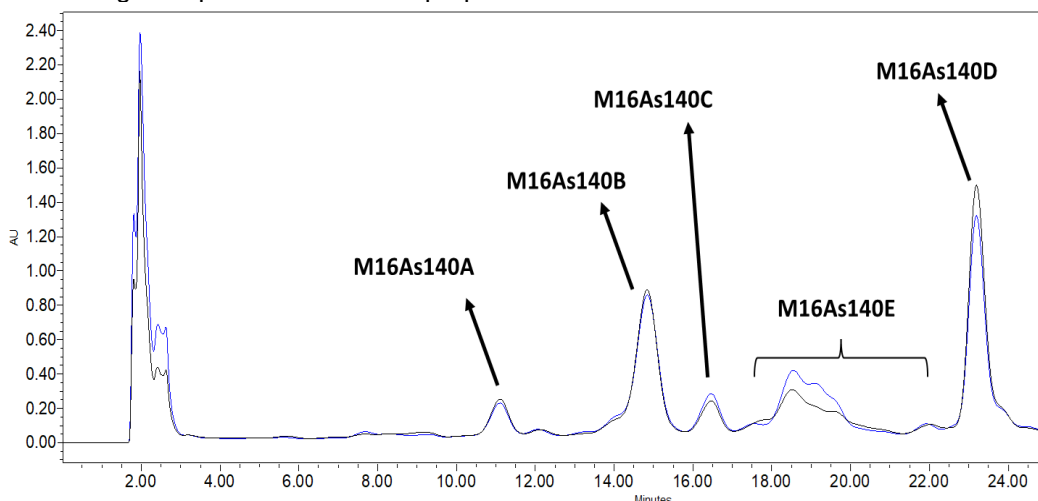


Condições de fracionamento: 1-coluna X-terra (Waters® C18, 7,8 × 150 mm, 5 µm), com uma vazão de 2,5 mL/min de fase móvel MeOH/MeCN 1:1 (0,1% ácido fórmico) com eluição em modo gradiente de 10-50% de MeOH:MeCN (1:1, v/v) em 25 minutos monitorado nos comprimentos de onda 254 e 265 nm;

Fonte: autoria própria

Todas as sub-frações obtidas a partir do fracionamento da fração M16As140 foram examinadas por HPLC-DAD-MS. A subfração M16As140D apresentou grau de pureza aceitável e foi encaminhada para análise de RMN mono e bidimensionais.

Figura 17. Cromatograma por HPLC-UV semipreparativo da amostra M16As140.



Fonte: autoria própria

#### 4.4 Determinação da atividade antiplasmodial *in vitro*

A avaliação da atividade antiplasmodial foi realizada no laboratório localizado no Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Rafael V. C. Guido.

Para o preparo da solução estoque a 10 mg/mL (armazenada a -20 °C), as amostras foram diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO).

As amostras foram investigadas quanto à atividade antiplasmodial contra a cepa de *P. falciparum* 3D7 (sensível a cloroquina) utilizando a técnica de SYBR Green I. As amostras foram testadas na concentração única de 50 µg/mL. Neste ensaio, as diluições dos compostos são incubadas com o parasito por 72 h, e em seguida é adicionado o reagente de SYBR Green e ocorre a marcação do DNA dos parasitos viáveis. A redução de parasitemia em cada concentração é calculada em relação aos controles de crescimento positivo (sem adição de compostos, 100% de viabilidade) e negativo (hemácias não-parasitadas, 0% de viabilidade). Os resultados são reportados como porcentagem de inibição.

## 5. Resultados e discussão

A linhagem fúngica, identificada como sendo do gênero *Peroneutypa* sp., foi isolada de um pepino do mar (holotúria) não identificado, adquirido no litoral do Espírito Santo em 2017. O cultivo da linhagem foi realizado utilizando-se meio de cultura líquido *Potato Dextrose Broth* com água marinha artificial. Passado o tempo de cultivo, a cultura foi filtrada e particionada com AcOEt. O extrato AcOEt foi evaporado. O resíduo obtido foi dissolvido em MeOH/H<sub>2</sub>O 95/5 e particionado com hexano. Evaporou-se a fração polar até a secura, dando origem ao extrato orgânico AcOEt-MeOH.

O extrato orgânico AcOEt-MeOH foi submetido a fracionamentos por cromatografia em coluna de permeação em gel contendo Sephadex® LH-20, por cromatografia em coluna pré-empacotada e por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector UV.

Foram realizadas etapas de separação e purificação nas frações obtidas, descritas na Seção 4.3. O isolamento e análise por técnicas espectroscópicas dos metabólitos puros produzidos no meio de cultura da linhagem *Peroneutypa* sp. possibilitou a identificação de três compostos inéditos e dois já reportados na literatura.

A contribuição do Dr. Marcelo Amorim na supervisão da análise estrutural dos compostos isolados foi essencial na caracterização das substâncias aqui investigadas.

Dos compostos isolados, três são análogos da classe das solanapironas, sendo dois deles considerados inéditos. Um composto inédito pertencente à classe dos diterpenos e um composto conhecido da classe das isoflavonas, também foram identificados.

### 5.1 Identificação estrutural da substância M16As54I

A substância M16As54I, revelou-se como um sólido branco amorfo, com rotação específica de  $[\alpha]_D^{22} - 173$  (c 0,1; MeOH). O espectro de massas de alta resolução (HRMS) deste composto revelou a fórmula molecular C<sub>20</sub>H<sub>27</sub>NO<sub>4</sub>, com um índice de deficiência de hidrogênio igual a oito. Observou-se um pico no espectro de

massas de alta resolução da molécula protonada em  $m/z$  346,2014  $[M + H]^+$ , outro sinal em  $m/z$  369,1832 correspondente ao aduto de sódio  $[M+Na]^+$  bem como pico em  $m/z$  713,3787, correspondente ao dímero de sódio  $[2M + Na]^+$  do mesmo composto (Apêndice 41).

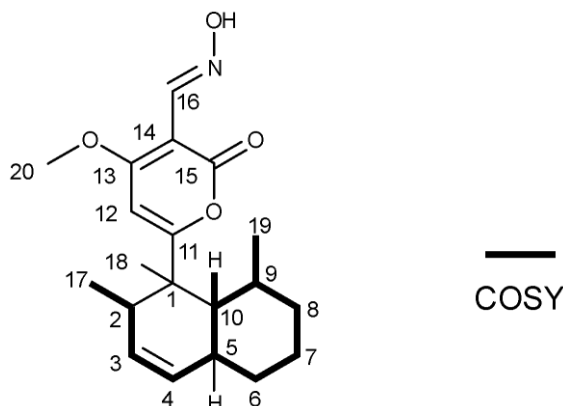
O espectro no infravermelho (Apêndice 42), exibiu bandas de estiramento C=O em  $1720\text{ cm}^{-1}$  e em  $1600\text{ cm}^{-1}$ , sugerindo a presença de carboxila conjugada à dupla ligação entre carbonos, além de bandas de estiramento C-H em  $2915\text{ cm}^{-1}$  e O-H em  $3249\text{ cm}^{-1}$ .

A análise conjunta dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e HSQC do composto M16As54I (Apêndices 32, 33 e 35) permitiu identificar: a) dois sinais característicos de hidrogênios olefínicos ou aromáticos isolados em  $\delta_{\text{H}}$  6,63 (1H, s, H-12),  $\delta_{\text{H}}$  8,14 (1H, s, H-16); b) dois sinais de hidrogênios olefínicos acoplados vicinalmente em  $\delta_{\text{H}}$  5,56 (1H, ddd 10,0; 4,7; 2,4 Hz, H-3) e  $\delta_{\text{H}}$  5,40 (1H, dd 10,0; 1,6 Hz, H-4); c) dois dubletos em  $\delta_{\text{H}}$  0,65 (3H, d 6,9 Hz, H<sub>3</sub>-19) e  $\delta_{\text{H}}$  0,84 (3H, d 7,1 Hz, H<sub>3</sub>-17), além de um singlete  $\delta_{\text{H}}$  1,38 (3H, s, H<sub>3</sub>-18), referentes a três grupos metila. Pôde-se observar de sinais de hidrogênios multipletos referentes a grupos metileno entre  $\delta_{\text{H}}$  1,27 e  $\delta_{\text{H}}$  1,86, bem como sinais referentes a grupos metino em  $\delta_{\text{H}}$  1,50 (1H, m),  $\delta_{\text{H}}$  1,91 (1H, t, 9,7) e  $\delta_{\text{H}}$  2,00 (1H, m) (Tabela 4).

Os dados observados nos espectros RMN de  $^{13}\text{C}$  revelaram a existência de 20 sinais, sendo estas atribuídas a: a) oito carbonos metinos, dos quais quatro são de dupla ligação (C-3 em  $\delta_{\text{C}}$  131,0, C-4 em  $\delta_{\text{C}}$  130,5, C-12 em  $\delta_{\text{C}}$  94,9 e C-16 em  $\delta_{\text{C}}$  143,6); b) três metilenos (C-7 em  $\delta_{\text{C}}$  35,6, C-7 em  $\delta_{\text{C}}$  28,2, C-8 em  $\delta_{\text{C}}$  39,1); c) três metilas (C-17 em  $\delta_{\text{C}}$  20,3, C-18 em  $\delta_{\text{C}}$  18,9, C-19 em  $\delta_{\text{C}}$  21,2); d) uma metoxila (C-20 em  $\delta_{\text{C}}$  58,1); e) cinco carbonos quaternários, incluindo uma carbonila de um grupo carboxila (C-15 em  $\delta_{\text{C}}$  163,2) (Tabela 4).

As análises dos espectros de COSY (Apêndice 37), HSQC-TOCSY (Apêndice 38) e HMBC (Apêndice 36) permitiram identificar a presença de uma porção decalina com insaturação nos carbonos C-3 e C-4 e posicionar as metilas H<sub>3</sub>-19 e H<sub>3</sub>-17 aos carbonos C-9 e C-2, respectivamente.

Figura 18. Correlações observadas no mapa de contorno COSY para a porção decalina presente no composto M16As54I

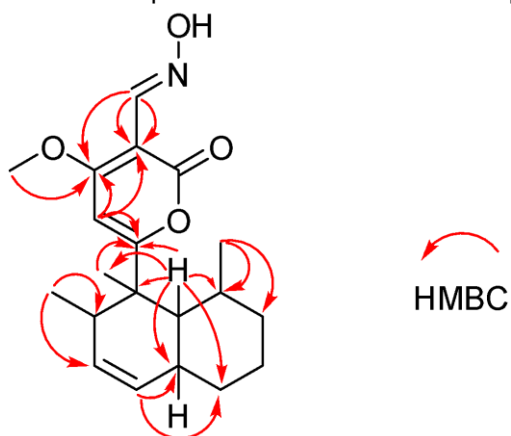


Fonte: autoria própria

Correlações observadas no espectro de HMBC dos hidrogênios H-12 e H-16, juntamente com a informação do número de átomos de oxigênio e nitrogênio a partir da fórmula molecular, permitiram deduzir a existência de uma porção pirano trissubstituída com os grupos metóxi e oxima posicionados em C-13 e C-14, respectivamente.

Considerando-se correlações observadas no espectro HMBC de H-10 e H-18 com C-11 ( $\delta_c$  177,3), e de H-12 com C-11, foi possível definir a conectividade das porções de decalina e pirano. Portanto, a estrutura plana do composto M16As51I foi determinada como sendo um novo análogo das solanapironas (Figura 21).

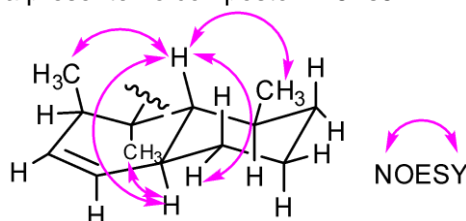
Figura 19. Correlações observadas no mapa de contorno HMBC do composto M16As54I



Fonte: autoria própria

A configuração relativa da porção de decalina do composto M16As54I foi estabelecida a partir das análises dos dados do espectro NOESY ( Apêndices 39 e 40) e comparação com os dados da literatura. A interação de H-10 com H<sub>3</sub>-17 e H<sub>3</sub>-19 estabeleceu orientações pseudoaxiais para CH<sub>3</sub>-17 e H-10, e orientação equatorial para CH<sub>3</sub>-19. O acoplamento de H-10 com H-5 e H-6ax, com multiplicidade de tripleto e constante de acoplamento de 9,7 Hz, confirmou que H-5 apresenta orientação *trans*-axial com H-10, indicando uma fusão do anel *trans* dos anéis A e B da porção decalina. A interação NOESY de H-5 com H<sub>3</sub>-18 também corroborou para estabelecer a orientação de CH<sub>3</sub>-18 como pseudoaxial do mesmo lado do plano que H-5.

Figura 20. Interações NOE observadas no espectro NOESY para determinação da configuração relativa da porção *trans*-decalina presente no composto M16As54I

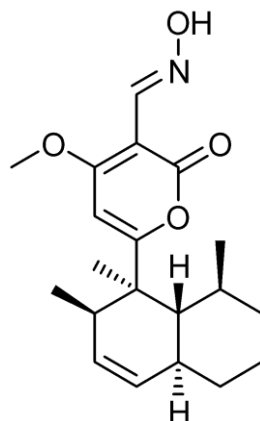


Fonte: autoria própria

Uma vez que não foi possível observar no espectro de RMN de <sup>1</sup>H em CD<sub>3</sub>OD o pico referente ao hidrogênio do grupo oxima, devido à troca isotópica entre os átomos de deutério (D) do solvente e dos hidrogênios (H) dos grupos oxima, foi necessário realizar a re-aquisição dos dados de RMN-<sup>1</sup>H da amostra em DMSO-*d*<sub>6</sub>, para determinar a configuração (se *E* ou *Z*) desse grupo oxima. O espectro de RMN-<sup>1</sup>H indicou a presença do hidrogênio da hidroxila da oxima em  $\delta_H$  11,11.

Pelas correlações observadas no espectro NOESY, foi possível visualizar a interação de H-16 em  $\delta_H$  7,95 no espectro adquirido em DMSO-*d*<sub>6</sub> com a hidroxila da oxima em  $\delta_H$  11,11, o que permitiu estabelecer a configuração da oxima como *E*. Estes dados permitiram a atribuição da configuração relativa de M16As54I como ilustrado na Figura 21.

Figura 21. Configuração relativa estabelecida para o composto M16As54I a partir das correlações observadas no NOESY.



Fonte: autoria própria

Tabela 2. Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) para a substância M16As54I.

Posição	M16As54I	
	$\delta_{\text{H}}$ (J in Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1	-	46,2
2	2,00 (1H, m)	46,7
3	5,56 (1H, ddd 10,0; 4,7; 2,4)	131,0
4	5,40 (1H, dd 10,0; 1,6)	130,5
5	1,88 (1H, m)	41,9
6	1,27 (1H, m) 1,86 (1H, m)	35,6
7	1,50 (1H, m) 1,79 (1H, m)	28,2
8	1,31 (1H, m) 1,69 (1H, m)	39,1
9	1,50 (1H, m)	38,0
10	1,91 (1H, t 9,7)	45,8
11	-	177,3
12	6,63 (1H, s)	94,9
13	-	171,7
14	-	98,1
15	-	163,2
16	8,14 (1H, s)	143,6
17	0,84 (3H, d 7,1)	20,3
18	1,38 (3H, s)	18,9
19	0,65 (3H, d 6,9)	21,2
20	4,06 (3H, s)	58,1
OH <sup>A</sup>	11,11 (1H, s)	-

<sup>A</sup>Sinal observado em  $\text{DMSO}-d_6$ .



A configuração absoluta do composto M16AS54I, foi estabelecida por uma análise comparativa dos espectros de dicroísmo circular eletrônico (ECD) experimental e simulado. O espectro de ECD médio de Boltzmann de (-E)-(1-R, 2-R, 5-S, 9-S, 10-R) do composto isolado (Apêndice 43) apresentou excelente correlação com o espectro de ECD experimental, os quais apresentam efeito Cotton positivo em 215 e 250 nm e um efeito Cotton negativo em torno de 263 e 330 nm. Este resultado definiu inequivocamente a configuração absoluta de M16AS54I.

A presença do grupo oxima ligado ao C-16 torna esta substância inédita na literatura, tendo sido atribuído o nome solanapirona S.

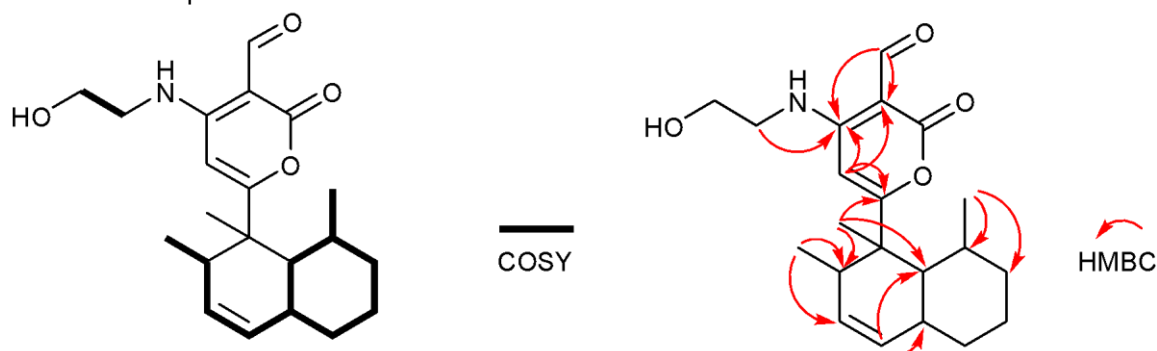
## 5.2 Identificação estrutural da substância M16As38A2

A substância M16As38A2 revelou-se como um óleo amarelo, com rotação específica  $[\alpha]_D^{23} - 37$  (c 0.1; MeOH). A análise por espectrometria de massas de alta resolução em modo positivo de ionização, indicou a fórmula  $C_{21}H_{29}NO_4$ , correspondendo a um índice de deficiência de hidrogênio de 8. No espectro de massas de alta resolução observou-se um sinal em  $m/z$  360,2164, correspondendo à molécula protonada  $[M + H]^+$  e um outro sinal em  $m/z$  719,4406, correspondente ao dímero protonado  $[2M + H]^+$  (Apêndice 13).

Os dados analisados a partir do espectro de RMN  $^1H$  (Apêndice 5) do composto M16As38A2 e a comparação com o espectro de RMN  $^1H$  da amostra M16As54I, apresentada na Seção 5.1, permitiram observar sinais característicos de compostos da classe das solanapironas, sendo possível inferir que ele se tratava de um análogo desta classe de compostos.

As diferenças observadas foram a ausência dos substituintes metoxila e oxima em C-13 e C-14, respectivamente. Os dados de RMN  $^1H$ , RMN  $^{13}C$  (Apêndice 7) e HSQC (Apêndice 8) revelaram a presença de um grupo aldeído ( $\delta_{H-16}$  9,91,  $\delta_{C-16}$  191,6) e de um grupo hidroxietilamino ( $\delta_{H-20}$  3,58,  $\delta_{C-20}$  46,2;  $\delta_{H-21}$  3,75,  $\delta_{C-21}$  61,4), ambos grupos também observados na estrutura da solanapirona C (ICHIHARA; TAZAKI; SAKAMURA, 1983). A diferença em relação à solanapirona C é a presença de grupos metila em C-1 e C-9 com  $\delta_H$  1.35 ( $\delta_C$  19,0) e  $\delta_H$  0.77 ( $\delta_C$  21,0), respectivamente. A confirmação da hipótese estrutural foi realizada por uma análise detalhada dos espectros COSY e HMBC, que apresentaram as correlações indicadas na Figura 22.

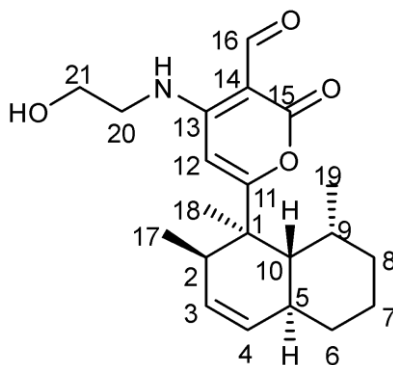
Figura 22. Correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC que estabelecem a estrutura do composto M16As38A2



Fonte: autoria própria

As interações NOE observadas no espectro NOESY foram entre H<sub>3</sub>-18 e H-5 e H<sub>3</sub>-19, e entre H<sub>3</sub>-17 e H-10 (Apêndice 11). Desta forma, foi possível estabelecer a configuração relativa do composto da amostra M16As38A2 como sendo 1*R*\*, 2*R*\*, 5*S*\*, 9*R*\*, 10*R*\*. Sugere-se para o composto da amostra M16As38A2 o nome solanapirona T.

Figura 23. Configuração relativa estabelecida para o composto M16As38A2 a partir das correlações observadas no NOESY.



Fonte: autoria própria

Tabela 3. Dados de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C (600 MHz; CD<sub>3</sub>OD) de M16As38A2 comparado com M16As54I.

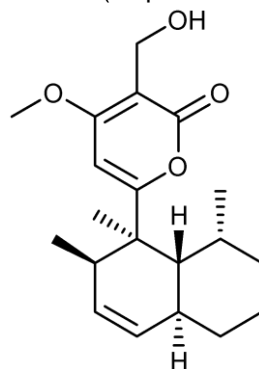
Nº.	M16As38A2		M16As54I	
	$\delta_H$ (J in Hz)	$\delta_C$	$\delta_H$ (J in Hz)	$\delta_C$
1	-	46,2	-	46.2
2	1,97 (1H, m)	46,6	2.00 (1H, m)	46.7
3	5,56 (1H, ddd 10,0; 4,7; 2,4)	130,9	5.56 (1H, ddd 10.0, 4.7, 2.4)	131.0
4	5,39 (1H, dt 10,0; 1,5)	130,5	5.40 (1H, dd 10.0, 1.6)	130.5
5	1,86 (1H, m)	41,8	1.88 (1H, m)	41.9
6	1,26 (1H, m) 1,85 (1H, m)	35,6	1.27 (1H, m) 1.86 (1H, m)	35.6

7	1,49 (1H, m) 1,79 (1H, m)	28,2	1.50 (1H, m) 1.79 (1H, m)	28.2
8	1,32 (1H, m) 1,69 (1H, m)	39,1	1.31 (1H, m) 1.69 (1H, m)	39.1
9	1,49 (1H, m)	38,2	1.50 (1H, m)	38.0
10	1,89 (1H, t 9,3)	45,5	1.91 (1H, t 9.7)	45.8
11	-	179,0	-	177.3
12	6,42 (1H, s)	94,7	6.63 (1H, s)	94.9
13	-	162,4	-	171.7
14	-	95,8	-	98.1
15	-	166,1	-	163.2
16	9,91 (1H, sl)	191,6	8.14 (1H, s)	143.6
17	0,90 (3H, d 7,1)	20,3	0.84 (3H, d 7.1)	20.3
18	1,35 (3H, s)	19,0	1.38 (3H, s)	18.9
19	0,77 (3H, d 6,9)	21,0	0.65 (3H, d 6.9)	21.2
20	3,58 (2H, dt 5,2; 1,0)	46,2	4.06 (3H, s)	58.1
21	3,76 (2H, t 5,2)	61,4		

### 5.3 Identificação estrutural da substância M16As38A1

A análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da amostra M16As38A1 também possibilitou a identificação de sinais característicos da classe das solanapironas. A análise desta amostra por HPLC-MS permitiu observar no espectro de massas sinais dos íons  $m/z$  333  $[\text{M}+\text{H}]^+$  correspondente à molécula protonada e  $m/z$  315  $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$  correspondente à molécula protonada com perda de uma molécula de água (Apêndice 2). Em comparação com dados da literatura referente à classe desses compostos, foi possível supor a identidade da substância como sendo a solanapirona M (Figura 18), com  $[\alpha]_D^{24} - 52,7$  (c 0,08; MeOH). (SCHMIDT; GLOER; WICKLOW, 2007).

Figura 24. Estrutura química da solanapirona M (suposto composto M16As38A1).



Fonte: autoria própria

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto M16As38A1 (Apêndice 3) indicou: a) a presença de um metino vinílico em  $\delta_{\text{H}}$  6,56 (1H, s); b) hidrogênios alílicos em  $\delta_{\text{H}}$  5,56 (1H, ddd 10,4; 4,8; 2,4 Hz) e  $\delta_{\text{H}}$  5,39 (1H, dd 9,9; 1,5 Hz); c) um grupo metoxila em  $\delta_{\text{H}}$  4,0 (3H, s); d) um grupo metileno próximo a um elemento eletronegativo em  $\delta_{\text{H}}$  4,4 (2H, s), e; e) três grupos de metilas em  $\delta_{\text{H}}$  0,64 (3H, d 6,9 Hz),  $\delta_{\text{H}}$  0,83 (3H, d 7,1 Hz) e  $\delta_{\text{H}}$  1,37 (3H, s), além de sinais de hidrogênios multipletos referentes a grupos metileno e metino entre  $\delta_{\text{H}}$  1,28 e  $\delta_{\text{H}}$  1,98. Estes sinais são muito similares aos sinais de RMN  $^1\text{H}$ , encontrados na literatura, da solanapirona M (SCHMIDT; GLOER; WICKLOW, 2007).

#### 5.4 Identificação estrutural da substância M16As51F1

A elucidação estrutural da substância M16As51F1, pertencente à classe dos diterpenos, foi possível pela análise dos dados de RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$ , HSQC, COSY, HMBC, TOCSY e NOESY, infravermelho, rotação óptica e espectrometria de massas.

A substância M16As51F1 revelou-se como um sólido amorfo branco com rotação específica de  $[\alpha]_D^{23} + 16,5$  (c 0,08; MeOH). A análise dos dados obtidos por espectrometria de massas de alta resolução, em modo positivo de ionização (Apêndice 28), exibiu sinal em  $m/z$  319,2281  $[\text{M} + \text{H}]^+$  correspondente à molécula protonada, e em  $m/z$  301,2173 correspondente à molécula protonada com perda de uma molécula de água  $[\text{M}-\text{H}_2\text{O} + \text{H}]^+$ . Os dados obtidos indicaram uma fórmula molecular de  $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_3$ , com um índice de deficiência de hidrogênio de 6.

No espectro de absorção no infravermelho (Apêndice 29) observam-se: a) banda larga de estiramento O-H em  $3408\text{ cm}^{-1}$ ; b) banda intensa de estiramento C-H em  $2924\text{ cm}^{-1}$ , e; c) banda de estiramento C=O característica de cetona conjugada com ligação dupla entre carbonos, em  $1676\text{ cm}^{-1}$ .

As análises dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (Apêndice 14) e HSQC (Apêndice 19) do composto M16As51F1 permitiram a identificação de sinais característicos de: a) metinos alifáticos em  $\delta_{\text{H}}$  2,08 (1H, s) e  $\delta_{\text{H}}$  2,47 (1H, m); b) metinos olefínicos em  $\delta_{\text{H}}$  6,16 (1H, t 2,6 Hz, H-7) e  $\delta_{\text{H}}$  5,93 (1H, dd 17,9 e 10,9 Hz, H-15), e; c) metinos oxigenados em  $\delta_{\text{H}}$  4,31 (1H, m, H-11) e em  $\delta_{\text{H}}$  4,82 (1H, t 2,2 Hz, H-14). Pode-se observar também sinais referentes a grupos metileno em  $\delta_{\text{H}}$  5,02 (1H, dd 17,9 e 1,2,

H-16a) e  $\delta_H$  5,09 (1H, dd 10,9 e 1,2, H-16b), bem como de quatro grupos metila em  $\delta_H$  1,24 (3H, H<sub>3</sub>-17),  $\delta_H$  1,11 (3H, H<sub>3</sub>-18),  $\delta_H$  1,17 (3H, H<sub>3</sub>-19) e  $\delta_H$  1,14 (3H, s, H<sub>3</sub>-20), além de sinais de grupos metilenos entre  $\delta_H$  1,22 – 2,22 (Tabela 3).

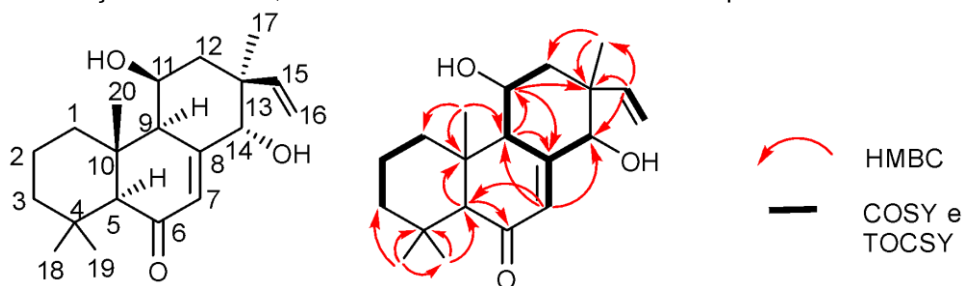
Os dados verificados no espectro de RMN de <sup>13</sup>C (Apêndice 17 e Apêndice 18) revelaram a existência de 20 sinais, sendo estas atribuídas a: a) um carbono carbonílico (C-6,  $\delta_C$  203,7); b) quatro carbonos olefínicos (C-7,  $\delta_C$  125,8; C-8,  $\delta_C$  165,4; C-15,  $\delta_C$  145,1; C-16,  $\delta_C$  113,5), dois carbonos hidroxilados (C-11,  $\delta_C$  64,9; C-14,  $\delta_C$  75,3), além de sinais de carbonos de grupos metino, metileno e metila entre  $\delta_C$  16,8 e  $\delta_C$  66,7.

Considerando o número de sinais no espectro de RMN <sup>13</sup>C, o número de carbonos de grupos metila e a multiplicidade destes no espectro de RMN <sup>1</sup>H, aliado às informações de levantamentos bibliográficos, pôde-se assumir que o composto em questão apresentava um esqueleto diterpênico. A partir das correlações observadas no espectro HMBC foi possível posicionar os grupos substituintes e confirmar que tal substância era de fato um diterpeno (Figura 20).

As correlações verificadas no espectro de HMBC (Apêndice 20) de H<sub>3</sub>-18 e H<sub>3</sub>-19 com C-3, C-4 e C-5 permitiram o posicionamento das metilas CH<sub>3</sub>-18 e CH<sub>3</sub>-19 em C-4. Já as correlações de H<sub>3</sub>-20 com H-1, H-9 e H-10 permitiram posicionar a metila CH<sub>3</sub>-20 em C-10. A metila CH<sub>3</sub>-17 foi posicionada em C-13 observando-se suas correlações HMBC com C-12, C-13, C-14 e C-15. O grupo vinila foi posicionado em C-13 a partir das correlações HMBC de H-15 com H<sub>3</sub>-17, C-12, C-13 e C-14, e de H<sub>2</sub>-16 com C-13 e C-15.

Outras correlações observadas no HMBC de H-5 com C-6, e de H-7 com C-5, C-9 e C-14 permitiram posicionar a carbonila em C-6 e a insaturação nas posições C-7/C-8. O carbono quaternário ( $\delta_C$  165,4, C-8) teve sua posição confirmada por meio das correlações HMBC de H-11 e H-9 com C-8.

Figura 25. Correlações de HMBC, COSY e TOCSY observadas no composto M16As51F1.

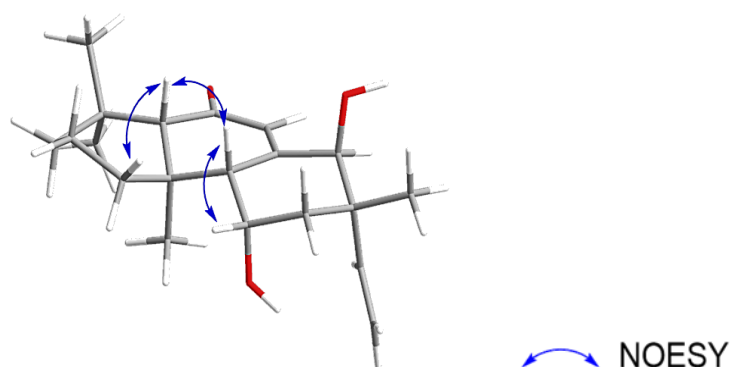


Fonte: autoria própria

A análise das correlações observadas no espectro de COSY (Apêndices 22 e 23) permitiu observar acoplamentos a longa distância entre H-7 com H-9 e H-14. O experimento de TOCSY ( Apêndice 24) também corroborou para identificar os sistemas de spin presentes na estrutura química.

Pela análise dos dados do espectro de NOESY ( Apêndices 25, 26 e 27) foi atribuída a configuração relativa de M16As51F1. Importantes interações NOESY observadas entre H-9 com H-1 $\alpha$ , H-5 e H-11, e entre H-5 com H-9, H-18, H-1 $\alpha$ , H-2 $\alpha$ , e H-3 $\alpha$  indicaram a orientação co-facial desses grupos.

Figura 26. Correlações NOESY observadas no composto M16As51F1.



Fonte: autoria própria

Tabela 4. Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) para a substância M16As51F1.

Posição	M16As51F1		HMBC
	$\tau_{\text{H}}$ (J in Hz)	$\tau_{\text{C}}$	
1 $\alpha$	1,34 (1H, m)	39,9	16,8; 19,2; 44,4; 45,5
1 $\beta$	1,94 (1H, m)		
2 $\alpha$	1,69 (1H, m)	19,2	33,5; 39,9; 44,4; 45,5
2 $\beta$	1,50 (1H, m)		
3 $\alpha$	1,38 (1H, m)	44,4	19,2; 22,2; 33,5; 39,9
3 $\beta$	1,22 (1H, m)		
4	-	33,5	-
5	2,08 (1H, s)	66,7	16,8; 22,2; 33,5; 45,5; 57,7; 203,7
6	-	203,7	-
7	6,16 (1H, t 2,6)	125,8	57,7; 66,7; 75,3
8	-	165,4	-
9	2,47 (1H, m)	57,7	16,8; 45,5; 64,9w; 125,8w; 165,4
10	-	45,5	-
11	4,31 (1H, m)	64,9	41,1; 165,4

12 $\alpha$ 12 $\beta$	2,22 (1H, dd 15,1 e 5,3) 1,75 (1H, ddd 15,1, 2,1 e 1,0)	46,5	41,1; 45,5w; 57,7; 75,3; 145,1
13	-	41,1	-
14	4,82 (1H, t 2,2 Hz)	75,3	-
15	5,93 (1H, dd 17,9 e 10,9)	145,1	28,8; 41,1; 46,5; 75,3
16a 16b	5,02 (1H, dd 17,9 e 1,2) 5,09 (1H, dd 10,9 e 1,2)	113,5	41,1; 145,1
17	1,24 (3H, s)	28,8	41,1; 46,5; 75,3; 145,1
18	1,11 (3H, s)	34,3	22,2; 33,5; 44,4; 66,7
19	1,17 (3H, s)	22,2	33,5; 34,3; 44,4; 66,7
20	1,14 (3H, s)	16,8	39,9; 45,5; 57,7; 66,7

A configuração absoluta do composto M16As51F1 foi obtida pela análise comparativa dos espectros experimental e simulado de dicroísmo circular eletrônico (ECD) (Apêndice 31). Conforme as configurações relativas obtidas, o espectro de ECD de Boltzmann médio para (5S, 9R, 10R, 11S, 13S, 14S) do composto M16As51F1 combinou muito bem com o espectro de ECD experimental, com efeito *Cotton* positivo em torno de 245 nm e efeito *Cotton* negativo em torno de 215 nm. Este resultado demonstrou inequivocamente a configuração absoluta do composto M16As51F1 como (5S, 9R, 10R, 11S, 13S, 14S).

A substância M16As51F1 apresenta o esqueleto de carbonos característicos dos diterpenos, e diferencia-se das demais, sobretudo pela posição da carbonila, sendo inédita na literatura.

### 5.5 Identificação estrutural da substância M16As140D

A substância M16140D foi obtida na forma de um óleo amarelo. A análise por espectrometria de massas de alta resolução (Apêndice 55) deste composto exibiu um íon em  $m/z$  255,0662  $[M+H]^+$ , revelando a fórmula molecular de  $C_{15}H_{10}O_4$ , com um índice de deficiência de hidrogênio de 11.

O espectro no infravermelho (Apêndice 56), mostrou bandas de estiramento em  $3246\text{ cm}^{-1}$ , características de grupos hidroxila, em  $2918\text{ cm}^{-1}$  de carbonos  $sp^2$  e em  $1674$ , característica de carbonila conjugada a anel aromático.

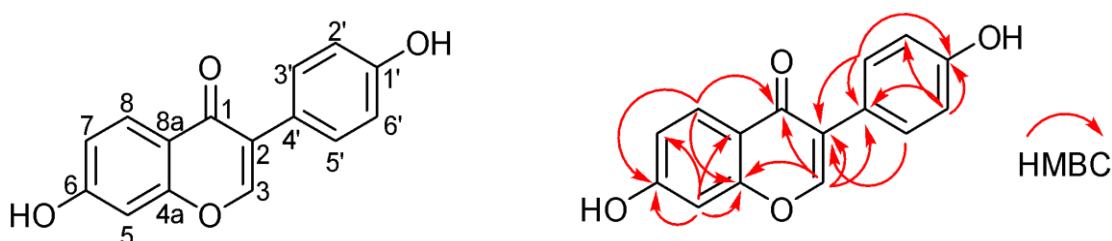
Os dados observados no espectro de absorção na região do UV ( Apêndice 57) permitiu observar bandas com comprimento de onda máximo em 249 e 300 nm, característico de carbonila  $\alpha,\beta$ -insaturada.

A análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  do composto M16As140D (Apêndices 45 e 46) possibilitaram a identificação de sinais característicos de anel benzeno *para*-dissubstituído com simetria em  $\delta_{\text{H}}$  6,80 (2H, dd 6,7 e 2,1 Hz, H-2' e H-6') e  $\delta_{\text{H}}$  7,37 (2H, dd 6,7 e 2,1 Hz, H-3' e H-5'), hidrogênios aromáticos em  $\delta_{\text{H}}$  6,86 (1H, dd 8,8 e 2,2 Hz, H-5),  $\delta_{\text{H}}$  6,92 (1H, dd 8,8 e 2,2 Hz, H-7) e  $\delta_{\text{H}}$  7,95 (1H, dd 8,8 e 2,2 Hz, H-8) evidenciando outro anel benzeno trissubstituído e um sinal de hidrogênio olefínico em  $\delta_{\text{H}}$  8,27 (1H, s, H-3). O hidrogênio H-3 apresentou sinal no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  característico de carbono  $\text{sp}^2$  ligado a oxigênio ( $\delta_{\text{C}}$  152,8). O sinal em  $\delta_{\text{H}}$  8,35 foi atribuído a resíduo de ácido fórmico utilizado na fase móvel durante a etapa cromatográfica de isolamento da substância.

As 15 ressonâncias observadas pela análise do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  ( Apêndice 47 e Apêndice 48) revelaram a existência de oito carbonos metinos e sete carbonos quaternários sendo um deles de grupo carbonila (C-1 em  $\delta_{\text{H}}$  174,7 ) (Tabela 5). Os sinais observados em  $\delta_{\text{C}}$  115,0 e  $\delta_{\text{C}}$  130,0 correspondem a dois carbonos cada devido a simetria do anel benzeno para H-2', H-3', H-5' e H-6', confirmado pelas correlações observadas no espectro de HSQC (Apêndice 49).

As correlações vistas no espectro de HMBC (Apêndice 50) de H-3 com C-4a e C-1, juntamente com as correlações de H-8 com C-1 e de H-5 com C-8a e C-4a, evidenciaram a presença de uma porção de cromenona com substituição em C-2 e uma carbonila  $\alpha,\beta$ -insaturada ligada em C-8a. A conectividade da porção aromática com simetria em C-2 da porção de cromenona foi possível observando-se correlações HMBC de H-5' e H-3' com C-2 e de H-3 com C-2 e C-4' (Figura 22).

Figura 27. Substância M16As140D e correlações chaves HMBC.





Fonte: autoria própria

Pela comparação dos dados espectroscópicos da literatura e dos dados experimentais obtidos foi possível identificar o composto M16As140D como sendo a daidzeína ( HAZATO et al., 1979; RONG et al., 1998 ; PRASAD et al., 2023)

Tabela 5. Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (600 MHz, DMSO- $d_6$ ) para a substância M16As140D.

Posição	M16As140D		HMBC
	$T_{\text{H}}$ (J in Hz)	$T_{\text{C}}$	
1	-	174,7	
2	-	123,5	
3	8,27 (1H, s)	152,8	174,7; 157,5; 122,6; 123,5
4A	-	157,5	
5	6,86 (1H, dd 8,8 e 2,2 Hz)	102,1	115,3; 116,5; 157,5; 162,9
6	-	162,9	
7	6,92 (1H, dd 8,8 e 2,2 Hz)	115,3	102,1; 116,5
8	7,95 (1H, dd 8,8 e 2,2 Hz)	127,2	174,7; 162,9; 157,5
8a	-	116,5	
1'	-	157,2	
2'	6,80 (1H, dd 6,7 e 2,1 Hz)	115,0	115,0; 122,6; 157,2
3'	7,37 (1H, dd 6,7 e 2,1 Hz)	130,0	157,2; 123,5; 130,0
4'	-	122,6	
5'	7,37 (1H, dd 6,7 e 2,1 Hz)	130,0	157,2; 123,5; 130,0
6'	6,80 (1H, dd 6,7 e 2,1 Hz)	115,0	115,0; 122,6; 157,2

## 5.6 Avaliação da atividade antiplasmodial dos compostos isolados

Todos os compostos isolados acima relatados, foram submetidos a bioensaios para que fossem avaliadas suas atividades antiplasmodial frente à linhagem de *Plasmodium falciparum* 3D7. Os bioensaios foram realizados pelo laboratório coordenado pelo Prof. Dr. Rafael Guido – IFSC/USP.

Apenas o composto M16As140D, a daidzeína, apresentou a atividade antiplasmodial mais potente, além de ausência de efeito citotóxico quando testada em uma concentração tão alta quanto 100  $\mu\text{M}$  ( $\text{IC}_{50}^{\text{HepG2}} > 100 \mu\text{M}$ ).

A daidzeína apresentou atividades inibitórias similares quando testada em um painel de cepas de *P. falciparum* resistentes, incluindo Dd2 [resistente à cloroquina (CQ), sulfadoxina (SDX), pirimetamina (PYR), mefloquina (MQ), cicloguanil (CYC)],

TM90C6B [resistente a CQ, PYR, atovaquona (ATO)] e 3D7r\_MMV848 (resistente a MMV848) proporcionando valores de índices de resistência (RI) mais baixos de 2. Não foi observada resistência cruzada aos antimaláricos padrão-ouro, sugerindo assim que a atividade antiplasmodial dos metabólitos ocorre *por meio* de um mecanismo de ação distinto.

A daidzeína é um flavonóide, da classe das isoflavonas, encontrado principalmente na soja e em produtos de soja, e tem sido objeto de estudos devido às suas potenciais atividades biológicas (SINGH et al., 2023; LADDHA; KULKARNI, 2023).

As principais atividades biológicas associadas a daidzeína são especialmente aquelas associadas ao controle do estrogênio, como câncer de mama, diabetes, osteoporose e doenças cardiovasculares e além de atuar como antioxidante, antialérgico e antiinflamatório (ALSHEHRI et al., 2021).

Não há relatos de associação de atividade antiplasmodial com a daidzeína. Tal dado ilustra a necessidade e importância da realização de estudos que possam ampliar as possibilidades de atividades biológicas de metabólitos secundários já conhecidos ou não, como potencialmente interessantes para o desenvolvimento de novos agentes antiplasmodiais.

## 6. Conclusão e perspectivas futuras

A investigação do extrato metanólico derivado do meio de cultivo da linhagem fúngica *Peroneutypa sp.*, que apresentou atividade antiplasmodial, possibilitou o isolamento e a identificação de cinco compostos.

Três dos compostos isolados são da classe das solanapironas. O composto M16As38A1 mostrou ser a solanapirona M, após comparação dos dados obtidos por RMN <sup>1</sup>H e espectrometria de massas com os dados encontrados na literatura. Os compostos M16As38A2 e M16As54I mostraram ser derivados inéditos das solanapironas. O primeiro composto tem a presença de dois grupos metilas em C-3 e C-9, o que o diferencia da solanapirona C e o segundo tem a presença de um grupo oxima ligado ao C-14.

O composto M16As51F1 foi identificado como sendo um diterpeno, e o composto M16As140D identificado como a daidzeína.

A daidzeína apresentou atividade antiplasmodial moderada contra *P. falciparum* resistente à cloroquina. Embora ainda não amplamente documentada como uma de suas principais atividades biológicas, destaca o potencial deste composto como agente antiplasmodial.

Baseando-se nos resultados deste estudo, é possível inferir que os fungos marinhos continuam a ser uma fonte valiosa e promissora de compostos químicos de interesse biológico e farmacológico. A obtenção de três compostos inéditos, juntamente com os dois já reportados, ressalta a diversidade química associada a esses microrganismos marinhos, além de enfatizar a importância da investigação e preservação da biodiversidade marinha, já que esta tem se revelado um importante arcabouço para a obtenção de novos compostos naturais bioativos.

## 7. Referências

ACHAN, J; TALISUNA, A; ERHART, A; YEKA, A; TIBENDERANA, J; BALIRAINÉ, F; ROSENTHAL, P; D'ALESSANDRO, U. Quinine, an old anti-malarial drug in a modern world: Role in the treatment of malaria. **Malaria Journal**, London, v. 10, p. 144, 2011.

ALSHEHRI, M. M; SHARIFI-RAD, J; HERRERA-BRAVO, J; JARA, E. L; SALAZAR, L. A; KREGIEL, D; UPRETY, Y; AKRAM, M; IQBAL, M; MARTORELL, M; TORRENS-MAS, M; PONS, D. G; DASTAN, S. D; CRUZ-MARTINS, N; OZDEMIR, F. A; KUMAR, M; CHO, W. C. Therapeutic potential of isoflavones with an emphasis on daidzein. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, London, v. 2021, p. 6331630, 1 jan. 2021.

ÁLVAREZ-BARDÓN, M; PÉREZ-PERTEJO, Y; ORDÓÑEZ, C; SEPÚLVEDA-CRESPO, D; CARBALLEIRA, N; TEKWANI, B; MURUGESAN, S; MARTINEZ-VALLADARES, M; GARCÍA-ESTRADA, C; REGUERA, R; BALAÑA-FOUCE, R. Screening marine natural products for new drug leads against trypanosomatids and malaria. **Marine Drugs**, Basel, v. 18, n. 4, E187, 2020.

ARRUDA, R. F; OLHER, V. G; VANDRESEN, F; SCHUQUEL, I. T. Chemical study and evaluation of anti-inflammatory, antitumor and antioxidante activities of aerial parts from *aeschynomene sensitiva*. **Revista Virtual de Química**, Niterói, v.10, n.3, p. 684-697, 2018.

BASCO, L. K. Molecular epidemiology of malaria in Cameroon. XVII. Baseline monitoring of atovaquone-resistant *Plasmodium falciparum* by in vitro drug assays and cytochrome b gene sequence analysis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Deerfield, v. 69, n. 2, p. 179-183, 2003.

BASSAT, Q; MAIGA-ASCOFARÉ, O.; MAY, J.; CLAIN, J.; MOMBO-NGOMA, G.; GORGER, K.; ADEGNIKA, A. A.; AGOBÉ, J. C. D.; DJIMDE, A.; MISCHLINGER, J.; RAMHARTER, M. Challenges in the clinical development pathway for triple and multiple drug combinations in the treatment of uncomplicated *falciparum* malaria. **Malaria Journal**, London, v.21, n. 1, 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia prático de tratamento da malária no Brasil**. Brasília, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim epidemiológico especial da malária 2022**. Brasília, 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/edicoes/2022/boletim-epidemiologico-vol-53-no17.pdf/view>. Acesso em: 09 mar. 2023.

BRAUTASET, T; SEKUROVA, O; SLETTA, H; ELLINGSEN, T; STROM, A; VALLA, S. ZOTCHEV, S. Biosynthesis of the polyene antifungal antibiotic nystatin in *Streptomyces noursei* ATCC 11455: analysis of the gene cluster and deduction of the

biosynthetic pathway. **Chemistry & Biology**, Cambridge, v. 7, n. 6, p. 395–403, 2000.

BURY, M; ANDOLFI, A; REGISTER, B; CIMMINO, A; MÉGALIZZI, V; MATHIEU, V; FERON, O; EVIDENTE, A; KISS, R. Fusicoccin A, a phytotoxic carbocyclic diterpene glucoside of fungal origin, reduces proliferation and invasion of glioblastoma cells by targeting multiple tyrosine kinases. **Translational Oncology**, San Francisco, v. 6, n. 2, p. 112–123, 1 abr. 2013.

CRAGG, G. M; NEWMAN, D. J. Medicinals for the millennia: the historical record. **Annals of the New York Academy of Science**, Hoboken, v. 953, p. 3-25, 2001.

CHEN, L; WANG, X; LIU, R; WANG, G. Culturable microorganisms associated with sea cucumbers and microbial natural products. **Marine Drugs**, Basel, v. 19, n. 8, p. 1-21, 2021.

DE ARAÚJO, R. V; SANTOS, S. S; SANCHES, L. M; GIAROLLA, J; SEoud, O; ELFERREIRA, E. I. Malaria and tuberculosis diseases of neglected populations: state of the art in chemotherapy and advances in the search for new drugs. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 115, p. E200229, 2020.

DE SOUZA, H. P; DE OLIVEIRA, W. T. G. H; DOS SANTOS, J. P. C; TOLEDO, J. P; FERREIRA, I. P. S; DE SOUSA ESASHIKA, S. N. G; DE LIMA, T. F. P; DE SOUSA DELÁCIO, A. Doenças infecciosas e parasitárias no Brasil de 2010 a 2017: aspectos para vigilância em saúde. **Revista Panamericana de Salud Publica**, Washington, v. 44, e.10, 2020.

FALAH, F. et al. Production of cyclosporin A by *Tolypocladium inflatum* using dairy waste medium: optimization and investigation of the effect of ultrasound, high hydrostatic pressure, and pulsed electric field treatments on the morphology of fungus. **Biomass Conversion and Biorefinery**, Heidelberg, v. 1, p. 1–13, 2023.

FASELEH JAHROMI, M; LIANG, J.; HO, Y; MOHAMAD, R; GOH, Y; SHOKRYAZDAN, P. Lovastatin production by *Aspergillus terreus* using agro-biomass as substrate in solid state fermentation. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, London, v. 2012, p. 11, 2012.

FRANCO, D. P; PEREIRA, T; VITORIO, F; NADUR, N; LACERDA, R; KUMMERLE, A. The importance of coumarins for medicinal chemistry and the development of bioactive compounds in the last years. **Química Nova**, São Paulo, v. 44, n. 2, p. 180–197, 2021.

FRANÇA, T. C. C; SANTOS, M. G.; FIGUEROA-VILLAR, J. D. Malária: aspectos históricos e quimioterapia. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 5, p. 1271-1278, 2008.

FOLEY, M; TILLEY, L. Quinine antimalarials: mechanisms of action and resistance and prospects for new agents. **Pharmacology and Therapeutics**, Philadelphia, v. 9, p. 55-87, 1998.

GOMES, A. P.; VITORINO, R. R.; COSTA, A.; MENDONÇA, E. G.; OLIVEIRA, M. G. A.; BATISTA, R. S. Malária grave por *Plasmodium falciparum*. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, São Paulo, v. 23, n. 3, p. 358-369, 2011.

HASAN, S.; ANSARI, M.; AHMAD, A.; MISHRA, M. Major bioactive metabolites from marine fungi: a review. **Bioinformation**, Chennai, v. 11, n. 4, p. 176, 30 abr. 2015.

HAZATO, T.; NAGANAWA, H.; KUMAGAI, M.; AOYAGI, T.; UMEZAWA, H. BETA.-Galactosidase-inhibiting new isoflavonoids produced by actinomycetes. **The Journal of Antibiotics**, London, v. 32, n. 3, p. 217–222, 1979.

ICHIHARA, A.; TAZAKI, H.; SAKAMURA, S. Solanapyrones A, B and C, phytotoxic metabolites from the fungus *alternaria solani*. **Tetrahedron Letters**, Oxford, v. 24, n. 48, p. 5373–5376, 1983.

KLAYMAN, D.L. Qinghaosu (Artemisinin): an antimalarial drug from China. **Science**, Washington, v. 228, p. 1049-1054, 1985.

KURIA, K. A. M.; CHEPKWONY, H.; GOVAERTS, C.; ROETS, E.; BUSSON, R.; DE WITTE, P.; ZUPKO, I.; HOORNAERT, G.; QUIRYNEN, L.; MAES, L.; JANSSENS, L.; HOOGMARTENS, J.; LAEKEMAN, G. The antiplasmodial activity of isolates from *Ajuda remota*. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 65, n. 5, p. 789-793, 2002.

LADDHA, A. P.; KULKARNI, Y. A. Pharmacokinetics, pharmacodynamics, toxicity, and formulations of daidzein: an important isoflavone. **Phytotherapy Research**: Oxford, v. 37, n. 6, p. 2578–2604, 2023.

LAURITANO, C.; IONORA, A. Chemical defense in marine organisms. **Marine Drugs**, Basel, v. 18, n. 10, 2020.

LAUX-BIEHLMANN, A.; MOUHEICHE, J.; VÉRIÈOE, J.; GOUMON, Y. Endogenous morphine and its metabolites in mammals: history, synthesis, localization and perspectives. **Neuroscience**, Oxford, v. 233, p. 95–117, 2013.

MAYER, A. M. S.; BERLINCK, R.; FUSETANI, N. Marine pharmacology in 2016–2017: marine compounds with antibacterial, antidiabetic, antifungal, anti-inflammatory, antiprotozoal, antituberculosis and antiviral activities; affecting the immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action. **Marine Drugs**, Basel, v. 19, n. 2, 2021.

NEGM, W. A.; EZZAT, S. M.; ZAYED, A. Marine organisms as potential sources of natural products for the prevention and treatment of malaria. **RSC Advances**, Cambridge, v. 13, p. 4436-4475, 2023.

NWEZE, J. A.; MBAOJI, F. N.; LI, Y.; YANG, L.; HUANG, S.; CHIGOR, V. N.; EZE, E. A.; PAN, L.; ZHANG, T.; YANG, D. Potentials of marine natural products against malaria, leishmaniasis and trypanosomiasis parasites: a review of recent articles. **Infectious Diseases of Poverty**, London, v. 10, n. 1, 2021.

PRASAD, B.; MALLICK, S.; BHARATI, A. C.; SINGH, S. Flavonoids: chemistry, biosynthesis, isolation, and biological function. *In*: VERMA, C.; VERMA, D. K. (eds.). **Handbook of biomolecules: fundamentals, properties and applications**. Amsterdam: Elsevier, 2023. p. 467–488.

RONG, H.; STEVENS, J. F.; DEINZER, M. L.; COOMAN, L.; KEUKELEIRE, D. Identification of isoflavones in the roots of *Pueraria lobata*. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 64, n. 07, p. 620–627, 1998.

SCHMIDT, L. E.; GLOER, J. B.; WICKLOW, D. T. Solanapyrone analogues from a Hawaiian fungicolous fungus. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 70, n. 8, p. 1317–1320, 2007.

SINGH, S.; GREWAL, S.; SHARMA, N.; BEHL, T.; GUPTA, S.; ANWER, .MK; VARGAS-DE-LA-CRUZ, C.; MOHAN, S.; BUNGAU, S. G.; BUMBU, A. Unveiling the pharmacological and nanotechnological facets of daidzein: present state-of-the-art and future perspectives. **Molecules**, Basel, v. 28, n. 4, p. 1765, 2023.

TEMPONE, A. G; PIEPER, P; BORBOREMA, S; THEVENARD, F; LAGO, J; CROFT, S; ANDERSON, E. Marine alkaloids as bioactive agents against protozoal neglected tropical diseases and malaria. **Natural Products Reports**, Sussex, v. 38, n. 12, p. 2214-2235, 2021.

WANI, M.C; TAYLOR, H; WALL, M; COGGON, P; MCPHAIL, A. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 93, n. 9, p. 2325- 2327, 1971.

WIESNER, J; ORTMANN, R; JOMAA, H; SCHLIZER, M. New antimalarial drugs. **Angewandte Chemie** (International Edition), Weinheim, v. 42, p. 5274-5293, 2003.

WINSTANLEY, P. Modern chemotherapeutic options for malaria. **The Lancet Infectious Diseases**, London, v. 1, p. 242-250, 2001.

WHO. **World malaria report**. Geneva, World Health Organization, 2013. Disponível em: [http:// www.who.int/malaria/publications/world\\_malaria\\_report\\_2013/en/](http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2013/en/). Acesso em: 10 fev. 2023.

WONGSRICHANALAI, C. I; PICKARD, A. L; WERNSDORFER, W. H; MESHINICK, S. R. Epidemiology of drug-resistant malaria. **The Lancet Infectious Diseases**, London, v. 2, p. 209-218, 2002.

**Apêndice**

Apêndice 1. Espectro de absorção na região do UV por HPLC-DAD de M16As38A1.	60
Apêndice 2. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização de M16As38A1	61
Apêndice 3. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (600 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) do composto M16As38A1.	62
Apêndice 4. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (600 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) do composto M16As38A2	63
Apêndice 5. Expansão do espectro de RMN de $^1\text{H}$ (600 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) do composto M16As38A2	64
Apêndice 6. Expansão do espectro de Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (600 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) do composto M16As38A2.	65
Apêndice 7. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (150 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) do composto M16As38A2	66
Apêndice 8. Espectro de RMN de HSQC (600 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) do composto M16As38A2	67
Apêndice 9. Espectro de RMN de HMBC do composto M16As38A2 (600 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ).	68
Apêndice 10. Espectro de RMN de COSY do composto M16As38A2	69
Apêndice 11. Espectro de RMN de NOESY (600 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) do composto M16As38A2	70
Apêndice 12. Espectro de absorção na região do UV por HPLC-DAD de M16As38A2	71
Apêndice 13. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização de M16As38A2.	72
Apêndice 14. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (600 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) do composto M16As51F1	73
Apêndice 15. Expansão do espectro de RMN de $^1\text{H}$ (600 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) do composto M16As51F1.	74
Apêndice 16. Expansão do espectro de RMN de $^1\text{H}$ (600 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) do composto M16As51F1.	75
Apêndice 17. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (150 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) do composto M16As51F1	76
Apêndice 18. Expansão do espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (150 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) do composto M16As51F1.	77

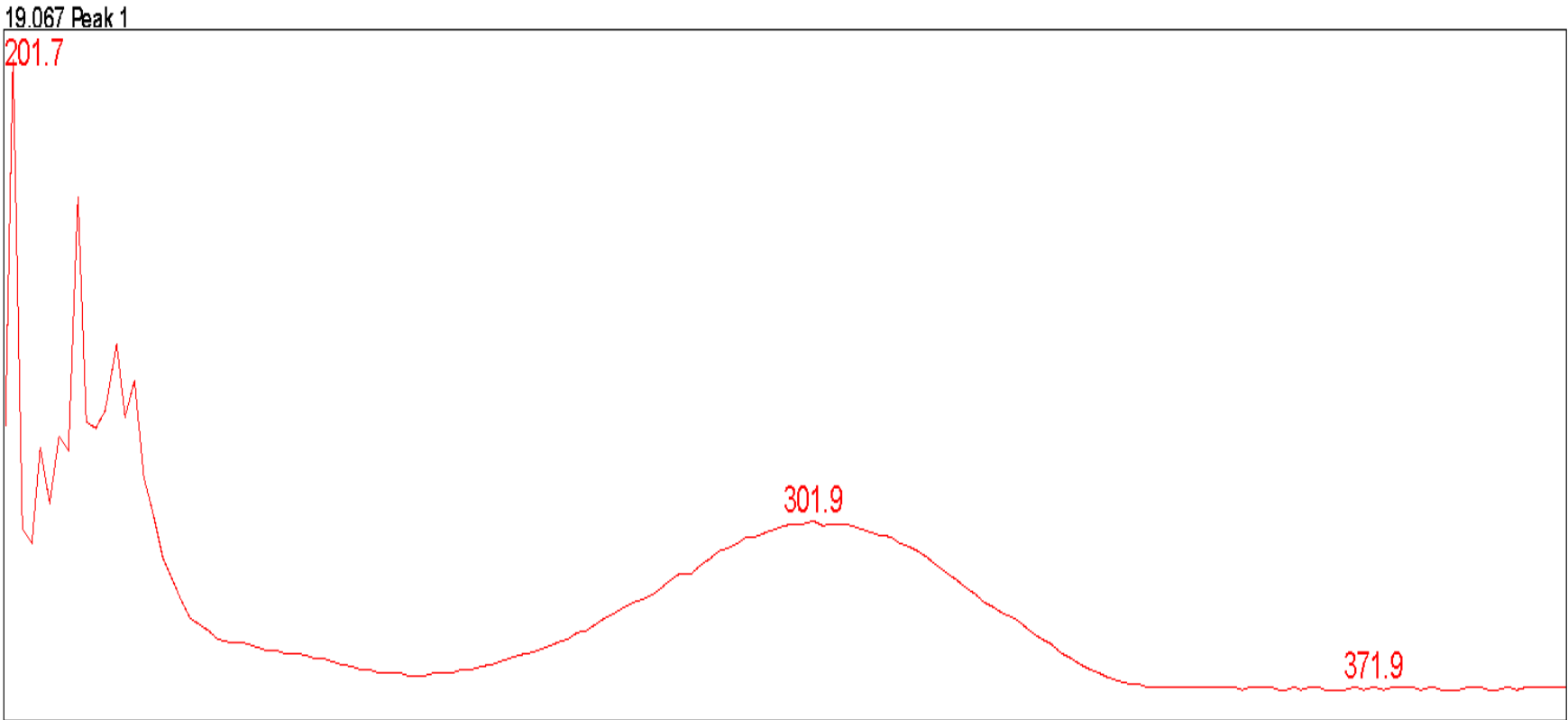


Apêndice 19. Espectro de RMN de HSQC (600 MHz, CD <sub>3</sub> OD) do composto M16As51F1	78
Apêndice 20. Espectro de RMN de HMBC (600 MHz, CD <sub>3</sub> OD) do composto M16As51F1.	79
Apêndice 21. Espectro de RMN de COSY (600 MHz, CD <sub>3</sub> OD) do composto M16As51F1.	80
Apêndice 22. Expansão do espectro de RMN de COSY (600 MHz, CD <sub>3</sub> OD) do composto M16As51F1.	81
Apêndice 23. Expansão do espectro de RMN de COSY (600 MHz, CD <sub>3</sub> OD) do composto M16As51F1.	82
Apêndice 24. Espectro de RMN de TOCSY (600 MHz, CD <sub>3</sub> OD) do composto M16As51F1. Espectro de RMN de <sup>1</sup> H ( <b>A</b> ), irradiação em δ <sub>H</sub> 1,94 ( <b>B</b> ) e irradiação em δ <sub>H</sub> 4,31 ( <b>C</b> ).	83
Apêndice 25. Espectro de RMN de NOESY (600 MHz, CD <sub>3</sub> OD) do composto M16As51F1.	84
Apêndice 26. Expansão do espectro de RMN de NOESY (600 MHz, CD <sub>3</sub> OD) do composto M16As51F1.	85
Apêndice 27. Expansão do espectro de RMN de NOESY (600 MHz, CD <sub>3</sub> OD) do composto M16As51F1.	86
Apêndice 28. Espectro de HRESIMS da amostra M16As51F1.	87
Apêndice 29. Espectro de IV (ATR) de M16As51F1.	88
Apêndice 30. Espectro de absorção na região do UV (60 µg/mL; MeOH) de M16As51F1.	89
Apêndice 31. ( <b>Esquerda</b> ) Comparação dos espectros de ECD e UV observados de (+)-M16As51F1 (120 µg/mL; MeOH) (traço preto) com os espectros de ECD e UV calculados em [PCM(MeOH)-CAM-B3LYP/TZVP//PCM(MeOH)-ωB97X-D/6-31G+(d,p)] da média de Boltzmann dos confôrmeros de menor energia identificados para (5 <i>S</i> , 9 <i>R</i> , 10 <i>R</i> , 11 <i>S</i> , 13 <i>S</i> , 14 <i>S</i> ) (traço azul). ( <b>Direita acima</b> ) Ampliação do espectros de ECD. ( <b>Direita abaixo</b> ) Estrutura, energia livre de Gibbs relativa e população de Boltzmann (%) dos confôrmeros de energia mais baixa de (5 <i>S</i> , 9 <i>R</i> , 10 <i>R</i> , 11 <i>S</i> , 13 <i>S</i> , 14 <i>S</i> )-M16As51F1.	90
Apêndice 32. Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (600 MHz, CD <sub>3</sub> OD) do composto M16As54I.	91

Apêndice 33. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$ ) do composto M16As54I.	92
Apêndice 34. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (150 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) do composto M16As54I.	93
Apêndice 35. Espectro de RMN de HSQC (600 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) do composto M16As54I.	94
Apêndice 36. Espectro de RMN de HMBC (600 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) do composto M16As54I.	95
Apêndice 37. Espectro de RMN de COSY (600 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) do composto M16As54I.	96
Apêndice 38. Espectro de RMN de HSQC-TOCSY (600 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) do composto M16As54I.	97
Apêndice 39. Espectro de 2D-NOESY (600 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) do composto M16As54I.	98
Apêndice 40. Espectro de 1D-NOESY (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$ ) do composto M16As54I. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ ( <b>A</b> ) e irradiação em $\delta_{\text{H}}$ 11,11 ( <b>B</b> ).	99
Apêndice 41. Espectro de HRESIMS da amostra M16As54I.	100
Apêndice 42. Espectro de infravermelho (ATR) do composto M16As54I.	101
Apêndice 43. Espectro de absorção na região do UV (15 $\mu\text{g/mL}$ ; MeOH) da amostra M16As54I.	102
Apêndice 44. ( <b>Esquerda</b> ) Comparação dos espectros de ECD observados de (+)- <b>M16As54Id</b> (50 $\mu\text{g/mL}$ ; MeOH) (traço preto) com o espectro de ECD calculado em [PCM(MeOH)-CAM-B3LYP/TZVP//PCM(MeOH)- $\omega\text{B97X-D/6-31G+(d,p)}$ ] da média de Boltzmann dos confôrmeros de menor energia ( <b>Direita</b> ) Estruturas, energias livres Gibbs relativas e população de Boltzmann (%) dos confôrmeros de energia mais baixa de ( <i>E</i> )-(1 <i>R</i> , 2 <i>R</i> , 5 <i>S</i> , 9 <i>S</i> , 10 <i>R</i> )- <b>M16As54Id</b> .	103
Apêndice 45. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$ ) do composto M16As140D.	104
Apêndice 46. Expansão do espectro de RMN de $^1\text{H}$ (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$ ) do composto M16As140D.	105
Apêndice 47. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$ ) do composto M16As140D.	106
Apêndice 48. Expansão do espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$ ) do composto M16As140D.	107

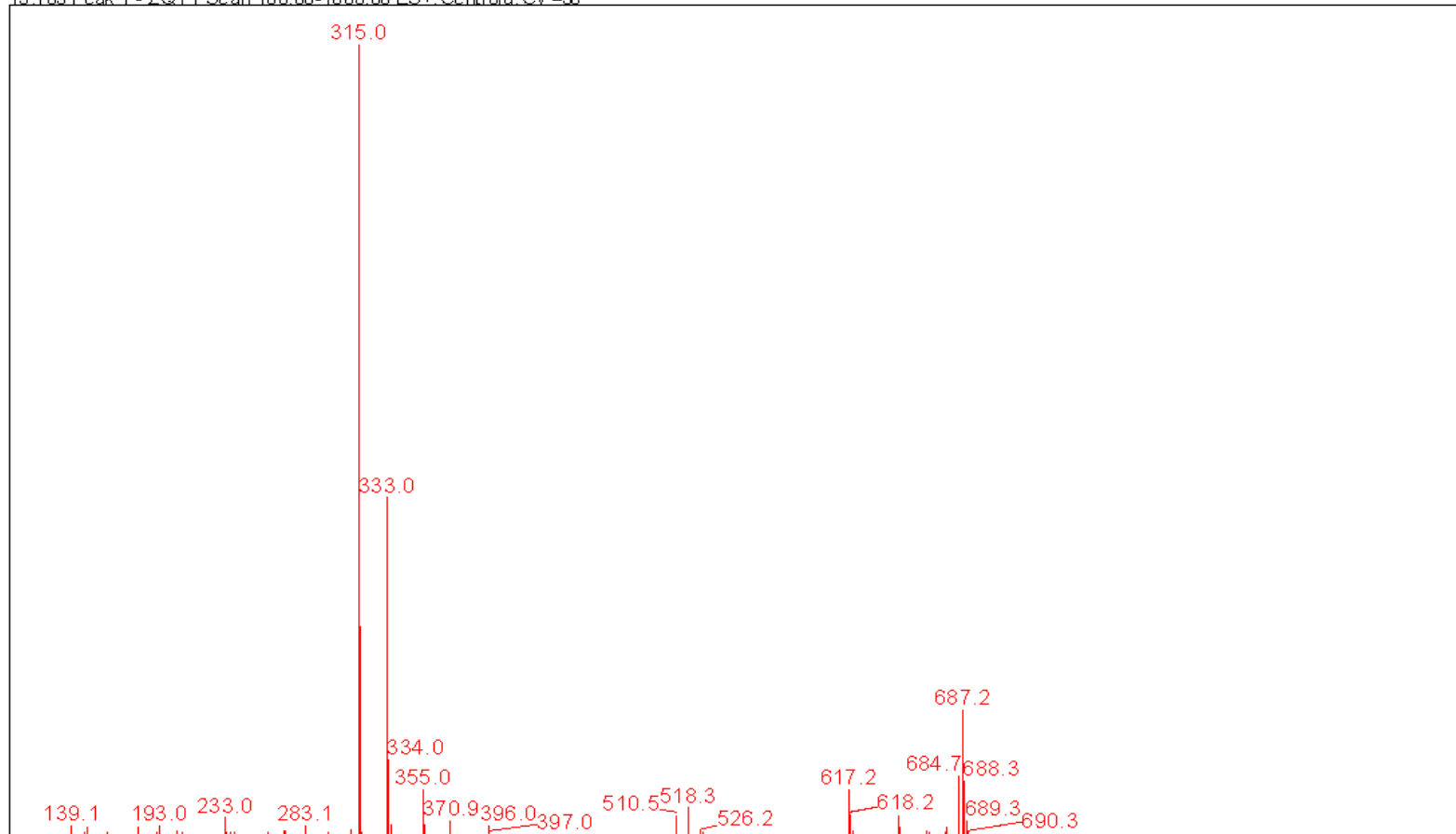
Apêndice 49. Espectro de RMN de HSQC (600 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) do composto M16As140D.	108
Apêndice 50. Espectro de RMN de HMBC (600 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) do composto M16As140D.	109
Apêndice 51. Espectro de HRESIMS da amostra M16As140D.	110
Apêndice 52. Espectro de infravermelho (pastilha de Si) do composto M16As140D.	111
Apêndice 53. Espectro de absorção na região do UV (10 µg/mL; MeOH) do composto M16As140D.	112

Apêndice 1. Espectro de absorção na região do UV por HPLC-DAD de M16As38A1.

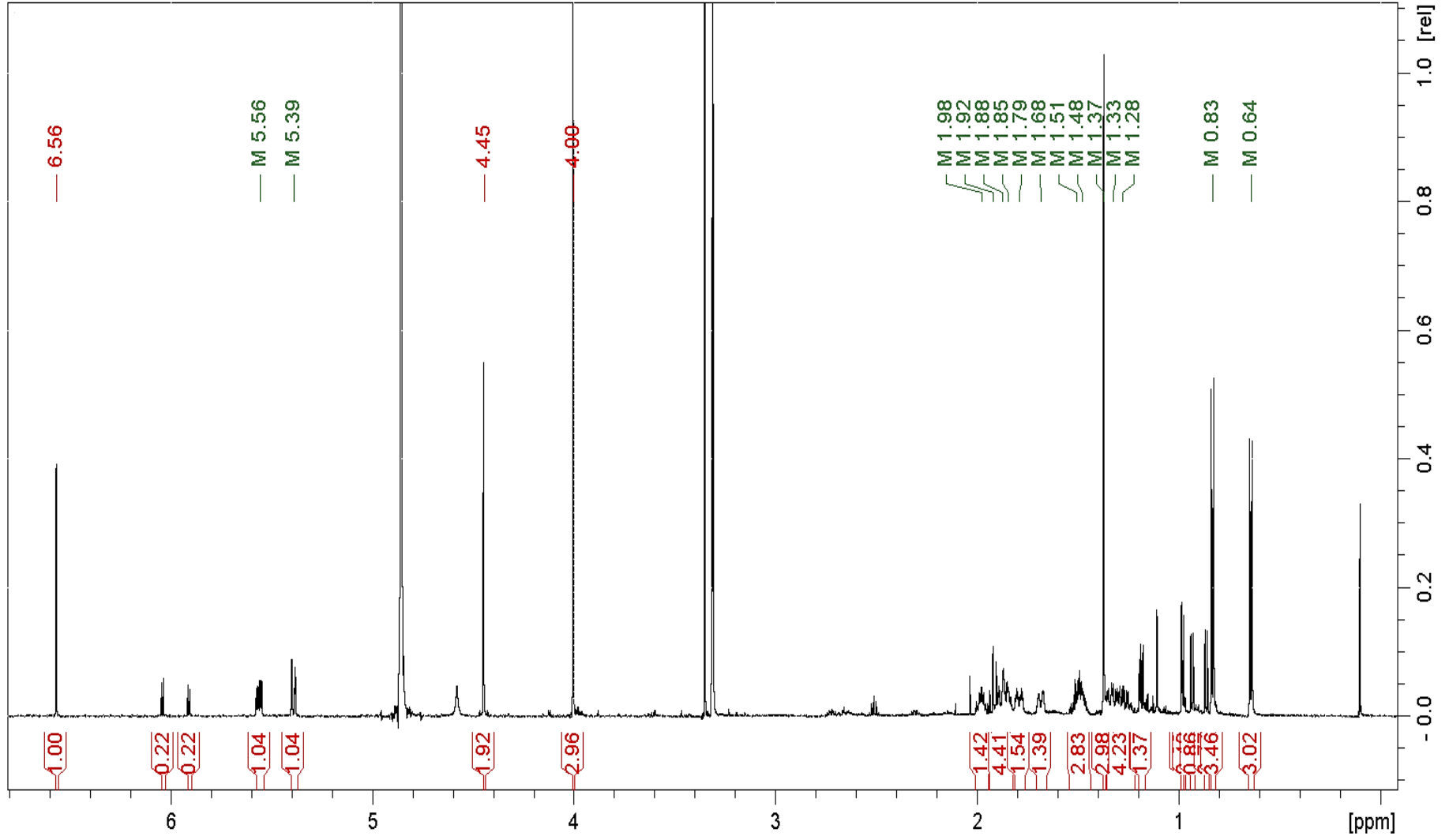


## Apêndice 2. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização de M16As38A1

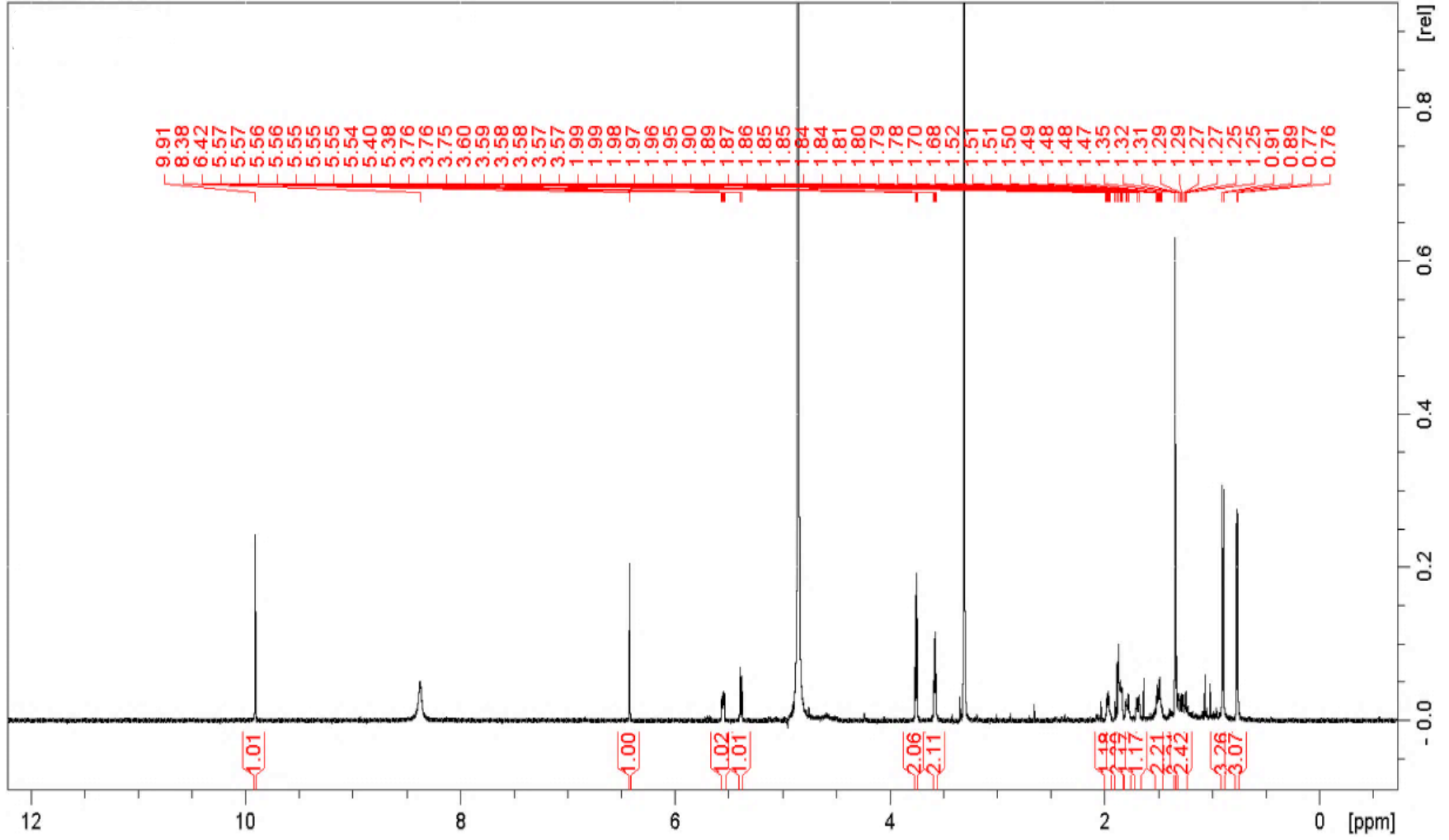
19.189 Peak 1 - ZQ.F1 Scan 100.00-1000.00 ES+ Centroid CV=30



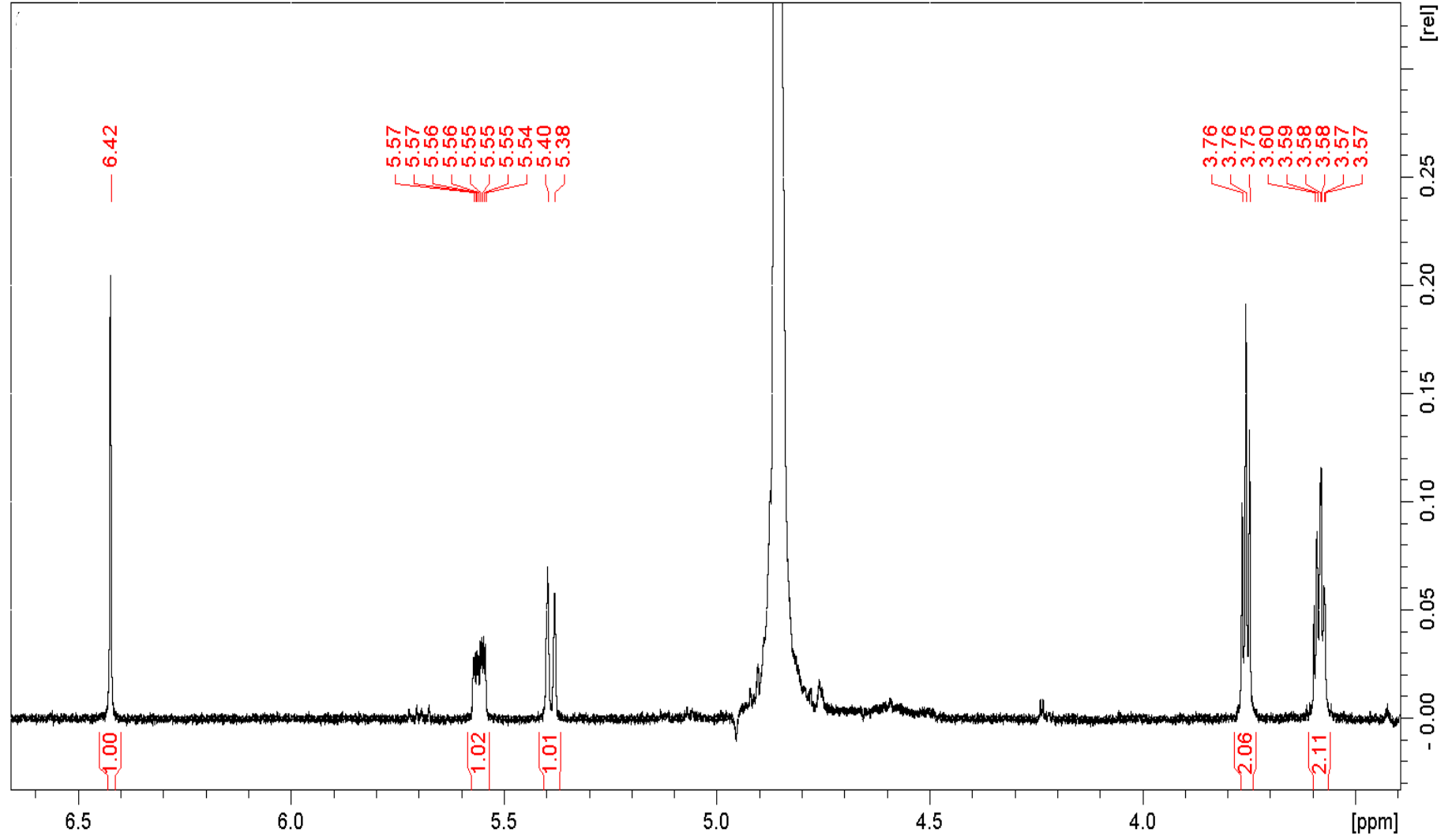
Apêndice 3. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) do composto M16As38A1.



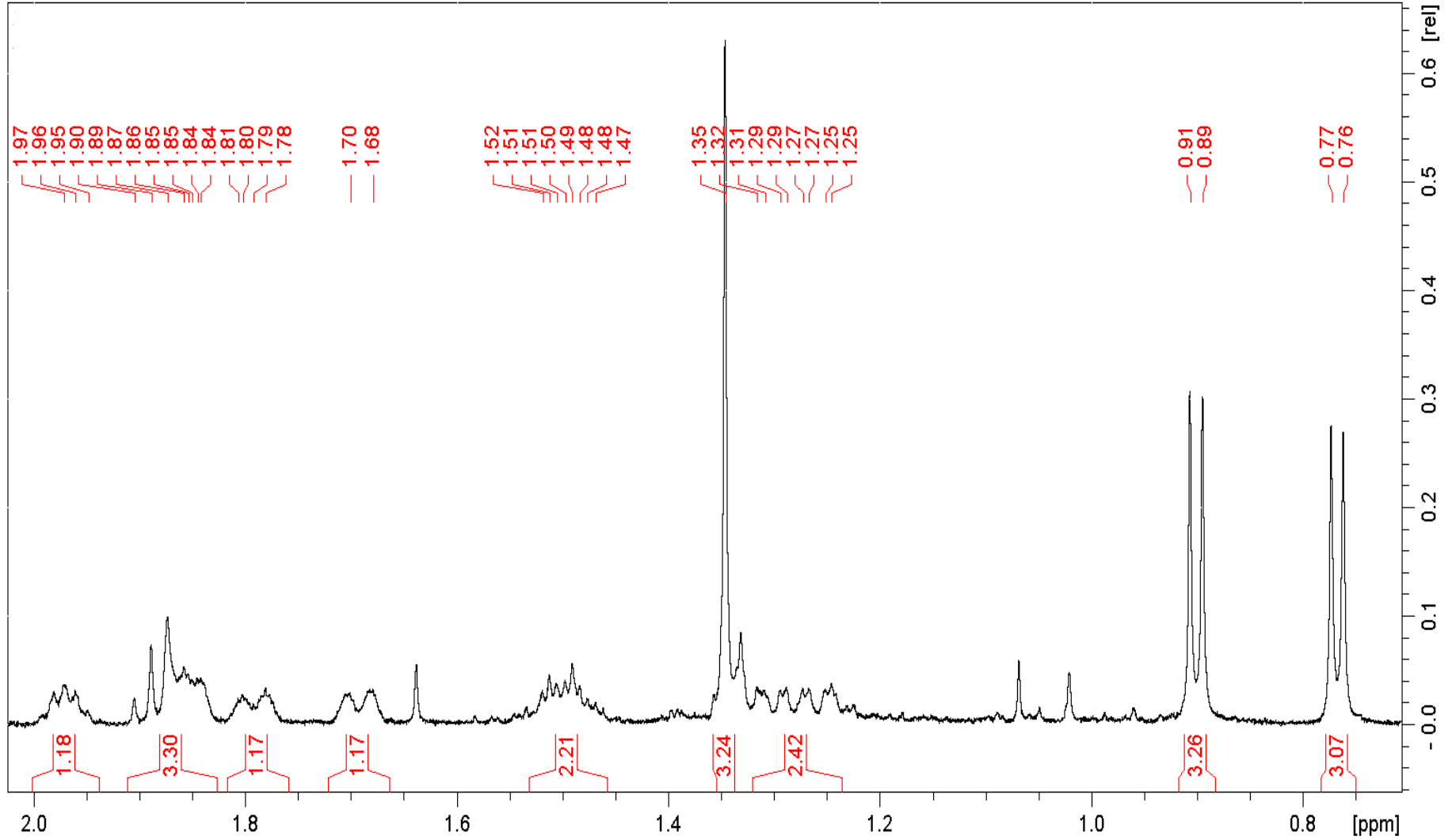
Apêndice 4. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) do composto M16As38A2



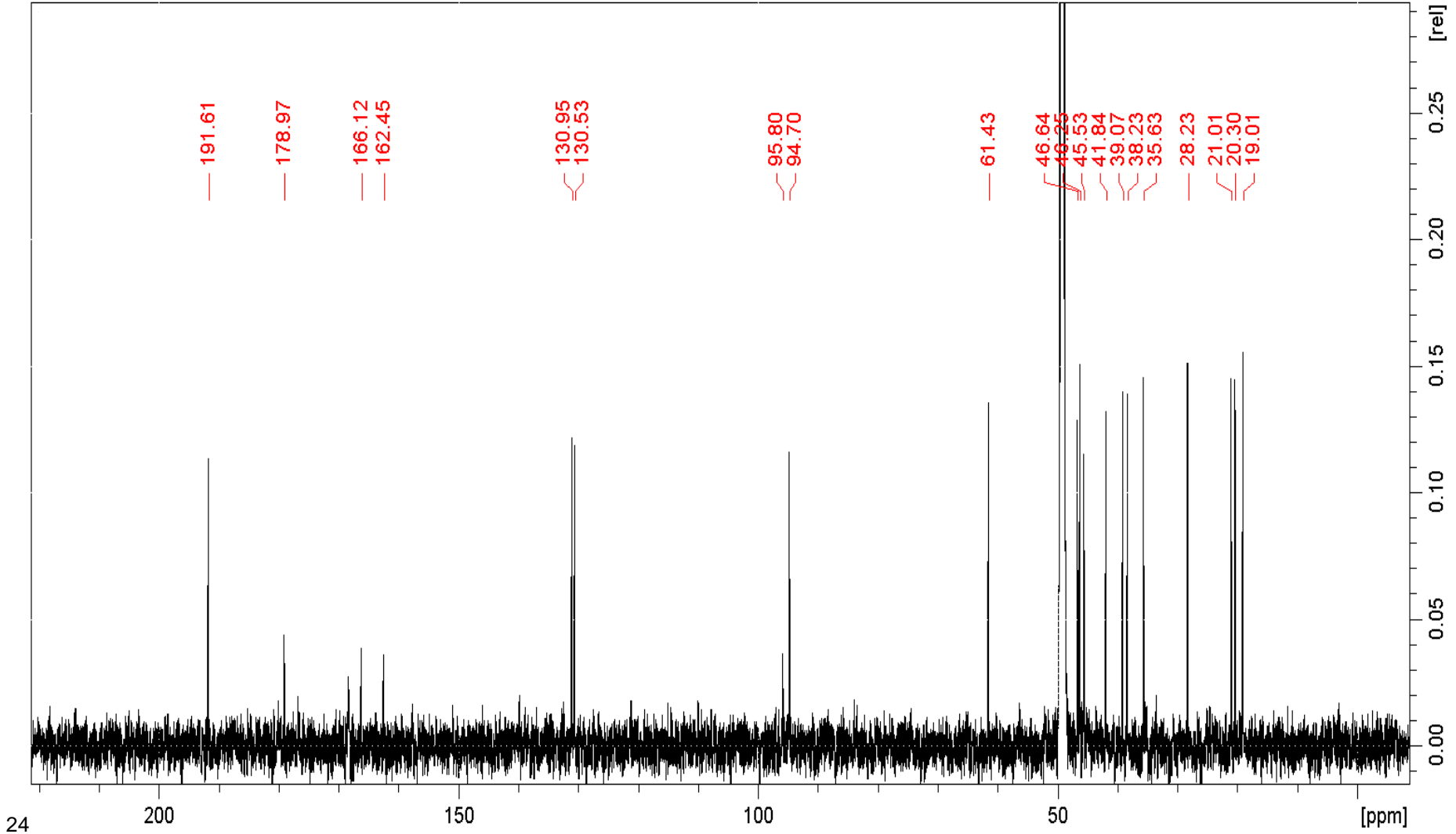
Apêndice 5. Expansão do espectro de RMN de <sup>1</sup>H (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) do composto M16As38A2



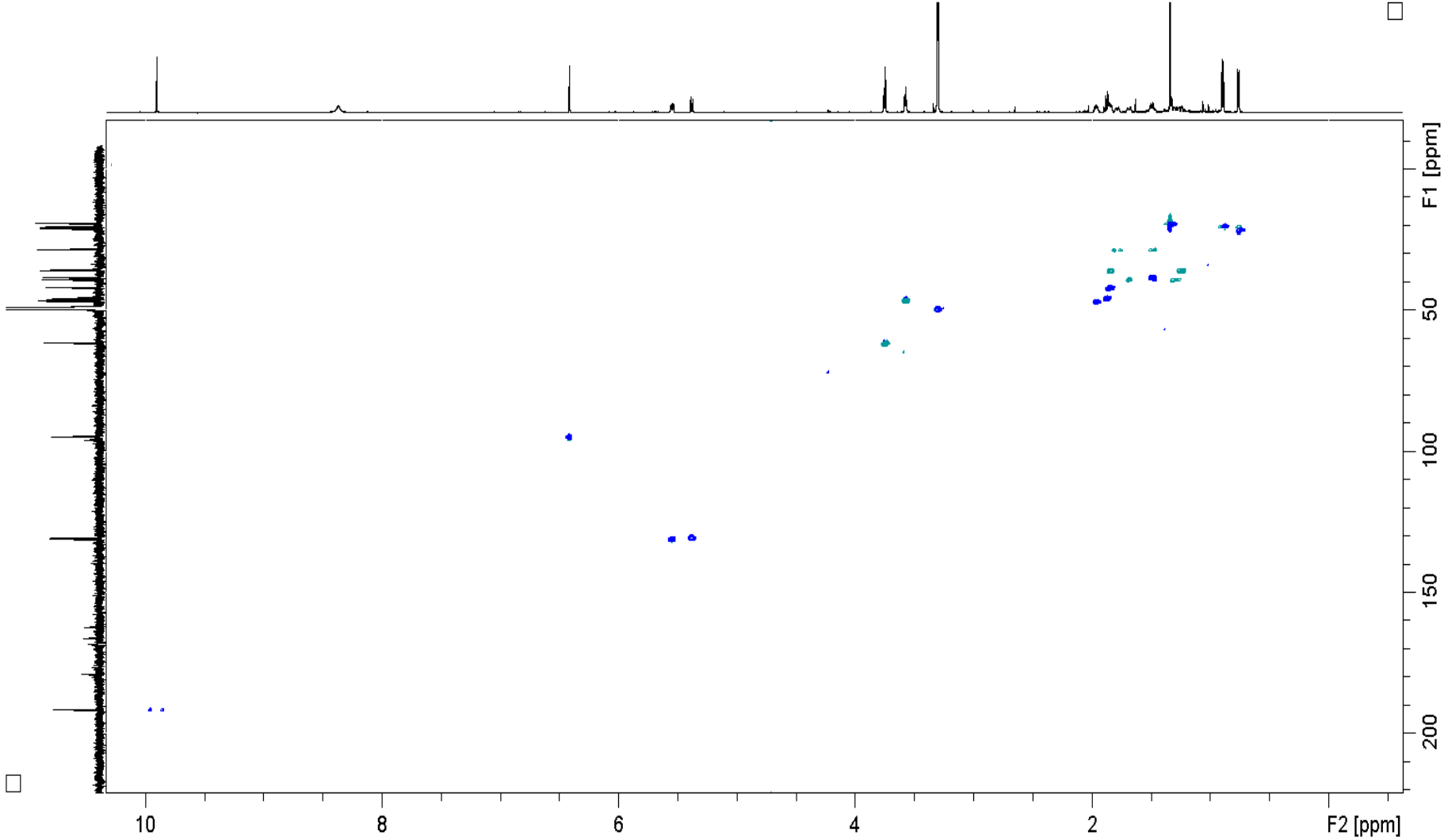


Apêndice 6. Expansão do espectro de Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) do composto M16As38A2.

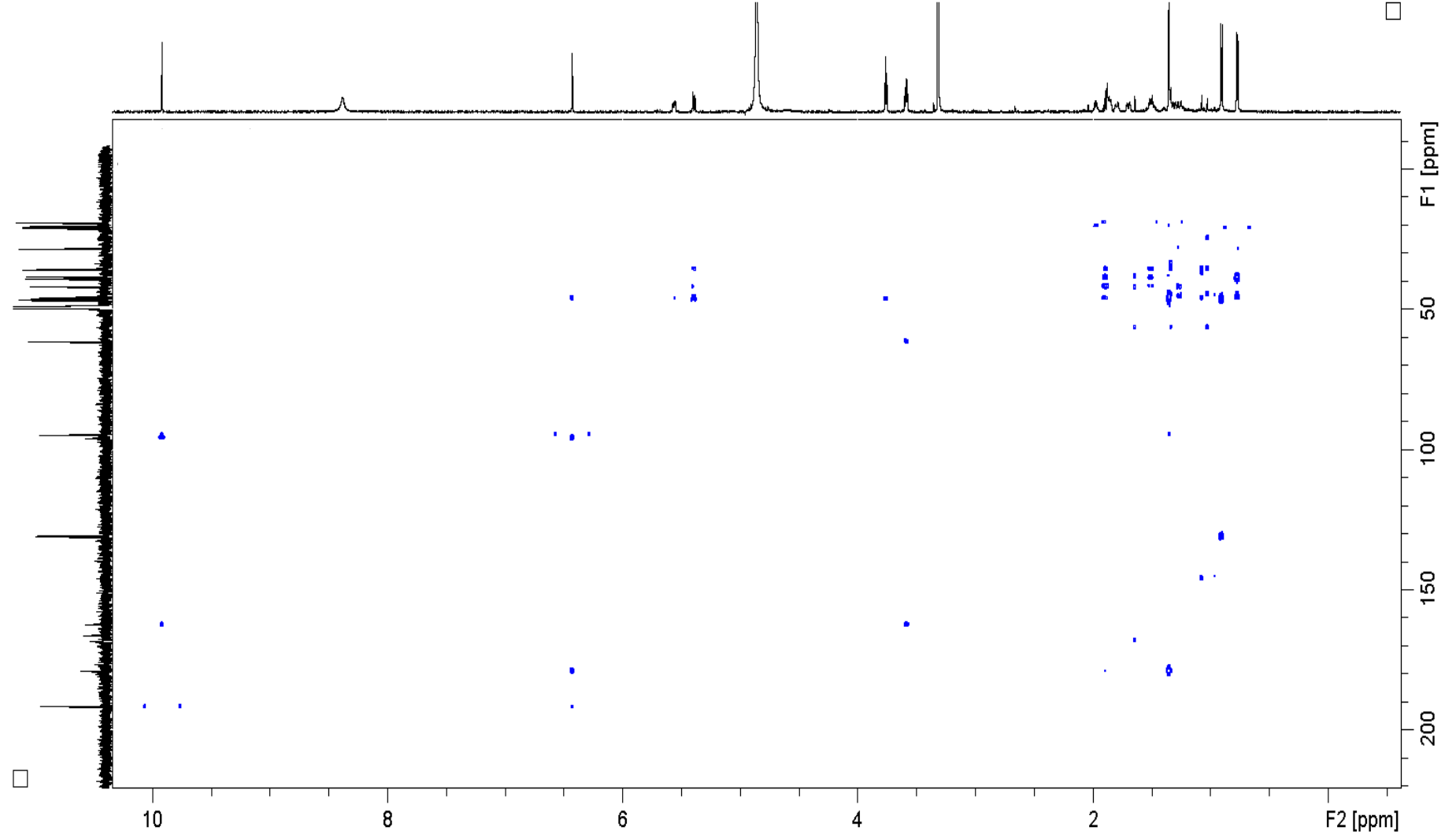
Apêndice 7. Espectro de RMN de <sup>13</sup>C (150 MHz, CD<sub>3</sub>OD) do composto M16As38A2



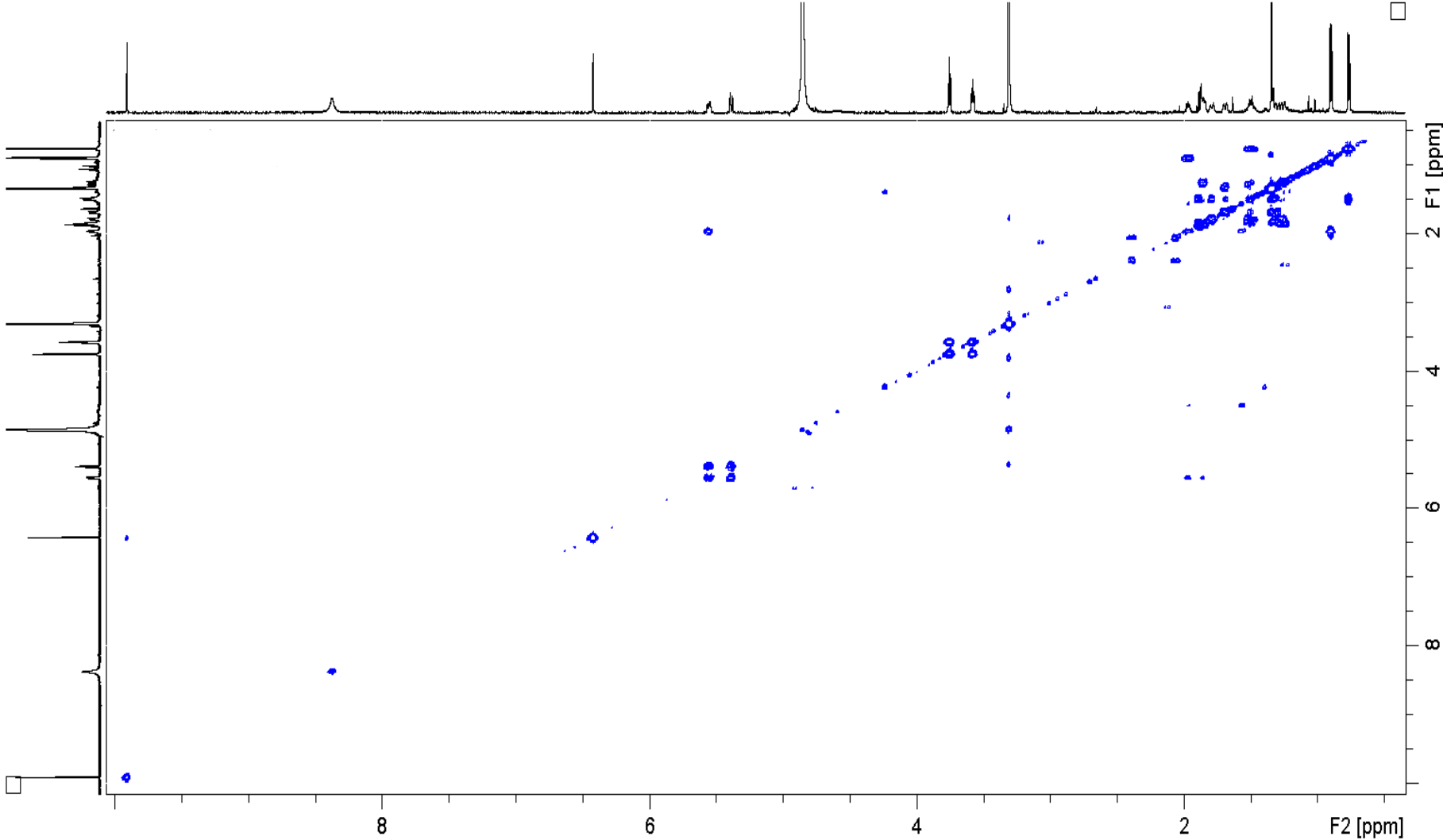
Apêndice 8. Espectro de RMN de HSQC (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) do composto M16As38A2



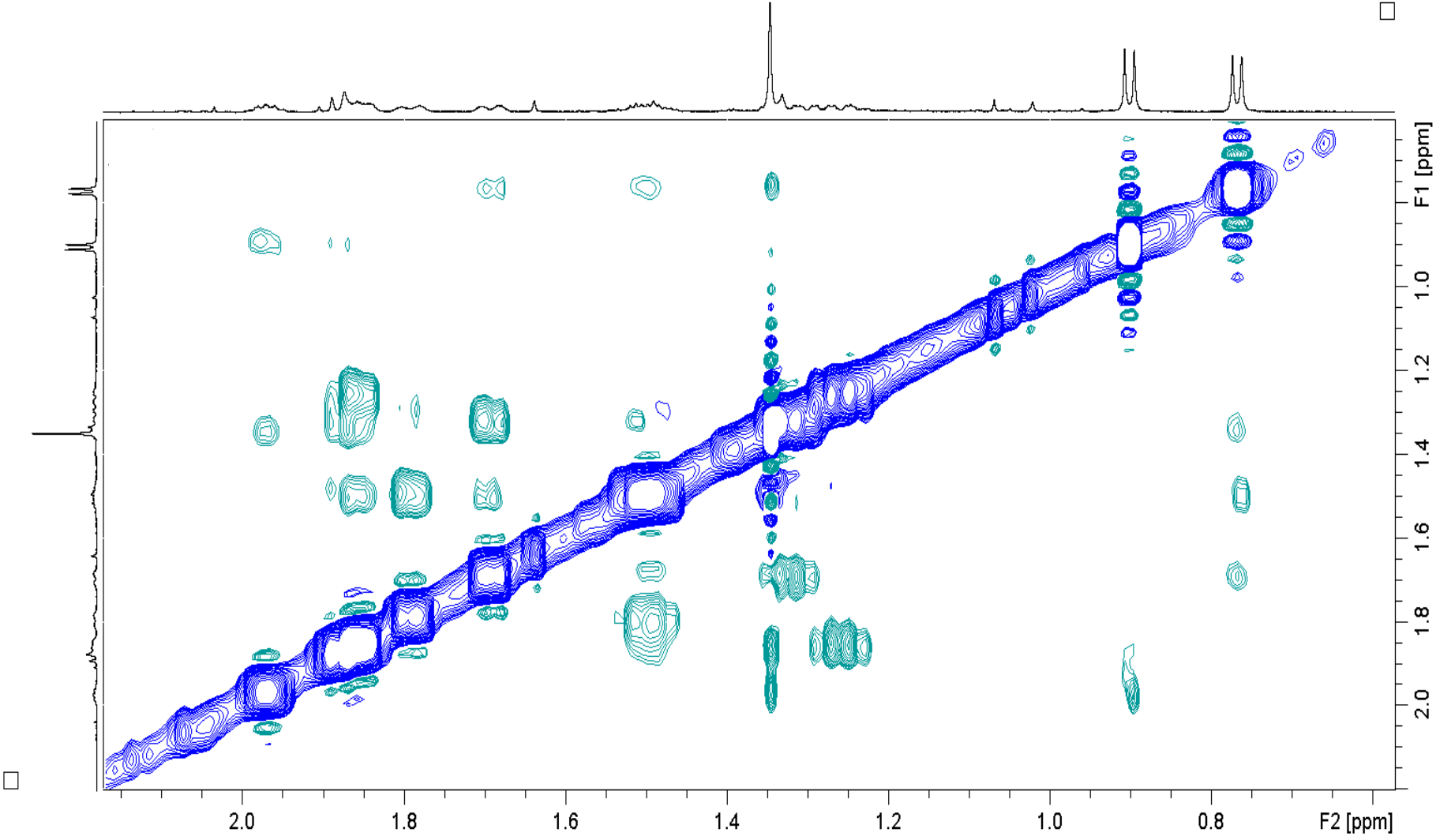
Apêndice 9. Espectro de RMN de HMBC do composto M16As38A2 (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD).



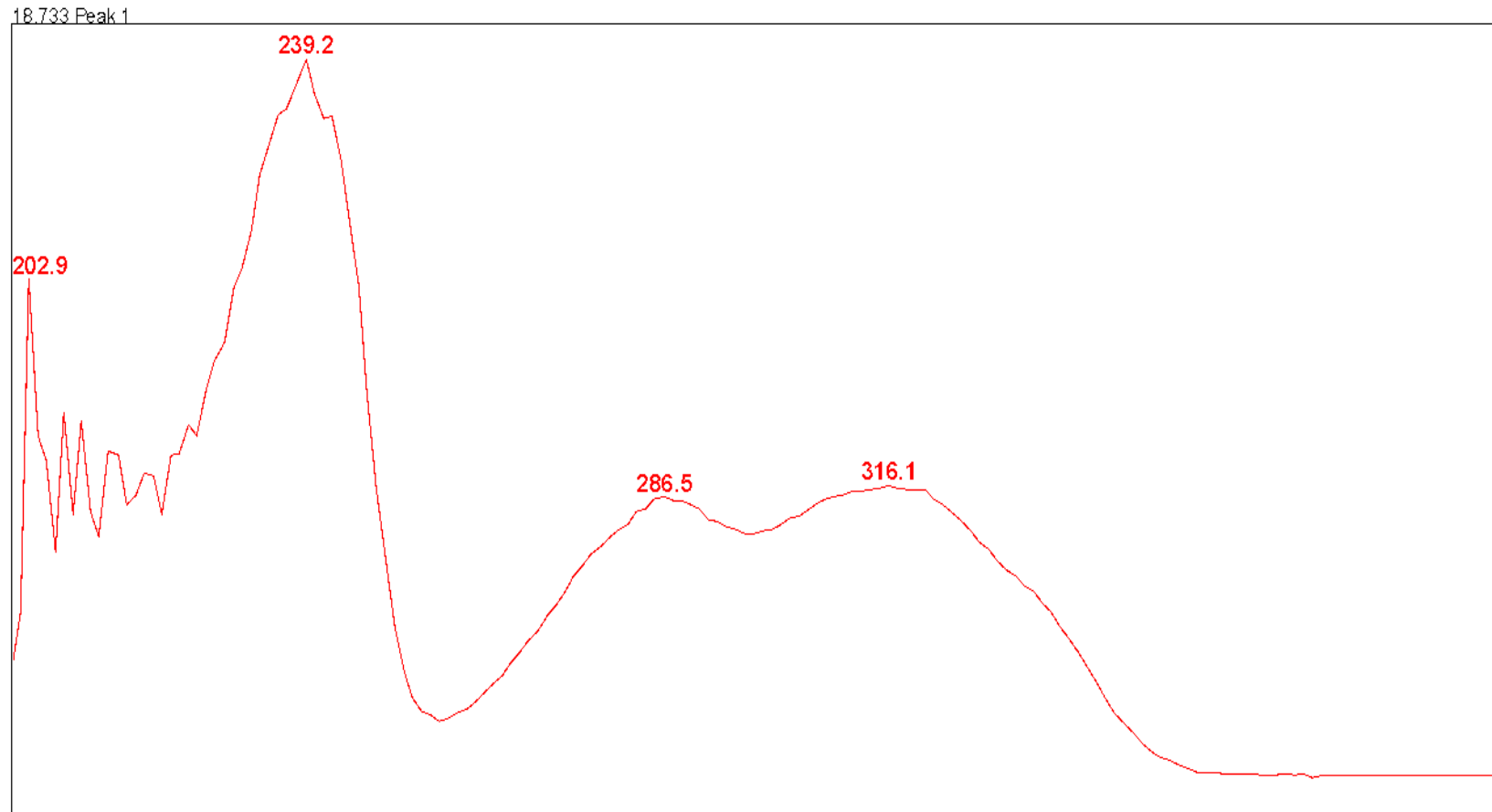
Apêndice 10. Espectro de RMN de COSY do composto M16As38A2



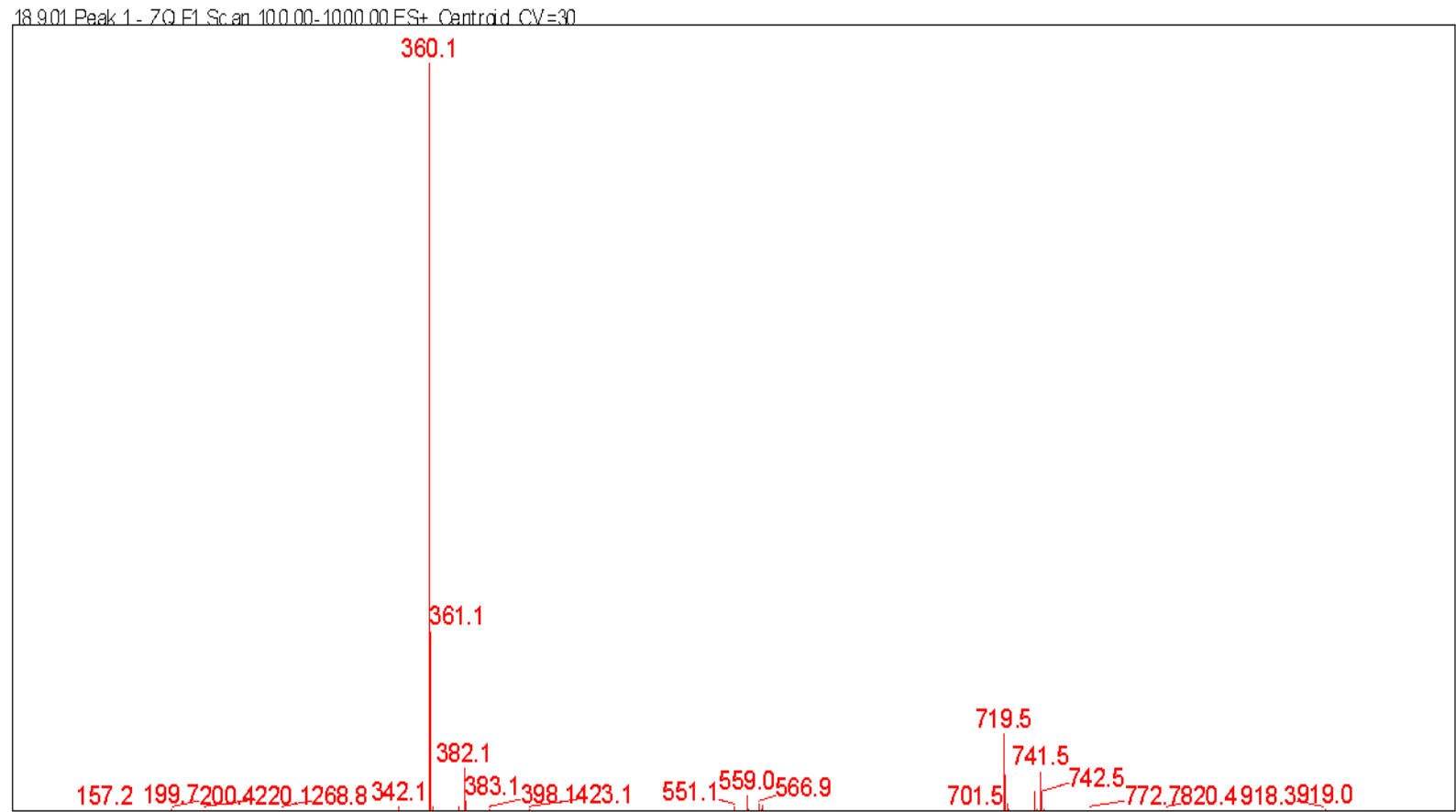
Apêndice 11. Espectro de RMN de NOESY (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) do composto M16As38A2



Apêndice 12. Espectro de absorção na região do UV por HPLC-DAD de M16As38A2

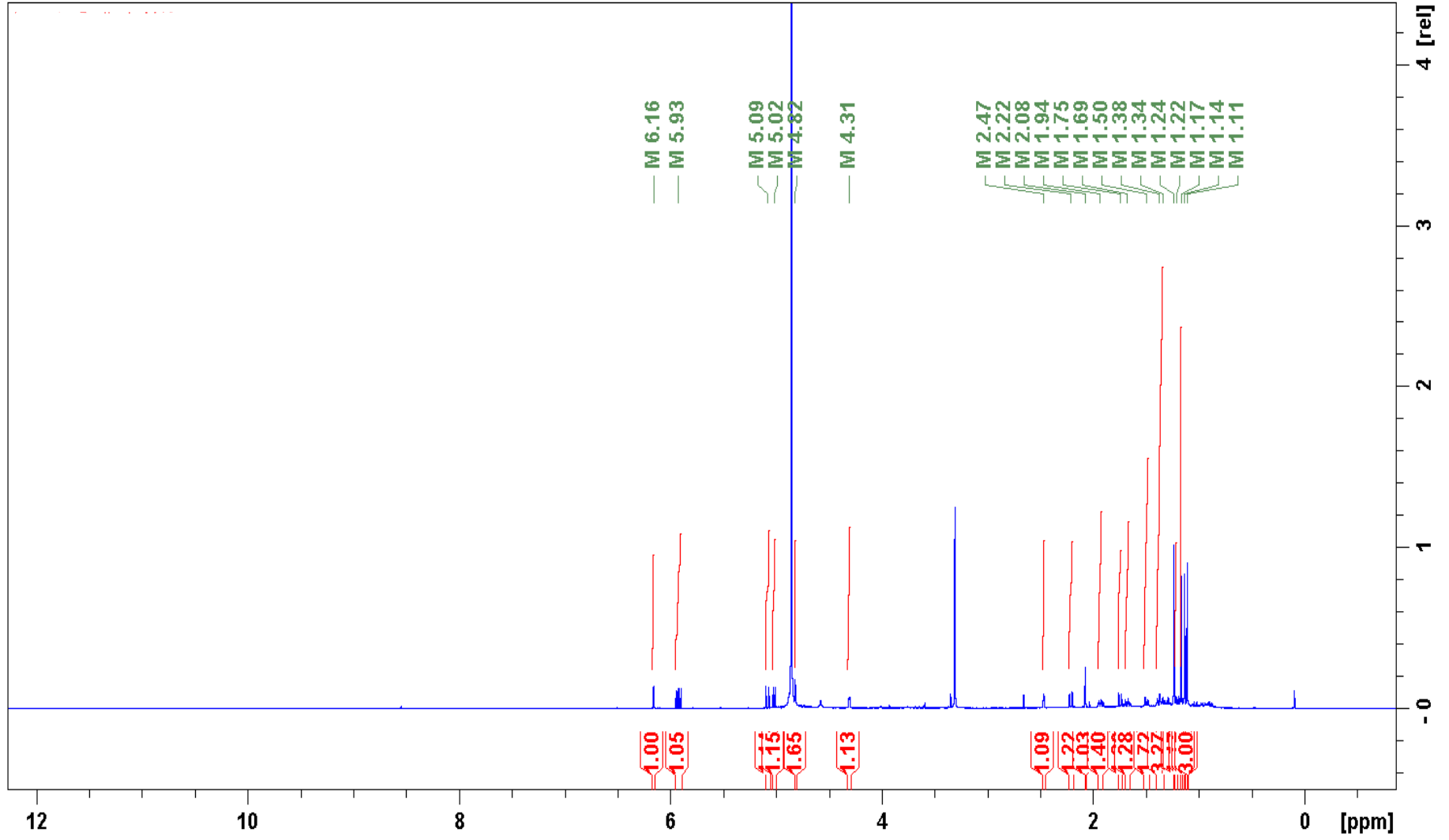


Apêndice 13. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização de M16As38A2.

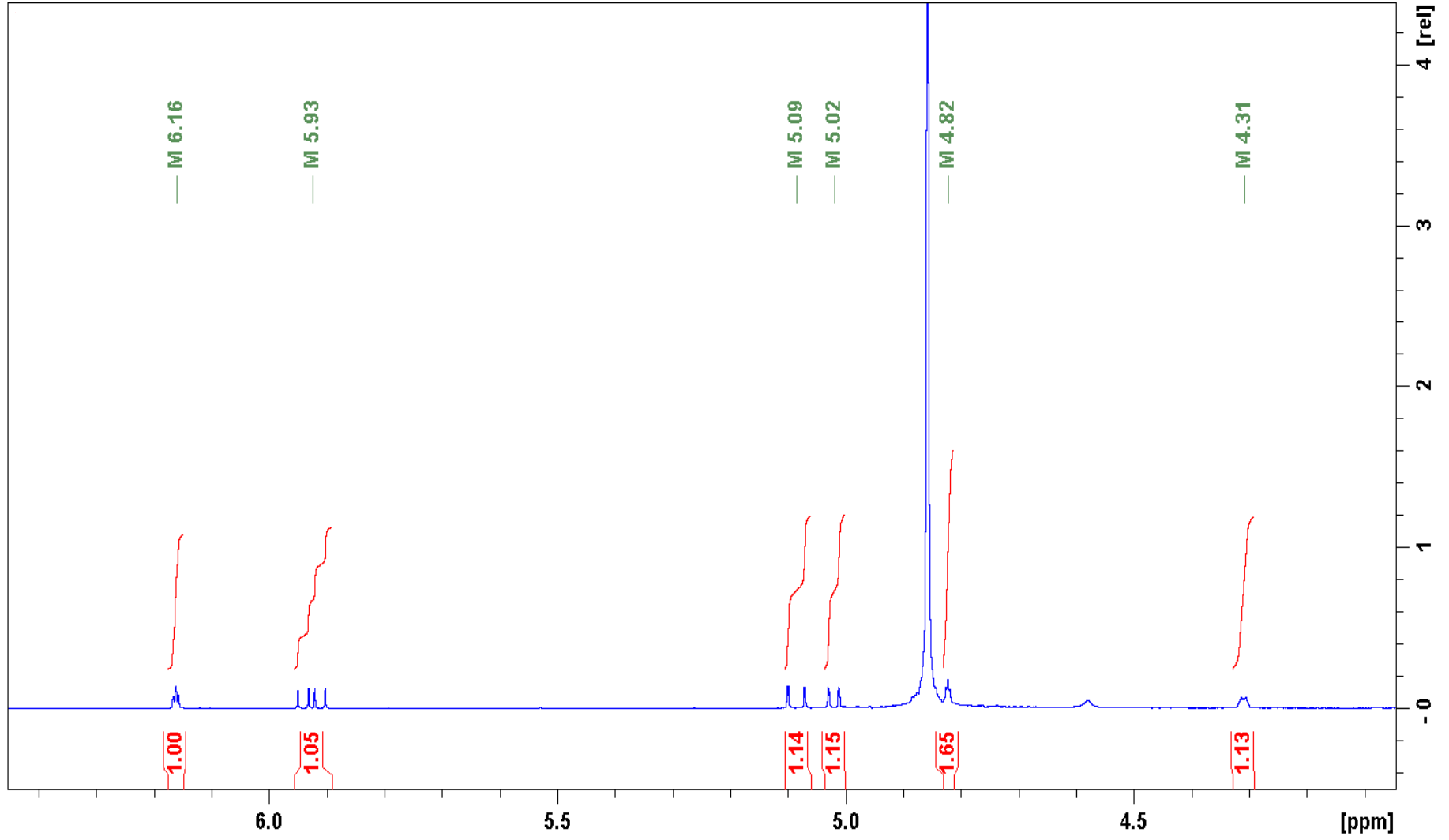




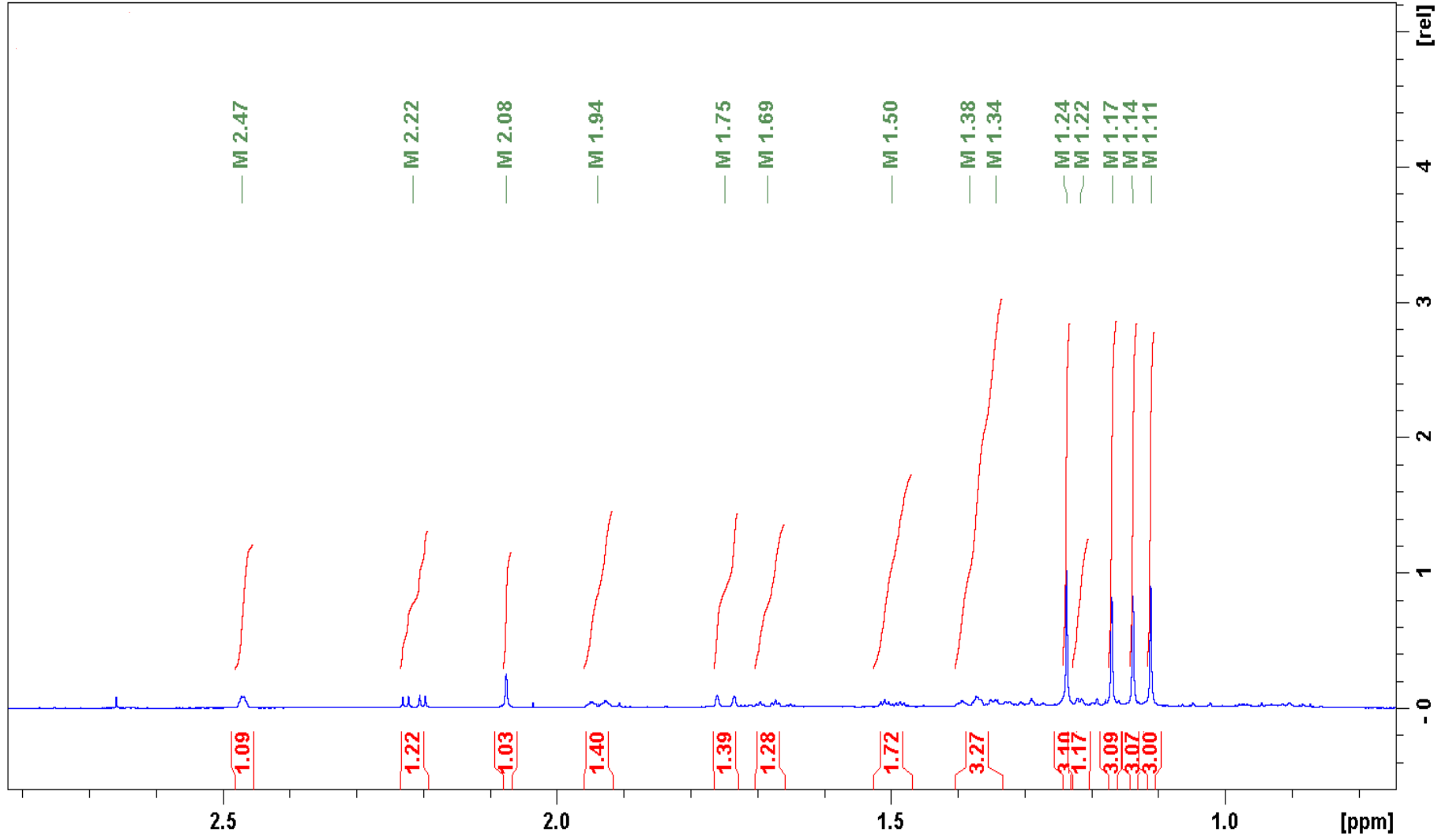
Apêndice 14. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) do composto M16As51F1



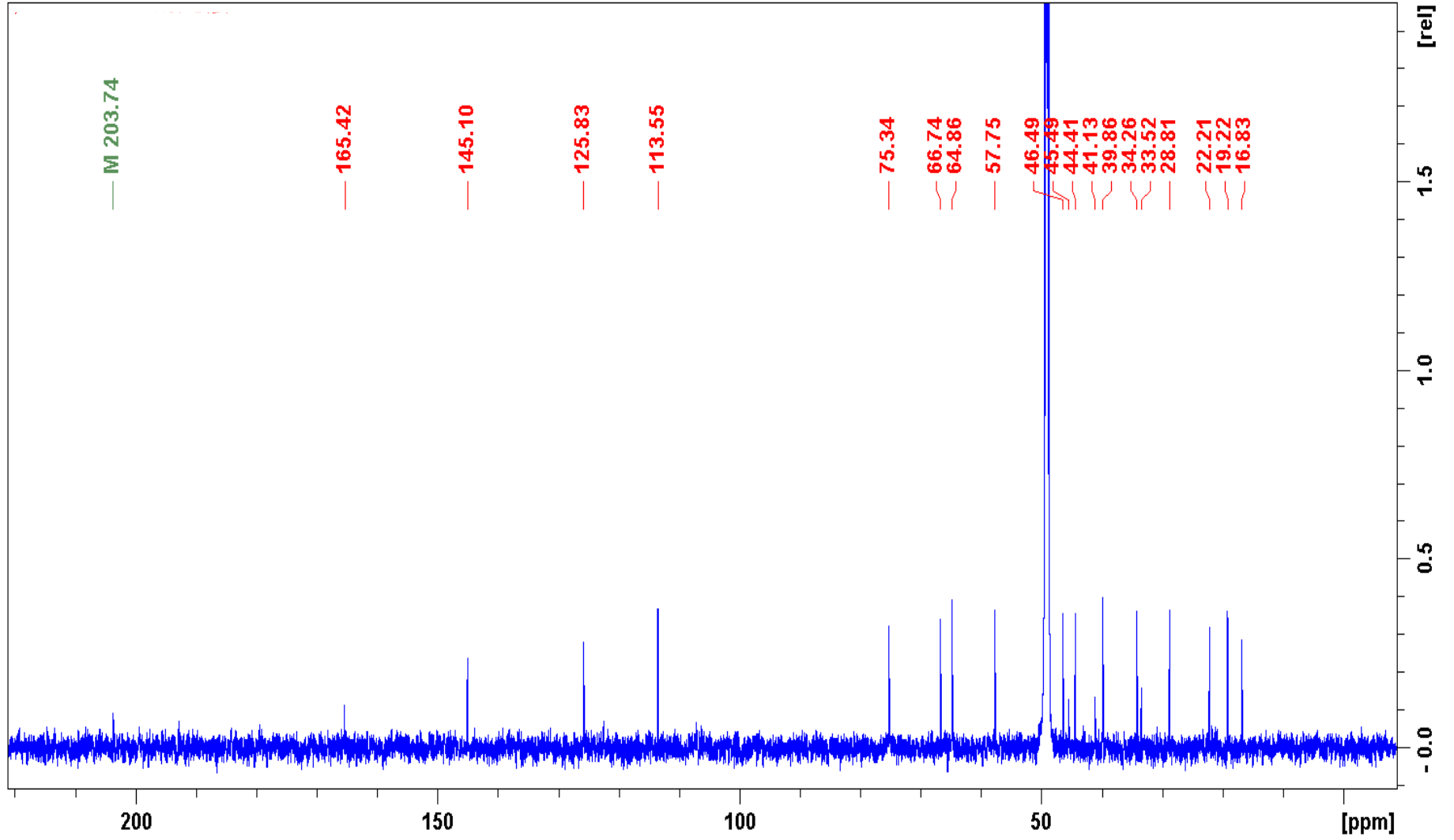
Apêndice 15. Expansão do espectro de RMN de <sup>1</sup>H (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) do composto M16As51F1.

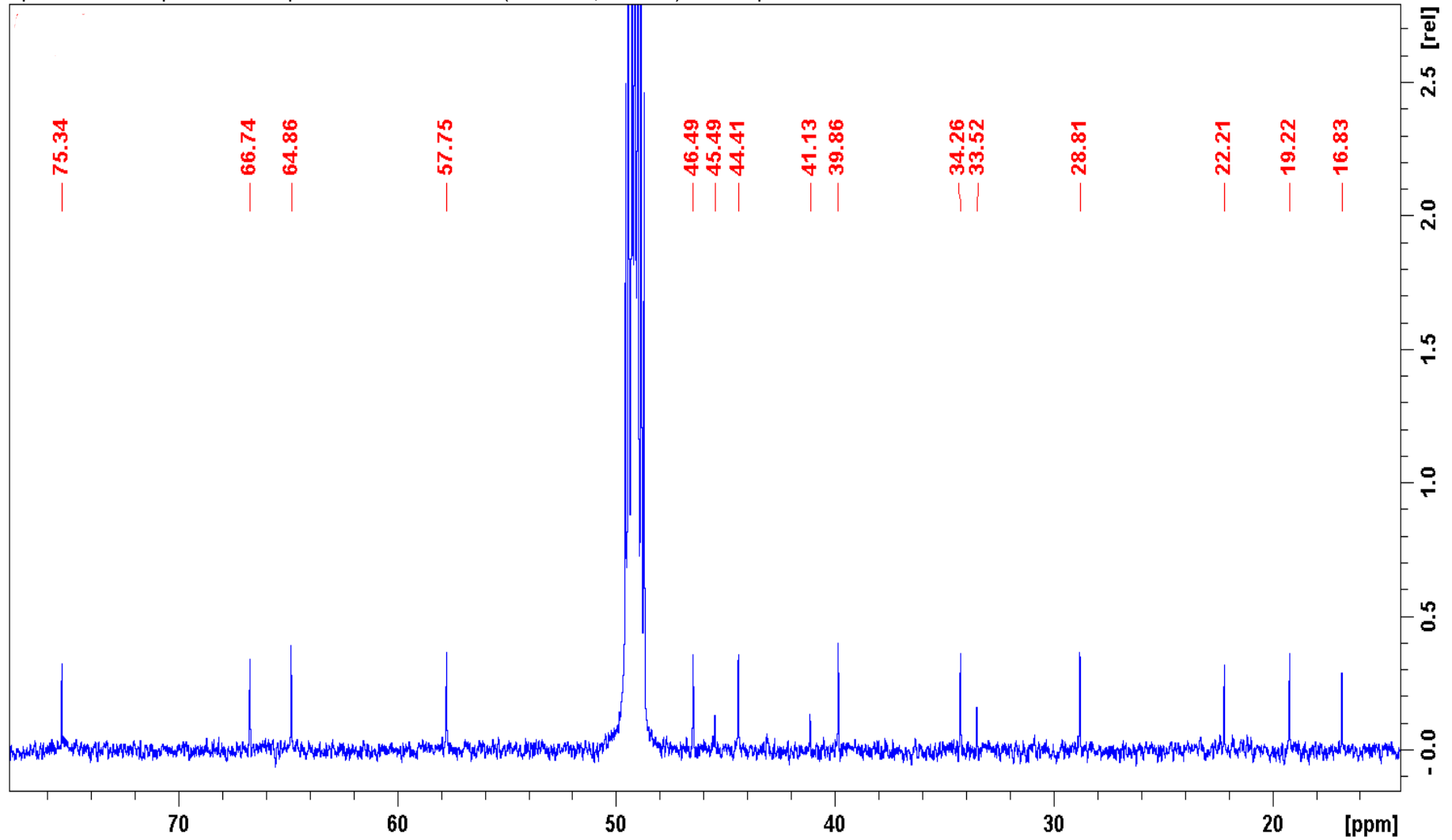


Apêndice 16. Expansão do espectro de RMN de 1H (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) do composto M16As51F1.

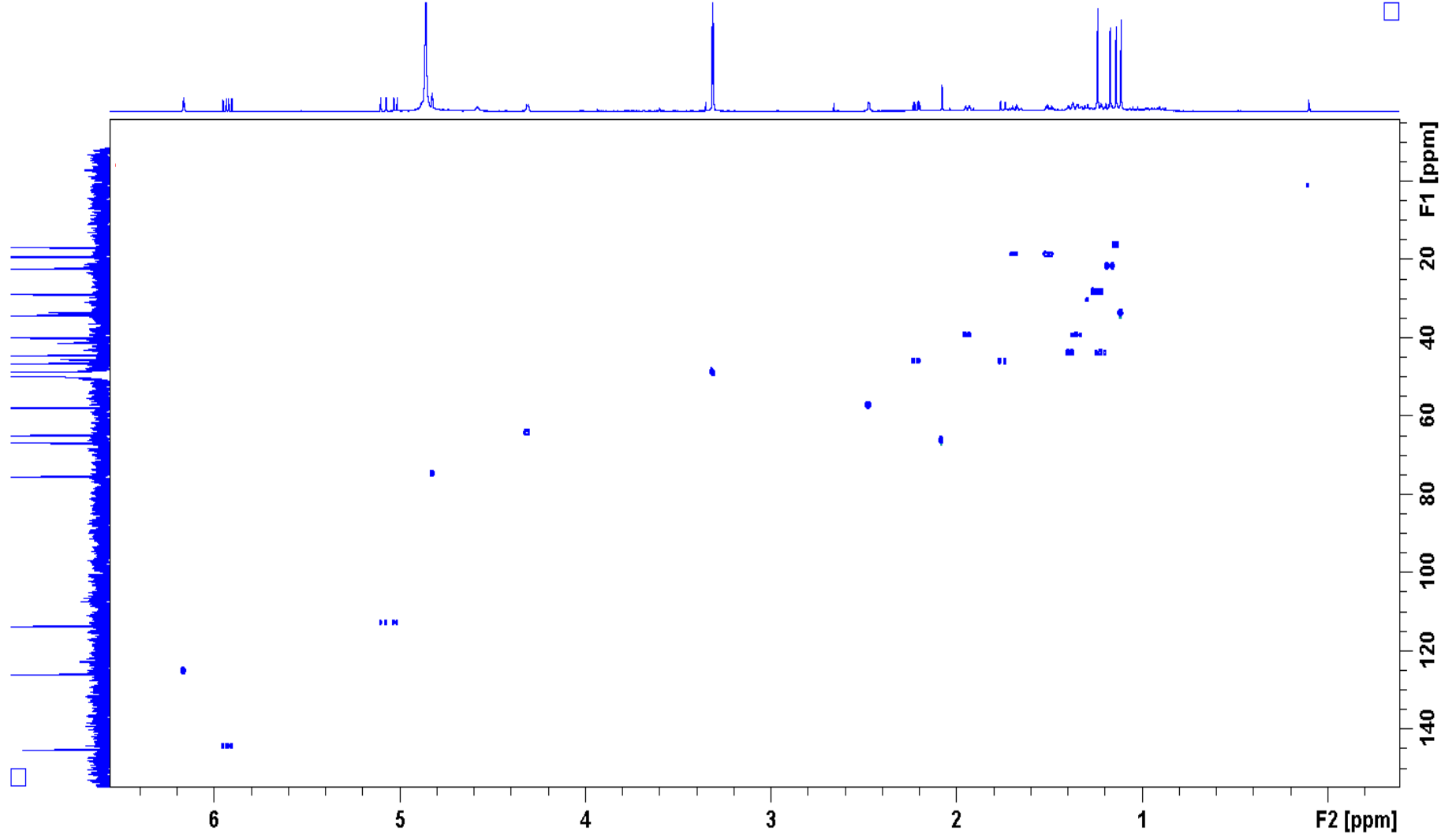


Apêndice 17. Espectro de RMN de <sup>13</sup>C (150 MHz, CD<sub>3</sub>OD) do composto M16As1F1

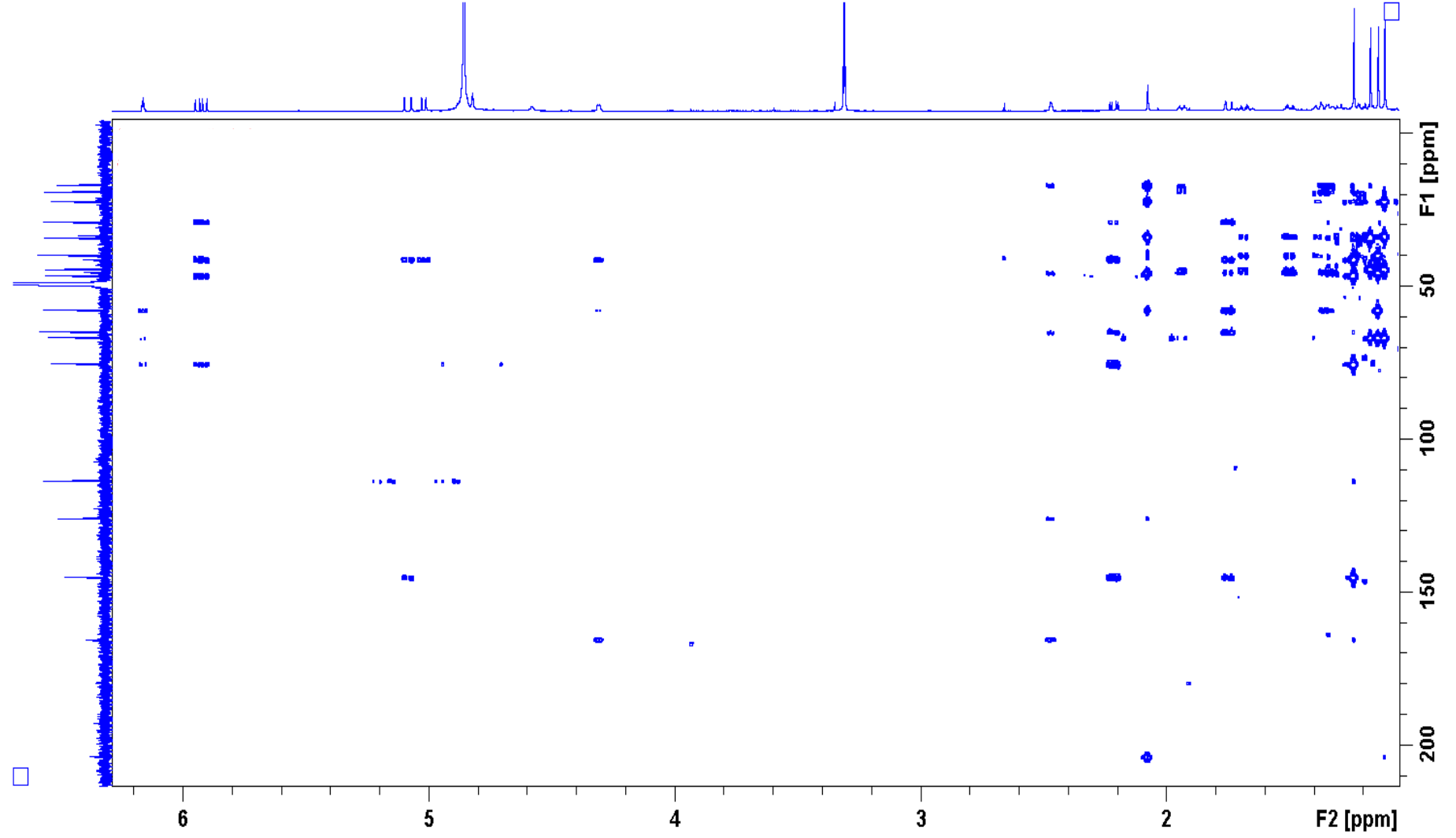


Apêndice 18. Expansão do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (150 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) do composto M16As51F1.

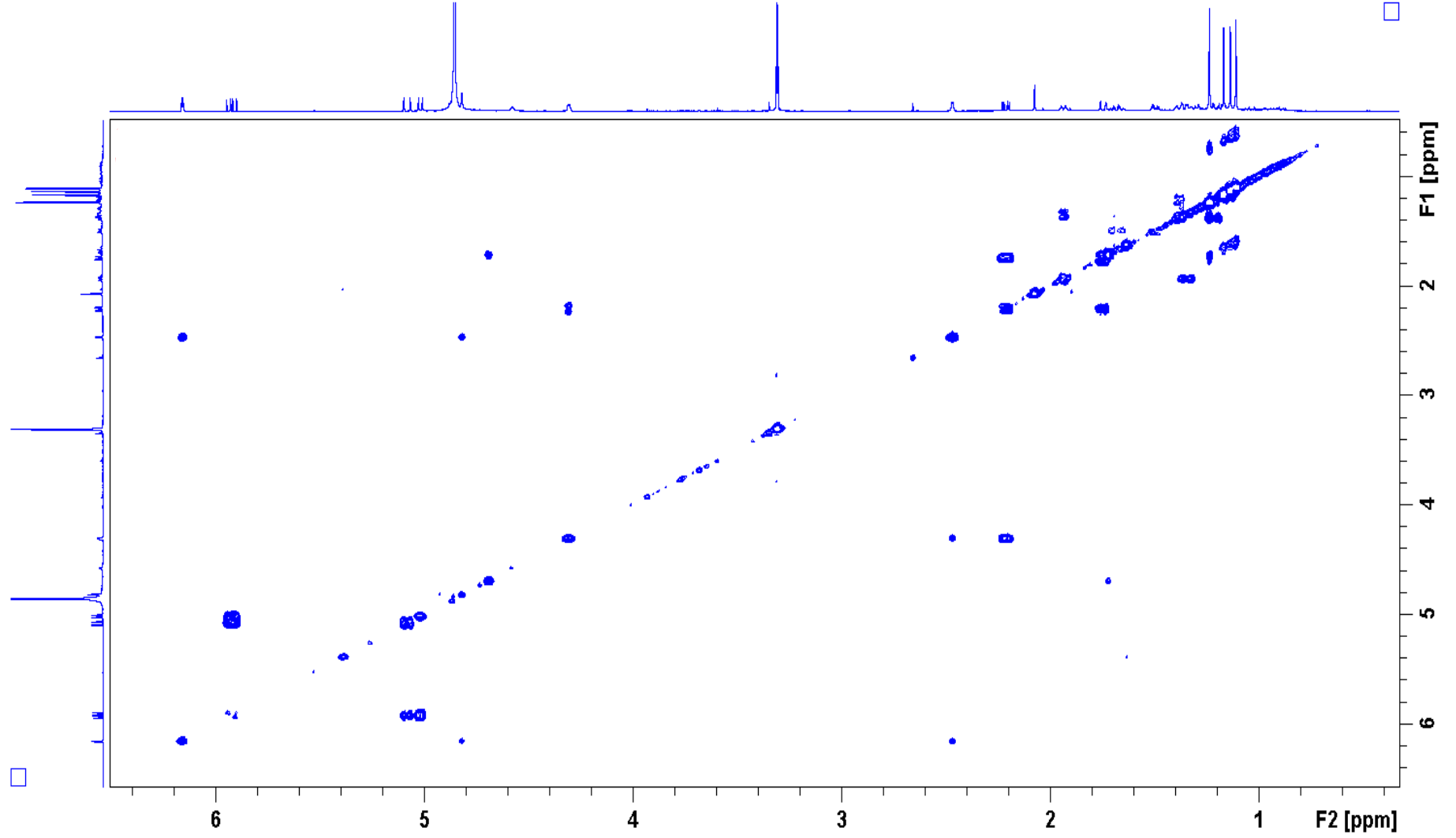
Apêndice 19. Espectro de RMN de HSQC (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) do composto M16As51F1



Apêndice 20. Espectro de RMN de HMBC (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) do composto M16As51F1.

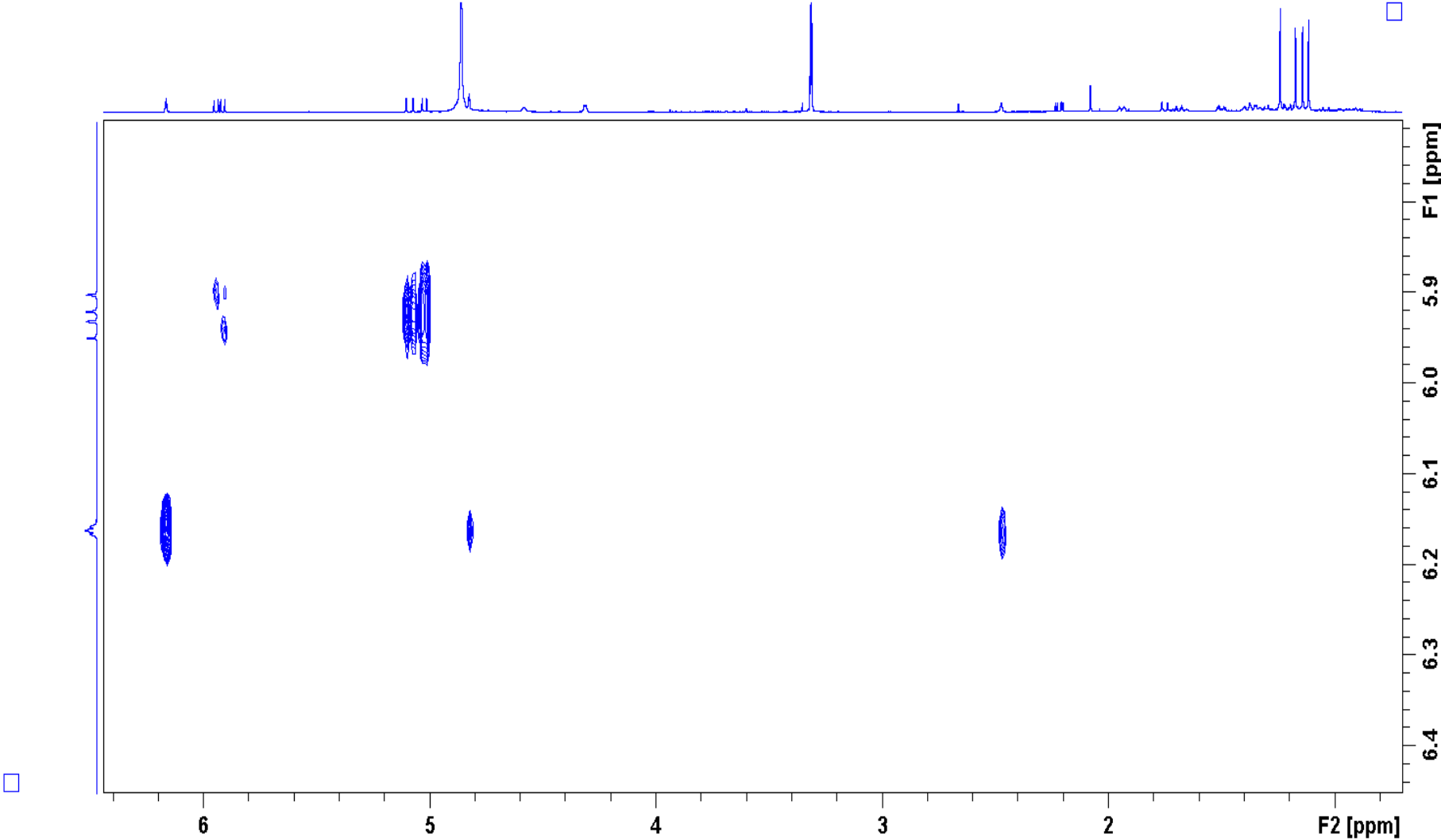


Apêndice 21. Espectro de RMN de COSY (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) do composto M16As51F1.

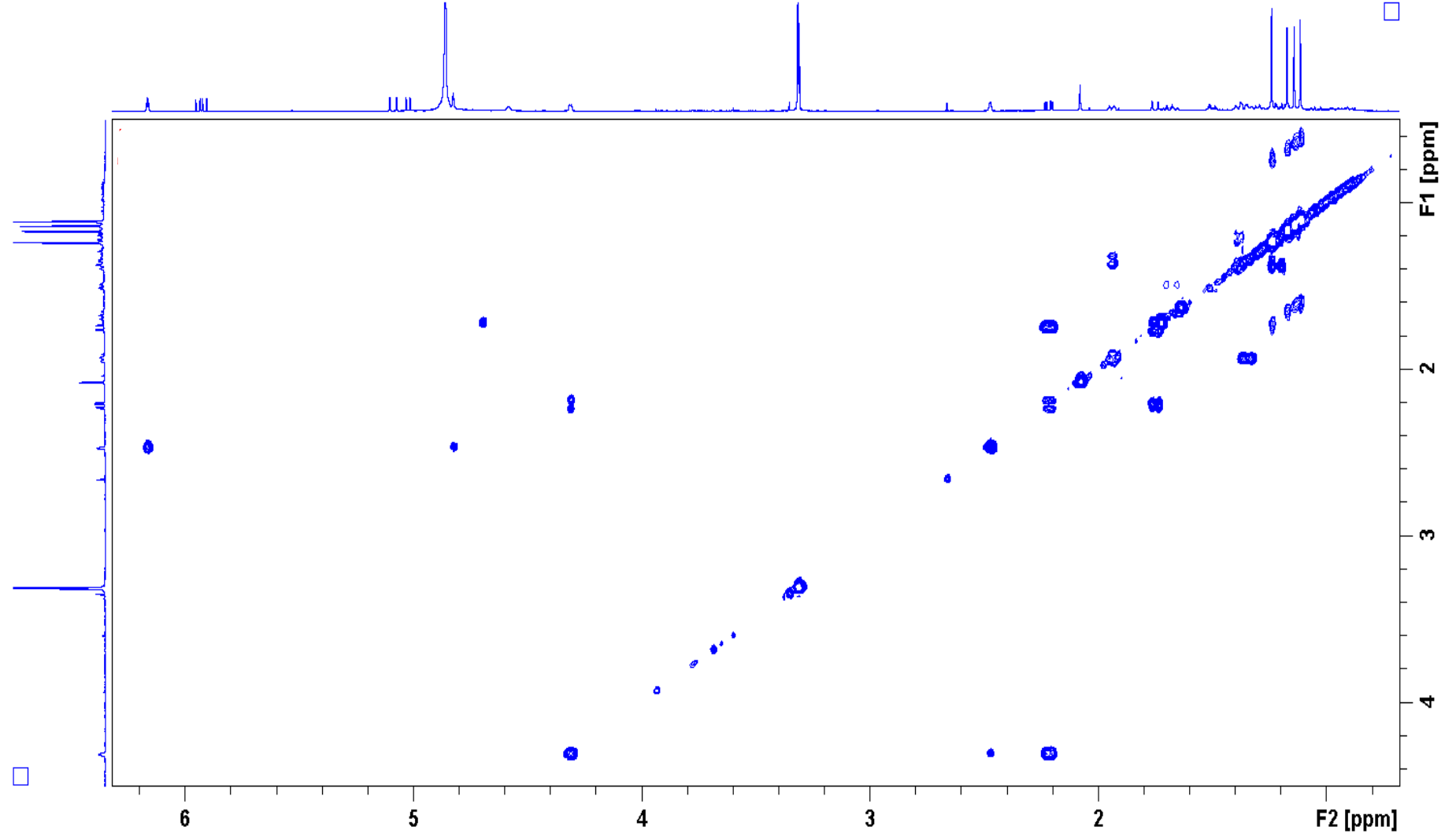




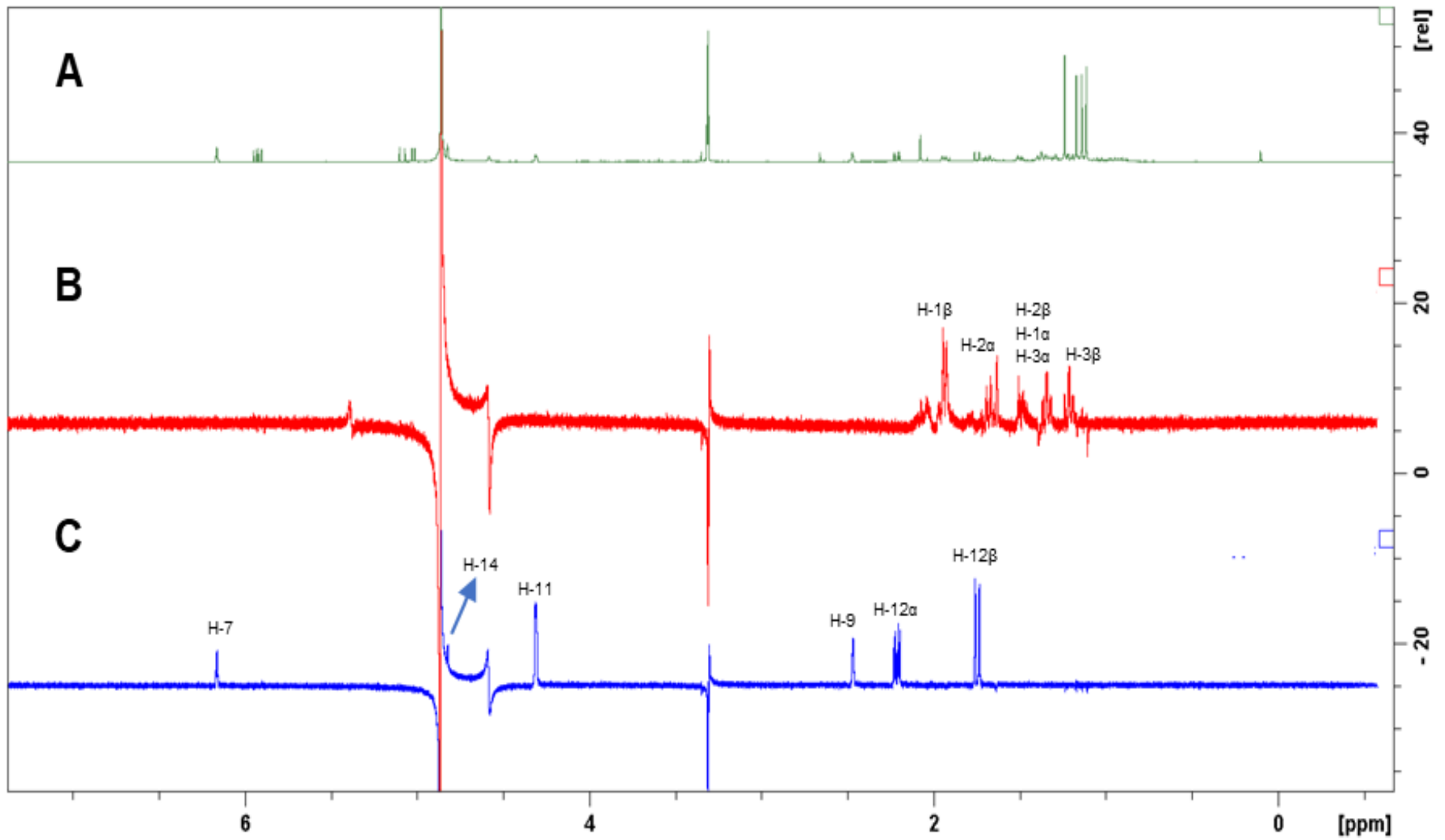
Apêndice 22. Expansão do espectro de RMN de COSY (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) do composto M16As51F1.



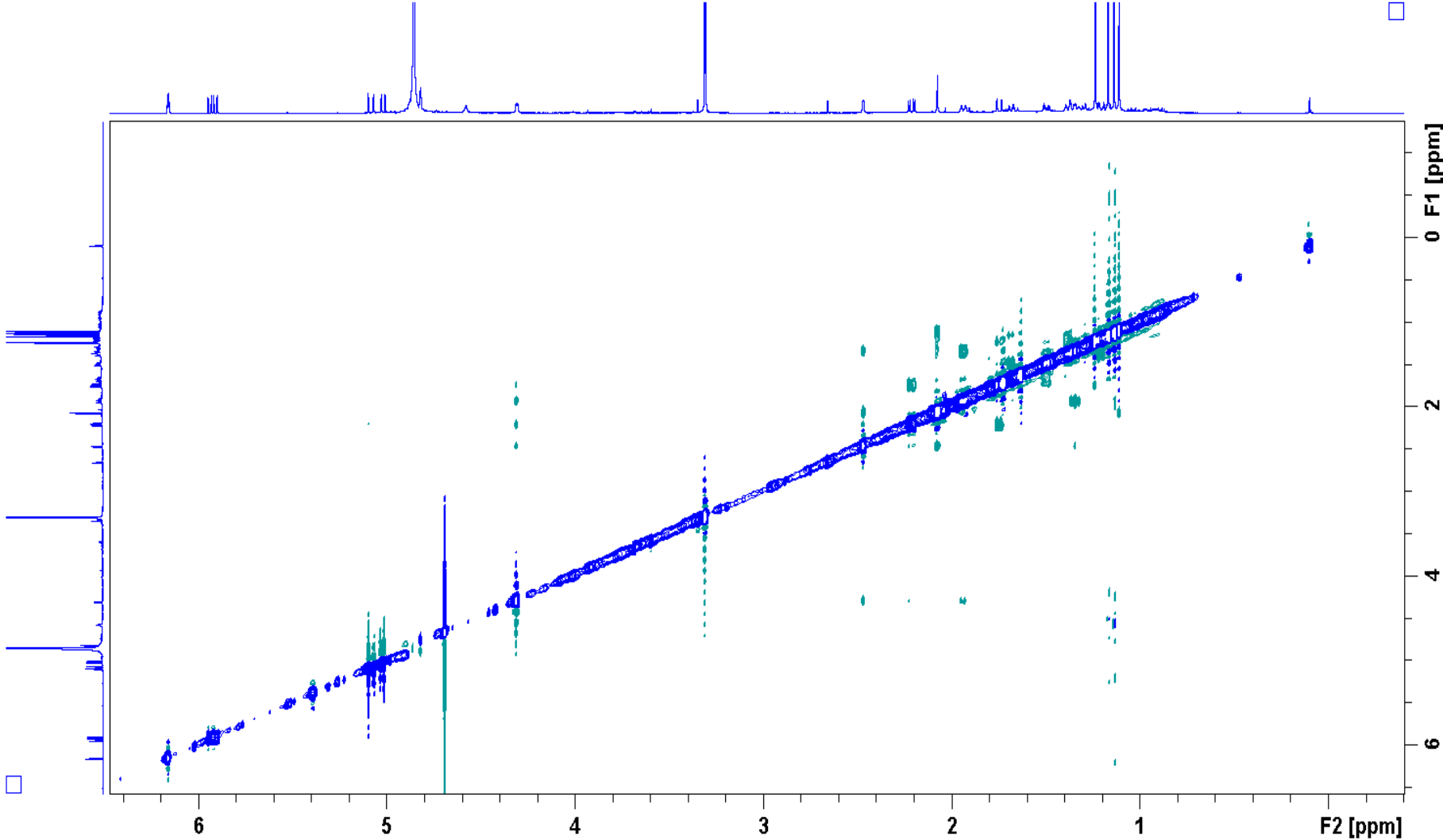
Apêndice 23. Expansão do espectro de RMN de COSY (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) do composto M16As51F1.



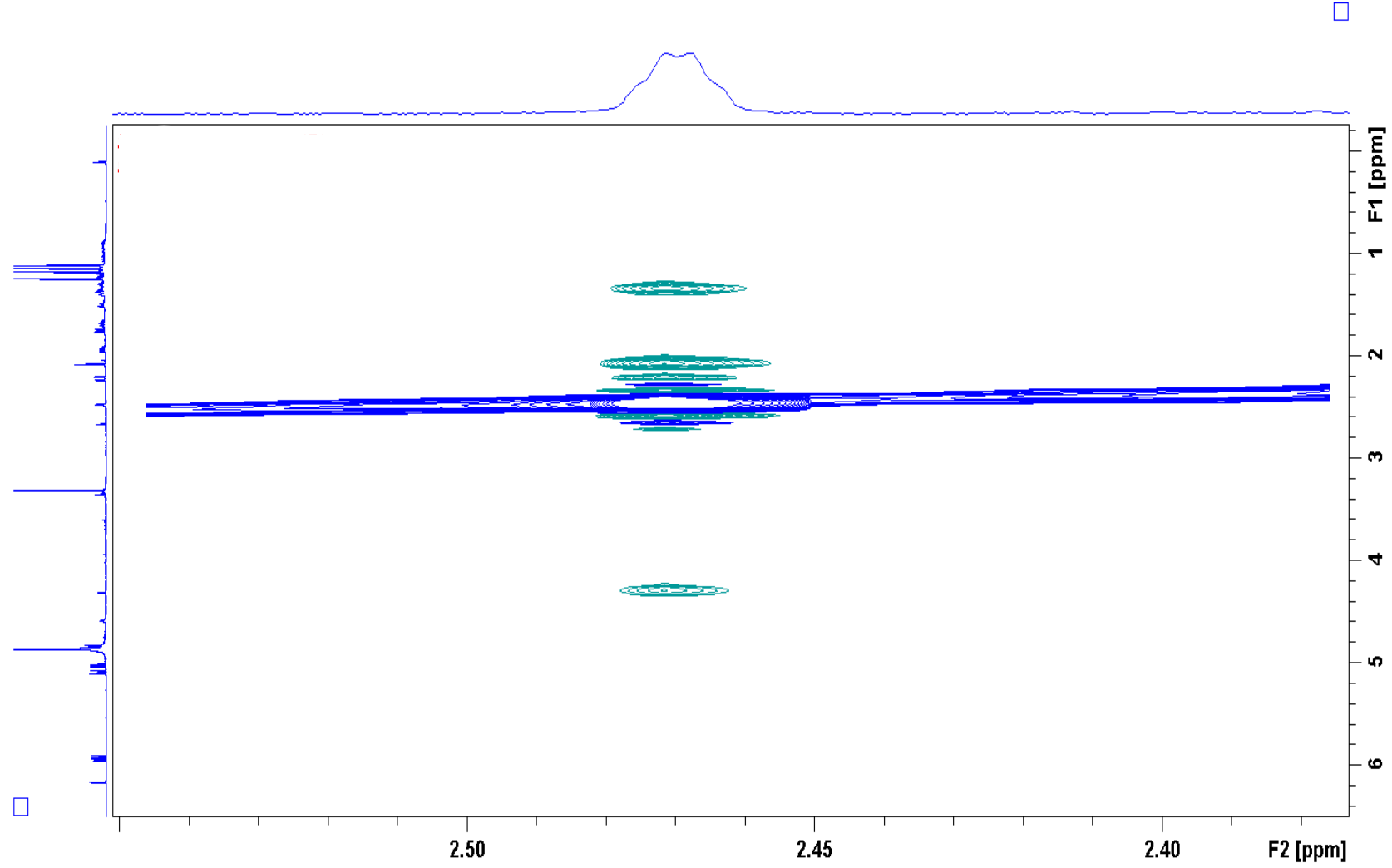
Apêndice 24. Espectro de RMN de TOCSY (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) do composto M16As51F1. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (A), irradiação em δ<sub>H</sub> 1,94 (B) e irradiação em δ<sub>H</sub> 4,31 (C).



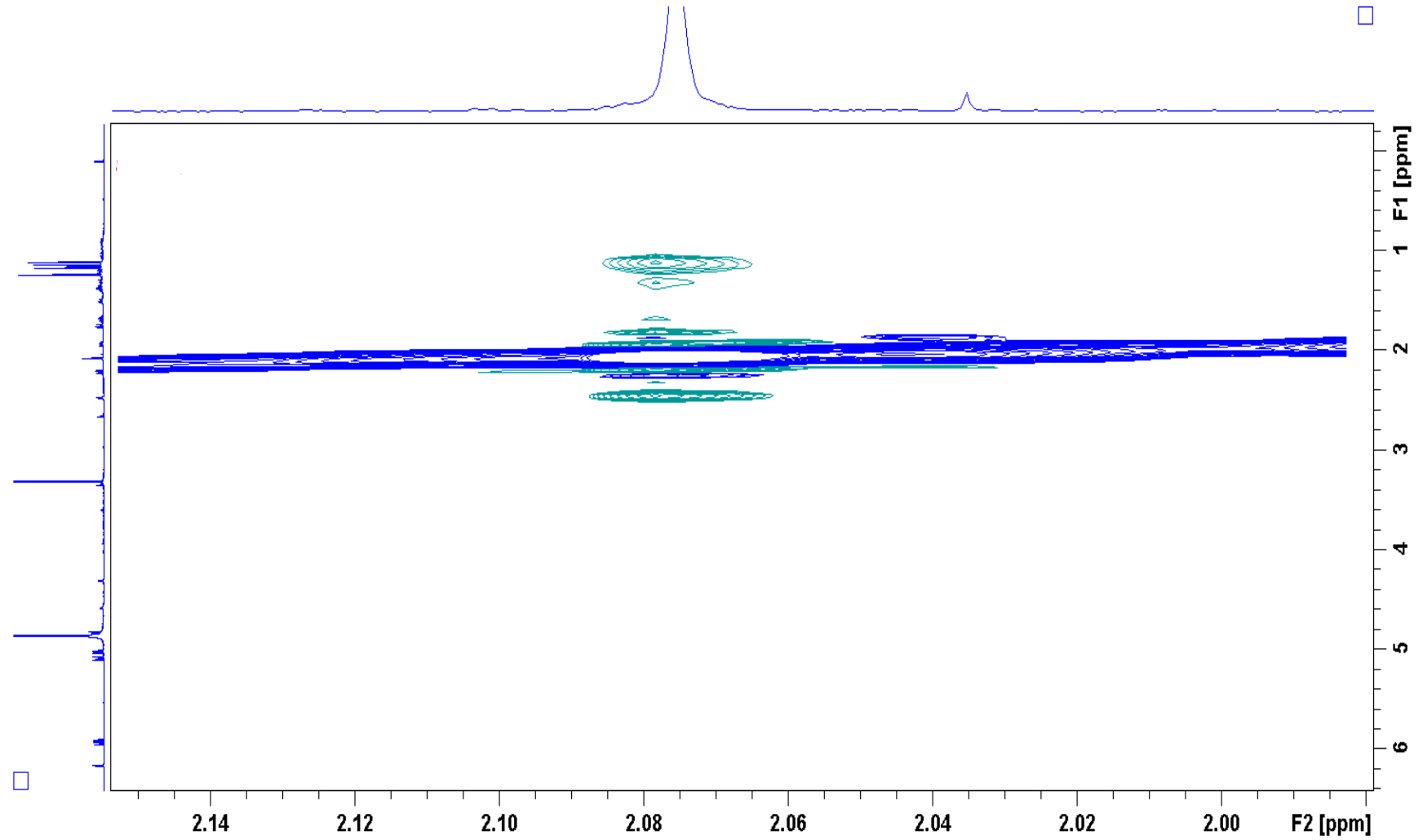
Apêndice 25. Espectro de RMN de NOESY (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) do composto M16As51F1.



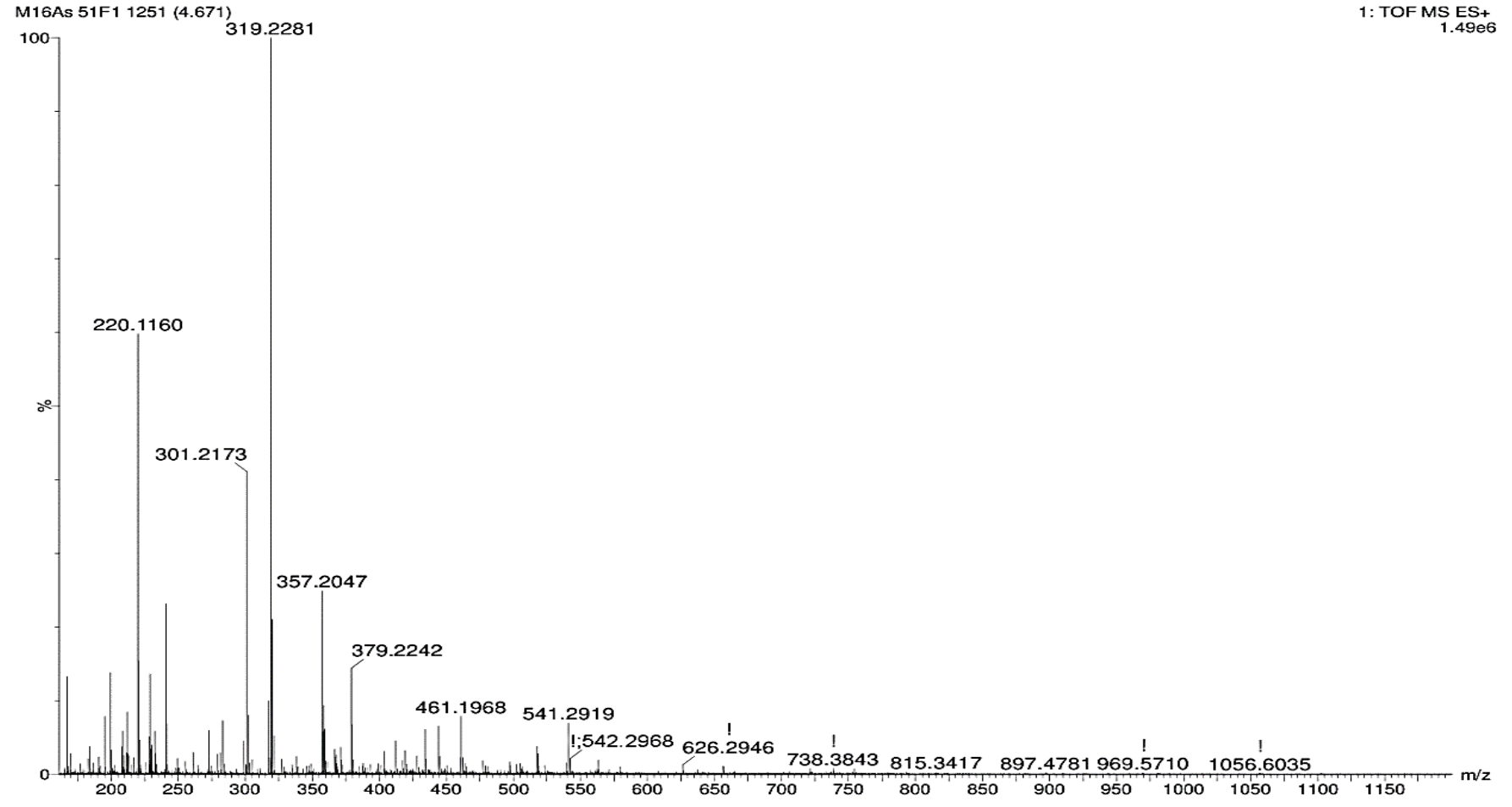
Apêndice 26. Expansão do espectro de RMN de NOESY (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) do composto M16As51F1.



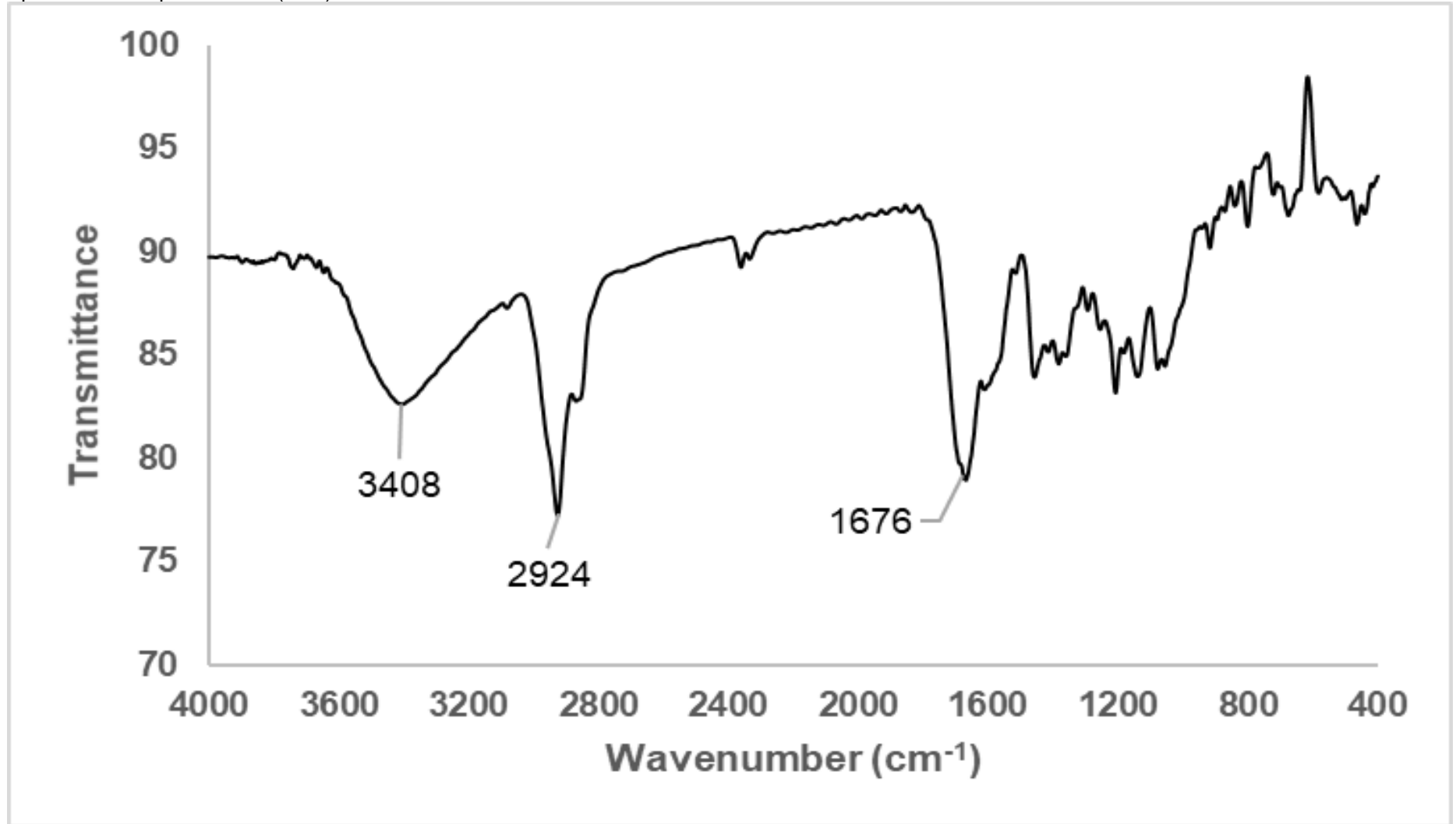
Apêndice 27. Expansão do espectro de RMN de NOESY (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) do composto M16As51F1.



Apêndice 28. Espectro de HRESIMS da amostra M16As51F1.

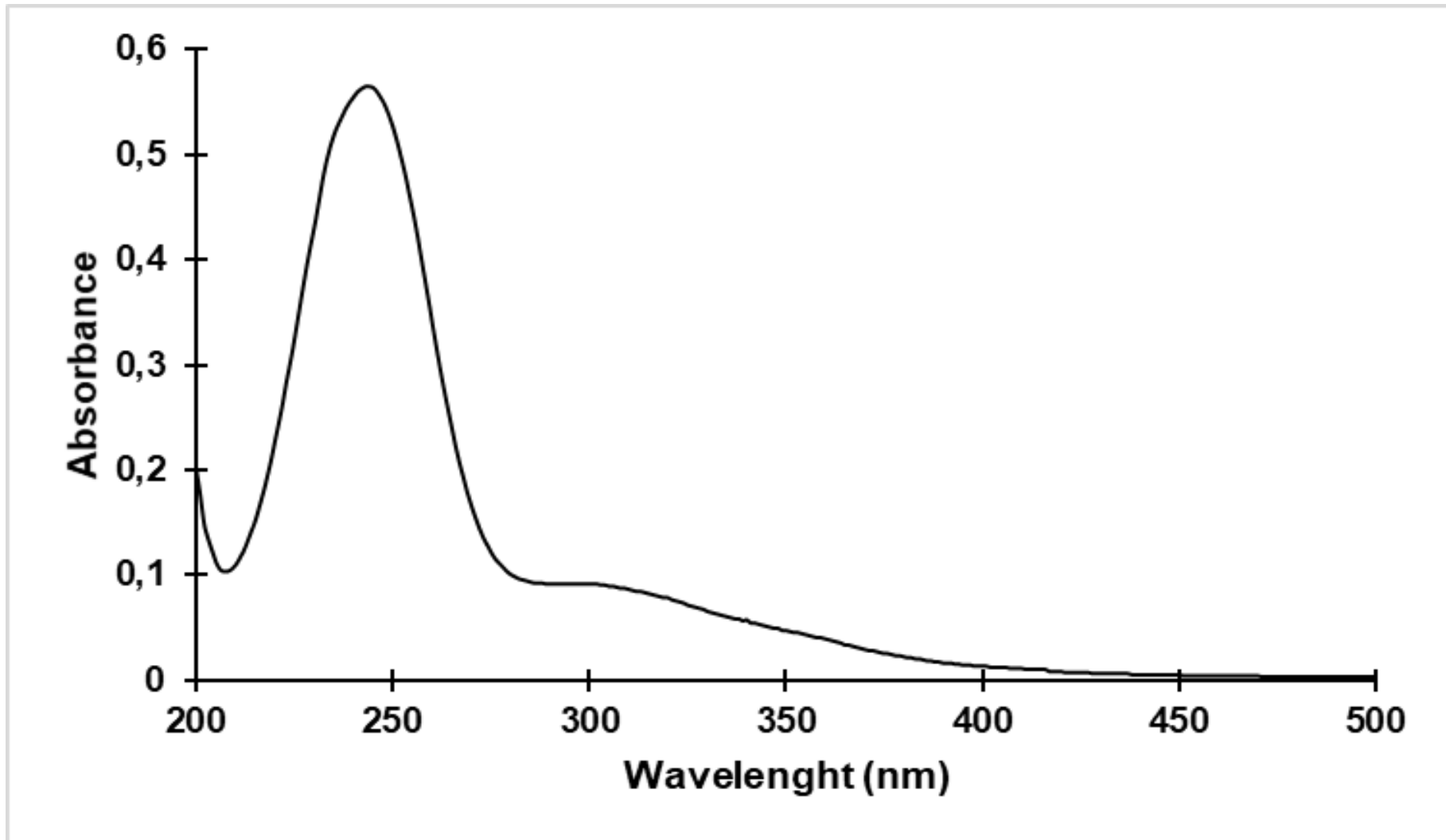


Apêndice 29. Espectro de IV (ATR) de M16As51F1.

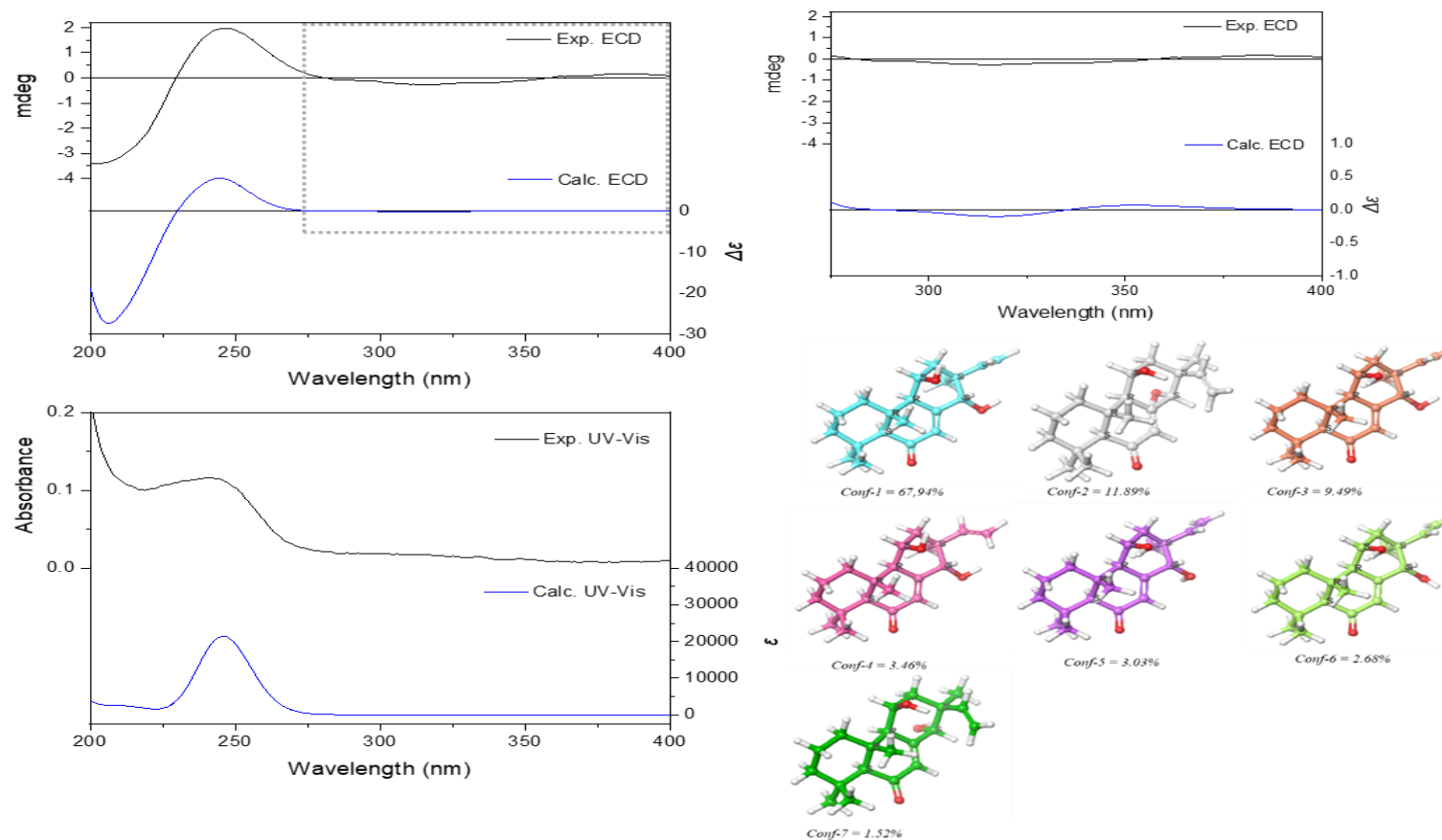




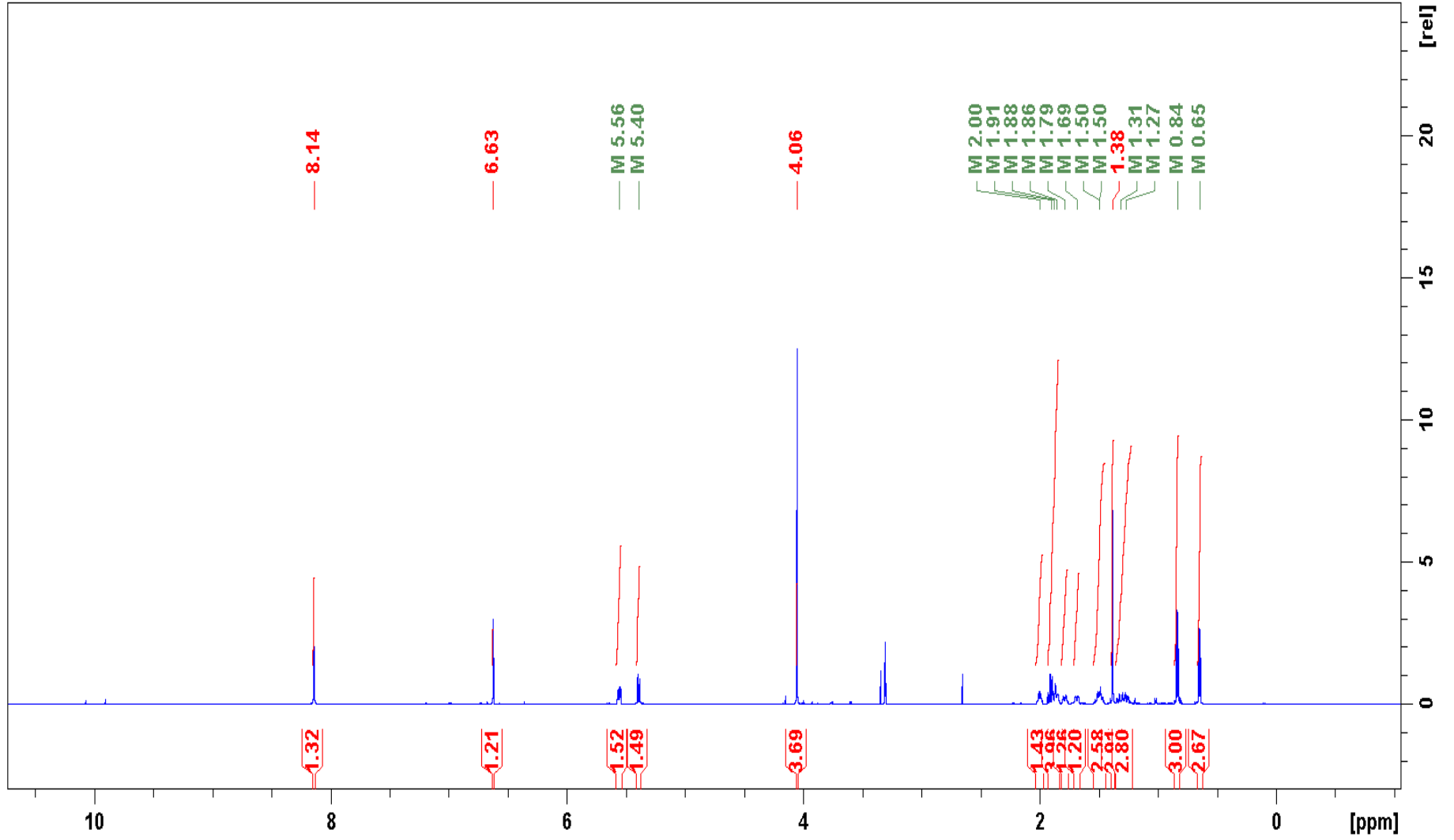
Apêndice 30. Espectro de absorção na região do UV (60 µg/mL; MeOH) de M16As51F1.



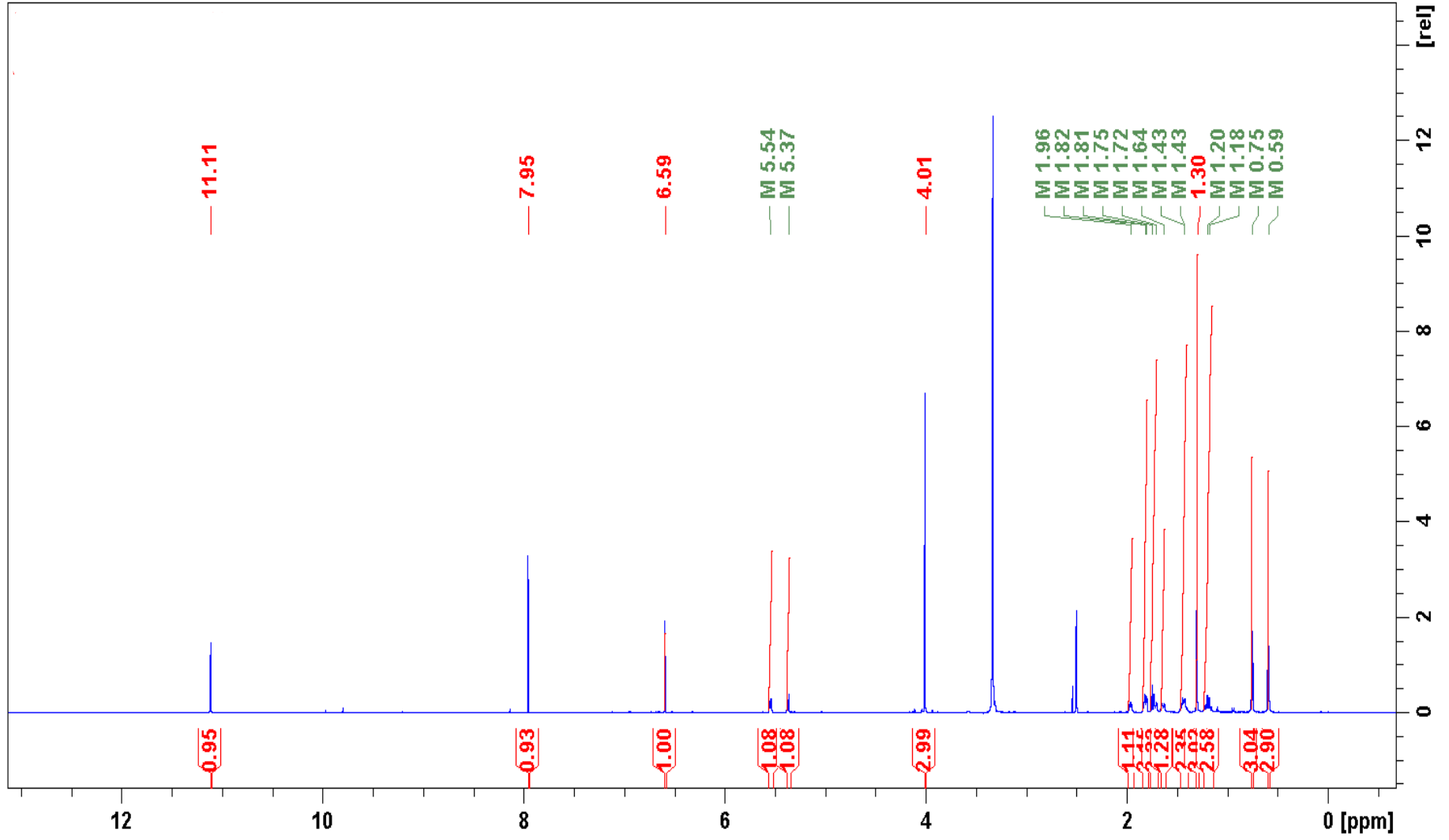
Apêndice 31. **(Esquerda)** Comparação dos espectros de ECD e UV observados de (+)-M16As51F1 (120 µg/mL; MeOH) (traço preto) com os espectros de ECD e UV calculados em [PCM(MeOH)-CAM-B3LYP/TZVP//PCM(MeOH)- $\omega$ B97X-D/6-31G+(d,p)] da média de Boltzmann dos conformêros de menor energia identificados para (5*S*, 9*R*, 10*R*, 11*S*, 13*S*, 14*S*) (traço azul). **(Direita acima)** Ampliação do espectros de ECD. **(Direita abaixo)** Estrutura, energia livre de Gibbs relativa e população de Boltzmann (%) dos conformêros de energia mais baixa de (5*S*, 9*R*, 10*R*, 11*S*, 13*S*, 14*S*)-M16As51F1.



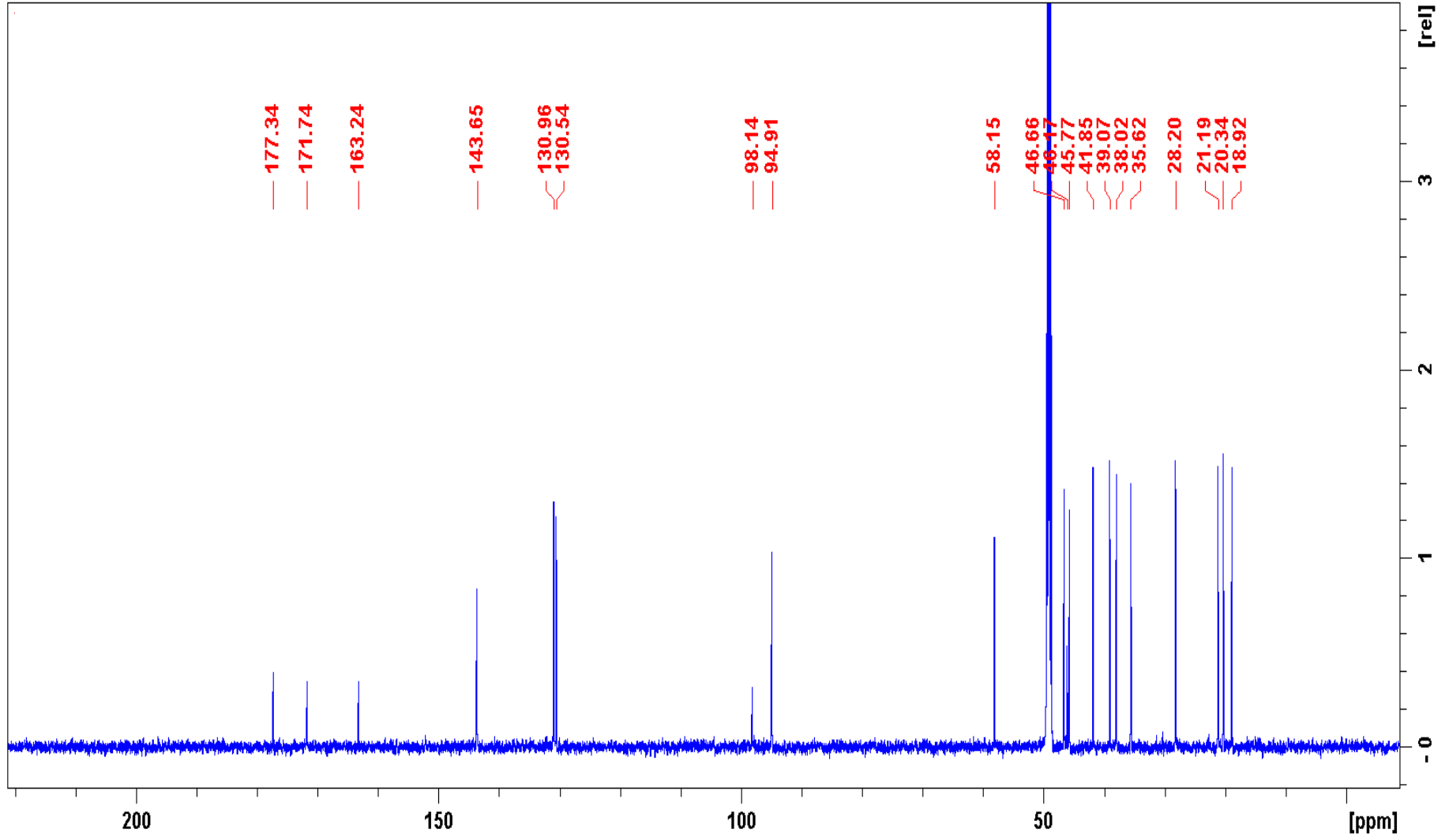
Apêndice 32. Espectro de RMN de 1H (600 MHz, CD3OD) do composto M16As54I.



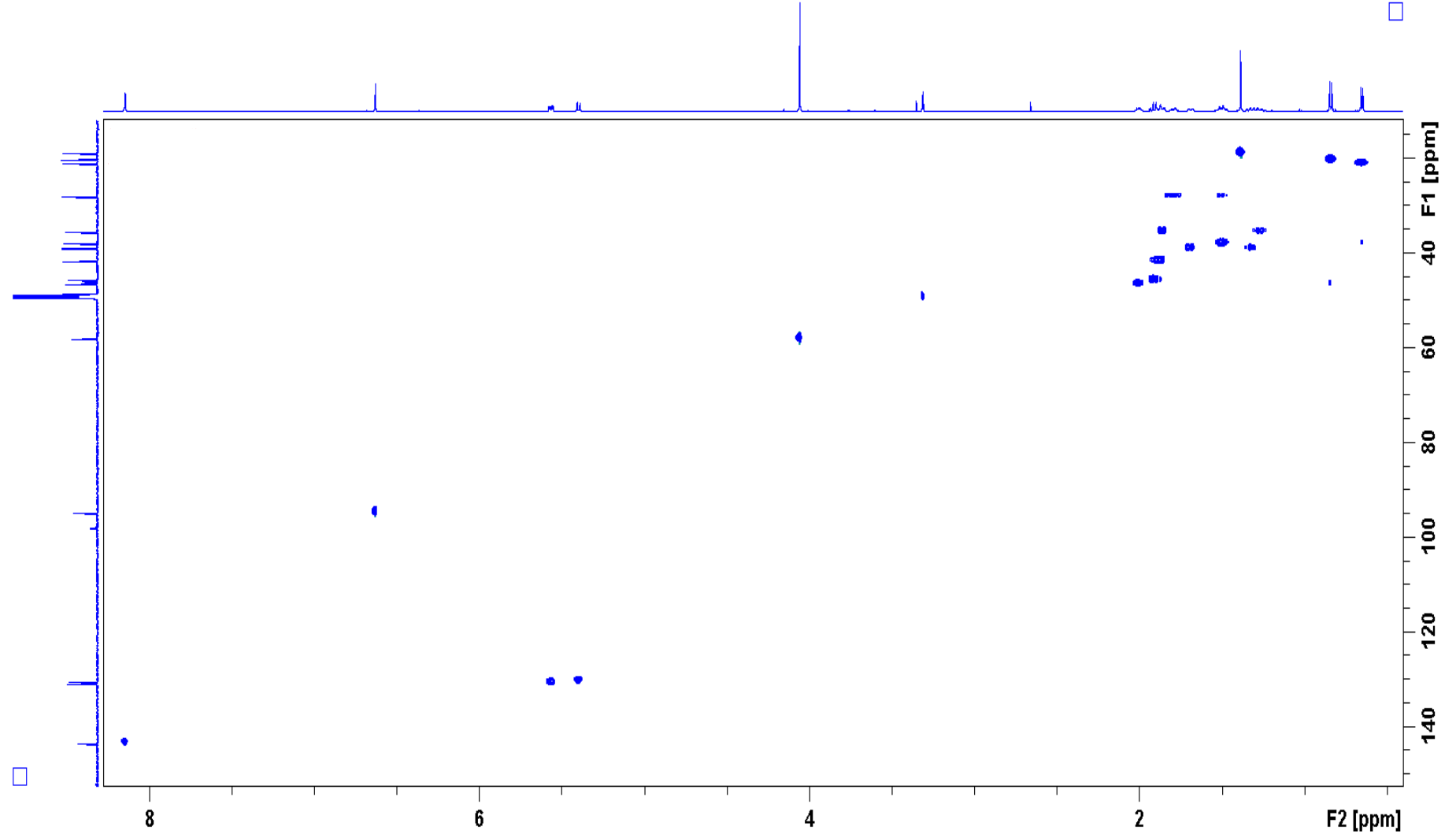
Apêndice 33. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) do composto M16As54I.



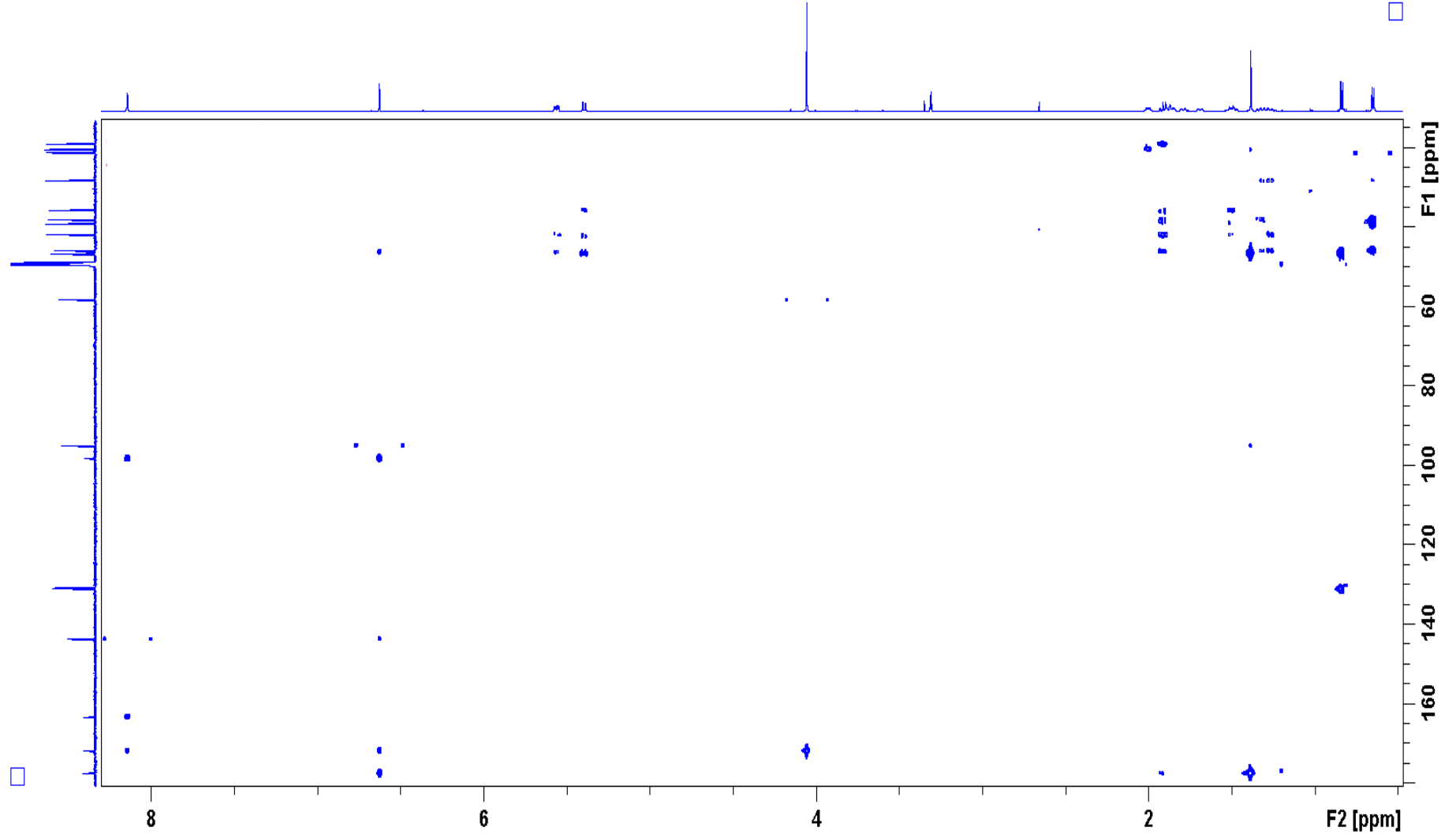
Apêndice 34. Espectro de RMN de <sup>13</sup>C (150 MHz, CD<sub>3</sub>OD) do composto M16As54I.



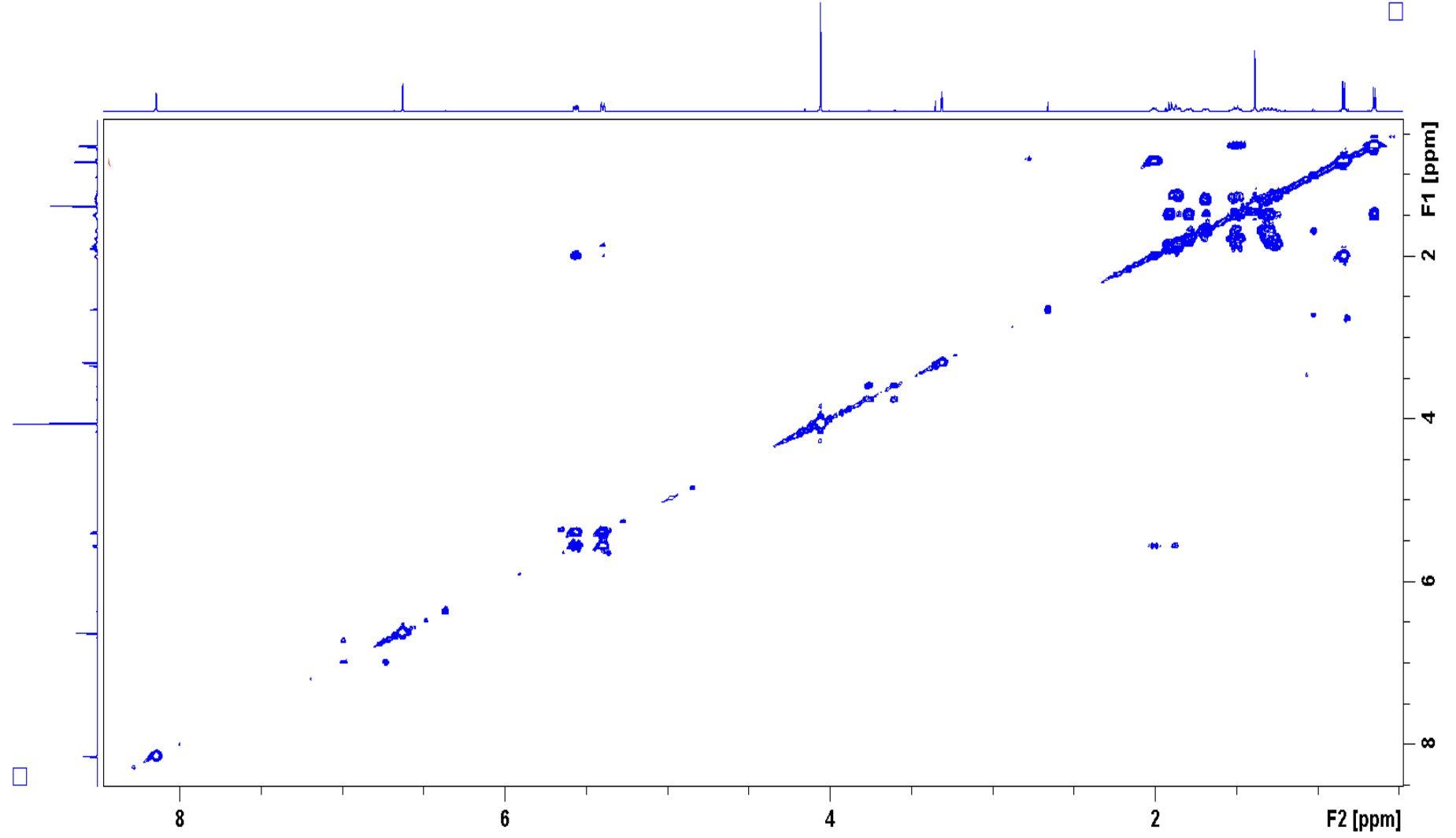
Apêndice 35. Espectro de RMN de HSQC (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) do composto M16As54I.



Apêndice 36. Espectro de RMN de HMBC (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) do composto M16As54I.

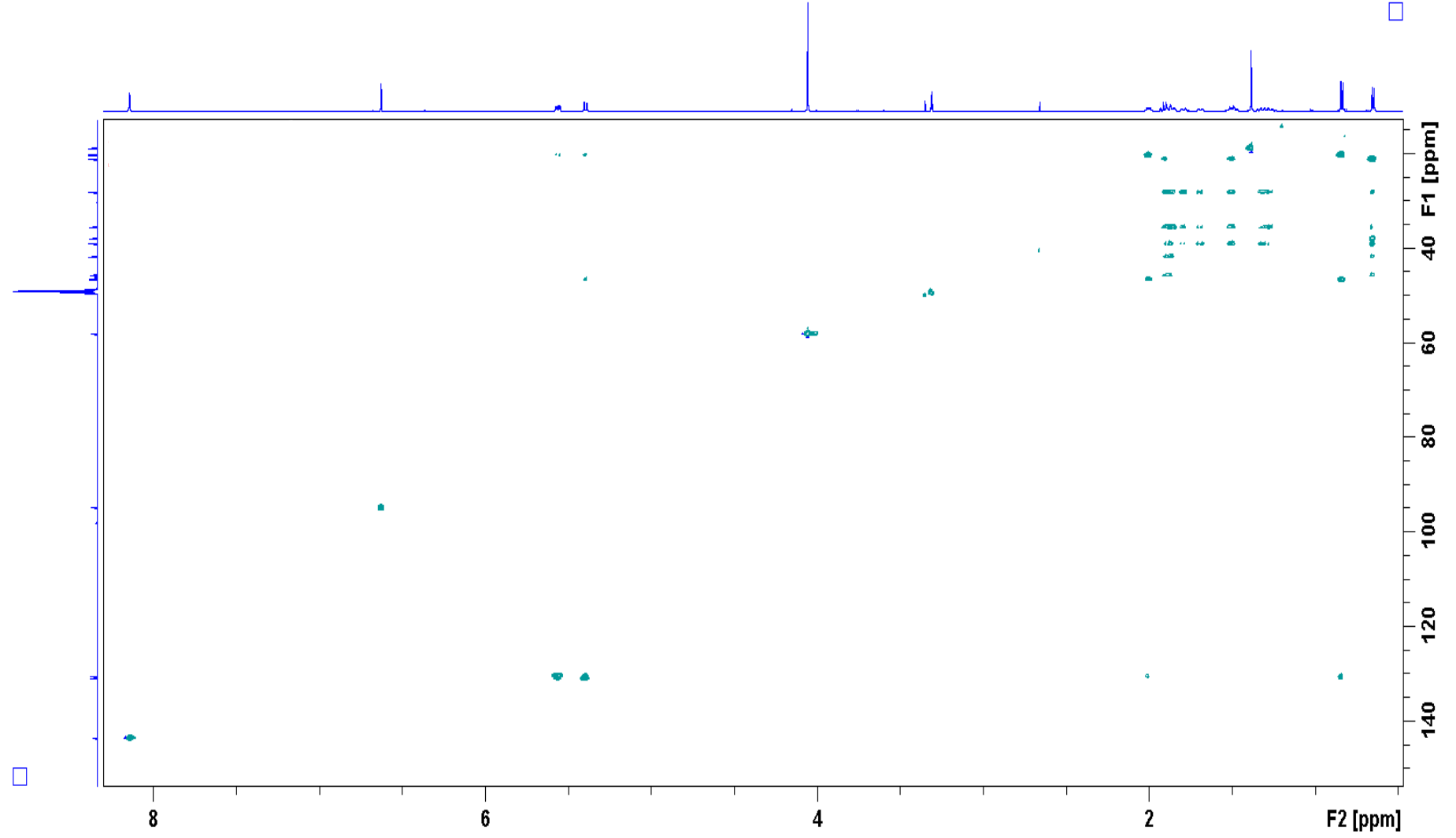


Apêndice 37. Espectro de RMN de COSY (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) do composto M16As54I

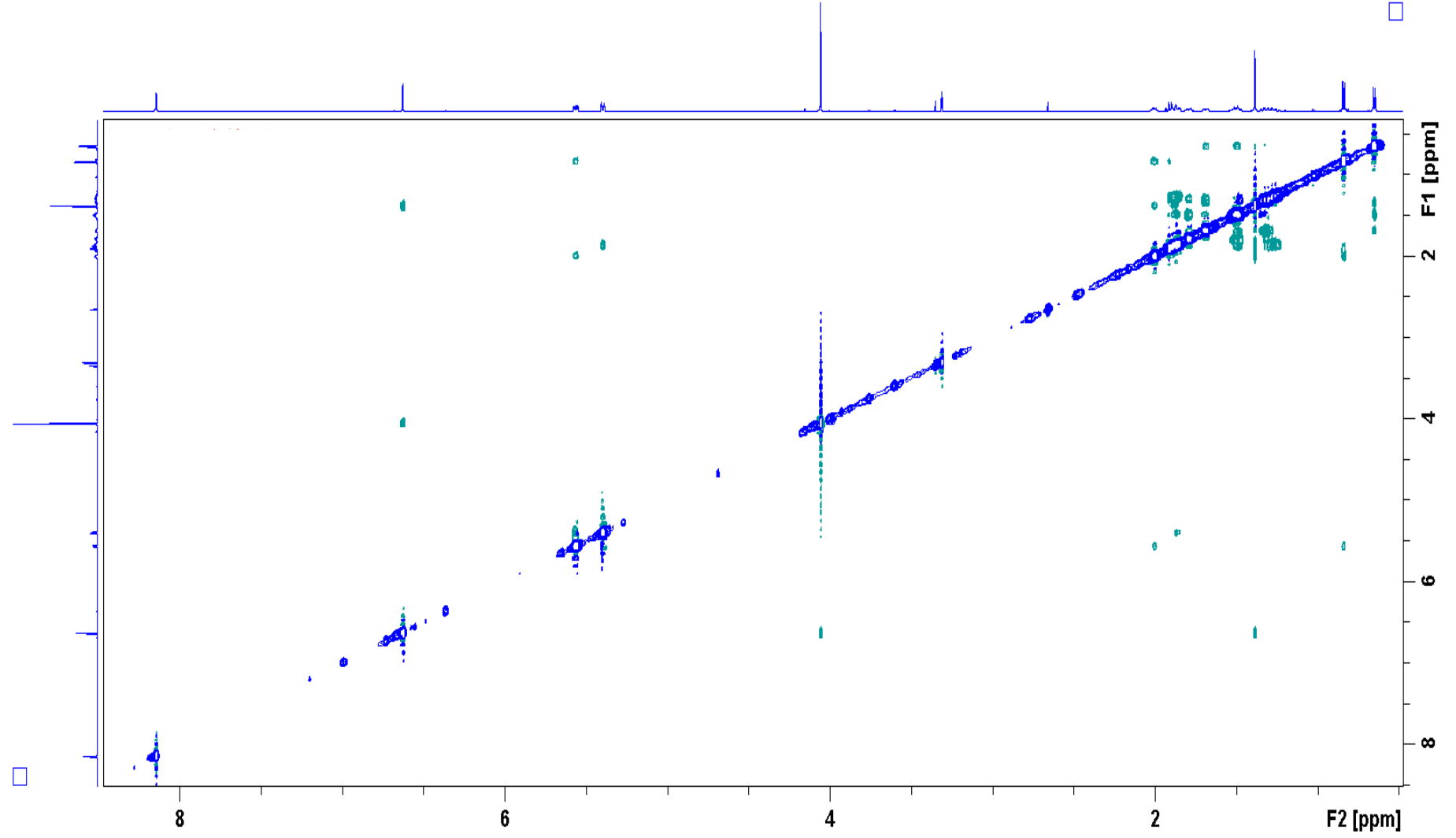




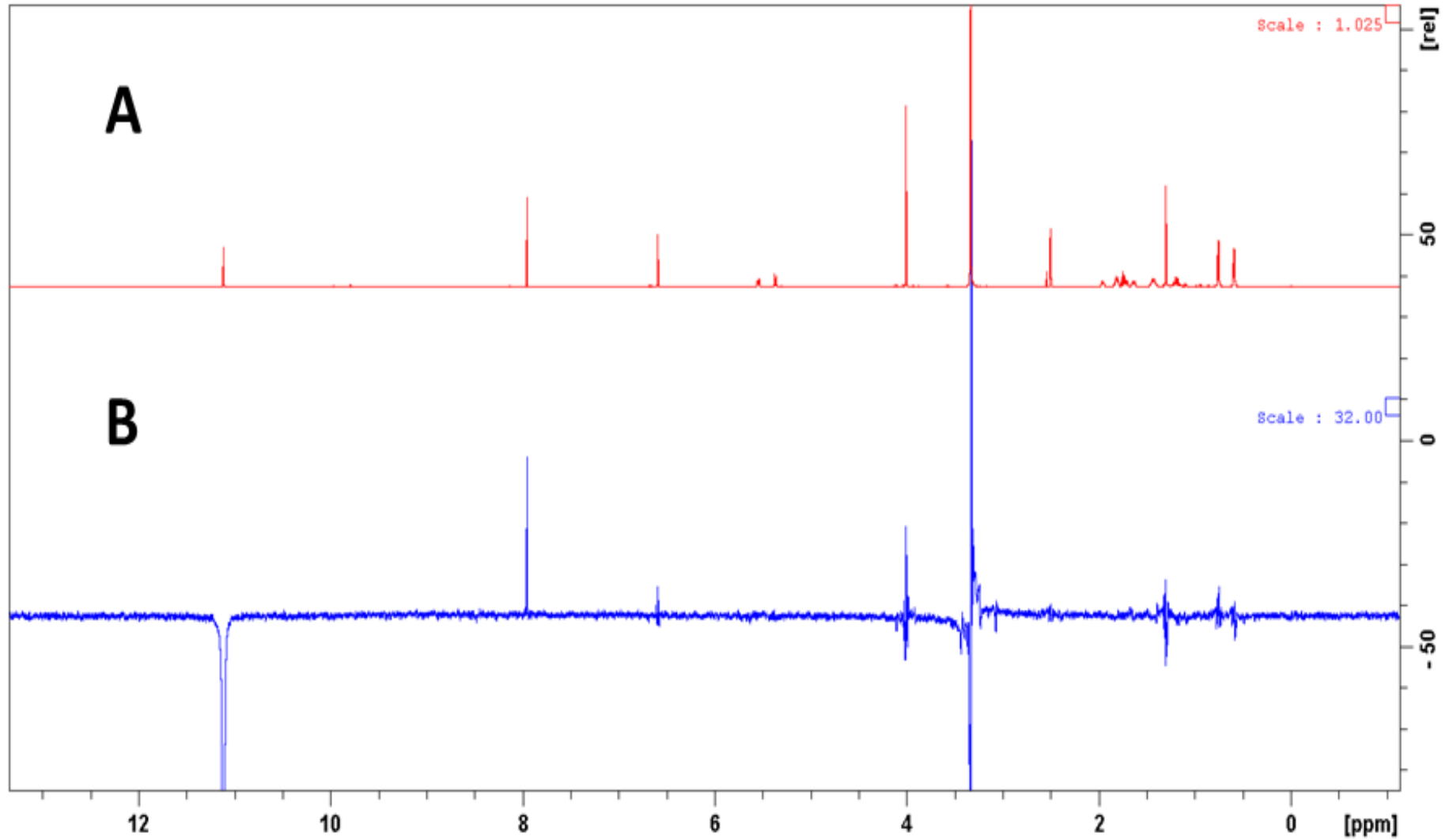
Apêndice 38. Espectro de RMN de HSQC-TOCSY (600 MHz, CD3OD) do composto M16As54I



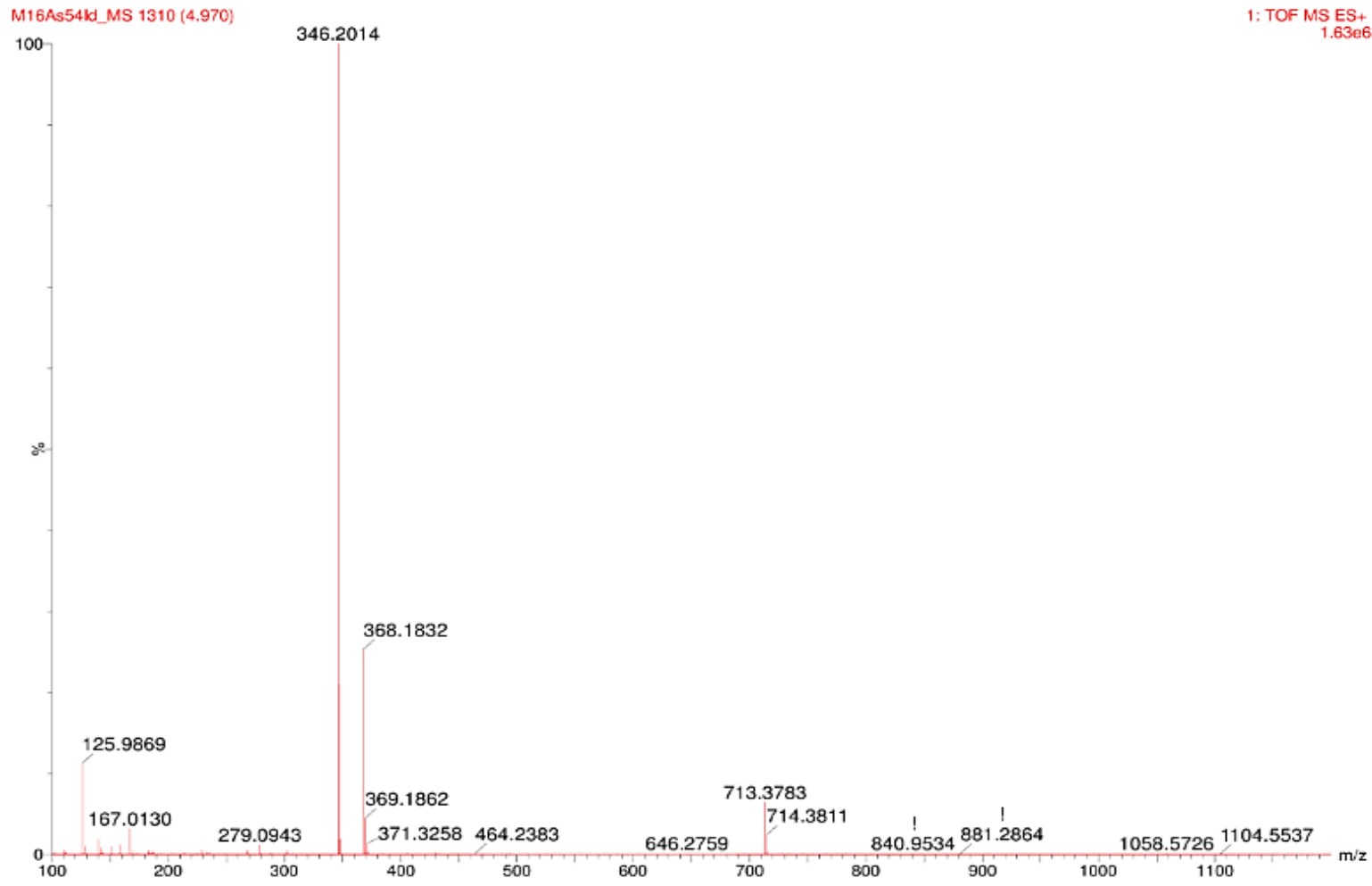
Apêndice 39. Espectro de 2D-NOESY (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) do composto M16As54I.



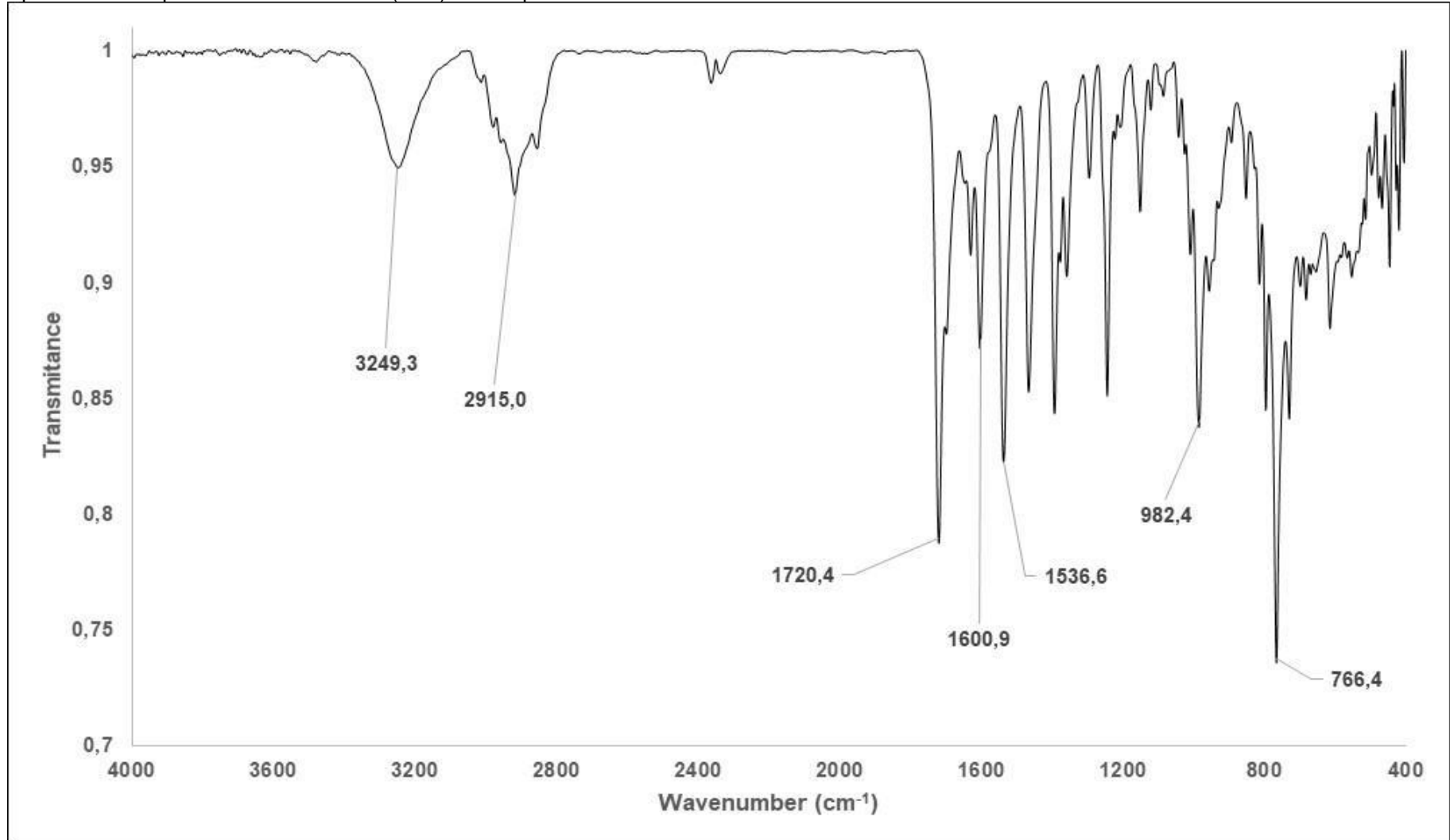
Apêndice 40. Espectro de 1D-NOESY (600 MHz, DMSO- $d_6$ ) do composto M16As54I. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (A) e irradiação em  $\delta_{\text{H}}$  11,11 (B).



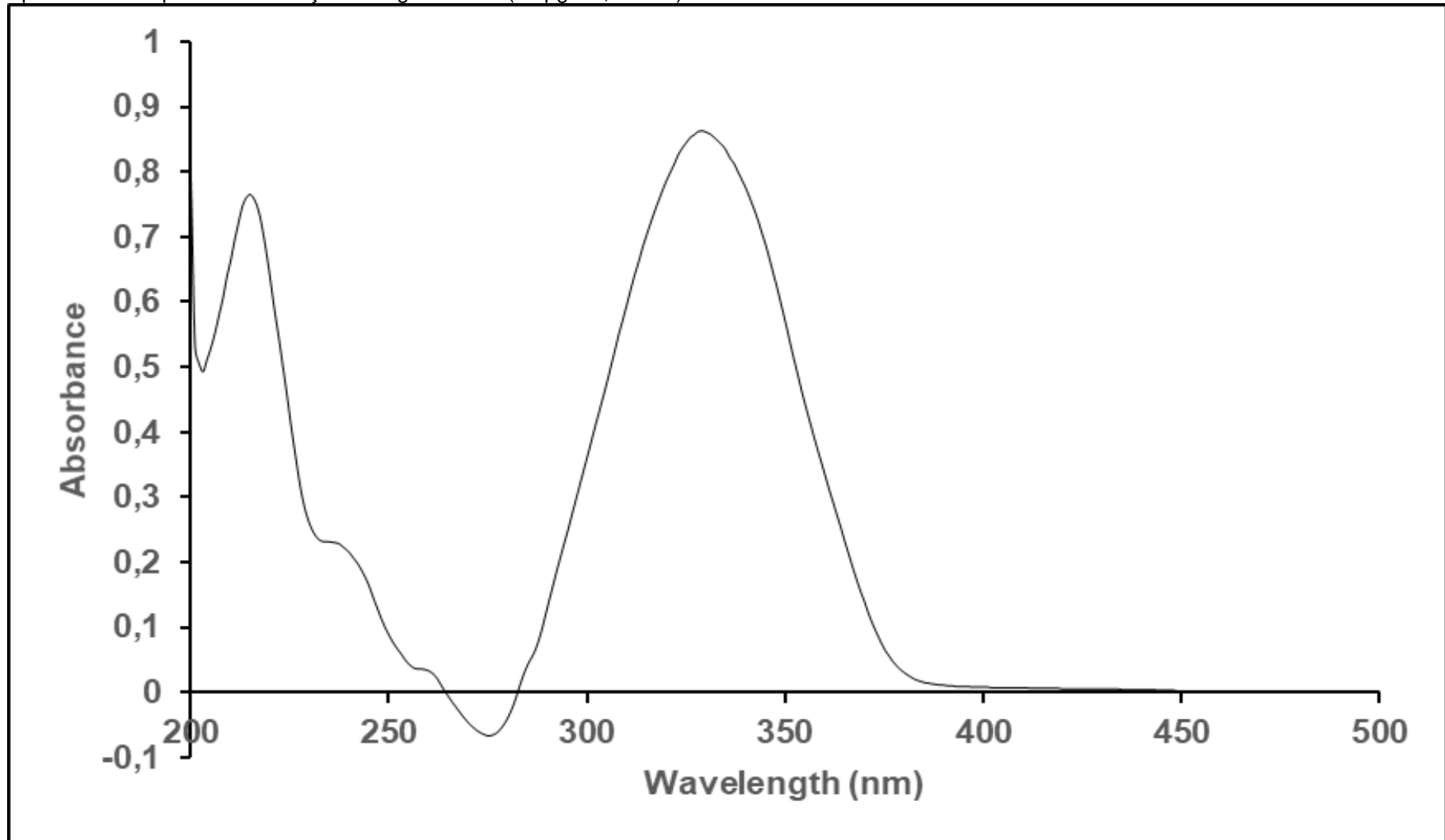
Apêndice 41. Espectro de HRESIMS da amostra M16As54I.



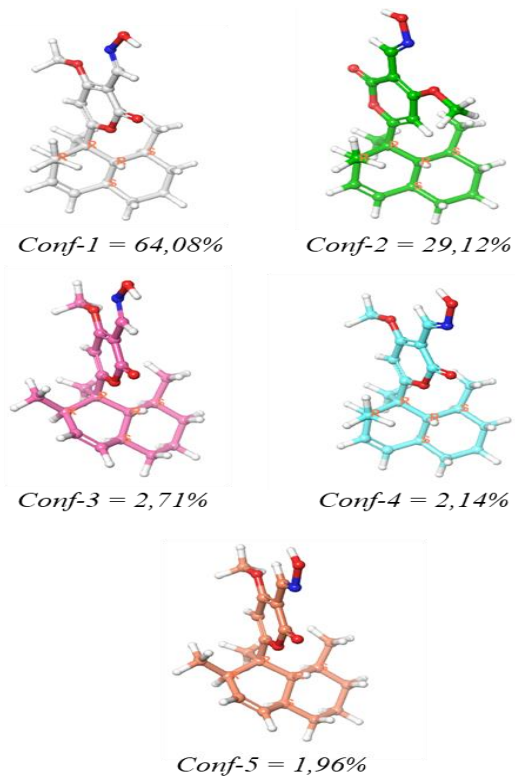
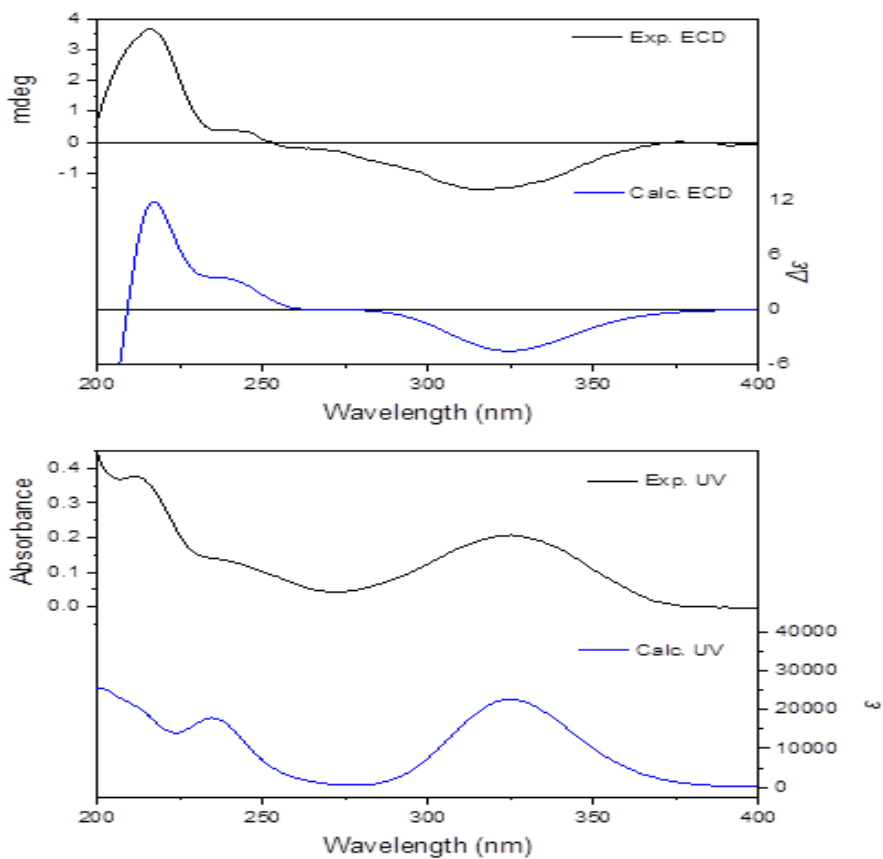
Apêndice 42 .Espectro de infravermelho (ATR) do composto M16As54I.

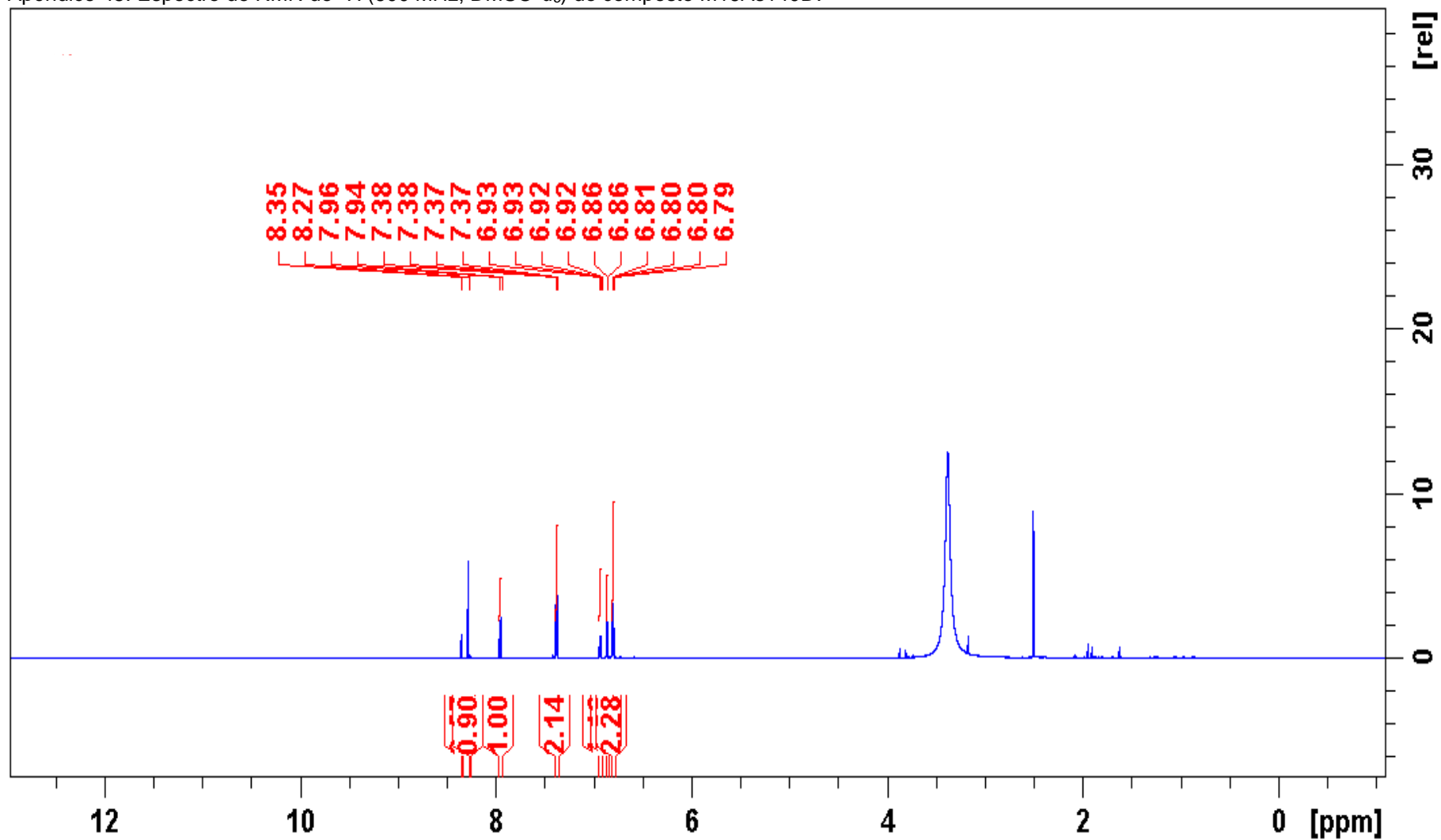


Apêndice 43. Espectro de absorção na região do UV (15 µg/mL; MeOH) da amostra M16As54I.

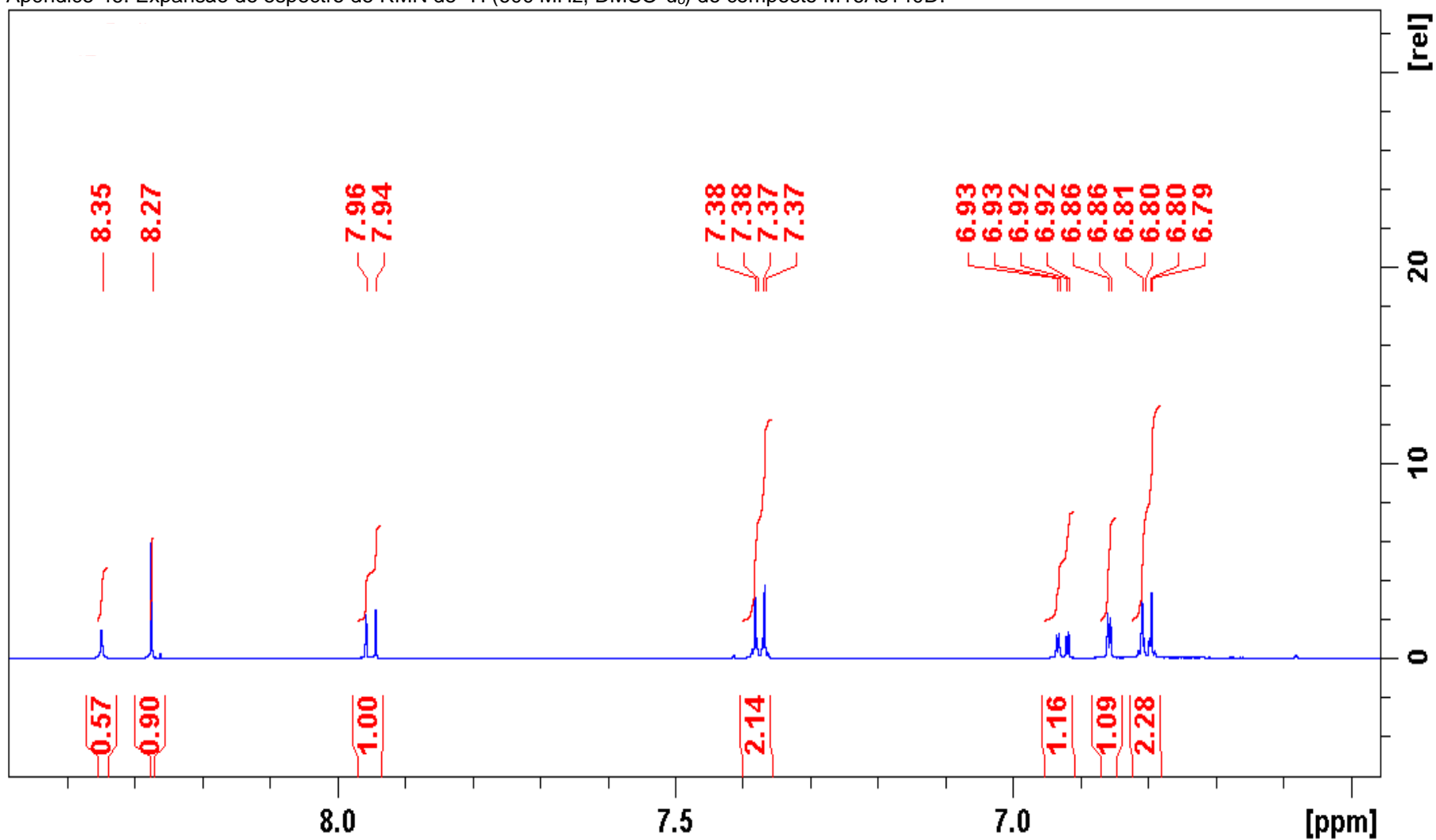


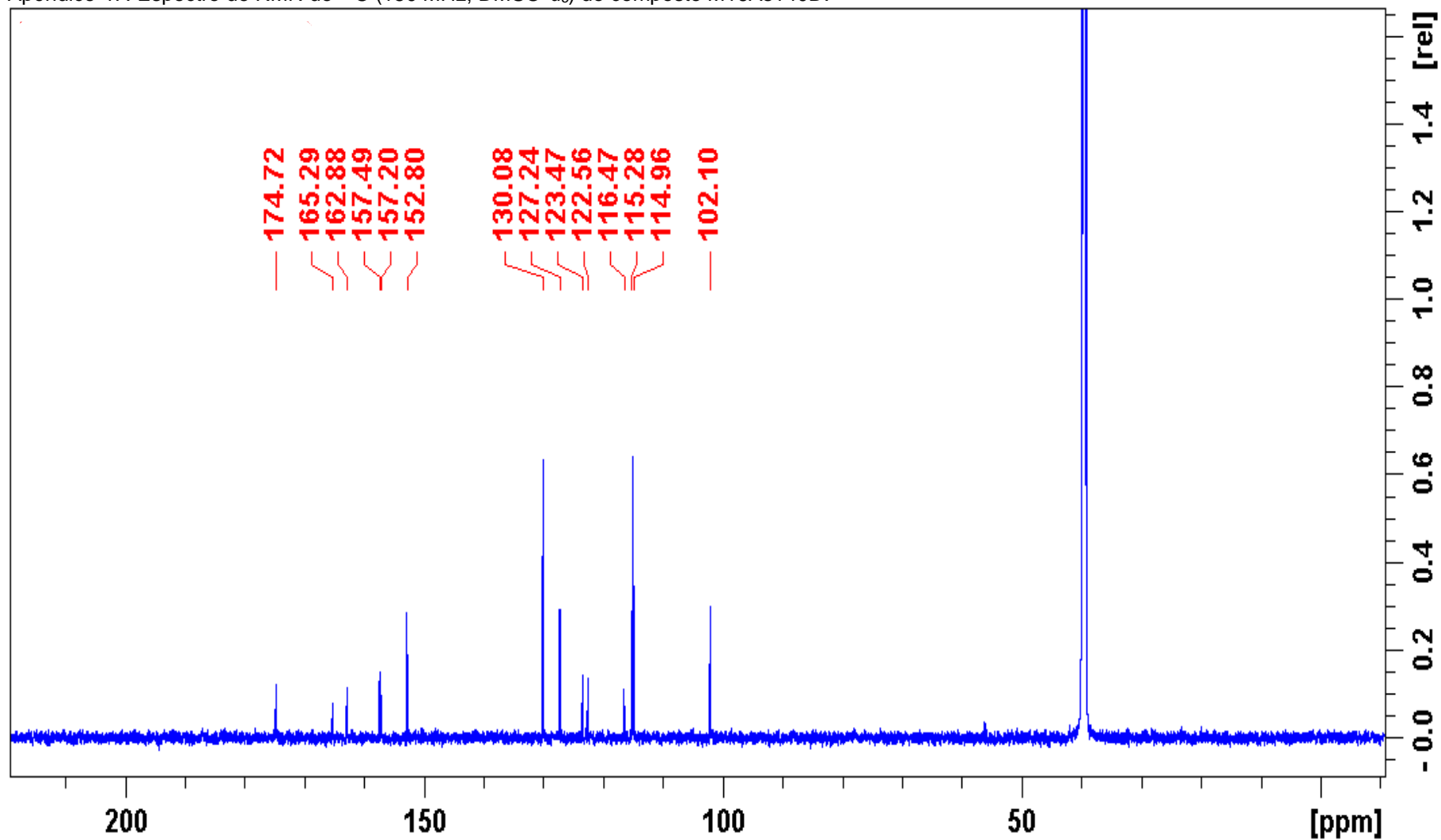
Apêndice 44. **(Esquerda)** Comparação dos espectros de ECD observados de (+)-**M16As54ld** (50 µg/mL; MeOH) (traço preto) com o espectro de ECD calculado em [PCM(MeOH)-CAM-B3LYP/TZVP//PCM(MeOH)- $\omega$ B97X-D/6-31G+(d,p)] da média de Boltzmann dos conformêros de menor energia **(Direita)** Estruturas, energias livres Gibbs relativas e população de Boltzmann (%) dos conformêros de energia mais baixa de (*E*)-(1*R*, 2*R*, 5*S*, 9*S*, 10*R*)-**M16As54ld**.

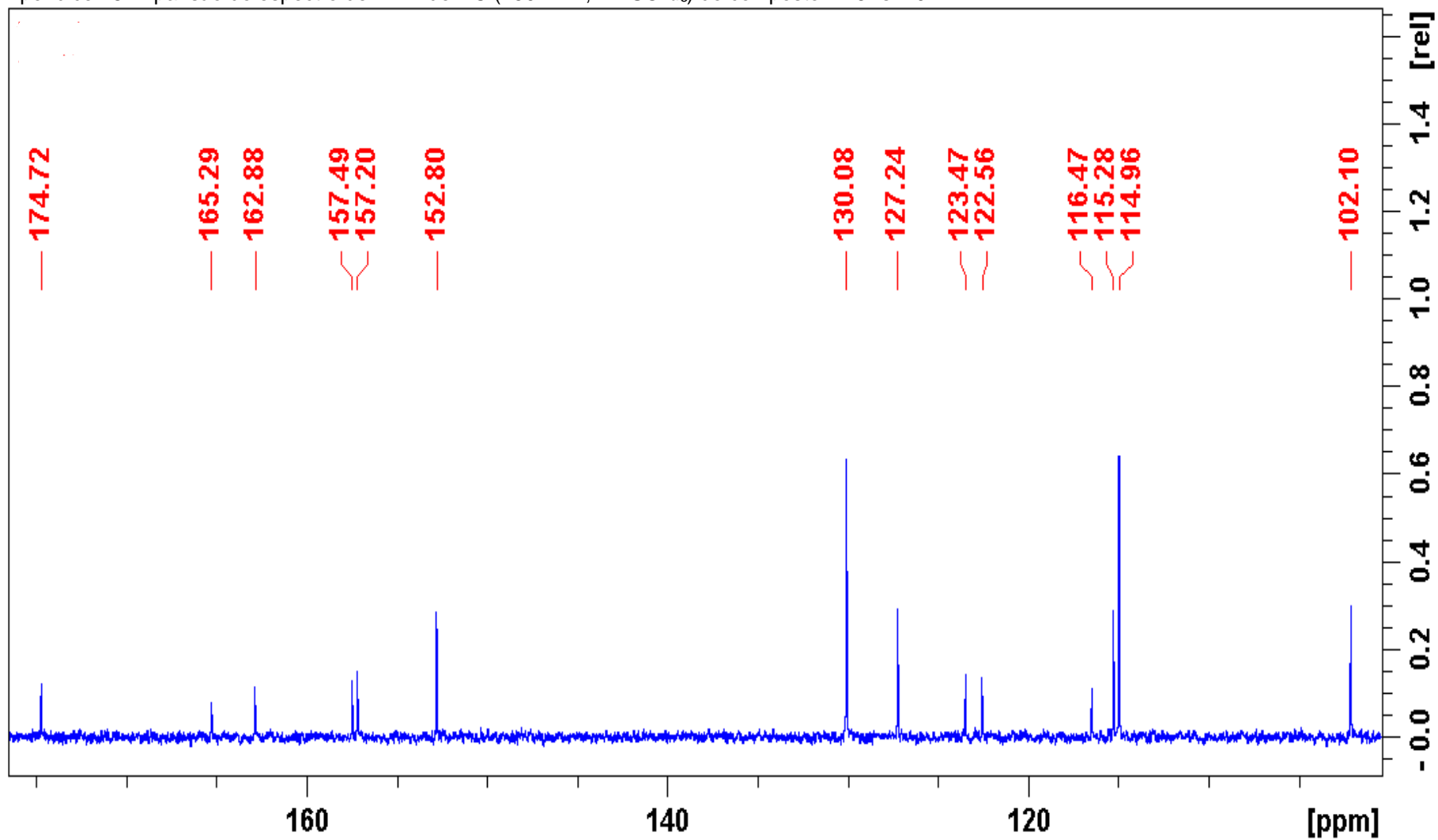


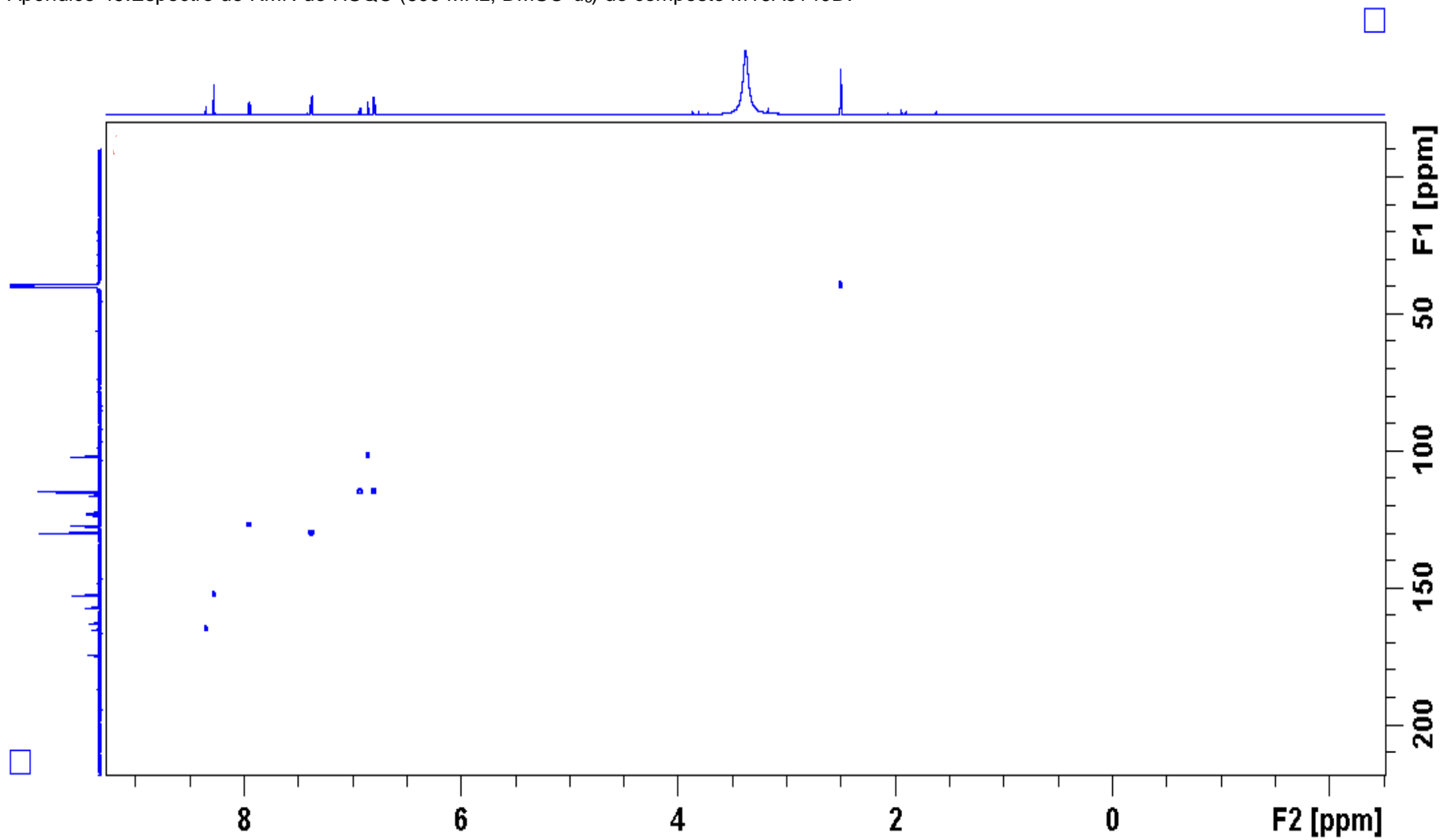
Apêndice 45. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) do composto M16As140D.



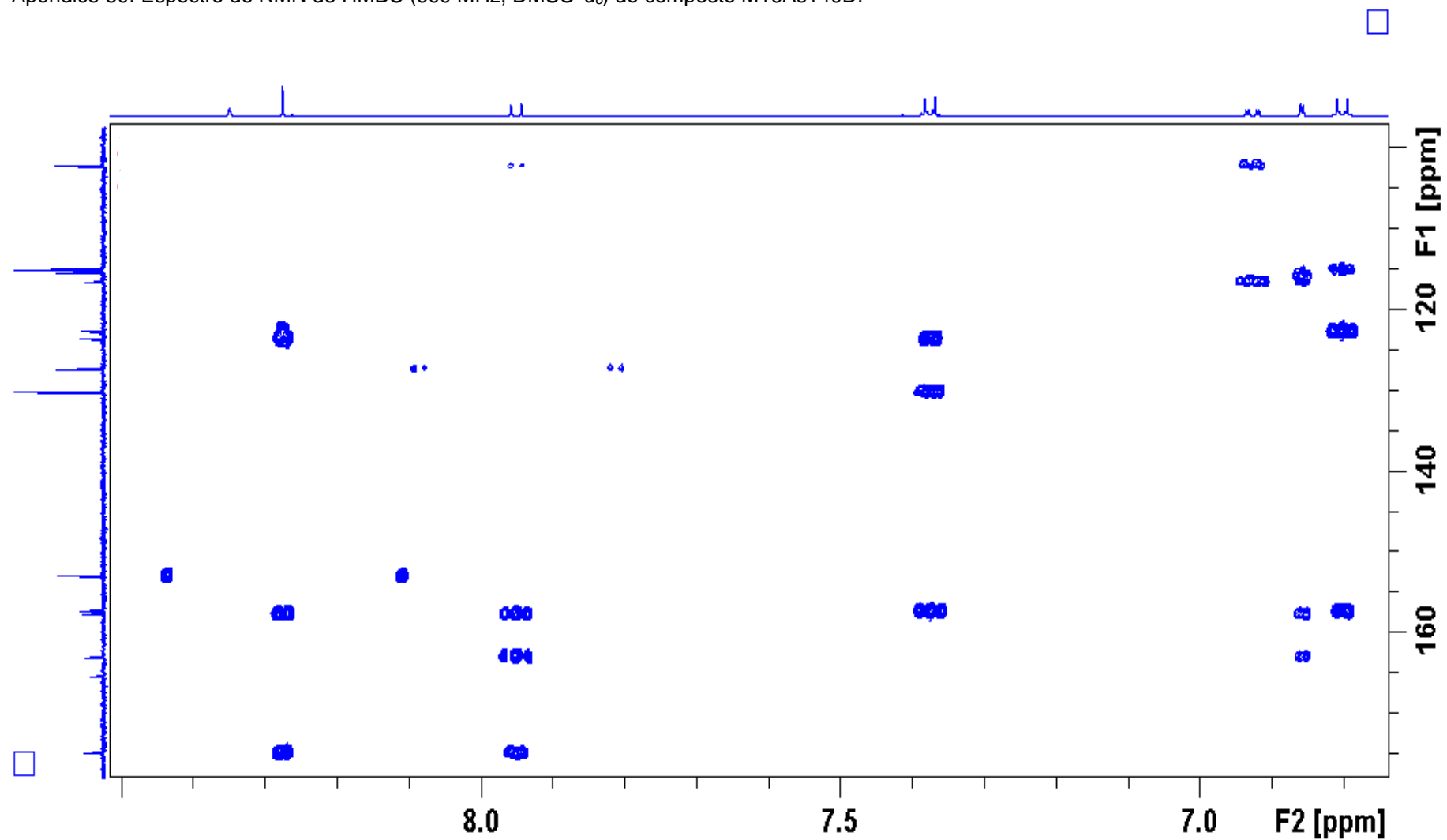
Apêndice 46. Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) do composto M16As140D.

Apêndice 47. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (150 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) do composto M16As140D.

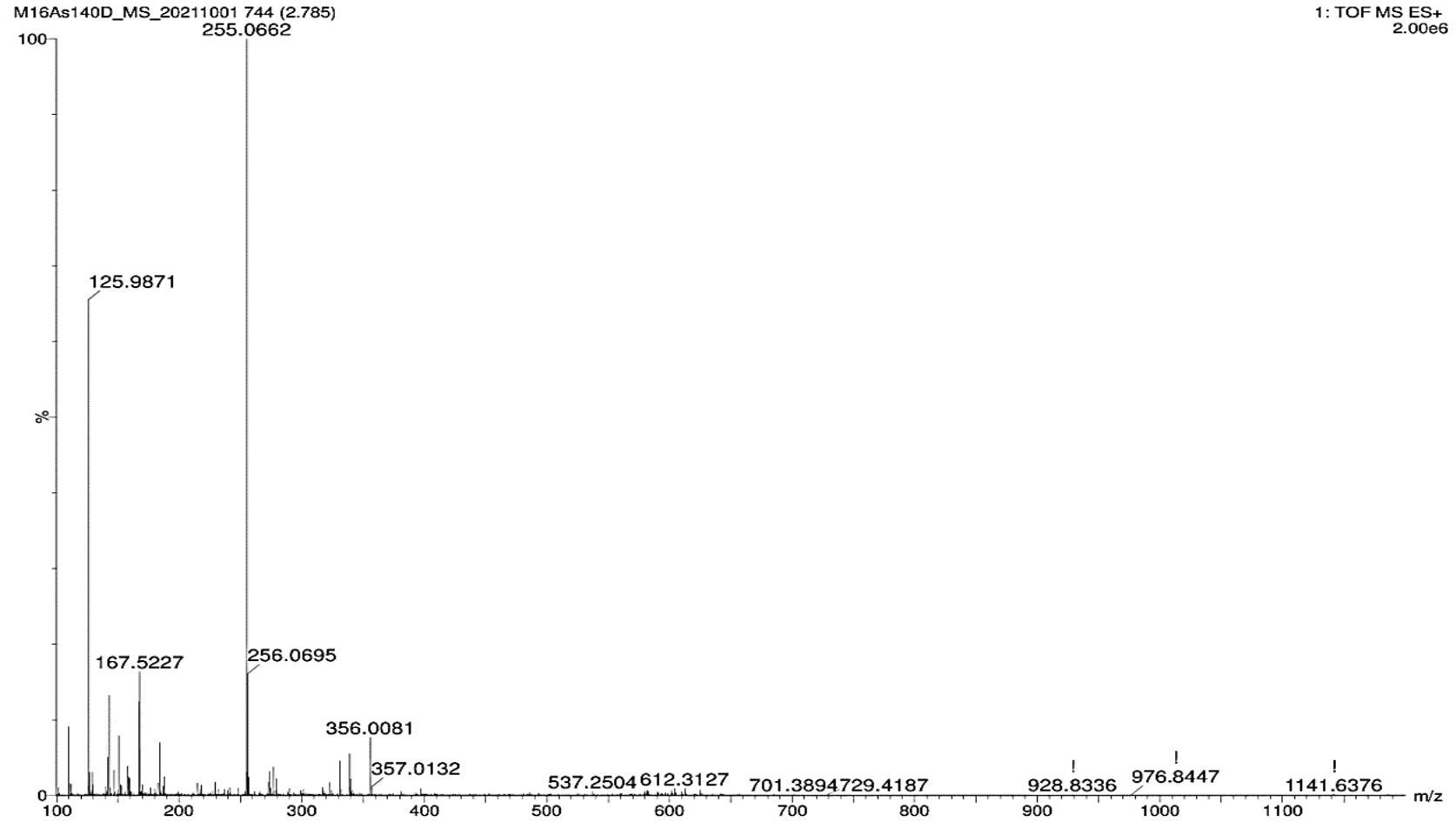
Apêndice 48. Expansão do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (150 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) do composto M16As140D.

Apêndice 49. Espectro de RMN de HSQC (600 MHz, DMSO- $d_6$ ) do composto M16As140D.

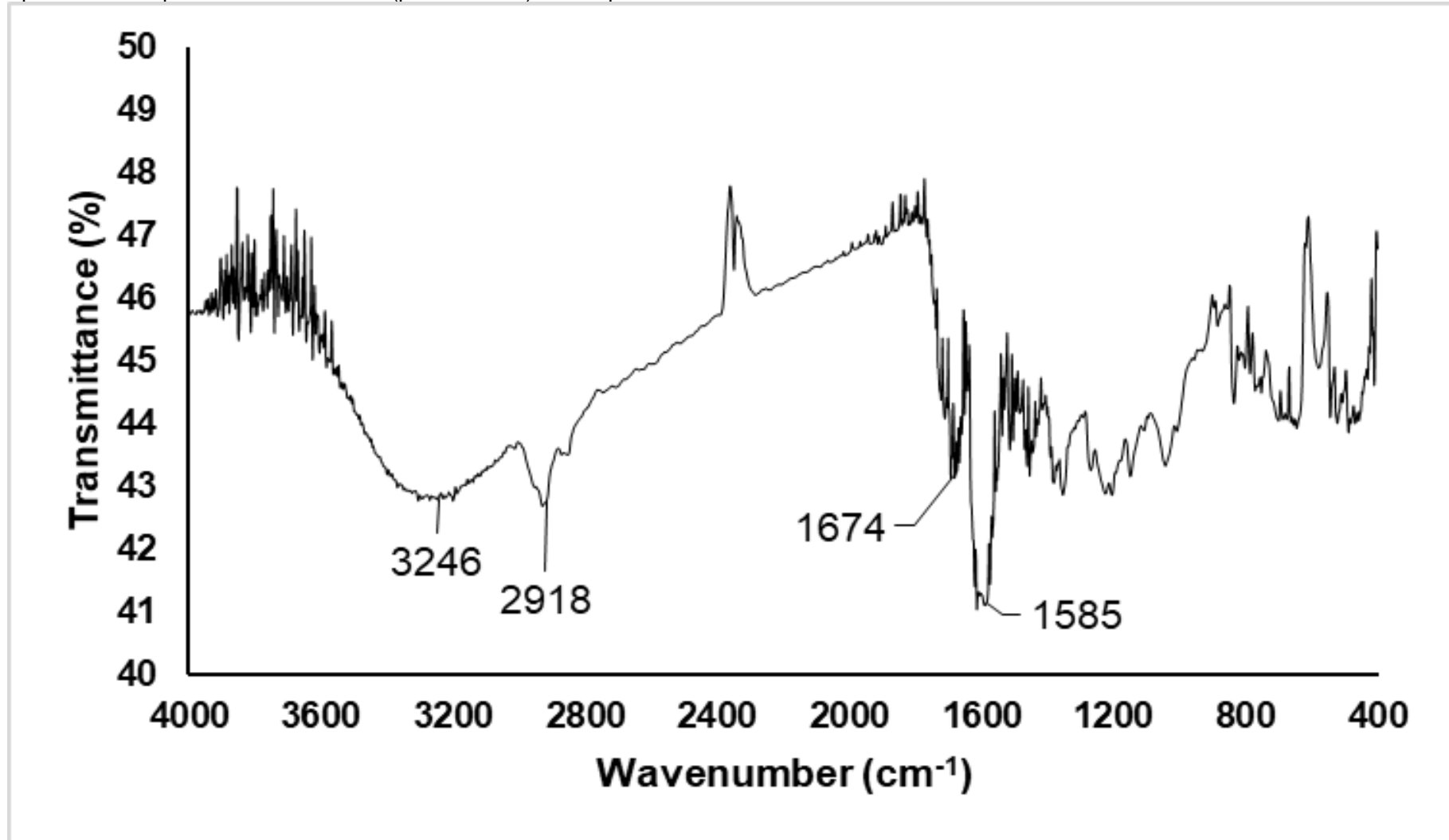
Apêndice 50. Espectro de RMN de HMBC (600 MHz, DMSO- $d_6$ ) do composto M16As140D.



Apêndice 51. Espectro de HRESIMS da amostra M16As140D.



Apêndice 52. Espectro de infravermelho (pastilha de Si) do composto M16As140D.



Apêndice 53. Espectro de absorção na região do UV (10 µg/mL; MeOH) do composto M16As140D.

