



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
ORGÂNICA**

BARTHOLOMEU ARAÚJO BARROS FILHO

**ESTUDO QUÍMICO DO BASIDIOMICETO
*LENTINUS STRIGELLUS***

**Fortaleza – Ceará
2009**

BARTHOLOMEU ARAÚJO BARROS FILHO

Estudo Químico do Basidiomiceto *Lentinus strigellus*

Tese de Doutorado submetida à
Coordenação do Programa de Pós-
Graduação em Química Orgânica,
da Universidade Federal do Ceará,
como requisito para a obtenção do
Grau de Doutor em Química.

Área de concentração: Química
Orgânica.

Orientadora: Profa. Dra. Maria da
Conceição Ferreira de Oliveira.

FORTALEZA – CEARÁ
2009

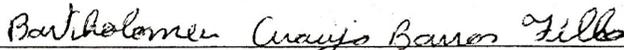
B274e Barros Filho, Bartholomeu Araújo
Estudo químico do basidiomiceto *Lentinus Strigellus* / Bartholomeu
Araújo Barros Filho, 2009.
221f; il. color. enc.

Orientadora: Profa. Dra. Maria da Conceição Ferreira de Oliveira
Co-orientador: Prof.: Dr. Jair Mafezoli
Área de concentração: Química Orgânica
Tese (doutorado) - Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências.
Depto. de Química, Fortaleza, 2009.

1. *Lentinus Strigellus* 2. Basidiomiceto 3. Biocatálise 4. Alcoóis quirais
I. Oliveira, Maria da Conceição Ferreira de (orient.) II. Mafezoli, Jair (co-
orient.) III. Universidade Federal do Ceará – Pós-Graduação em Química
Orgânica e Inorgânica IV. Título

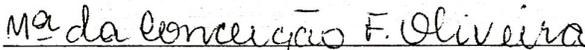
CDD 547

Esta Tese foi aprovada como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Doutor em Química Orgânica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, em cuja Biblioteca de Ciências e Tecnologia/UFC encontra-se à disposição dos interessados.

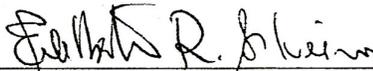

Bartholomeu Araújo Barros Filho

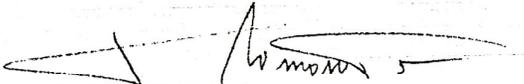
TESE APROVADA EM: 27/03/2009

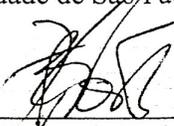
EXAMINADORES:


Profa. Dra. Maria da Conceição Ferreira de Oliveira (orientadora)
Universidade Federal do Ceará - UFC


Profa. Dra. Nilce Viana Gramosa Pompeu de Sousa Brasil
Universidade Federal do Ceará - UFC


Prof. Dr. Edilberto Rocha Silveira
Universidade Federal do Ceará - UFC


Prof. Dr. João Valdir Comasseto
Universidade de São Paulo - USP-SP


Prof. Dr. Fernando Batista da Costa
Universidade de São Paulo - FCFRP/USP

Dedico este trabalho a meus pais, Bartolomeu e Raimunda, que tanto amor me dedicaram, a meus irmãos Ana Paula e Alexandre e à minha orientadora, Prof^ª Dra Maria da Conceição, pelo apoio e dedicação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida, a graça e capacidade que me concedeu.

A meus pais, Bartolomeu Araújo Barros e Raimunda Ribeiro Barros, pelo apoio constante em cada passo dessa caminhada, a meus irmãos, Alexandre e Ana Paula por estarem sempre ao meu lado.

A minha orientadora professora Maria da Conceição Ferreira de Oliveira, pelos ensinamentos e por acreditar em minha vontade de vencer mais essa barreira na construção de meu caminho e aperfeiçoamento acadêmico, disponibilidade e exemplo, tanto de pessoa como de profissional.

Ao Prof. Jair Mafezoli, pela ajuda no trabalho experimental, determinação estrutural e na elaboração dessa tese.

Ao Prof. Edson Rodrigues Filho pela co-orientação e amizade durante a realização desse trabalho no Departamento de Química da UFSCar.

Aos professores Vicente Gotor, Vicente Gotor Fernández e Gonzalo de Gonzalo pela orientação e acolhimento no Laboratório de Bioorgânica, do Departamento de Química da Universidad de Oviedo (Espanha).

À Profa. Maria Nenmaura pela utilização da infra-estrutura do Laboratório de Micologia e Patologia de Sementes (LAMPS) – UFC.

À Viviane Marque Ferreira, aluna de IC da EMBRAPA, pelo treinamento na manipulação de fungos.

A todos os professores do Curso de Pós-Graduação em Química Orgânica da Universidade Federal do Ceará, responsáveis direto ou indiretamente por minha formação.

Ao CENAUREMN pela aquisição dos espectros de RMN e em especial à Gizelle e ao João Henrique pela realização dos experimentos.

Aos companheiros de laboratório Fátima, Gizelle, Natália, Biel, Daniel, Reinaldo, Alexandre, Érica e Pontes, por toda ajuda e amizade.

A todos os colegas do Laboratório de Bioorgânica, do Departamento de Química da Universidad de Oviedo (Espanha), por toda ajuda.

A todos os colegas do Curso de Pós-Graduação em Química Orgânica.

Aos funcionários Lana, Célia, Mundinha e Paulo pela colaboração.

A todos aqueles que colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho

Aos órgãos financiadores CAPES, CNPq, FUNCAP e PRONEX.

RESUMO

O estudo químico do basidiomiceto *Lentinus strigellus* foi realizado através da investigação da produção de metabólitos secundários em diferentes meios de culturas, além da sua utilização em processos de biorredução de compostos carbonílicos pró-quirais (cetona e β -cetoéster). A partir de *L. strigellus* cultivado em meio de peptona foi possível isolar os benzopiranos 2,2-dimetil-6-metoxicroman-4-ona, 4-hidroxi-2,2-dimetil-6-metoxicromano e (3*R*,4*S*)-3,4-dihidroxi-2,2-dimetil-6-metoxicromano do meio líquido. Do micélio, foram isolados o alcalóide indólico echinulina e a antraquinona fisciona, ambos inéditos para o gênero *Lentinus*. Do microrganismo cultivado em Czapek, enriquecido com caldo de batata, foram isolados do meio líquido os mesmos benzopiranos produzidos em peptona, além de (3*S*,4*S*)-3,4-dihidroxi-2,2-dimetil-6-metoxicromano. Quando Czapek foi utilizado como meio de cultivo, foram isoladas a panepoxidona e a isopanepoxidona. Células em crescimento de *L. strigellus* em meio de batata-dextrose foram investigadas, pela primeira vez, na biorredução estereoseletiva da acetofenona e nove derivados aromáticos, além das cetonas alifáticas ciclo-hexilmetilcetona, octan-2-ona, undecan-2-ona e do β -cetoéster 4-cloroacetoacetato de metila. A maioria das cetonas aromáticas foi convertida ao respectivo álcool de configuração *S*, em excessos enantioméricos superiores a 99%. Exceto para a undecan-2-ona, as cetonas alifáticas foram reduzidas enzimaticamente ao álcool de configuração *S* em elevadas taxas de conversão e excessos enantioméricos. O β -cetoéster 4-cloroacetoacetato de metila foi quimiosseletivamente reduzido ao álcool correspondente de configuração *R*, mas com excesso enantiomérico moderado.

Palavras-chave: *Lentinus strigellus*, Basidiomiceto, Biocatálise, Álcoois quirais.

ABSTRACT

The chemical study of the basidiomicete *Lentinus strigellus* was done by the investigation of its secondary metabolites production in varied culture media, besides its utilization in the bioreduction of prochiral carbonyl compounds (ketone and β -ketoester). From the liquid medium of *L. strigellus* grown in peptone broth, it was isolated the benzopyranes 2,2-dimethyl-6-methoxycroman-4-one, 4-hydroxy-2,2-dimethyl-6-methoxycromane and (3*R*,4*S*)-3,4-dihydroxy-2,2-dimethyl-6-methoxycromane. From the mycelium, the indol alkaloid echinuline and the anthraquinone fuscione were isolated, both compounds reported for the first time in *Lentinus*. The same benzopyranes isolated from *L. strigellus* grown in peptone, besides (3*S*,4*S*)-3,4-dihydroxy-2,2-dimethyl-6-methoxycromane were isolated from the liquid medium of the microorganism grown in Czapek medium enriched with potato broth. When only Czapek was used as culture medium, panepoxidone and isopanepoxidone were isolated. Growing cells of *L. strigellus* in potato-dextrose medium were investigated, for the first time, in the stereoselective reduction of acetophenone and nine aromatic derivatives, besides the aliphatic ketones cyclohexylmethylketone, octan-2-one and undecan-2-one, and the β -ketoester methyl 4-chloroacetoacetate. Most of the aromatic ketones were converted into the respective alcohols with *S* configuration in high enantiomeric excesses (> 99%). Except for undecan-2-one, the aliphatic ketones were enzymatically reduced to the alcohols with *S* configurations in high conversion ratios and enantiomeric excesses. β -ketoester methyl 4-chloroacetoacetate was chemoselectively reduced to its corresponding alcohol with *R* configuration but with moderate *ee*.

Palavras-chave: *Lentinus strigellus*, Basidiomicete, Biocatalysis, Chiral alcohols.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cultura de <i>L. strigellus</i> em BDA (A) e na forma de cogumelo (B).....	28
Figura 2: Esqueleto básico dos cromanos (A) e croman-4-ona (B)	36
Figura 3: Numeração do esqueleto básico dos cromanos e croman-4-onas.....	36
Figura 4: Acoplamentos observados no espectro bidimensional HMBC de LS1: posicionamento das isoprenilas e do sistema dimetilalila na molécula	48
Figura 5: Acoplamentos observados no espectro bidimensional HMBC de LS1: posicionamento do sistema 6-metilpiperazino-2,5-diona na molécula.....	48
Figura 6: Espectro de massa de LS1 (IE, 70 eV).....	50
Figura 7: Espectro de RMN ¹ H de LS1 (C ₅ D ₅ N, 500 MHz).....	50
Figura 8: Expansão do espectro de RMN ¹ H de LS1 (C ₅ D ₅ N, 500 MHz).....	51
Figura 9: Expansão do espectro de RMN ¹ H de LS1 (C ₅ D ₅ N, 500 MHz).....	51
Figura 10: Espectro de RMN ¹³ C –BB de LS1 (C ₅ D ₅ N, 125 MHz).....	52
Figura 11: Expansão do espectro de RMN ¹³ C –BB de LS1 (C ₅ D ₅ N, 125 MHz).....	52
Figura 12: Expansão do espectro de RMN ¹³ C –BB de LS1 (C ₅ D ₅ N, 125 MHz).....	53
Figura 13: Espectro de RMN ¹³ C – DEPT 135° de LS1 (C ₅ D ₅ N, 125 MHz)	53
Figura 14: Espectro bidimensional COSY ¹ H- ¹ H de LS1 (C ₅ D ₅ N, 125 MHz).....	54
Figura 15: Expansão do espectro bidimensional COSY ¹ H- ¹ H de LS1 (C ₅ D ₅ N, 500 MHz)	54
Figura 16: Espectro bidimensional HSQC de LS1 (C ₅ D ₅ N, 125 MHz)	55
Figura 17: Expansão do espectro bidimensional HSQC de LS1 (C ₅ D ₅ N, 125 MHz)....	55
Figura 18: Expansão do espectro bidimensional HSQC de LS1 (C ₅ D ₅ N, 500 MHz /125 MHz)	56
Figura 19: Espectro bidimensional HMBC de LS1 (C ₅ D ₅ N, 500 MHz /125 MHz)	56
Figura 20: Expansão do espectro bidimensional HMBC de LS1 (C ₅ D ₅ N, 500 MHz /125 MHz)	57
Figura 21: Expansão do espectro bidimensional HMBC de LS1 (C ₅ D ₅ N, 500 MHz /125 MHz)	57
Figura 22: Expansão do espectro bidimensional HMBC de LS1 (C ₅ D ₅ N, 500 MHz /125 MHz)	58
Figura 23: Expansão do espectro bidimensional HMBC de LS1 (C ₅ D ₅ N, 500 MHz /125 MHz)	58
Figura 24: Expansão do espectro bidimensional HMBC de LS1 (C ₅ D ₅ N, 500 MHz /125 MHz)	59
Figura 25: Expansão do espectro bidimensional HMBC de LS1 (C ₅ D ₅ N, 500 MHz /125 MHz)	59
Figura 26: Estruturas da 1,5-dihidroxi-7-metil-3-metoxiantraquinona (82) e fisciona (83).....	61
Figura 27: Principais acoplamentos a longa distância de LS2 observados no espectro bidimensional HMBC	61
Figura 28: Espectro de massa de LS2 (IE, 70 eV).....	63
Figura 29: Espectro de RMN ¹ H de LS2 (CDCl ₃ , 500 MHz)	64
Figura 30: Expansão do espectro de RMN ¹ H de LS2 (CDCl ₃ , 500 MHz)	64
Figura 31: Espectro de RMN ¹³ C –BB de LS2 (CDCl ₃ , 125 MHz)	65
Figura 32: Espectro de HSQC de LS2 (CDCl ₃ , 500 MHz /125 MHz)	65
Figura 33: Espectro de HMBC de LS2 (CDCl ₃ , 500 MHz /125 MHz)	66
Figura 34: Expansão do espectro de HMBC de LS2 (CDCl ₃ , 500 MHz /125 MHz).....	66
Figura 35: Expansão do espectro de HMBC de LS2 (CDCl ₃ , 500 MHz /125 MHz).....	67

Figura 36: Expansão do espectro de HMBC de LS2 (CDCl ₃ , 500 MHz /125 MHz).....	67
Figura 37: Estrutura do 4-hidroxi-2,2-dimetil-6-metoxicromano.	69
Figura 38: Principais acoplamentos a longa distância observados no espectro de RMN bidimensional HMBC de LS3	70
Figura 39: Espectro de massa de LS3 (IE, 70 eV).....	71
Figura 40: Espectro de RMN ¹ H de LS3 (CDCl ₃ , 500 MHz)	72
Figura 41: Expansão do espectro de RMN ¹ H de LS3 (CDCl ₃ , 500 MHz)	72
Figura 42: Expansão do espectro de RMN ¹ H de LS3 (CDCl ₃ , 500 MHz)	73
Figura 43: Espectro de RMN ¹³ C –BB de LS3 (CDCl ₃ , 125 MHz)	73
Figura 44: Espectro de RMN ¹³ C –DEPT 135° de LS3 (CDCl ₃ , 125 MHz)	74
Figura 45: Espectro bidimensional COSY ¹ H- ¹ H de LS3 (CDCl ₃ , 500 MHz)	74
Figura 46: Expansão do espectro bidimensional COSY ¹ H- ¹ H de LS3 (CDCl ₃ , 500 MHz)	75
Figura 47: Espectro bidimensional HSQC de LS3 (CDCl ₃ , 500 MHz /125 MHz).....	75
Figura 48: Espectro bidimensional HMBC de LS3 (CDCl ₃ , 500 MHz /125 MHz).....	76
Figura 49: Expansão do espectro bidimensional HMBC de LS3 (CDCl ₃ , 500 MHz /125 MHz)	76
Figura 50: Expansão do espectro bidimensional HMBC de LS3 (CDCl ₃ , 500 MHz /125 MHz)	77
Figura 51: Expansão do espectro bidimensional HMBC de LS3 (CDCl ₃ , 500 MHz/125 MHz)	77
Figura 52: Estrutura da 2,2-dimetil-6-metoxicroman-4-ona	79
Figura 53: Principais acoplamentos a longa distância de LS4	80
Figura 54: Espectro de massa de LS4 (IE, 70 eV).....	82
Figura 55: Espectro de RMN ¹ H de LS4 (CDCl ₃ , 500 MHz)	82
Figura 56: Expansão do espectro de RMN ¹ H de LS4 (CDCl ₃ , 500 MHz)	83
Figura 57: Espectro de RMN ¹³ C –BB de LS4 (CDCl ₃ , 125 MHz)	83
Figura 58: Expansão do espectro de RMN ¹³ C –BB de LS4 (CDCl ₃ , 125 MHz)	84
Figura 59: Espectro de RMN ¹³ C –DEPT 135° de LS4 (CDCl ₃ , 125 MHz)	84
Figura 60: Expansão do espectro bidimensional COSY ¹ H- ¹ H de LS4 (CDCl ₃ , 500 MHz)	85
Figura 61: Espectro bidimensional HSQC de LS4 (CDCl ₃ , 500 MHz/125 MHz).....	85
Figura 62: Espectro bidimensional HMBC de LS4 (CDCl ₃ , 500 MHz/125 MHz).....	86
Figura 63: Estrutura do (3 <i>R</i> *,4 <i>S</i> *)-3,4-dihidroxi-2,2-dimetil-6-metoxicromano.....	88
Figura 64: Principais acoplamentos a longa distância observados no espectro de RMN bidimensional HMBC de LS5	88
Figura 65: Espectro de massa de LS5 (IE, 70 eV).....	90
Figura 66: Espectro de RMN ¹ H de LS5 (CDCl ₃ , 500 MHz)	91
Figura 67: Expansão do espectro de RMN ¹ H de LS5 (CDCl ₃ , 500 MHz)	91
Figura 68: Espectro de RMN ¹³ C –BB de LS5 (CDCl ₃ , 125 MHz)	92
Figura 69: Expansão do espectro de RMN ¹³ C –BB de LS5 (CDCl ₃ , 125 MHz)	92
Figura 70: Espectro de RMN ¹³ C –DEPT 135° de LS5 (CDCl ₃ , 125 MHz)	93
Figura 71: Espectro bidimensional COSY ¹ H- ¹ H de LS5 (CDCl ₃ , 500 MHz)	93
Figura 72: Espectro bidimensional HSQC de LS5 (CDCl ₃ , 500 MHz/125 MHz).....	94
Figura 73: Espectro bidimensional HMBC de LS5 (CDCl ₃ , 500 MHz/125 MHz).....	94
Figura 74: Expansão do espectro bidimensional HMBC de LS5 (CDCl ₃ , 500 MHz/125 MHz)	95
Figura 75: Expansão do espectro bidimensional HMBC de LS5 (CDCl ₃ , 500 MHz/125 MHz)	95
Figura 76: Estrutura da (3 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-3,4-dihidroxi-2,2-dimetil-6-metoxicromano	97

Figura 77: Espectro de massa de LS6 (IE, 70 eV).....	98
Figura 78: Espectro de RMN ¹ H de LS6 (CDCl ₃ , 500 MHz)	98
Figura 79: Expansão do espectro de RMN ¹ H de LS6 (CDCl ₃ , 500 MHz)	99
Figura 80: Espectro de RMN ¹³ C –BB de LS6 (CDCl ₃ , 125 MHz)	99
Figura 81: Espectro de RMN ¹³ C –DEPT 135° de LS6 (CDCl ₃ , 125 MHz)	100
Figura 82: Estrutura da panepoxidona	102
Figura 83: Acoplamentos dos hidrogênios vicinais de LS7	102
Figura 84: Principais acoplamentos a longa distância de LS7	103
Figura 85: Espectro de massa de LS7 (IE, 70 eV).....	104
Figura 86: Espectro de RMN ¹ H de LS7 (CDCl ₃ , 500 MHz)	105
Figura 87: Expansão do espectro de RMN ¹ H de LS7 (CDCl ₃ , 500 MHz)	105
Figura 88: Espectro de RMN ¹³ C –BB de LS7 (CDCl ₃ , 125 MHz)	106
Figura 89: Expansão do espectro de RMN ¹³ C –BB de LS7 (CDCl ₃ , 125 MHz)	106
Figura 90: Espectro de RMN ¹³ C –DEPT 135° de LS7 (CDCl ₃ , 125 MHz)	107
Figura 91: Espectro bidimensional COSY ¹ H- ¹ H de LS7 (CDCl ₃ , 500 MHz)	107
Figura 92: Espectro de HSQC de LS7 (CDCl ₃ , 125 MHz).....	108
Figura 93: Espectro de HMBC de LS7 (CDCl ₃ , 125 MHz).....	108
Figura 94: Expansão do espectro de HMBC de LS7 (CDCl ₃ , 125 MHz).....	109
Figura 95: Expansão do espectro de HMBC de LS7 (CDCl ₃ , 125 MHz).....	109
Figura 96: Estrutura da isopanepoxidona.....	111
Figura 97: Acoplamentos dos hidrogênios vicinais de LS8.....	111
Figura 98: Principais acoplamentos a longa distância de LS8	112
Figura 99: Espectro de massa de LS8 (IE, 70 eV).....	113
Figura 100: Espectro de RMN ¹ H de LS8 (CD ₃ OD, 500 MHz)	113
Figura 101: Expansão do espectro de RMN ¹ H de LS8 (CD ₃ OD, 500 MHz)	114
Figura 102: Espectro de RMN ¹³ C –BB de LS8 (CD ₃ OD, 125 MHz)	114
Figura 103: Espectro de RMN ¹³ C–DEPT 135° de LS8 (CD ₃ OD, 125 MHz).....	115
Figura 104: Espectro bidimensional COSY ¹ H- ¹ H de LS8 (CD ₃ OD, 500 MHz)	115
Figura 105: Espectro bidimensional HSQC de LS8 (CD ₃ OD, 500 MHz/125 MHz) ...	116
Figura 106: Expansão do espectro bidimensional HSQC de LS8 (CD ₃ OD, 500 MHz/125 MHz)	116
Figura 107: Espectro bidimensional HMBC de LS8 (CD ₃ OD, 500 MHz/125 MHz) ..	117
Figura 108: Expansão do espectro bidimensional HMBC de LS8 (CD ₃ OD, 500 MHz/125 MHz)	117
Figura 109: Expansão do espectro bidimensional HMBC de LS8 (CD ₃ OD, 500 MHz/125 MHz)	118
Figura 110: Mecanismo de ação enzimática chave-fechadura.	121
Figura 111: Mecanismo de ação enzimática encaixe induzido.	122
Figura 112: Representação da estereosseletividade pela regra dos três pontos.	123
Figura 113: Exemplo esquemático da seletividade enzimática.	124
Figura 114: Modelo da especificidade de Prelog	126
Figura 115: Metabolismo da glicose (ESPOSITO; AZEVEDO, 2004)	129
Figura 116: Colônia de <i>Fusarium oxysporum</i> (controle positivo), crescidas em BDA e BDA + fucsina	129
Figura 117: Colônias de <i>L. strigellus</i> , crescidas em BDA e BDA + fucsina	130
Figura 118: Curva de calibração do 1-feniletan-1-ol.....	134
Figura 119: Curva de calibração do 1-(2-metoxifenil)etan-1-ol	134
Figura 120: Curva de calibração do 1-(3-metoxifenil)etan-1-ol	135
Figura 121: Curva de calibração do 1-(4-metoxifenil)etan-1-ol	135
Figura 122: Curva de calibração do 1-(2-nitrofenil)etan-1-ol.....	136

Figura 123: Curva de calibração do 1-(3-nitrofenil)etan-1-ol.....	136
Figura 124: Curva de calibração do 1-(4-nitrofenil)etan-1-ol.....	137
Figura 125: Curva de calibração do 1-(4-metilfenil)etan-1-ol	137
Figura 126: Cromatograma do padrão da acetofenona.....	138
Figura 127: Cromatograma do padrão do 1-feniletan-1-ol	138
Figura 128: Cromatograma da biorredução da acetofenona após 1 dia.....	138
Figura 129: Cromatograma da biorredução da acetofenona após 3 dias	138
Figura 130: Cromatograma da biorredução da acetofenona após 6 dias	139
Figura 131: Cromatograma do padrão da acetofenona em coluna quiral.	139
Figura 132: Cromatograma do padrão do 1-feniletan-1-ol em coluna quiral	139
Figura 133: Cromatograma da biorredução da acetofenona após 1 dia em coluna quiral	139
Figura 134: Cromatograma da biorredução da acetofenona após 3 dias em coluna quiral	140
Figura 135: Cromatograma da biorredução da acetofenona após 6 dias em coluna quiral	140
Figura 136: Cromatograma do padrão da 4'-metilacetofenona.....	140
Figura 137: Cromatograma do padrão do 1-(4-metilfenil)etan-1-ol.....	140
Figura 138: Cromatograma da mistura de padrões do 1-(4-metilfenil)etan-1-ol e acetofenona.....	141
Figura 139: Cromatograma da biorredução da 4'-metilacetofenona após 1 dia	141
Figura 140: Cromatograma da biorredução da 4'-metilacetofenona após 3 dias.....	141
Figura 141: Cromatograma da biorredução da 4'-metilacetofenona após 6 dias.....	141
Figura 142: Cromatograma do padrão da 4'-metilacetofenona em coluna quiral.....	142
Figura 143: Cromatograma do padrão da 1-(4-metilfenil)etan-1-ol em coluna quiral.	142
Figura 144: Cromatograma da biorredução da 4'-metilacetofenona após 1 dia em coluna quiral	142
Figura 145: Cromatograma da biorredução da 4'-metilacetofenona após 3 dias em coluna quiral	142
Figura 146: Cromatograma da biorredução da 4'-metilacetofenona após 6 dias em coluna quiral	143
Figura 147: Cromatograma do padrão da 2'-metoxiacetofenona.....	143
Figura 148: Cromatograma do padrão do 1-(2-Metoxifenil)etan-1-ol	143
Figura 149: Cromatograma da biorredução da 2'-metoxiacetofenona após 1 dia.....	143
Figura 150: Cromatograma da biorredução da 2'-metoxiacetofenona após 3 dias	144
Figura 151: Cromatograma da biorredução da 2'-metoxiacetofenona após 6 dias	144
Figura 152: Cromatograma do padrão da 2'-metoxiacetofenona em coluna quiral	144
Figura 153: Cromatograma do padrão do 1-(2-Metoxifenil)etan-1-ol em coluna quiral	144
Figura 154: Cromatograma da biorredução da 2'-metoxiacetofenona após 1 dia em coluna quiral	145
Figura 155: Cromatograma da biorredução da 2'-metoxiacetofenona após 3 dias em coluna quiral	145
Figura 156: Cromatograma da biorredução da 2'-metoxiacetofenona após 6 dias em coluna quiral	145
Figura 157: Cromatograma do padrão da 3'-metoxiacetofenona.....	145
Figura 158: Cromatograma do padrão do 1-(3-Metoxifenil)etan-1-ol	146
Figura 159: Cromatograma da biorredução da 3'-metoxiacetofenona após 1 dia.....	146
Figura 160: Cromatograma da biorredução da 3'-metoxiacetofenona após 3 dias	146
Figura 161: Cromatograma da biorredução da 3'-metoxiacetofenona após 6 dias	146

Figura 162: Cromatograma do padrão da 3'-metoxiacetofenona em coluna quiral	147
Figura 163: Cromatograma do padrão do 1-(3-Metoxifenil)etan-1-ol em coluna quiral	147
Figura 164: Cromatograma da biorredução da 3'-metoxiacetofenona após 1 dia em coluna quiral	147
Figura 165: Cromatograma da biorredução da 3'-metoxiacetofenona após 3 dia em coluna quiral	147
Figura 166: Cromatograma da biorredução da 3'-metoxiacetofenona após 6 dias em coluna quiral	148
Figura 167: Cromatograma do padrão da 4'-metoxiacetofenona	148
Figura 168: Cromatograma do padrão do 1-(4-Metoxifenil)etan-1-ol	148
Figura 169: Cromatograma da biorredução da 4'-metoxiacetofenona após 1 dia	148
Figura 170: Cromatograma da biorredução da 4'-metoxiacetofenona após 3 dias	149
Figura 171: Cromatograma da biorredução da 4'-metoxiacetofenona após 6 dias	149
Figura 172: Cromatograma do padrão da 4'-Metoxifenilacetofenona em coluna quiral	149
Figura 173: Cromatograma do padrão do 1-(4-Metoxifenil)etan-1-ol em coluna quiral	149
Figura 174: Cromatograma da biorredução da 4'-metoxiacetofenona após 3 dias em coluna quiral	150
Figura 175: Cromatograma da biorredução da 4'-metoxiacetofenona após 6 dias em coluna quiral	150
Figura 176: Cromatograma do padrão da 2'-nitroacetofenona	150
Figura 177: Cromatograma do padrão do 1-(2-Nitrofenil)etan-1-ol	150
Figura 178: Cromatograma da biorredução da 2'-nitroacetofenona após 1 dia	151
Figura 179: Cromatograma da biorredução da 2'-nitroacetofenona após 3 dias	151
Figura 180: Cromatograma da biorredução da 2'-nitroacetofenona após 6 dias	151
Figura 181: Cromatograma do padrão do 2'-nitroacetofenona em coluna quiral	151
Figura 182: Cromatograma do padrão do 1-(2-Nitrofenil)etan-1-ol em coluna quiral	152
Figura 183: Cromatograma da biorredução da 2'-nitroacetofenona após 1 dia em coluna quiral	152
Figura 184: Cromatograma da biorredução da 2'-nitroacetofenona após 3 dias em coluna quiral	152
Figura 185: Cromatograma da biorredução da 2'-nitroacetofenona após 6 dias em coluna quiral	152
Figura 186: Cromatograma do padrão do 3'-nitroacetofenona	153
Figura 187: Cromatograma do padrão do 1-(3-Nitrofenil)etan-1-ol	153
Figura 188: Cromatograma da biorredução da 3'-nitroacetofenona após 1 dia	153
Figura 189: Cromatograma da biorredução da 3'-nitroacetofenona após 3 dias	153
Figura 190: Cromatograma da biorredução da 3'-nitroacetofenona após 6 dias	154
Figura 191: Cromatograma do padrão da 3'-nitroacetofenona em coluna quiral após 1 dia	154
Figura 192: Cromatograma do padrão do 1-(3-Nitrofenil)etan-1-ol em coluna quiral	154
Figura 193: Cromatograma da biorredução da 3'-nitroacetofenona após 1 dia em coluna quiral	154
Figura 194: Cromatograma da biorredução da 3'-nitroacetofenona após 3 dias em coluna quiral	155
Figura 195: Cromatograma da biorredução da 3'-nitroacetofenona após 6 dias em coluna quiral	155
Figura 196: Cromatograma do padrão da 4'-nitroacetofenona	155

Figura 197: Cromatograma do padrão do 1-(4-Nitrofenil)etan-1-ol	155
Figura 198: Cromatograma da biorredução da 4'-nitroacetofenona após 1 dia.....	156
Figura 199: Cromatograma da biorredução da 4'-nitroacetofenona após 3 dias.....	156
Figura 200: Cromatograma da biorredução da 4'-nitroacetofenona após 6 dias.....	156
Figura 201: Cromatograma do padrão da 4'-nitroacetofenona em coluna quirál	156
Figura 202: Cromatograma do padrão do 1-(4-Nitrofenil)etan-1-ol em coluna quirál	157
Figura 203: Cromatograma da biorredução da 4'-nitroacetofenona após 1 dia em coluna quirál	157
Figura 204: Cromatograma da biorredução da 4'-nitroacetofenona após 3 dia em coluna quirál	157
Figura 205: Cromatograma da biorredução da 4'-nitroacetofenona após 6 dia em coluna quirál	157
Figura 206: Curva de calibração do 2-Clorofeniletan-1-ol.....	159
Figura 207: Curva de calibração do 2-Cloro-1-(3,4-diclorofenil)etan-1-ol.....	159
Figura 208: Cromatograma do padrão da 2-cloroacetofenona.....	160
Figura 209: Cromatograma do padrão do 2-cloroafeniletan-1-ol.....	160
Figura 210: Cromatograma da biorredução da 2-cloroacetofenona após 1 dia.....	160
Figura 211: Cromatograma da biorredução da 2-cloroacetofenona após 3 dias	160
Figura 212: Cromatograma da biorredução da 2-cloroacetofenona após 6 dias	161
Figura 213: Cromatograma do padrão do 2-clorofeniletan-1-ol em coluna quirál.....	161
Figura 214: Cromatograma da biorredução da 2-cloroacetofenona após 1 dia em coluna quirál	161
Figura 215: Cromatograma da biorredução da 2-cloroacetofenona após 3 dias em coluna quirál	161
Figura 216: Cromatograma da biorredução da 2-cloroacetofenona após 6 dias em coluna quirál	162
Figura 217: Cromatograma do padrão da 2,3',4'-tricloroacetofenona	162
Figura 218: Cromatograma do padrão do 2-Cloro-1-(3,4-diclorofenil)etan-1-ol	162
Figura 219: Cromatograma da biorredução da 2,3',4'-tricloroacetofenona após 1 dia	162
Figura 220: Cromatograma da biorredução da 2,3',4'-tricloroacetofenona após 3 dias	163
Figura 221: Cromatograma da biorredução da 2,3',4'-tricloroacetofenona após 6 dias	163
Figura 222: Cromatograma do padrão do 2-Cloro-1-(3,4-diclorofenil)etan-1-ol em coluna quirál.....	163
Figura 223: Cromatograma da biorredução da 2,3',4'-tricloroacetofenona após 1 dia em coluna quirál.....	163
Figura 224: Cromatograma da biorredução da 2,3',4'-tricloroacetofenona após 3 dias em coluna quirál	164
Figura 225: Cromatograma da biorredução da 2,3',4'-tricloroacetofenona após 6 dias em coluna quirál	164
Figura 226: Cromatograma do padrão do 4-cloroacetoacetato	166
Figura 227: Cromatograma da biorredução do 4-cloroacetoacetato após 1 dia.....	166
Figura 228: Cromatograma da biorredução do 4-cloroacetoacetato após 3 dias	167
Figura 229: Cromatograma da biorredução do 4-cloroacetoacetato após 6 dias	167
Figura 230: Cromatograma do padrão do 4-cloro-3-hidroxi-butanoato de metila	168
Figura 231: Cromatograma da biorredução do 4-cloroacetoacetato após 1 dia em coluna quirál	168
Figura 232: Cromatograma da biorredução do 4-cloroacetoacetato de metila após 3 dias em coluna quirál	169

Figura 233: Cromatograma da biorredução do 4-cloroacetoacetato após 6 dias em coluna quirál.....	169
Figura 234: Cromatograma do padrão do octan-2-ona.....	170
Figura 235: Cromatograma do padrão da octan-2-ol.....	170
Figura 236: Cromatograma da biorredução da octan-2-ona após 1 dia.....	171
Figura 237: Cromatograma da biorredução da octan-2-ona após 3 dias.....	171
Figura 238: Cromatograma da biorredução da octan-2-ona após 6 dias.....	172
Figura 239: Cromatograma do padrão do octan-2-ol em coluna quirál.....	172
Figura 240: Cromatograma da biorredução da octan-2-ona após 1 dia em coluna quirál.....	173
Figura 241: Cromatograma da biorredução da octan-2-ona após 3 dias em coluna quirál.....	173
Figura 242: Cromatograma da biorredução da octan-2-ona após 6 dias em coluna quirál.....	174
Figura 243: Cromatograma do padrão undecan-2-ona.....	174
Figura 244: Cromatograma do padrão da undecan-2-ol.....	175
Figura 245: Cromatograma da biorredução da undecan-2-ona após 1 dia.....	175
Figura 246: Cromatograma da biorredução da undecan-2-ona após 3 dias.....	176
Figura 247: Cromatograma da biorredução da undecan-2-ona após 6 dias.....	176
Figura 248: Cromatograma do padrão do undecan-2-ol em coluna quirál.....	177
Figura 249: Cromatograma da biorredução da undecan-2-ona após 1 dia em coluna quirál.....	177
Figura 250: Cromatograma da biorredução da undecan-2-ona após 3 dias, em coluna quirál.....	178
Figura 251: Cromatograma da biorredução da undecan-2-ona após 6 dias, em coluna quirál.....	178
Figura 252: Cromatograma do padrão do ciclo-hexilmetilcetona.....	179
Figura 253: Cromatograma do padrão do 1-ciclo-hexilmetiletan-1-ol.....	179
Figura 254: Cromatograma da biorredução da ciclo-hexilmetilcetona após 1 dia.....	180
Figura 255: Cromatograma da biorredução da ciclo-hexilmetilcetona após 3 dias.....	180
Figura 256: Cromatograma da biorredução da ciclo-hexilmetilcetona após 6 dias.....	181
Figura 257: Cromatograma do padrão do 1-ciclo-hexiletan-1-ol em coluna quirál.....	181
Figura 258: Cromatograma da biorredução da ciclo-hexilmetilcetona após 1 dia em coluna quirál.....	182
Figura 259: Cromatograma da biorredução da ciclo-hexilmetilcetona após 3 dias em coluna quirál.....	182
Figura 260: Cromatograma da biorredução da ciclo-hexilmetilcetona após 6 dias em coluna quirál.....	183
Figura 261: Cetonas pró-quirais empregadas nas reações de biorredução.....	202

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Metabólitos secundários isolados de espécies de <i>Lentinus</i>	31
Tabela 2: Estruturas dos metabólitos secundários isolados do gênero <i>Lentinus</i>	33
Tabela 3: Croman-4-onas e cromanos isolados de fungos.....	37
Tabela 4: Estruturas de cromanos e croman-4-onas de origem fúngica.....	39
Tabela 5: Dados de RMN ¹ H (500 MHz) e ¹³ C (125 MHz) de LS1 em C ₅ D ₅ N.....	49
Tabela 6: Comparação dos dados de RMN ¹ H (500 MHz) e ¹³ C (125 MHz) da antraquinona fisiona (SMETANINA <i>et al.</i> , 2007) com os de LS2, ambos em CDCl ₃	62
Tabela 7: Dados de RMN ¹ H (500 MHz) e ¹³ C (125 MHz) de LS2 em CDCl ₃	63
Tabela 8: Deslocamentos químicos (δ) de RMN ¹³ C de LS3 com padrão de hidrogenação obtido pela comparação dos espectros ¹³ C-BB e DEPT-135°.....	70
Tabela 9: Dados de RMN ¹ H (500 MHz) e ¹³ C (125 MHz) LS3 em CDCl ₃	71
Tabela 10: Deslocamentos químicos de RMN ¹³ C (δ) de LS4 com padrão de hidrogenação obtido pela comparação dos espectros ¹³ C-BB e DEPT-135°.....	80
Tabela 11: Comparação entre os dados de RMN ¹ H (CDCl ₃) da 2,2-dimetil-6-metoxicroman-4-ona (WANG <i>et al.</i> , 2004) e LS4.....	81
Tabela 12: Dados de RMN ¹ H (500 MHz) e ¹³ C (125 MHz) de LS4 em CDCl ₃	81
Tabela 13: Deslocamentos químicos de RMN ¹³ C (δ) de LS5 com padrão de hidrogenação obtido pela comparação dos espectros ¹³ C-BB e DEPT-135°.....	89
Tabela 14: Comparação dos dados de RMN ¹ H e ¹³ C do (3R, 4S)-3,4-dihidroxi-2,2-dimetil-6-metoxicromano (WANG <i>et al.</i> , 2004) com os de LS5.....	89
Tabela 15: Dados de RMN ¹ H (500 MHz) e ¹³ C (125 MHz) de LS5 em CDCl ₃	90
Tabela 16: Comparação dos dados de RMN ¹ H (500 MHz) e ¹³ C (125 MHz) das substâncias LS6 e LS5, ambas em CDCl ₃	97
Tabela 17: Dados de RMN ¹ H (500 MHz) e ¹³ C (125 MHz) de LS7 em CDCl ₃	103
Tabela 18: Comparação entre os dados de RMN ¹ H e ¹³ C (CDCl ₃) da panepoxidona (COTA <i>et al.</i> , 2008) e LS7.....	104
Tabela 19: Dados de RMN ¹ H (500 MHz) e ¹³ C (125 MHz) de LS8 em CD ₃ OD.....	112
Tabela 20: Especificidade de enzimas na redução de cetonas.....	126
Tabela 21: Redução de α-hidroxifeniletanonas por células de <i>Geotrichum sp.</i>	128
Tabela 22: Resultado da biorredução de cetonas aromáticas pró-quirais por células em crescimento de <i>L. strigellus</i>	133
Tabela 23: Resultado da biorredução de cetonas α-halogenadas por células em crescimento de <i>L. strigellus</i>	158
Tabela 24: Resultado da biorredução das cetonas alifáticas (104-107) por células em crescimento de <i>L. strigellus</i>	165
Tabela 25: Extratos obtidos no cultivo de <i>L. strigellus</i> em peptona sob condições estáticas.....	189
Tabela 26: Extratos obtidos nos cultivos de <i>L. strigellus</i> sob agitação.....	190
Tabela 27: Fracionamento cromatográfico de EAclS.....	191
Tabela 28: Fracionamento cromatográfico de EAclS 2.....	191
Tabela 29: Fracionamento cromatográfico de PMeLSA.....	192
Tabela 30: Fracionamento cromatográfico de PMeLSA 4.....	193
Tabela 31: Fracionamento cromatográfico de PMeLSA 5.....	194
Tabela 32: Fracionamento cromatográfico de PMeLSA 5,5.....	195
Tabela 33: Fracionamento cromatográfico de PMeLSACB.....	195
Tabela 34: Fracionamento cromatográfico de PMeLSACB 4.....	196
Tabela 35: Fracionamento cromatográfico de PMeLSACB 4,2.....	196
Tabela 36: Fracionamento cromatográfico de PMeLSACB 4.....	197

Tabela 37: Fracionamento cromatográfico de PMeLSACB 4,5	198
Tabela 38: Fracionamento cromatográfico de PMeLSACB 4,6	198
Tabela 39: Fracionamento cromatográfico de PMeLSAC.....	199
Tabela 40: Fracionamento cromatográfico de PMeLSAC 3.....	199
Tabela 41: Fracionamento cromatográfico de PMeLSAC 3,1	200
Tabela 42: Fracionamento cromatográfico de PMeLSAC 3,1,3	200
Tabela 43: Fracionamento cromatográfico de PMeLSAC 3,1,5	201
Tabela 44: Resultado das reduções químicas das cetonas aromáticas.....	203
Tabela 45: Resultado das reduções químicas dos alcoóis alifáticos.....	204

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Redução estereoespecífica de 1-[3,5-bis(trifluorometil)fenil]etanona.	127
Esquema 2: Redução enantiosseletiva de cetonas por <i>G. candidum</i>	127
Esquema 4: Cetonas alifáticas utilizadas nas biorredução com <i>L. strigellus</i>	164
Esquema 4: Redução química das cetonas aromáticas	203
Esquema 5: Acetilação química dos alcoóis alifáticos	203

LISTA DE SIGLAS

AcOEt: Acetato de Etila

ADH: Enzima Alcooldesidrogenase

BB: Broad Band

BD: Meio de Cultura Batata-Dextrose

BDA: Meio de Cultura Batata-Dextrose-Àgar

C: Carbono não hidrogenado

CCD: Cromatografia em Camada Delgada

CCDA: Cromatografia em Camada Delgada Analítica

CCDP: Cromatografia em Camada Delgada Preparativa

CG/DIC: Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização em Chama

CG/EM: Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massa

CH: Carbono metínico

CH₂: Carbono metilênico

CH₃: Carbono metílico

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

COSY: *Correlation Spectroscopy*

DEPT 135°: *Distortless Enhancement by Polarization Transfer 135°*

EM: Espectrometria de Massa

eV: Elétrons volt

HMBC: *Heteronuclear Multiple Bond Connectivity*

HSQC: *Heteronuclear Single Quantum Coherence*

IE: Impacto Eletrônico

J: Constante de Acoplamento

LS1: Substância 1 isolada de *Lentinus strigellus*

LS2: Substância 2 isolada de *Lentinus strigellus*

LS3: Substância 3 isolada de *Lentinus strigellus*

LS4: Substância 4 isolada de *Lentinus strigellus*

LS5: Substância 5 isolada de *Lentinus strigellus*

LS6: Substância 6 isolada de *Lentinus strigellus*

LS7: Substância 7 isolada de *Lentinus strigellus*

LS8: Substância 8 isolada de *Lentinus strigellus*

MeOH: Metanol

RMN ¹³C – BB: Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13 – *Broad Band*

RMN ¹H: Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio 1

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ESQUEMAS

LISTA DE SIGLAS

1. INTRODUÇÃO	23
2. CONSIDERAÇÕES TAXONÔMICAS	27
2.1 O Gênero <i>Lentinus</i>	27
2.2 A Espécie <i>Lentinus strigellus</i>	27
3. LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO	30
3.1 Metabólitos Secundários do Gênero <i>Lentinus</i>	30
3.2 Cromanos e Croman-4-onas de Origem Fúngica.....	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
4.1 Isolamento e Identificação de Metabólitos Secundários	46
4.2.1 Isolamento e Identificação de LS1	46
4.2.2 Isolamento e Identificação de LS2	60
4.2.3 Isolamento e Identificação de LS3	68
4.2.4 Isolamento e Identificação de LS4	78
4.2.5 Isolamento e Identificação de LS5	87
4.2.6 Isolamento e Identificação de LS6	96
4.2.7 Isolamento e Identificação de LS7	101
4.2.8 Isolamento e Identificação de LS8	110
4.3 Biocatálise.....	119
4.3.1 As Enzimas e a Biotransformação.....	119
4.3.2 Modelos Enzimáticos	121
4.3.3 Utilização de Microrganismos em Reações de Biotransformação.....	124
4.3.4 Utilização de ADHs em biocatálise.....	125
4.4 Bioprospecção de Atividade Álcool Desidrogenases em <i>L. strigellus</i>	128
4.5 Biorredução de Cetonas Pró-Quirais por Células em Crescimento de <i>L. strigellus</i>	130
4.4.2 Biorredução de cetonas alifáticas pró-quirais e β -cetoéster.....	164
5. PARTE EXPERIMENTAL	185
5.1 Microrganismo	185
5.2 Métodos Cromatográficos	185
5.2.1 Cromatografia em Gel de Sílica	185
5.2.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	185
5.2.3 Cromatografia Gasosa acoplada a Detector de Ionização de Chama	186
5.3 Métodos espectrométricos	186
5.4 Ponto de Fusão	187
5.5 Rotação Óptica.....	187
5.6 Preparação dos Meios de Cultura.....	187
5.6.1 Meio BDA (batata-dextrose-ágar).....	188
5.6.2 Peptona.....	188
5.6.3 Czapek	188
5.6.4 Czapek com Caldo de Batata	188
5.6.5 BD.....	188

5.6.6 BDA + fucsina básica	188
5.7 Cultivos de <i>Lentinus strigellus</i>	189
5.7.1 Crescimento de <i>Lentinus strigellus</i> sob Condições Estáticas	189
5.7.2 Crescimento de <i>Lentinus strigellus</i> Sob Agitação.....	189
5.8 Isolamento de Metabolitos Secundários de <i>L. strigellus</i>	190
5.8.1 Isolamento de LS1	190
5.8.2 Fracionamento Cromatográfico de EAcLS.....	190
5.8.3 Fracionamento cromatográfico de EAcLS 2: isolamento de LS2.....	191
5.8.4 Fracionamento cromatográfico de PMeLSA	192
5.8.5 Fracionamento Cromatográfico de PMeLSA 4: Isolamento de LS3	192
5.8.6 Fracionamento Cromatográfico de PMeLSA 5: Isolamento de LS4	193
5.8.7 Fracionamento Cromatográfico de PMeLSA 5,5: Isolamento de LS5.....	194
5.8.8 Fracionamento Cromatográfico de PMeLSACB	195
5.8.9 Fracionamento cromatográfico de PMeLSACB 4	195
5.8.10 Fracionamento Cromatográfico de PMeLSACB 4,2: Isolamento de LS4.	196
5.8.11 Fracionamento Cromatográfico de PMeLSACB 4,4: Isolamento de LS5.	197
5.8.12 Fracionamento Cromatográfico de PMeLSACB 4,5: Isolamento de LS6.	197
5.8.13 Fracionamento Cromatográfico de PMeLSACB 4,6.....	198
5.8.14 Fracionamento Cromatográfico de PMeLSAC	199
5.8.15 Fracionamento cromatográfico de PMeLSAC 3.....	199
5.8.16 Fracionamento Cromatográfico de PMeLSAC 3,1	199
5.8.17 Fracionamento Cromatográfico de PMeLSAC 3,1,3: Isolamento de LS7	200
5.8.18 Fracionamento Cromatográfico de PMeLSAC 3,1,5: Isolamento de LS8	201
5.9 Bioprospecção de Atividade Álcool Desidrogenase (ADH) de <i>L. strigellus</i>	201
5.10 Emprego de <i>L. strigellus</i> em Reações de Biorredução.....	201
5.10.1 Substratos Utilizados nas Reações de Biorredução.....	201
5.10.2. Álcoois e Ésteres Racêmicos Padrões	202
5.10.3 Redução Química das Cetonas Aromáticas Comerciais (NUNES <i>et al.</i> , 2005)	202
5.10.4. Acetilação das Cetonas Alifáticas Comercias	203
5.10.5 Quantificação dos Alcoóis Obtidos nas Biorreduções	204
5.10.6 Biorredução de Cetonas Pró-Quirais por Células em Crescimento de <i>Lentinus strigellus</i>	204
5.10.6.1 Preparação e Análise das Amostras por CLAE.....	204
5.10.6.2 Preparação e Análise das Amostras por CG/DIC.....	205
5.10.6.3 Parâmetros Cromatográficos Utilizados nas Análises de Biorredução ..	205
6. CONCLUSÃO	210
REFERÊNCIAS	211



INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Os fungos constituem um grupo numeroso de organismos, diversificado e de enorme importância ecológica e econômica. O reino Fungi é o segundo maior grupo de organismos, compreendendo cerca de 70.000 espécies identificadas e encontra-se dividido em quatro filos: Chytridiomycota (790 espécies), Zygomycota (1060 espécies), Ascomycota (32300 espécies) e Basidiomycota (22244 espécies) (LIMA, 2003). Estimativas apontam que existam aproximadamente 1,5 milhões de espécies diferentes de fungos (MUELLER; BILLS; FOSTER, 2004).

A maior parte dos fungos, assim como as bactérias, desempenha um papel de grande importância na economia e na natureza. Esses seres, na busca de seu alimento, decompõem as plantas mortas que revestem o solo das regiões florestadas, e degradam os restos de outros organismos. Nesse processo, produzem CO₂, que passa para a atmosfera, e diversas substâncias minerais, que dissolvidas no solo pela chuva e umidade, constituem alimento para outras plantas. Os fungos destroem materiais que, de outra forma, se acumulariam em quantidades incalculáveis (BERGAMIN-FILHO; KIMATE; AMORIN, 1995).

Além de úteis para a natureza, os fungos são úteis para o homem, pois podem ser utilizados como alimento. As leveduras, por exemplo, são indispensáveis à produção de pão, queijo, vinho e cerveja (BERGAMIN-FILHO; KIMATE; AMORIN, 1995). Na medicina, eles são fonte de vários medicamentos. A penicilina, um antibiótico largamente utilizado, foi isolado do fungo *Penicillium notatum* e impulsionou a pesquisa na área de produtos naturais obtidos de fungos com atividade farmacológica (PINTO, 2002). Desde a descoberta desse antibiótico, vários estudos continuam sendo realizados na avaliação de estruturas químicas de metabólitos secundários de origem fúngica e suas atividades biológicas. Dados recentes apontam que mais de 1500 metabólitos secundários de fungos, caracterizados entre 1993 e 2001, exibiram atividade antibiótica ou antitumoral (STADLER; KELLER, 2008).

Em 1994, seis dos vinte medicamentos mais vendidos (representando um mercado de aproximadamente 6,7 bilhões de dólares) eram de origem fúngica ou produzidos através de transformações químicas de metabólitos secundários oriundos de fungos. Como exemplo, pode-se citar a mevinolina, um agente redutor do nível de

colesterol, cuja comercialização mundial é de aproximadamente 1 bilhão de dólares por ano (PINTO, 2002).

No entanto, os fungos também possuem um aspecto negativo, pois eles produzem, entre outros metabólitos, as micotoxinas, que podem provocar várias doenças em homens e outros animais, infectar plantas, grãos e alimentos acarretando prejuízos na sua produção (BERGAMIN-FILHO; KIMATE; AMORIN, 1995).

Fungos filamentosos e leveduriformes (leveduras) são ainda empregados como biocatalisadores na transformação de moléculas orgânicas, gerando produtos com alta quimio-, regio- e estereosseletividade (KIM *et al.*, 2007). Vários microrganismos estão sendo investigados na síntese assimétrica de moléculas biologicamente ativas e de interesse comercial (POLLARD; WOODLEY, 2006), principalmente nos setores farmacêutico (PATEL, 2008) e de Química fina (STRAATHOF *et al.*, 2002). Merece destaque a produção de álcoois quirais através do emprego de enzimas álcool-desidrogenases (ADHs) de origem fúngica (MOORE *et al.*, 2007).

Os cogumelos são macrofungos ricos em fibra dietética, minerais e vitaminas (MANZI; AGUZZI; PIZZOFERRATO, 2001). Devido a isso, eles se tornaram bastante atraentes como fontes de alimento para o homem, bem como para obtenção e desenvolvimento de novas drogas (MANZI; PIZZOFERRATO, 2000). Alguns componentes dos cogumelos podem diminuir o colesterol, modular o sistema imunológico e ainda inibir o crescimento tumoral (SMITH; ROWAN; SULLIVAN, 2002; WASSER, 2002). Extratos de muitos cogumelos, como de *Lentinula edodes*, *Agaricus blazei*, *Ganoderma lucidum*, e *Fruondosa grifola*, suprimem crescimento de tumor, controlando o sistema imunológico do hospedeiro (SCHEPETKIN; QUINN, 2006). *Lentinula edodes* (shiitake) é o segundo cogumelo comestível mais popular no mundo, e sua importância é atribuída ao seu valor nutricional e aplicação médica (HATVANI, 2001). Vários componentes importantes, incluindo polissacarídeos biologicamente ativos, fibras dietéticas, ergosterol, vitaminas B1, B2 e C, e minerais, foram isolados do basidiocarpo, micélio e meio de cultura utilizado no crescimento de *Lentinula edodes* (CHOI *et al.*, 2006).

Lentinus strigellus é um fungo comestível e medicinal encontrado na América do Sul, sendo descrito como fonte de polissacarídeos bioativos (LIN *et al.*, 2004).

Nenhum estudo foi encontrado na literatura sobre a identificação de seus metabólitos secundários micromoleculares ou acerca do emprego do seu sistema enzimático em biocatálise, justificando o estudo químico desse fungo.

Assim, os objetivos geral e específicos deste trabalho são:

- Objetivo geral
 - ✓ Investigar o potencial químico de *Lentinus strigellus*.
- Objetivos específicos
 - ✓ Isolar e caracterizar metabólitos secundários de *L. strigellus* a partir de extratos orgânicos obtidos dos micélios e meios de culturas do microrganismo;
 - ✓ Empregar células em crescimento de *L. strigellus* em reações de redução de compostos carbonílicos pró-quirais;

Além desta introdução (Capítulo 1), esta tese apresenta cinco outros capítulos: 2- Considerações Taxonômicas; 3-Levantamento Bibliográfico; 4-Resultados e Discussão; 5-Parte Experimental; 6-Conclusão.

Esta tese foi desenvolvida em parceria com os seguintes laboratórios: Laboratório de Bioquímica Micromolecular, do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (UFSCAR) - Projeto de Cooperação Acadêmica CAPES/PROCAD-2005 “Nucleação e Consolidação de Grupos Atuando em Química de Microrganismos na UFC e UFPA” - e Laboratório de Bioorgânica, do Departamento de Química da Universidad de Oviedo (Espanha) - Projeto de Cooperação internacional CAPES/DGU “Otimização de processos biocatalíticos para a síntese de compostos orgânicos”.

The image shows two fuzzy, brown, spherical fungi growing on a piece of weathered wood. The fungi have a dense, hair-like texture and are positioned on the left and right sides of the frame. The wood is dark and textured, with some lighter patches. The background is blurred, showing some green leaves and brown twigs. The text "CONSIDERAÇÕES TAXONÔMICAS" is overlaid in the center in a bold, black, serif font.

**CONSIDERAÇÕES
TAXONÔMICAS**

2. CONSIDERAÇÕES TAXONÔMICAS

2.1 O Gênero *Lentinus*

O gênero *Lentinus* Fr. (Polyporaceae) é caracterizado por possuir basidioma clicibóide, pinelado, estipado e lamelado, firme; estipe excêntrico a subcentral confluyente com o píteo; sistema hifal dimítico; lamelas finas, duras, geralmente serrilhadas; basidiósporos hialinos, elípticos e lisos (DA LUZ, 2008). Este gênero tem uma distribuição mundial, mas as suas espécies ocorrem mais abundantemente em regiões tropicais. Os basidiocarpos são freqüentemente duros, com consistência quase que lenhosa, e são mais persistentes que os membros típicos dos Agaricales. Esta característica é a principal causa da sua abundância na natureza e freqüentemente representa o grupo dominante de fungos de agaricoide nas florestas tropicais, sendo resistente até mesmo a períodos adversos de seca (VARGAS-ISLA; ISHIKAWA, 2008). Estudos de etinomicologia identificaram diferentes espécies de cogumelos do gênero de *Lentinus* consumidas por grupos indígenas. As espécies *Lentinus crinitus* (L.) Fr., *L. velutinus* Fr., *L. glabratus* Mont., *L. cubensis* Berk., *L. strigosus* (Schwein.) Fr. são consumidas pelo grupo Yanomami, na Amazônia brasileira (VARGAS-ISLA; ISHIKAWA, 2008). O grupo indígena Uitoto, localizado em Araracuara, na Amazônia colombiana, consome *L. strigosus*, *L. concavus* (Berk.), *L. crinitus*, e *L. scleropus* (Pers.) Fr. (VARGAS-ISLA; ISHIKAWA, 2008).

2.2 A Espécie *Lentinus strigellus*

Lentinus strigellus Berk. (Fig. 1) é um cogumelo comestível pertencente à sub-classe Agaricomycetidae. Este basidiomiceto é encontrado freqüentemente em países tropicais, principalmente na América Latina (México, Cuba, Guadalupe, Brasil, Paraguai, Colômbia, Venezuela, Peru e Argentina), e normalmente crescem em ramos podres ou madeira enterrada. Comparado com outros cogumelos comestíveis, como *Lentinula edodes* (Berk) Singer, esse macrofungo é considerado um novo membro da família dos cogumelos medicinais (LIN *et al.*, 2004).



Figura 1: Cultura de *L. strigellus* em BDA (A) e na forma de cogumelo (B)



**LEVANTAMENTO
BIBLIOGRÁFICO**

3. LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO

3.1 Metabólitos Secundários do Gênero *Lentinus*

Os microrganismos têm se destacado como fonte de metabólitos secundários biologicamente ativos, com estruturas variadas e com aplicação no desenvolvimento de novos agentes farmacêuticos (JANG *et al.*, 2006).

Várias espécies de cogumelos têm sido avaliadas, tanto por seu valor nutricional, quanto por suas propriedades farmacológicas, uma vez que são alimentos fisiologicamente benéficos. Além disso, algumas espécies têm efeitos terapêuticos frente a vários tipos de doenças. Dentre as diversas propriedades fisiológicas apresentadas, destacam-se: manutenção da homeostase, regulação do biorritmo, prevenção de doenças como o câncer e doenças do coração, redução da pressão arterial e diminuição do nível de colesterol no sangue (WASSER; WEIS, 1999). Das 10.000 espécies de cogumelos conhecidos, cerca de 700 delas são consideradas comestíveis e mais de 200 têm valor medicinal, embora uma pequena parcela desses cogumelos seja própria para consumo (CHANG, 1996). Entre as espécies de cogumelos comestíveis, apenas 20 são produzidas comercialmente, destacando-se *Agaricus bisporus* (Champignon), *Volvariella volvacea* (Cogumelo de palha), *Pleurotus ostreatus* (Hiratake), *Auricularia aurícula* e *Lentinula edodes* (Shiitake) (CHANG, 1996).

Mais de 40 espécies do gênero *Lentinus* são conhecidas nos países tropicais, onde também são consumidas. As espécies *Lentinus crinitus* (L.) Fr., *L. velutinus* Fr., *L. glabratus* Mont., *L. cubensis* Berk. e *L. strigosus* (Schwein.) Fr. são consumidas pelo grupo indígena Yanomami, na Amazônia brasileira (VARGAS-ISLA; ISHIKAWA, 2008), e *L. strigellus* é considerada medicinal (LIN *et al.*, 2004).

A importância econômica e biológica de espécies deste gênero justificou a realização de um levantamento bibliográfico acerca dos seus metabólitos secundários descritos na literatura. Este levantamento foi realizado através de pesquisa na base de dados do *Chemical Abstracts*, até o ano de 2008.

A investigação dos constituintes voláteis de *Lentinus* é bastante restrita na literatura, sendo descrito apenas o estudo do corpo de frutificação de *L. lepideus*, sendo identificados 43 compostos, dos quais 19 eram sesquiterpenos (WU *et al.*, 2006). Os compostos mais abundantes foram o ácido hexadecanóico e o 2-vinil malonato de

metila e propila. Os compostos nonanal, (*E*)-2-nonenal, germacreno D, ácido nonanóico e 2-vinil malonato de metila e propila foram identificados como os responsáveis pelo aroma característico deste cogumelo.

A investigação química do gênero *Lentinus* visando à identificação de metabólitos secundários fixos encontra-se descrita para 9 espécies: *L. adharens*, *L. connatus*, *L. crinitus*, *L. degener*, *L. dactyloides*, *L. giganteus*, *L. lepideus*, *L. strigosos* e *L. torulosus*. Dentre estas, destacam-se pela produção de metabólitos secundários as espécies *L. connatus*, *L. crinitus* e *L. strigosus* (Tabela 1).

Tabela 1: Metabólitos secundários isolados de espécies de *Lentinus*

Basidiomiceto	Metabólito Secundário
<i>L. adharens</i>	23
<i>L. connatus</i>	5-6, 8, 15-19, 21
<i>L. crinitus</i>	5-6, 8, 15, 19-22
<i>L. degener</i>	23, 30
<i>L. dactyloides</i>	4
<i>L. giganteus</i>	1-3, 29
<i>L. lepideus</i>	27-28
<i>L. strigosos</i>	9-10, 13-16, 19, 21, 24
<i>L. torulosus</i>	7, 11-12, 16

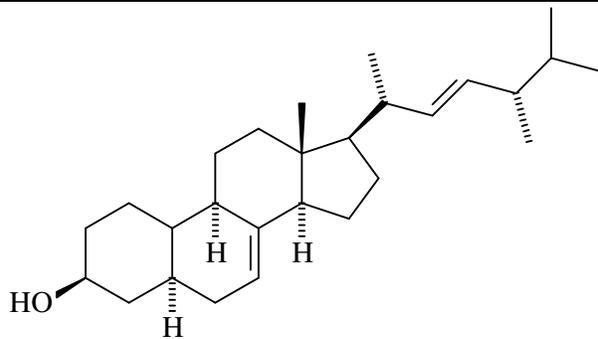
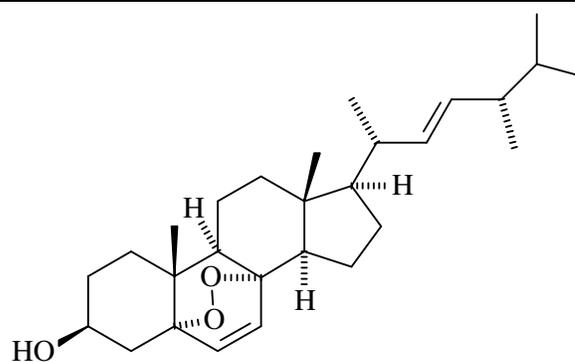
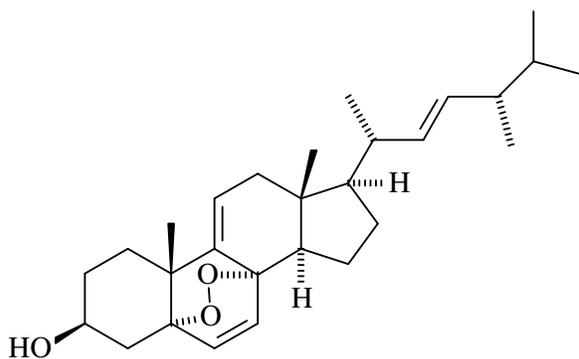
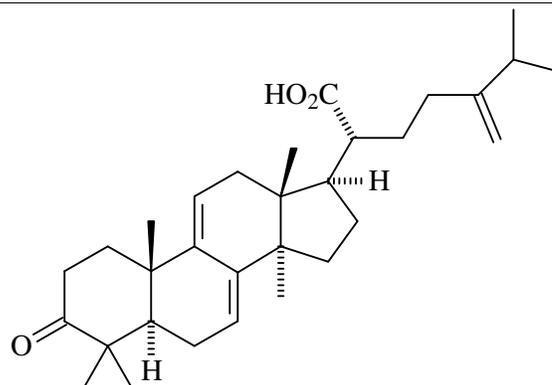
Foram identificados 30 metabólitos secundários isolados de *Lentinus* (Tabela 2, p. 33), os quais se encontram distribuídos em classes diferentes: esteróides (**1-4**), benzopiranos (**5-10**), sesquiterpenos (**17-22, 24-28**), benzoquinona (**23**), ciclohexanonas α,β -epoxidadas e derivados (**11-16**), entre outras (**29-30**).

Nos microrcanismos *L. lepideus* (ABRAHAM; HANSSEN; MOEHRINGER, 1988), *L. crinitus* (ABATE; ABRAHAM, 1994) e *L. connatus* (RUKACHAISIRIKUL

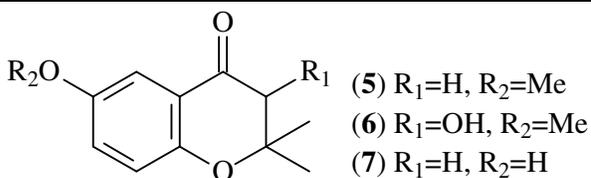
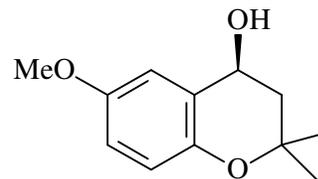
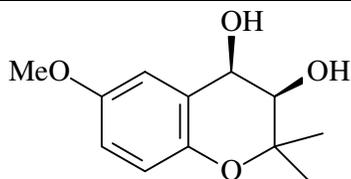
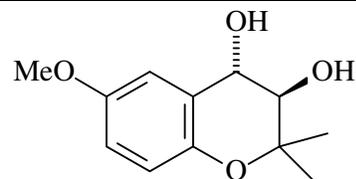
et al., 2005) observou-se uma predominância de sesquiterpenos. Uma benzoquinona foi identificada em *L. degener* (ANCHEL *et al.*, 1948) e *L. adhaerens* (LAUER *et al.*, 1991), benzopiranos foram isolados de *L. crinitus* (ABRAHAM; ABATE, 1995) e *L. connatus* (RUKACHAISIRIKUL *et al.*, 2005) além de ciclohexanonas α,β -epoxidadas de *L. connatus* (RUKACHAISIRIKUL *et al.*, 2005), *L. crinitus* (PETROVA *et al.*, 2005; ERKEL; ANKE; STERNER, 1996; ABRAHAM; ABATE, 1995), *L. strigosus* (COTA *et al.*, 2008; KIS *et al.*, 1970) e *L. torulosus* (KIS *et al.*, 1970), dentre outras classes de compostos.

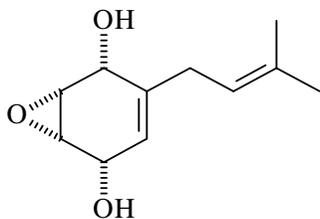
Assim como em outros gêneros, a produção dos metabólitos secundários de *Lentinus* mostrou-se diretamente influenciada pelas condições de crescimento fúngico (temperatura, meio de cultura, tempo de crescimento e etc). Um bom exemplo é o estudo da produção de metabólitos secundários de *L. crinitus* (ABRAHAM; ABATE, 1995), que se mostrou altamente dependente da fonte de carbono utilizada no meio de cultura. Quando lactose foi empregada, observou-se o favorecimento da formação dos antibióticos hipnofilina (**21**) e 1-desoxi-hipnofilina (**22**). A substituição deste açúcar por manose levou à produção de 2,2-dimetil-6-metoxicroman-4-ona (**5**), panepoxidona (**15**) e dihidro-hipnofilina (**19**) como constituintes majoritários.

Os metabólitos isolados deste gênero foram, principalmente, isolados de extratos do corpo de frutificação de cogumelos comercializados. Quando cultivados em meio líquido, a maioria dos metabólitos foi isolada a partir de extratos do meio de cultivo, o que mostra que os mesmos são excretados para o meio após sua produção ou formados no próprio meio por enzimas liberadas pelo microrganismo. Os tempos de cultivos utilizados nos estudos descritos na literatura mostraram-se variados, sendo possível encontrar cultivos entre 10 e 105 dias.

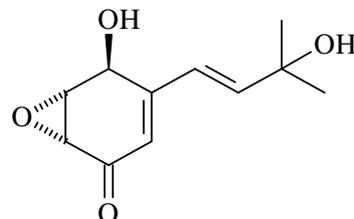
Tabela 2: Estruturas dos metabólitos secundários isolados do gênero *Lentinus*• Estelasterol (1) (GAN *et al.*, 2007)• Peroxido de ergosterol (2) (GAN *et al.*, 2007)• (3 β ,5 α ,8 α ,22E,24R)-5,8-epidioxyergosta-6,9(11),22-trien-3-ol (3) (GAN *et al.*, 2007)

• Ácido dihidroerburicóico (4) (GASCOIGNE; ROBERTSON; SIMES, 1953)

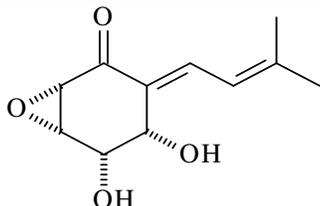
• 2,2-dimetil-6-metoxicroman-4-ona (5) (ABRAHAM; ABATE, 1995; RUKACHAISIRIKUL *et al.*, 2005)• 3-hidroxi-2,2-dimetil-6-metoxicroman-4-ona (6) (ABRAHAM; ABATE, 1995; RUKACHAISIRIKUL *et al.*, 2005)• 6-hidroxi-2,2-dimetil-6-metoxicroman-4-ona (7) (KIS *et al.*, 1970)• 4-hidroxi-2,2-dimetil-6-metoxicromano (8) (ABRAHAM; ABATE, 1995; RUKACHAISIRIKUL *et al.*, 2005)• (±)-*cis*-3,4-dihidroxi-2,2-dimetil-6-metoxicroman-4-ona (9) (KIS *et al.*, 1970)• (±)-*trans*-3,4-dihidroxi-2,2-dimetil-6-metoxicroman-4-ona (10) (KIS *et al.*, 1970)



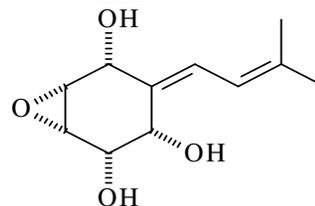
• 7-desidropanepoxidol (**11**) (KIS *et al.*, 1970)



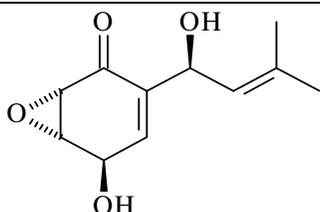
• Isopanepoxidona (**12**) (KIS *et al.*, 1970)



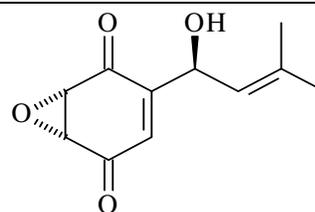
• Neopanepoxidona (**13**) (KIS *et al.*, 1970)



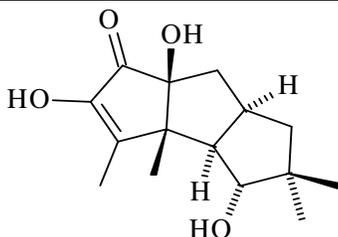
• Neopanepoxidol (**14**) (COTA *et al.*, 2008; KIS *et al.*, 1970)



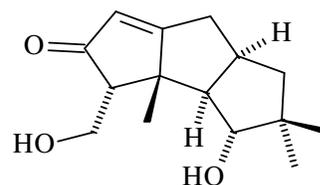
• Panepoxidona (**15**) (ABRAHAM; ABATE, 1995; ERKEL; ANKE; STERNER, 1996; KIS *et al.*, 1970; PETROVA *et al.*, 2005; RUKACHAISIRIKUL *et al.*, 2005)



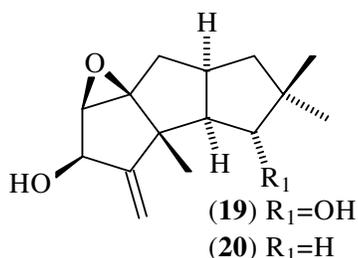
• Panepoxidona (**16**) (COTA *et al.*, 2008; KIS *et al.*, 1970; RUKACHAISIRIKUL *et al.*, 2005)



• Connatus A (**17**) (RUKACHAISIRIKUL *et al.*, 2005)

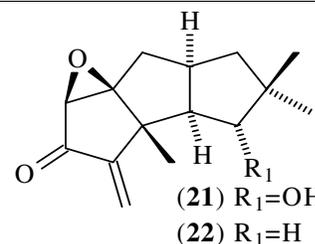


• Connatus B (**18**) (RUKACHAISIRIKUL *et al.*, 2005)



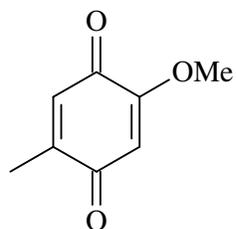
• Dihidrohipnofilina (**19**) (ABATE *et al.*, 1994; ABRAHAM; ABATE 1995; COTA *et al.*, 2008; RUKACHAISIRIKUL *et al.*, 2005)

• (**20**) (ABRAHAM; ABATE, 1995; ABATE; ABRAHAM, 1994)

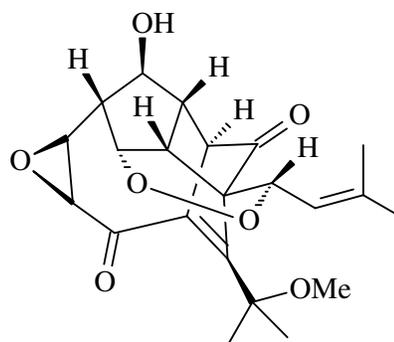


• Hipnofilina (**21**) (ABRAHAM; ABATE, 1995; ABATE; ABRAHAM, 1994; COTA *et al.*, 2008; RUKACHAISIRIKUL *et al.*, 2005)

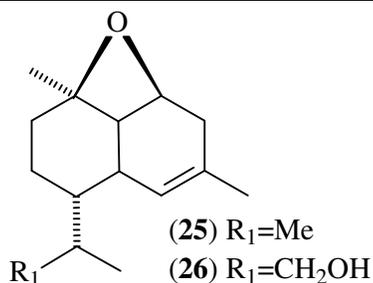
• 1-desoxi-hipnofilina (**22**) (HARROWVEN; LUCAS; HOWES, 2000; ABRAHAM; ABATE, 1995; ABATE; ABRAHAM, 1994)



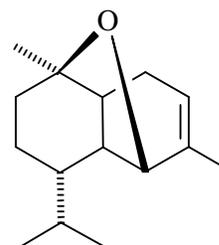
- 5-metil-2-metoxi-1,4-benzoquinona (23) (ANCHEL *et al.*, 1948 ; LAUER *et al.*, 1991)



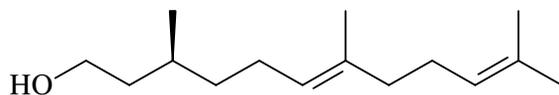
- Henaciclinalol (24) (SCHLEGEL *et al.*, 2003)



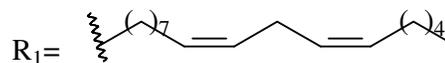
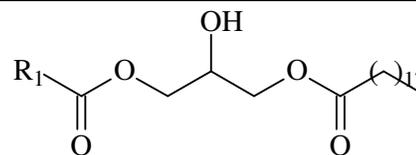
- Lentideuseter (25) (ABRAHAM; HANSSEN; MOEHRINGER, 1988)
- 10-hidroxilentideuseter (26) (ABRAHAM; HANSSEN; MOEHRINGER, 1988)



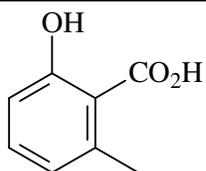
- Isolentideuseter (27) (ABRAHAM; HANSSEN; MOEHRINGER, 1988)



- Terrestrol (28) (ABRAHAM; HANSSEN; MOEHRINGER, 1988)



- (29) (GAN *et al.*, 2007)



- Ácido 6-metilsalicílico (30) (PETTERSON, 1966)

3.2 Cromanos e Croman-4-onas de Origem Fúngica

O isolamento de três cromanos e uma croman-4-ona de *L. strigellus* justificou a realização de um levantamento bibliográfico dessa classe de metabólitos secundários, com ênfase nos cromenos de origem fúngica. O levantamento bibliográfico foi realizado na base de dados do *Chemical Abstracts*, sem restrição de período.

Cromanos e croman-4-onas podem ser classificados como benzopiranos (Fig. 2). Esta classe encontra-se amplamente distribuída em plantas e fungos e tem chamado a atenção de químicos e farmacêuticos por exibirem um amplo espectro de atividades biológicas, como inseticida, antifúngica e antibacteriana, ou ainda como ingrediente em alguns perfumes (MATOS; SOUSA; MORAIS, 2009).

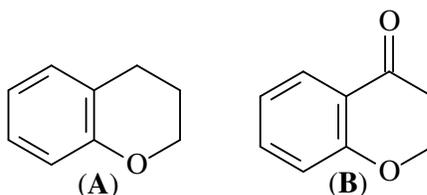


Figura 2: Esqueleto básico dos cromanos (A) e croman-4-ona (B)

Desde a descoberta dos benzopiranos, a nomenclatura destes compostos teve muitas alterações, sendo encontradas na literatura várias formas de numeração do sistema de anéis. Nos últimos anos, observa-se a predominância da numeração apresentada na Figura 3.

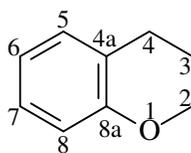


Figura 3: Numeração do esqueleto básico dos cromanos e croman-4-onas

Um total de 55 compostos de origem fúngica foi encontrado no levantamento bibliográfico (Tabela 4, p. 39), os quais foram isolados de 27 espécies de fungos filamentosos (Tabela 3, p. 37).

Tabela 3: Croman-4-onas e cromanos isolados de fungos

Fungo	Croman-4-ona	Cromano
<i>Aposphaeria</i> sp	37-38	
<i>Aspergillus duricaulis</i>	47-48	69-72
<i>Aspergillus fonsecaeus</i>	47, 49-51	
<i>Blennoria</i> sp	55-57, 59-62	
<i>Burkholderia</i> sp	35	
<i>Chaetomium globosum</i>	58	
<i>Coniothyrium minitans</i>		66-68
<i>Fusarium equiseti</i>	65	
<i>Fusarium oxysporum</i>	65	
<i>Fusarium roseum</i>	65	
<i>Fusarium sporotrichioides</i>	65	
<i>Gliocladium</i> sp	54	
<i>Kionochaeta pughii</i>	36	73
<i>Lentinus connatus</i>	5	8
<i>Lentinus crinitus</i>	5, 7	
<i>Monodictys putredinis</i>	31-32	
<i>Paecilomyces</i> sp	54, 63-64	74
<i>Panus conchatus</i>	6	
<i>Panus rudis</i>		9-10
<i>Paraphaeosphaeria quadrisepata</i>	44	
<i>Penicillium frequentans</i>	53	
<i>Periconia siamensis</i>	34	
<i>Phoma pigmentivora</i>	33, 40-43, 45, 52	
<i>Phoma</i> sp	39	
<i>Siphula ceratites</i>	46	
<i>Stachybotrys microspora</i>		75-81

Foram encontradas 37 estruturas de croman-4-onas e 18 de cromanos, sendo as espécies fúngicas *Blennoria* sp e *Stachybotrys microspora*, respectivamente, as maiores produtoras (7 compostos cada) destas duas classes de metabólitos secundários. Para o gênero *Lentinus* encontra-se descrito o isolamento de três croman-4-onas e três cromanos. Nas espécies *Lentinus connatus*, *Aspergillus duricaulis*, *Kionochaeta pughii* e *Paecilomyces* sp foram encontrados tanto croman-4-onas quanto cromanos.

Quase todos os compostos são substituídos na posição 2, tendo como exceção a citomicetina (**6**), isolada de *Penicillium frequentans* (DEMETRIADOU *et al.*, 1988), e os compostos **69-72**, isolados de *Aspergillus duricaulis* (SAENGCHANTARA; WALLACE, 1986).

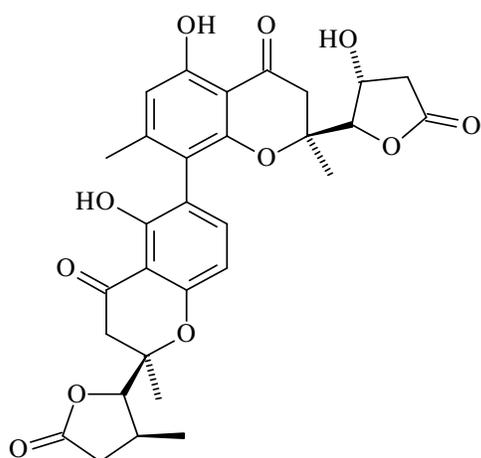
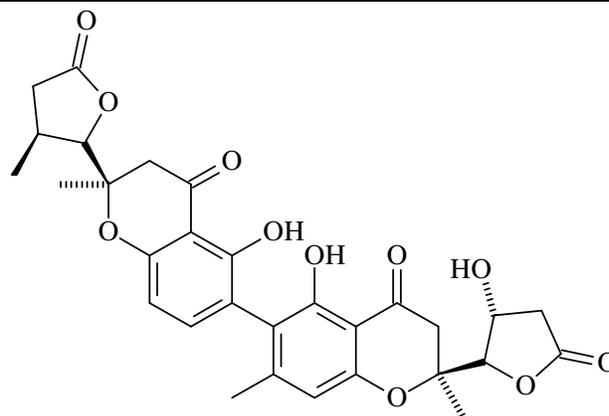
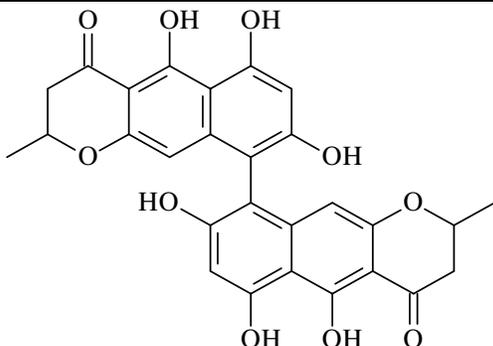
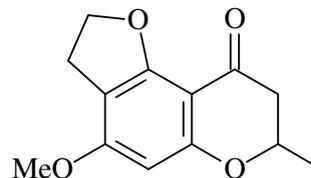
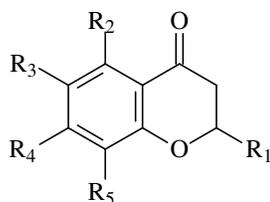
O único cromano que apresenta um sistema espiroacetal em sua estrutura é a paecilospirona (**74**), a qual foi isolada do fungo *Paecilomyces* sp. e possui atividade antitumoral (NAMIKOSHI *et al.*, 2000).

Dentre todos os compostos desta classe de origem fúngica, foram isolados doze dímeros: monodictiocroma A (**31**) e B (**32**), isolados do fungo marinho *Monodictys putredinis* (PONTIUS *et al.*, 2008); cefalocromina (**33**), um pigmento isolado de *Phoma pigmentivora* (MCGAHREN *et al.*, 1972); aurasperona B (**47**), aurasperona C (**48**), fonseciona B (**49**), fonseciona C (**50**) e fonseciona D (**51**), naftocromanonas isoladas de espécies de *Aspergillus* (SAENGCHANTARA; WALLACE, 1986); ácido secalonico D (**54**), isolado dos fungos *Paecilomyces* sp e *Gliocladium* sp e que mostrou uma atividade citotóxica frente células KB ($IC_{50} < 1 \mu\text{g ml}^{-1}$) e inibidora da topoisomerase humana (IC_{50} de $0,16 \mu\text{mol ml}^{-1}$) (GUO *et al.*, 2007); Paecilina A (**63**), isolado de *Paecilomyces* sp (GUO *et al.*, 2007); SMTP 7 (**80**) e SMTP 8 (**81**), dois cromanos isolados de *Stachybotrys microspora* (HU *et al.*, 2000).

De *Stachybotrys microspora*, uma série de compostos com o grupo *N*-carboxibutílica (**75-81**) foi isolada. Este grupo presente nas moléculas é derivado dos aminoácidos serina, fenilalanina, leucina ou triptofano (HASUMI *et al.*, 1998).

Através deste levantamento bibliográfico, foi ainda possível observar que os compostos 2,2-dimetil-6-metoxicroman-4-ona (**5**), 4-hidroxi-2,2-dimetil-6-metoxicromano (**8**), 3*S*,4*S*-dihidroxi-2,2-dimetil-6-metoxicromano (**9**) e 3*R*,4*S*-dihidroxi-2,2-dimetil-6-metoxicromano (**10**), descritos pela primeira vez neste trabalho como metabólito secundário de *L. strigellus*, foram anteriormente isolados de *L. connatus* (**5, 8**), *L. crinitus* (**5, 8**) e *Panus rudis* (*L. strigosus*) (**9-10**), sendo que os dois últimos foram isolados como racematos.

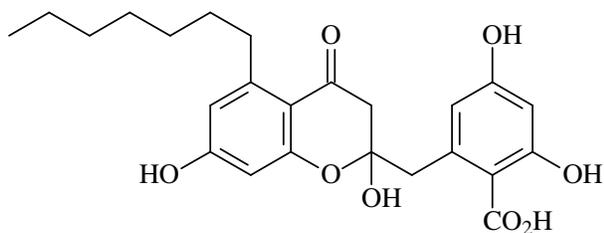
Tabela 4: Estruturas de cromanos e croman-4-onas de origem fúngica

• Monodictiocromona A (31) (PONTIUS *et al.*, 2008)• Monodictiocromona B (32) (PONTIUS *et al.*, 2008)• Cefalocromina (33) (MACGAHREN *et al.*, 1972)• (45) (MACGAHREN *et al.*, 1972)(34) R₁=Me, R₂=H, R₃=OH, R₄=H, R₅=H(35) R₁=CH₂OH, R₂=H, R₃=H, R₄=H, R₅=H(36) R₁=Me, R₂=H, R₃=H, R₄=OH, R₅=H(37) R₁=CHCHCH₂CH₂CH₃, R₂=CH₂CO₂H, R₃=H, R₄=OMe, R₅=OH(38) R₁=CHCHCH₂CH₂CH₃, R₂=CH₂CO₂Et, R₃=H, R₄=OH, R₅=H(39) R₁=Me, R₂=OMe, R₃=H, R₄=OH, R₅=CH₂CH₂OH(40) R₁=Me, R₂=OH, R₃=CH₂CH₂OH, R₄=OMe, R₅=H(41) R₁=Me, R₂=OH, R₃=CH₂CH₂COCH₃, R₄=OMe, R₅=H(42) R₁=Me, R₂=OH, R₃=H, R₄=H, R₅=H(43) R₁=Me, R₂=H, R₃=CO₂H, R₄=H, R₅=OH(44) R₁=CHCHCH₂CH₂CH₃, R₂=CH₂CO₂H, R₃=H, R₄=OH, R₅=H• 6-hidroxi-2-metilcroman-4-ona (34) (BHILABUTRA *et al.*, 2007)• 2-hidroxi-2-metilcroman-4-ona (35) (KANG *et al.*, 2004)• 7-hidroxi-2-metilcroman-4-ona (36) (PITTAYAKHAJONWUT *et al.*, 2002)• Aposphaeria A (37) (KROHN *et al.*, 1996)• Aposphaeria B (38) (KROHN *et al.*, 1996)

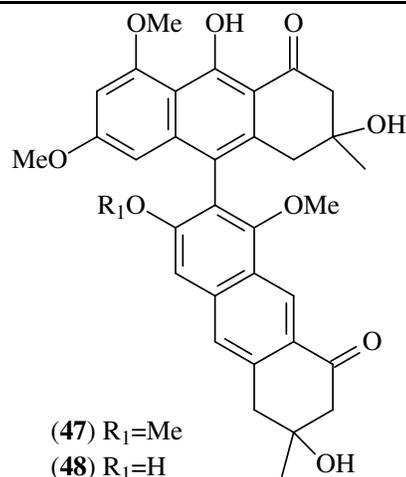
• 7-hidroxi-8(2-hidroxi-2-etil)-5-metoxi-2-metilcroman-4-ona (39) (SAENGCHANTARA; WALLACE, 1986)

• 5-hidroxi-7(2-hidroxi-2-etil)-7-metoxi-2-metilcroman-4-ona (40) (MACGAHREN *et al.*, 1972)• 5-hidroxi-6(3-oxobutil)-7-metoxi-2-metilcroman-4-ona (41) (MACGAHREN *et al.*, 1972)• 5-hidroxi-2-metilcroman-4-ona (42) (MACGAHREN *et al.*, 1972)• Ácido roselinico (43) (MACGAHREN *et al.*, 1972)

• Aposphaerina C (44) (WIJERATNE; PARANAGAMA; GUNATILAKA, 2006)



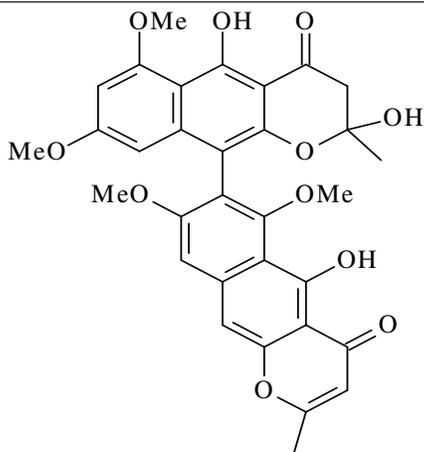
- Oxisipulina (**46**) (SAENGCHANTARA; WALLACE, 1986)



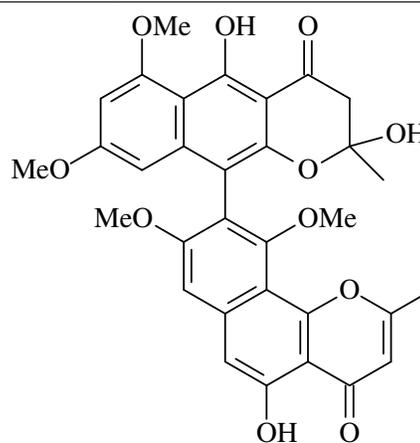
(**47**) $R_1=Me$

(**48**) $R_1=H$

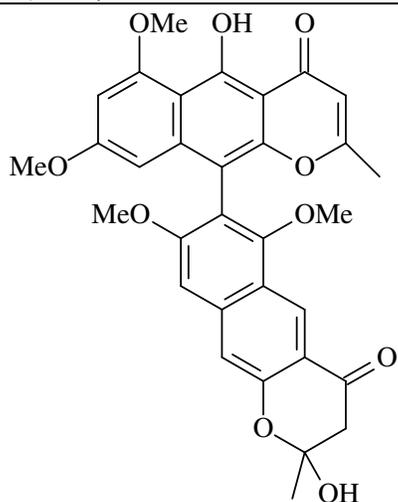
- Aurasperona B (**47**) (SAENGCHANTARA; WALLACE, 1986)
- Aurasperona C (**48**) (SAENGCHANTARA; WALLACE, 1986)



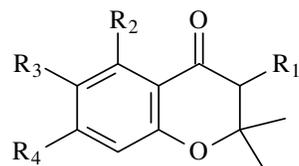
- Fonsecainona B (**49**) (SAENGCHANTARA; WALLACE, 1986)



- Fonsecainona C (**50**) (SAENGCHANTARA; WALLACE, 1986)



- Fonsecainona D (**51**) (SAENGCHANTARA; WALLACE, 1986)



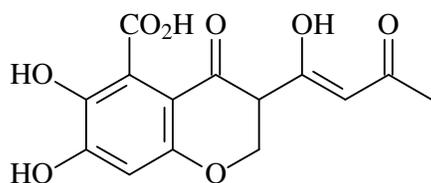
(**5**) $R_1=H, R_2=H, R_3=OMe$

(**52**) $R_1=H, R_2=H, R_3=CHO$

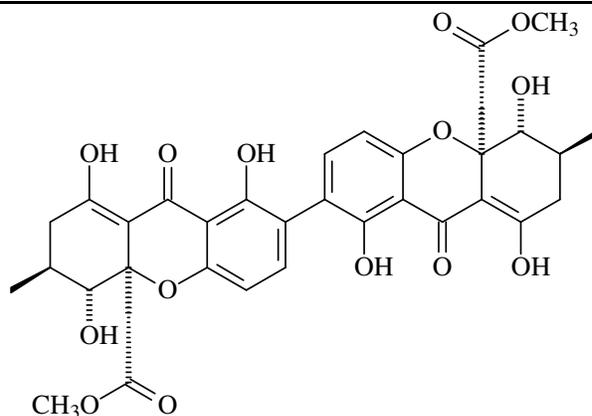
(**6**) $R_1=OH, R_2=H, R_3=OMe$

(**7**) $R_1=H, R_2=H, R_3=OH$

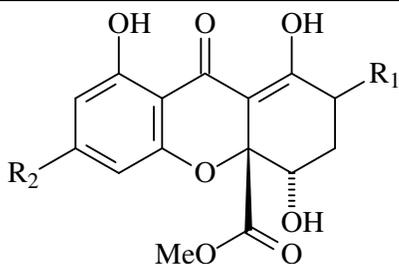
- 2,2-dimetil -6-metoxicroman-4-ona (**5**) ABRAHAM; ABATE, 1995; RUKACHAISIRIKUL *et al.*, 2005)
- (**52**)(MACGAHREN *et al.*, 1972)
- (*S*)-3-hidroxi-2,2-dimetil-6-metoxicroman-4-ona (**6**) (ABRAHAM; ABATE, 1995)
- 6-hidroxi-2,2-dimetilcroman-4-ona (**7**) (KIS *et al.*, 1970)



- Citomicetina (**53**) (DEMETRIADOU *et al.*, 1985)



- Ácido secalônico D (**54**) (GUO *et al.*, 2007; REN *et al.*, 2005)

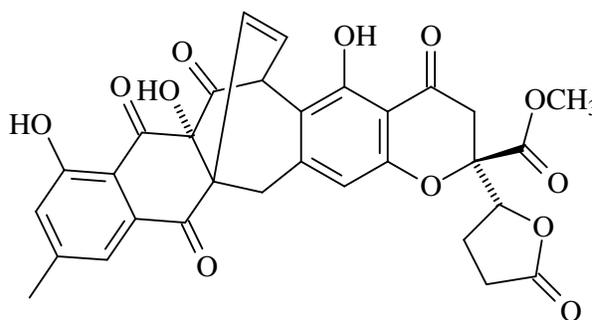


(**55**) $R_1 = \text{Me}$, $R_2 = \text{H}$

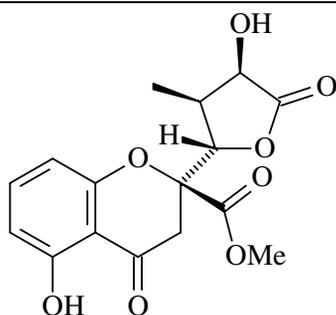
(**56**) $R_1 = \text{Me}$, $R_2 = \text{H}$

(**57**) $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{Me}$

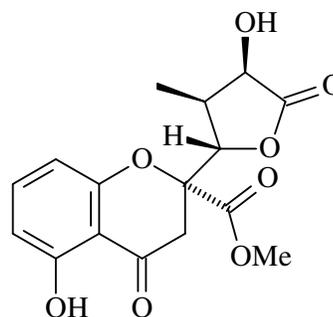
- Blennolido A (**55**) (ZHANG *et al.*, 2008)
- Blennolido B (**56**) (ZHANG *et al.*, 2008)
- Blennolido C (**57**) (ZHANG *et al.*, 2008)



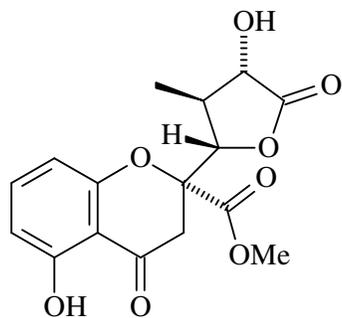
- Chaetomanona (**58**) (KANOKMEDHAKUL *et al.*, 2002)



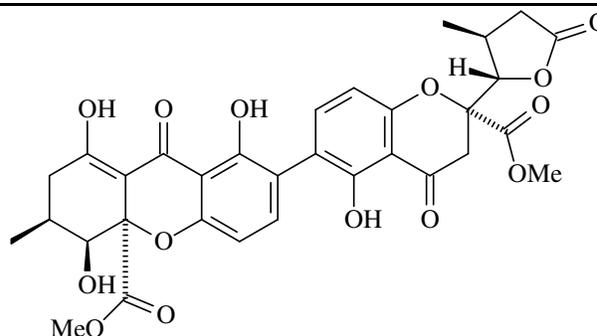
- Blenolido D (**59**) (ZHANG *et al.*, 2008)



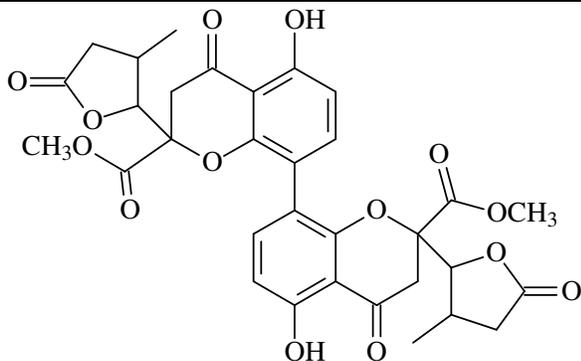
- Blenolido E (**60**) (ZHANG *et al.*, 2008)



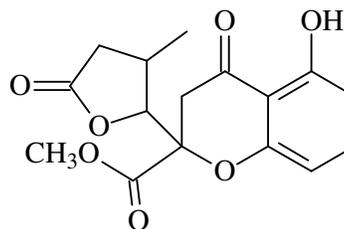
• Blenolido F (**61**) (ZHANG *et al.*, 2008)



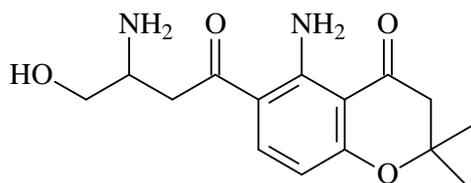
• Blenolido G (**62**) (ZHANG *et al.*, 2008)



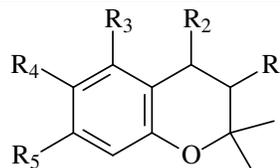
• Paecilina A (**63**) (GUO *et al.*, 2007)



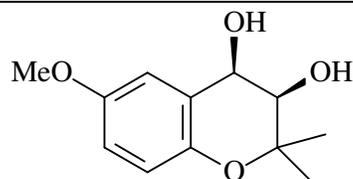
• Paecilina B (**64**) (GUO *et al.*, 2007)



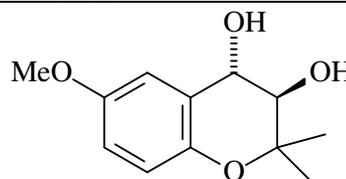
• Fusarocromanona (**65**) (MIROCHA *et al.*, 1989; MORRISON *et al.*, 2002; PATHRE *et al.*, 1986)



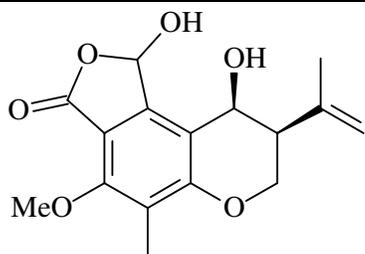
- (**8**) $R_1=H$, $R_2=OH$, $R_3=H$, $R_4=OMe$, $R_5=H$
- (**66**) $R_1=\alpha OH$, $R_2=\beta OH$, $R_3=H$, $R_4=COMe$, $R_5=H$
- (**67**) $R_1=\beta OH$, $R_2=\beta OH$, $R_3=H$, $R_4=COMe$, $R_5=H$
- (**68**) $R_1=\alpha OH$, $R_2=\beta OH$, $R_3=H$, $R_4=CHOHMe$, $R_5=H$
- 4-hidroxi-2,2-dimetil-6-metoxicromano (**8**) (ABRAHAM; ABATE, 1995; RAKUCHAISIRIKUL *et al.*, 2005)
- (3*S*,4*R*)-3,4-dihidroxi-6-carboxi-2,2-dimetilcromano (**66**) (MACHIDA *et al.*, 2001)
- (3*R*,4*R*)-3,4-dihidroxi-6-acetoxi-2,2-dimetilcromano (**67**) (MACHIDA *et al.*, 2001)
- (3*S*,4*R*)-3,4-dihidroxi-6-(1-hidroxietil)-2,2-dimetilcromano (**68**) (MACHIDA *et al.*, 2001)



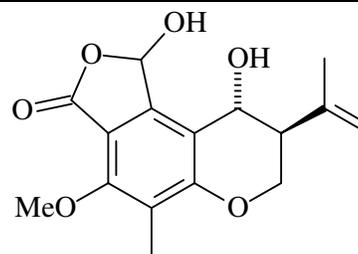
• (±)-*cis*-3,4-dihidroxi-2,2-dimetil-6-metoxicromano (**9**) (KIS *et al.*, 1970)



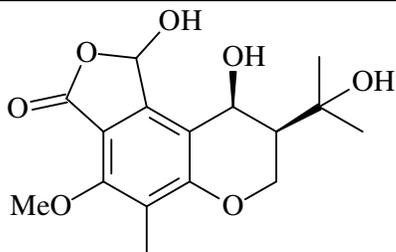
• (±)-*trans*-3,4-dihidroxi-2,2-dimetil-6-metoxicromano (**10**) (KIS *et al.*, 1970)



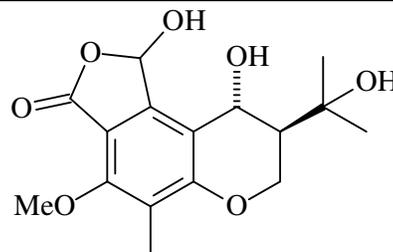
• (69) (SAENGCHANTARA; WALLACE, 1986)



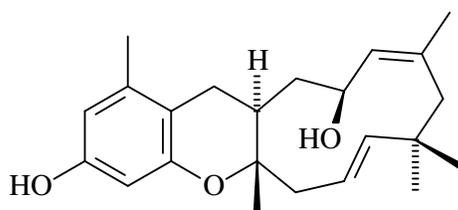
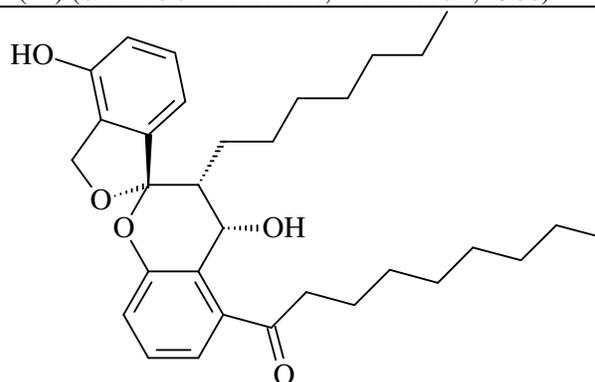
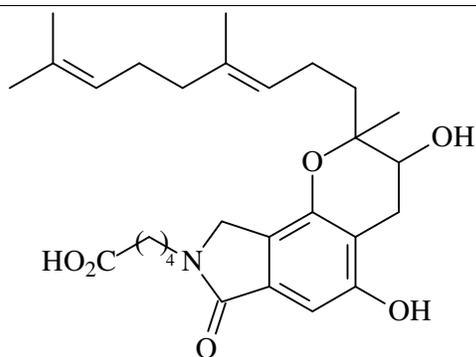
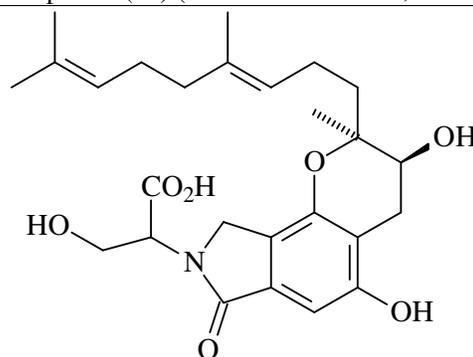
• (70) (SAENGCHANTARA; WALLACE, 1986)

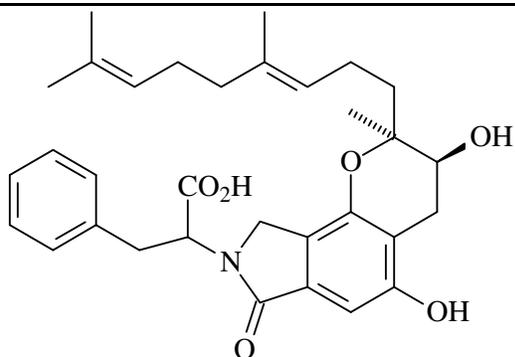
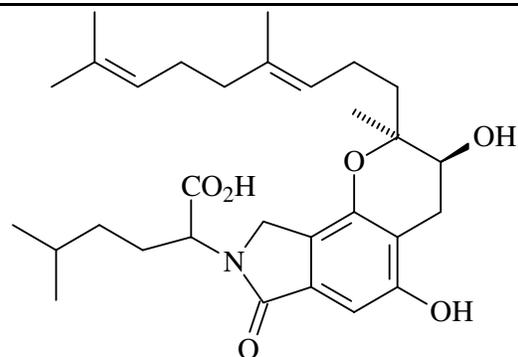
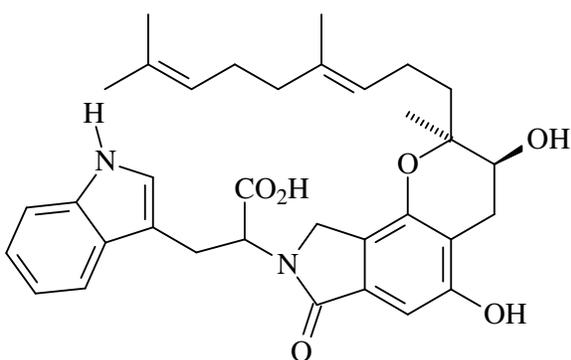
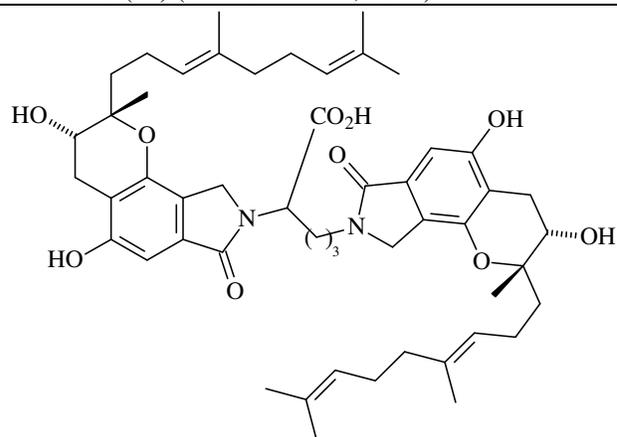


• (71) (SAENGCHANTARA; WALLACE, 1986)

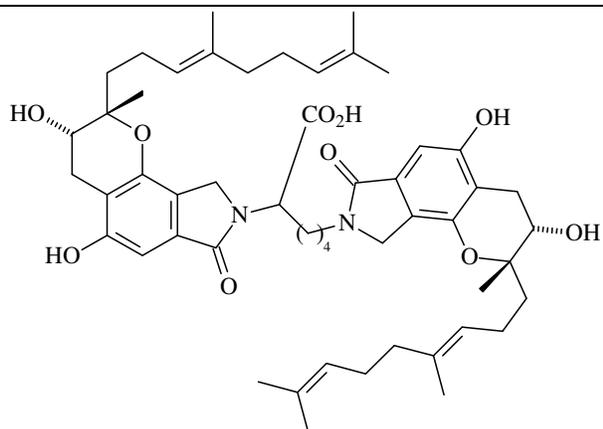


• (72) (SAENGCHANTARA; WALLACE, 1986)

• Pughinina (73) (PITTAYAKHAJONWUT *et al.*, 2002)• Paecilospirona (74) (NAMIKOSHI *et al.*, 2000)• Estaplabina (75) (HASUMI *et al.*, 1998)• SMTP 3 (76) (HASUMI *et al.*, 1998)

• SMTP 4 (77) (HASUMI *et al.*, 1998)• SMTP 5 (78) (HASUMI *et al.*, 1998)• SMTP 6 (79) (HASUMI *et al.*, 1998)

• SMTP 7 (80) (HU; OHYAMA; HASUMI, 2000)



• SMTP 8 (81) (HU; OHYAMA; HASUMI, 2000)

The image shows two small, spherical mushrooms with a very fuzzy, almost hair-like texture. They are a light brown or tan color. One mushroom is positioned slightly higher and to the left of the other. They are growing on a piece of weathered, greyish-brown wood that has a rough, cracked surface. The background is out of focus, showing some green leaves and brown twigs, suggesting a natural, outdoor setting. The text 'RESULTADOS E DISCUSSÃO' is overlaid in the center of the image in a bold, black, serif font.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Isolamento e Identificação de Metabólitos Secundários

4.2.1 Isolamento e Identificação de LS1

Durante a concentração do extrato acetato de etila do micélio de *L. strigellus*, crescido em meio de peptona sob condições estáticas (Item 5.7.1, p. 189), observou-se a formação de um precipitado (37,7 mg). Depois de separado, o material foi purificado por cromatografia em camada delgada em gel de sílica, eluída com hexano/acetato de etila 50%, e forneceu 16,2 mg de um sólido amorfo branco (p.f. = 237-241°C), denominado de LS1 (Item 5.8.1, p. 190).

O espectro de massa (Fig. 6, p. 50) de LS1 apresentou o pico íon molecular com razão massa/carga igual a 461 daltons, sugerindo se tratar de um composto com um número ímpar de átomos de nitrogênio.

O espectro de RMN ^1H (Fig. 7, p. 50) de LS1 apresentou três simpletos em 9,61, 9,37 e 8,78 δ para um hidrogênio cada, os quais foram atribuídos a hidrogênios ligados a átomo de nitrogênio. Foram também observados dois sinais referentes a hidrogênios de anel aromático em 7,73 (1H, s) e 7,08 δ (1H, s); sinais em 3,57 (2H, d, $J=7,3$ Hz), 5,62 (1H, tl, $J=6,7$ Hz), 1,75 (3H, s) e 1,72 δ (3H, s), que juntos caracterizaram a presença de uma isoprenila (3,3-dimetilalila) com metilas magneticamente diferentes; sinais em 3,59 (2H, d, $J=7,8$ Hz), 5,48 (1H, tl, $J=6,7$ Hz), 1,61 (3H, s) e 1,68 δ (3H, s), que indicaram a presença de um segundo grupo isoprenila (3,3-dimetilalila) na molécula; sinais em 6,30 (1H, dd, $J=10,4$ e 17,4 Hz), 5,15 (1H, d, $J=10,4$ Hz), 5,18 (1H, d, $J=17,4$ Hz), 1,61 (3H, s) e 1,59 (3H, s) atribuídos a um grupo 1,1-dimetilalila ligado a carbono sp^2 , com hidrogênios metílicos magneticamente diferentes e hidrogênios terminais diastereotópicos; sinais em 4,80 (2H, dl, $J=11,3$ Hz), 4,38 (1H, ql, $J=7,1$ Hz), 4,11 (1H, d, $J=14,3$ Hz), 3,65 (1H, d, $J=11,7$ Hz) e 1,78 (3H, d, $J=7,1$ Hz), este último referente a uma metila ligada a carbono metínico.

O espectro de RMN ^{13}C -BB (Fig. 10, p. 52) para essa substância apresentou vinte e oito sinais, dentre eles dois (169,1 e 169,0 δ) atribuídos a duas carbonilas de lactama e treze sinais entre 147,5 - 107,1 δ associados a carbonos sp^2 . Como o espectro de RMN ^1H sugeriu a presença de duas isoprenilas, os sinais em 132,7, 131,5, 126,0, 124,1, 35,5, 31,0, 26,2, 26,2, 18,3 e 18,1 δ foram atribuídos a estes dois grupamentos na

molécula. A presença do grupo 1,1-dimetilalila foi confirmada através dos sinais em 147,5, 111,9, 40,0 e 28,8 δ , sendo o último atribuído a dois carbonos. O espectro mostrou ainda os sinais em 57,3, 52,1, 33,0 e 22,2 δ .

Comparação entre os espectros de RMN ^{13}C -DEPT 135° (Fig. 13, p. 53) e ^{13}C -BB revelou a presença de onze carbonos não hidrogenados (C), sete carbonos metínicos (CH), quatro carbonos metilênicos (CH_2) e sete carbonos metílicos (CH_3), uma vez que foram sugeridos dois carbonos para o sinal em 28,8 δ .

O espectro de RMN bidimensional HSQC (Fig. 16, p. 55) de LS1 apresentou as correlações dos hidrogênios de anel aromático em 7,73 e 7,08 δ com os respectivos carbonos em 116,4 e 122,8 δ ; dos hidrogênios de olefina em 5,18 e 5,15 δ com o carbono 111,9 δ , confirmando tratar-se de hidrogênios diastereotópicos; em 6,30, 5,62 e 5,48 δ com os carbonos em 147,5, 126,0 e 124,1 δ , respectivamente. Apresentou ainda a correlação dos hidrogênios metilênicos em 4,80 δ com o carbono 57,3 δ ; dos hidrogênios diastereotópicos em 4,10 e 3,65 δ com o carbono 33,0 δ ; dos hidrogênios metílicos em 4,38 δ com o carbono 52,1 δ ; em 3,59 δ com o carbono 31,0 δ ; em 3,57 δ com o carbono 35,5 δ . Foram também observadas as seguintes correlações: dos hidrogênios metílicos em 1,78 δ com o carbono 22,2 δ ; do hidrogênio em 1,75 δ com o carbono 18,3 δ ; do hidrogênio em 1,72 δ com o carbono 26,2 δ ; do hidrogênio em 1,68 δ com o carbono 26,2 δ ; do hidrogênio em 1,61 δ com o carbono 18,1 δ ; dos hidrogênios em 1,61 e 1,59 δ com o carbono 28,8 δ . Esta última correlação corroborou a sugestão de dois carbonos para o sinal em 28,8 δ .

O espectro bidimensional HMBC (Fig. 19, p. 56) de LS1 possibilitou correlacionar os hidrogênios em 7,73 δ com os carbonos em 133,8 (2J), 122,8 (3J), 107,1 (3J) e 35,5 δ (3J); em 7,08 δ com os carbonos 116,4 (3J), 35,5 (3J) e 31,0 δ (3J), que juntos indicam a posição das duas isoprenilas na molécula (Fig. 4, p. 48). A confirmação da presença do grupo 1,1-dimetilalila, bem como sua localização, foi realizada pela correlação dos hidrogênios em 6,30 δ com os carbonos em 40,0 (2J), 28,8 (3J) e 142,4 δ (3J); em 5,18 δ com os carbonos 147,5 (2J) e 40,0 δ (3J); em 5,15 δ com o carbono 40,0 δ (3J); em 1,61 δ com os carbonos 132,7 (2J), 40,0 (2J), 147,5 (3J), 142,4 (3J), 124,1 (3J), 28,8 (3J) e 26,2 δ (3J); em 1,59 δ com os carbonos 147,5 (3J), 142,4 (3J), 124,1 (3J), 40,0 (3J) e 28,8 δ (3J) (Fig. 4, p. 48).

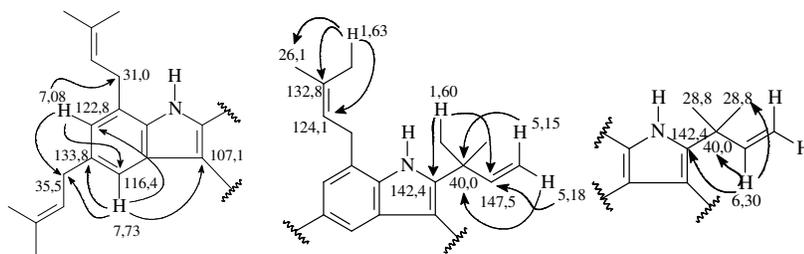


Figura 4: Acoplamentos observados no espectro bidimensional HMBC de LS1: posicionamento das isoprenilas e do sistema dimetilalila na molécula

A presença das isoprenilas na molécula foi ainda confirmada pela correlação a longa distância do hidrogênio em 5,62 δ com os carbonos 35,5 (2J), 26,2 (3J) e 18,3 δ (3J); em 5,56 δ com os carbonos 126,0 (2J), 131,5 (3J), 122,8 (3J) e 116,4 δ (3J); em 1,75 δ com os carbonos 131,5 (2J), 126,0 (3J), 26,2 δ (3J); em 1,72 δ com os carbonos 131,5 (2J), 126,0 (3J), 18,3 δ (3J) para uma das isoprenilas (Fig. 4, p. 48); do hidrogênio em 5,48 δ com o carbono 35,5 (2J), 26,4 (3J) e 18,4 δ (3J); em 3,59 δ com os carbonos 124,1 (2J) e 133,7 δ (3J) e em 1,68 δ com os carbonos 132,7 (2J), 124,1 (3J) e 18,1 δ (3J) para a outra isoprenila (Fig. 4, p. 48). Mostrou ainda a existência de um sistema indólico pela correlação do hidrogênio em 9,61 δ com os carbonos 142,4 (2J), 133,7 (2J), 130,8 (3J) e 107,1 δ (3J); além do acoplamento dos hidrogênios metilênicos diastereotópicos em 4,11 e 3,65 δ com os carbonos 107,1 (2J), 57,5 (2J), 169,0 (3J), 142,4 (3J) e 130,8 δ (3J) mostram que este se encontra ligado ao anel indólico e a um grupamento 6-metilpiperazino-2,5-diona, sendo a presença deste mostrada pelas correlações dos hidrogênios em 4,80 δ com o carbono 169,0 δ (2J); em 4,38 δ com os carbonos 169,1 (2J) e 22,2 δ (2J); em 1,78 δ com os carbonos 52,1 (2J) e 169,1 δ (3J); em 9,37 δ com os carbonos 169,1 (2J) e 57,3 (2J); em 8,78 δ com os carbonos 169,0 (2J) e 52,1 δ (2J) δ (Tab. 5, p. 49, Fig. 5).

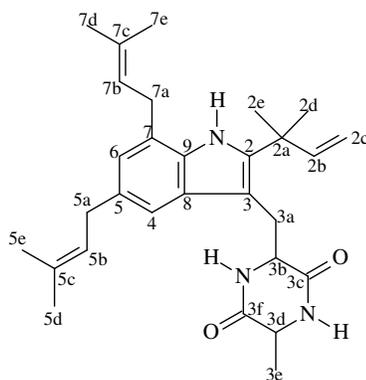


Figura 5: Acoplamentos observados no espectro bidimensional HMBC de LS1: posicionamento do sistema 6-metilpiperazino-2,5-diona na molécula

A análise dos dados discutidos permitiu propor para LS1 a estrutura do alcalóide indólico triprenilado echinulina, inédito no gênero *Lentinus* e isolado anteriormente de varias espécies de fungos filamentosos, tais como *Chaetomium globosum* (SOMDEJ, *et*

al., 2002) e *Eurodium repens* (ODOJIL *et al.*, 1978). Este alcalóide foi também isolado de plantas das famílias *Anacardiaceae*, *Cucurbitaceae* e *Orchidaceae* (TALAPATRA *et al.*, 2001).

Tabela 5: Dados de RMN ¹H (500 MHz) e ¹³C (125 MHz) de LS1 em C₅D₅N



C	HMQC		COSY	² J	HMBC	
	δ _H	δ _C			³ J	
2		142,4				
3		107,1				
4	7,73 (1H, s)	116,4		133,0		35,5; 107,1; 122,8
5		133,7				
6	7,08 (1H, s)	122,8				31,0; 35,5; 116,4
7		124,6				
8		130,8				
9		133,7				
2a		40,0				
2b	6,30 (1H, dd, J=10,4 e 17,4 Hz)	147,5	5,15; 5,18	40,0		28,8; 142,4
2c	5,15 (1H, d, J=10,4 Hz)	111,9	5,18; 6,30			40,0
	5,18 (1H, d, J=17,4 Hz)					
2d	1,63 (3H, s)	28,8		40,0; 132,7		26,2; 28,8; 124,1; 142,4; 147,5
2e	1,60 (3H, s)	28,8				28,8; 40,0; 142,4; 147,5
3a	4,11 (1H, d, J=14,3 Hz)	33,0	3,65; 4,80	57,3; 107,1		130,8; 142,4
	3,65 (1H, d, J=11,7 Hz)		4,11; 4,80	57,3; 107,1		130,8; 142,4; 169,0
3b	4,80 (2H, dl, J=11,3 Hz)	57,3	3,65; 4,11	169,0		
3c		169,0				
3d	4,38 (1H, ql, J=7,1 Hz)	52,1	1,78	22,2; 169,1		
3e		169,1				
5a	3,57 (2H, d, J=7,3 Hz)	35,5	5,62	126,0		116,4; 122,8; 131,5

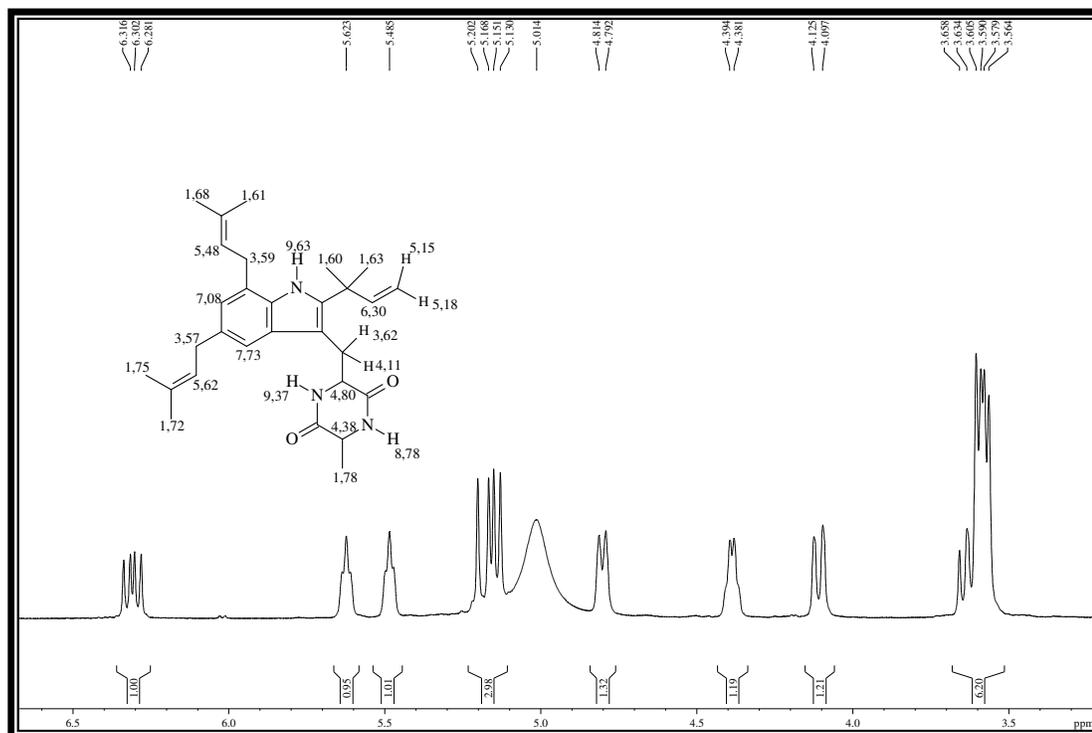


Figura 8: Expansão do espectro de RMN ^1H de LS1 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz)

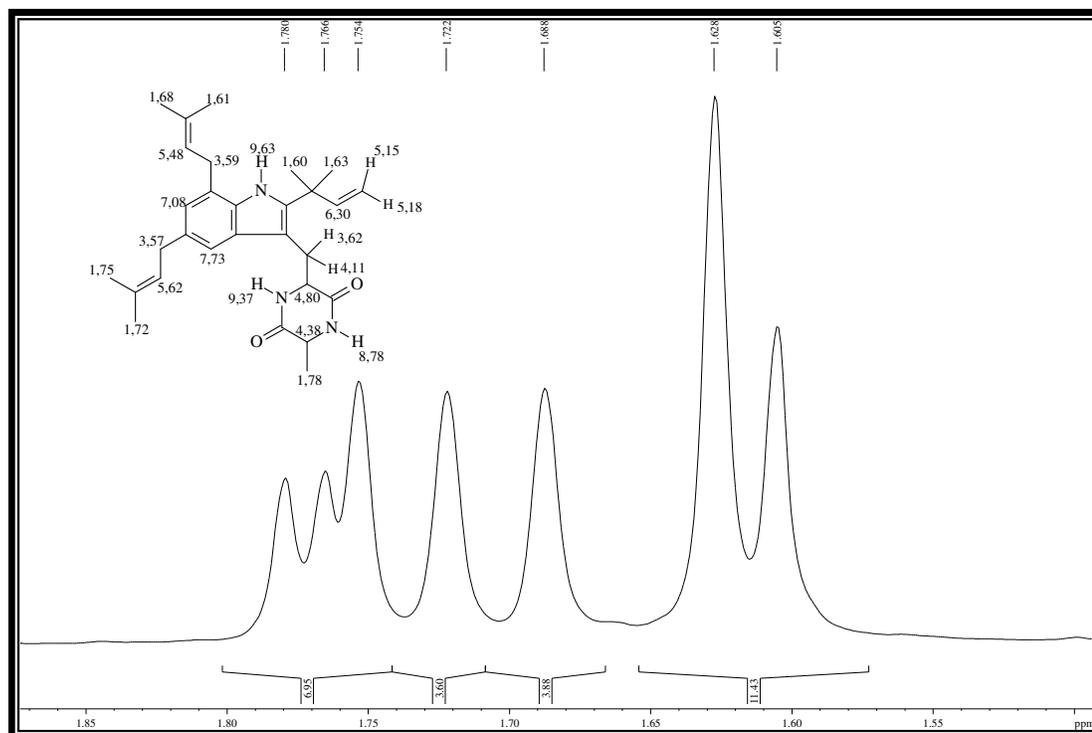


Figura 9: Expansão do espectro de RMN ^1H de LS1 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz)

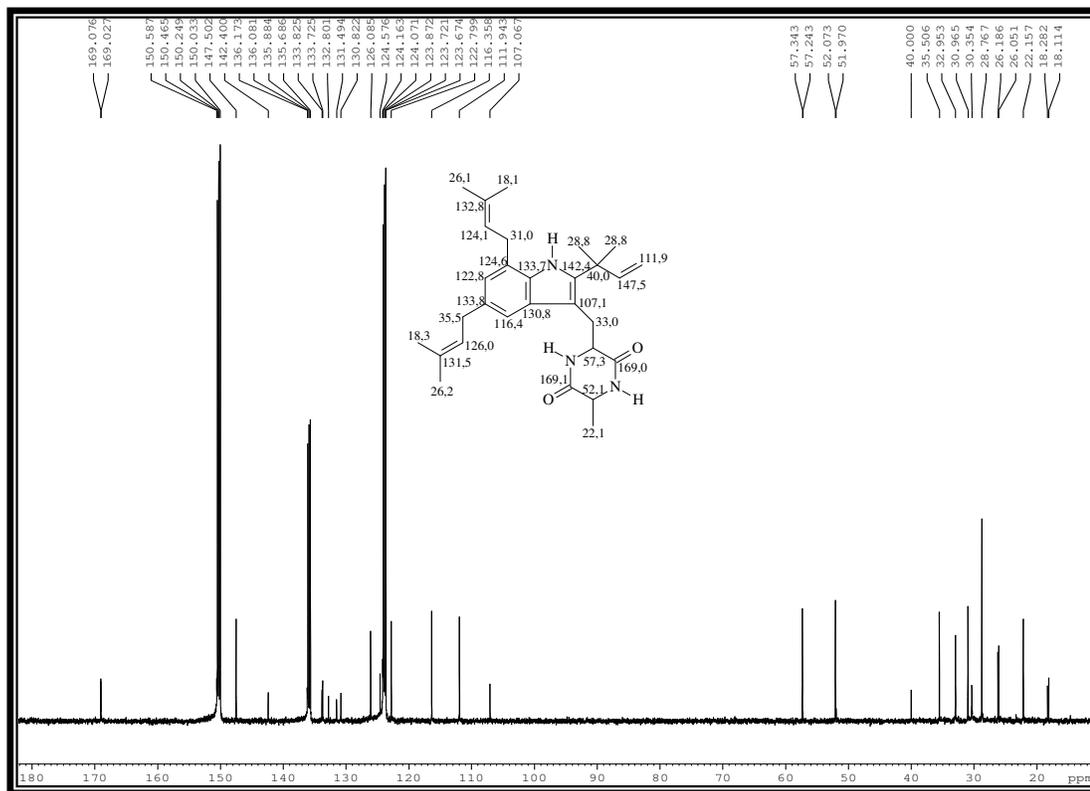


Figura 10: Espectro de RMN ^{13}C –BB de LS1 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz)

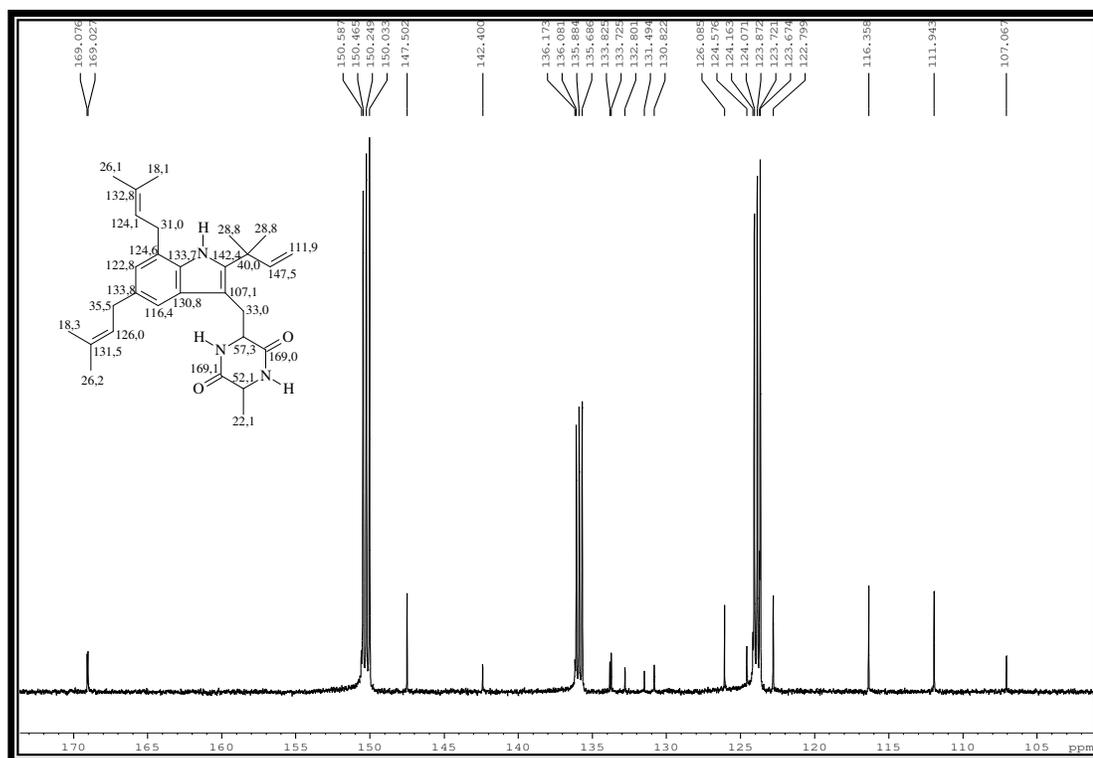
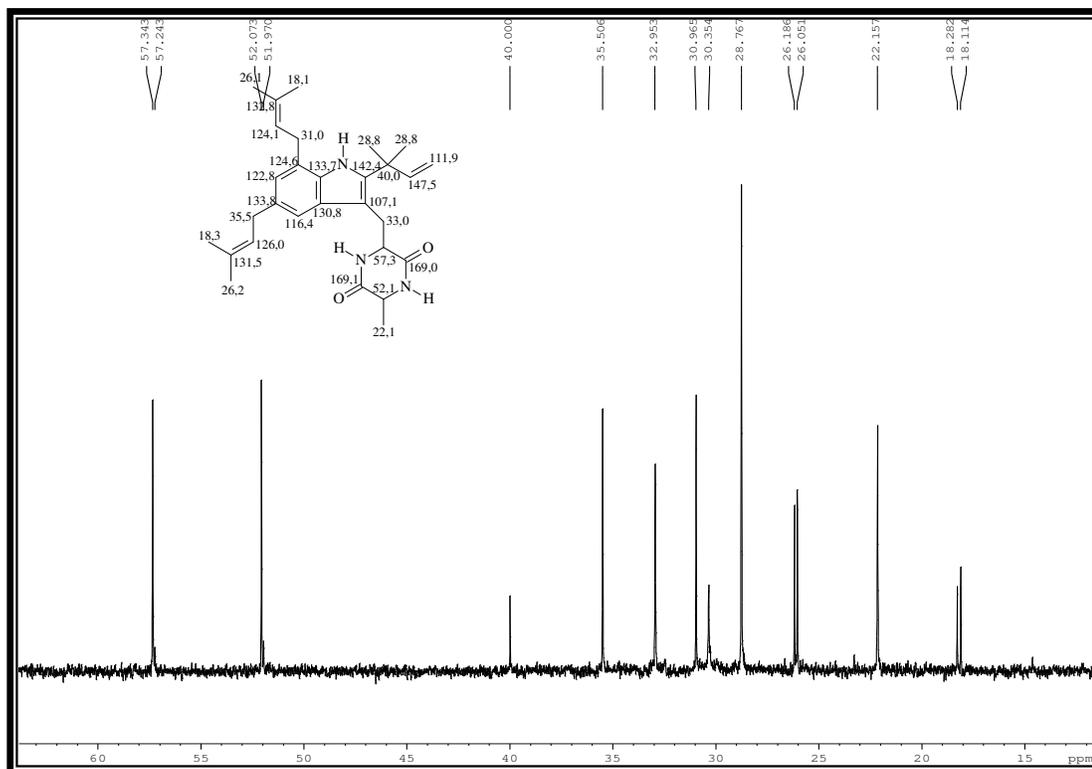
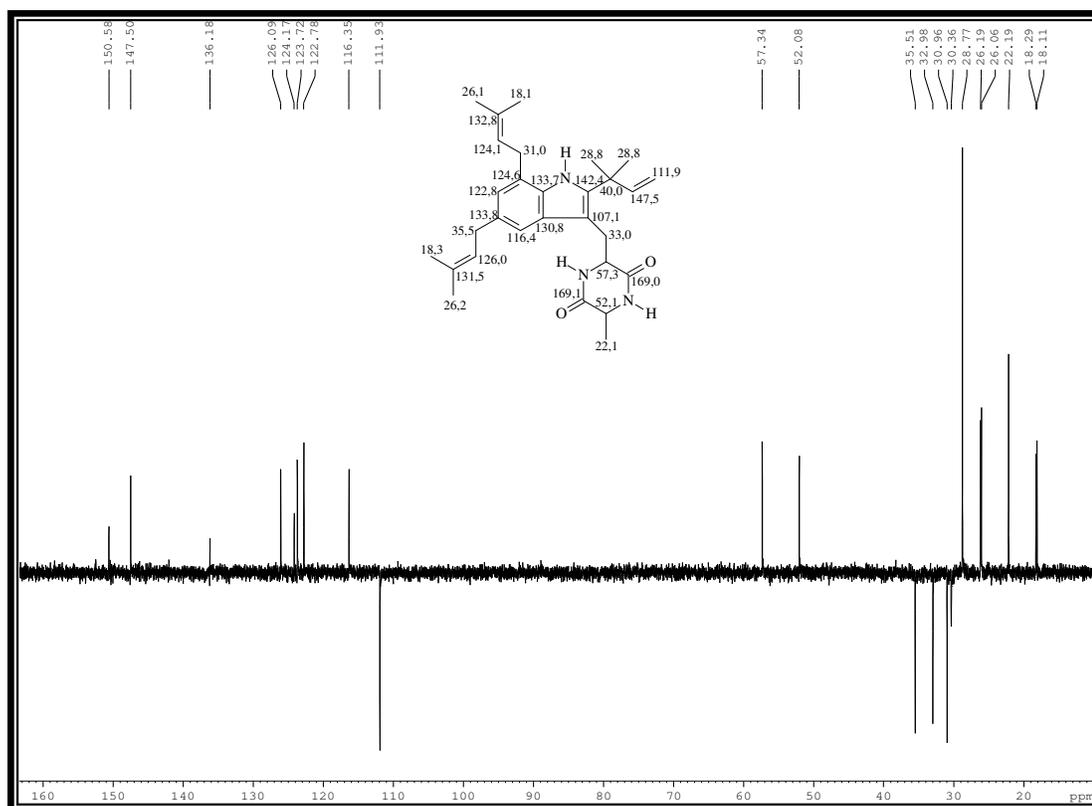


Figura 11: Expansão do espectro de RMN ^{13}C –BB de LS1 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz)

Figura 12: Expansão do espectro de RMN ^{13}C -BB de LS1 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz)Figura 13: Espectro de RMN ^{13}C - DEPT 135° de LS1 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz)

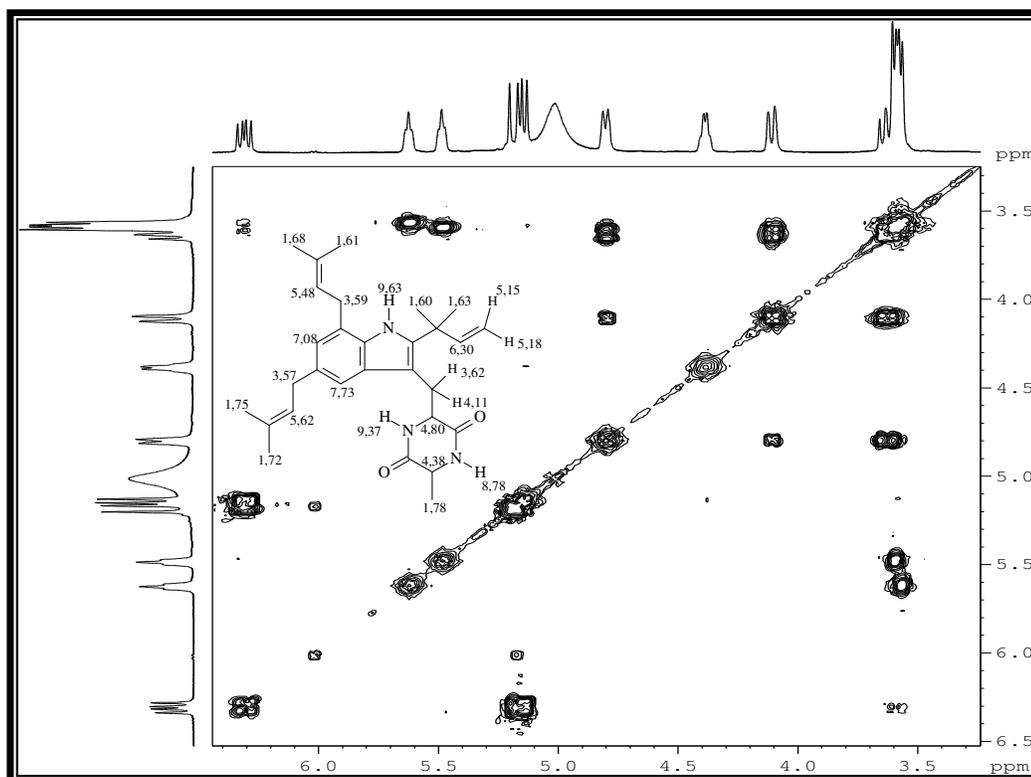


Figura 14: Espectro bidimensional COSY ^1H - ^1H de LS1 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz)

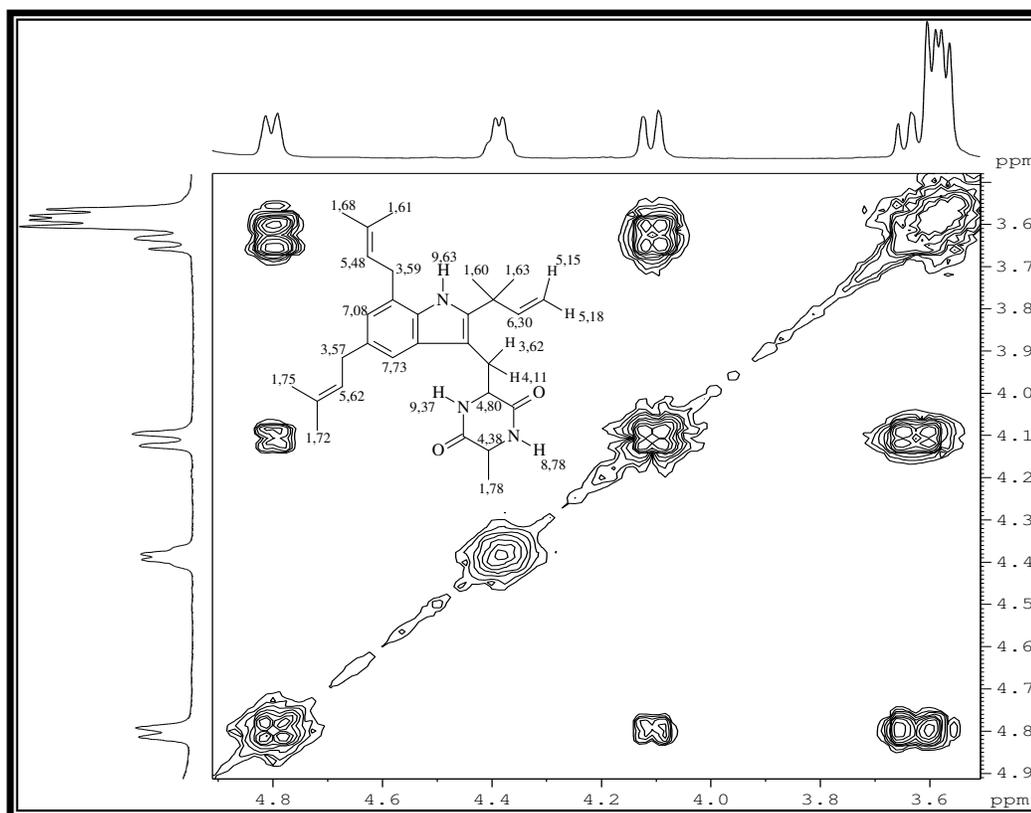


Figura 15: Expansão do espectro bidimensional COSY ^1H - ^1H de LS1 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz)

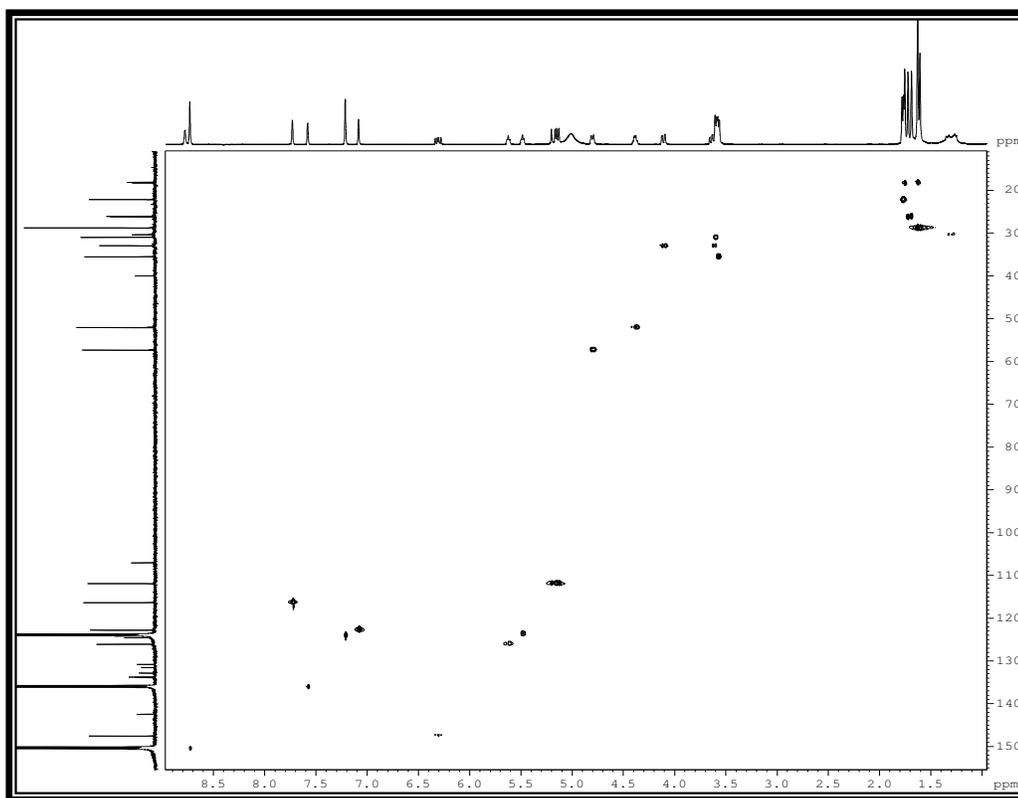


Figura 16: Espectro bidimensional HSQC de LS1 (C_5D_5N , 125 MHz)

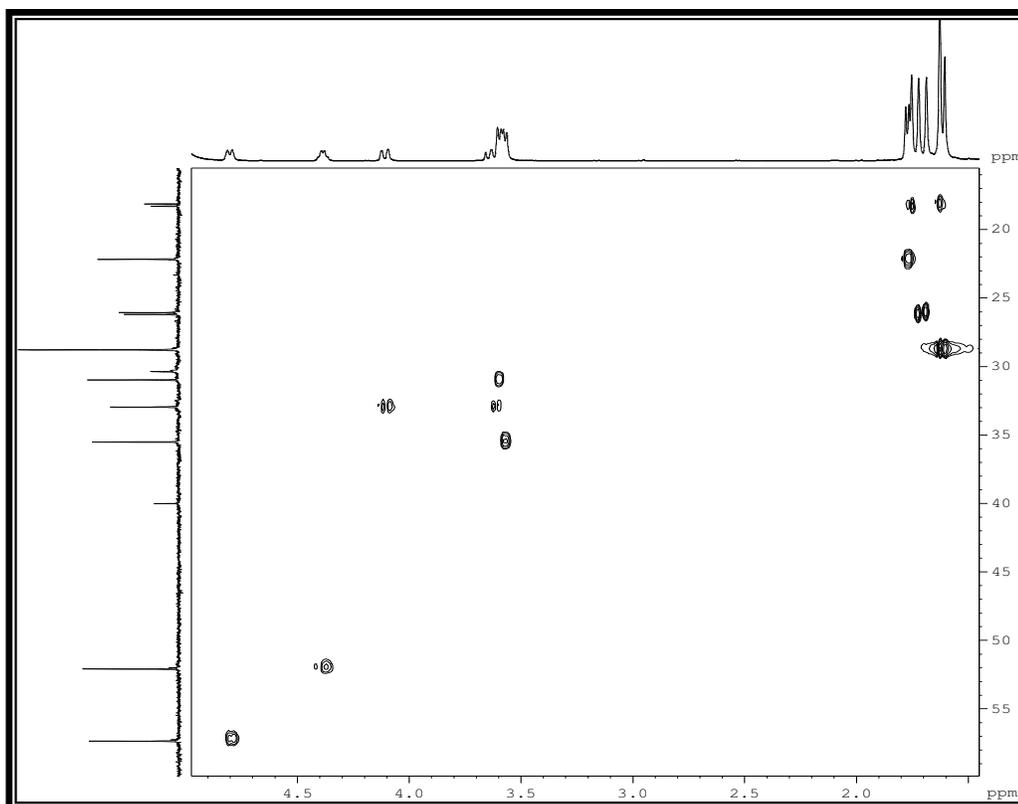


Figura 17: Expansão do espectro bidimensional HSQC de LS1 (C_5D_5N , 125 MHz)

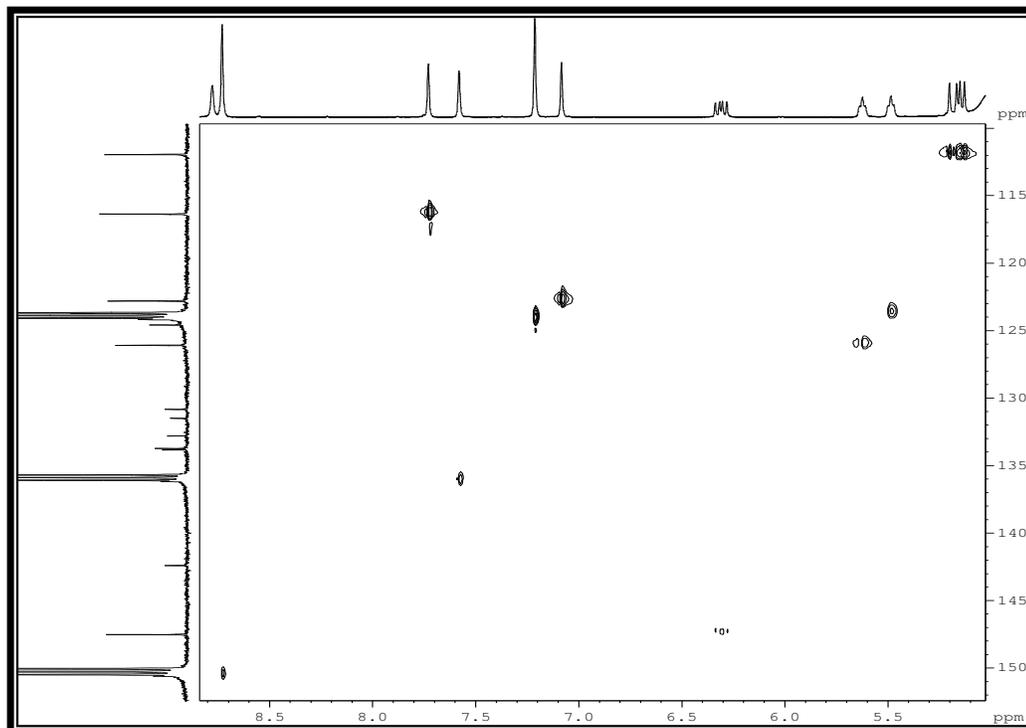


Figura 18: Expansão do espectro bidimensional HSQC de LS1 (C_5D_5N , 500 MHz /125 MHz)

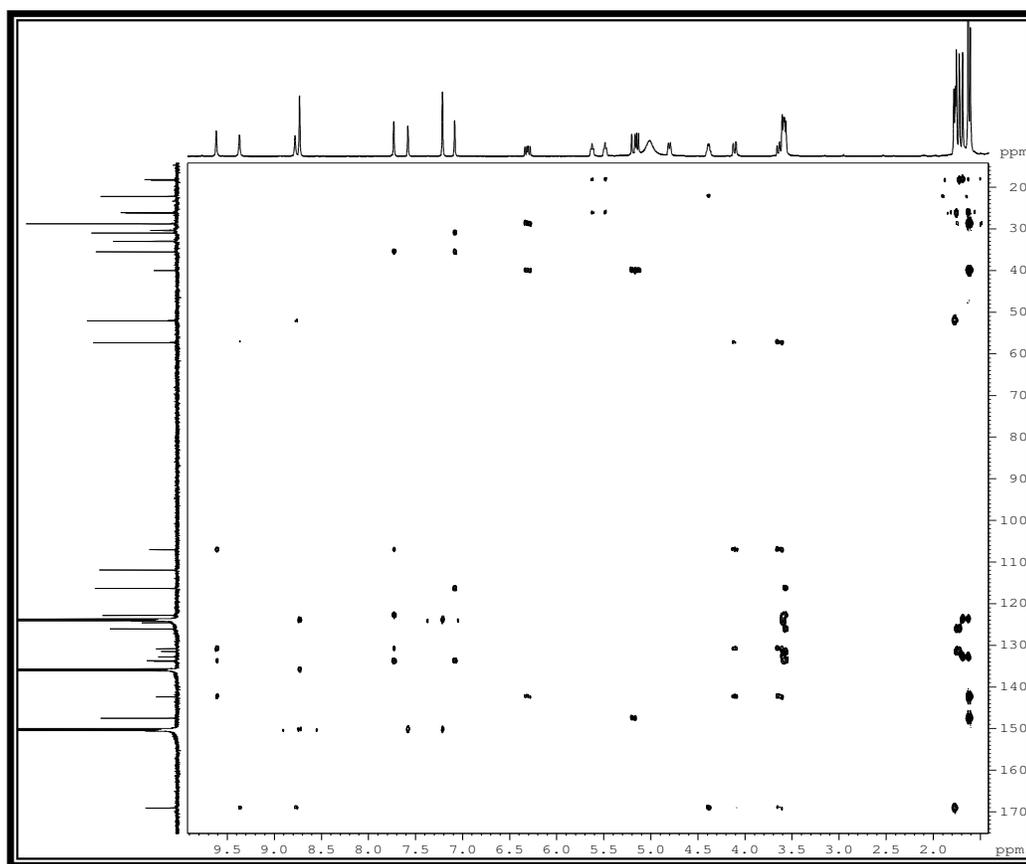


Figura 19: Espectro bidimensional HMBC de LS1 (C_5D_5N , 500 MHz /125 MHz)

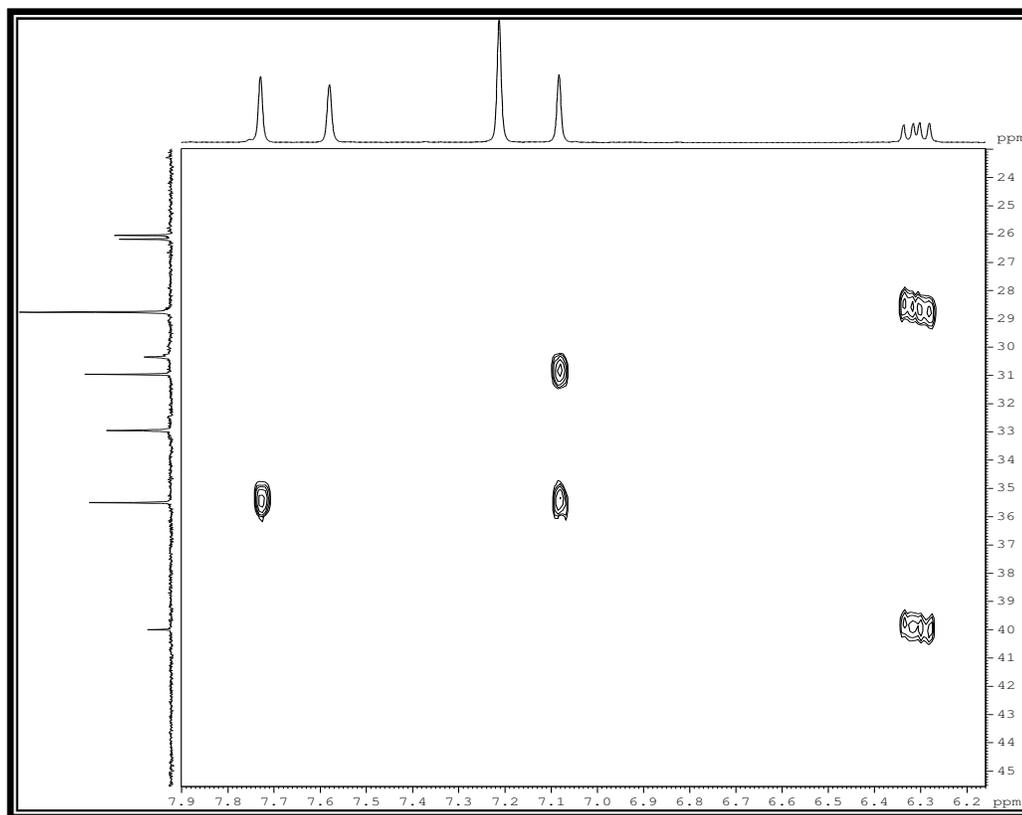


Figura 20: Expansão do espectro bidimensional HMBC de LS1 (C_5D_5N , 500 MHz /125 MHz)

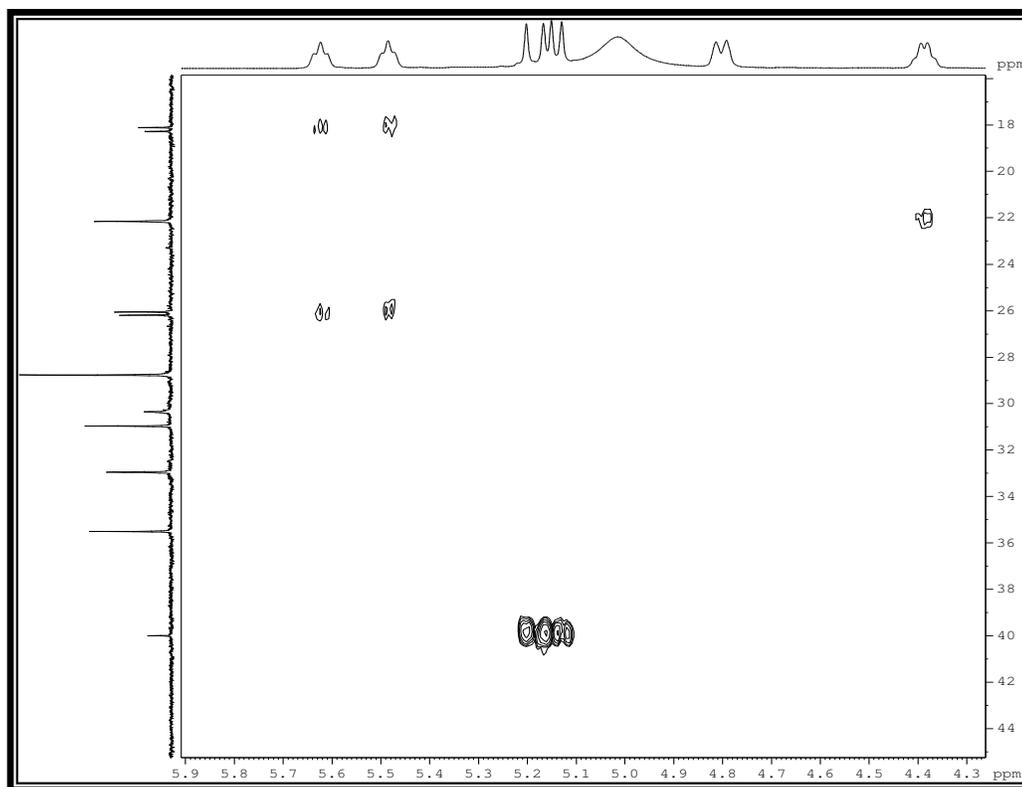


Figura 21: Expansão do espectro bidimensional HMBC de LS1 (C_5D_5N , 500 MHz /125 MHz)

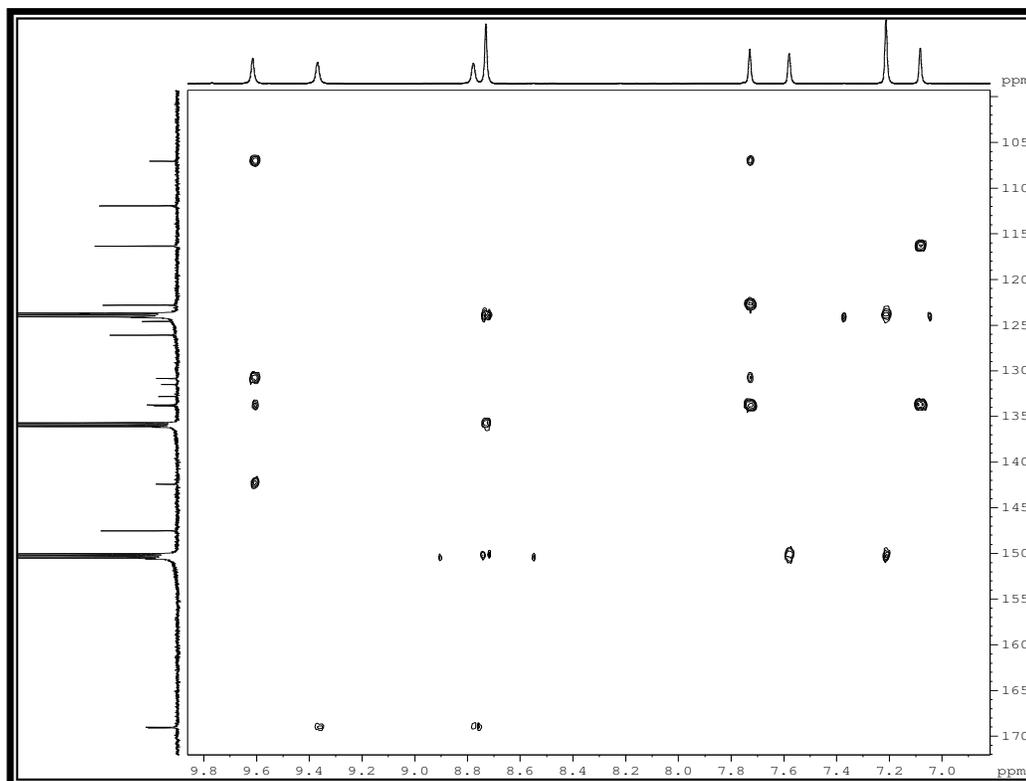


Figura 22: Expansão do espectro bidimensional HMBC de LS1 (C_5D_5N , 500 MHz /125 MHz)

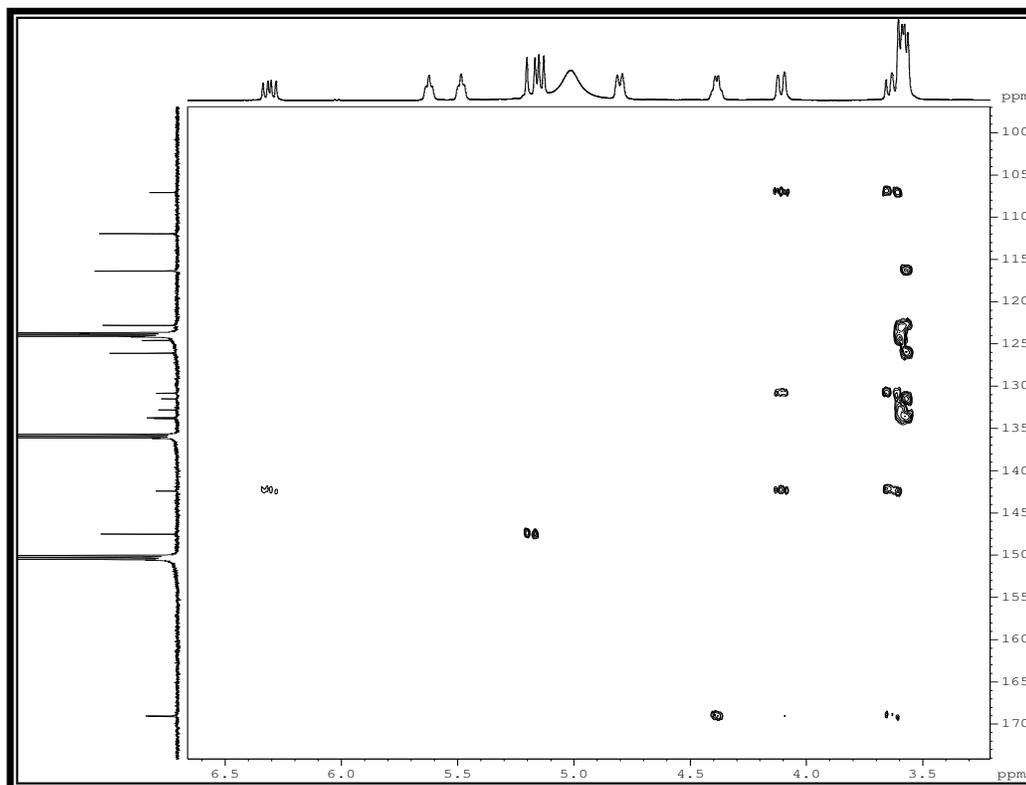


Figura 23: Expansão do espectro bidimensional HMBC de LS1 (C_5D_5N , 500 MHz /125 MHz)

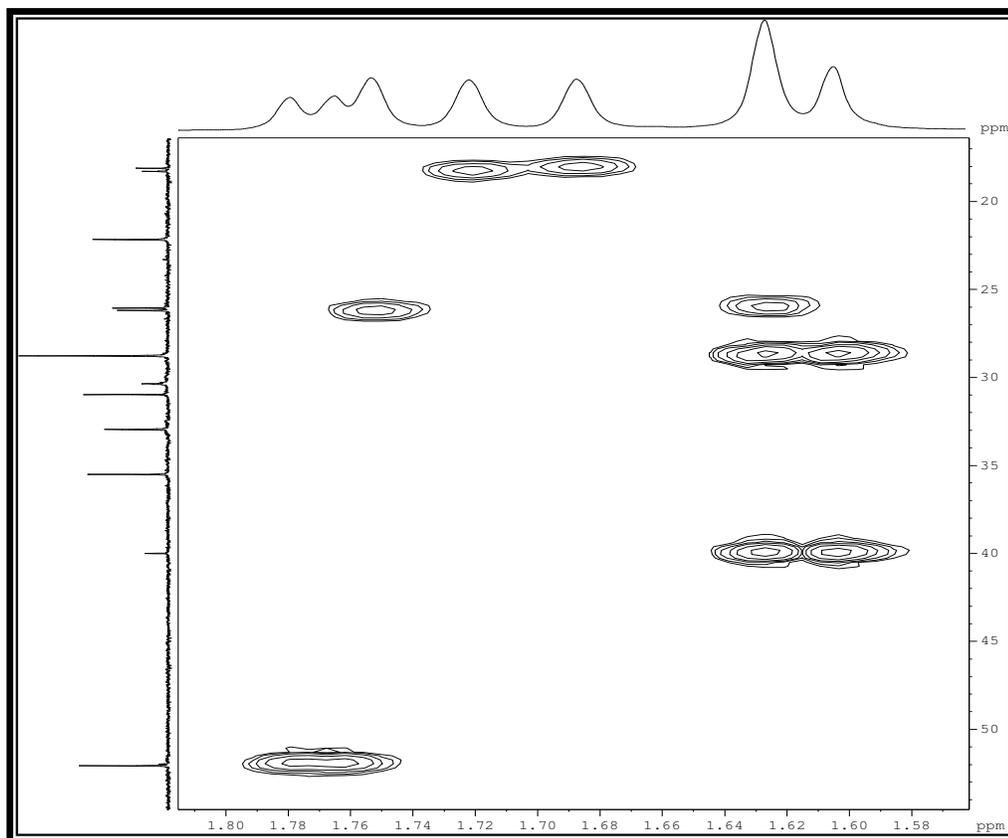


Figura 24: Expansão do espectro bidimensional HMBC de LS1 (C_5D_5N , 500 MHz /125 MHz)

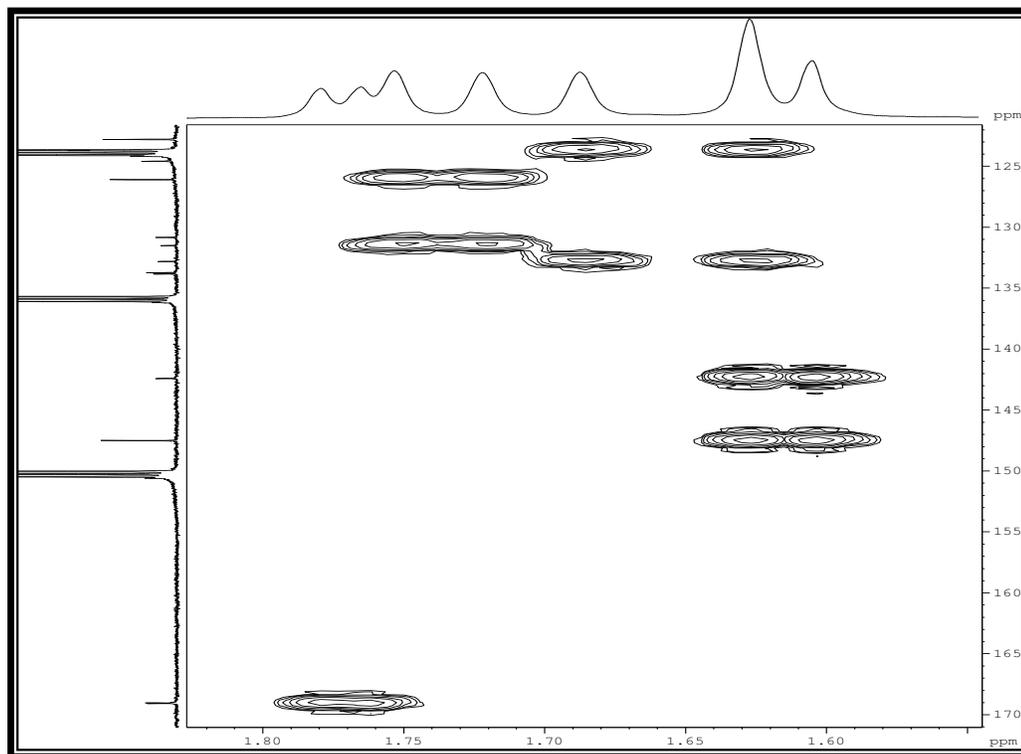


Figura 25: Expansão do espectro bidimensional HMBC de LS1 (C_5D_5N , 500 MHz /125 MHz)

4.2.2 Isolamento e Identificação de LS2

Fracionamentos cromatográficos sucessivos da fração EAcLS2, proveniente do extrato AcOEt do micélio de *L. strigellus*, cultivado em peptona sob condições estáticas (Item 5.8.3, p. 191), levaram ao isolamento cristais vermelhos em forma de agulha, com faixa de fusão 207,5 - 209,8 °C, denominado de LS2.

O espectro de RMN ¹³C-BB (Fig. 31, p. 65) apresentou dezesseis linhas espectrais, sendo duas delas (191,0 e 182,2 δ) características de cetonas conjugadas; doze sinais em região de carbono *sp*² (107,0-162,8 δ), sendo três deles oxigenados (162,8, 165,4 e 166,8 δ), além de um sinal característico de metoxila em 56,3 δ e outro em 22,4 δ atribuído a uma metila.

O espectro de RMN ¹H (Fig. 29, p. 64) de LS2 apresentou dois simpletos em 12,32 e 12,12 δ, característicos de hidroxilas queladas com grupo carbonila através de ligação de hidrogênio; sinais característicos de hidrogênios de anel aromático em 7,63 (1H, s), 7,37 (1H, d, *J* = 2,5 Hz), 7,09 (1H, s) e 6,69 δ (1H, d, *J* = 2,5 Hz) que, pelos padrões de acoplamento e valores das constantes de acoplamento, indicaram a presença de dois anéis aromáticos com um padrão de acoplamento *meta* para seus hidrogênios. Pode-se observar ainda a presença de dois simpletos em 3,95 (3H, s) e 2,46 δ (3H, s), sendo o primeiro característico de grupamento metoxila e o segundo de metila, ambos ligados a anel aromático.

A partir dos dados discutidos, pode-se sugerir a fórmula molecular C₁₆H₁₂O₅ para o composto, a qual está de acordo com o pico íon molecular de razão massa/carga igual à 284 Daltons, observado no espectro de massa (Fig. 28, p. 63) de LS2.

O espectro bidimensional HSQC (Fig. 32, p. 65) permitiu correlacionar os hidrogênios dos anéis aromáticos em 7,09, 7,63, 7,37 e 6,69 δ, com os carbonos 124,7, 121,5, 108,4 e 107,0 δ, respectivamente. Os hidrogênios do grupo metoxila em 3,95 δ foram associados ao carbono 56,3 δ e os do grupo metila em 2,46 δ foram correlacionados ao carbono em 22,4 δ.

A partir da análise dos dados espectrométricos discutidos, foi possível sugerir para LS2 a estrutura de uma antraquinona trioxigenada, com os dois anéis aromáticos

dissubstituídos. Após levantamento bibliográfico de antraquinonas com esse padrão de substituição e de oxigenação, foram propostas para o composto isolado as estruturas da 1,5-dihidroxi-7-metil-3-metoxiantraquinona (**82**) (SOB *et al.*, 2008) e fisciona (**83**) (SMETANINA *et al.*, 2007), apresentadas na Figura 26.

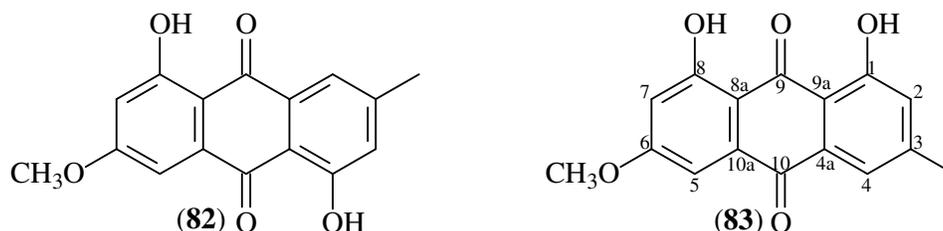


Figura 26: Estruturas da 1,5-dihidroxi-7-metil-3-metoxiantraquinona (**82**) e fisciona (**83**)

O espectro bidimensional HMBC (Fig. 33, p. 66) de LS2 mostrou as correlações à longa distância do hidrogênio em 12,3 δ com os carbonos em 165,4 (2J), 110,5 (3J) e 107,0 δ (3J); em 12,12 δ com os carbonos 162,8 (2J), e 113,9 (3J), possibilitando confirmar a localização das hidroxilas na molécula (Fig. 27). Foram ainda observados os acoplamentos do hidrogênio em 7,09 δ com os carbonos 121,5 (3J), 113,9 (3J) e 22,4 δ (3J); em 7,63 δ com os carbonos em 124,7 (3J), 113,9 (3J) e 22,4 δ (3J); em 7,37 δ com os carbonos 166,8 (2J), 182,2 (3J), 110,5 (3J) e 107,0 δ (3J); em 6,69 δ com os carbonos 166,8 (2J), 165,4 (2J), 110,5 (3J) e 108,4 δ (3J) (Tab. 7, p. 63, Fig. 27).

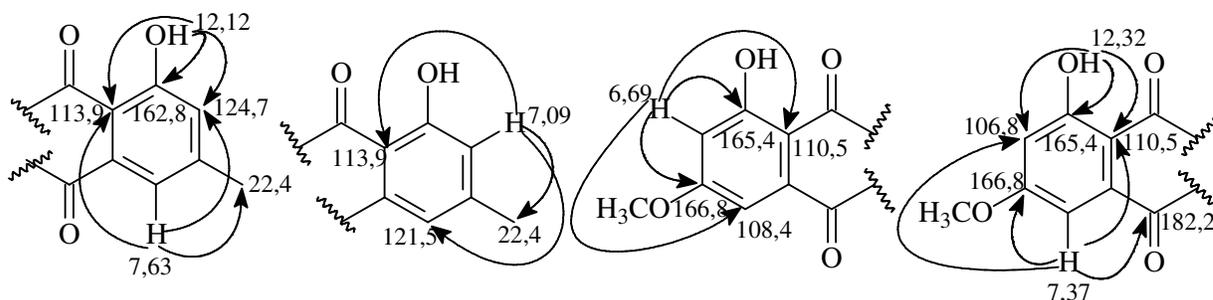


Figura 27: Principais acoplamentos a longa distância de LS2 observados no espectro bidimensional HMBC

Assim, as correlações observadas no espectro bidimensional HMBC permitiram concluir que LS2 tratava-se da antraquinona fisciona (**83**), um pigmento isolado de vários microrganismos (SMETANINA *et al.*, 2007) e plantas (CHOI *et al.*, 2007; KOMATSU *et al.*, 2006; LU *et al.*, 2007). Esta antraquinona é conhecida por sua potente atividade antibacteriana, (SMETANINA *et al.*, 2007), além de inibir a enzima fosfatase Cdc25B com IC_{50} de 62,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (CHOI *et al.*, 2007)

Tabela 7: Comparação dos dados de RMN ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) da antraquinona fisciona (SMETANINA *et al.*, 2007) com os de LS2, ambos em CDCl_3

C	RMN ^1H		RMN ^{13}C	
	fisciona	LS2	fisciona	LS2
1			162,5	162,8
2	7,08 (1H, s)	7,09 (1H, s)	124,5	124,7
3			148,4	148,7
4	7,62 (1H, s)	7,63 (1H, s)	121,3	121,5
4a			133,2	133,5
5	7,36 (1H, s)	7,37 (1H, d, $J=2,5$ Hz)	108,2	108,4
6			166,5	166,8
7	6,69 (1H, s)	6,69 (1H, d, $J=2,5$ Hz)	106,8	107,0
8			165,2	165,4
8a			110,3	110,5
9			190,8	191,0
9a			113,7	113,9
10			182,0	182,2
10a			135,2	135,5
CH_3	2,45 (3H, s)	2,46 (3H, s)	22,1	22,4
OCH_3	3,94 (3H, s)	3,95 (3H, s)	56,1	56,3
OH		12,12 (1H, s)		
OH		12,32 (1H, s)		

Tabela 8: Dados de RMN ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) de LS2 em CDCl_3

C	HSQC		HMBC	
	$\delta_{\text{H}}^{(a)}$	$\delta_{\text{C}}^{(b)}$	2J	3J
1		162,8		
2	7,09 (1H, s)	124,7		22,4; 113,9; 121,5
3		148,7		
4	7,63 (1H, s)	121,5		22,4; 113,9; 124,7
4a		133,5		
5	7,37 (1H, d, $J=2,5$ Hz)	108,4	166,8	107,0; 110,5; 182,2
6		166,8		
7	6,69 (1H, d, $J=2,5$ Hz)	107,0	165,4; 166,8	108,4; 110,5
8		165,4		
8a		110,5		
9		191,0		
9a		113,9		
10		182,2		
10a		135,5		
CH_3	2,46 (3H, s)	22,4		
OCH_3	3,95 (3H, s)	56,3		
OH	12,12 (1H, s)		162,8	113,9
OH	12,32 (1H, s)		165,4	107,0; 110,5

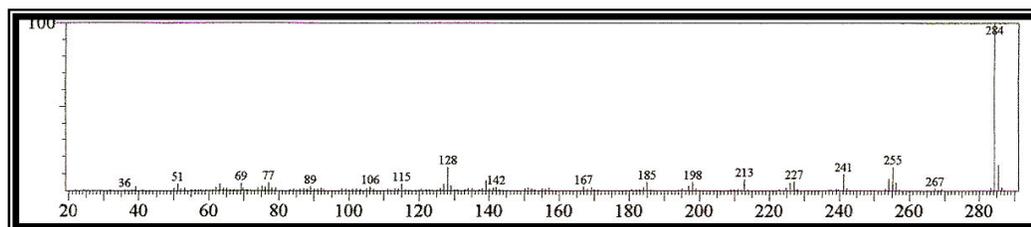


Figura 28: Espectro de massa de LS2 (IE, 70 eV)

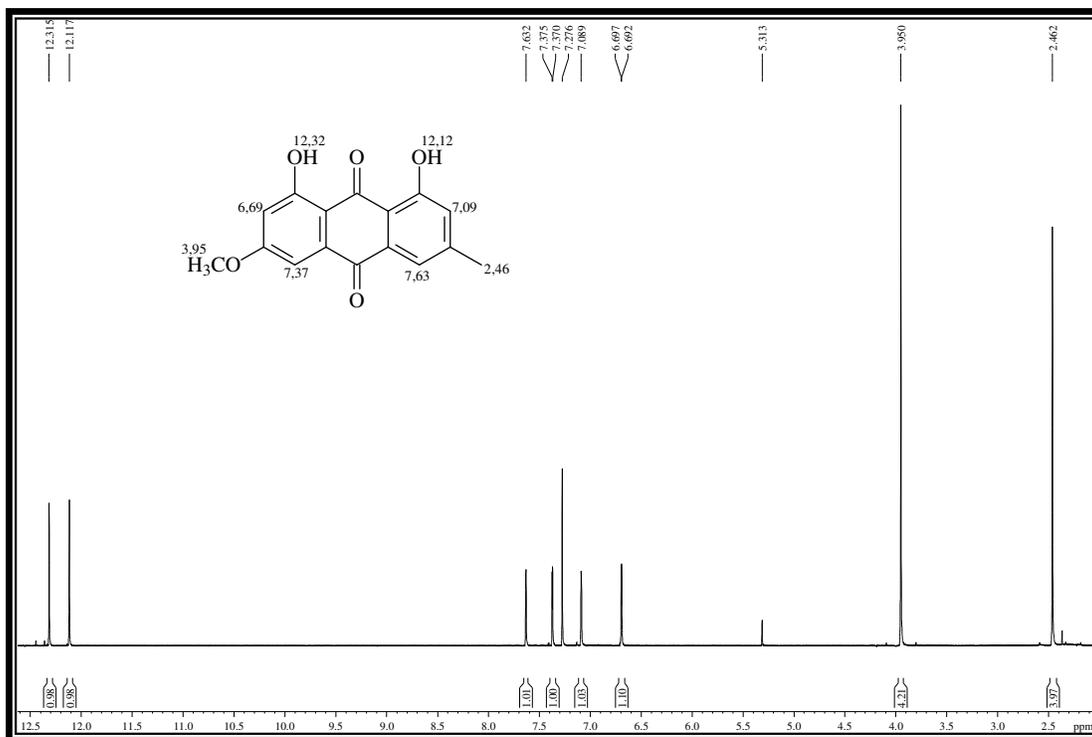


Figura 29: Espectro de RMN ^1H de LS2 (CDCl_3 , 500 MHz)

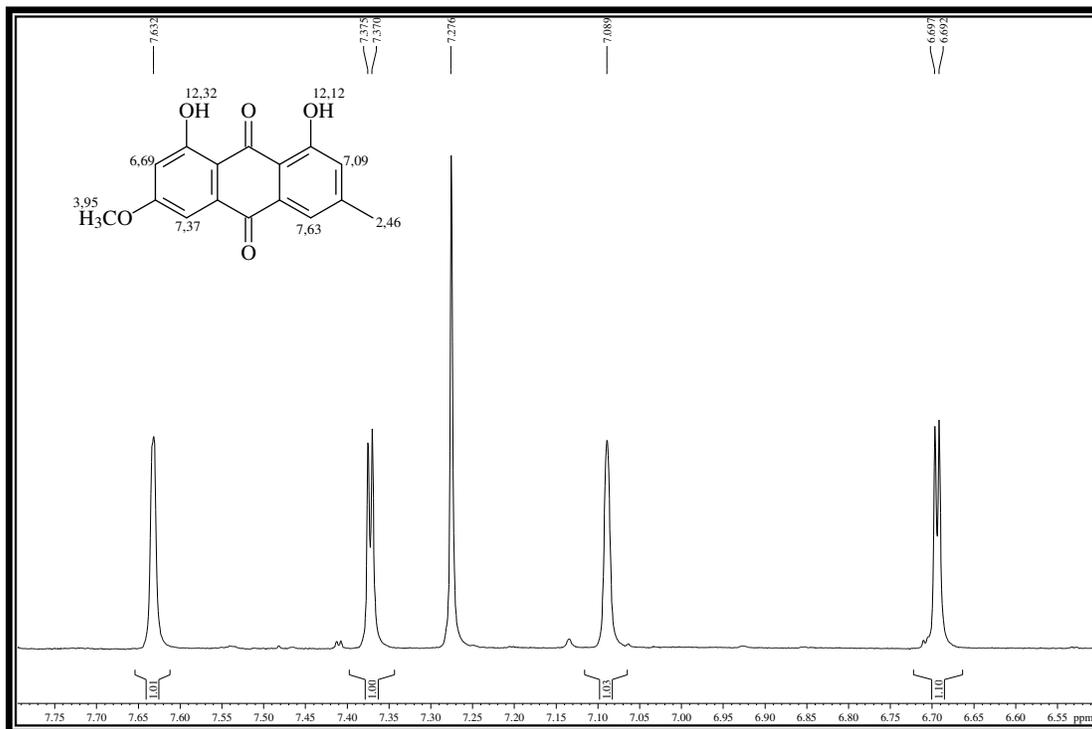


Figura 30: Expansão do espectro de RMN ^1H de LS2 (CDCl_3 , 500 MHz)

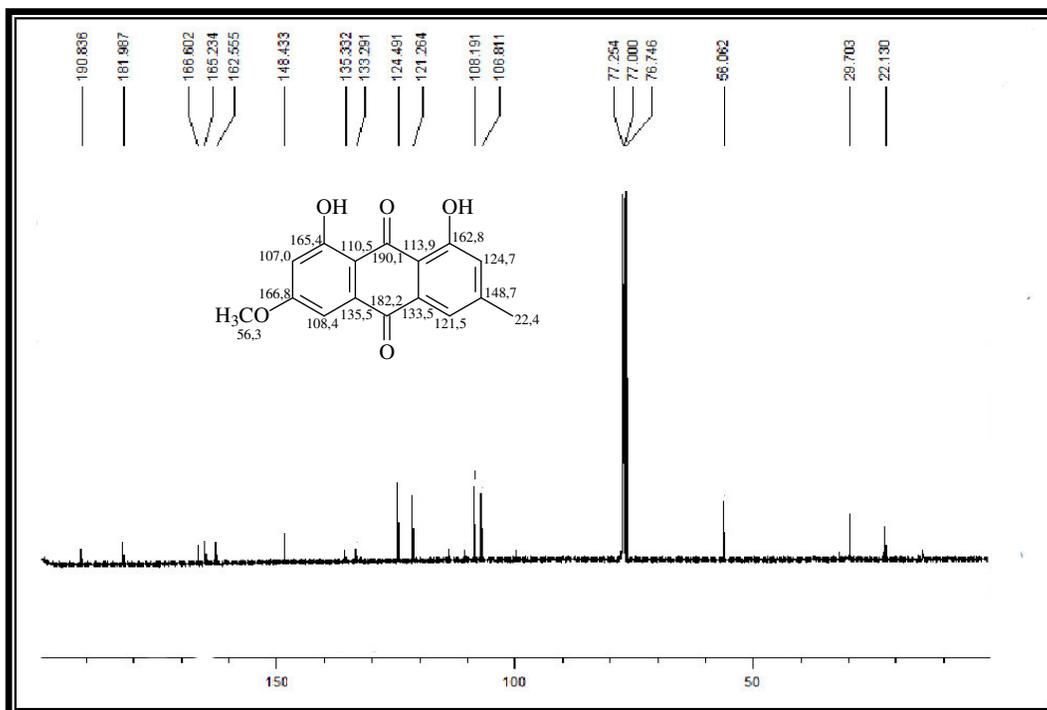


Figura 31: Espectro de RMN ^{13}C –BB de LS2 (CDCl_3 , 125 MHz)

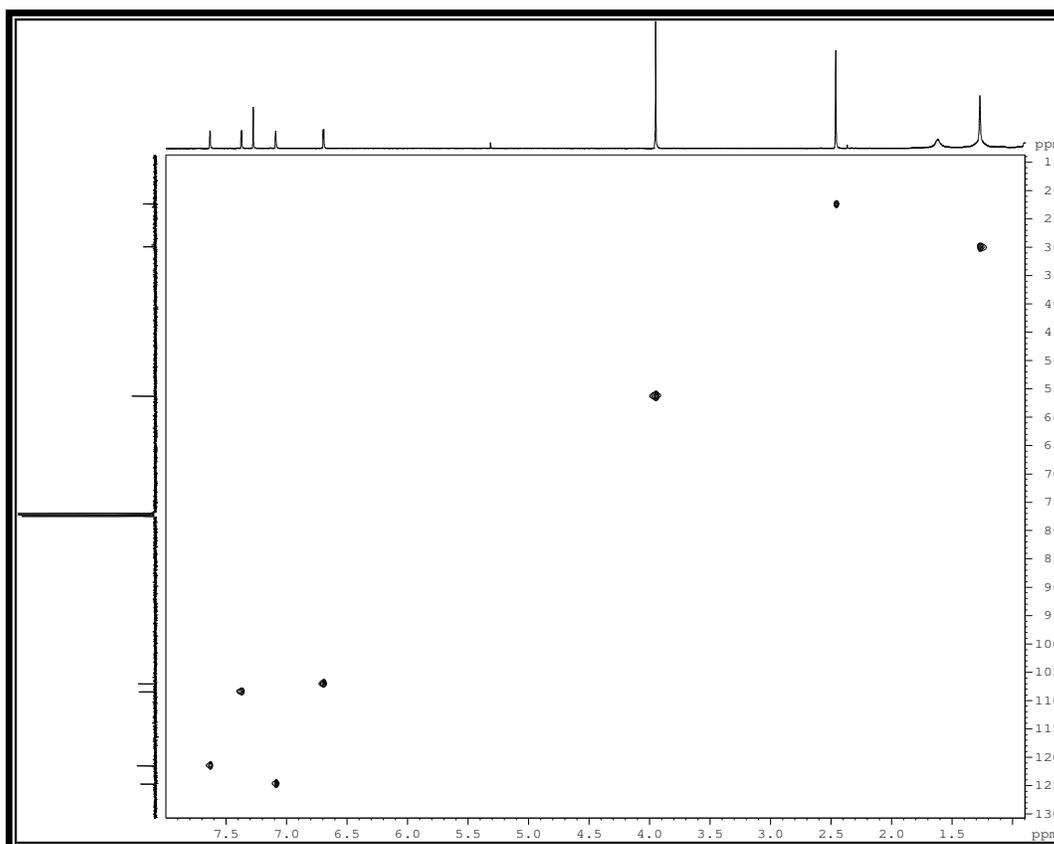


Figura 32: Espectro de HSQC de LS2 (CDCl_3 , 500 MHz / 125 MHz)

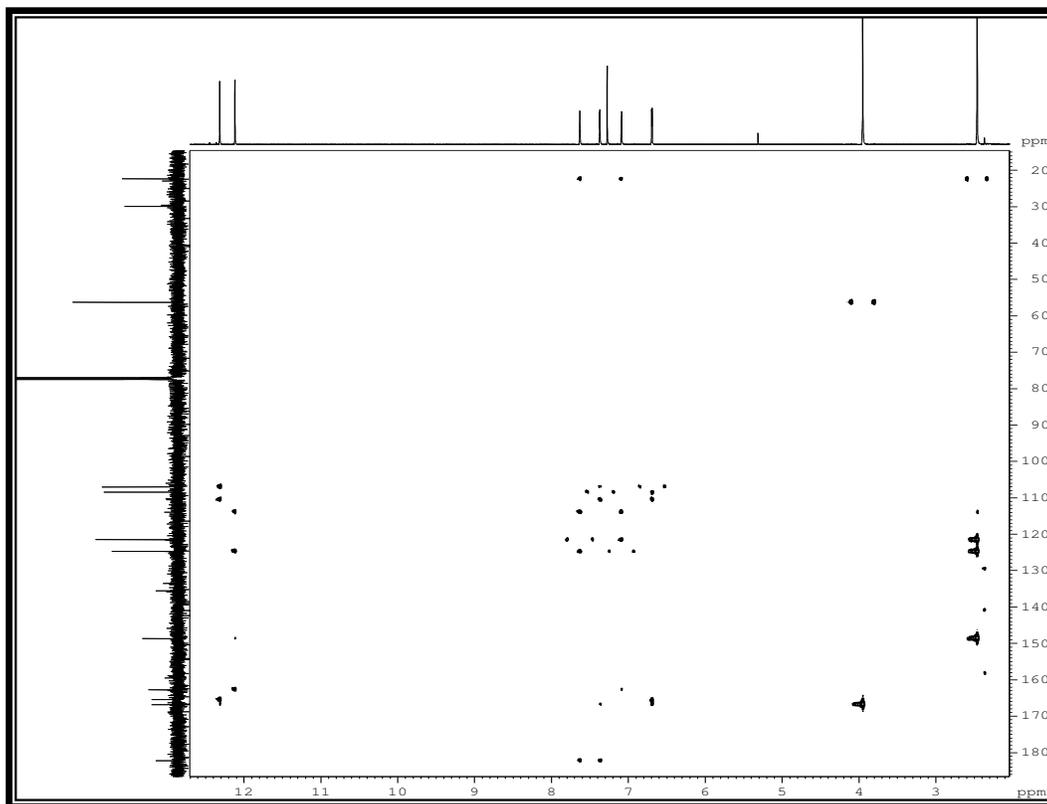


Figura 33: Espectro de HMBC de LS2 (CDCl₃, 500 MHz /125 MHz)

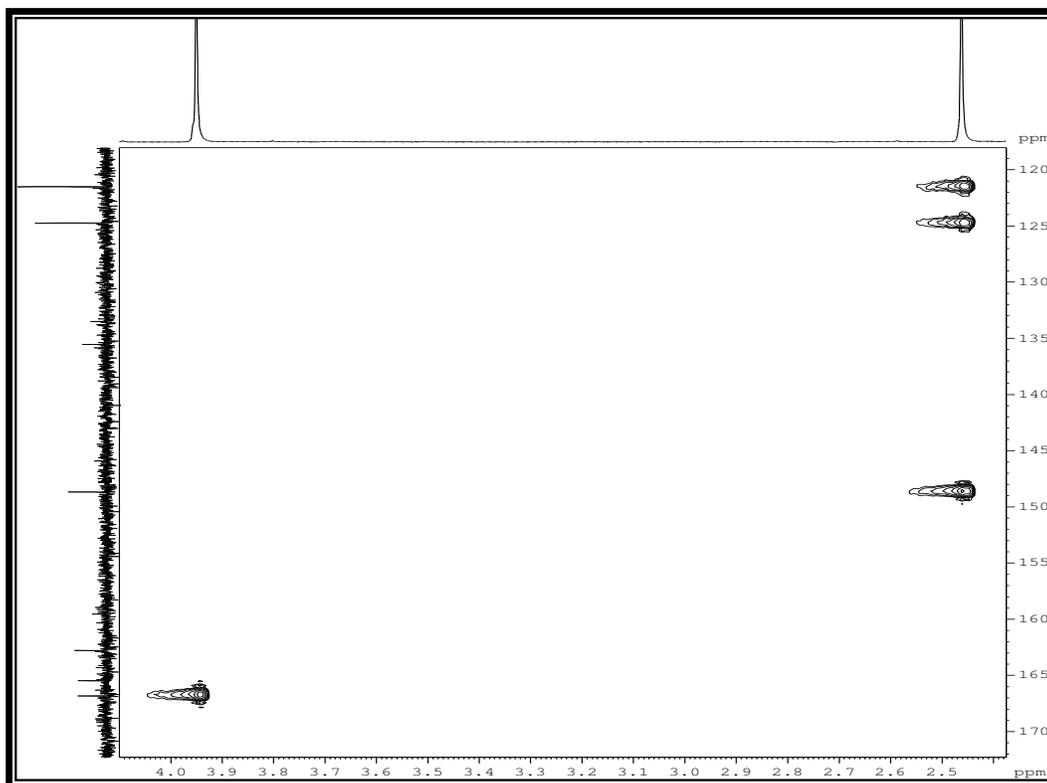


Figura 34: Expansão do espectro de HMBC de LS2 (CDCl₃, 500 MHz /125 MHz)

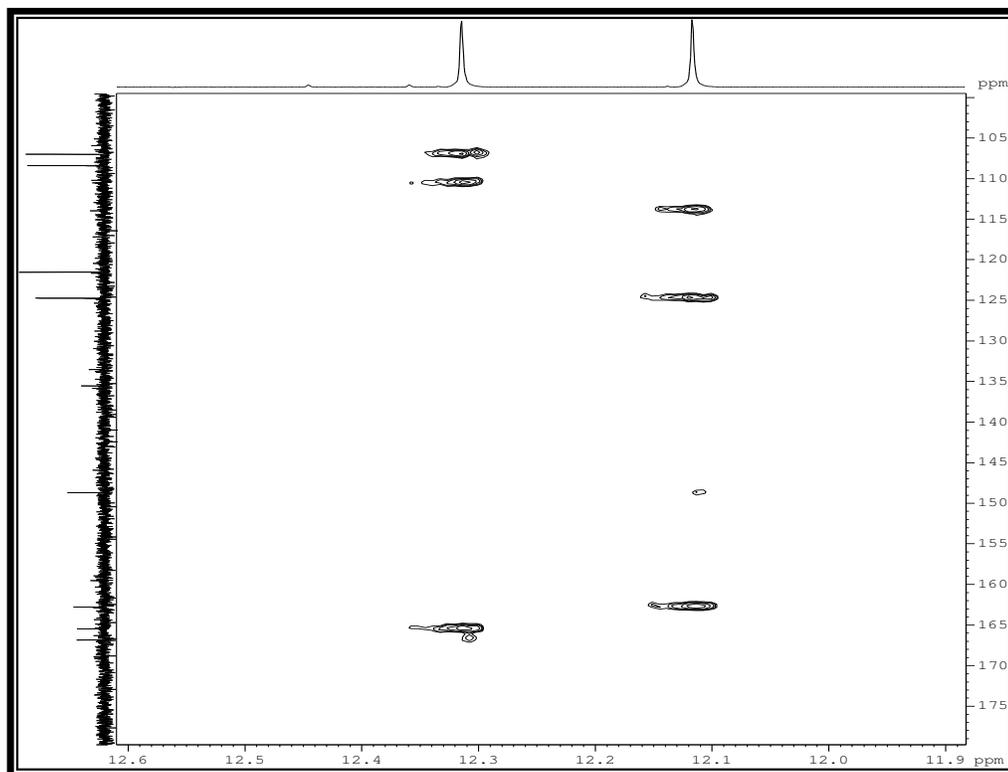


Figura 35: Expansão do espectro de HMBC de LS2 (CDCl_3 , 500 MHz /125 MHz)

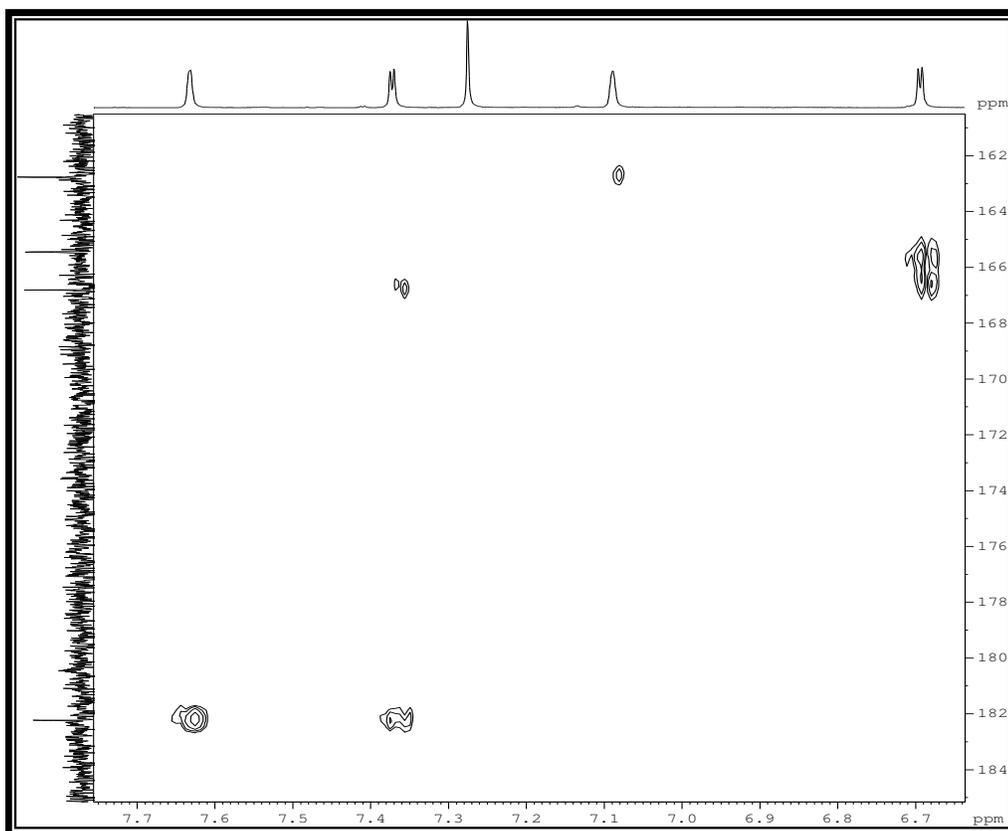


Figura 36: Expansão do espectro de HMBC de LS2 (CDCl_3 , 500 MHz /125 MHz)

4.2.3 Isolamento e Identificação de LS3

Fracionamentos cromatográficos sucessivos do extrato obtido a partir da partição líquido-líquido oriundo do meio de cultura peptona utilizado no cultivo de *L. strigellus*, sob agitação, (Item 5.7.2, p. 189), permitiram a obtenção de um líquido viscoso marrom, que após análise por CCDA apresentou-se como um único *spot* e foi denominado de LS3 (Item 5.8.5, p. 192).

O espectro de RMN ^1H (Fig. 40, p. 72) de LS3 mostrou dois simpletos em 1,29 e 1,42 δ para três hidrogênios cada, associados a duas metilas; sinais em 1,83 (1H, dd, $J = 13,1$ e 8,8 Hz) e 2,14 δ (1H, dd, $J = 13,1$ e 6,2 Hz); sinal em 4,80 δ (1H, dd, $J = 8,8$ e 6,2 Hz) referente a hidrogênio ligado a carbono oxigenado; simpleto em 3,76 δ (3H, s), característico de grupamento metoxila. Foram ainda observados sinais em 6,72 δ (1H, d, $J = 8,9$ Hz), 6,77 δ (1H, dd, $J = 8,9$ e 2,9 Hz), e 7,00 δ (1H, d, $J = 2,9$ Hz), justificando a presença de um anel aromático trissubstituído, com hidrogênios *meta* posicionados.

O espectro de RMN ^{13}C -BB (Fig. 43, p. 73) para essa substância apresentou doze sinais, dos quais seis encontravam-se na região de carbonos sp^2 (111,8-153,6), sendo dois deles funcionalizados (147,3 e 153,6 δ); seis sinais característicos de carbonos sp^3 , dois deles (75,2 e 64,1 δ) atribuídos a carbonos oxigenados e um (56,0 δ) referente a grupo metoxila. Foi observado ainda um sinal em 43,0 δ , provavelmente pertencente a carbono metilênico, além de dois sinais em 25,8 e 29,1 δ , referente às duas metilas identificadas no espectro de RMN ^1H .

Comparação entre o espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (Fig. 44, p. 74) e o espectro de RMN ^{13}C -BB mostrou a presença de quatro carbonos não hidrogenados (C), quatro carbonos metínicos (CH), um carbono metilênico (CH₂) em 43,0 δ , confirmando o deslocamento para este grupo, e três sinais de carbonos metílicos (CH₃).

A análise do espectro de RMN bidimensional HSQC (Fig. 47, p. 75) permitiu correlacionar os hidrogênios metílicos em 1,29 e 1,42 δ aos carbonos 25,8 e 29,1 δ , respectivamente; os hidrogênios em 1,83 e 2,14 δ com o carbono 43,0 δ , indicando que estes dois hidrogênios eram diastereotópicos. Mostrou ainda a correlação do hidrogênio em 4,80 com o carbono carbinólico em 64,1 δ ; dos hidrogênios em 3,76 δ com o

carbono em 56,0 δ ; dos hidrogênios de anel aromático em 6,72, 6,77 e 7,00 δ com os carbonos 118,1, 116,1 e 111,8 δ , respectivamente.

A partir dos dados discutidos, pode-se sugerir a fórmula molecular $C_{12}H_{16}O_3$ para o composto, a qual está de acordo com o pico íon molecular de razão massa/carga igual à 208 Daltons, observado no espectro de massa (Fig. 39, p. 71) de LS3.

Estes dados, principalmente o padrão de acoplamento obtido no espectro de RMN 1H , permitiram propor para LS3 a estrutura do 4-hidroxi-2,2-dimetil-6-metoxicromano (Fig. 37), isolado anteriormente de *Lentinus connatus* (RUKACHAISIRIKUL *et al.*, 2005) e *Lentinus crinitus* (ABRAHAM; ABATE, 1995) e sintetizado por Wang e colaboradores (2004).

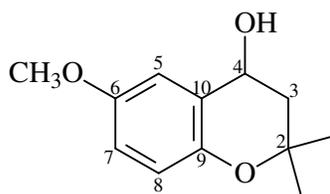


Figura 37: Estrutura do 4-hidroxi-2,2-dimetil-6-metoxicromano.

A confirmação da estrutura proposta se deu através da análise do espectro de RMN bidimensional HMBC (Fig. 48, p. 76) de LS3. As seguintes correlações à longa distância foram observadas: hidrogênios em 1,29 δ com os carbonos 75,2 (2J), 29,1 (3J) e 43,0 δ (3J); hidrogênios em 1,42 δ com os carbonos 75,2 (2J), 25,8 (3J) e 43,0 δ (3J); hidrogênios em 1,83 e 2,14 δ com os carbonos 64,1 (2J), 75,2 (2J), 25,8 (3J) 29,1 (3J) e 124,9 δ (3J), o que confirmou a natureza diastereotópica desses dois hidrogênios, além da sua localização na molécula; hidrogênios em 4,80 δ com os carbonos 64,1 (2J), 75,2 (3J), 111,8 (3J) e 147,3 δ (2J). A localização da metoxila na molécula foi determinada através da correlação dos hidrogênios em 3,76 δ com o carbono 153,6 (3J); foi possível observar ainda a correlação dos hidrogênios aromáticos em 6,72 δ com os carbonos 147,3 (2J), 124,9 (3J) e 153,6 δ (3J); em 6,77 δ com os carbonos 153,6 (2J), 111,8 (3J) e 147,3 δ (3J); em 7,00 δ , com os carbonos 124,9 (2J), 153,6 (2J), 64,1 (3J), 116,1 (3J) e 147,3 δ (3J) (Tab. 9, p. 71, Fig. 38, p. 70).

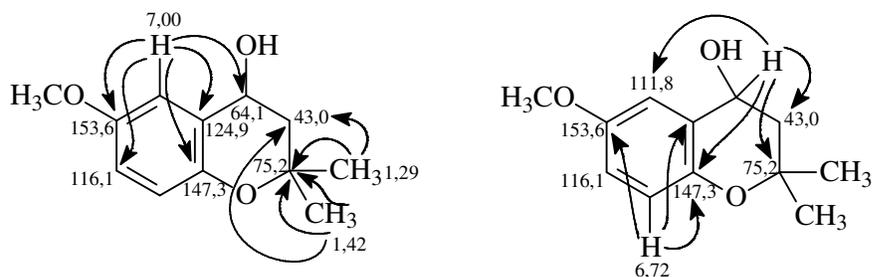


Figura 38: Principais acoplamentos a longa distância observados no espectro de RMN bidimensional HMBC de LS3

Por tratar-se de uma molécula quiral, a rotação específica deste composto foi obtida ($[\alpha]_D^{25} = -1,2$ ($c = 0,42$, CHCl_3)). Entretanto, embora a literatura (RUKACHAISIRIKUL *et al.*, 2005; ABRAHAM; ABATE, 1995) atribua a configuração *S* para o 4-hidroxi-2,2-dimetil-6-metoxicromano isolado de *Lentinus connatus* e *Lentinus crinitus*, não foi possível ter acesso à rotação específica desta molécula para fins de comparação com a isolada de *L. strigellus*.

Tabela 9: Deslocamentos químicos (δ) de RMN ^{13}C de LS3 com padrão de hidrogenação obtido pela comparação dos espectros ^{13}C -BB e DEPT-135°

C	CH	CH ₂	CH ₃	TOTAL
75,2	64,1	43,0	25,8	
118,1	111,8		29,1	
124,9	116,1		56,0	
153,6	118,1			
C ₄	C ₄ H ₄	CH ₂	C ₂ H ₆	C ₁₁ H ₁₂
=C-O	C-O		O-CH ₃	C ₁₂ H ₁₆ O ₃

Tabela 10: Dados de RMN ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) LS3 em CDCl_3

C	HSQC	δ_{C}	COSY		HMBC	
	δ_{H}			2J	3J	
2		75,2				
3	2,14 (1H, dd, $J=6,2$ e $13,3$ Hz) 1,83(1H, dd, $J=8,8$ e $13,3$ Hz)	43,0	4,80	64,1; 76,2	25,8; 29,1; 124,9	
4	4,80 (1H, dd, $J=6,2$ e $8,8$ Hz)	64,1	2,14; 1,83	43,0; 124,9	75,2; 111,8; 147,3	
5	7,00 (1H, d, $J=2,9$ Hz)	111,8		124,9; 153,6	64,1; 116,1; 147,3	
6		153,6				
7	6,77 (1H, dd, $J=2,9$ e $8,9$ Hz)	116,1	6,72	153,6	111,8; 147,3	
8	6,72 (1H, d, $J=8,9$ Hz)	118,1	6,77	147,3	124,9; 153,6	
9		147,3				
10		124,9				
CH_3	1,29 (3H, s)	25,8		75,2	29,1; 43,0	
CH_3	1,42 (3H, s)	29,1		75,2	29,1; 43,0	
OCH_3	3,76 (3H, s)	56,0			153,6	

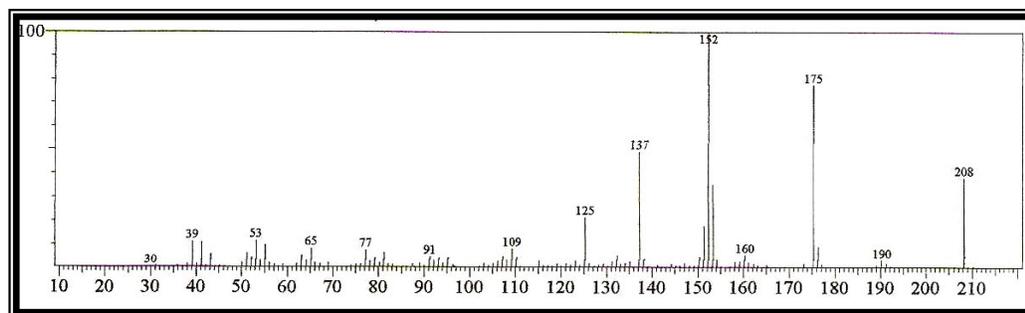


Figura 39: Espectro de massa de LS3 (IE, 70 eV)



Figura 40: Espectro de RMN ^1H de LS3 (CDCl_3 , 500 MHz)

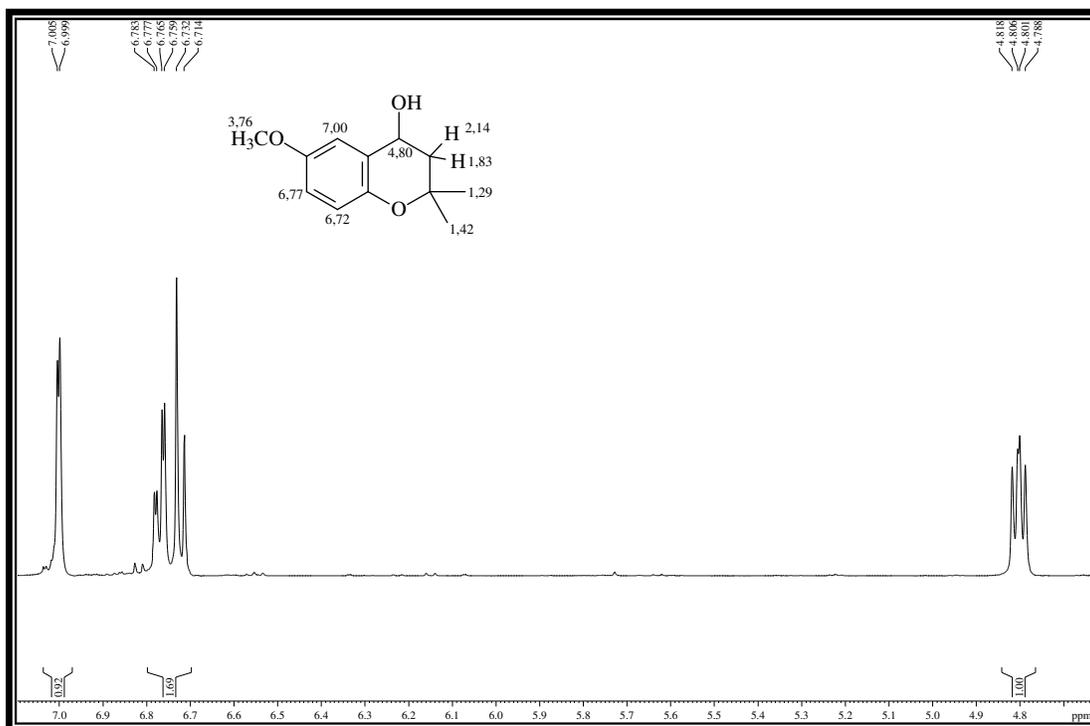


Figura 41: Expansão do espectro de RMN ^1H de LS3 (CDCl_3 , 500 MHz)

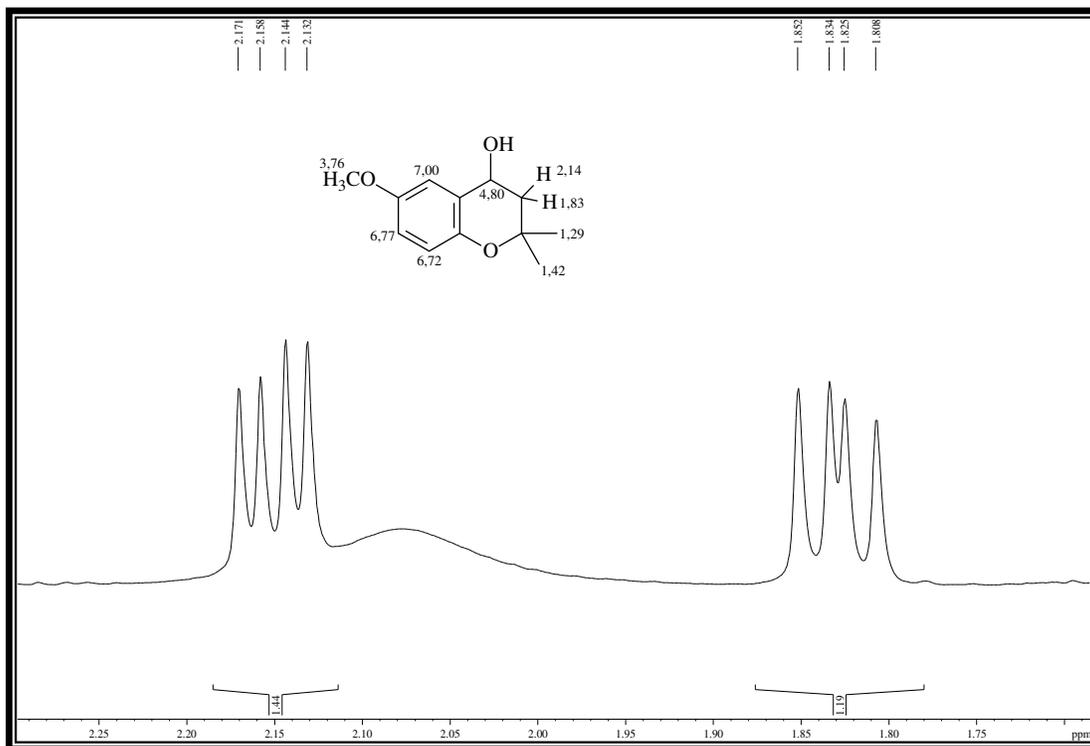


Figura 42: Expansão do espectro de RMN ¹H de LS3 (CDCl₃, 500 MHz)

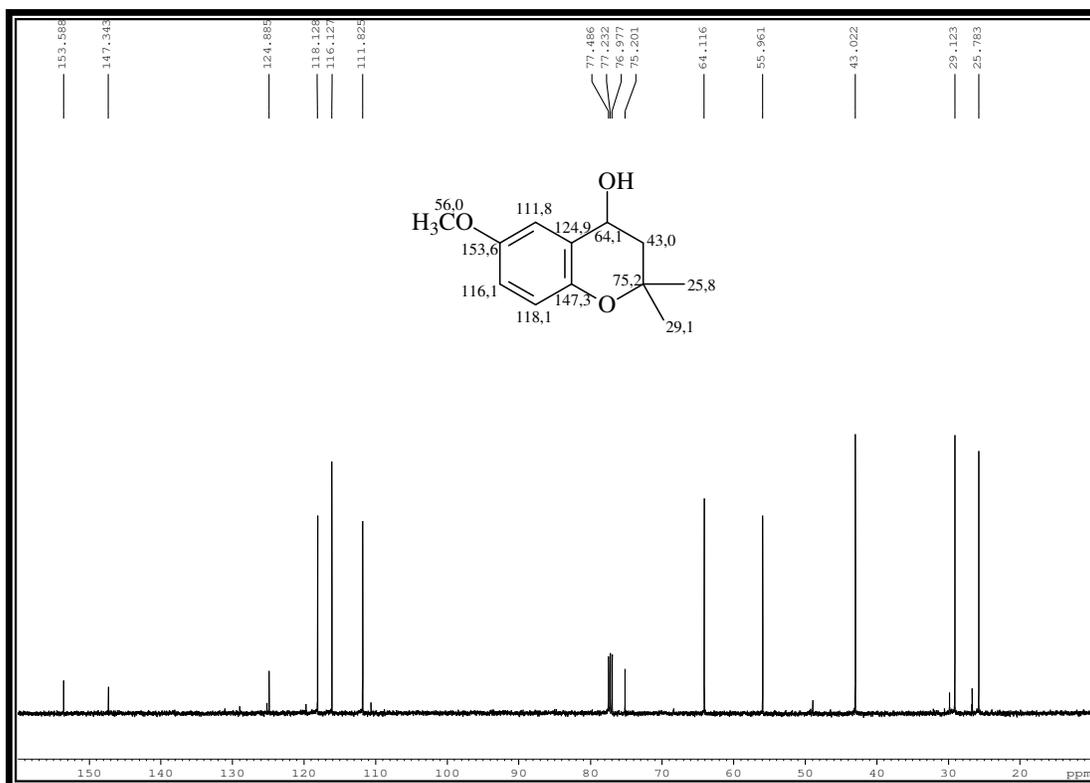


Figura 43: Espectro de RMN ¹³C –BB de LS3 (CDCl₃, 125 MHz)

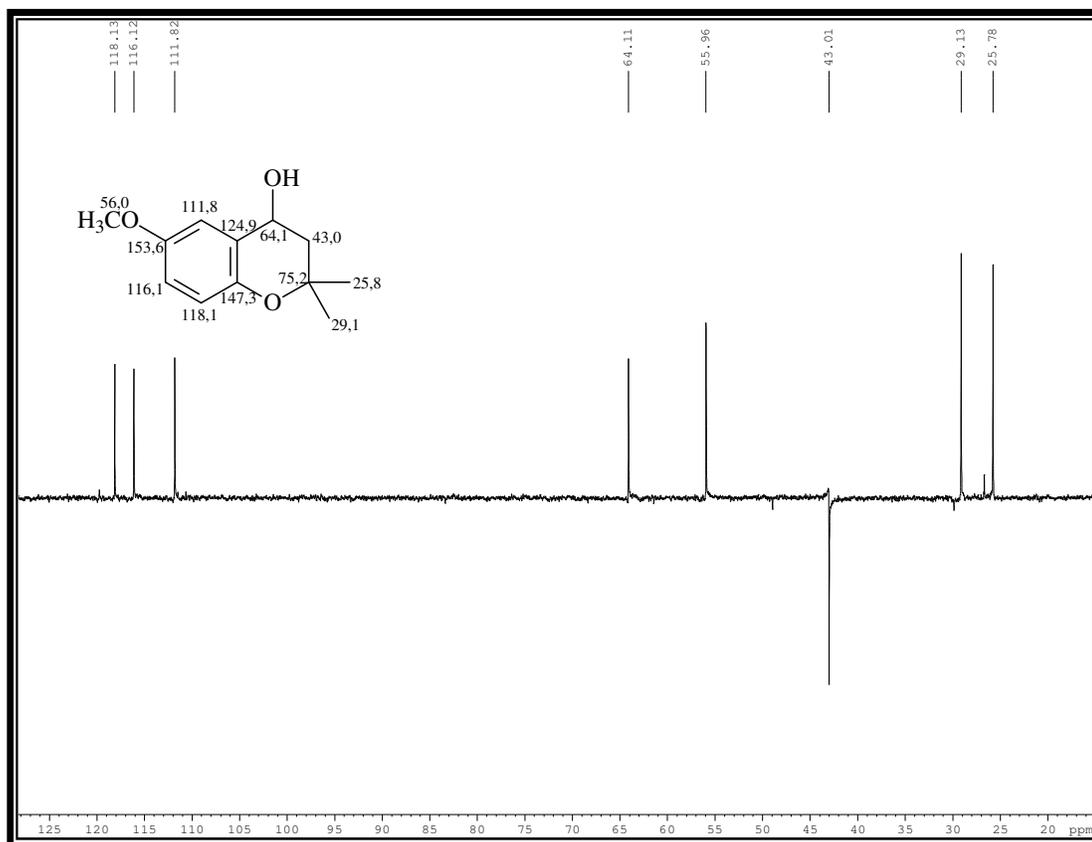


Figura 44: Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° de LS3 (CDCl_3 , 125 MHz)

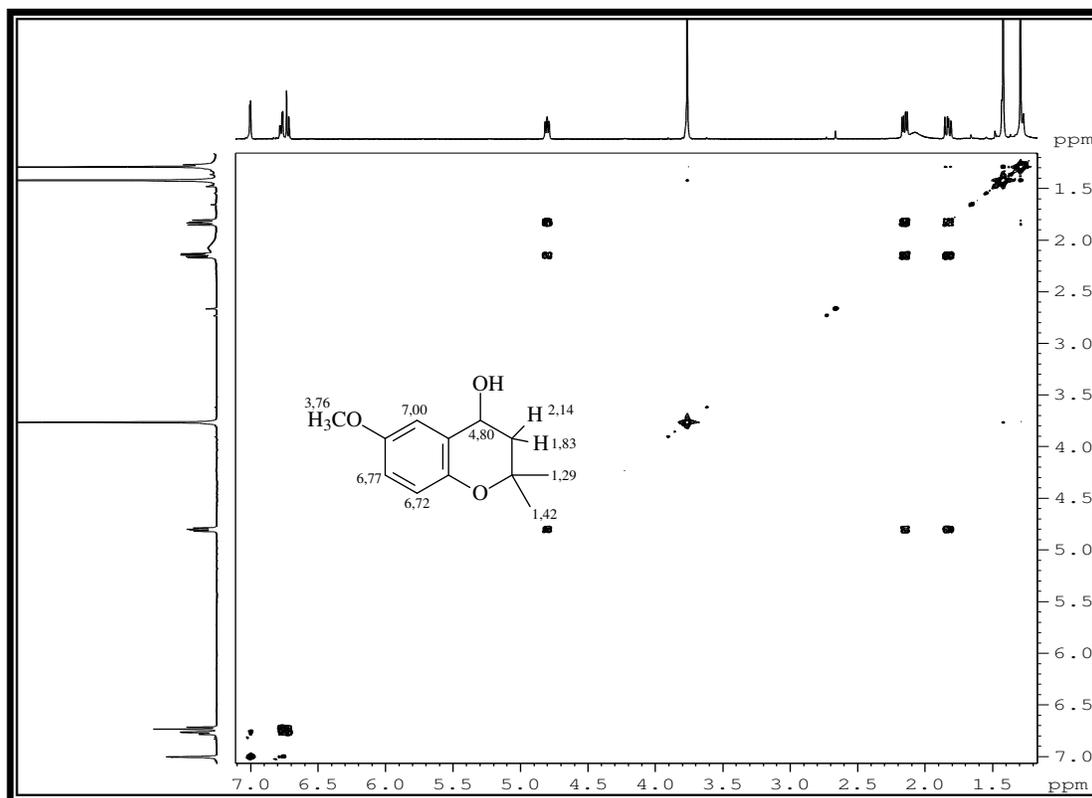


Figura 45: Espectro bidimensional COSY ^1H - ^1H de LS3 (CDCl_3 , 500 MHz)

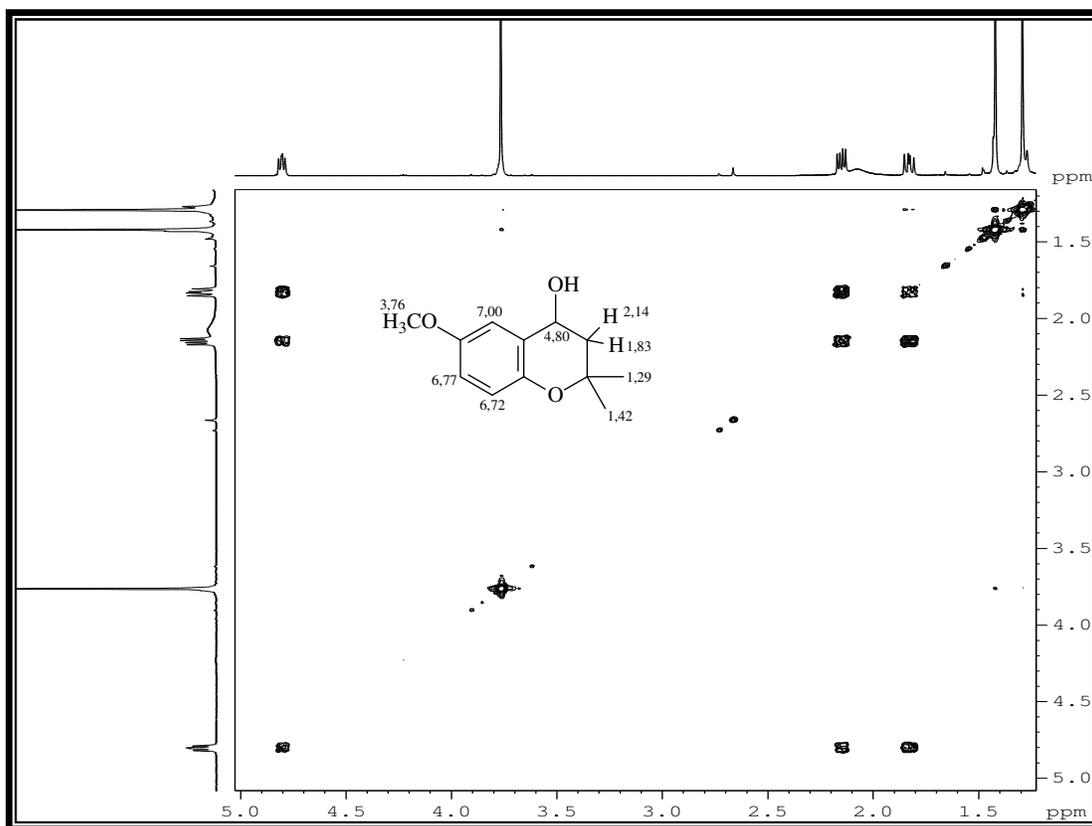


Figura 46: Expansão do espectro bidimensional COSY ¹H-¹H de LS3 (CDCl₃, 500 MHz)

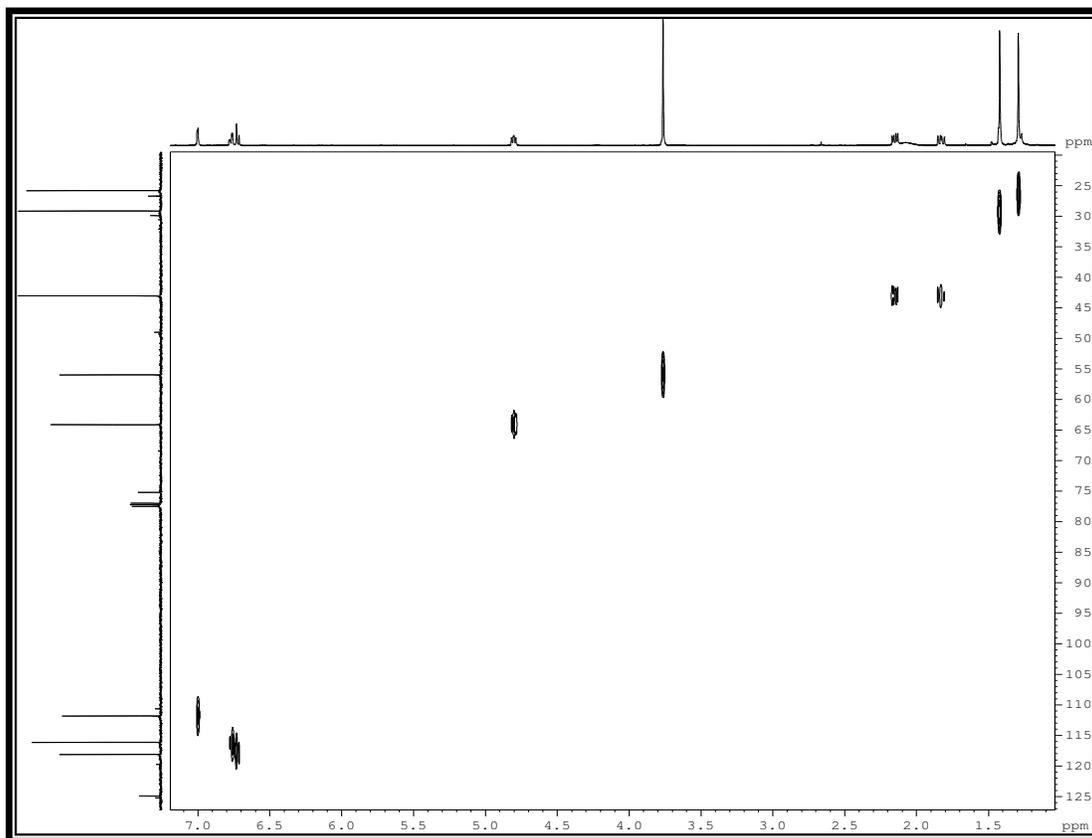


Figura 47: Espectro bidimensional HSQC de LS3 (CDCl₃, 500 MHz /125 MHz)

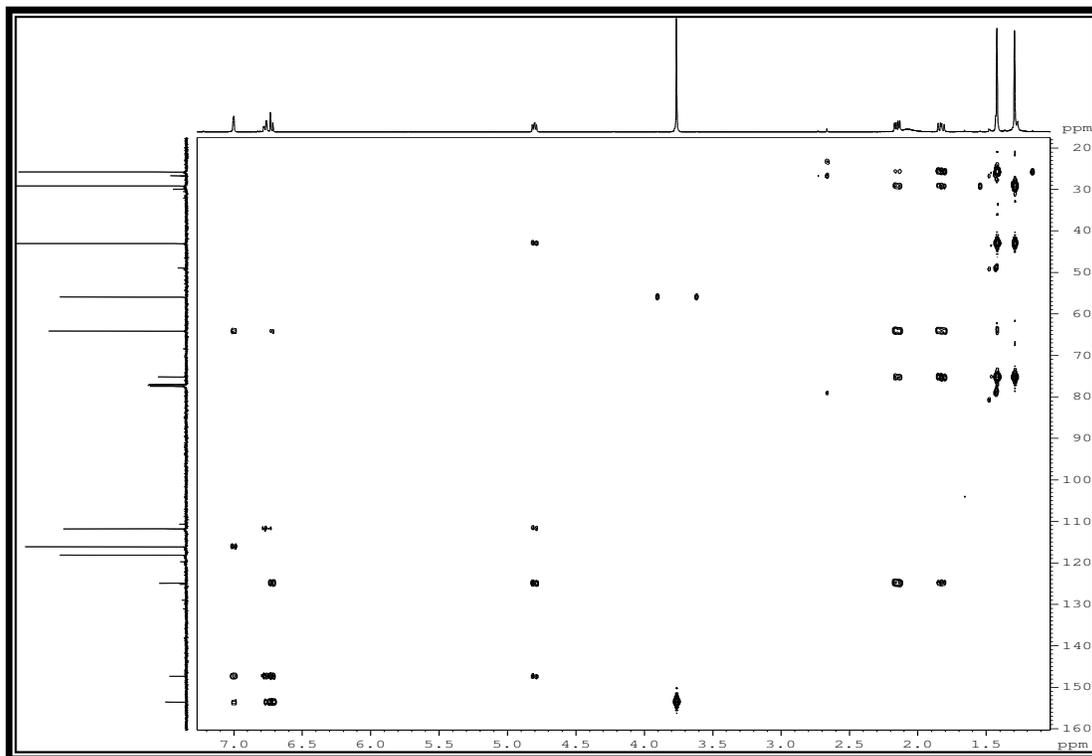


Figura 48: Espectro bidimensional HMBC de LS3 (CDCl₃, 500 MHz /125 MHz)

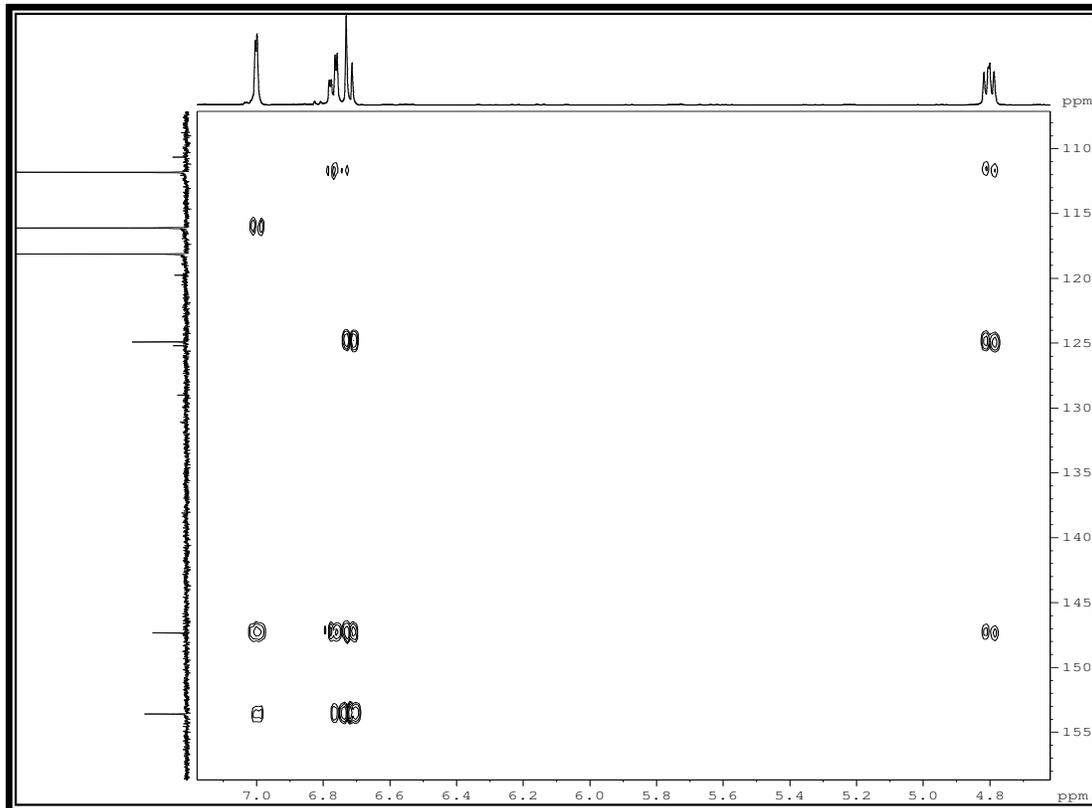


Figura 49: Expansão do espectro bidimensional HMBC de LS3 (CDCl₃, 500 MHz /125 MHz)

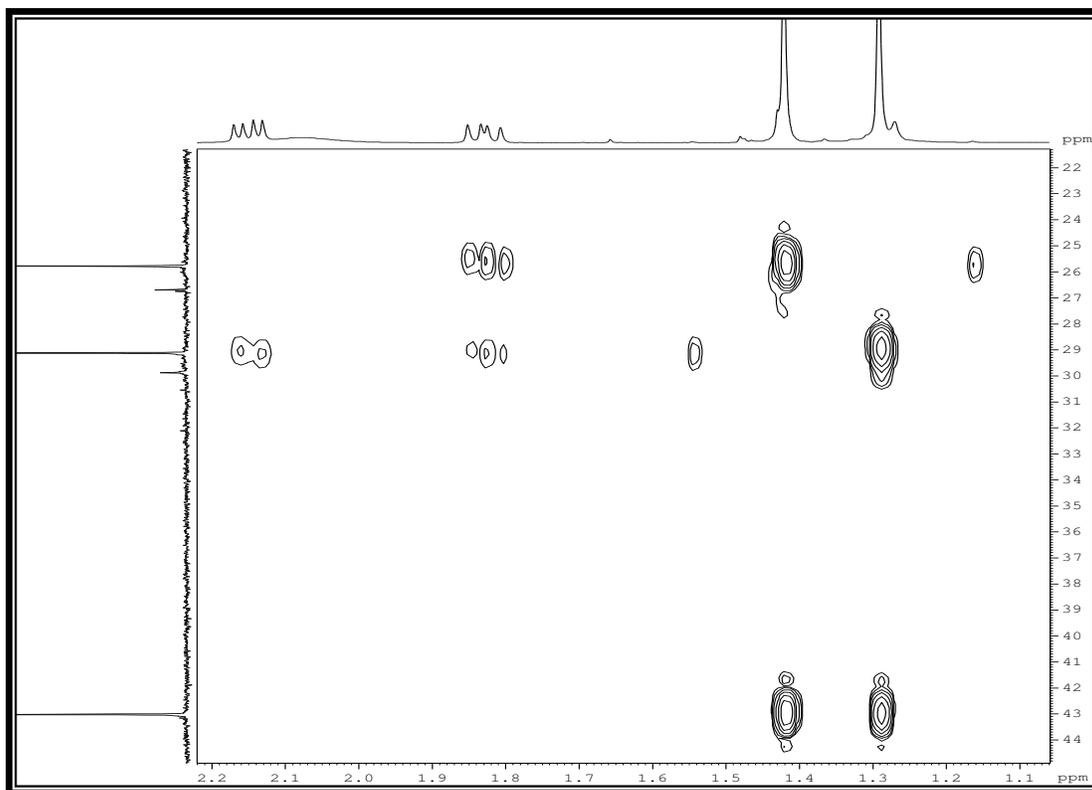


Figura 50: Expansão do espectro bidimensional HMBC de LS3 (CDCl₃, 500 MHz /125 MHz)

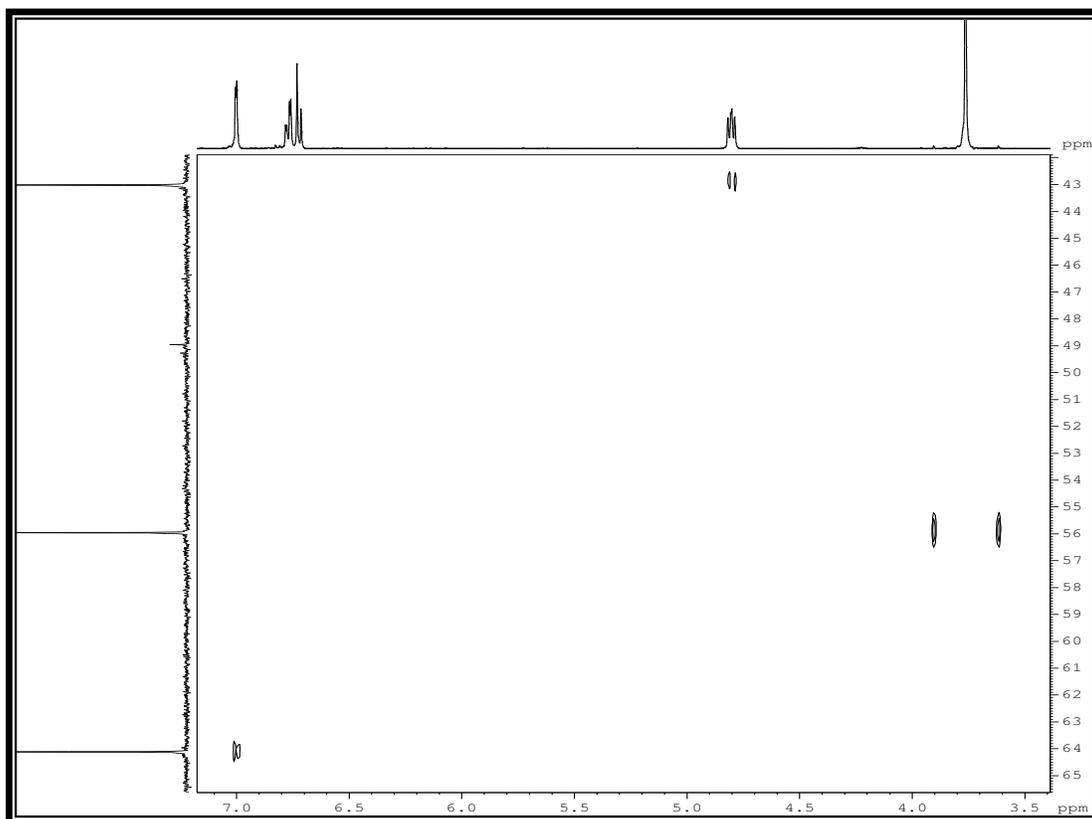


Figura 51: Expansão do espectro bidimensional HMBC de LS3 (CDCl₃, 500 MHz/125 MHz)

4.2.4 Isolamento e Identificação de LS4

Após partição líquido-líquido do meio de cultura peptona proveniente do cultivo do basidiomiceto *L. strigellus* sob agitação (PMeLSA), o extrato acetato de etila foi submetido a sucessivos fracionamentos cromatográficos, levando ao isolamento de um líquido viscoso, levemente esverdeado, denominado LS4 (Item 5.8.6, p. 193). Em CCDA, quando revelado com vanilina, apresentava coloração azul.

O espectro de massa (Fig. 54, p. 82) de LS4 apresentou o pico íon molecular com razão massa/carga igual a 206 Daltons.

O espectro de RMN ^1H (Fig. 55, p. 82) de LS4 apresentou um sinal em 1,43 δ (6H, s), indicando a presença de duas metilas magneticamente idênticas; sinal em 2,69 δ (2H, s), possivelmente de um fragmento CH_2 isolado; um simpleto em 3,79 δ (3H), característico de grupamento metoxila. Foram ainda observados sinais em 6,85 δ (1H, d, $J = 9,0$ Hz), 7,07 δ (1H, dd, $J = 9,0$ e 3,1 Hz), e 7,28 δ (1H, d, $J = 3,1$ Hz), que caracterizaram a presença de um anel aromático trissubstituído.

O espectro de RMN ^{13}C -BB (Fig. 57, p. 83) para essa substância apresentou onze sinais, dentre eles um sinal (192,7 δ) de carbonila conjugada; seis sinais de carbonos sp^2 (107,2-154,3 δ), sendo dois deles funcionalizados (153,8 e 154,8 δ); quatro sinais de carbonos sp^3 , sendo um deles (79,2 δ), possivelmente, de um carbono não hidrogenado e oxigenado, um característico de grupo metoxila (55,9 δ) e outro do carbono metilênico (49,0 δ) identificado no espectro de RMN ^1H . Este último, pelo valor de deslocamento químico, foi sugerido estar ligado a uma carbonila (192,7 δ). Como o sinal em 26,7 δ é característico de grupamento metila, e o espectro de RMN ^1H indicou a presença de duas unidades deste substituinte na molécula, foi possível supor que o sinal em 26,7 δ é referente as duas metilas presentes na molécula. Assim, ao invés de onze, foram propostos doze átomos de carbono para LS4.

Comparação entre os espectros de RMN ^{13}C -DEPT 135° (Fig. 59, p. 84) e ^{13}C -BB mostrou a presença de cinco carbonos não hidrogenados (C), três carbonos metínicos (CH), um carbono metilênico (CH_2) em 49,0 δ , confirmando o deslocamento para este grupo, e um sinal associado a dois carbonos metílicos (CH_3).

O espectro de RMN bidimensional HSQC (Fig. 61, p. 85) de LS4 apresentou as correlações dos hidrogênios em 7,28, 7,07, e 6,85 δ com os carbonos 107,2, 125,5, e 119,8 δ respectivamente; do hidrogênio em 3,79 δ com o carbono em 55,9 δ e dos hidrogênios em 2,69 e 1,43 δ com os respectivos carbonos em 49,0 e 26,7 δ .

Os dados discutidos anteriormente permitiram sugerir para LS4 a fórmula molecular $C_{12}H_{14}O_3$ e a estrutura de uma cromanona. Comparação com dados da literatura (WANG *et al.*, 2004) (Tab. 10, p. 80) para esta classe de moléculas, permitiu propor para o composto isolado a estrutura da 2,2-dimetil-6-metoxicroman-4-ona (Fig. 52).

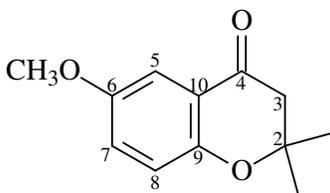


Figura 52: Estrutura da 2,2-dimetil-6-metoxicroman-4-ona

A proposição estrutural foi confirmada através da análise do espectro bidimensional HMBC (Fig. 62, p. 86) do composto. As seguintes correlações foram observadas: hidrogênios em 7,28 δ com os carbonos 120,1 (2J), 153,8 δ (2J), 125,2 (3J), 154,8 (3J), e 192,7 δ (3J); em 7,07 δ com os carbonos 153,8 (2J), 107,2 (3J) e 154,8 δ (3J); em 6,85 δ com os carbonos em 154,8 δ (2J), 120,1 δ (3J) e 153,8 δ (3J). A correlação a longa distância da metoxila em 3,79 δ com o carbono 153,8 δ (3J) do anel aromático confirmou a localização deste grupo na molécula. Foi também observado o acoplamento dos hidrogênios em 2,69 δ com os carbonos 79,2 δ (2J), 192,7 δ (2J), 26,7 δ (3J) e 120,1 δ (3J), confirmando a ligação do carbono metilênico ao grupo carbonila. O espectro HMBC apresentou ainda o acoplamento dos hidrogênios em 1,43 δ com os carbonos 79,2 (2J) e 49,0 δ (3J) (Tab. 12, p. 81; Fig. 53, p.80).

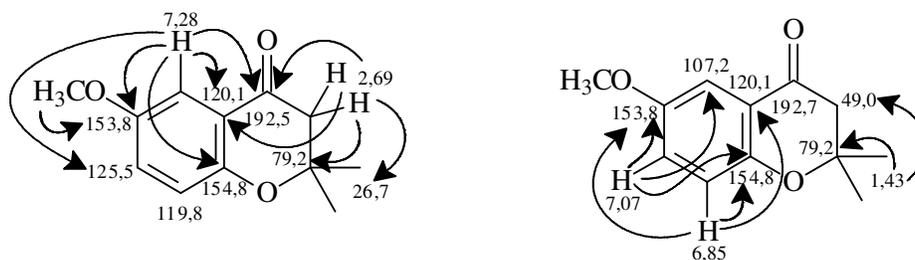


Figura 53: Principais acoplamentos a longa distância de LS4

A 2,2-dimetil-6-metoxicroman-4-ona foi anteriormente isolada de *Lentinus connatus* (RUKACHAISIRIKUL *et al.*, 2005) e *Lentinus crinitus* (ABRAHAM; ABATE, 1995). Vale ressaltar que esta molécula foi obtida por Wang e colaboradores (2004) como intermediário na síntese de vários 3,4-dihidroxi-2,2-dimetil-6-metoxicromanos. Nenhum dado acerca da atividade biológica desta molécula foi encontrado na literatura.

Tabela 11: Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C (δ) de LS4 com padrão de hidrogenação obtido pela comparação dos espectros ^{13}C -BB e DEPT-135 $^\circ$

C	CH	CH ₂	CH ₃	TOTAL
79,2	107,2	49,0	26,7	
120,1	119,5		26,7	
153,8	125,5		55,9	
154,8				
192,7				
C ₅	C ₃ H ₃	CH ₂	C ₂ H ₆	C ₁₁ H ₁₁
C=O			O-CH ₃	C ₁₂ H ₁₄ O ₃
C-O				

Tabela 12: Comparação entre os dados de RMN ^1H (CDCl_3) da 2,2-dimetil-6-metoxicroman-4-ona (WANG *et al.*, 2004) e LS4

C	RMN ^1H	
	(WANG <i>et al.</i> , 2004) ^(a)	LS4 ^(b)
2		
3	2,73 (2H, s)	2,69 (2H, s)
4		
5		7,28 (1H, d, $J=3,1$ Hz)
6		
7	6,86-7,32 (3H, m)	7,07 (1H, dd, $J=3,1$ e $9,0$ Hz)
8		6,85 (1H, d, $J=9,0$ Hz)
9		
10		
2xCH ₃	1,49 (6H, s)	1,43 (6H, s)
OCH ₃	3,82 (3H, s)	3,79 (3H, s)

(a) 200 MHz; (b) 500 MHz;

Tabela 13: Dados de RMN ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) de LS4 em CDCl_3

C	HSQC	COSY		HMBC	
	δ_{H}	δ_{C}		2J	3J
2		79,2			
3	2,69 (2H, s)	49,0		79,2; 192,7	26,7; 120,1
4		192,7			
5	7,28 (1H, d, $J=3,1$ Hz)	107,2		120,1; 153,8	125,2; 154,8; 192,7
6		153,8			
7	7,07 (1H, dd, $J=3,1$ e $9,0$ Hz)	125,5	6,85	153,8	107,2; 154,8
8	6,85 (1H, d, $J=9,0$ Hz)	119,8	7,07	154,8	120,1; 153,8
9		154,8			
10		120,1			
2x CH ₃	1,43 (6H, s)	26,7		79,2	49,0
OCH ₃	3,79 (3H, s)	55,9			153,8

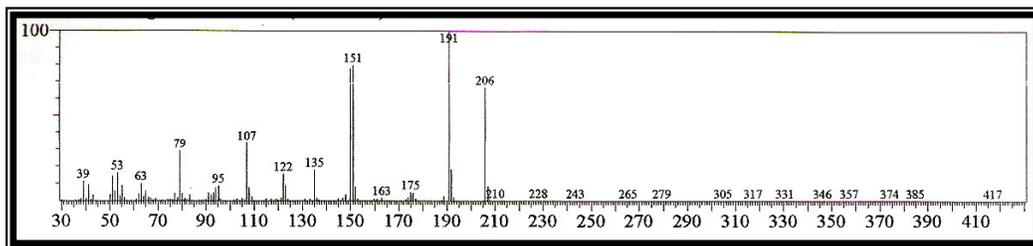


Figura 54: Espectro de massa de LS4 (IE, 70 eV)

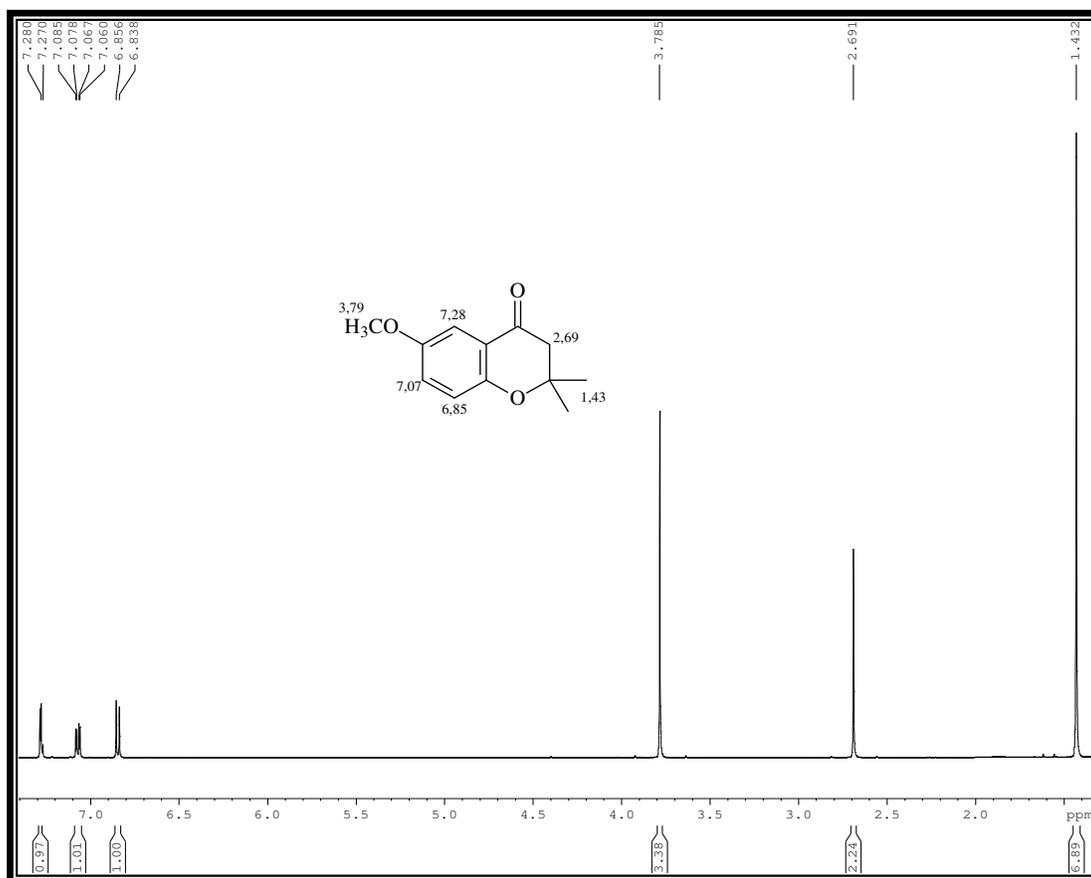


Figura 55: Espectro de RMN ¹H de LS4 (CDCl₃, 500 MHz)

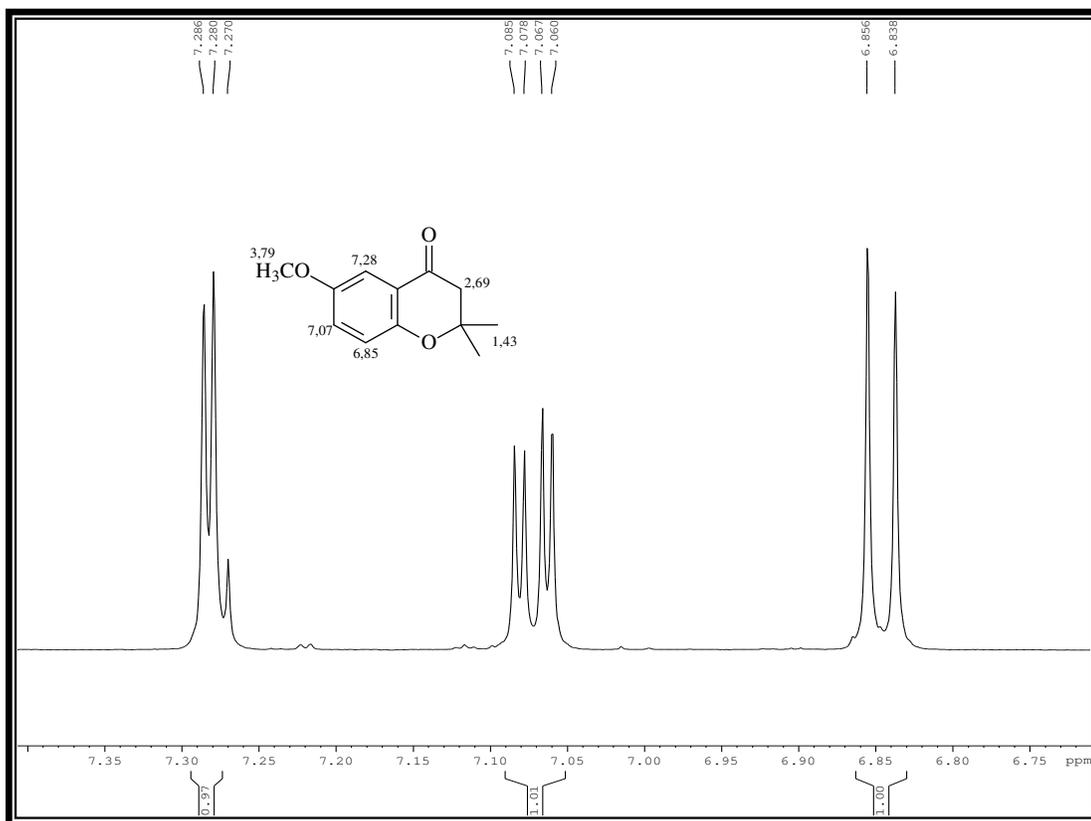


Figura 56: Expansão do espectro de RMN ¹H de LS4 (CDCl₃, 500 MHz)

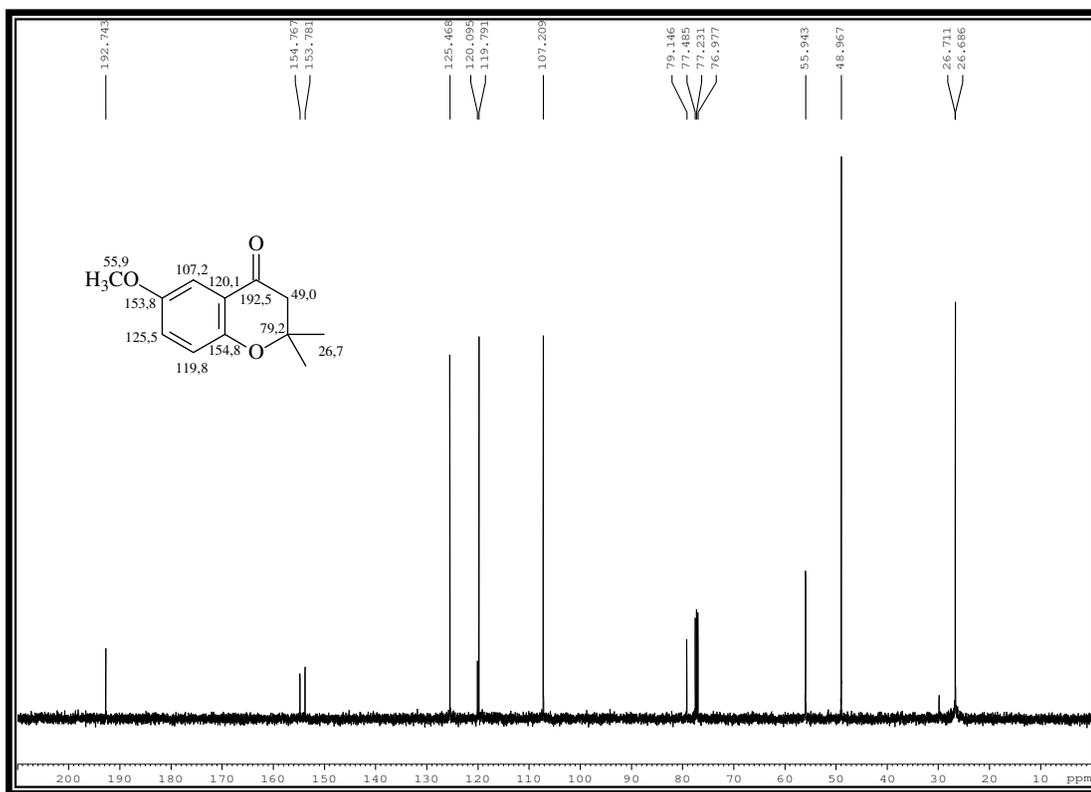


Figura 57: Espectro de RMN ¹³C –BB de LS4 (CDCl₃, 125 MHz)

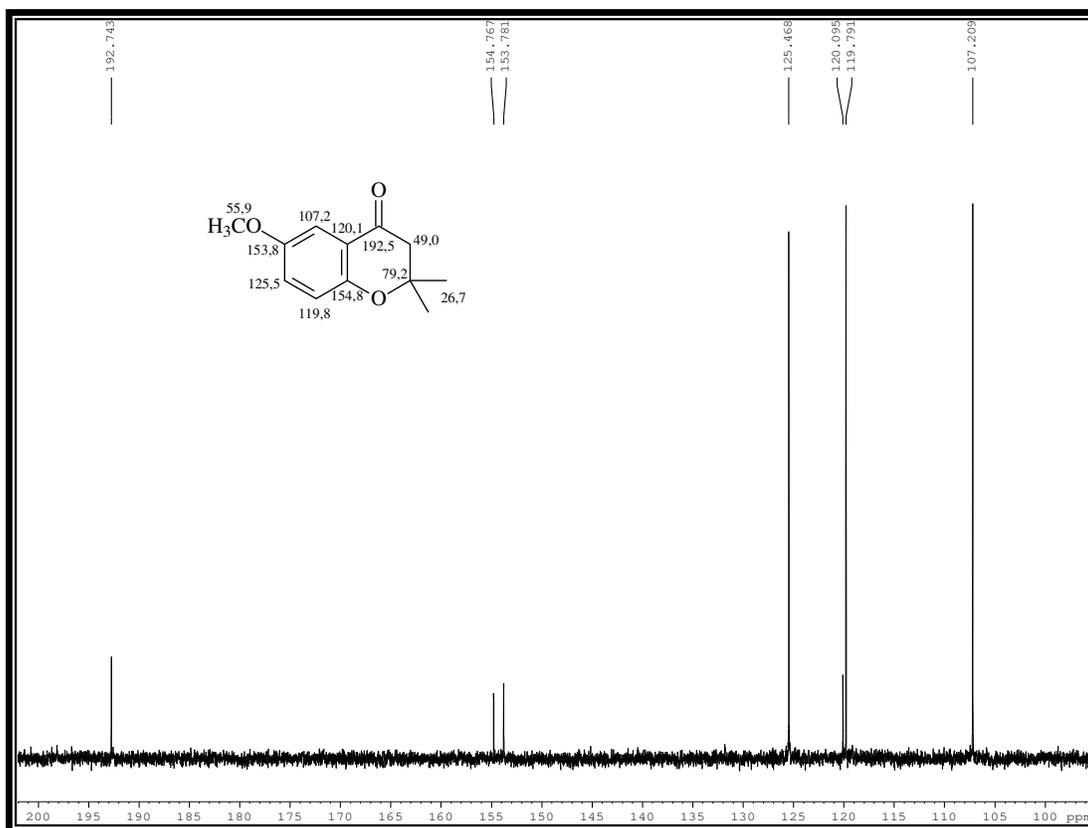


Figura 58: Expansão do espectro de RMN ^{13}C –BB de LS4 (CDCl_3 , 125 MHz)

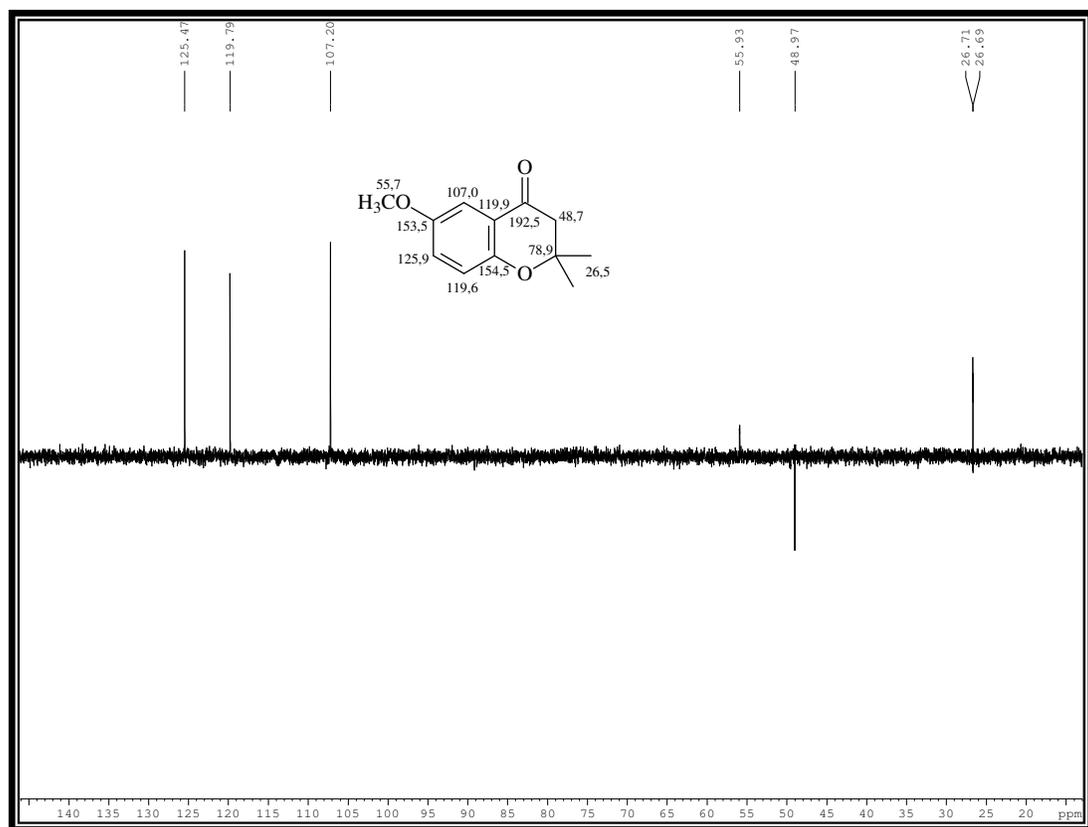


Figura 59: Espectro de RMN ^{13}C –DEPT 135° de LS4 (CDCl_3 , 125 MHz)

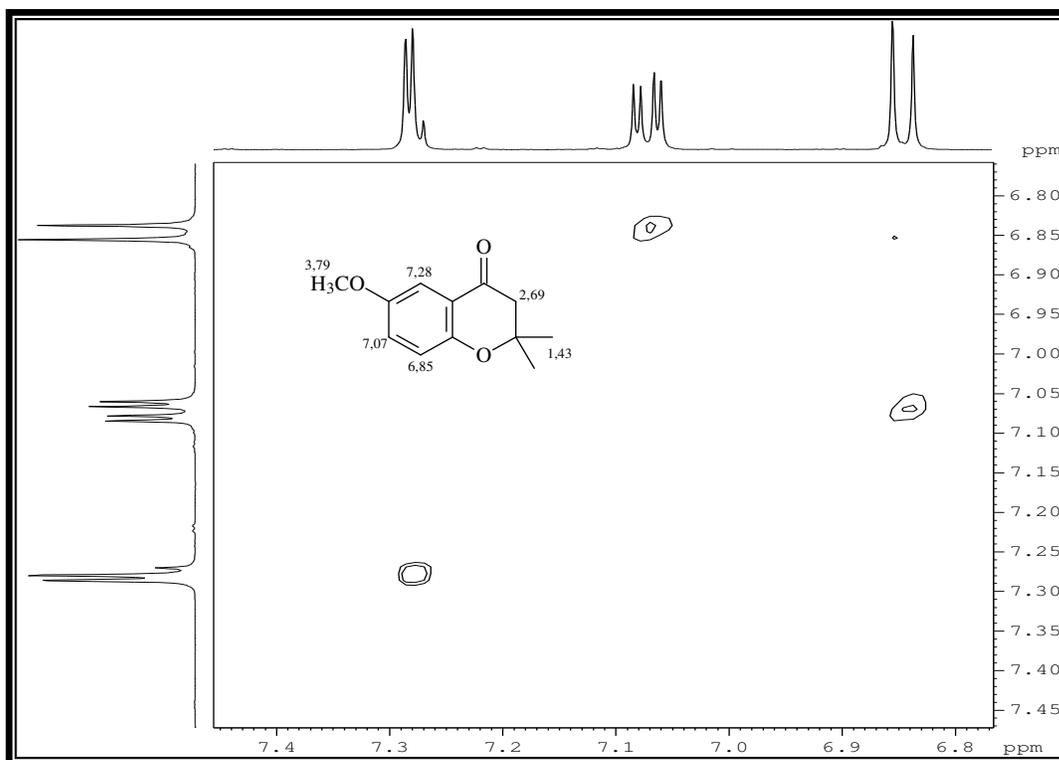


Figura 60: Expansão do espectro bidimensional COSY ¹H-¹H de LS4 (CDCl₃, 500 MHz)

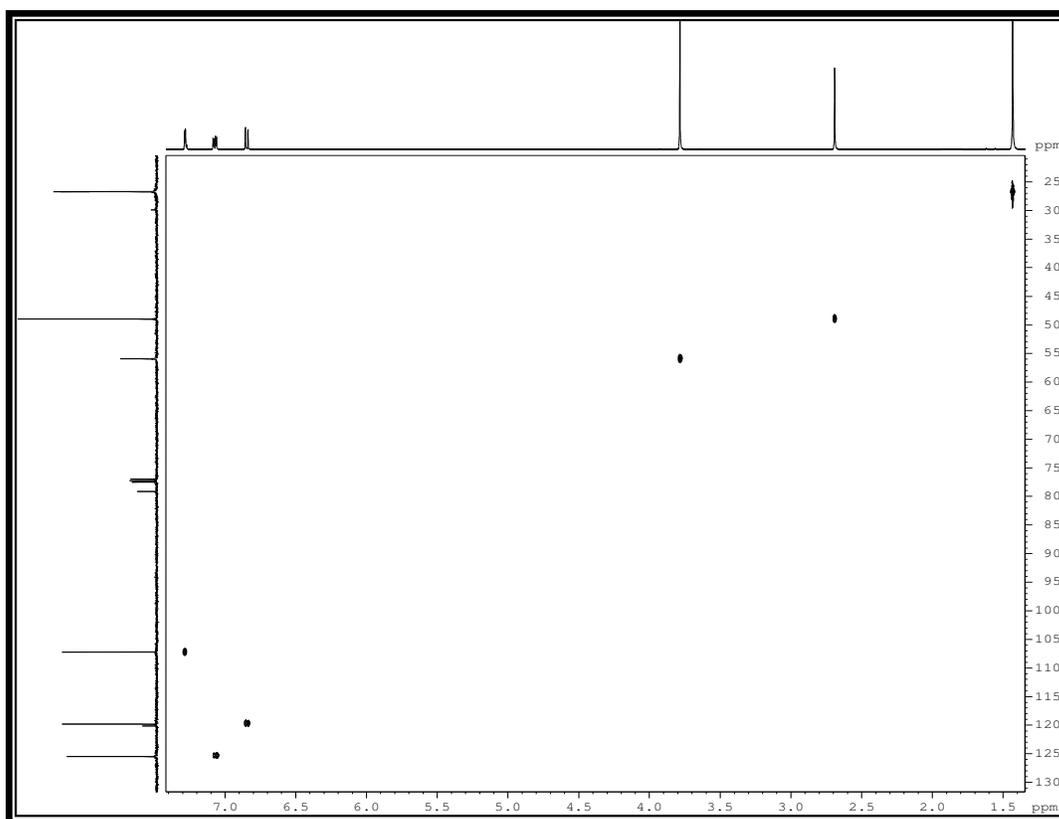


Figura 61: Espectro bidimensional HSQC de LS4 (CDCl₃, 500 MHz/125 MHz)

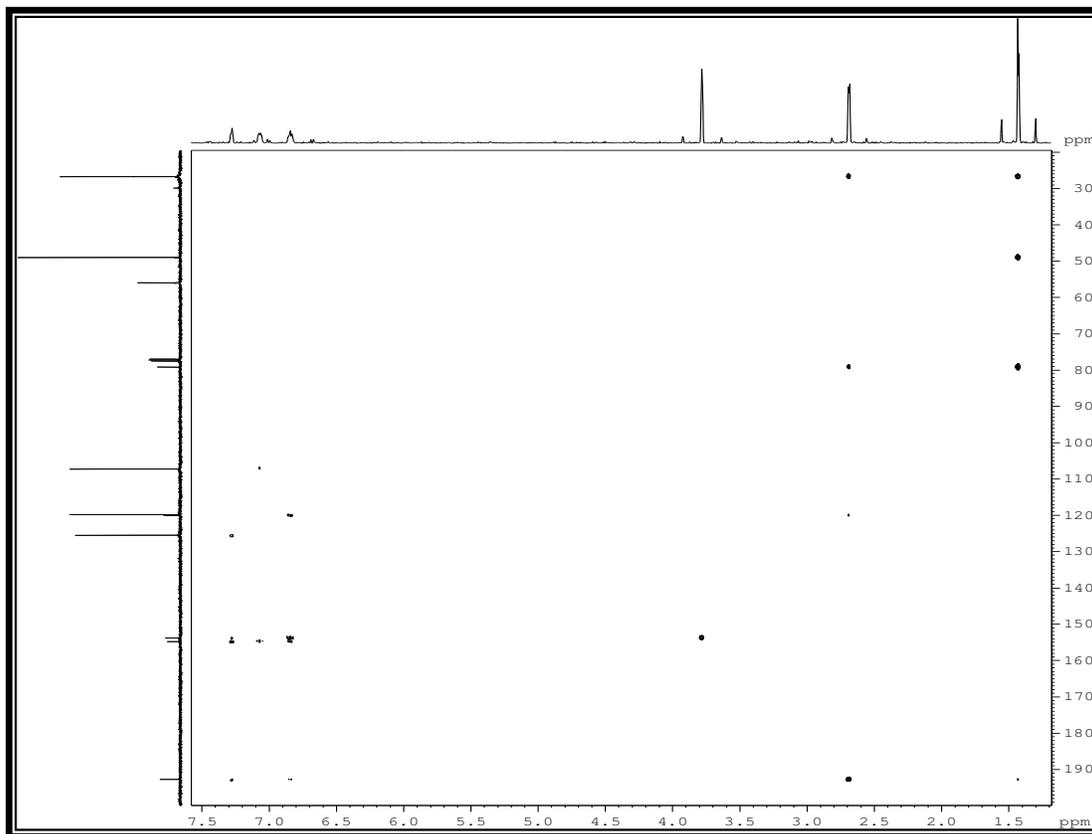


Figura 62: Espectro bidimensional HMBC de LS4 (CDCl₃, 500 MHz/125 MHz)

4.2.5 Isolamento e Identificação de LS5

Fracionamentos cromatográficos sucessivos do extrato obtido a partir da partição líquido-líquido do meio de cultura peptona utilizado no cultivo de *L. strigellus* sob agitação (Item 5.7.2, p. 189), permitiram o isolamento de um líquido viscoso marrom denominado de LS5 (Item 5.8.7, p. 194).

O espectro de RMN ^{13}C -BB (Fig. 68, p. 92) apresentou doze sinais, dos quais seis encontravam-se em região de carbono sp^2 (111,7-153,9), três (70,2, 76,9 e 78,2 δ) atribuídos a carbonos sp^3 oxigenados, além um sinal característico de metoxila (56,0 δ) e dois sinais em 18,8 e 26,8 δ , atribuídos a duas metilas.

A comparação entre o espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (Fig. 70, p. 93) e o espectro de RMN ^{13}C -BB revelou a presença de quatro carbonos não hidrogenados (C), cinco carbonos metínicos (CH), dois deles (70,2 e 76,9 δ) em região de carbono sp^3 , além de três sinais para carbonos metílicos (CH₃), um deles (56,0 δ) de grupo metoxila.

O espectro de RMN ^1H (Fig. 66, p. 91) de LS5 apresentou dois simpletos em 1,17 e 1,43 δ para três hidrogênios cada, atribuídos a duas metilas presentes na molécula; simpleto em 3,73 δ (3H), característico de grupamento metoxila; sinais em 3,56 (1H, d, $J = 8,6$ Hz) e 4,51 δ (1H, d, $J = 8,6$ Hz), associados a dois hidrogênios vicinais ligados a carbono oxigenado e com configuração *trans* entre si. Foram ainda observados sinais referentes a hidrogênios de anel aromático em 6,70 δ (1H, d, $J = 8,8$ Hz), 6,76 δ (1H, dd, $J = 8,8$ e 2,7 Hz), e 6,96 δ (1H, d, $J = 2,7$ Hz), sugerindo tratar-se de um sistema trissubstituído, com hidrogênios *meta* posicionados.

O espectro bidimensional HSQC (Fig. 72, p. 94) mostrou a correlação dos hidrogênios do anel aromático em 6,96, 6,76 e 6,70 δ com os carbonos 111,7, 116,2 e 117,8 δ , respectivamente. Mostrou também a correlação dos hidrogênios dos grupos metilas em 3,73, 1,43 e 1,17 δ com os carbonos 56,0, 26,8 e 18,8 δ , respectivamente, além da correlação dos hidrogênios dos carbonos metínicos em 4,51 e 3,56 δ com os seus respectivos carbonos em 70,0 e 76,9 δ .

O espectro de massa (Fig. 65, p. 90) de LS5 apresentou o pico íon molecular com razão massa/carga de 224 daltons, sugerindo a fórmula molecular $C_{12}H_{16}O_3$.

Os dados discutidos sugeriram a estrutura de um cromano, semelhante à proposta para LS3 (Item 4.2.3, p. 67), mas hidroxilado nas posições 3 e 4. Através de levantamento bibliográfico, foi possível propor para o produto isolado a estrutura do (3*R**,4*S**)-3,4-dihidroxi-2,2-dimetil-6-metoxicromano (Fig. 63) (WANG *et al.*, 2004).

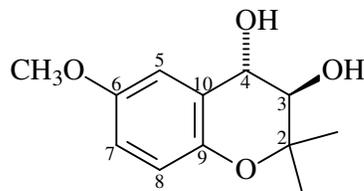


Figura 63: Estrutura do (3*R**,4*S**)-3,4-dihidroxi-2,2-dimetil-6-metoxicromano

A estrutura proposta foi confirmada através do espectro bidimensional HMBC (Fig. 73, p. 94), o qual apresentou as seguintes correlações principais: hidrogênio em 3,56 δ com os carbonos em 70,2 (2J), 78,2 (2J), 18,8 (3J) e 26,8 δ (3J); em 4,51 δ com os carbonos 76,9 (2J), 123,9 (2J), 111,8 (3J) e 146,4 (3J), confirmando a localização destes hidrogênios na molécula (Fig. 64).

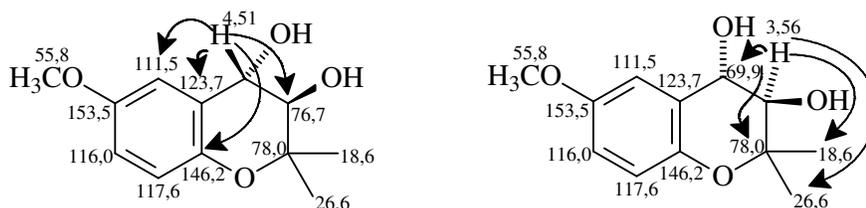


Figura 64: Principais acoplamentos a longa distância observados no espectro de RMN bidimensional HMBC de LS5

Através da comparação da rotação específica de LS5 ($[\alpha]_D^{25} = -4,1$ (c 0,50, acetona)) com dados da literatura para o (3*R*,4*S*)-3,4-dihidroxi-2,2-dimetil-6-metoxicromano, sintetizado assimetricamente ($[\alpha]_D^{25} = -31$ (c 3,2, acetona)) (WANG *et al.*, 2004), foi possível estabelecer a mesma configuração absoluta para o produto isolado de *L. strigellus*. Vale ressaltar que este metabólito secundário foi anteriormente isolado do basidiomiceto *Panus rudis* (*L. strigosus*) (KIS *et al.*, 1970) e apresenta várias propriedades fisiológicas (WANG *et al.*, 2004).

Tabela 14: Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C (δ) de LS5 com padrão de hidrogenação obtido pela comparação dos espectros ^{13}C -BB e DEPT-135 $^{\circ}$

C	CH	CH ₂	CH ₃	TOTAL
78,3	76,9		18,8	
123,9	78,3		26,8	
146,4	111,8		56,0	
153,9	116,2			
	117,9			
C ₄	C ₅ H ₅		C ₂ H ₆	C ₁₁ H ₁₁
C-O	C-O		O-CH ₃	C ₁₂ H ₁₆ O ₃

Tabela 15: Comparação dos dados de RMN ^1H e ^{13}C do (3R, 4S)-3,4-dihidroxi-2,2-dimetil-6-metoxicromano (WANG *et al.*, 2004) com os de LS5

C	RMN ^1H		RMN ^{13}C	
	(WANG <i>et al.</i> , 2004) ^(a)	LS5 ^(b)	(WANG <i>et al.</i> , 2004) ^(b)	LS5 ^(d)
2			78,1	78,3
3	3,33 (1H, dd, $J=8,6, 5,2$ Hz)	3,56 (1H, d, $J=8,6$ Hz)	74,8	76,9
4	4,27 (1H, m, $J=8,6, 6,8$ Hz)	4,51 (1H, d, $J=8,6$ Hz)	68,2	70,2
5		6,96 (1H, d, $J=2,7$ Hz)	112,4	111,8
6			153,0	153,9
7	6,58-6,90 (3H, m)	6,76 (1H, dd, $J=2,7$ e $8,8$ Hz)	114,8	116,2
8		6,70 (1H, d, $J=8,8$ Hz)	116,7	117,9
9			145,8	146,4
10			126,3	123,9
CH ₃	1,06 (3H, s)	1,17 (3H, s)	19,0	18,8
CH ₃	1,31 (3H, s)	1,43 (3H, s)	26,8	26,8
OCH ₃	3,67 (3H, s)	3,73 (3H, s)	55,3	56,0

(a) DMSO 400 MHz; (b) CDCl₃ 500 MHz; (c) DMSO 100 MHz; (d) CDCl₃ 125 MHz

Tabela 16: Dados de RMN ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) de LS5 em CDCl_3

C	HSQC		COSY		HMBC	
	δ_{H}	δ_{C}			2J	3J
2		78,3				
3	3,56 (1H, d, $J=8,6$ Hz)	76,9	4,51	70,2; 78,3	18,8; 26,8	
4	4,51 (1H, d, $J=8,6$ Hz)	70,2	3,56	76,9; 123,9	111,8; 146,4	
5	6,96 (1H, d, $J=2,7$ Hz)	111,8		123,9; 153,9	70,2; 116,2; 146,4	
6		153,9				
7	6,76 (1H, dd, $J=2,7$ e 8,8 Hz)	116,2	6,70	153,9	111,8; 146,4	
8	6,70 (1H, d, $J=8,8$ Hz)	117,9	6,76	146,4	123,9; 153,9	
9		146,4				
10		123,9				
CH_3	1,17 (3H, s)	18,8		78,2	26,8; 76,9	
CH_3	1,43 (3H, s)	26,8		78,2	18,8; 76,9	
OCH_3	3,73 (3H, s)	56,0			153,9	

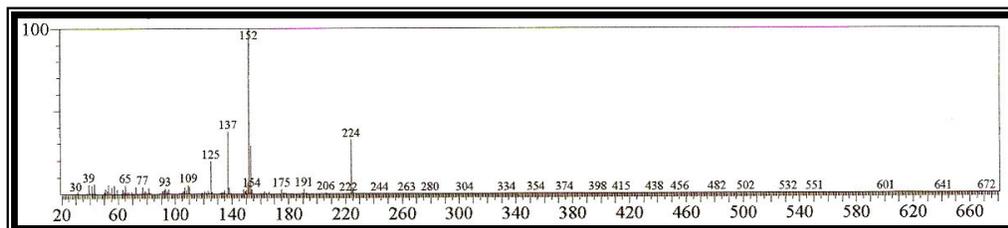


Figura 65: Espectro de massa de LS5 (IE, 70 eV)

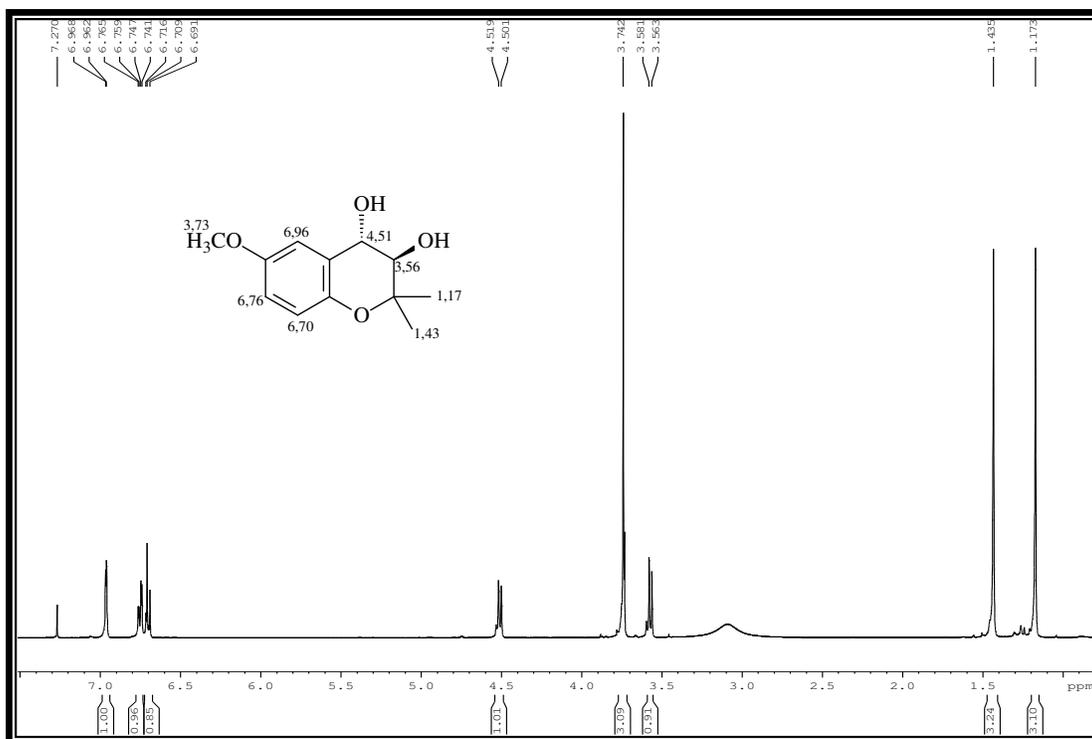


Figura 66: Espectro de RMN ¹H de LS5 (CDCl₃, 500 MHz)

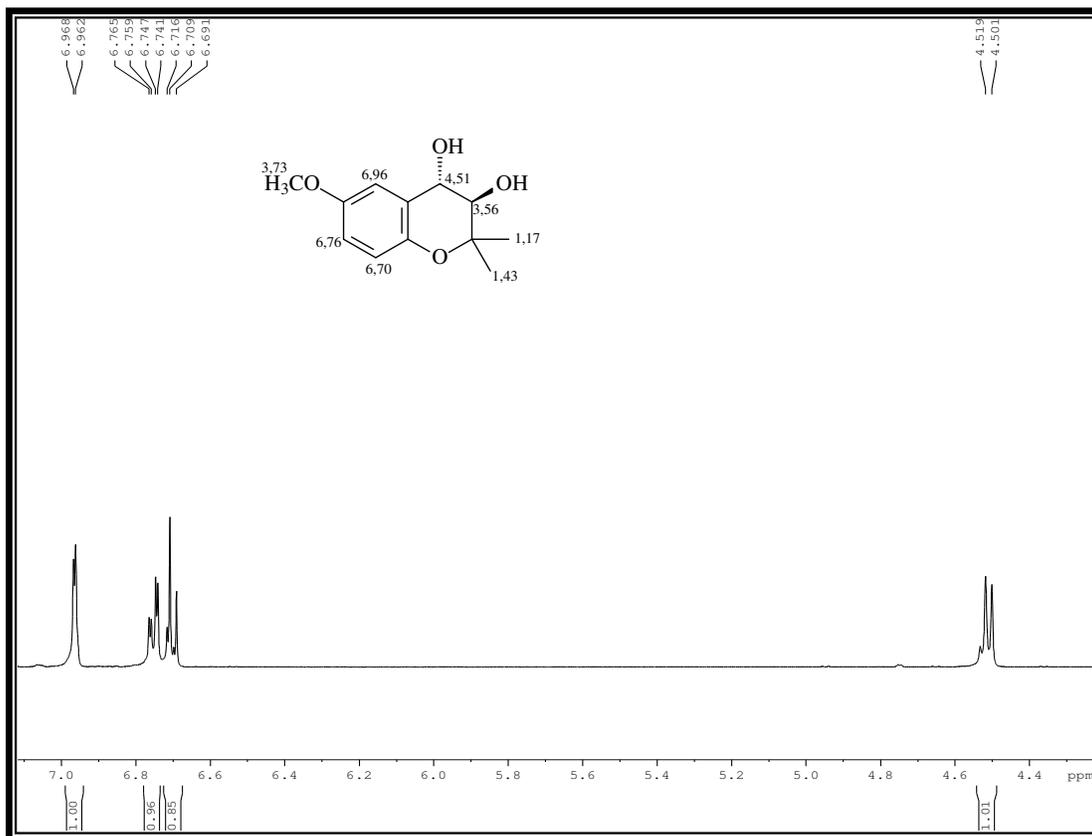


Figura 67: Expansão do espectro de RMN ¹H de LS5 (CDCl₃, 500 MHz)

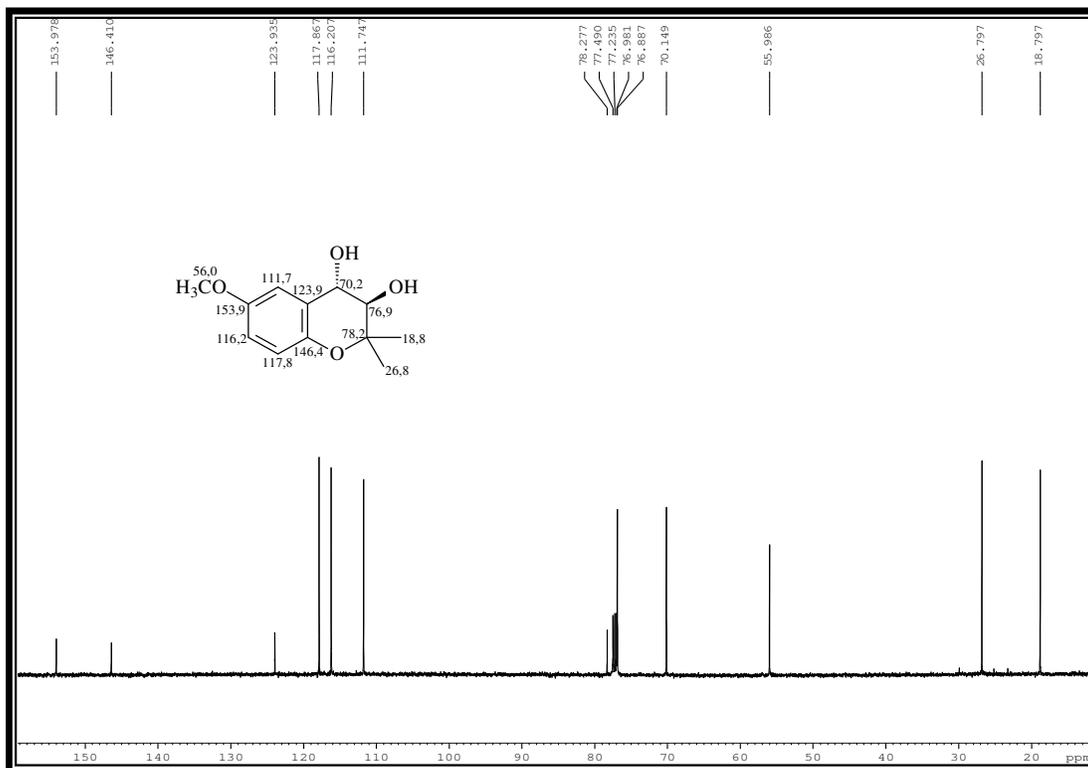


Figura 68: Espectro de RMN ^{13}C –BB de LS5 (CDCl_3 , 125 MHz)

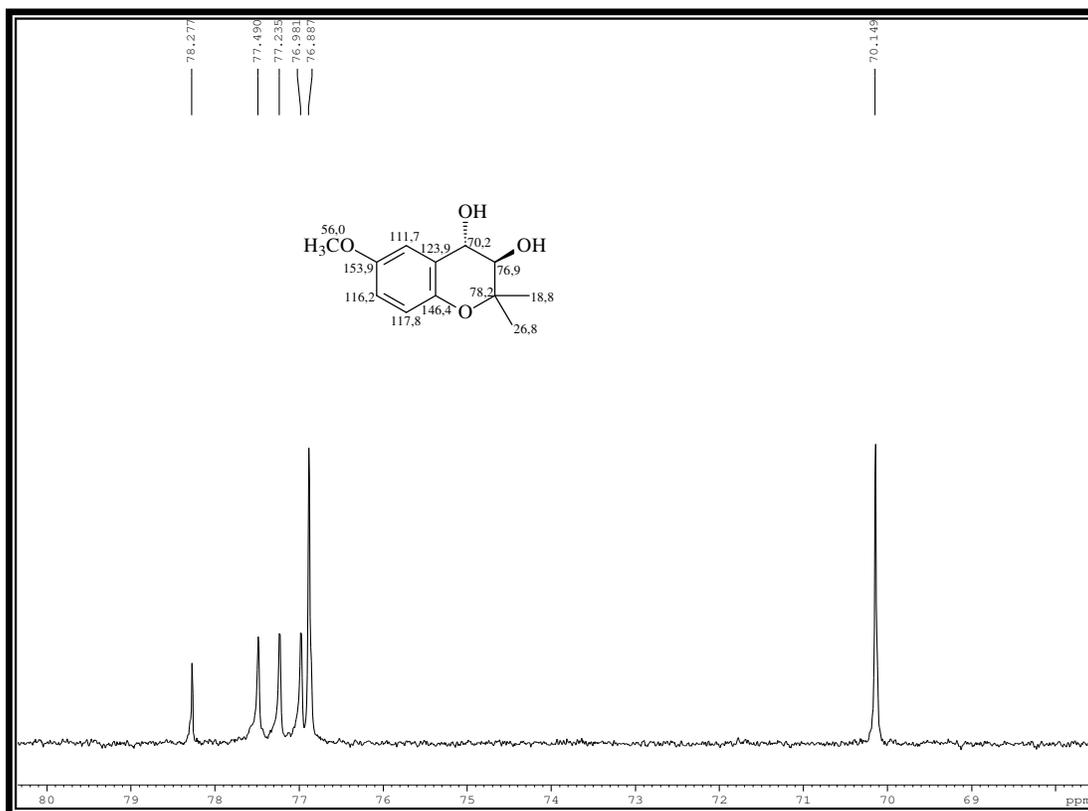


Figura 69: Expansão do espectro de RMN ^{13}C –BB de LS5 (CDCl_3 , 125 MHz)

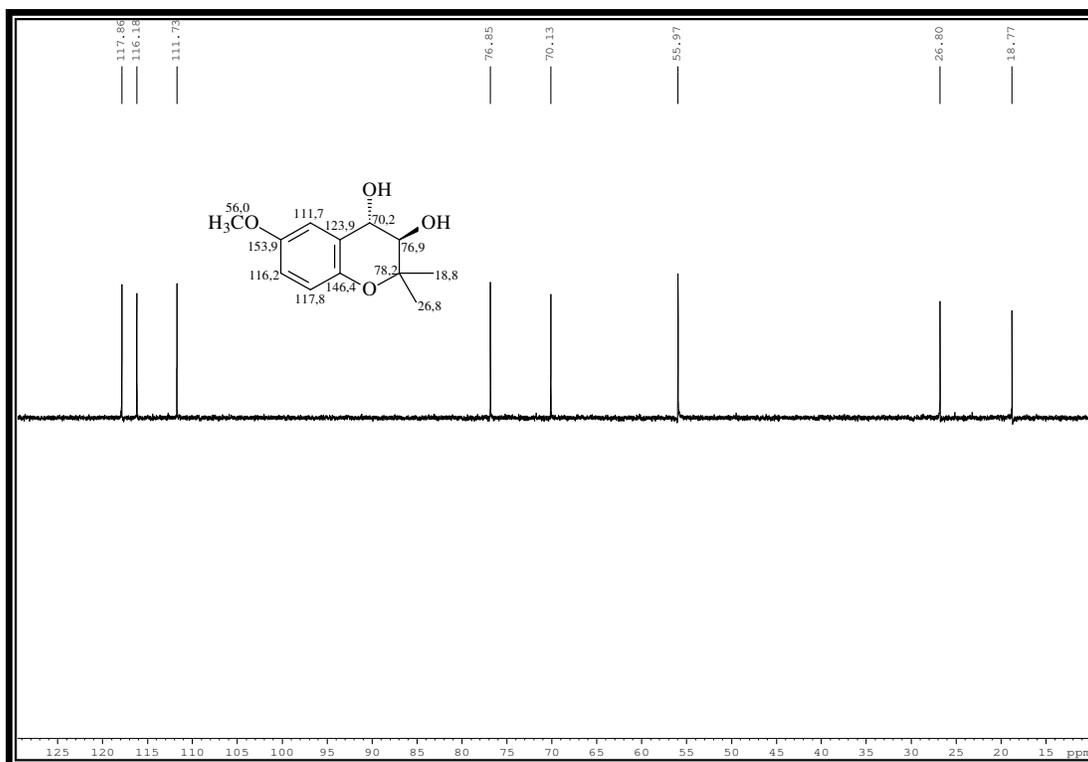


Figura 70: Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° de LS5 (CDCl_3 , 125 MHz)

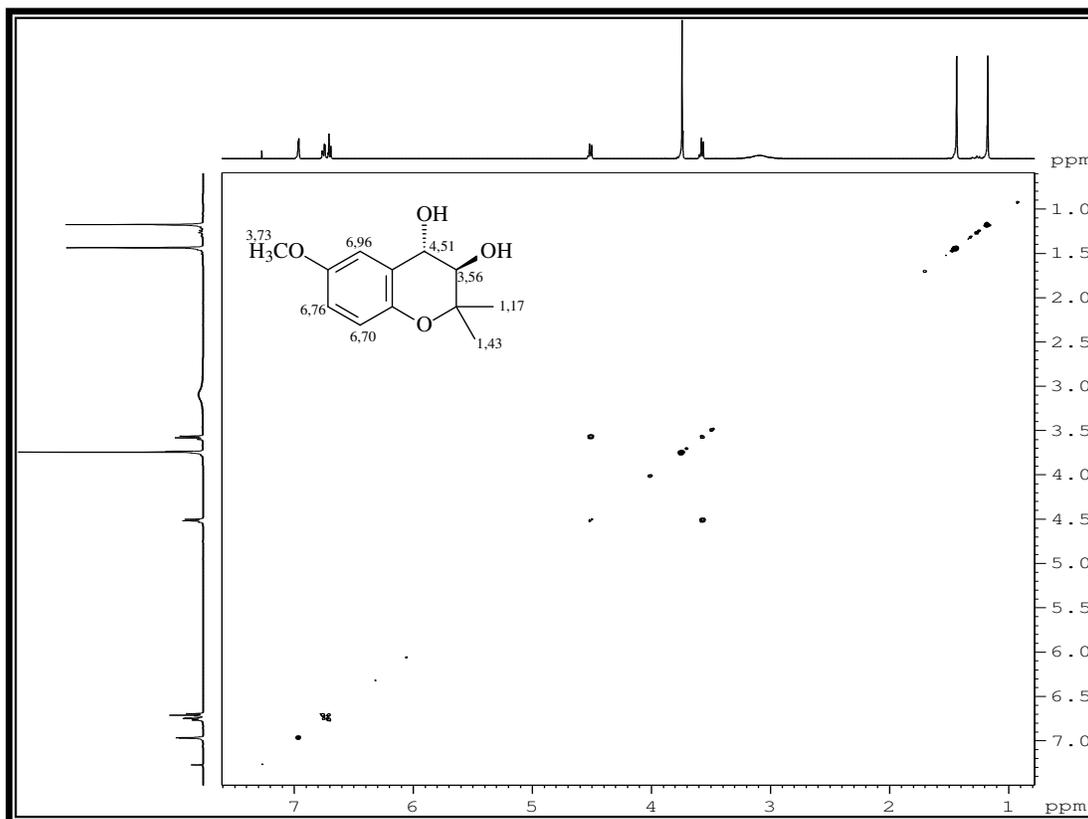
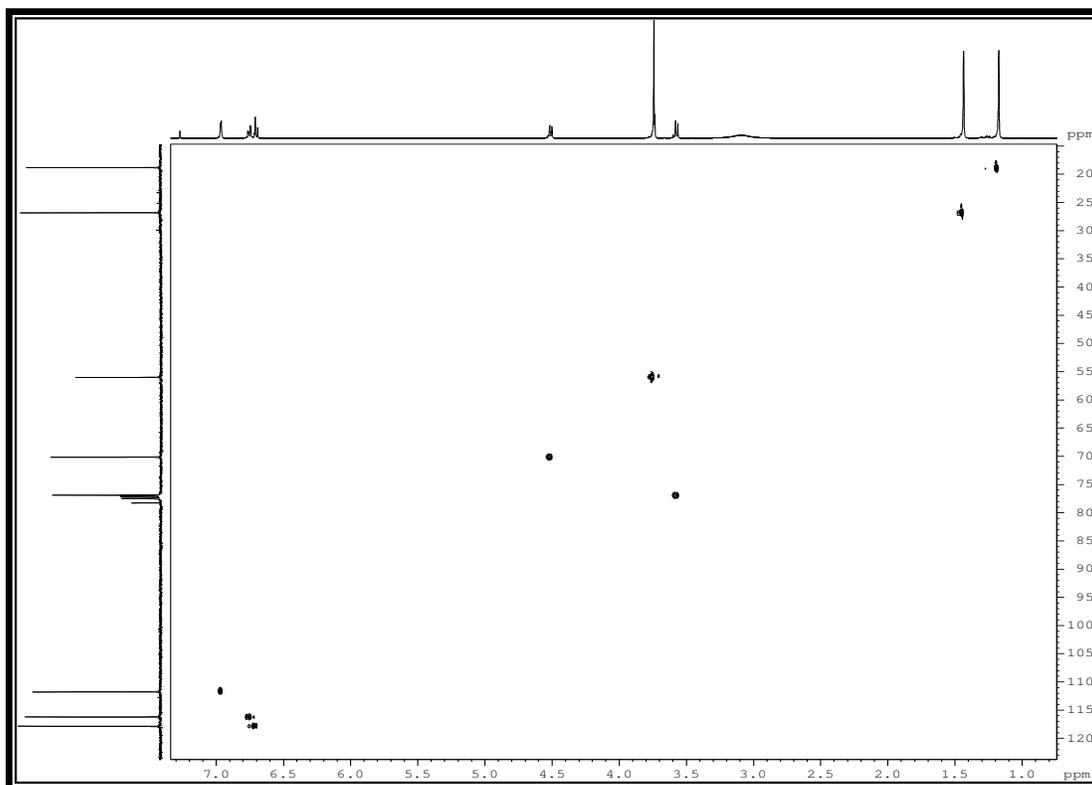
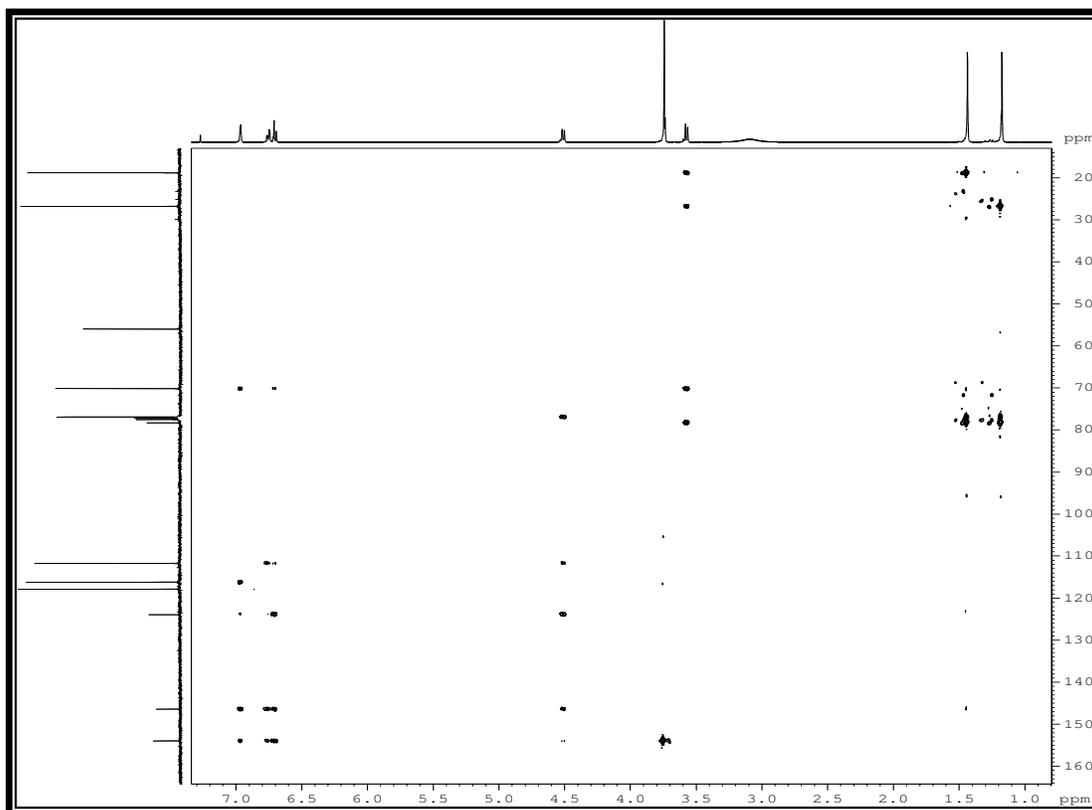


Figura 71: Espectro bidimensional COSY ^1H - ^1H de LS5 (CDCl_3 , 500 MHz)

Figura 72: Espectro bidimensional HSQC de LS5 (CDCl₃, 500 MHz/125 MHz)Figura 73: Espectro bidimensional HMBC de LS5 (CDCl₃, 500 MHz/125 MHz)

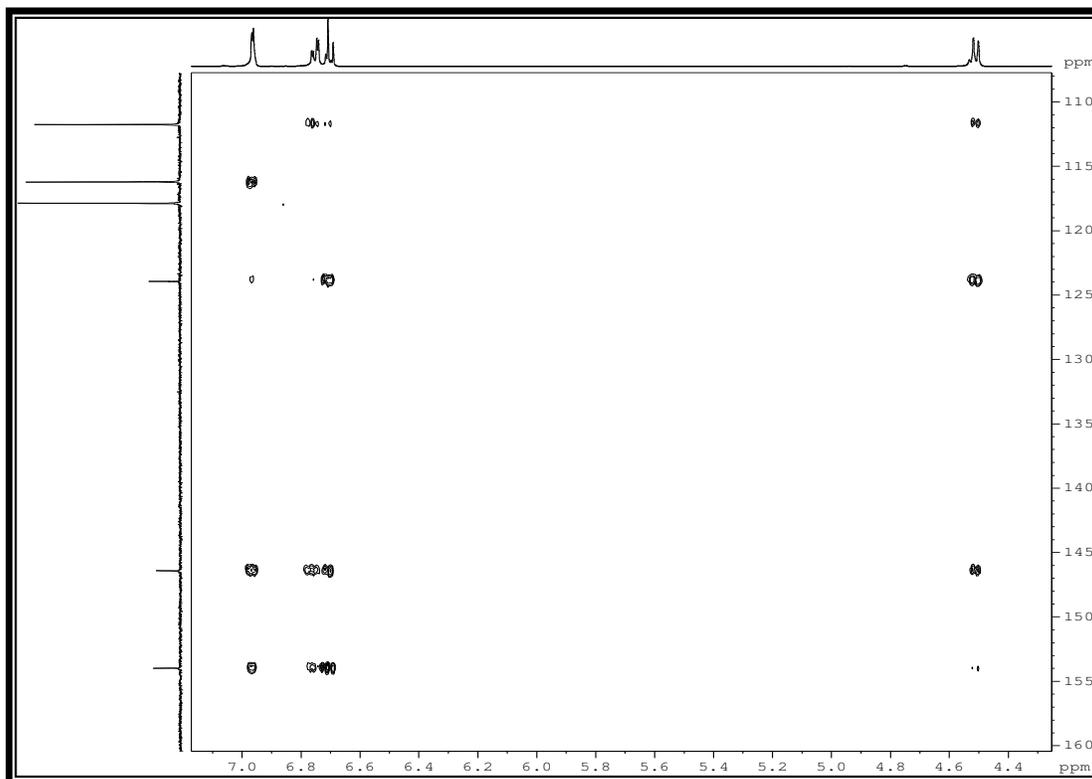


Figura 74: Expansão do espectro bidimensional HMBC de LS5 (CDCl₃, 500 MHz/125 MHz)

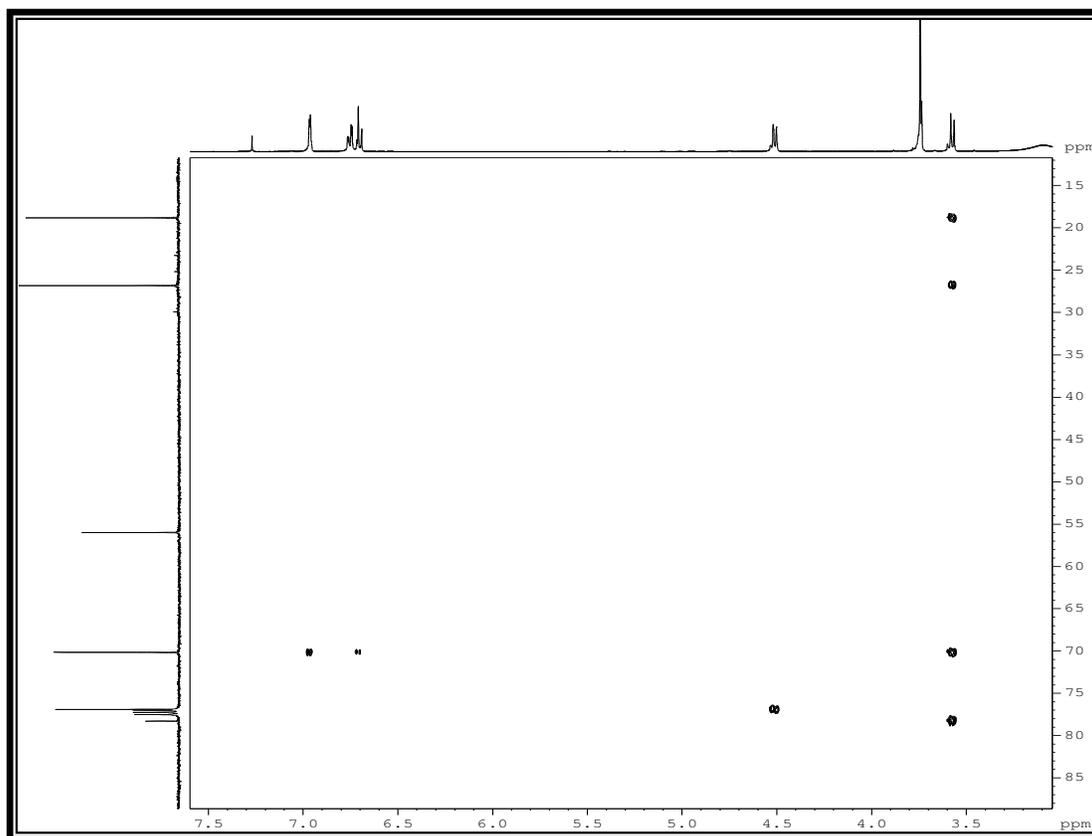


Figura 75: Expansão do espectro bidimensional HMBC de LS5 (CDCl₃, 500 MHz/125 MHz)

4.2.6 Isolamento e Identificação de LS6

Fracionamentos cromatográficos sucessivos do extrato acetato de etila, obtido da partição líquido-líquido do meio de cultura peptona, preparado com caldo de batata, do cultivo de *L. strigellus* sob agitação (Item 5.7.2, p. 189), permitiram o isolamento de um líquido viscoso marron denominado LS6 (Item 5.8.12, p. 197).

O espectro de RMN ^1H (Fig. 78, p. 98) de LS6 mostrou-se muito semelhante ao de LS5, identificado como (3*R*,4*S*)-3,4-dihidroxi-2,2-dimetil-6-metoxicroman-4-ona (Item 4.2.5, p. 87). Foram observados dois simpletos em 1,27 e 1,48 δ para três hidrogênios cada, atribuídos a duas metilas; simpleto em 3,78 δ (3H, s), característico de grupamento metoxila; sinais em 3,69 (1H, d, $J = 4,3$ Hz) e 4,77 δ (1H, d, $J = 4,3$ Hz), que pelo valores de deslocamento químico e acoplamento, foram associados a dois hidrogênios vicinais com configuração *cis*, ambos ligados a carbonos oxigenados. Foram ainda observados sinais referentes a hidrogênios de anel aromático em 7,08 δ (1H, d, $J = 2,8$ Hz), 6,78 δ (1H, dd, $J = 8,9$ e 2,8 Hz) e 6,51 δ (1H, t, $J = 8,9$ Hz), indicando um padrão de acoplamento *meta* entre os dois primeiros.

Da mesma forma, o espectro de RMN ^{13}C -BB (Fig. 80, p. 99) de LS6 mostrou grandes similaridades ao de LS5 (Item 4.2.5, p. 86). Doze sinais foram observados, estando seis em região de carbono sp^2 (112,8-154,6 δ), dois em região de carbono oxigenados; três (77,7, 71,9 e 65,8 δ) em região de carbono sp^3 oxigenados; um sinal característico de grupo metoxila (56,0 δ), e dois sinais (25,1 e 23,3 δ) atribuídos a duas metilas.

Comparação entre o espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (Fig. 81, p. 100) e o espectro de RMN ^{13}C -BB revelou a presença de quatro carbonos não hidrogenados (C), cinco carbonos metínicos (CH), dois deles (71,9 e 65,8 δ) em região de carbono sp^3 , além de três sinais para carbonos metílicos (CH₃), um deles (56,0 δ) referente ao grupo metoxila.

O espectro de massa (Fig. 77, p. 98) de LS6, apresentou o pico íon molecular com razão massa/carga de 224 daltons, sugerindo a fórmula $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_3$.

Os dados discutidos, juntamente com a comparação dos dados obtidos para LS5 (Tab. 16, p. 97), indicam que LS6 se tratava de um diastereoisômero de LS5, com

configuração *cis* para as duas hidroxilas (Fig. 76). Este produto natural foi anteriormente isolado do basidiomiceto *Panus rudes* (*L. strigosus*) (KIS *et al.*, 1970) e a configuração absoluta 3*S*,4*S* foi estabelecida após comparação da rotação específica ($[\alpha]_D^{25} = -5,0$ (c 0,1, CHCl₃)) de LS6 com dados da literatura para a mesma molécula ($[\alpha]_D^{25} = -8,4$ (c 3,14, CHCl₃)), sintetizada assimetricamente (WANG *et al.*, 2004).

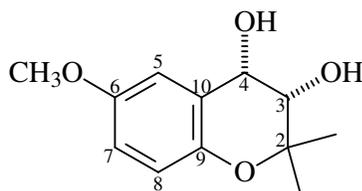


Figura 76: Estrutura da (3*S*,4*S*)-3,4-dihidroxi-2,2-dimetil-6-metoxicromano

Tabela 17: Comparação dos dados de RMN ¹H (500 MHz) e ¹³C (125 MHz) das substâncias LS6 e LS5, ambas em CDCl₃

C	RMN ¹ H		RMN ¹³ C	
	LS6	LS5	LS6	LS5
2			77,7	78,3
3	3,69 (1H, d, J=4,2 Hz)	3,56 (1H, d, J=8,6 Hz)	71,9	76,9
4	4,77 (1H, d, J=4,2 Hz)	4,51 (1H, d, J=8,6 Hz)	65,8	70,2
5	7,08 (1H, d, J=2,8 Hz)	6,96 (1H, d, J=2,7 Hz)	112,8	111,8
6			154,6	153,9
7	6,78 (1H, dd, J=2,8 e 9,0 Hz)	6,76 (1H, dd, J=2,7 e 8,8 Hz)	116,6	116,2
8	6,75 (1H, t, J=9,0 Hz)	6,70 (1H, d, J=8,8 Hz)	118,1	117,9
9			146,0	146,4
10			123,1	123,9
CH ₃	1,27 (3H, s)	1,17 (3H, s)	23,3	18,8
CH ₃	1,48 (3H, s)	1,43 (3H, s)	25,1	26,8
OCH ₃	3,78 (3H, s)	3,73 (3H, s)	56,0	56,0

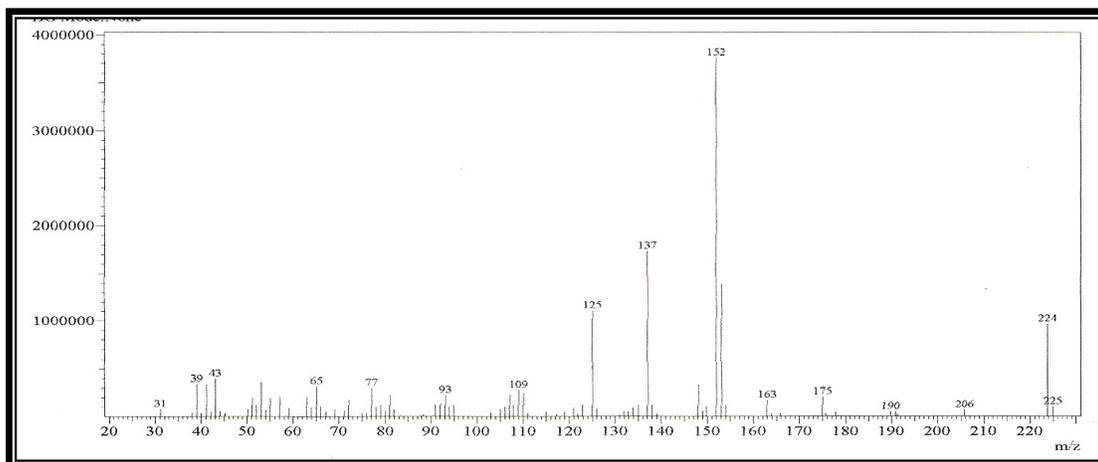


Figura 77: Espectro de massa de LS6 (IE, 70 eV)

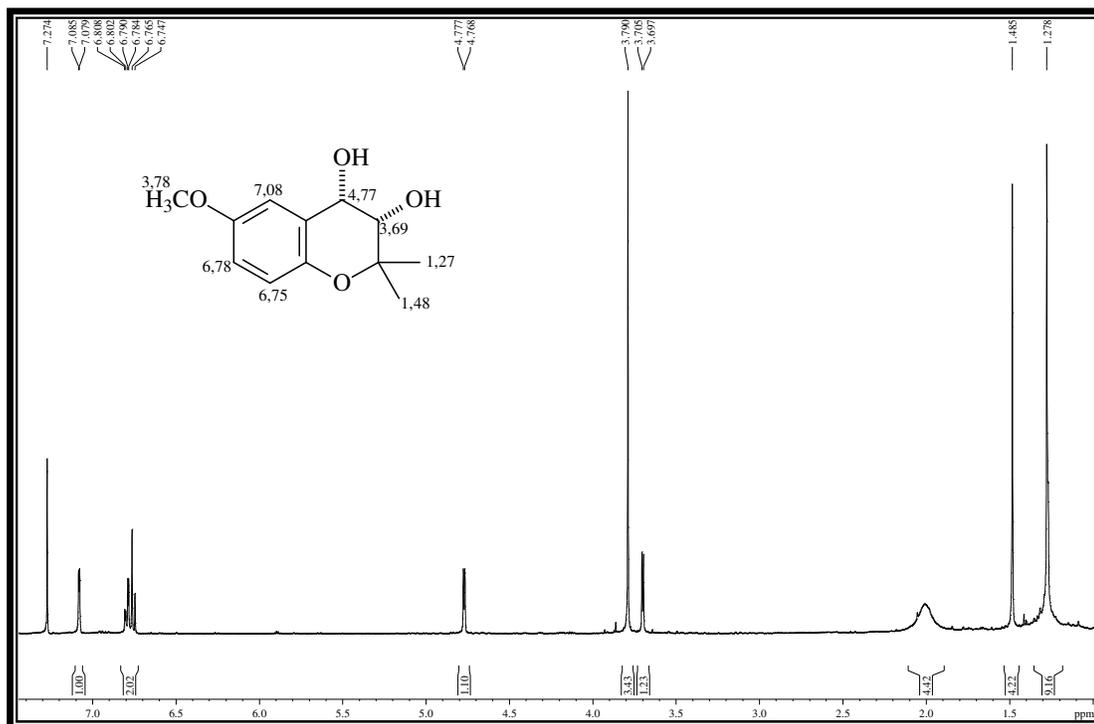


Figura 78: Espectro de RMN ¹H de LS6 (CDCl₃, 500 MHz)

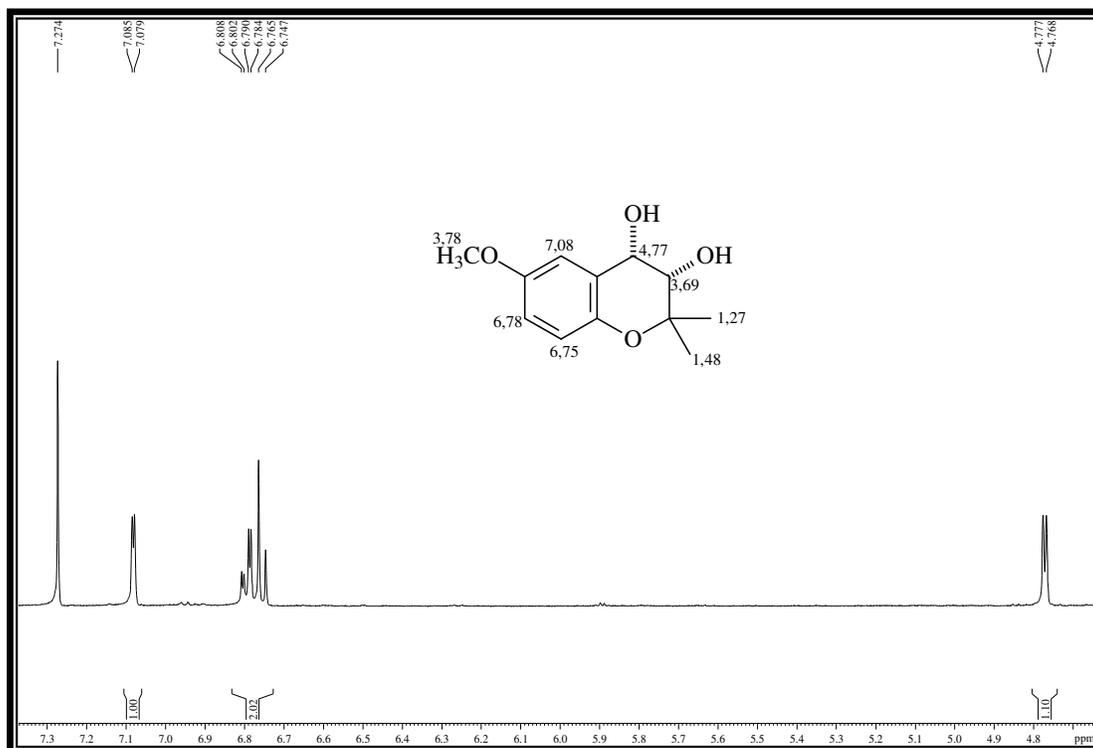


Figura 79: Expansão do espectro de RMN ¹H de LS6 (CDCl₃, 500 MHz)

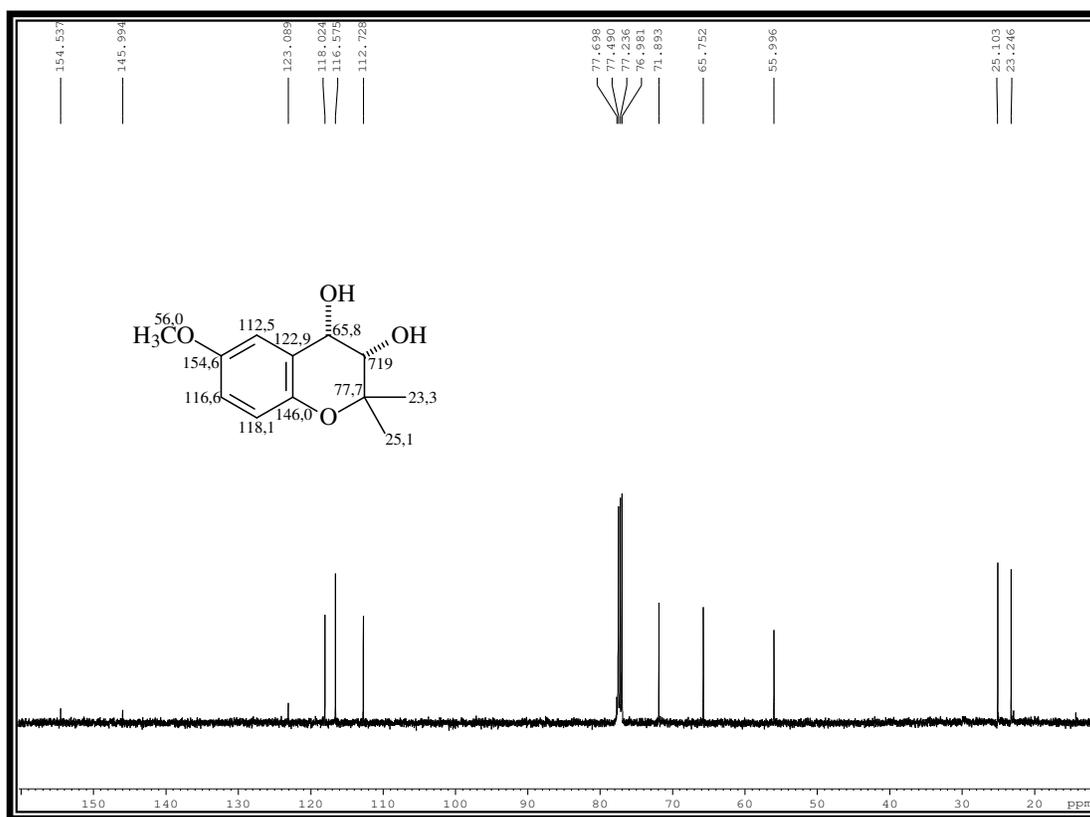


Figura 80: Espectro de RMN ¹³C –BB de LS6 (CDCl₃, 125 MHz)

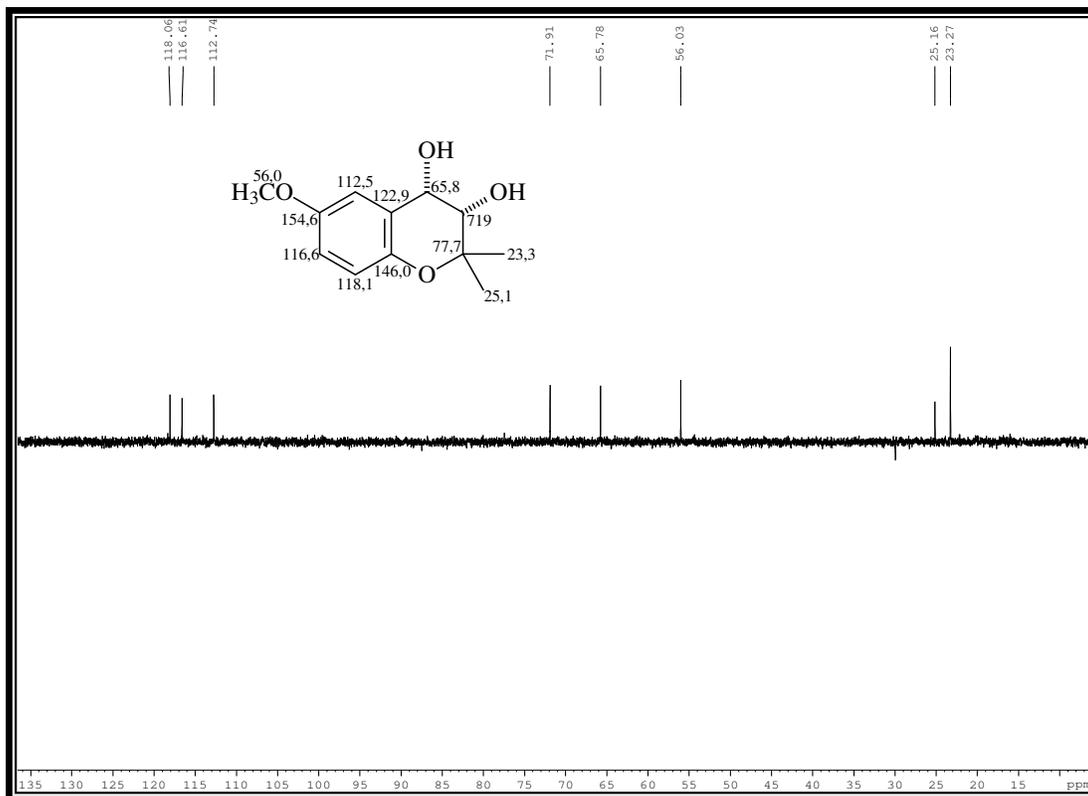


Figura 81: Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° de LS6 (CDCl_3 , 125 MHz)

4.2.7 Isolamento e Identificação de LS7

Após sucessivos fracionamentos cromatográficos do extrato acetato de etila, obtido da partição líquido-líquido do meio Czapek proveniente do crescimento de *L. strigellus* sob agitação (Item 5.7.2, p. 189), permitiram o isolamento de um líquido viscoso marron, denominado LS7 (Item 5.8.17, p. 200).

O espectro de RMN ^1H (Fig. 86, p. 105) de LS7 mostrou a um sinal centrado em 6,63 δ (1H, m), atribuído a um hidrogênio de olefina conjugada; sinais em 5,27 (1H, d, $J=10,0$ Hz) e 4,95 δ (1H, d, $J=10,0$ Hz), 4,62 (1H, d, $J=5,0$ Hz), 3,73 (1H, tl, $J=3,0$ Hz) e 3,42 δ (1H, d, $J=3,0$ Hz). Foi possível observar ainda dois sinais em 1,68 (3H, d, $J=1,0$ Hz), e 1,67 δ (3H, s), atribuídos a duas metilas.

O espectro de RMN ^{13}C -BB (Fig. 88, p. 106) apresentou onze linhas espectrais, sendo uma delas (194,5 δ) característica de cetona conjugada; quatro sinais em 139,2, 138,1, 138,0 e 123,8 δ , característicos de carbono sp^2 . Como não foram observados hidrogênios de anel aromático no espectro de RMN ^1H , estes sinais foram associados a duas ligações duplas na molécula. O espectro também apresentou quatro sinais referentes a carbonos sp^3 oxigenados (64,9, 62,9, 57,8 e 53,9 δ) e sinais em 25,9 e 18,4 δ , referentes às duas metilas presentes na molécula.

Através da comparação entre os espectros de RMN ^{13}C -DEPT 135 $^\circ$ (Fig. 90, p. 107) e ^{13}C -BB foi possível deduzir a presença de três carbonos não hidrogenados (C), seis carbonos metínicos (CH) e dois sinais de carbonos metílicos, anteriormente atribuídos a dois grupos metilas na molécula.

O espectro de RMN bidimensional HSQC (Fig. 92, p. 108) de LS7 apresentou as correlações dos hidrogênios ligados a carbonos sp^3 oxigenado em 5,27, 4,62, 3,73 e 3,42 δ com os carbonos 64,9, 62,9, 57,8 e 53,9 δ , respectivamente; dos hidrogênios de olefinas em 6,63e 4,95 δ com os seus respectivos carbonos em 138,0 e 123,8 δ ; dos hidrogênios em 1,68 δ com o carbono em 18,4 δ ; além dos hidrogênios em 1,67 δ com o carbono 25,9 δ .

Os dados discutidos, principalmente o padrão de acoplamento obtido no espectro de RMN ^1H , permitiram sugerir para LS7 a estrutura da panepoxidona, cuja configuração relativa encontra-se apresentada na Fig. 82 (p. 102). A Tabela 18 (p. 104)

apresenta a comparação dos dados de RMN ^1H e ^{13}C de LS7 com os descritos na literatura (COTA *et al.*, 2008) para este produto natural.

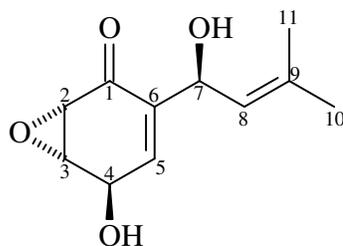


Figura 82: Estrutura da panepoxidona

A estrutura proposta foi também confirmada através da análise dos espectros de RMN bidimensional COSY ^1H - ^1H (Fig. 91, p. 107) e HMBC (Fig. 93, p. 108) de LS7.

O espectro de COSY ^1H - ^1H (Fig. 91, p. 107) possibilitou correlacionar, de forma inequívoca, a relação vicinal entre o hidrogênio em 3,73 δ e os hidrogênios em 4,62 e 3,42 δ ; a correlação entre os hidrogênios 6,63 e 4,62 δ , além dos hidrogênios em 5,27 e 4,95 δ (Fig. 83) (Tab. 17, p. 103).

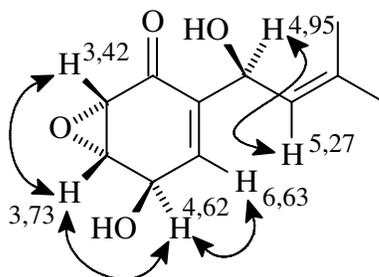


Figura 83: Acoplamentos dos hidrogênios vicinais de LS7

Através do espectro de HMBC (Fig. 93, p. 108) de LS7 foi possível correlacionar o hidrogênio em 6,63 δ com os carbonos, 139,2 (2J), 57,8 (3J), 64,9 (3J) e 194,5 δ (3J); em 5,27 δ com os carbonos 138,1 (3J) e 194,5 δ (3J); em 4,62 δ com os carbonos em 57,8 (2J), 138,0 (2J) e 53,9 δ (3J); em 3,73 δ com os carbonos 53,9 (2J), 62,9 (2J) e 138,0 δ (3J); em 3,42 δ com os carbonos 57,8 (2J), 194,5 (2J) e 139,2 δ (3J). Foi ainda observada a correlação a longa distância da metila em 1,68 δ com os carbonos 138,1 (2J), 25,9 (3J) 123,8 δ (3J) e da metila em 1,67 δ com os carbonos 138,1 (2J), 18,4

(3J) 123,8 δ (3J), confirmando a localização das metilas no sistema isoprenílico (Fig. 84).

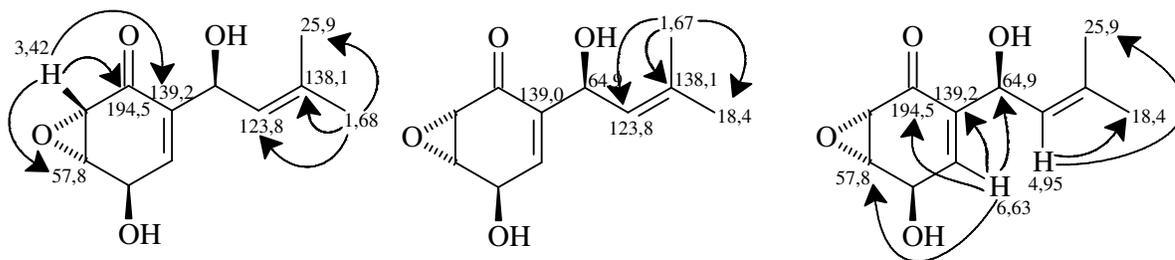


Figura 84: Principais acoplamentos a longa distância de LS7

A panepoxidona isolada de *L. strigellus* apresentou a rotação específica $[\alpha]_D^{25} = -59$ (c 0,4, CH_2Cl_2), o que está de acordo com o valor de $[\alpha]_D^{25} = -61$ (c 0,4, CH_2Cl_2) descrito na literatura para este composto (COTA *et al.*, 2008). Este produto natural foi anteriormente isolado de *L. connatus* (RUKACHAISIRIKUL *et al.*, 2005), *L. strigosos* (COTA *et al.*, 2008) e *L. crinitus* (ERKEL; ANKE; STERNER, 1996; ABRAHAM; ABATE, 1995), sendo inédito para *L. strigellus*. É conhecido pela sua potente atividade inibitória de NF-kB (SHOTWELL *et al.*, 2002; ERKEL; ANKE; STERNER, 1996), tendo sua síntese total descrita na literatura (SHOTWELL *et al.*, 2000).

Tabela 18: Dados de RMN ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) de LS7 em CDCl_3

C	HSQC	COSY		HMBC	
	δ_{H}	δ_{C}	2J	3J	
1		194,5			
2	3,42 (1H, d, $J=3,0$ Hz)	53,9	3,73	57,8; 194,5	139,2
3	3,73 (1H, tl, $J=3,0$ Hz)	57,8	4,61; 6,62	53,9; 62,9	138,0
4	4,62 (1H, d, $J=5,0$ Hz)	62,9	3,73; 6,62	57,8; 138,0	53,9
5	6,63 (1H, m)	138,0	3,73; 4,61	139,2	57,8; 64,9; 194,5
6		139,2			
7	5,27 (1H, d, $J=9,5$ Hz)	64,9	4,95	123,8	138,1; 194,5
8	4,95 (1H, dl, $J=9,5$ Hz)	123,8	1,68; 5,27		18,4; 25,9
9		138,1			
10	1,68(3H, d, $J=1,0$ Hz)	18,4	4,95	138,1	25,9; 123,8
11	1,67 (3H,s)	25,9		138,1	18,4; 123,8

Tabela 19: Comparação entre os dados de RMN ^1H e ^{13}C (CDCl_3) da panepoxidona (COTA *et al.*, 2008) e LS7

C	RMN ^1H		RMN ^{13}C	
	panepoxidona ^(a)	LS7 ^(b)	panepoxidona ^(c)	LS7 ^(d)
1			194,5	194,5
2	3,46 (1H, dd, $J=1,0$ e $3,6$ Hz)	3,42 (1H, d, $J=3,0$ Hz)	53,9	53,9
3	3,80 (1H, dq, $J=1,3$, $2,5$ e $3,6$ Hz)	3,73 (1H, tl, $J=3,0$ Hz)	57,7	57,8
4	4,68 (1H, sl)	4,62 (1H, d, $J=5,0$ Hz)	63,2	62,9
5	6,70 (1H, ddd, $J=1,3$, $2,5$ e $3,6$ Hz)	6,63 (1H, m)	137,8	138,0
6			139,0	139,2
7	5,29 (1H, qd, $J=1,3$ e $8,8$ Hz)	5,27 (1H, d, $J=9,5$ Hz)	65,4	64,9
8	5,02 (1H, d, $J=8,8$ Hz)	4,95 (1H, dl, $J=9,5$ Hz)	123,7	123,8
9			138,3	138,1
10	1,72(6H, s)	1,68(3H, d, $J=1,0$ Hz)	18,4	18,4
11		1,67 (3H,s)	25,9	25,9

(a) 400 MHz; (b) 500 MHz; (c) 100 MHz; (d) 125 MHz

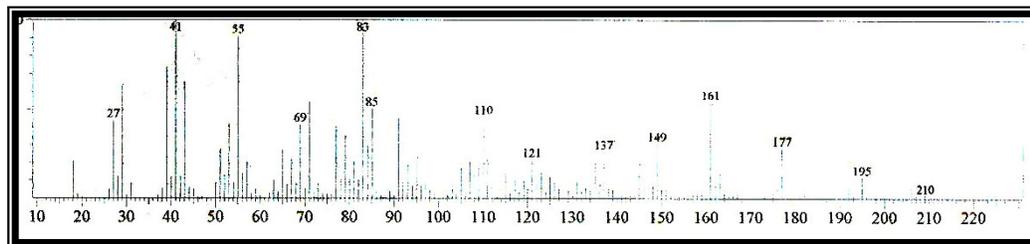


Figura 85: Espectro de massa de LS7 (IE, 70 eV)

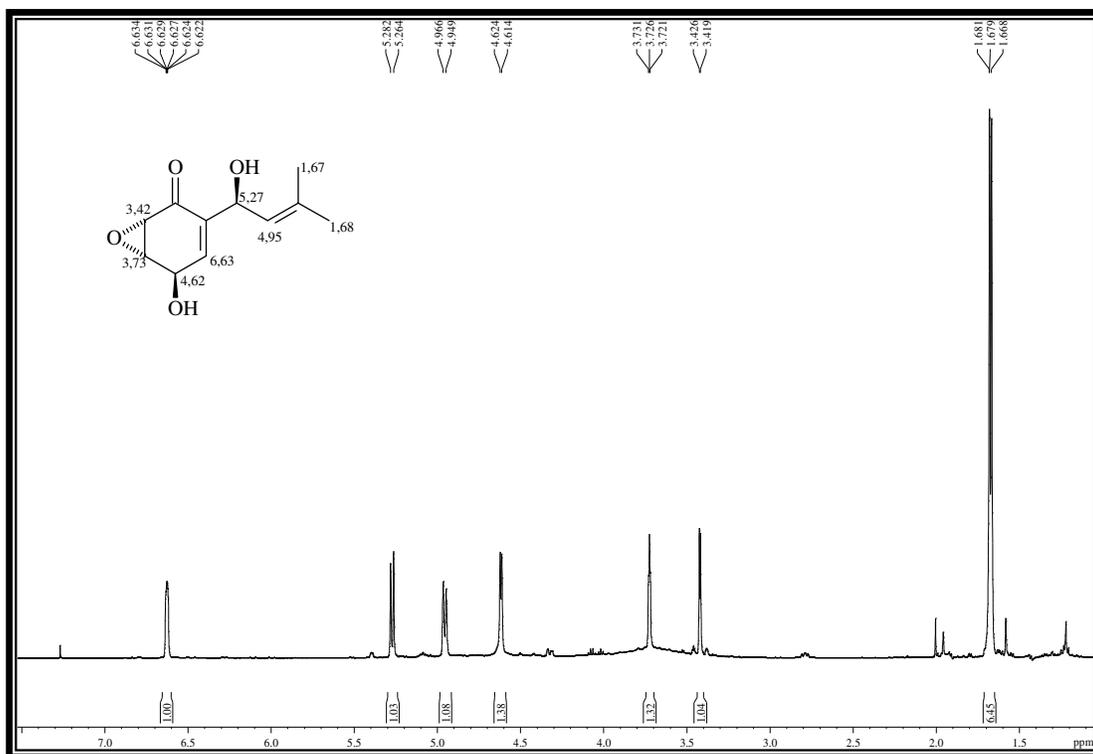


Figura 86: Espectro de RMN ^1H de LS7 (CDCl_3 , 500 MHz)

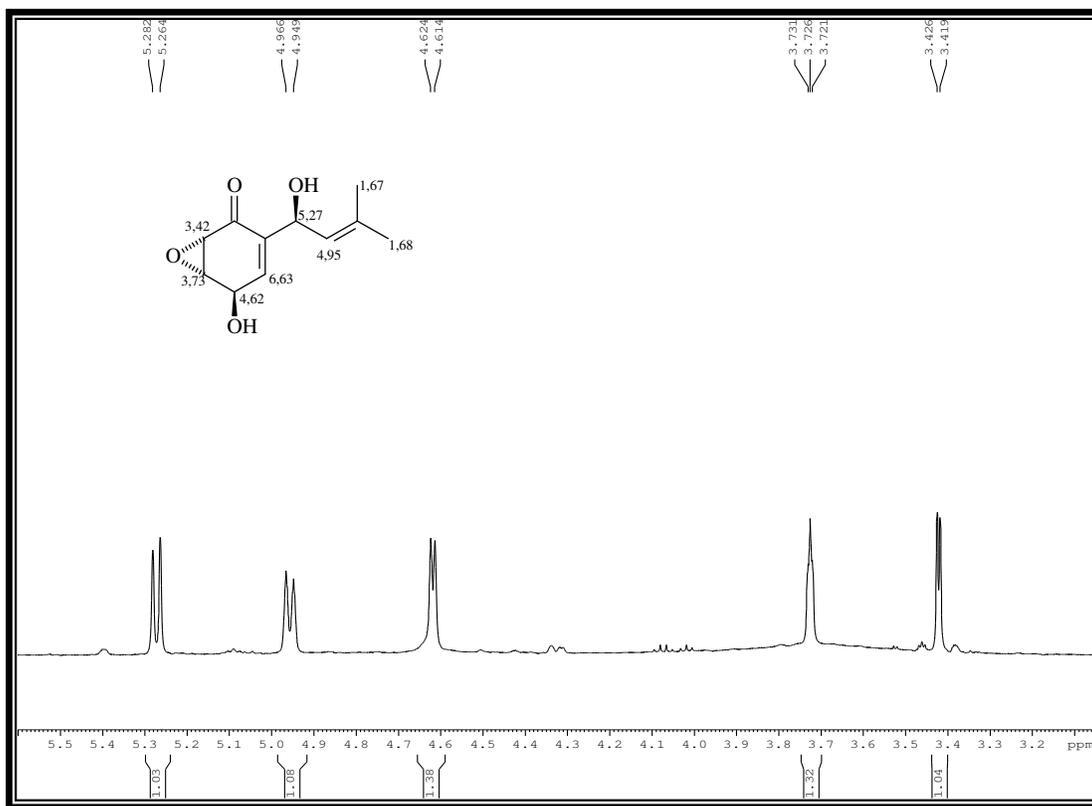


Figura 87: Expansão do espectro de RMN ^1H de LS7 (CDCl_3 , 500 MHz)

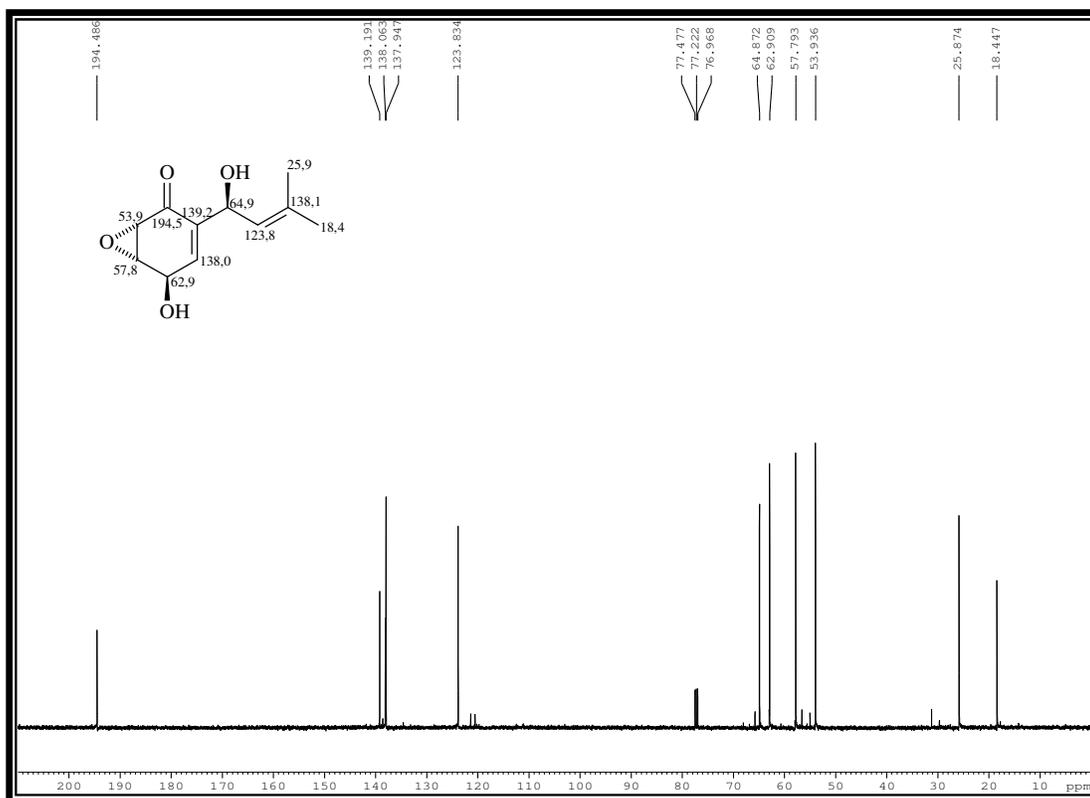


Figura 88: Espectro de RMN ^{13}C –BB de LS7 (CDCl_3 , 125 MHz)

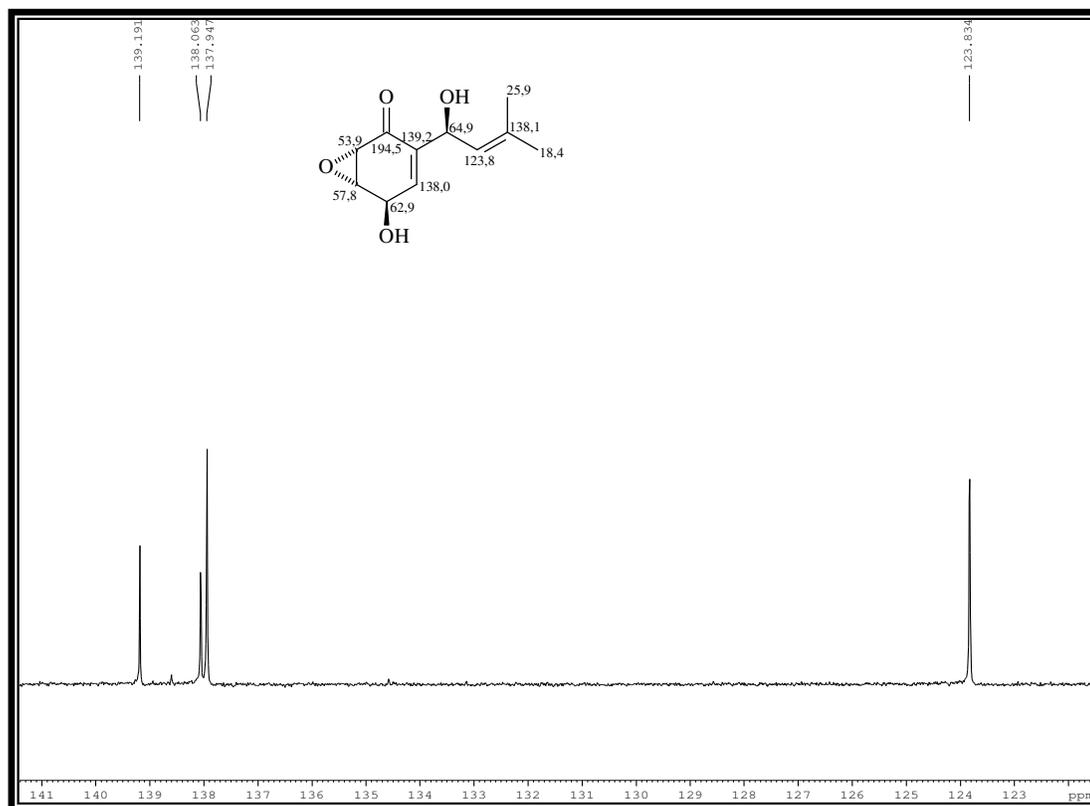


Figura 89: Expansão do espectro de RMN ^{13}C –BB de LS7 (CDCl_3 , 125 MHz)

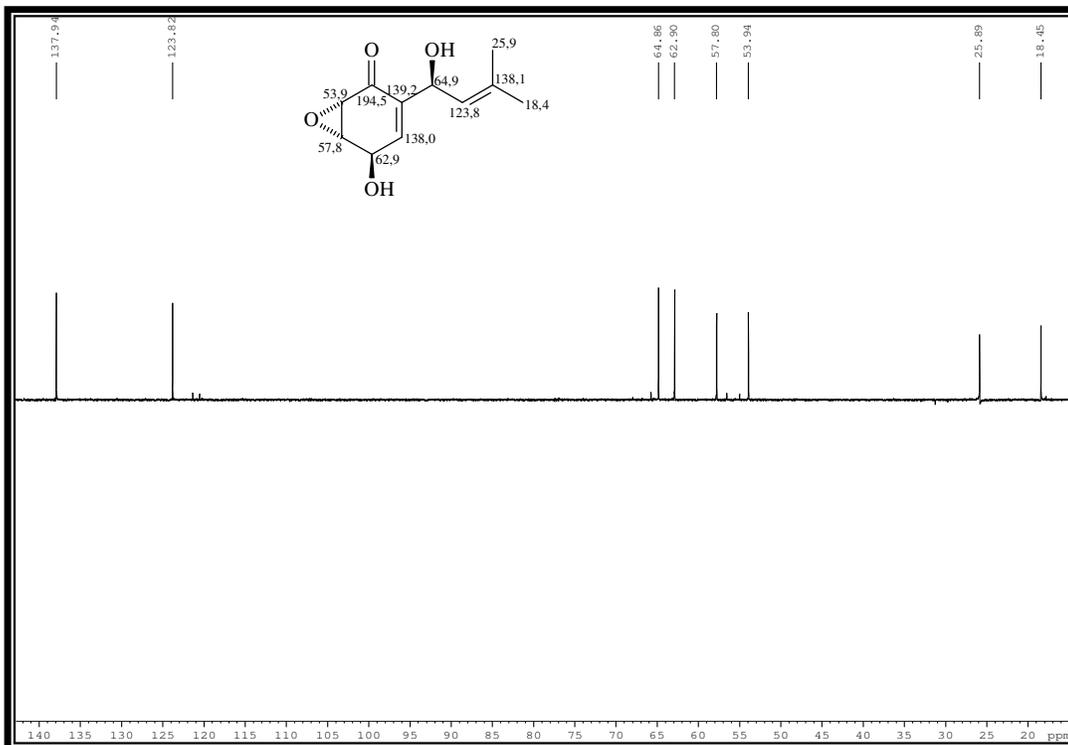


Figura 90: Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° de LS7 (CDCl_3 , 125 MHz)

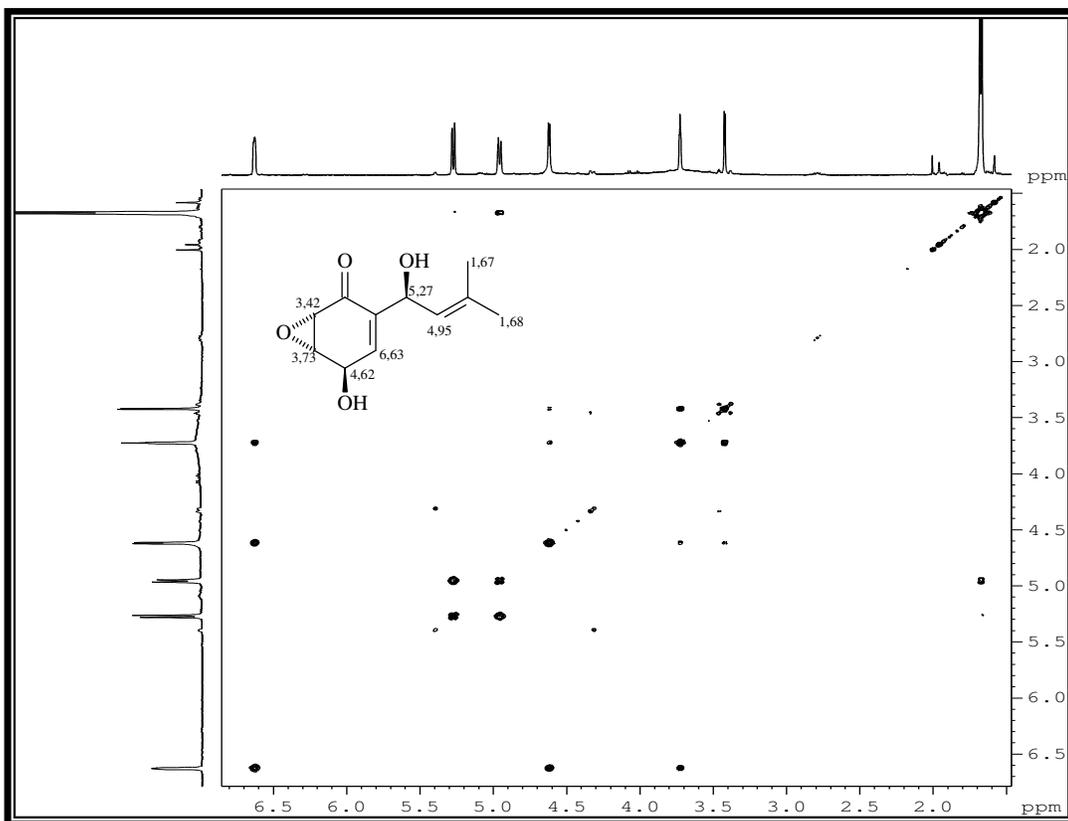


Figura 91: Espectro bidimensional COSY ^1H - ^1H de LS7 (CDCl_3 , 500 MHz)

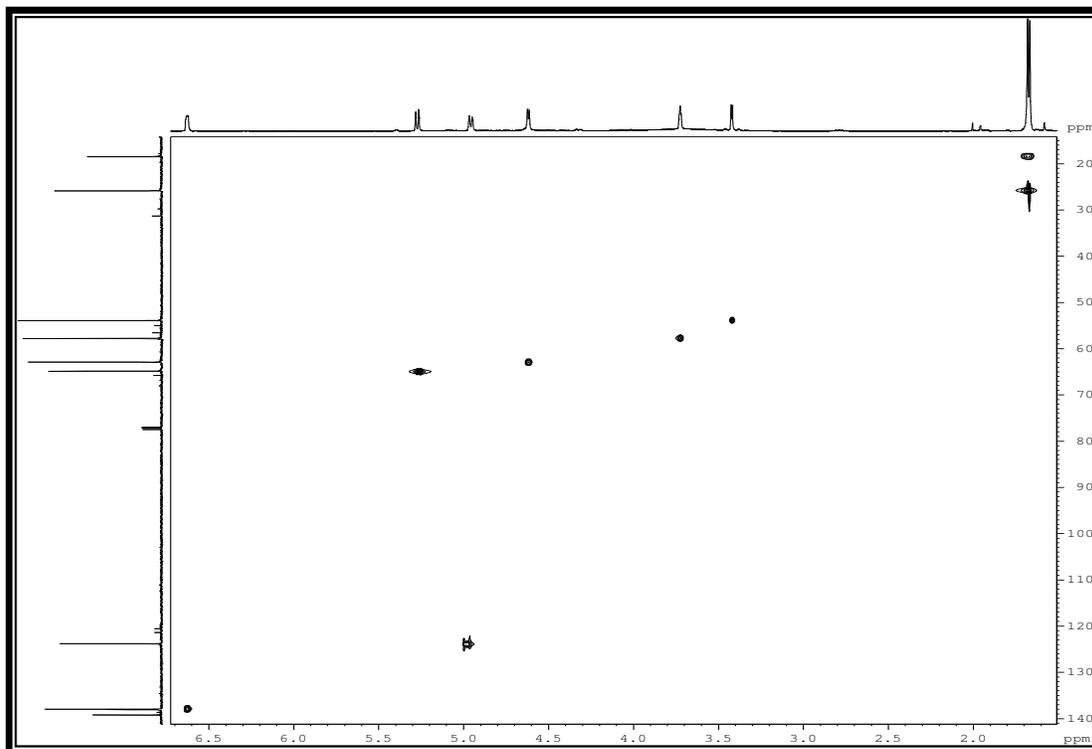


Figura 92: Espectro de HSQC de LS7 (CDCl₃, 125 MHz)

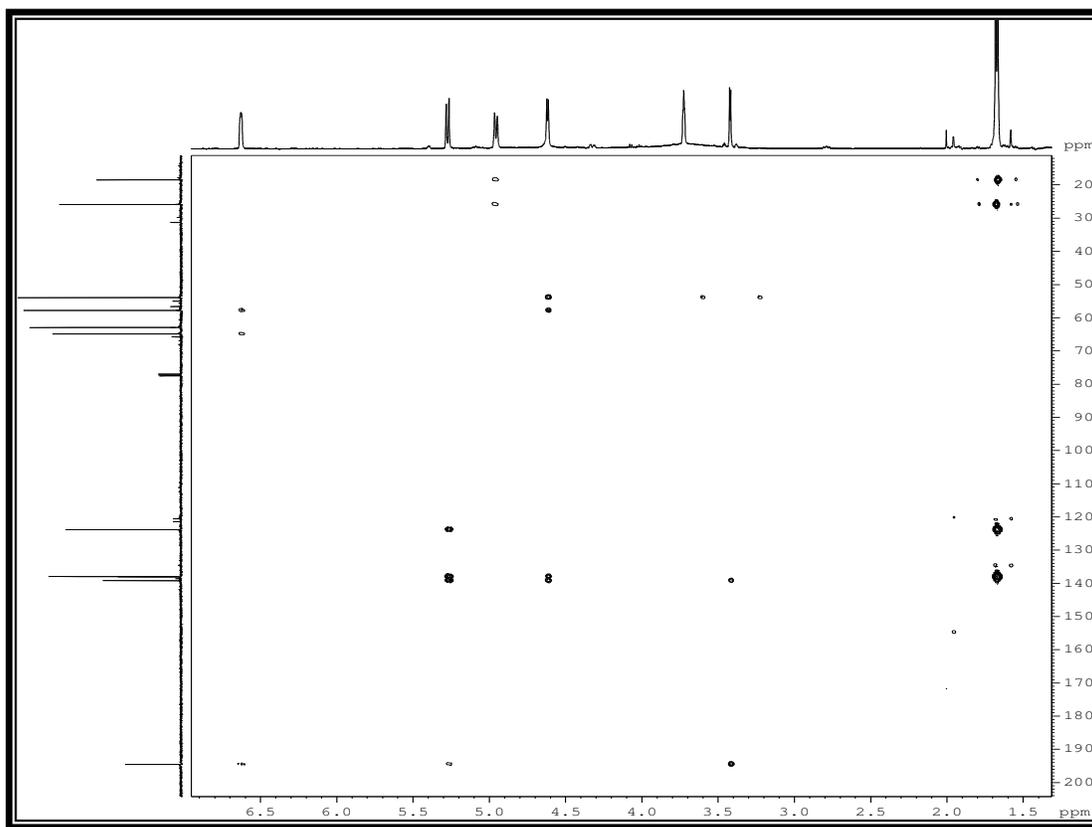


Figura 93: Espectro de HMBC de LS7 (CDCl₃, 125 MHz)

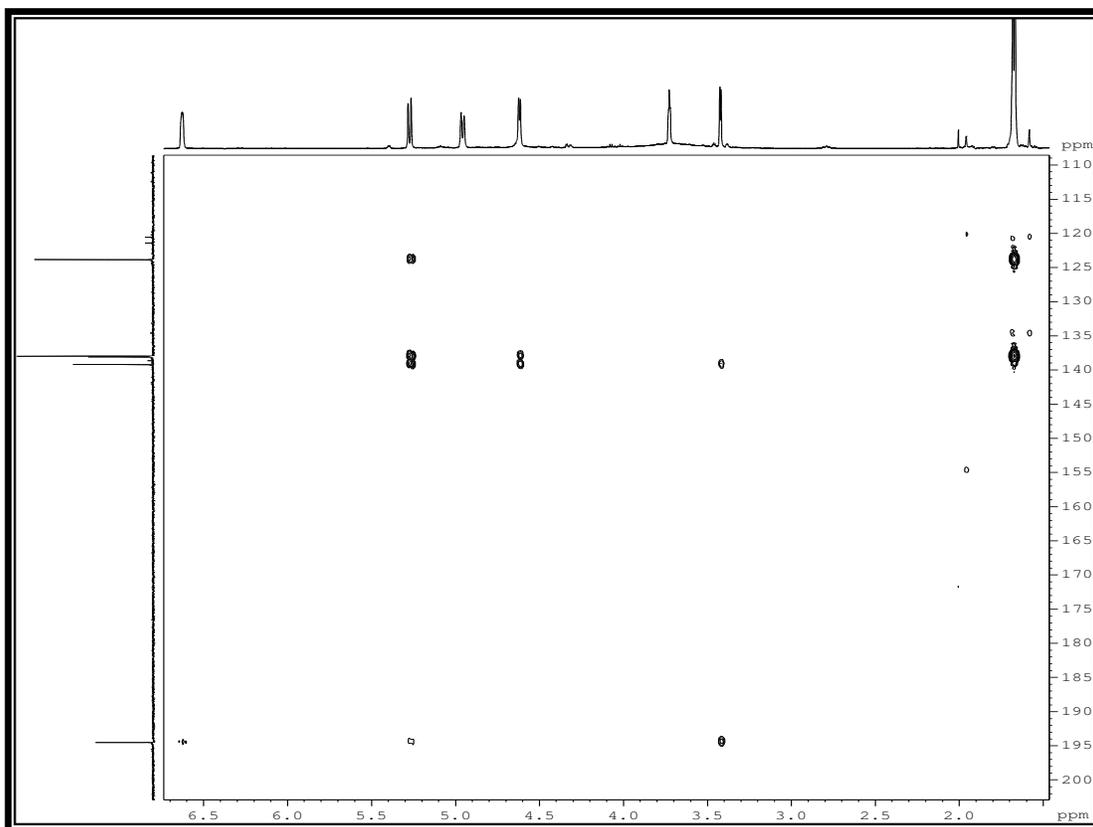


Figura 94: Expansão do espectro de HMBC de LS7 (CDCl₃, 125 MHz)

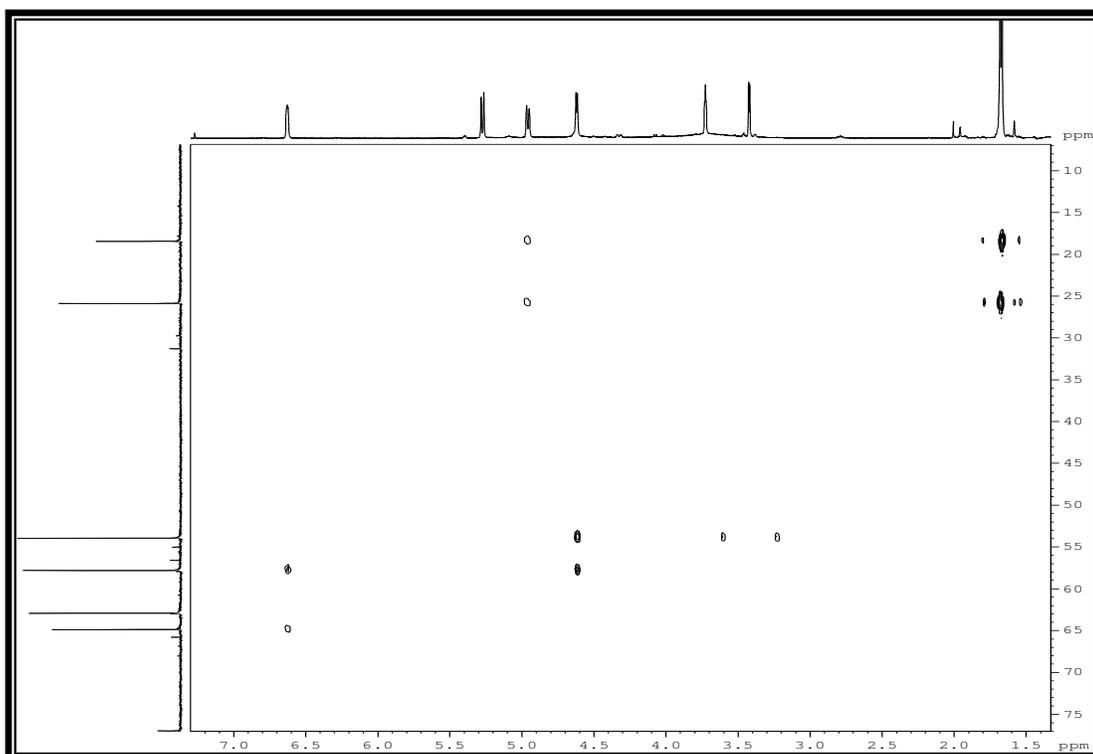


Figura 95: Expansão do espectro de HMBC de LS7 (CDCl₃, 125 MHz)

4.2.8 Isolamento e Identificação de LS8

Após sucessivos fracionamentos cromatográficos do extrato acetato de etila, obtido da partição líquido-líquido do meio Czapek proveniente do crescimento de *L. strigellus* sob agitação (Item 5.7.2, p. 189), permitiram o isolamento de um líquido viscoso marron, denominado LS8 (Item 5.8.18, p. 201).

O espectro de RMN ^1H (Fig. 100, p. 113) de LS8 mostrou dois sinais centrados em 6,67 δ (1H, d, $J=16$ Hz) e 6,35 δ (1H, d, $J=16$ Hz), atribuídos a hidrogênios de olefina conjugada com relação *trans*; sinal em 5,95 (1H, sl) atribuído um hidrogênio de uma olefina trissubstituída; sinais em 4,76 (1H, d, $J=2,0$ Hz), 3,89 δ (1H, dd, $J=3,3$ e 4,0 Hz) e 3,41 δ (1H, dd, $J=2,0$ e 4,0 Hz), associados a três hidrogênios ligados a carbono sp^3 oxigenado. Foi possível observar ainda dois sinais em 1,33 (3H, s), e 1,32 δ (3H, s), atribuídos a duas metilas.

O espectro de RMN ^{13}C -BB (Fig. 102, p. 114) apresentou dez linhas espectrais, sendo uma delas (195,7 δ) característica de cetona conjugada; quatro sinais em 156,4, 148,6, 125,0 e 122,1 δ , atribuídos a carbonos sp^2 , das duas olefinas sugeridas no espectro de RMN ^1H e pelos deslocamentos nos permitem sugerir também que ambas encontram-se conjugadas com a carbonila. O espectro também apresentou quatro sinais referentes a carbonos sp^3 oxigenados (71,7, 66,3, 57,6 e 55,1 δ) e sinal em 29,4 δ , que foram atribuídos as duas metilas identificadas pelo espectro de RMN ^1H . Assim a molécula deve possuir átomos de carbono ao invés de dez.

Através da comparação entre os espectros de RMN ^{13}C -DEPT 135° (Fig. 103, p. 115) e ^{13}C -BB foi possível deduzir a presença de três carbonos não hidrogenados (C), seis carbonos metínicos (CH) e dois sinais de carbonos metílicos, atribuídos a dois grupos metilas.

O espectro de RMN bidimensional HSQC (Fig. 105, p. 116) de LS8 apresentou as correlações dos hidrogênios de olefinas em 6,67, 6,35 e 5,90 δ com os seus respectivos carbonos em 148,6, 125,0 e 122,1 δ ; dos hidrogênios ligados a carbonos sp^3 oxigenado em 4,76, 3,85 e 3,41 δ com os carbonos 66,3, 57,6 e 55,1 δ , respectivamente; dos hidrogênios em 1,33 e 1,32 δ com o carbono em 29,8 δ , confirmando que este sinal no espectro de RMN ^{13}C -BB é referente as duas metilas (Tab. 19, p. 112).

Os dados discutidos, principalmente o padrão de acoplamento obtido no espectro de RMN ^1H , permitiram sugerir para LS8 a estrutura da isopanepoxidona, cuja configuração relativa está apresentada na Fig. 96.

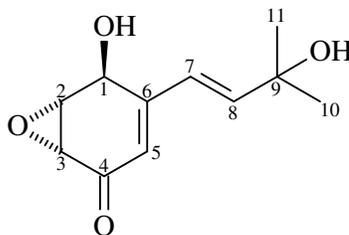


Figura 96: Estrutura da isopanepoxidona

A estrutura proposta foi também confirmada através da análise dos espectros de RMN bidimensional COSY ^1H - ^1H (Fig. 104, p. 115) e HMBC (Fig. 107, p. 117) de LS8.

O espectro de RMN bidimensional COSY ^1H - ^1H (Fig. 104, p. 115) possibilitou correlacionar o hidrogênios de olefina em 6,67 e 6,35 δ , do hidrogênio em 5,90 com o hidrogênio em 4,76 δ ; em 3,41 com os hidrogênios em 5,90 e 3,85 δ ; em 4,76 com os hidrogênios em 5,90 e 3,85 δ .

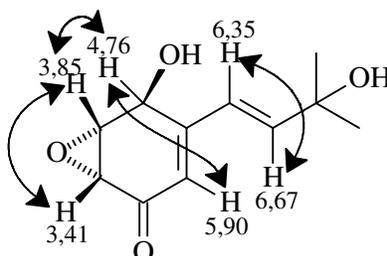


Figura 97: Acoplamentos dos hidrogênios vicinais de LS8

Através do espectro de HMBC (Fig. 107, p. 117) de LS8 foi possível correlacionar entre outros o hidrogênio em 6,67 δ com os carbonos, 125,0 (2J), 71,7 (2J), 156,4 (3J) e 29,8 δ (3J); em 6,35 δ com os carbonos 156,4 (2J), 148,6 (2J), 122,1 (3J), 71,7 (3J) e 66,3 δ (3J); em 5,90 δ com os carbonos em 156,4 (2J), 125,0 (3J), 66,3 (3J) e 55,1 δ (3J); em 4,76 δ com os carbonos 156,4 (2J), 57,6 (2J), 125,0 (3J) e 122,1 δ (3J); em 3,85 δ com os carbonos 66,3 (2J), 55,1 (2J) e 156,4 δ (3J); em 3,41 δ com os carbonos em 57,6 (2J) e 122,1 δ (3J). Foi ainda observada a correlação a longa distância das metilas em 1,33 e 1,32 δ com os carbonos 71,7 (2J) e 148,6 δ (3J) (Fig. 98, p. 112).

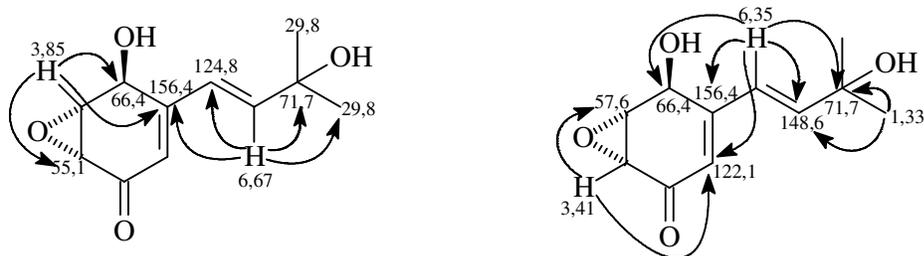


Figura 98: Principais acoplamentos a longa distância de LS8

A molécula isolada de *L. strigellus* apresentou rotação específica $[\alpha]_D^{25} = +145$ (c 0,25, MeOH) e foi anteriormente obtida de *Panus conchatus* (*L. strigosus*) (KIS *et al.*, 1970). Assim como a panepoxidona, este produto natural é conhecido pela sua potente atividade inibitória de NF- κ B (SHOTWELL *et al.*, 2000; ERKEL; ANKE; STERNER, 1996) e tem sua síntese total descrita na literatura (SHOTWELL *et al.*, 2000, 2002).

Tabela 20: Dados de RMN ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) de LS8 em CD_3OD

C	HSQC		COSY		HMBC	
	δ_{H}	δ_{C}		2J	3J	
1	4,76 (1H, d, $J=2,0$ Hz)	66,3	3,85; 5,90	57,6; 156,4	122,1; 125,0	
2	3,85 (1H, t, $J=3,8$ Hz)	57,6	3,41; 4,76; 5,90	55,1; 66,3	156,4	
3	3,41 (1H, dd, $J=3,8$ e $2,0$ Hz)	55,1	3,85; 5,90	57,6	122,1	
4		195,7				
5	5,90 (1H, sl)	122,1	3,41; 4,76	156,4	55,1; 66,3; 124,9	
6		156,4				
7	6,35 (1H, d, $J=16,0$ Hz)	125,0	6,67	148,6; 156,4	66,3; 71,7; 122,1	
8	6,67 (1H, d, $J=16,0$ Hz)	148,6	6,35	71,7; 124,9	29,8; 156,4	
9		71,7				
10	1,32 (3H, s)	29,8		71,7	148,6	
11	1,33 (3H, s)	29,8		71,7	148,6	

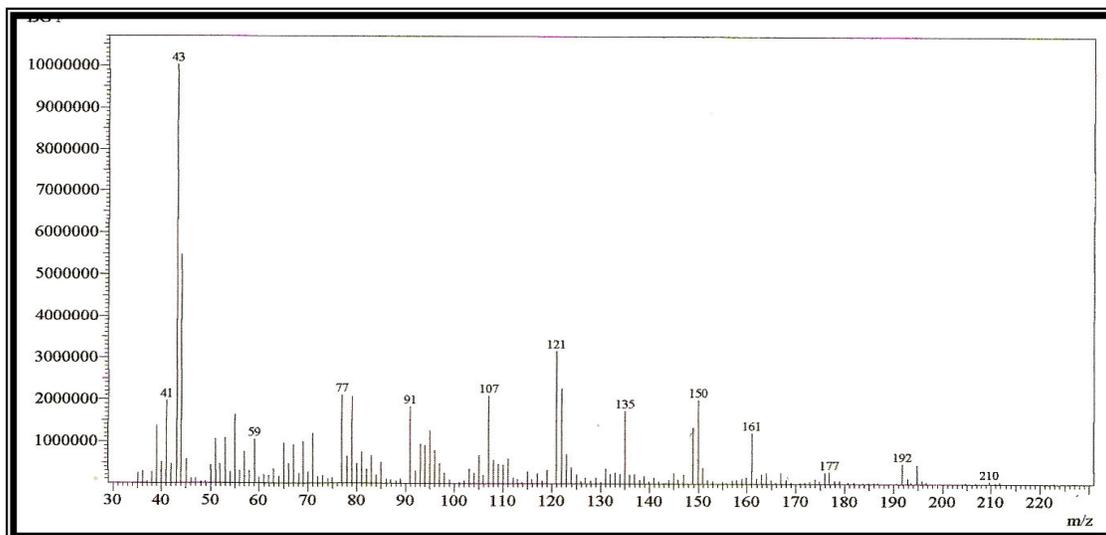


Figura 99: Espectro de massa de LS8 (IE, 70 eV)

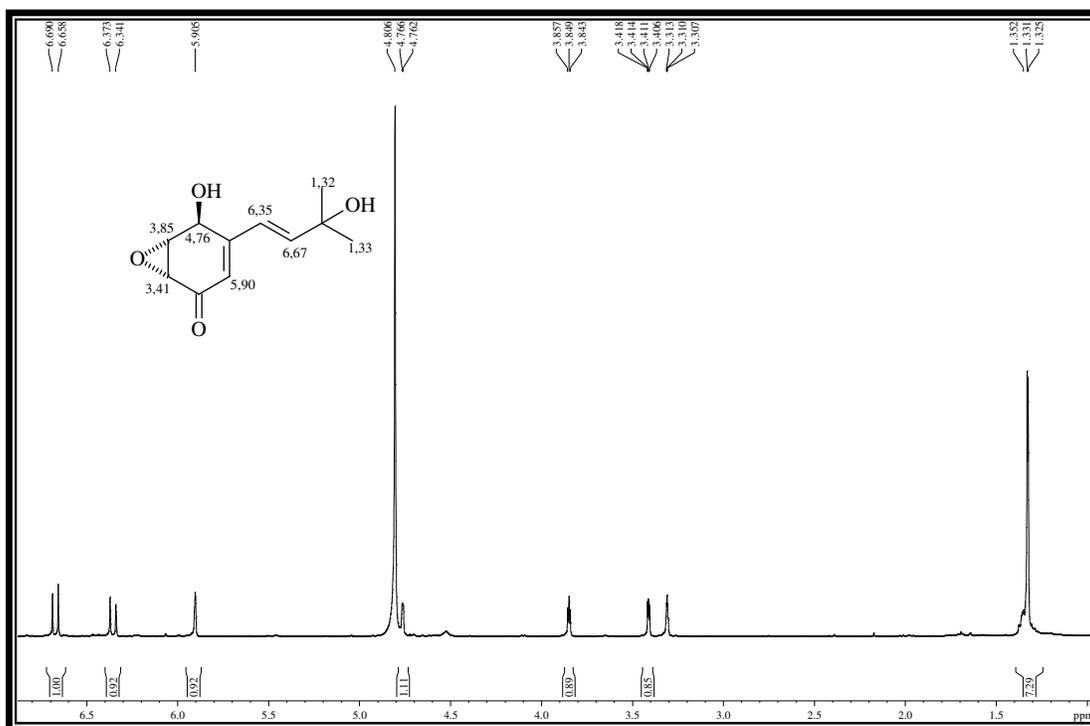


Figura 100: Espectro de RMN ¹H de LS8 (CD₃OD, 500 MHz)

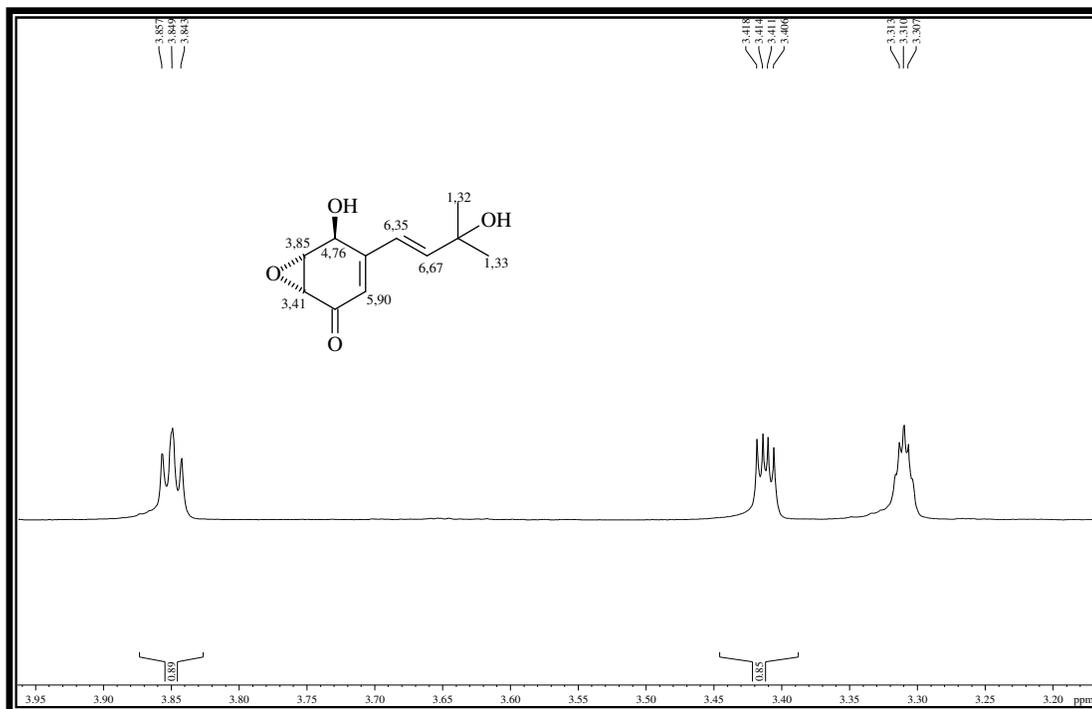


Figura 101: Expansão do espectro de RMN ^1H de LS8 (CD_3OD , 500 MHz)

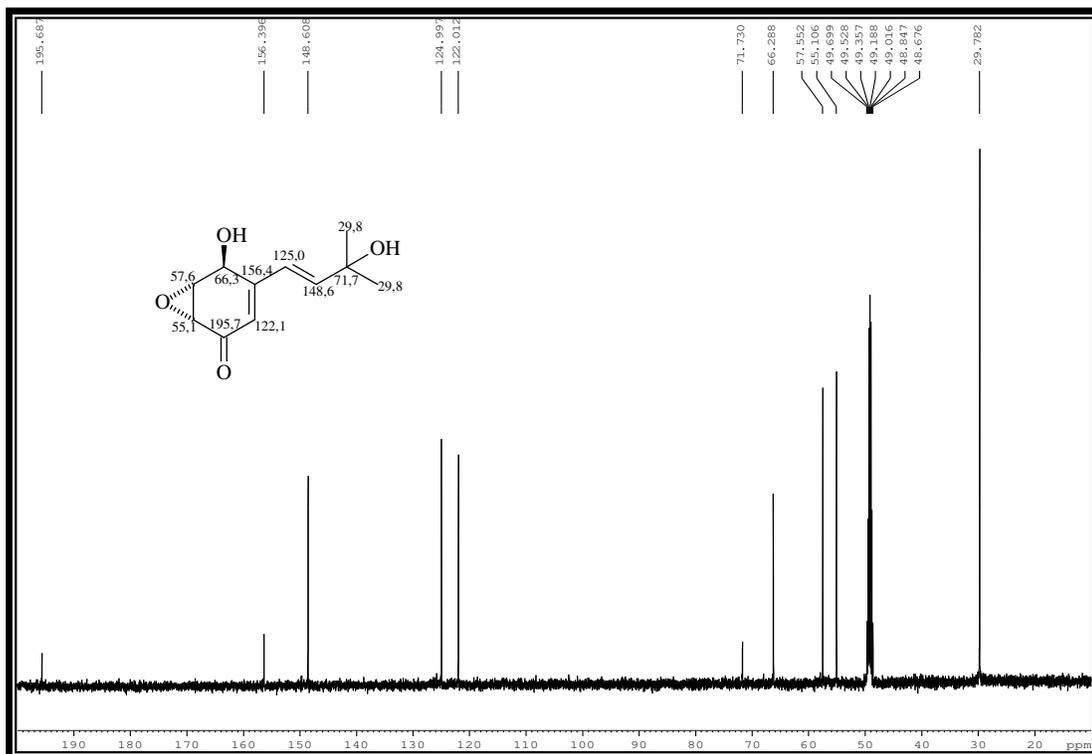


Figura 102: Espectro de RMN ^{13}C -BB de LS8 (CD_3OD , 125 MHz)

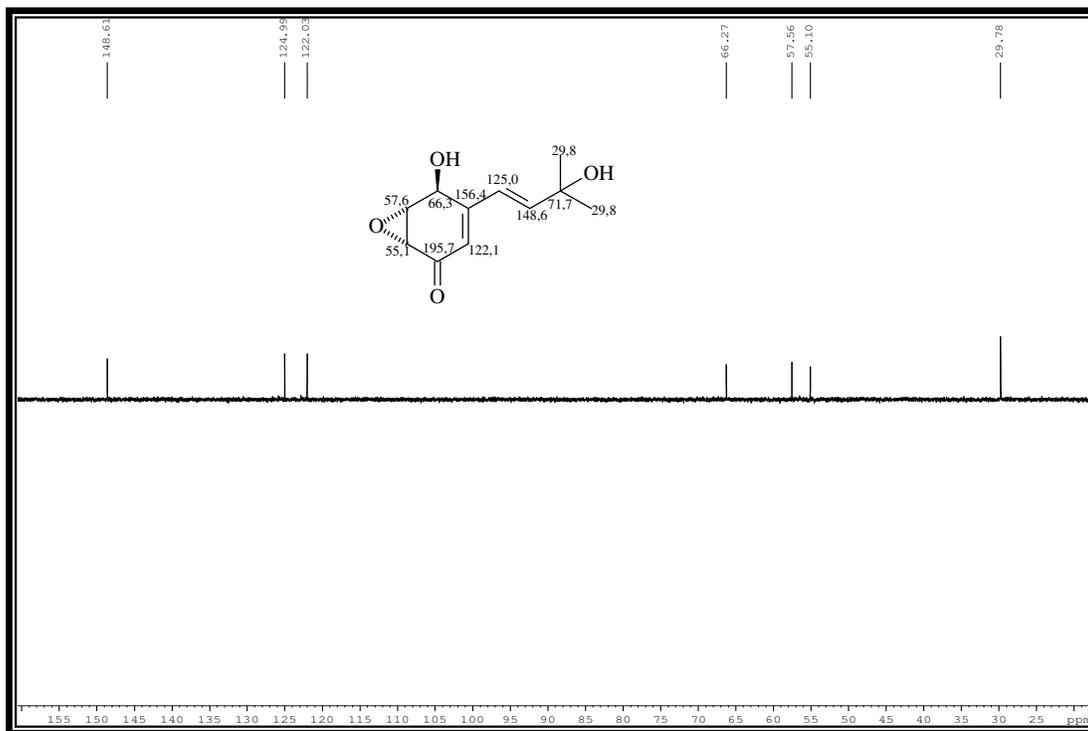


Figura 103: Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° de LS8 (CD_3OD , 125 MHz)

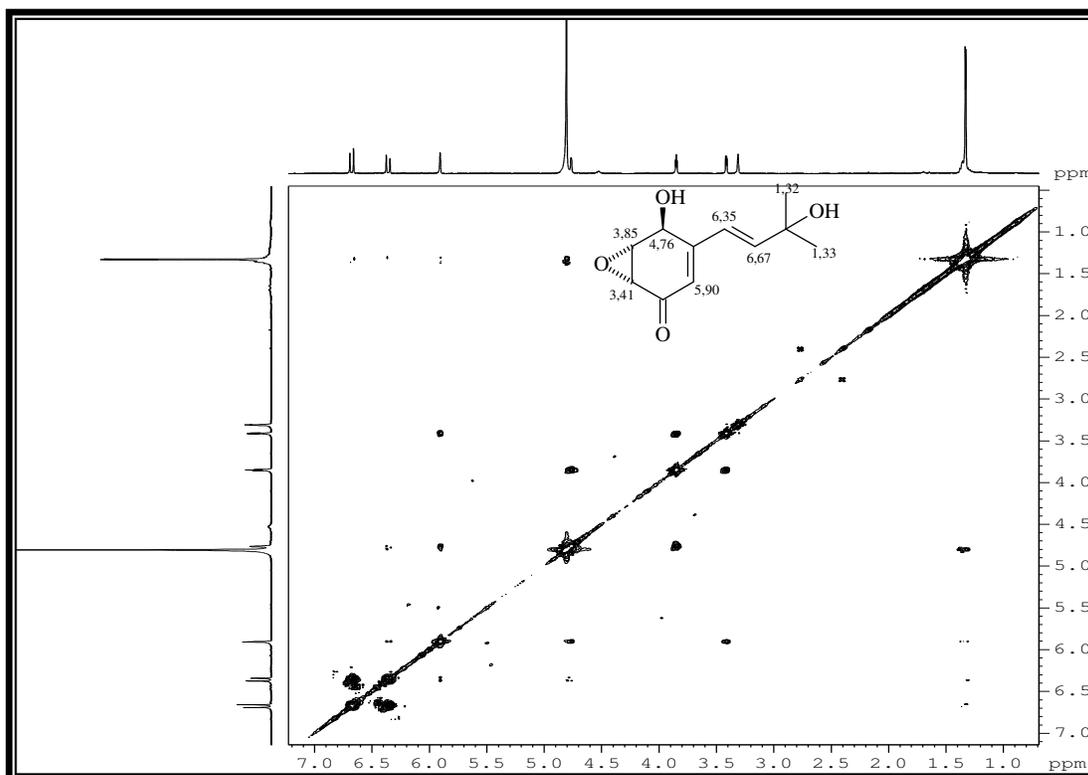


Figura 104: Espectro bidimensional COSY ^1H - ^1H de LS8 (CD_3OD , 500 MHz)

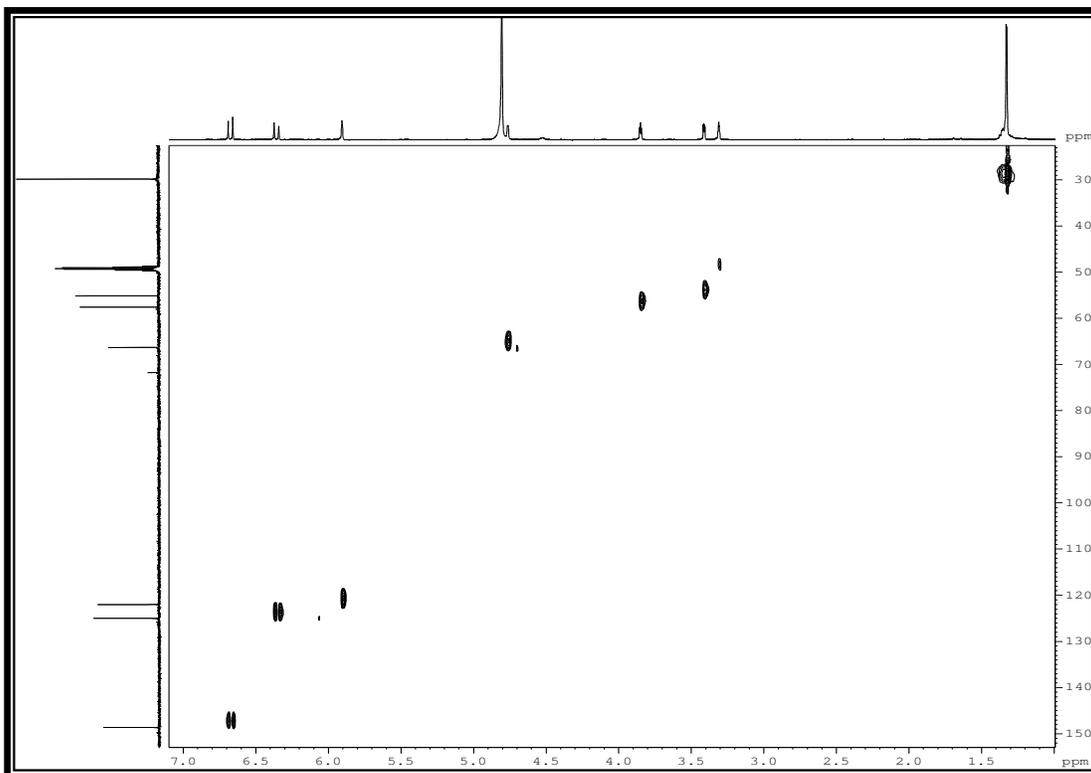


Figura 105: Espectro bidimensional HSQC de LS8 (CD₃OD, 500 MHz/125 MHz)

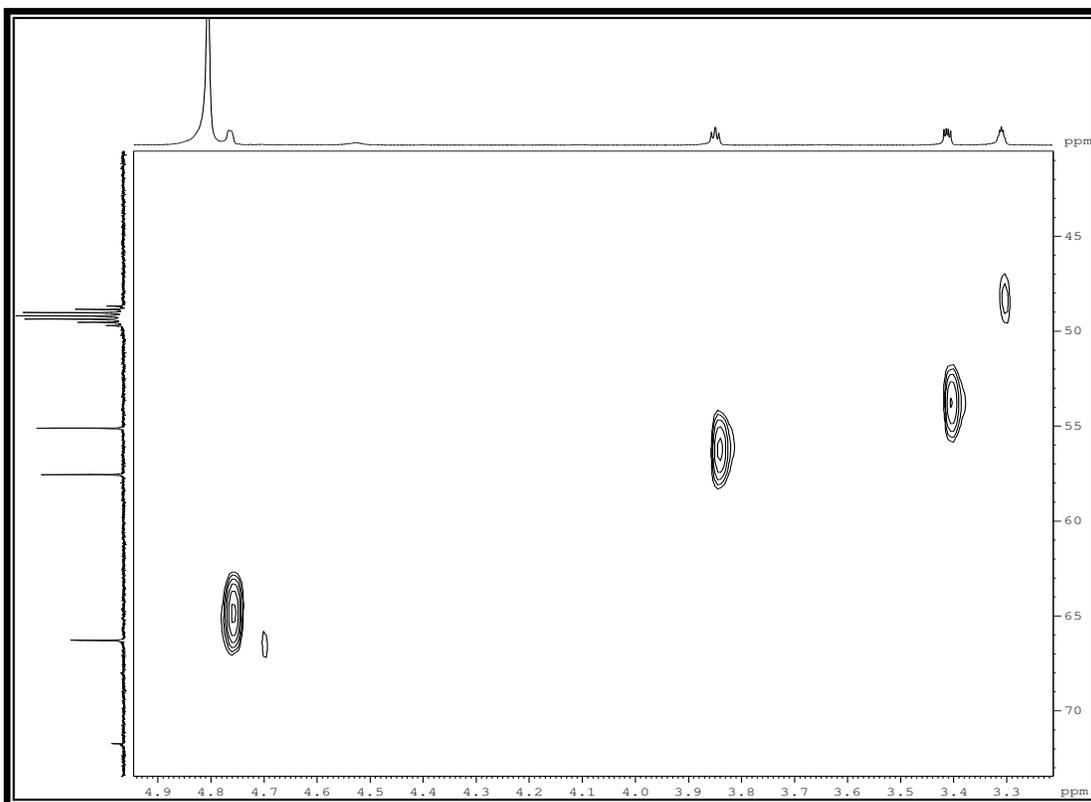


Figura 106: Expansão do espectro bidimensional HSQC de LS8 (CD₃OD, 500 MHz/125 MHz)

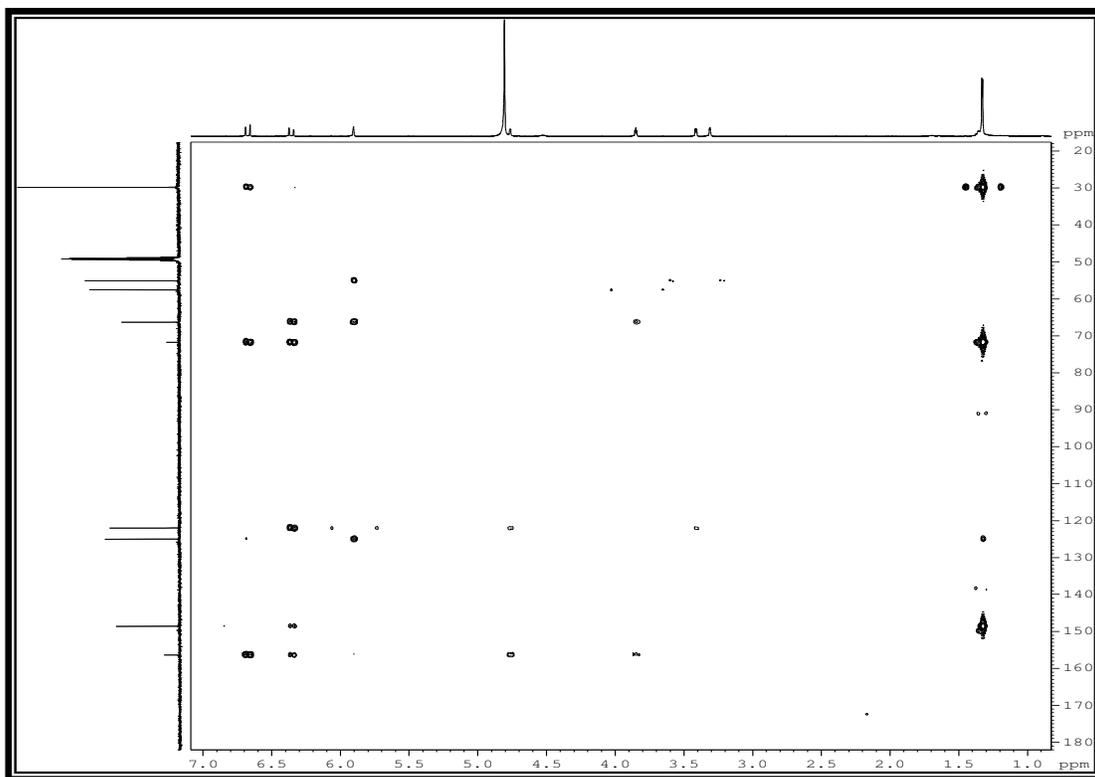


Figura 107: Espectro bidimensional HMBC de LS8 (CD₃OD, 500 MHz/125 MHz)

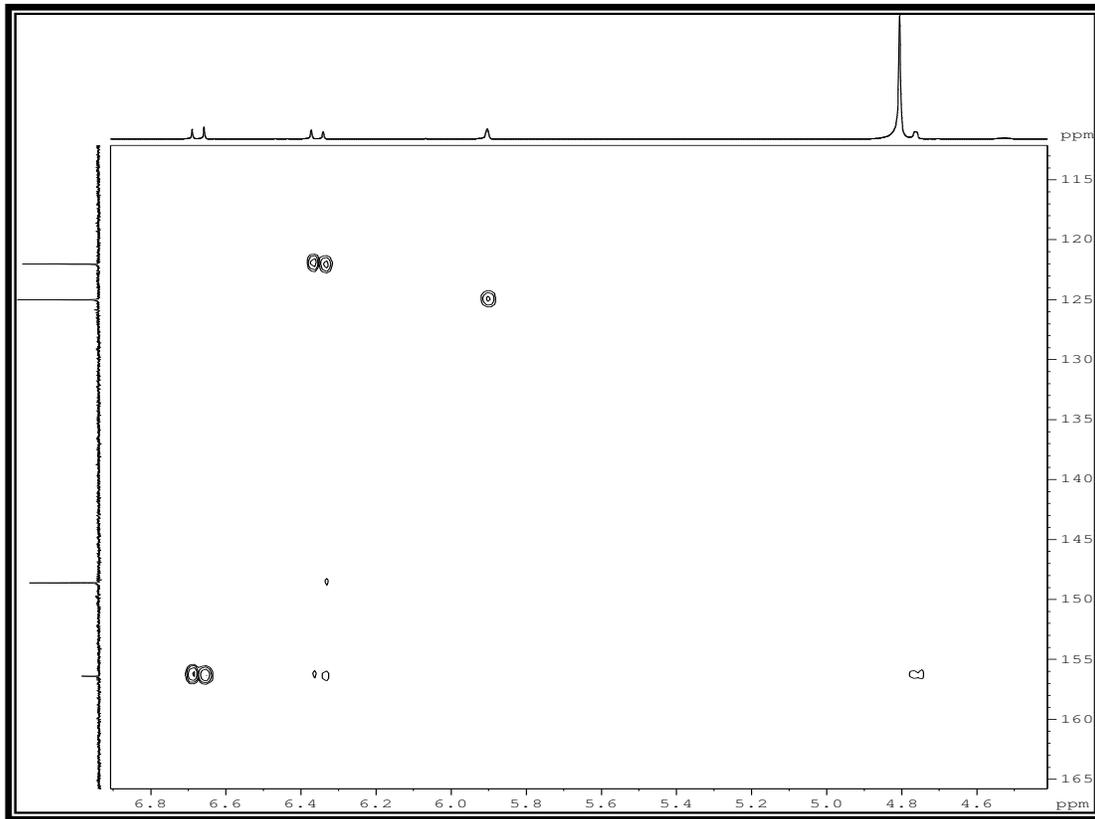


Figura 108: Expansão do espectro bidimensional HMBC de LS8 (CD₃OD, 500 MHz/125 MHz)

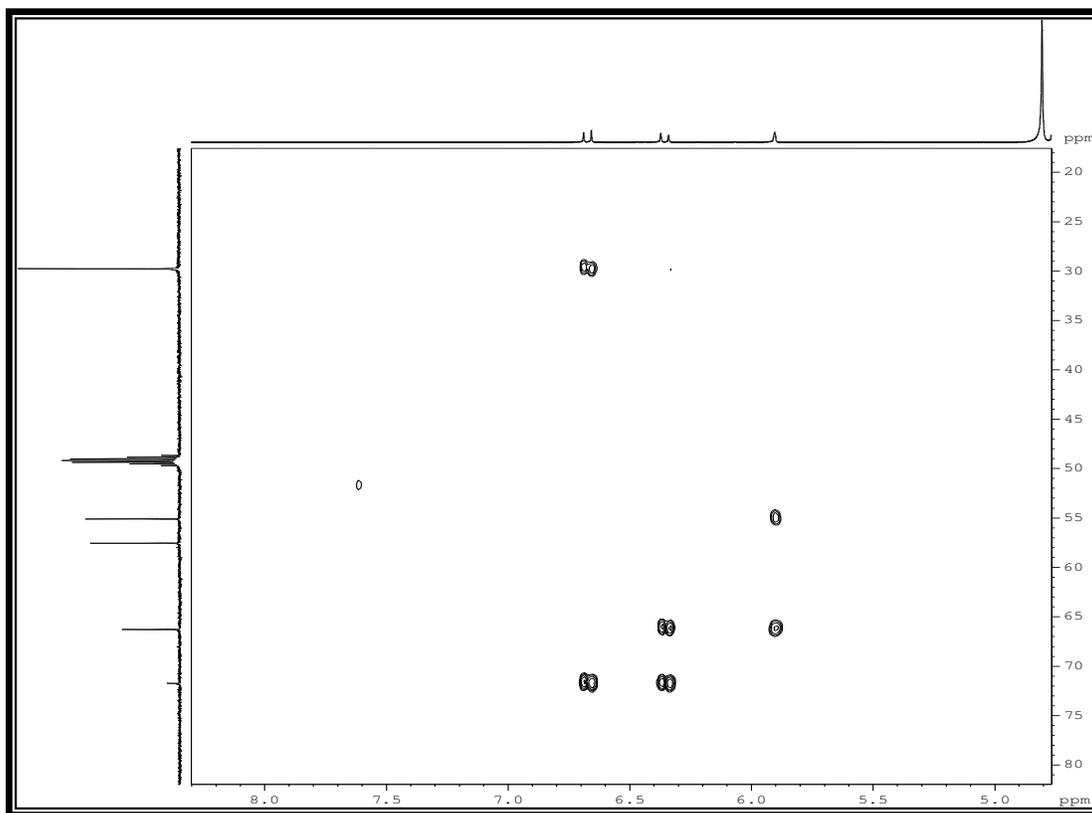


Figura 109: Expansão do espectro bidimensional HMBC de LS8 (CD₃OD, 500 MHz/125 MHz)

4.3 Biocatálise

O emprego de fontes naturais (células inteiras ou enzimas isoladas) como catalisadores na transformação de moléculas orgânicas sintéticas é uma prática empregada há centenas de anos. Entretanto, foi somente na década de 80 que se reconheceu o grande potencial dos sistemas vivos como catalisadores naturais de transformações orgânicas (TORSSELL, 1997; BOMMARIUS, 2004).

O termo biocatálise ou biotransformação refere-se aos processos em que um catalisador biológico é utilizado na conversão de um substrato orgânico, em um número limitado de etapas, sendo a enzima o biocatalisador (DERMIJIAN *et al.*, 1999; BOMMARIUS, 2004).

Os estudos científicos acerca da biocatálise estão sendo impulsionados como um suporte para sínteses químicas, ou seja, para ampliações, degradações ou resoluções racêmicas de compostos naturais ou sintéticos (MATSUDA; YAMANAKA; NAKAMURA, 2009). Atualmente, o emprego de biotransformações de moléculas orgânicas ocupa um lugar de destaque na química orgânica sintética contemporânea (FABER, 2000). Várias revisões sobre o assunto podem ser encontradas na literatura (ABRAHAM; SPASSOV, 2002).

4.3.1 As Enzimas e a Biotransformação

A aplicação de enzimas em síntese representa uma alternativa viável, chamada “química ecologicamente correta”, principalmente pelo controle ambiental. A versatilidade de reações catalisadas por enzimas e microrganismos é de particular interesse devido às várias vantagens apresentadas à biocatálise. A grande diversidade de processos metabólicos, condições brandas de reações, e enorme variedade de microrganismos na natureza são alguns privilégios evidentes em sínteses orgânicas.

Enzimas são proteínas que catalisam com grande eficiência as reações biológicas. São formadas por longas cadeias de aminoácidos unidas por ligações peptídicas e articuladas em estruturas tridimensionais. Possuem em suas estruturas grupos polares tais como -COOH, -OH, -NH₂, -SH e -CONH₂, que auxiliam na catálise enzimática. Sua eficiência catalítica e estrutura são mais estáveis em meio aquoso, no

entanto, muitas enzimas têm sido usadas como catalisador em vários solventes orgânicos. Enzimas são empregadas, por exemplo, em processos industriais, procedimentos analíticos, na medicina, tecnologia de alimentos e biorremediação, devido à sua alta seletividade (SILVERMAN, 2002).

As enzimas podem utilizar uma enorme variedade de compostos orgânicos como substrato nas reações enzimáticas, dentre os quais podemos citar: compostos aromáticos, esteróides, alcalóides, cumarinas, terpenóides e lignanas. Outra vantagem na utilização das enzimas é a grande variedade de reações catalisadas que são encontradas na literatura, podendo destacar-se as reações de hidrólise, acetilação, oxidação, redução, metilação, isomerização, glicosilação, dentre outras (BOMMARIUS, 2004).

A grande vantagem das enzimas é a alta seletividade de suas reações mostrando uma grande diferenciação enantiomérica entre seus substratos, esta seletividade pode ser de três tipos: quimiosseletividade - atuam num único tipo de grupo funcional, preservando assim outras funções existentes na molécula; regiosseletividade - podem distinguir grupos funcionais que estão quimicamente situados em diferentes regiões no mesmo substrato; enantiosseletividade - a grande maioria das enzimas são formadas a partir de L-aminoácidos e dessa forma atuam como catalisadores quirais. Isto significa que, alguma forma quiral e proquiral no substrato tem que ser reconhecida pela enzima para a formação do complexo enzima-substrato (BOMMARIUS, 2004).

Uma outra vantagem das enzimas é sua elevada eficiência como catalisador, pois são capazes de acelerar as reações de 10^8 a 10^{10} vezes em média, comparadas com as reações não enzimáticas correspondentes. Como consequência, a concentração molar do catalisador biológico (enzima) é da ordem de 10^{-3} a 10^{-4} %, bem menor que a de catalisadores químicos que são cerca de 0,1 a 1% bem mais elevado.

A utilização de biocatalisadores também apresenta algumas desvantagens que devem ser consideradas: as enzimas estão presentes na natureza em uma única forma enantiomérica, tornando impossível inverter a indução quiral de uma determinada reação enzimática. Trabalhar sob condições brandas pode, às vezes, se transformar em desvantagem uma vez que, um aumento de pH e temperatura, bem como elevadas concentrações de sal podem causar a desativação da proteína.

O princípio de um catalisador é diminuir a energia de ativação. Assim a enzima se liga a uma molécula de substrato em uma região específica, denominada sítio de ligação. Esta região é um encaixe que apresenta um lado envolvido por cadeias de aminoácidos que ajudam a ligar o substrato, e o outro lado desta cadeia age na catálise.

Várias teorias vêm sendo desenvolvidas no intuito de melhor entender a catálise enzimática. Porém, dentre as propostas apresentadas até hoje, as mais conhecidas serão resumidas a seguir.

4.3.2 Modelos Enzimáticos

A noção de que as interações entre uma enzima e seu substrato seriam complementares foi introduzida, inicialmente, pelo famoso modelo “chave-fechadura”, proposto por Emil Fischer, em 1894. Neste tipo de modelo o substrato se ajusta à enzima como uma chave se ajusta à fechadura (Figura: 110). O substrato aloja-se na porção enzimática que apresenta uma configuração complementar a sua, enquanto os grupos químicos estabelecem as ligações com o sítio ativo. Esse mecanismo, que admite uma estrutura rígida para a enzima, embora aceito por um bom período, mostrou-se incapaz de explicar o fato de muitas enzimas, como as lipases, converterem não apenas os seus substratos naturais, mas também muitos substratos não naturais de características estruturais diferentes (FABER, 2000).

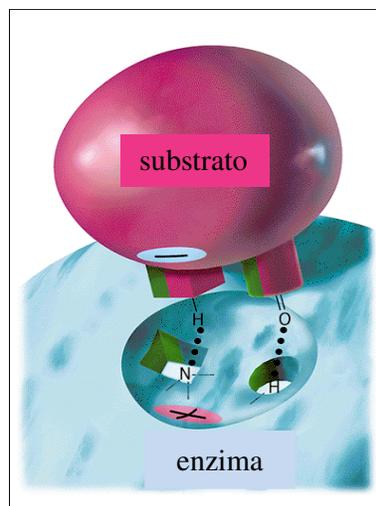


Figura 110: Mecanismo de ação enzimática chave-fechadura.

A teoria do encaixe induzido foi desenvolvida inicialmente por Koshland e colaboradores em 1958, baseada em sistemas enzimáticos. Esta teoria sugere que, através da complexação, o substrato induz uma mudança conformacional na subunidade da enzima com a qual interage. Esta mudança pode ser transmitida às subunidades vizinhas, induzindo na enzima a conformação responsável pelo processo catalítico promovendo assim um encaixe perfeito entre seu sítio ativo e o substrato envolvido (FABER, 2000).

Em outras palavras, a teoria do encaixe induzido considera a capacidade do ligante de selecionar ou induzir a modificação da estrutura tridimensional de seu receptor biológico, ao mesmo tempo em que este receptor tem a propriedade de reconhecer uma ou um conjunto de conformações do(s) ligante(s). Este, ao acarretar uma mudança conformacional de seu receptor, pode estar induzindo-o a adotar a conformação responsável por seu reconhecimento (Figura 111).

O mecanismo pode ser comparado à interação da mão com a luva, onde a mão representa o substrato e a luva à enzima. Essa proposta mostrou-se capaz de explicar porque em muitos casos são necessários apenas alguns requisitos estruturais para que certos substratos sejam transformados por uma determinada enzima.

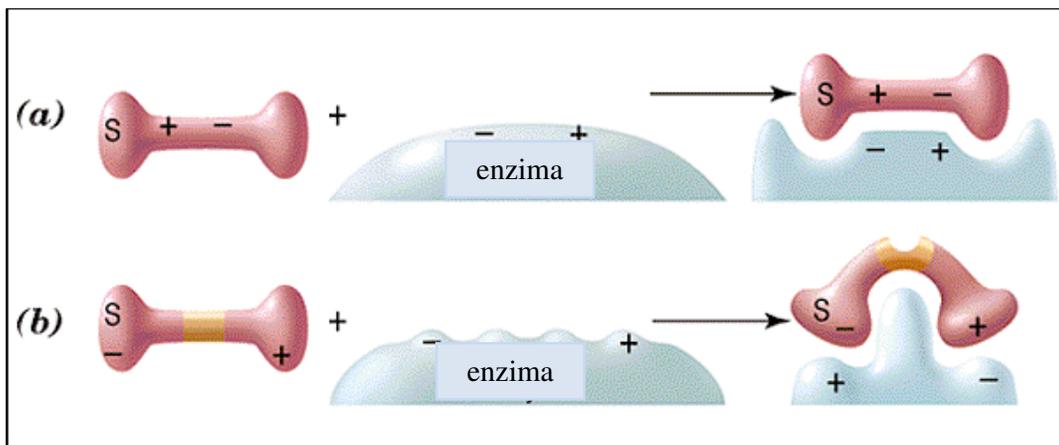


Figura 111: Mecanismo de ação enzimática encaixe induzido.

Através desse mecanismo de ação pode-se entender porque muitas enzimas são ativas frente a substratos não naturais que possuem características estruturais diferentes dos seus substratos naturais.

A regra dos três pontos foi sugerida por A. G. Ogston (1940) e é amplamente utilizada para explicar a enantiosseletividade das enzimas. Segundo essa teoria, para se obter um alto grau de enantiosseletividade em uma conversão enzimática, o substrato deve estar aprisionado firmemente em um espaço tridimensional. Como consequência, torna-se necessária à existência de pelo menos três diferentes pontos de ligação entre o substrato e o sítio ativo da enzima. De acordo com essa teoria, a estereoespecificidade das enzimas é explicada pela existência de três pontos ou sítios diferentes de interação, entre a enzima e o substrato. Os pontos de ligação se unem a grupos específicos no substrato, levando a enzima e o substrato a se posicionarem em uma orientação fixa, um em relação ao outro, colocando o grupo do substrato a ser transformado sob o sítio de catálise da enzima (Figura 112) (FABER, 2000).

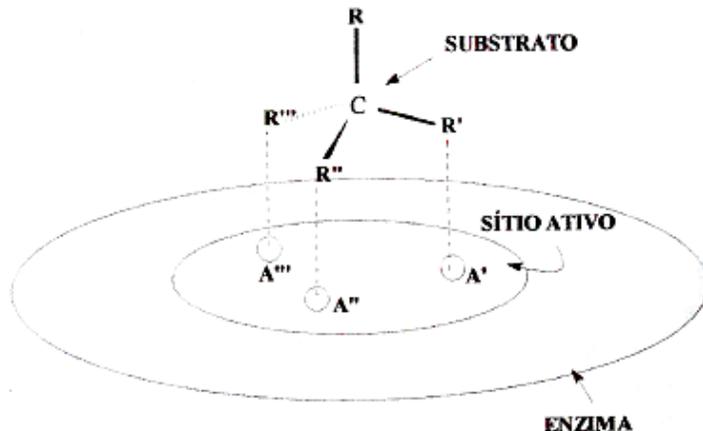


Figura 112: Representação da estereoespecificidade pela regra dos três pontos.

A região onde os sítios ligantes e catalíticos estão situados é denominada de sítio ativo da enzima. Esta região compreende uma pequena porção do volume total da enzima e normalmente encontra-se na superfície ou próxima a esta, de modo a ser acessível ao substrato.

A alta especificidade da ação enzimática é, portanto, governada pela habilidade da enzima de se ligar ao substrato, sob a forma de um estado de transição, durante a conversão do substrato em produto. Uma substância é assim considerada um bom substrato quando é capaz de formar um estado de transição estável, que assegure a formação do produto em uma velocidade relativamente alta. A especificidade enzimática pode ser exemplificada pela discriminação entre enantiômeros de um substrato racêmico *R* e *S*, no qual a quiralidade está localizada em um átomo de carbono

sp^3 . A Figura 113, mostra como um sítio ativo da enzima é capaz de diferenciar entre o par de enantiômeros (*R* ou *S*). No caso 1, ocorre um acoplamento perfeito entre o enantiômero *R* e o sítio ativo da enzima, permitindo dessa forma uma conversão sobre o grupo D do substrato. No caso 2, o enantiômero *S* não consegue "encaixar" de forma adequada para que ocorra a conversão.

Somente o enantiômero *R*, do par racêmico irá sofrer a conversão enzimática, explicando dessa forma o motivo da alta seletividade das reações enzimáticas.

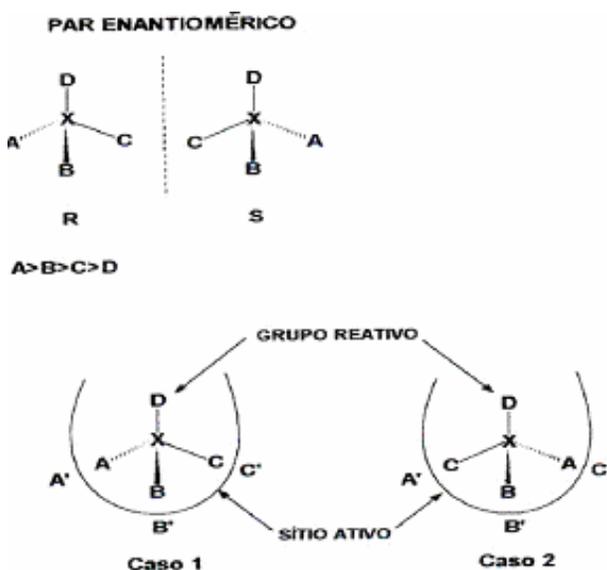


Figura 113: Exemplo esquemático da seletividade enzimática.

4.3.3 Utilização de Microrganismos em Reações de Biotransformação

Os microrganismos são de interesse particular como biocatalisadores uma vez que, dentre outras vantagens, apresentam um crescimento rápido, fornecendo elevadas quantidades de enzimas, além de produzirem todas as enzimas necessárias para catalisar os mais diversos tipos de reações químicas (DEMIRJIAN *et al.*, 1999).

Fungos filamentosos e leveduriformes (leveduras) são empregados como biocatalisadores na transformação de moléculas orgânicas, gerando produtos com alta quimio-, regio- e estereosseletividade (KIM *et al.*, 2007). Vários microrganismos estão sendo investigados na síntese assimétrica de moléculas biologicamente ativas e de interesse comercial (POLLARD; WOODLEY, 2006). Merece destaque a produção de álcoois quirais através do emprego de enzimas álcool-desidrogenases (ADHs) de origem fúngica (MOORE *et al.*, 2007; PIOVAN *et al.*, 2008).

As reações catalisadas por microrganismos podem ser realizadas utilizando duas metodologias:

1- Células em crescimento: Os substratos e a inoculação são adicionados simultaneamente ao meio de cultura ou os substratos são adicionados durante a fase de crescimento do microrganismo. Durante a fase de crescimento do microrganismo ocorre a formação do seu complexo enzimático capaz de metabolizar os nutrientes. Se o composto de partida for adicionado nessa fase ele pode induzir a formação de enzimas normalmente não produzidas pelo microrganismo, aumentando assim os resultados positivos na biocatálise.

2- Células em repouso: O microrganismo é inicialmente cultivado sob condições ótimas até seu crescimento e posteriormente a biomassa é separada por filtração ou centrifugação. Em seguida as células são transferidas para um outro meio de cultura como, água e glicose e o substrato é então adicionado. A composição do meio de cultura facilita o isolamento do produto, porém a transformação depende de enzimas já formadas.

4.3.4 Utilização de ADHs em biocatálise

A enzima álcool desidrogenase, pertencente à sub-classe das oxidorreduções (SILVERMEN, 2002), é uma enzima intracelular envolvida no catabolismo da glicose de microrganismos (PRESECKI; VASIC-RACKI, 2005), que catalisa a oxidação reversível de álcoois aos correspondentes compostos carbonilados (SILVERMEN, 2002) (aldeídos e cetonas), bastante empregada na síntese orgânica devido ao seu grande potencial de resolução de centros quirais (MATSUDA; YAMANAKA; NAKAMURA, 2009).

A redução assimétrica de cetonas e aldeídos pró-quirais pode ser feita usando desidrogenases isoladas ou células microbianas íntegras, fornecendo os respectivos álcoois secundários ou primários. No caso de cetonas pró-quirais, a estereoquímica do álcool formado na biorredução pode ser prevista pela regra de Prelog, a qual postula o ataque do hidreto pela pseudo face *re* da carbonila, formando o álcool de configuração *S* (Fig. 114, p. 126) (SALVI; CHATTOPADHYAY, 2001). A maioria das desidrogenases favorece a formação de produtos com especificidade Prelog, enquanto que álcoois anti-

Prelog são mais difíceis de serem obtidos (FABER, 2000). Na Tabela 20 são mostradas algumas enzimas álcool desidrogenases descritas na literatura.

Figura 114: Modelo da especificidade de Prelog

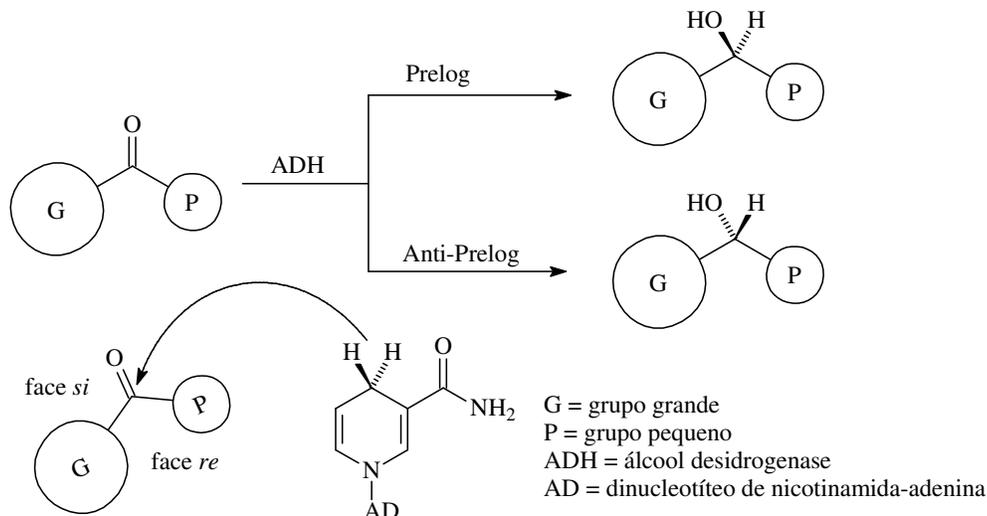
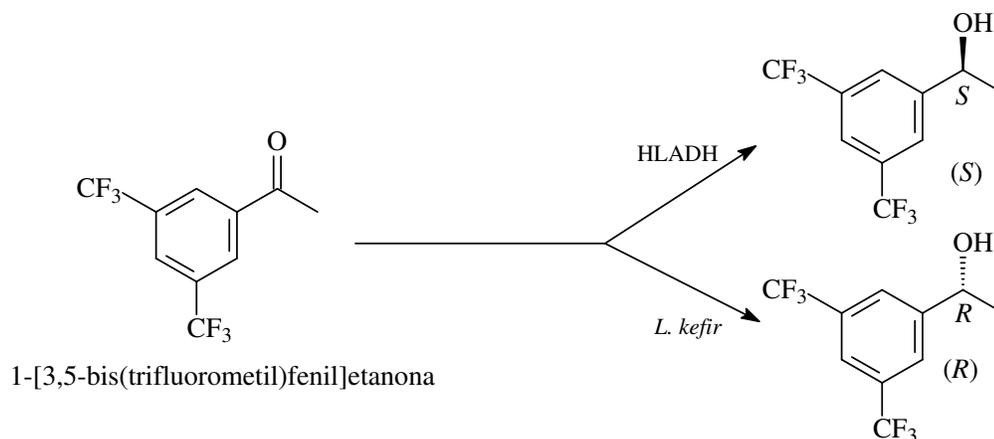


Tabela 21: Especificidade de enzimas na redução de cetonas.

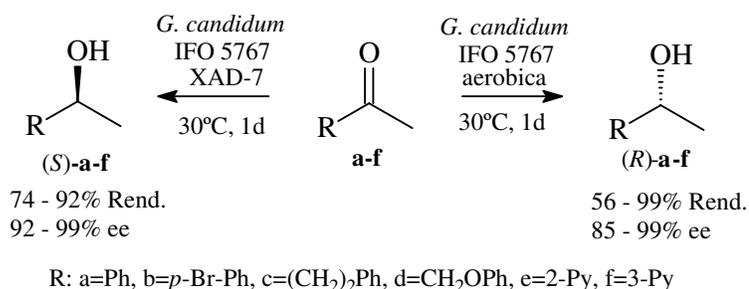
Enzima	Especificidade	Cofator
<i>Thermonaerobum brockii</i> - ADH	Prelog	NADPH
<i>Candida parapsilosis</i> - ADH	Prelog	NADH
<i>Lactobacillus kefir</i> - ADH	Anti-Prelog	NADPH
<i>Mucor javanicus</i> - ADH	Anti-Prelog	NADPH

Na redução do 1-[3,5-bis(trifluorometil)fenil]etanona, os dois isômeros configuracionais podem ser obtidos com elevado grau de pureza (99% *ee*) de acordo com a enzima utilizada (Esquema 1, p. 127). Para a obtenção do estereoisômero *R* a enzima *Lactobacillus kefe* ADL é recomendada, enquanto que o estereoisômero de configuração oposta é obtido quando se utiliza álcool desidrogenase de fígado de cavalo (HLADH) (GELO-PUJIC, 2006).



Esquema 1: Redução estereoespecífica de 1-[3,5-bis(trifluorometil)fenil]etanona.

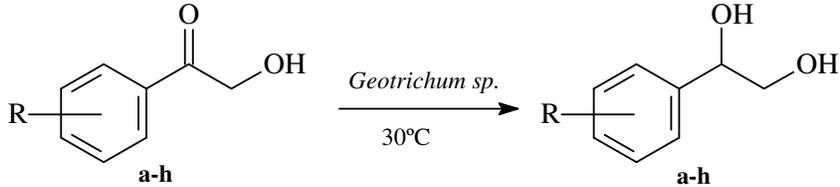
Quando se utiliza o fungo *Geotrichum candidum* em conjunto com Amberlite XAD-7 uma série de cetonas foram reduzidas aos seus álcoois secundários com excesso enantiomérico satisfatório (NAKAMURA, 2002) como mostrado no esquema 2.



Esquema 2: Redução enantiosseletiva de cetonas por *G. candidum*.

Dependendo do meio utilizado, o fungo *G. candidum* pode gerar o álcool de configuração *R* ou *S*. No primeiro caso, quando a reação é conduzida sob condições aeróbias, este produto é preferencialmente obtido. A adição de Amberlite XAD-7 ao meio promove a inversão na enantiosseletividade do produto gerando assim o estereoisômero *S*.

Uma série de α -hidroxifeniletanonas *o*-, *m*- e *p*- substituídas foram reduzidas aos correspondentes 1,2-dióis usando células de *Geotrichum sp.* como catalisador (WEI, 2000) (Tabela 21, p. 128).

Tabela 22: Redução de α -hidroxifeniletanonas por células de *Geotrichum sp.*


Substrato	R	t (h)	Rend.	ee (%)	Configuração
a	H	16	62	91	S
b	<i>o</i> -Cl	15	77	60	R
c	<i>m</i> -Cl	12	93	77	S
d	<i>p</i> -Cl	12	91	96	S
e	<i>o</i> -NO ₂	15	37	47	R
f	<i>m</i> -NO ₂	12	84	98,5	S
g	<i>p</i> -NO ₂	10	95	99	S
h	<i>p</i> -CH ₃ SO ₂ NH	48	67	99,5	S

Observa-se que a posição do substituinte tem efeito na enantioseletividade mostrada por este microrganismo. Cetonas *o*-substituídas levam geralmente a 1,2-diois de configuração *R* com moderado excesso enantiomérico. Enquanto (*S*)-1,2-diois são obtidos na redução das cetonas *m*- e *p*- substituídas com excelente excesso enantiomérico.

4.4 Bioprospecção de Atividade Álcool Desidrogenases (ADHs) em *L. strigellus*

A atividade ADH de *L. striguellus* (Item 5.9, p. 201) foi investigada empregando-se fucsina básica como corante do substrato enzimático (DELAMATER, 1948; KLIGMAN; MESCON, 1950; PUCHTLER; MELOAN; BREWTON, 1975; HILLOCKS, 1985; MADSEN *et al.*, 1998). Nesse ensaio, o piruvato formado a partir do metabolismo da glicose segue a rota da fermentação alcoólica (Figura 115, p. 129) produzindo acetaldeído, que logo em seguida é reduzido a etanol pela ação de ADHs (ESPOSITO; AZEVEDO, 2004; NELSON; COX, 2006; PRESECKI; VASIC-RACKI, 2005). A fucsina básica reage com o acetaldeído, mudando a coloração das colônias para rosa (PUCHTLER; MELOAN; BREWTON, 1975).

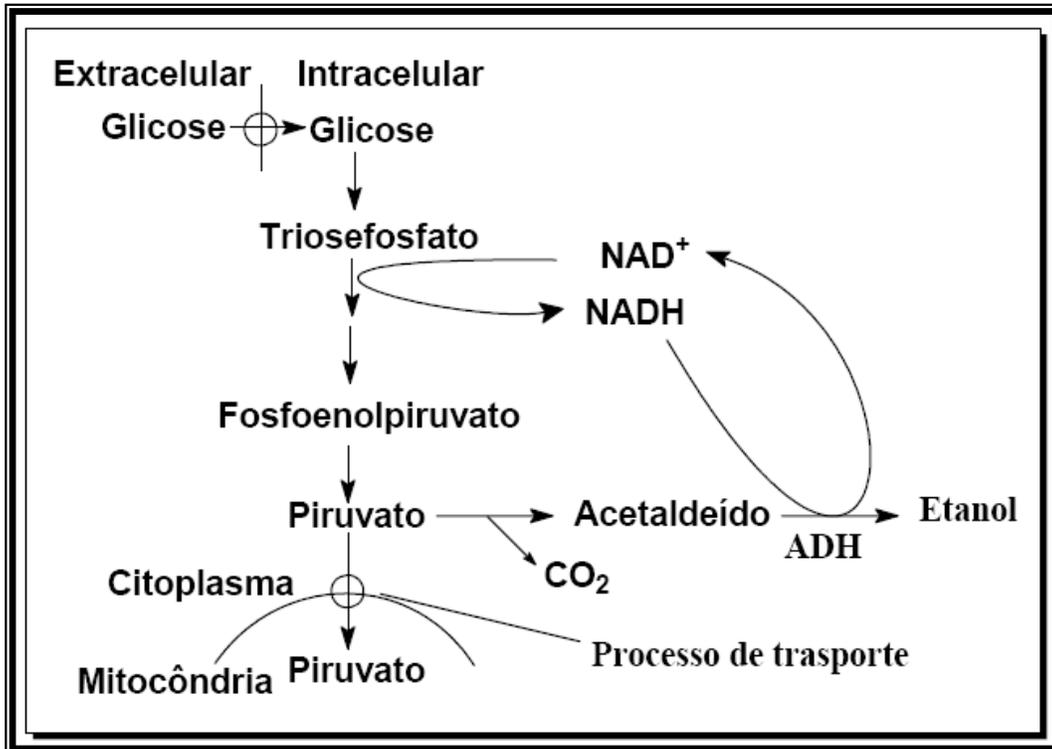


Figura 115: Metabolismo da glicose (ESPOSITO; AZEVEDO, 2004)

A atividade ADH foi detectada pelo método de difusão em gel, empregando-se como meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) suplementado com 0,1% de fucsina básica. O ensaio foi realizado em triplicata e o fungo *Fusarium oxysporum* foi empregado como controle positivo (Fig. 116).

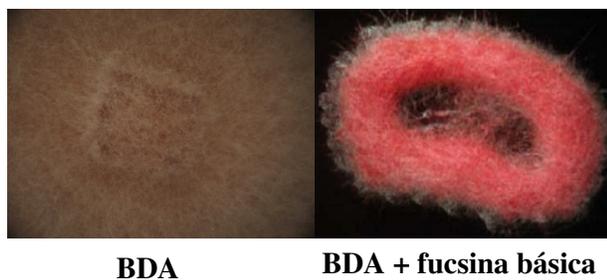


Figura 116: Colônia de *Fusarium oxysporum* (controle positivo), crescidas em BDA e BDA + fucsina

Após sete dias de crescimento, foi observado o desenvolvimento da coloração rosa na cultura fúngica suplementada com fucsina básica (Fig. 117, p. 130), indicando atividade ADH positiva. Embora o experimento empregado seja apenas qualitativo, a intensidade da coloração rosa observada nas colônias de *L. strigellus* sugeriu que a atividade ADH desse basidiomiceto é elevada.

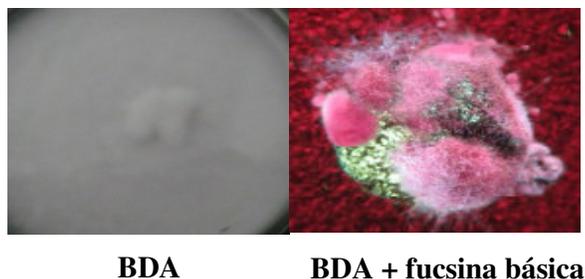


Figura 117: Colônias de *L. strigellus*, crescidas em BDA e BDA + fucsina

A atividade ADH positiva de *L. strigellus* motivou o emprego desse microrganismo como biocatalisador na redução de compostos carbonílicos pró-quirais, visando à obtenção de alcoóis opticamente ativos (Item 5.10, p. 201).

4.5 Biorredução de Cetonas Pró-Quirais por Células em Crescimento de *L. strigellus*

O estudo da biorredução de cetonas aromáticas pró-quirais para obtenção de alcoóis opticamente ativos foi realizado empregando-se células em crescimento do microrganismo *L. strigellus*. Inicialmente, a acetofenona (**84**) foi empregada como modelo na otimização das condições reacionais.

Após sete dias de crescimento fúngico em meio de batata-dextrose (BD) sob agitação e a 28 °C, 10 mg da cetona foram adicionados ao meio reacional (Item 5.10.6, p. 205). Uma alíquota de 1,0 mL da reação foi retirada a cada 1, 3 e 6 dias e analisada por CLAE (Item 5.10.6.1, p. 204). O valor de conversão da acetofenona no seu respectivo álcool foi determinado através de uma curva de calibração previamente construída (Fig. 1118, p. 134). Os tempos de retenção da cetona e do álcool foram determinados pela injeção de padrões no CLAE, tanto em coluna aquiral quanto em quiral, para posterior comparação com o produto reacional.

Após 1 dia de reação, o 1-feniletan-1-ol foi formado em elevado excesso enantiomérico ($ee >99\%$), mas com baixo valor de conversão (39%). A enantiosseletividade da reação foi mantida ao longo do tempo reacional (3 e 6 dias), com um significativo aumento do valor de conversão da cetona em álcool (84%).

Como previsto pela regra Prelog, o álcool formado apresentou configuração *S*. Esta estereoquímica foi determinada pela comparação da rotação óptica do produto isolado com os dos enantiômeros *R* e *S* do 1-feniletan-1-ol padrão.

A partir do resultado obtido com a biorredução da acetofenona (**84**), outras sete cetonas pró-quirais (**85-91**), contendo grupos doadores (OMe e Me) e retiradores (NO₂) de elétrons no anel aromático, foram investigadas como substrato nas mesmas condições reacionais. Da mesma forma que para **84**, os valores de conversão das cetonas em álcool foram determinados através de curvas de calibração previamente construídas (Figs. 119-125, p. 134-137) e os tempos de retenção das cetonas e dos alcoóis foram determinados por CLAE.

As Figuras 126-205 (p. 138-157) mostram os cromatogramas das reações de biorredução e os dados extraídos dos mesmos encontram-se resumidos na Tabela 22 (p. 133). É possível observar que, com exceção da 3-metoxiacetofenona (entrada 9) e 4-nitroacetofenona (entrada 21), todos os derivados da acetofenona foram convertidos aos álcoois correspondentes em elevados excessos enantioméricos (>90%). Na maioria dos casos, as maiores conversões foram obtidas com 3 e 6 dias de reação.

A mesma estereoquímica *S* foi encontrada em todos os álcoois majoritariamente produzidos. Assim como para o 1-feniletan-1-ol, a configuração absoluta dos álcoois foi determinada através da comparação da rotação óptica de cada produto isolado com dados da literatura para os enantiômeros *R* e *S*.

Nas cetonas contendo o grupo OMe no anel, observou-se a melhor conversão e *ee* quando este grupo se encontrava na posição *orto* (entrada 6). A 3-nitroacetofenona foi o derivado nitrado que apresentou as melhores conversão e *ee* (entradas 17-18). Valores inferiores de conversões foram observados nos produtos da biorredução da 4-metilacetofenona, mas com *ee* >99% quando a reação foi realizada em 1 e 3 dias (entradas 22-23).

Quando o grupo NO₂ se encontrava na posição *orto*, observou-se, após seis dias de reação, um menor valor de conversão (49%, entrada 15) em relação a cetonas substituídas com o grupo OMe nesta mesma posição (97%, entrada 6).

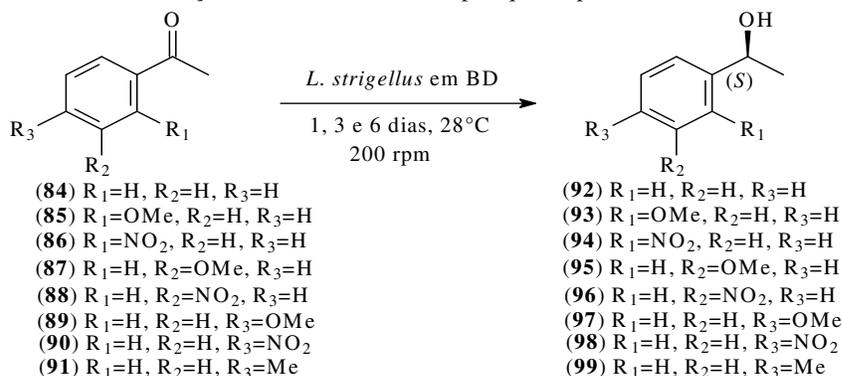
Para o derivado substituído com o grupo retirador de elétrons na posição *meta* observou-se uma alta conversão com apenas 1 dia de reação (80%, entrada 16) e um *ee* de 97,5% (entrada 16). Entretanto, a substituição do *meta*-NO₂ por *meta*-OMe levou à conversões inferiores (64%, entrada 8) e *ee* similares (97%, entrada 7).

A mesma taxa de conversão (58%, entradas 11 e 23) e excesso enantiomérico (99%, entradas 11 e 23) foram observadas após 3 dias de reação para as cetonas que continham grupos ativadores do anel (OMe e Me) na posição *para*. Observou-se ainda que o acréscimo no tempo da reação levou ao aumento na conversão (77%, entrada 12), havendo uma diminuição no valor do excesso enantiomérico no sexto dia (92%, entrada 12). A presença de um grupo nitro na mesma posição mostrou melhoras nas taxas de conversão (98%, entrada 20) e um decréscimo no excesso enantiomérico (94%, entrada 20) após 3 dias de reação.

Em suma, a inserção dos grupos metoxilas nas posições *orto* ou *para* levaram à formação do produto de redução em maiores taxas de conversão, quando comparadas com as reações envolvendo este mesmo grupo na posição *meta*. De maneira contrária, a presença de um grupo desativador nas posições *orto* ou *para* promoveu uma redução nas taxas de conversão e excesso enantiomérico dos produtos reacionais, quando comparados com as reações envolvendo a cetona *m*-NO₂ substituída.

Biorreduções de cetonas aromáticas substituídas com grupo doador de elétrons (OMe) são relatados na literatura utilizando células íntegras de *Daucus carota* L. Observou-se um aumento na conversão e no *ee* quando derivados *meta*-substituídos foram utilizados (MACZKA; MIRONOWICZ, 2004). Assim, as conversões e *ee* obtidos nos estudos com *L. strigellus* foram superiores aos da literatura para cetonas substituídas em *orto* e *para*, e inferiores para os derivados *meta* substituídos.

Estudos da biotransformação de cetonas pró-quirais pelo fungo *Alternaria alternata* (KURBANOGLU *et al.*, 2007) revelaram que quando grupos retiradores de elétrons são inseridos, os alcoóis produzidos com altas conversões e *ee* são os substituídos na posição *meta*. Estes resultados estão de acordo com os observados nos estudos com *L. strigellus*.

Tabela 23: Resultado da biorredução de cetonas aromáticas pró-quirais por células em crescimento de *L. strigellus*

Entrada	R	t (dias)	Conversão (%)	ee (%)
1		1	39,0	>99,0
2	H	3	83,0	>99,0
3		6	84,0	>99,0
4		1	50,0	>99,0
5	2-OMe	3	91,5	>99,0
6		6	96,5	97,0
7		1	33,5	97,0
8	3-OMe	3	64,0	93,0
7		6	59,0	77,0
10		1	28,0	>99,0
11	4-OMe	3	58,0	>99,0
12		6	77,0	92,0
13		1	8,5	98,5
14	2-NO ₂	3	47,5	98,5
15		6	49,0	99,0
16		1	80,0	97,5
17	3-NO ₂	3	99,0	97,5
18		6	99,0	97,5
19		1	86,0	99,0
20	4-NO ₂	3	98,0	94,0
21		6	98,0	62,0
22		1	17,0	>99,0
23	4-Me	3	57,5	>99,0
24		6	83,0	92,5

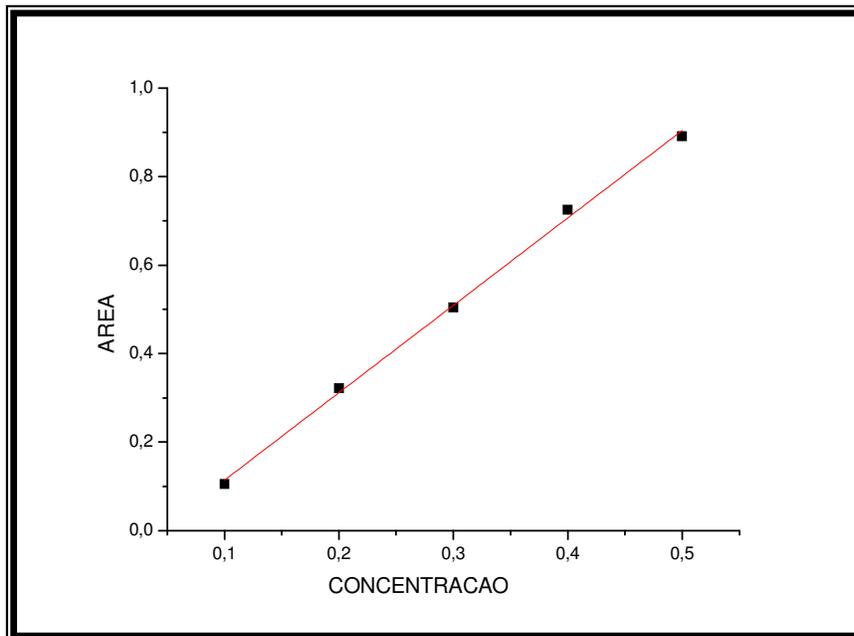


Figura 118: Curva de calibração do 1-feniletan-1-ol

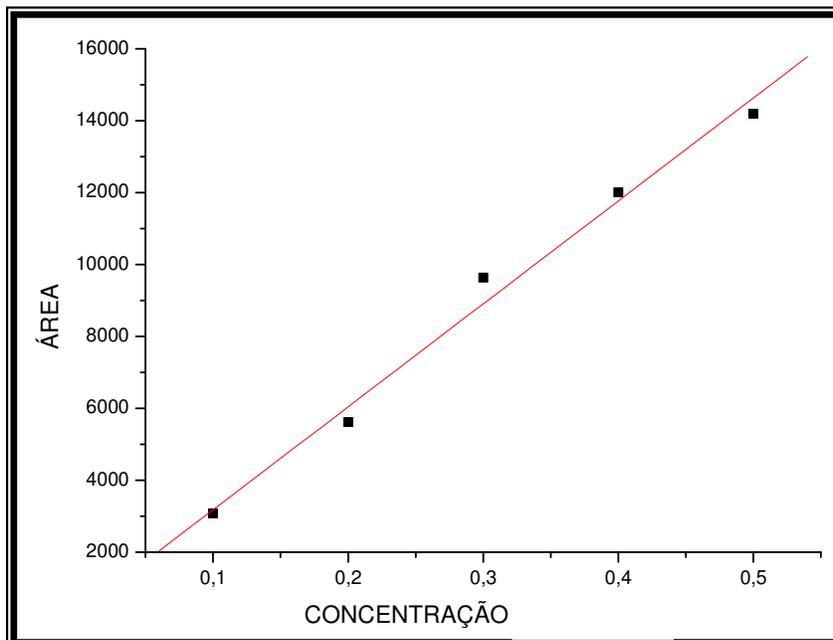


Figura 119: Curva de calibração do 1-(2-metoxifenil)etan-1-ol

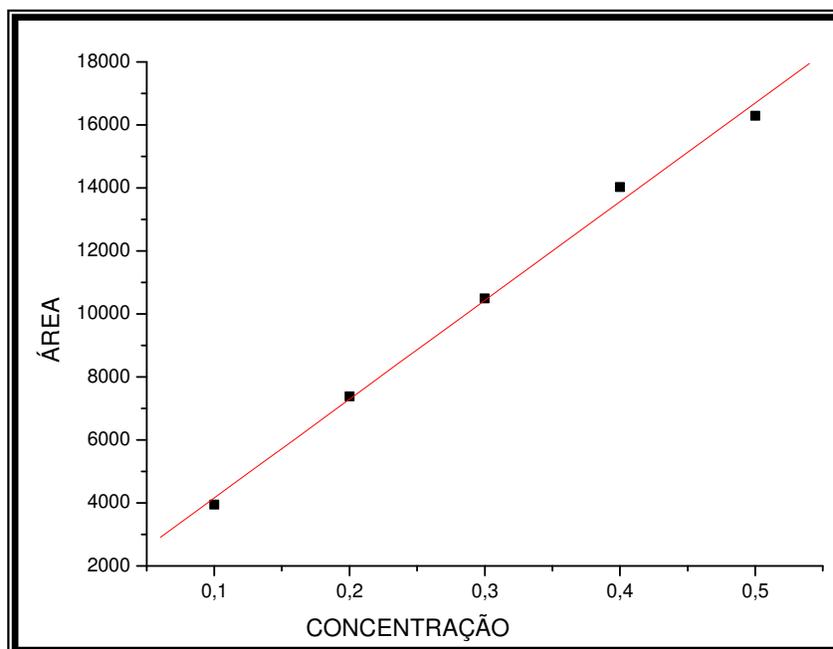


Figura 120: Curva de calibração do 1-(3-metoxifenil)etan-1-ol

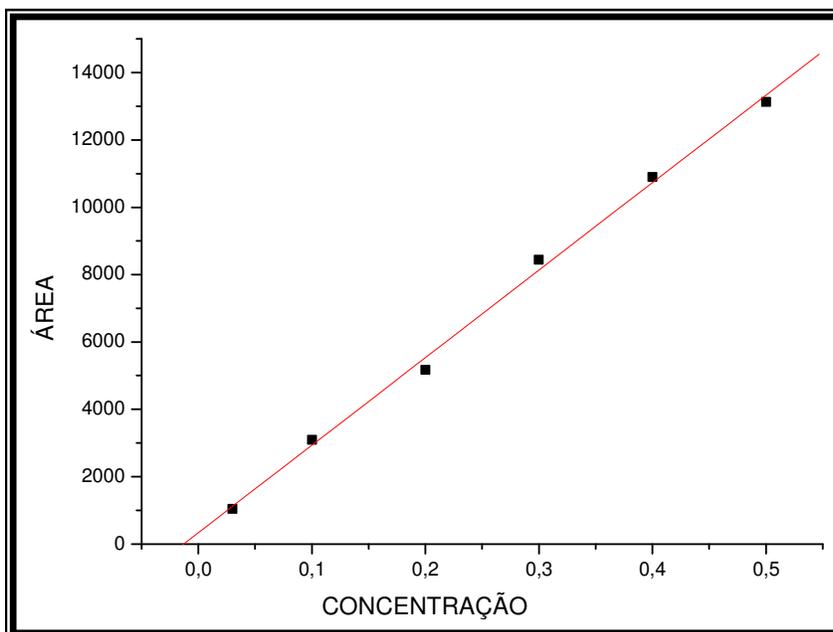


Figura 121: Curva de calibração do 1-(4-metoxifenil)etan-1-ol

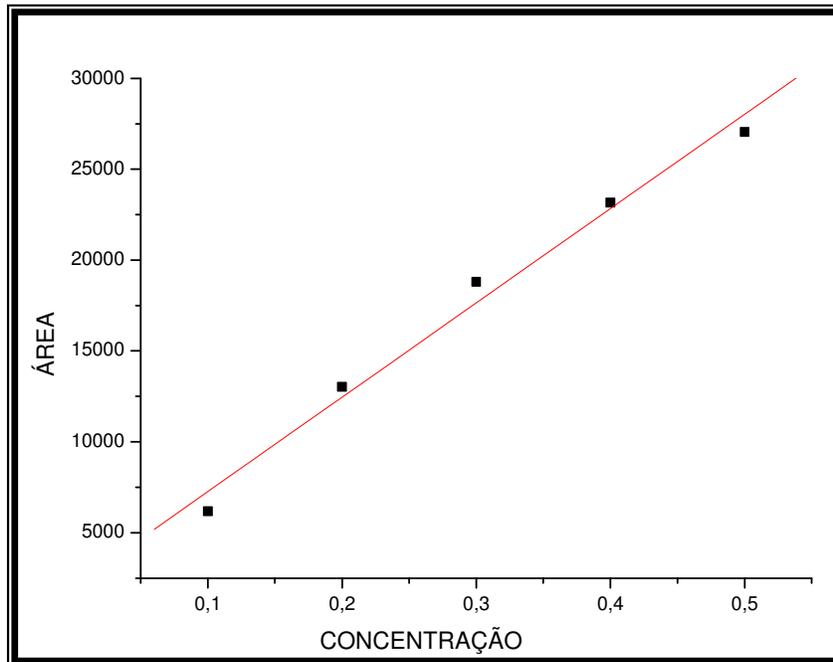


Figura 122: Curva de calibração do 1-(2-nitrofenil)etan-1-ol

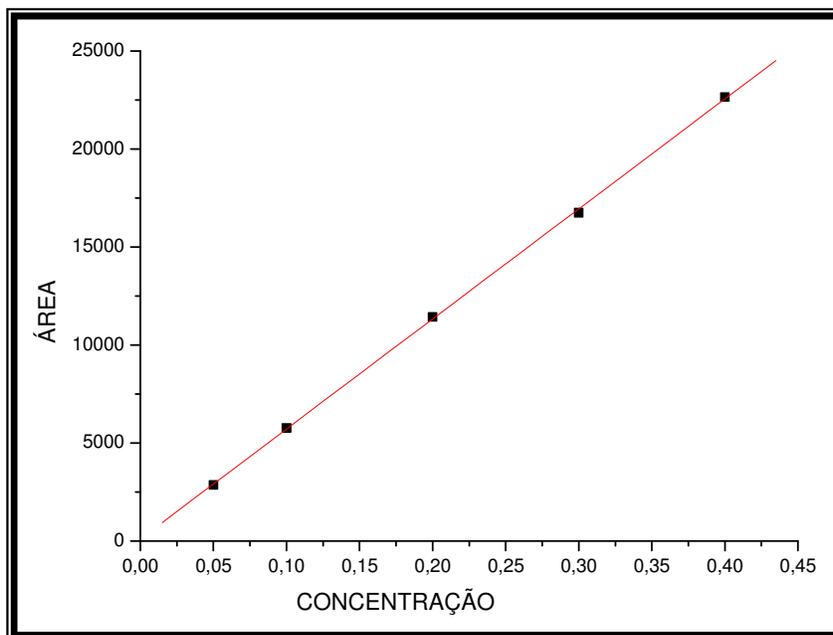


Figura 123: Curva de calibração do 1-(3-nitrofenil)etan-1-ol

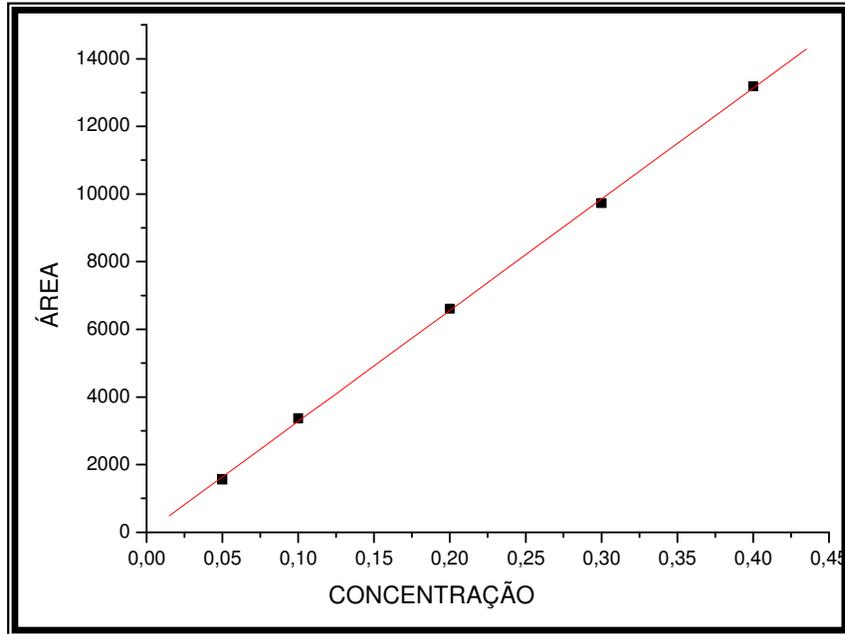


Figura 124: Curva de calibração do 1-(4-nitrofenil)etan-1-ol

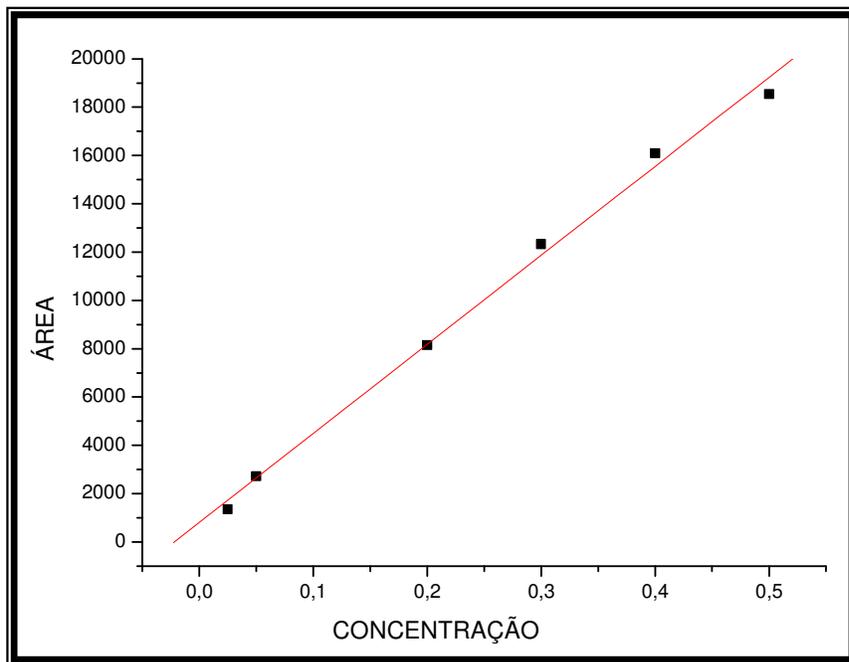


Figura 125: Curva de calibração do 1-(4-metilfenil)etan-1-ol

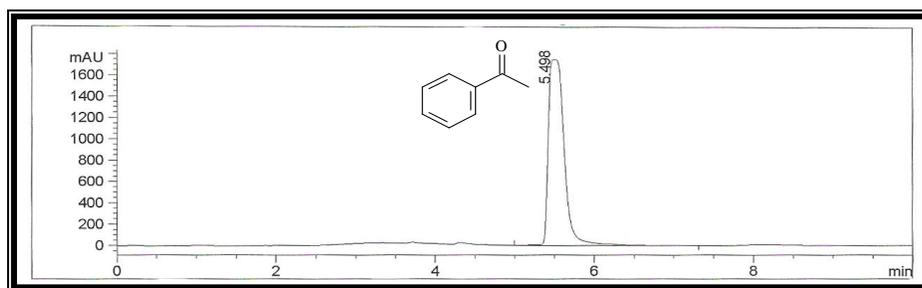


Figura 126: Cromatograma do padrão da acetofenona

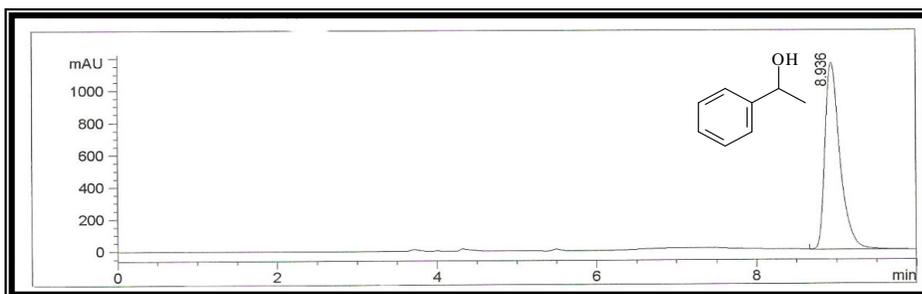


Figura 127: Cromatograma do padrão do 1-feniletan-1-ol

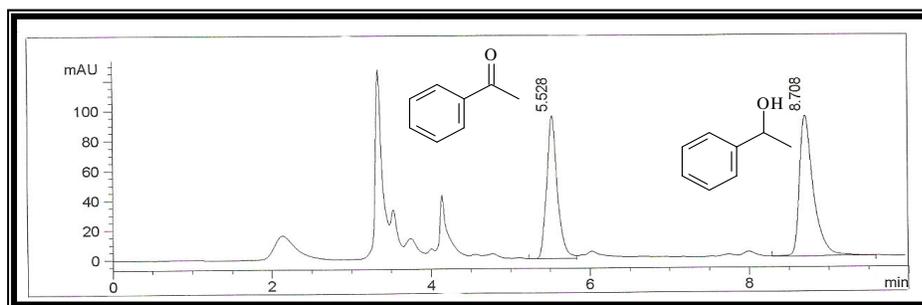


Figura 128: Cromatograma da biorredução da acetofenona após 1 dia

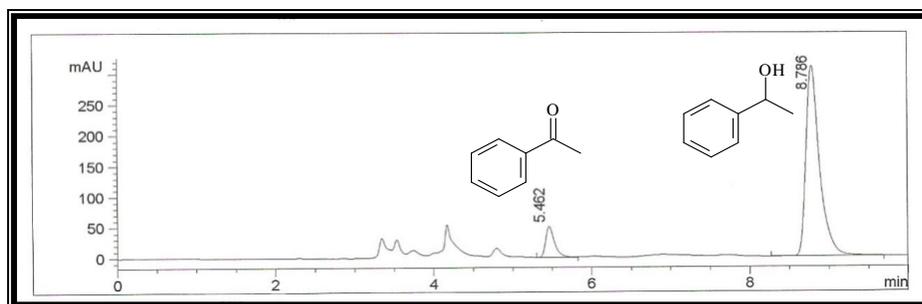


Figura 129: Cromatograma da biorredução da acetofenona após 3 dias

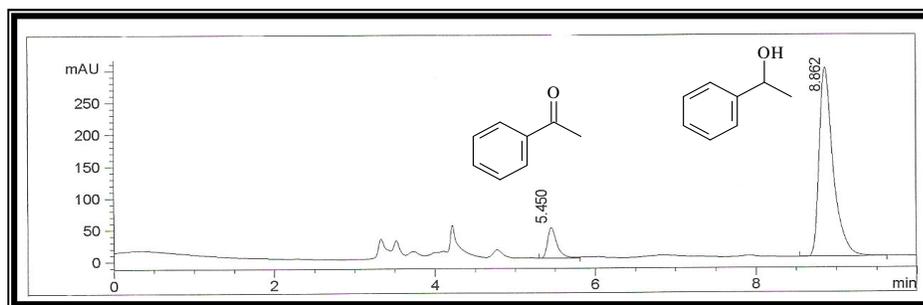


Figura 130: Cromatograma da biorredução da acetofenona após 6 dias

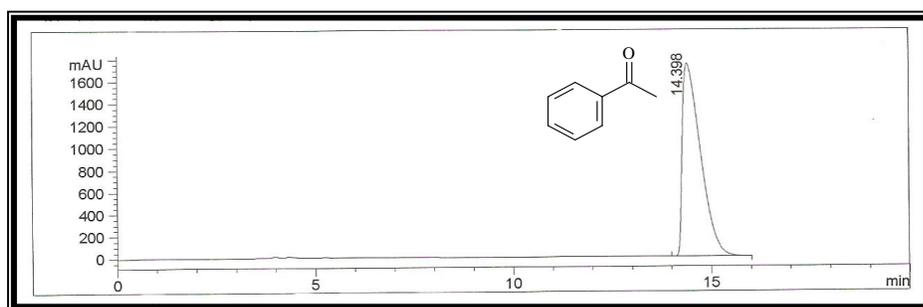


Figura 131: Cromatograma do padrão da acetofenona em coluna quiral.

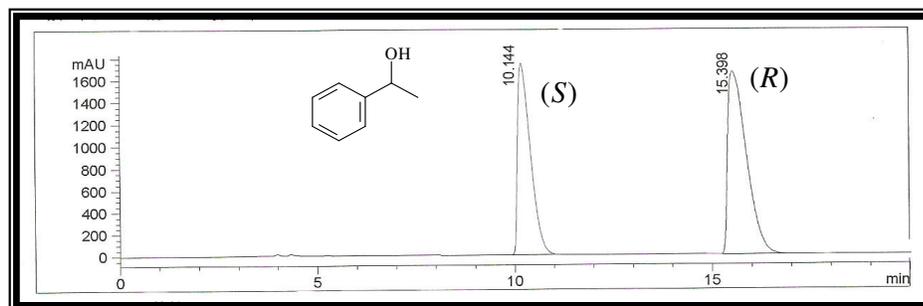


Figura 132: Cromatograma do padrão do 1-feniletan-1-ol em coluna quiral

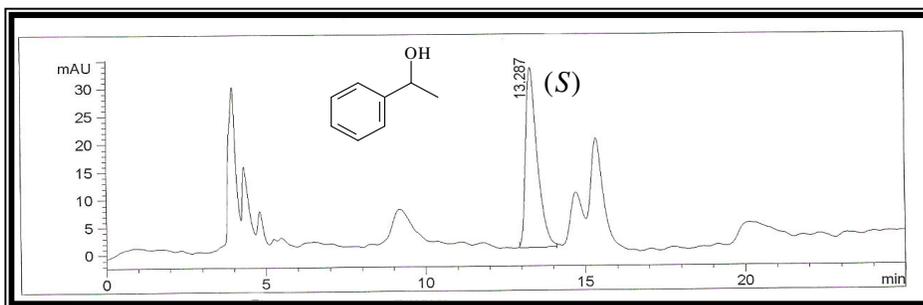


Figura 133: Cromatograma da biorredução da acetofenona após 1 dia em coluna quiral

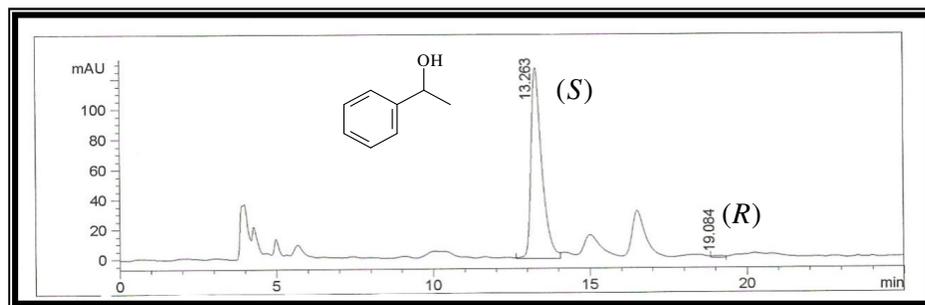


Figura 134: Cromatograma da biorredução da acetofenona após 3 dias em coluna quiral

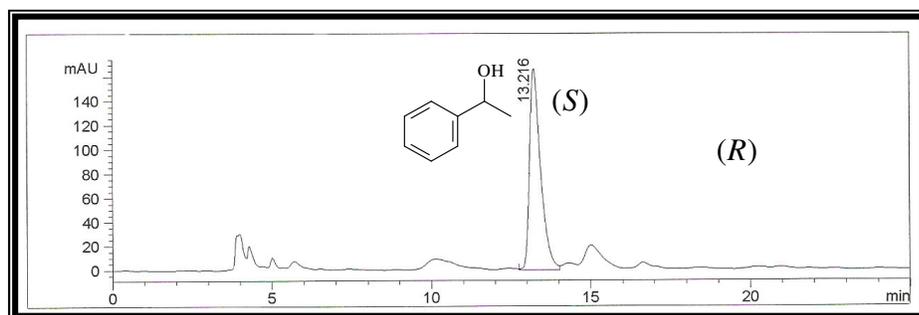


Figura 135: Cromatograma da biorredução da acetofenona após 6 dias em coluna quiral

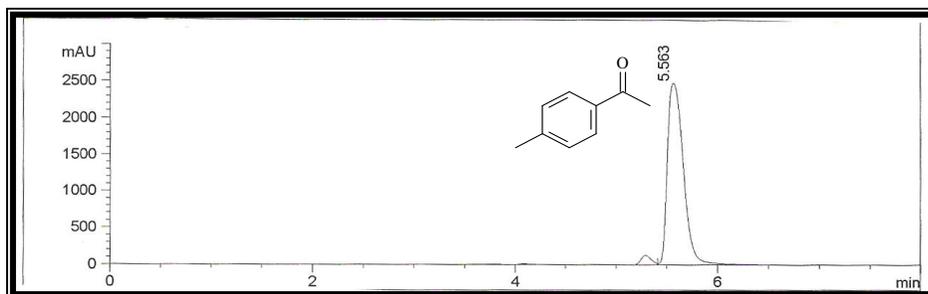


Figura 136: Cromatograma do padrão da 4'-metilacetofenona

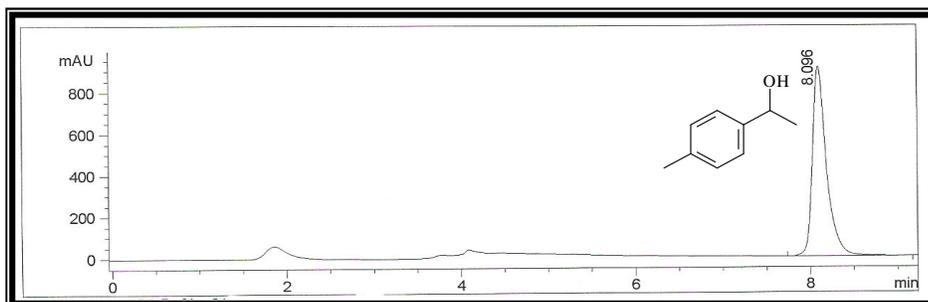


Figura 137: Cromatograma do padrão do 1-(4-metilfenil)etan-1-ol

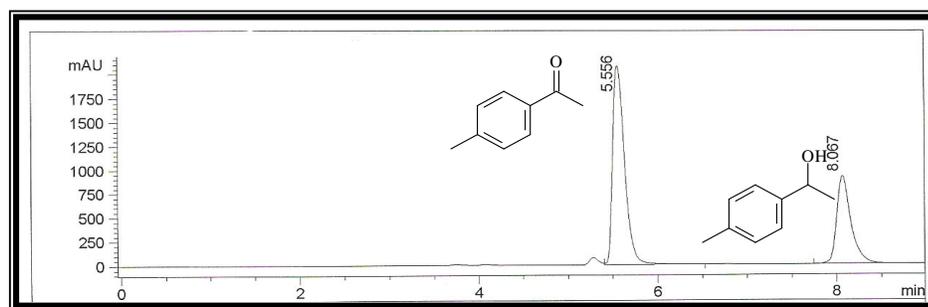


Figura 138: Cromatograma da mistura de padrões do 1-(4-metilfenil)etan-1-ol e acetofenona

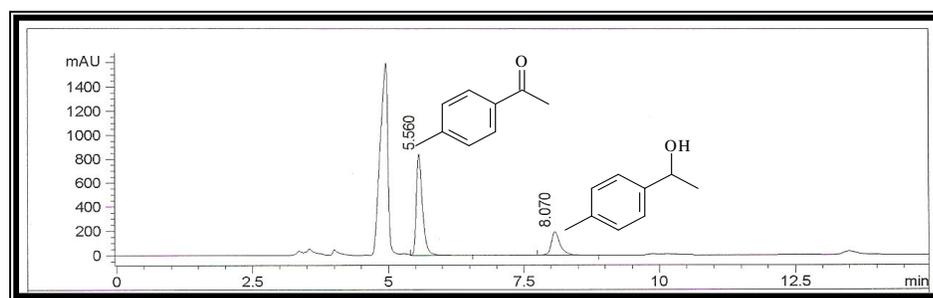


Figura 139: Cromatograma da biorredução da 4'-metilacetofenona após 1 dia

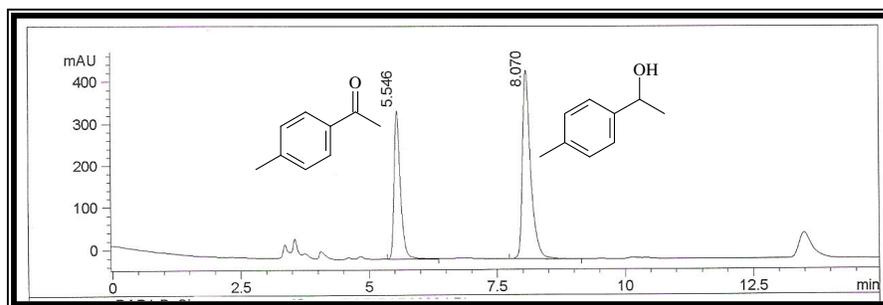


Figura 140: Cromatograma da biorredução da 4'-metilacetofenona após 3 dias

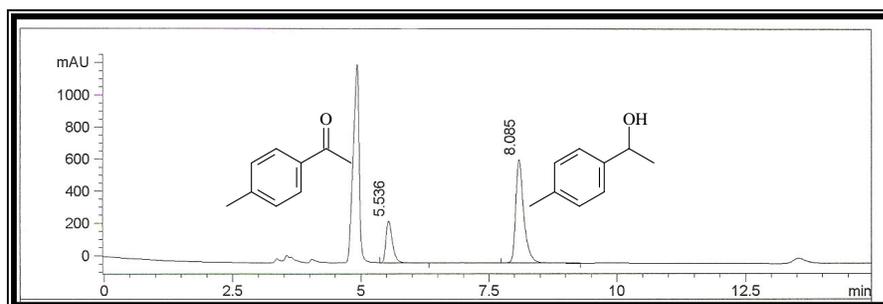


Figura 141: Cromatograma da biorredução da 4'-metilacetofenona após 6 dias

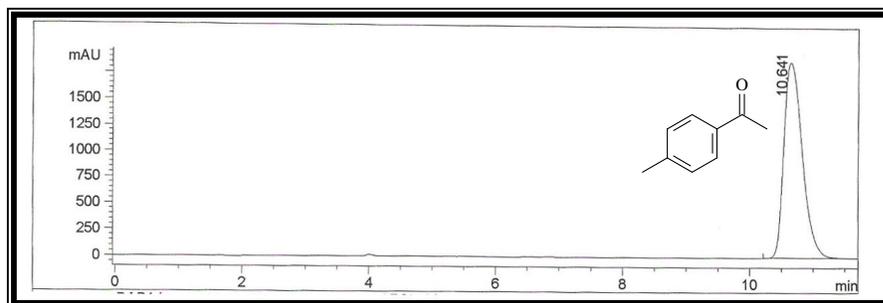


Figura 142: Cromatograma do padrão da 4'-metilacetofenona em coluna quiral

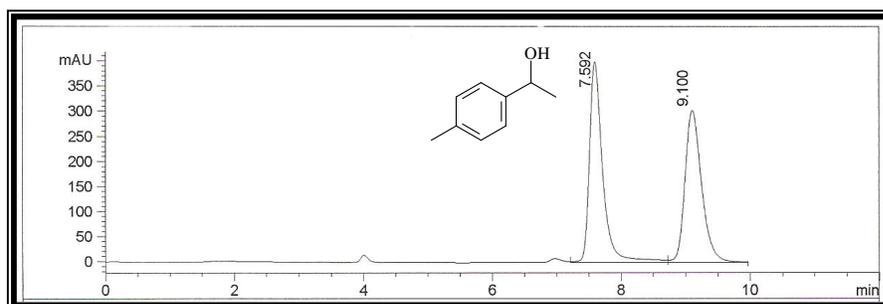


Figura 143: Cromatograma do padrão da 1-(4-metilfenil)etan-1-ol em coluna quiral

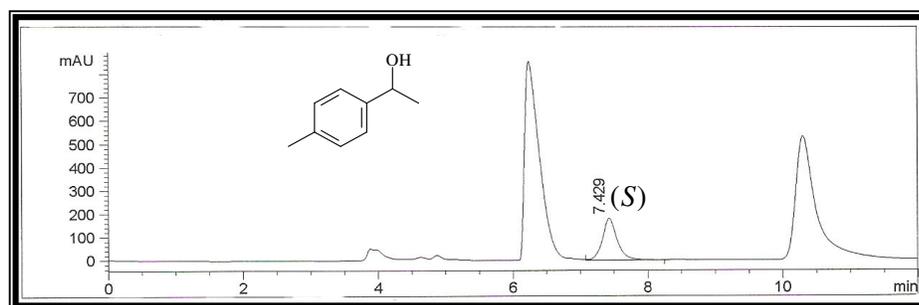


Figura 144: Cromatograma da biorredução da 4'-metilacetofenona após 1 dia em coluna quiral

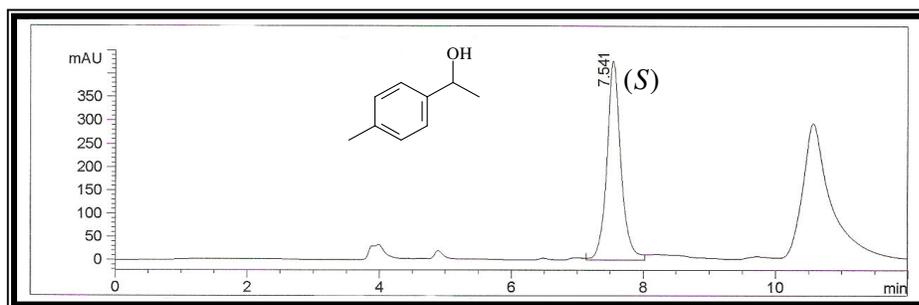


Figura 145: Cromatograma da biorredução da 4'-metilacetofenona após 3 dias em coluna quiral

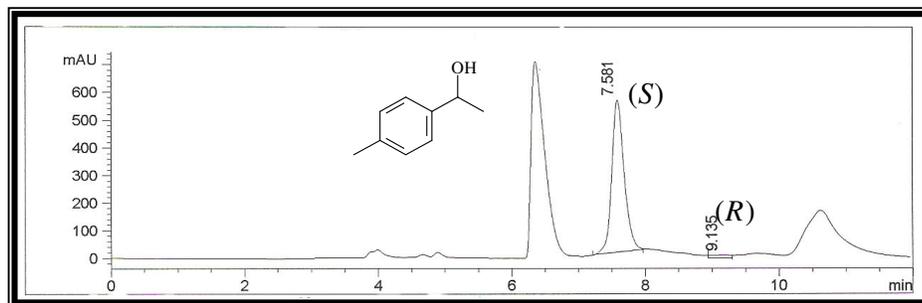


Figura 146: Cromatograma da biorredução da 4'-metilacetofenona após 6 dias em coluna quiral

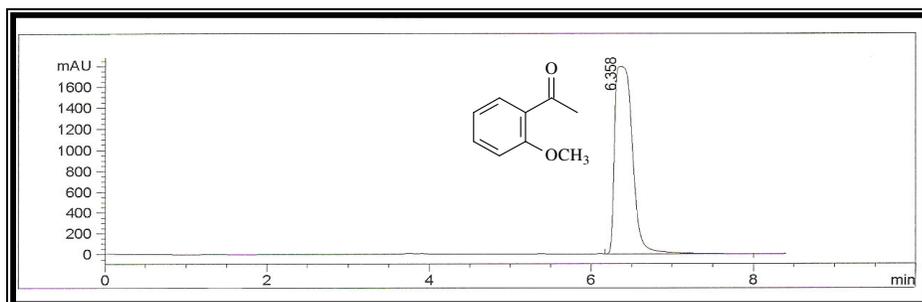


Figura 147: Cromatograma do padrão da 2'-metoxiacetofenona

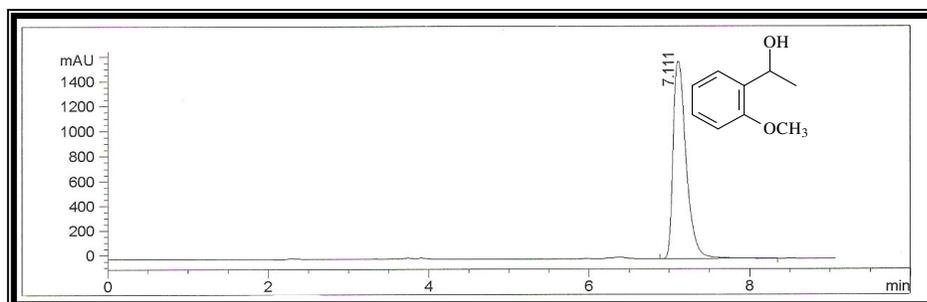


Figura 148: Cromatograma do padrão do 1-(2-Metoxifenil)etan-1-ol

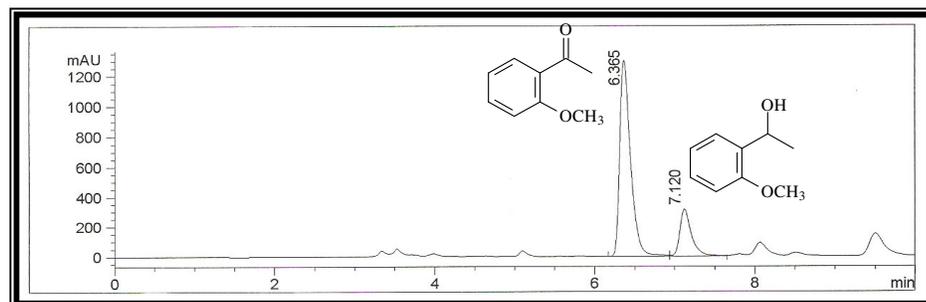


Figura 149: Cromatograma da biorredução da 2'-metoxiacetofenona após 1 dia.

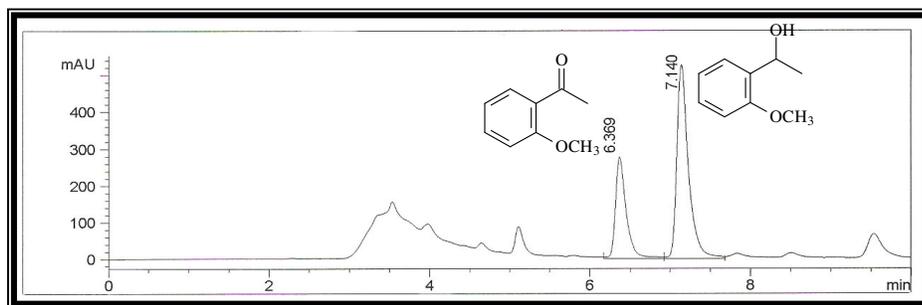


Figura 150: Cromatograma da biorredução da 2'-metoxiacetofenona após 3 dias

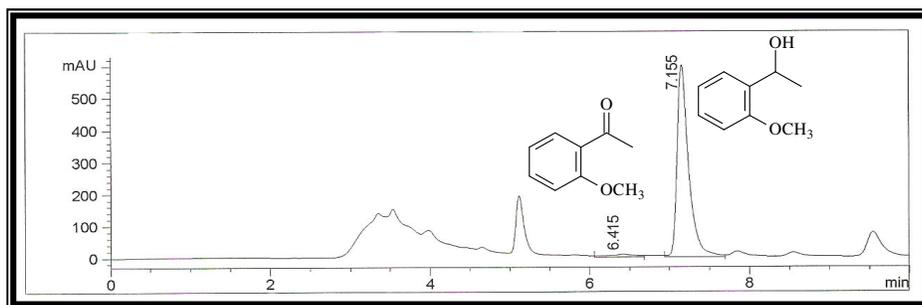


Figura 151: Cromatograma da biorredução da 2'-metoxiacetofenona após 6 dias

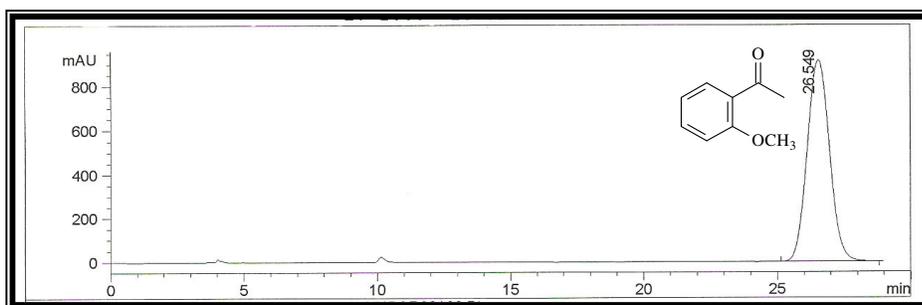


Figura 152: Cromatograma do padrão da 2'-metoxiacetofenona em coluna quiral

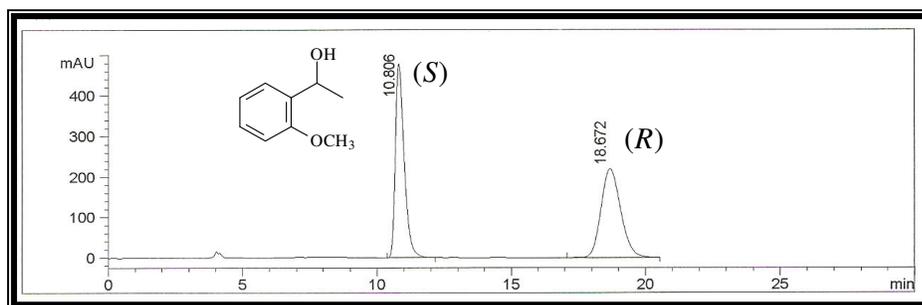


Figura 153: Cromatograma do padrão do 1-(2-Metoxifenil)etan-1-ol em coluna quiral

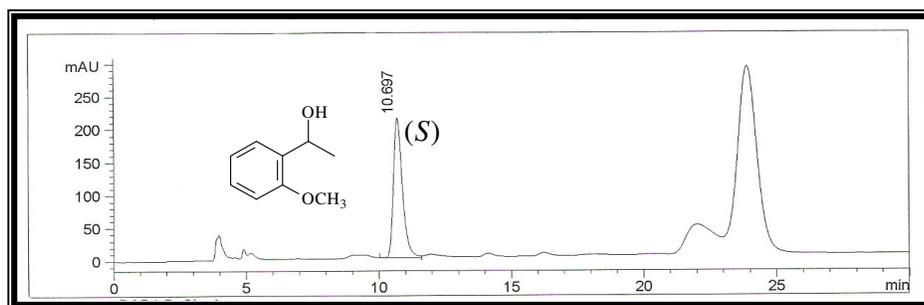


Figura 154: Cromatograma da biorredução da 2'-metoxiacetofenona após 1 dia em coluna quiral

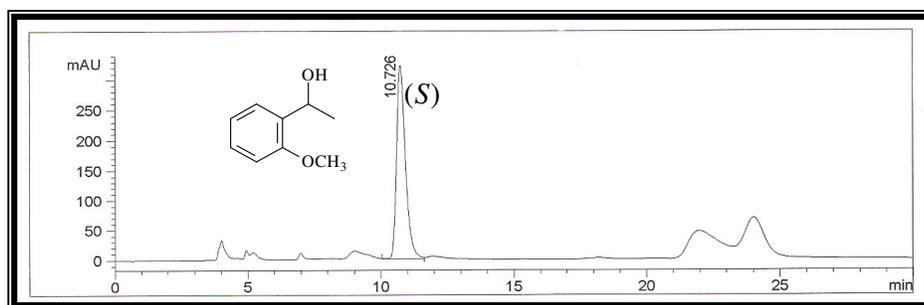


Figura 155: Cromatograma da biorredução da 2'-metoxiacetofenona após 3 dias em coluna quiral

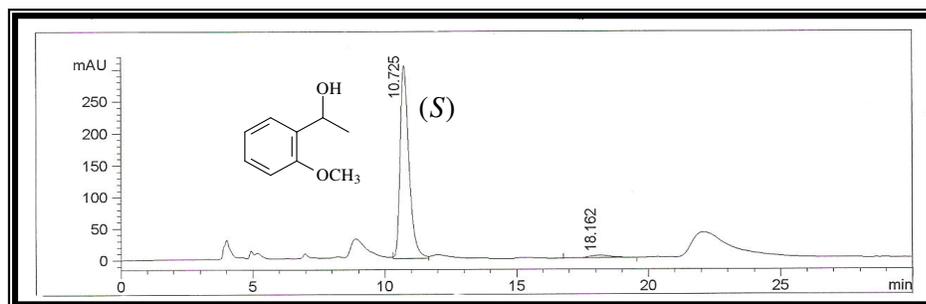


Figura 156: Cromatograma da biorredução da 2'-metoxiacetofenona após 6 dias em coluna quiral

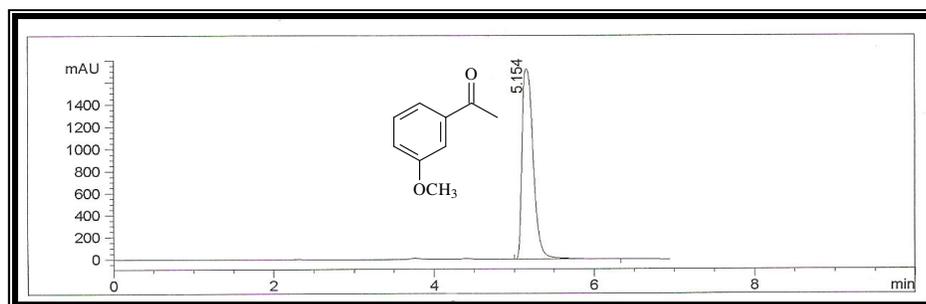


Figura 157: Cromatograma do padrão da 3'-metoxiacetofenona

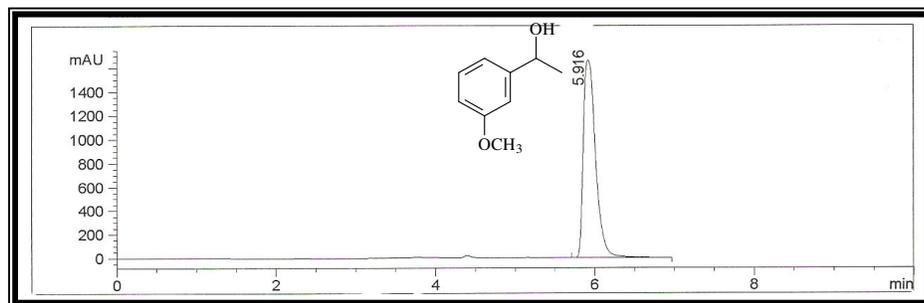


Figura 158: Cromatograma do padrão do 1-(3-Metoxifenil)etan-1-ol

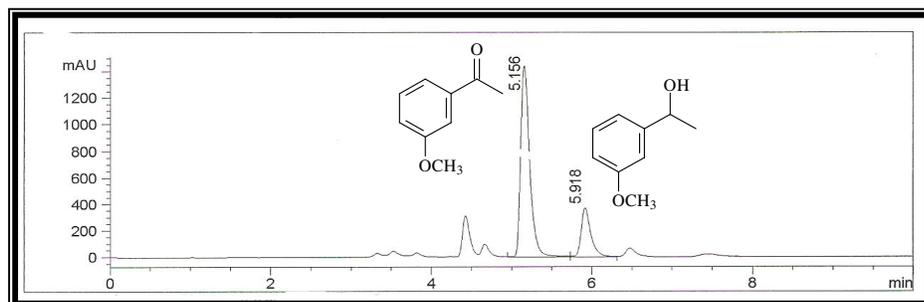


Figura 159: Cromatograma da biorredução da 3'-metoxiacetofenona após 1 dia

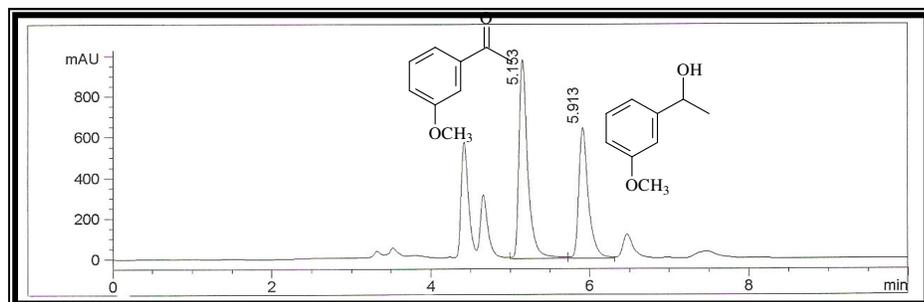


Figura 160: Cromatograma da biorredução da 3'-metoxiacetofenona após 3 dias

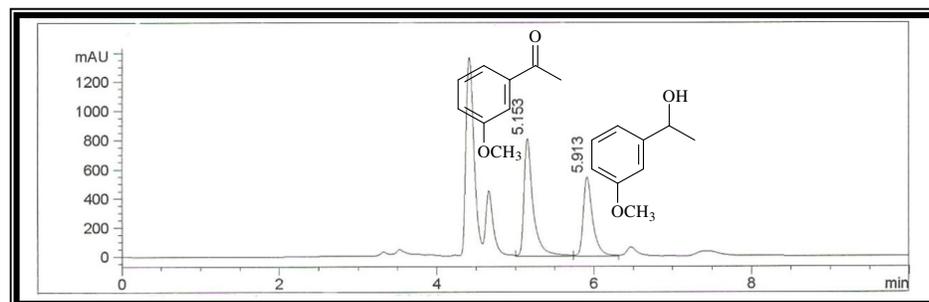


Figura 161: Cromatograma da biorredução da 3'-metoxiacetofenona após 6 dias

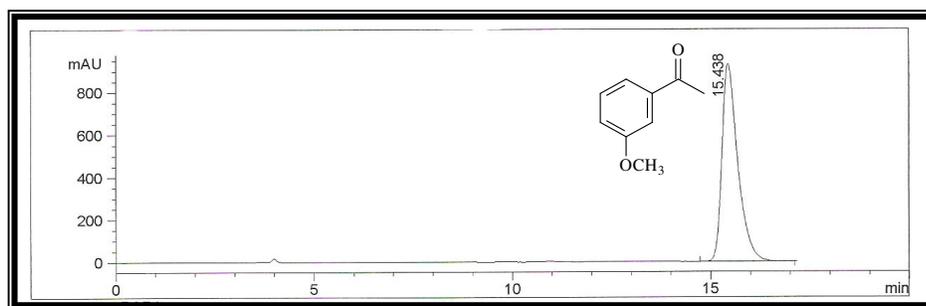


Figura 162: Cromatograma do padrão da 3'-metoxiacetofenona em coluna quiral

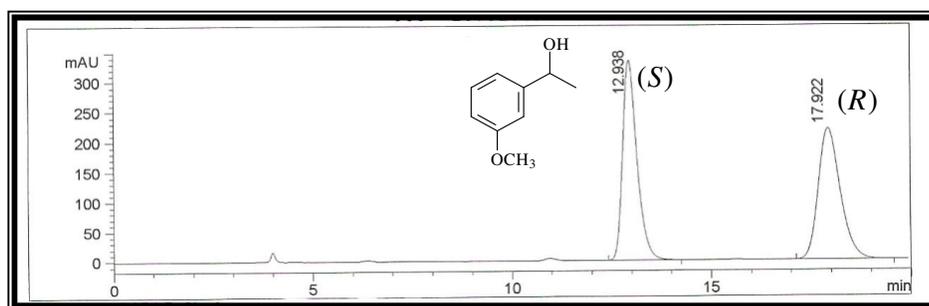


Figura 163: Cromatograma do padrão do 1-(3-Metoxifenil)etan-1-ol em coluna quiral

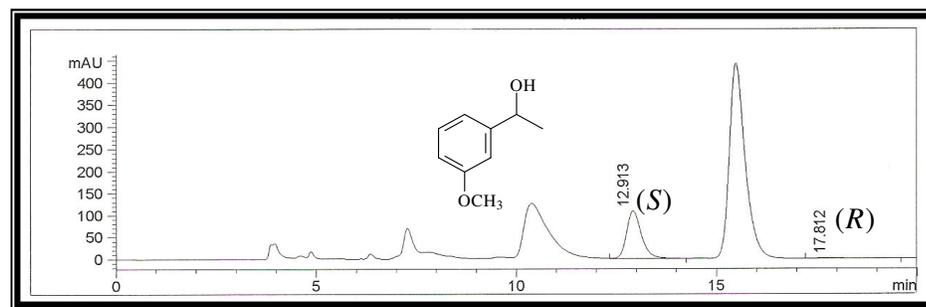


Figura 164: Cromatograma da biorredução da 3'-metoxiacetofenona após 1 dia em coluna quiral

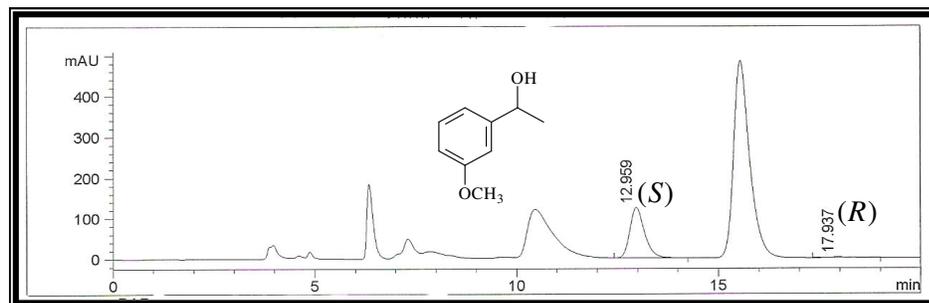


Figura 165: Cromatograma da biorredução da 3'-metoxiacetofenona após 3 dia em coluna quiral

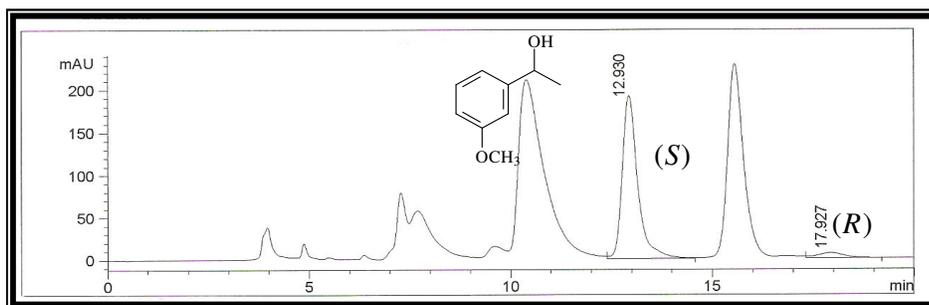


Figura 166: Cromatograma da biorredução da 3'-metoxiacetofenona após 6 dias em coluna quiral

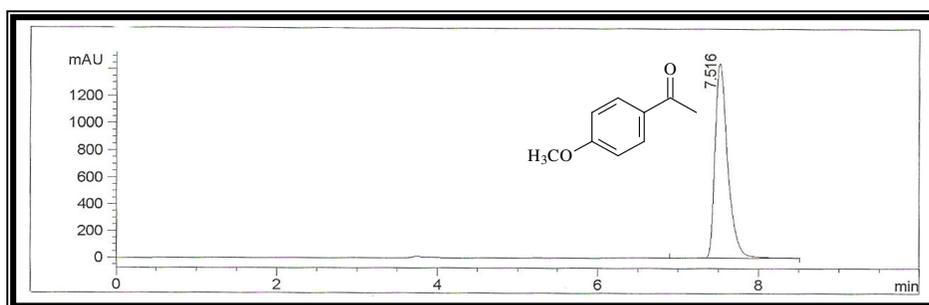


Figura 167: Cromatograma do padrão da 4'-metoxiacetofenona

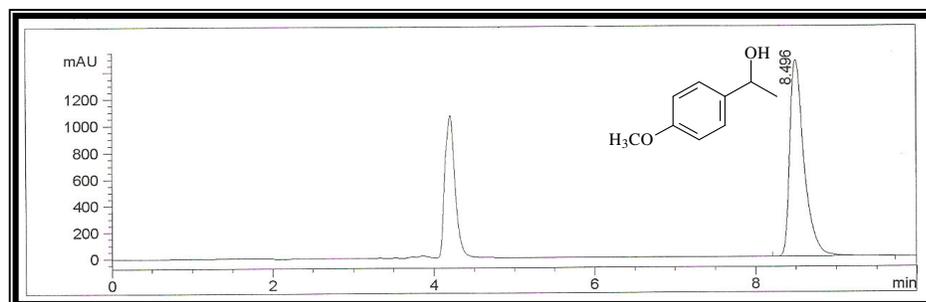


Figura 168: Cromatograma do padrão do 1-(4-Metoxifenil)etan-1-ol

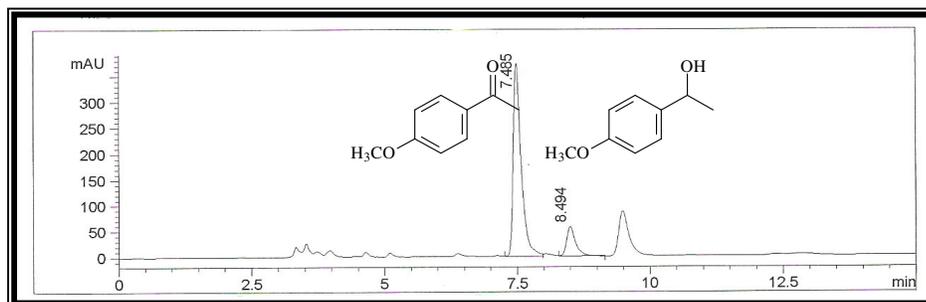


Figura 169: Cromatograma da biorredução da 4'-metoxiacetofenona após 1 dia

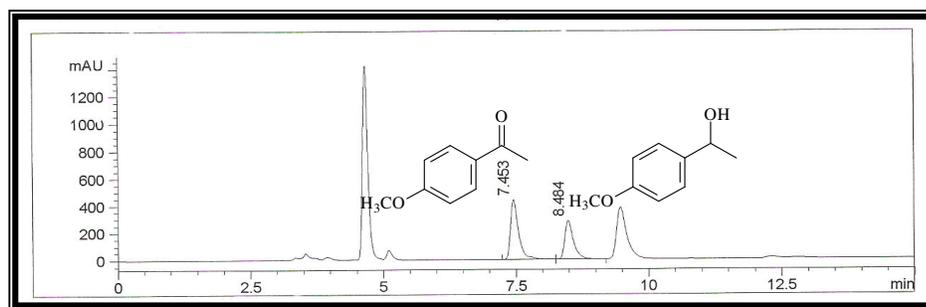


Figura 170: Cromatograma da biorredução da 4'-metoxiacetofenona após 3 dias

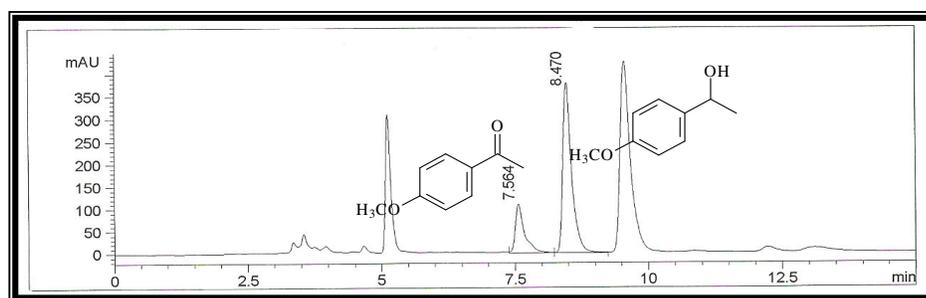


Figura 171: Cromatograma da biorredução da 4'-metoxiacetofenona após 6 dias

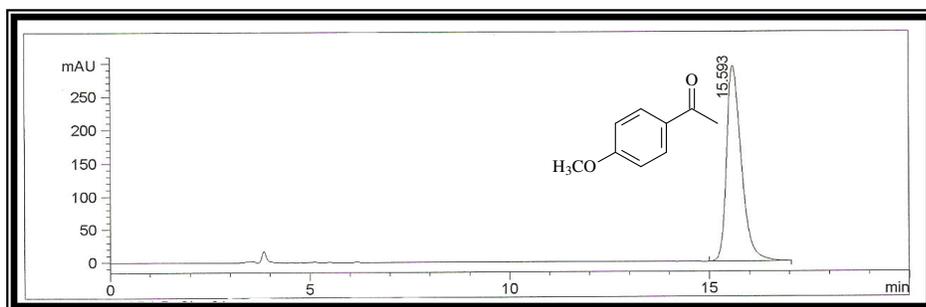


Figura 172: Cromatograma do padrão da 4'-Metoxifenilacetofenona em coluna quiral

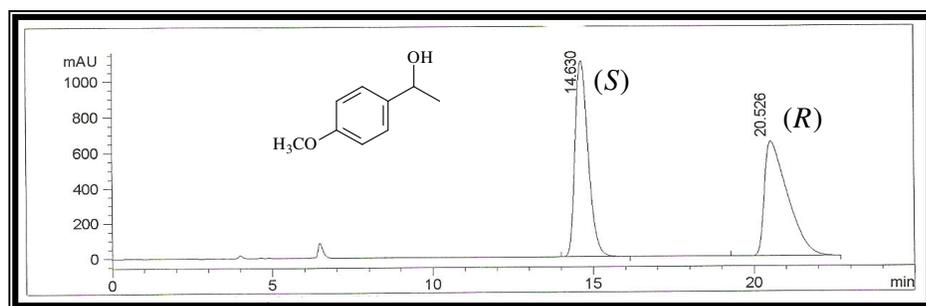


Figura 173: Cromatograma do padrão do 1-(4-Metoxifenil)etan-1-ol em coluna quiral

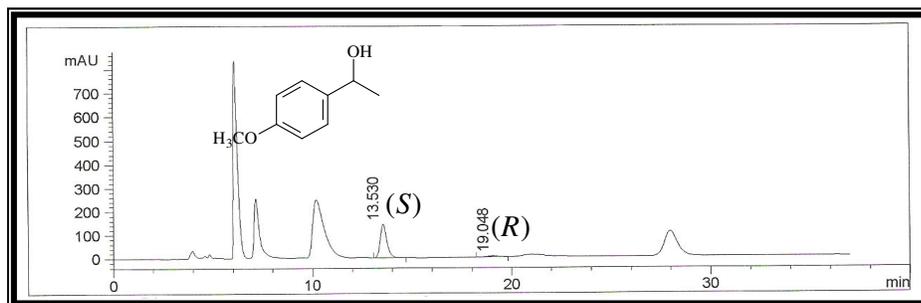


Figura 174: Cromatograma da biorredução da 4'-metoxiacetofenona após 3 dias em coluna quiral

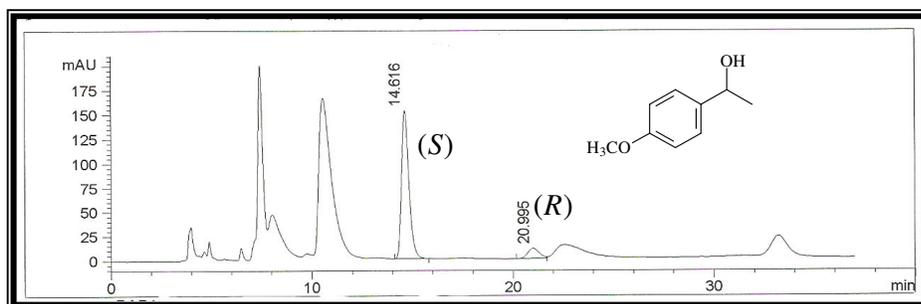


Figura 175: Cromatograma da biorredução da 4'-metoxiacetofenona após 6 dias em coluna quiral

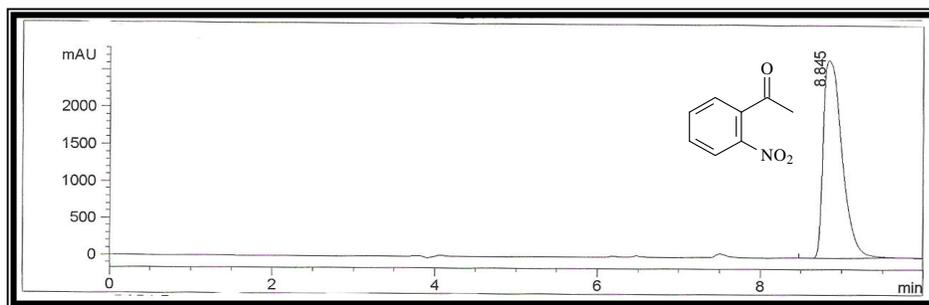


Figura 176: Cromatograma do padrão da 2'-nitroacetofenona

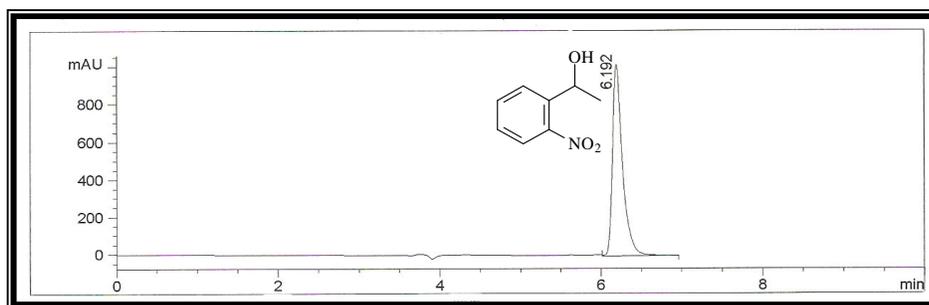


Figura 177: Cromatograma do padrão do 1-(2-Nitrofenil)etan-1-ol

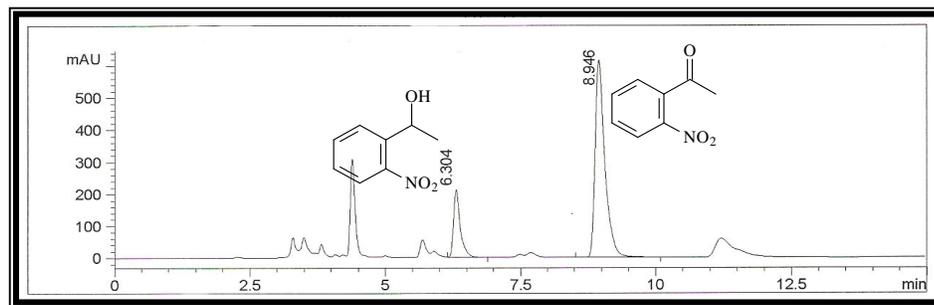


Figura 178: Cromatograma da biorredução da 2'-nitroacetofenona após 1 dia

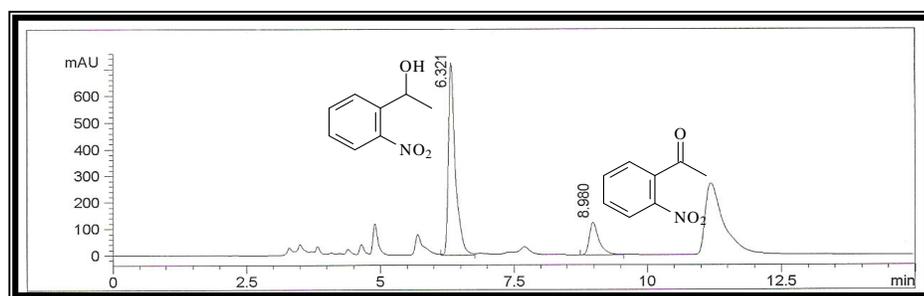


Figura 179: Cromatograma da biorredução da 2'-nitroacetofenona após 3 dias

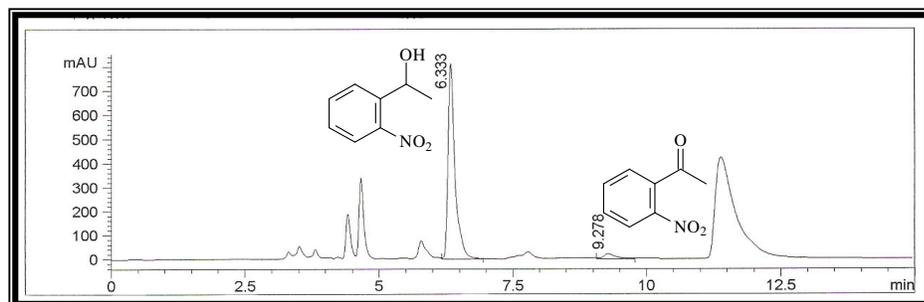


Figura 180: Cromatograma da biorredução da 2'-nitroacetofenona após 6 dias

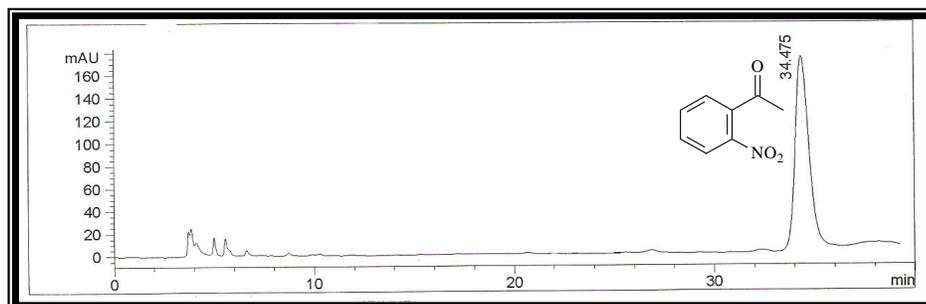


Figura 181: Cromatograma do padrão de 2'-nitroacetofenona em coluna quiral

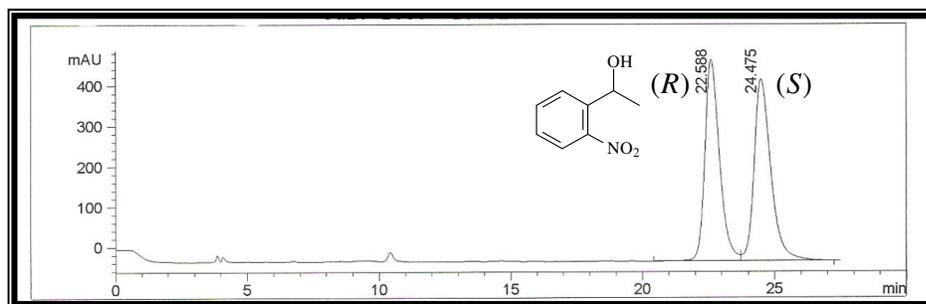


Figura 182: Cromatograma do padrão do 1-(2-Nitrofenil)etan-1-ol em coluna quiral

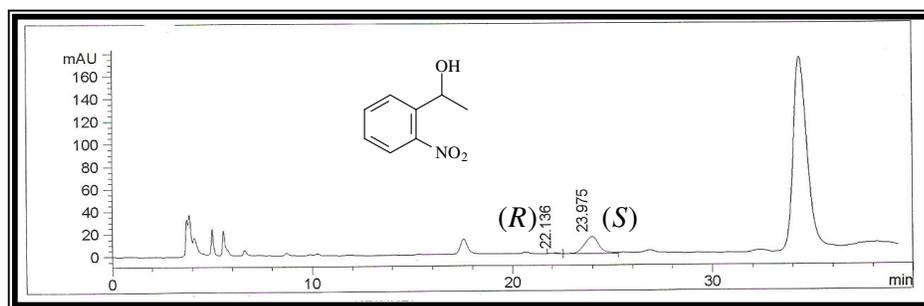


Figura 183: Cromatograma da biorredução da 2'-nitroacetofenona após 1 dia em coluna quiral

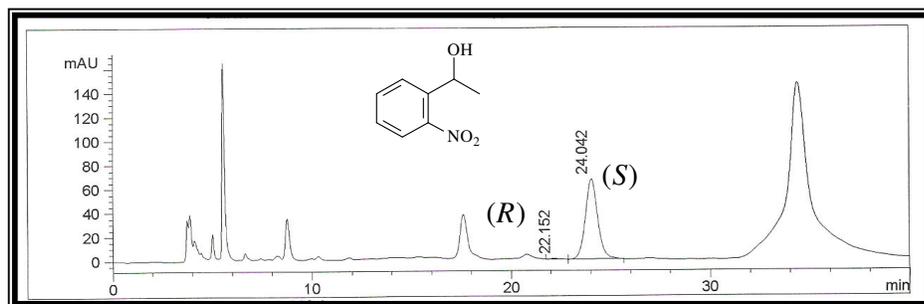


Figura 184: Cromatograma da biorredução da 2'-nitroacetofenona após 3 dias em coluna quiral

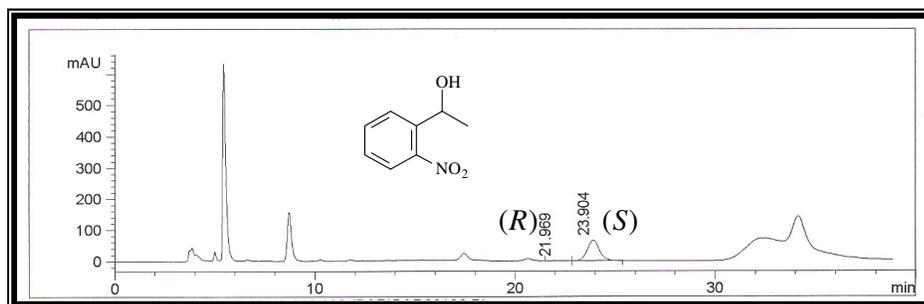


Figura 185: Cromatograma da biorredução da 2'-nitroacetofenona após 6 dias em coluna quiral

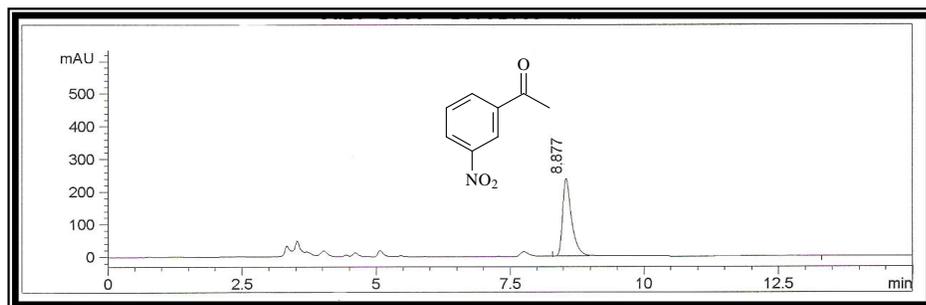


Figura 186: Cromatograma do padrão do 3'-nitroacetofenona

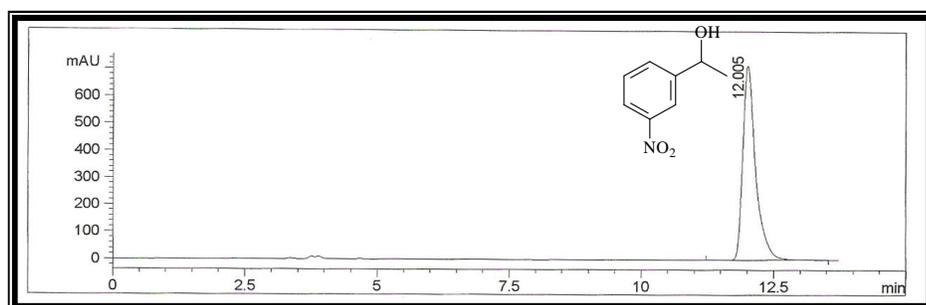


Figura 187: Cromatograma do padrão do 1-(3-Nitrofenil)etan-1-ol

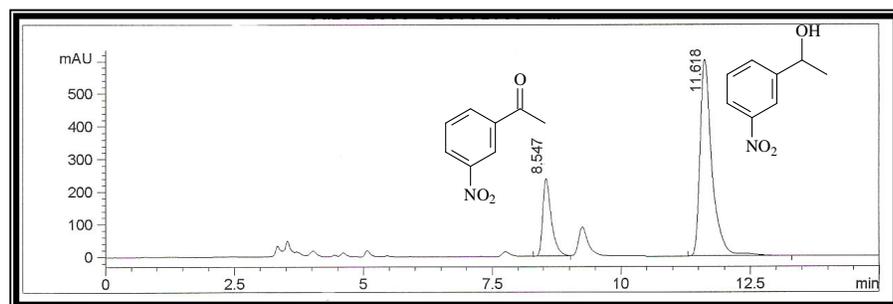


Figura 188: Cromatograma da biorredução da 3'-nitroacetofenona após 1 dia

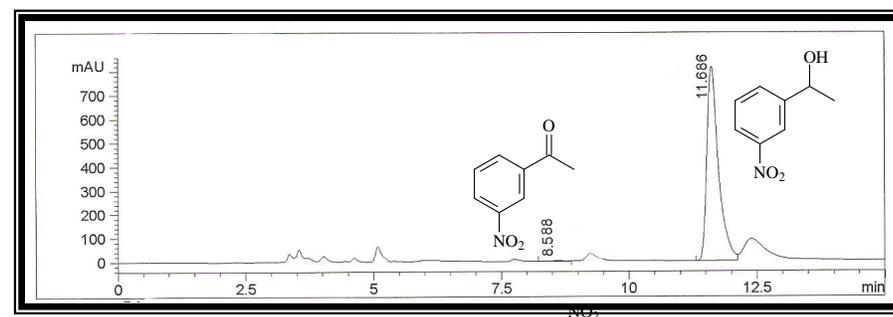


Figura 189: Cromatograma da biorredução da 3'-nitroacetofenona após 3 dias

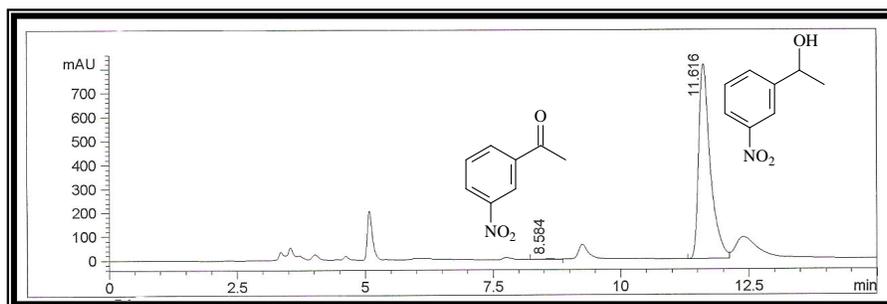


Figura 190: Cromatograma da biorredução da 3'-nitroacetofenona após 6 dias

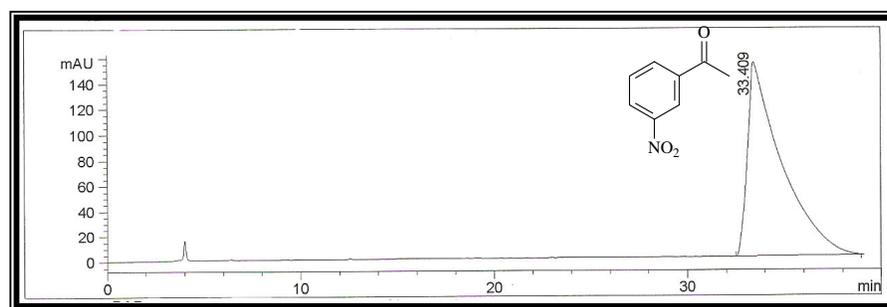


Figura 191: Cromatograma do padrão da 3'-nitroacetofenona em coluna quiral após 1 dia

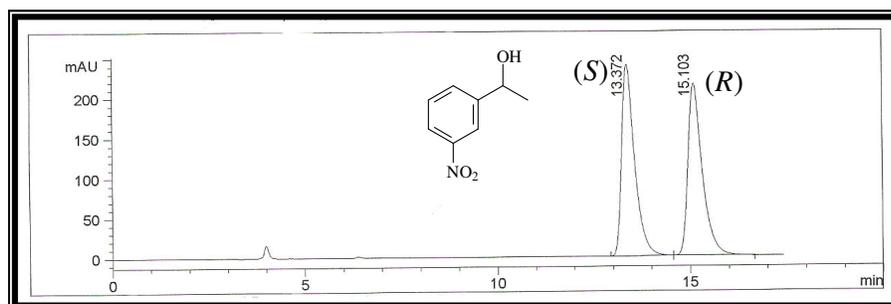


Figura 192: Cromatograma do padrão do 1-(3-Nitrofenil)etan-1-ol em coluna quiral

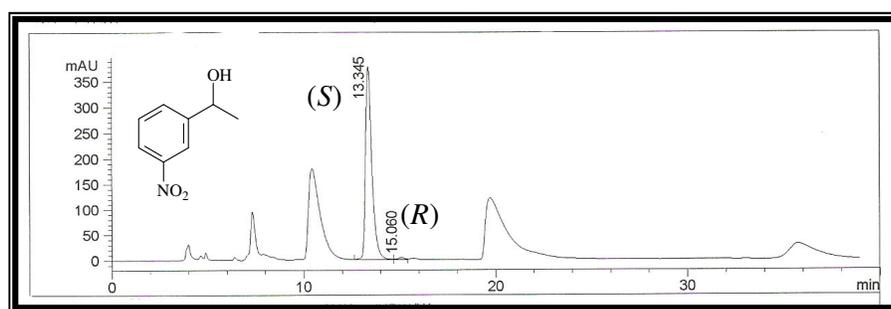


Figura 193: Cromatograma da biorredução da 3'-nitroacetofenona após 1 dia em coluna quiral

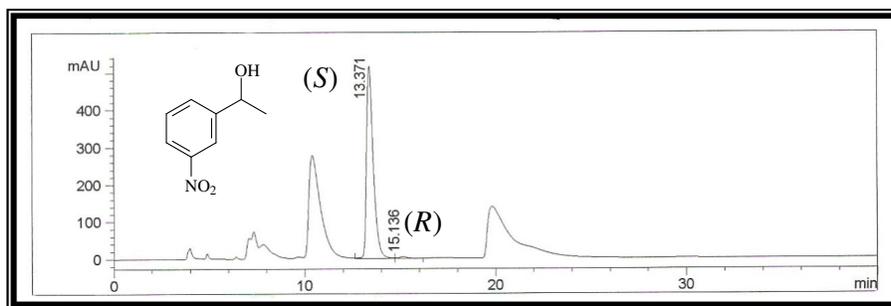


Figura 194: Cromatograma da biorredução da 3'-nitroacetofenona após 3 dias em coluna quiral

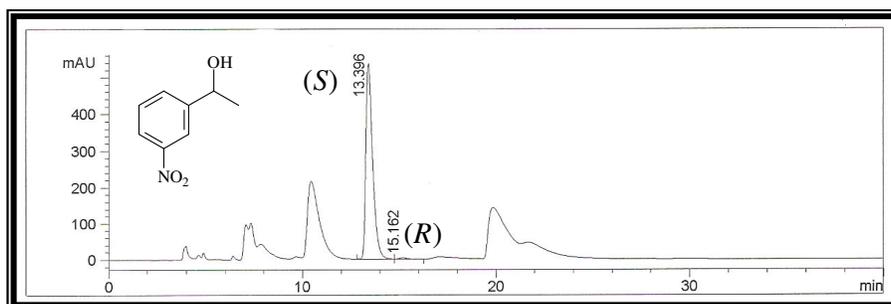


Figura 195: Cromatograma da biorredução da 3'-nitroacetofenona após 6 dias em coluna quiral

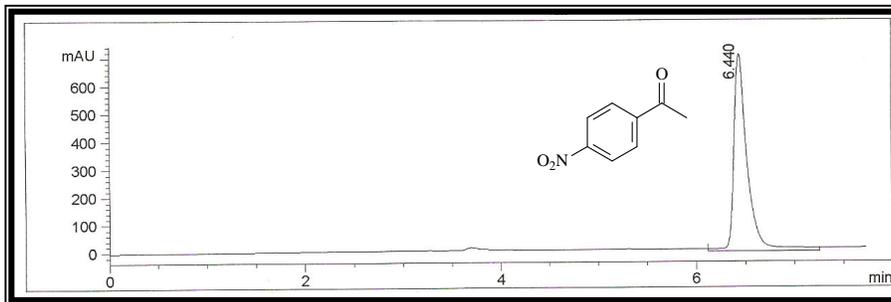


Figura 196: Cromatograma do padrão da 4'-nitroacetofenona

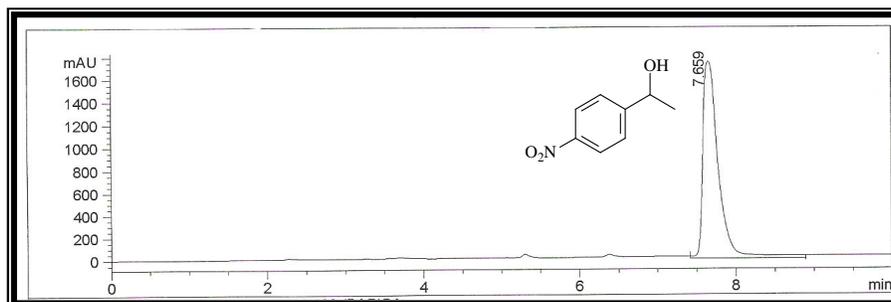


Figura 197: Cromatograma do padrão do 1-(4-Nitrofenil)etan-1-ol

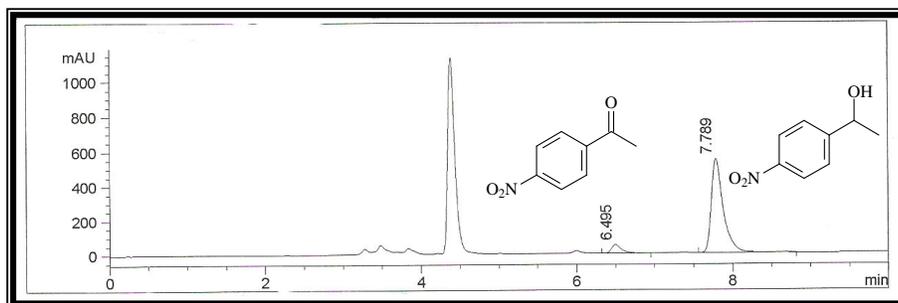


Figura 198: Cromatograma da biorredução da 4'-nitroacetofenona após 1 dia

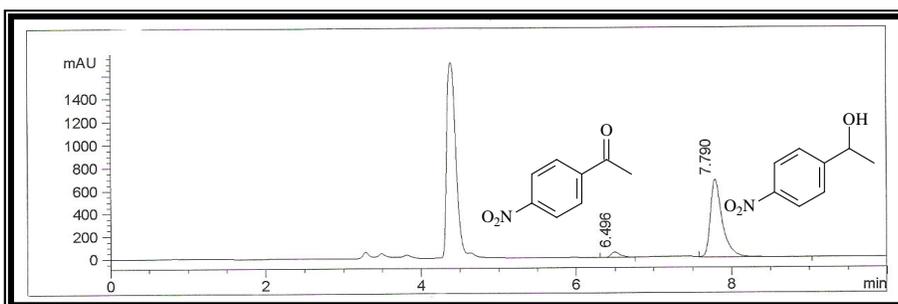


Figura 199: Cromatograma da biorredução da 4'-nitroacetofenona após 3 dias

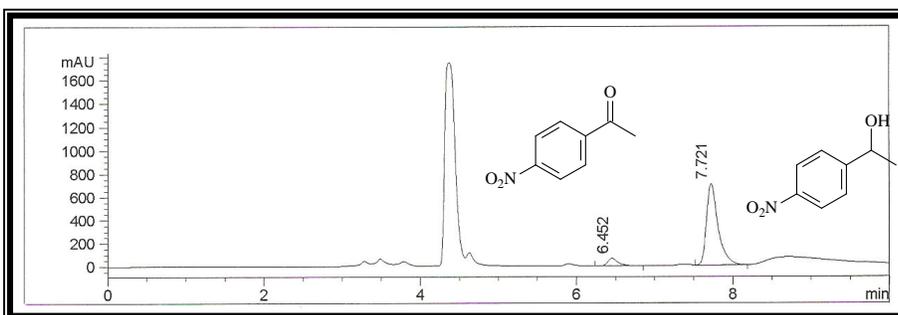


Figura 200: Cromatograma da biorredução da 4'-nitroacetofenona após 6 dias

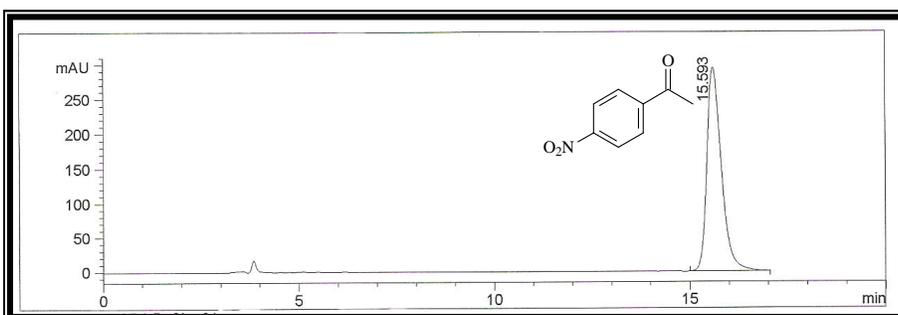


Figura 201: Cromatograma do padrão da 4'-nitroacetofenona em coluna quiral

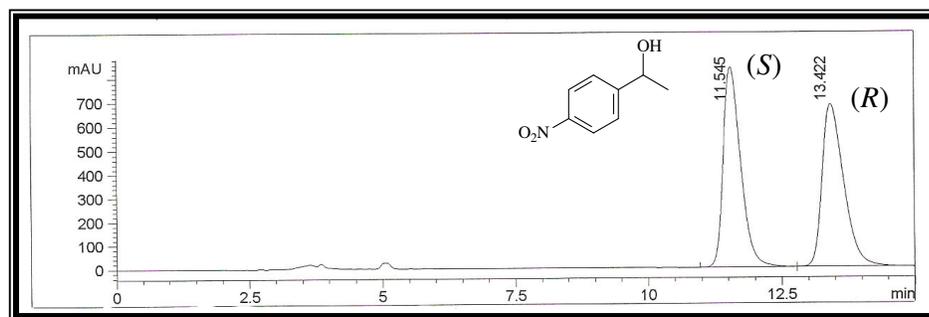


Figura 202: Cromatograma do padrão do 1-(4-Nitrofenil)etan-1-ol em coluna quiral

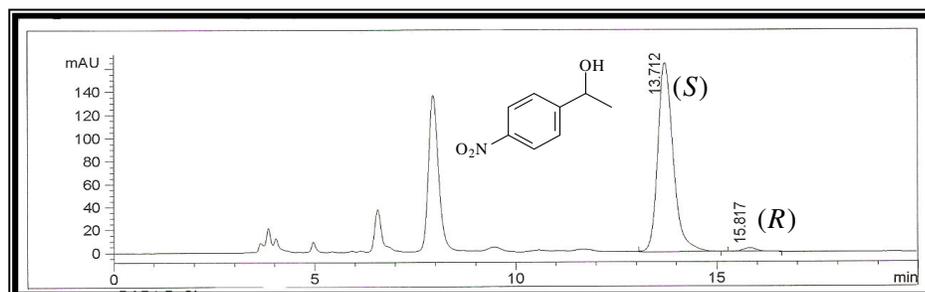


Figura 203: Cromatograma da biorredução da 4'-nitroacetofenona após 1 dia em coluna quiral

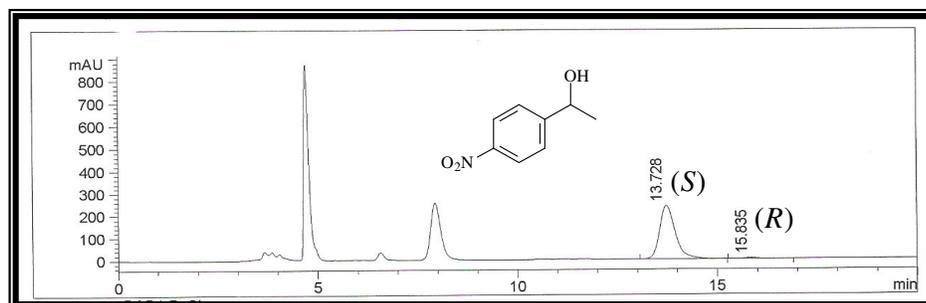


Figura 204: Cromatograma da biorredução da 4'-nitroacetofenona após 3 dia em coluna quiral

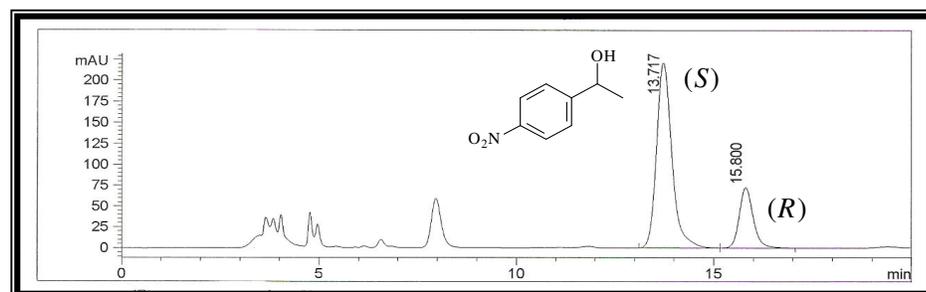


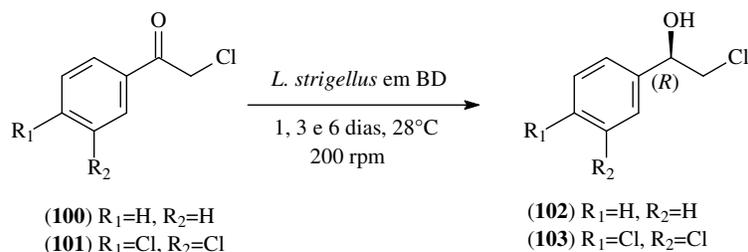
Figura 205: Cromatograma da biorredução da 4'-nitroacetofenona após 6 dia em coluna quiral

Foram também investigadas as reações de biorredução das cetonas α -cloradas **100** e **101**, empregando-se o fungo *L. strigellus* como biocatalisador (Tab. 23, p. 158). Os valores de conversão das cetonas em álcool foram determinados através de curvas de calibração previamente construídas (Figs. 206-207, p. 159) e os tempos de retenção das cetonas e dos alcoóis foram determinados por CLAE.

Nos cromatogramas dessas duas cetonas (Figs. 208-225, p. 160-164), foram observados elevados valores de conversão, mas com redução nos valores de *ee*, quando comparados com as cetonas não halogenadas. Entre as duas cetonas, observou-se apenas um leve aumento na conversão e excesso enantiomérico do produto de redução da cetona contendo o anel halogenado. Estes resultados são contrários aos observados na utilização da álcool desidrogenase YMR226c de *Saccharomyces cerevisiae* por Yang e colaboradores (2007), os quais observaram uma diminuição nos valores de conversão e excesso enantiomérico.

A mesma seletividade facial anteriormente observada (produto Prelog) no estudo da acetofenona e derivados foi obtida, com o produto majoritário apresentando configuração *R* devido à mudança na prioridade dos grupos (prioridade de C.I.P) no centro estereogênico formado.

Tabela 24: Resultado da biorredução de cetonas α -halogenadas por células em crescimento de *L. strigellus*



Entrada	R	t (dias)	Conversão (%)	ee (%)	Configuração
1		1	85,0	78,0	<i>R</i>
2	H	3	92,0	78,0	<i>R</i>
3		6	96,0	77,5	<i>R</i>
4		1	96,0	90,5	<i>R</i>
5	Cl	3	97,5	90,5	<i>R</i>
6		6	96,0	90,5	<i>R</i>

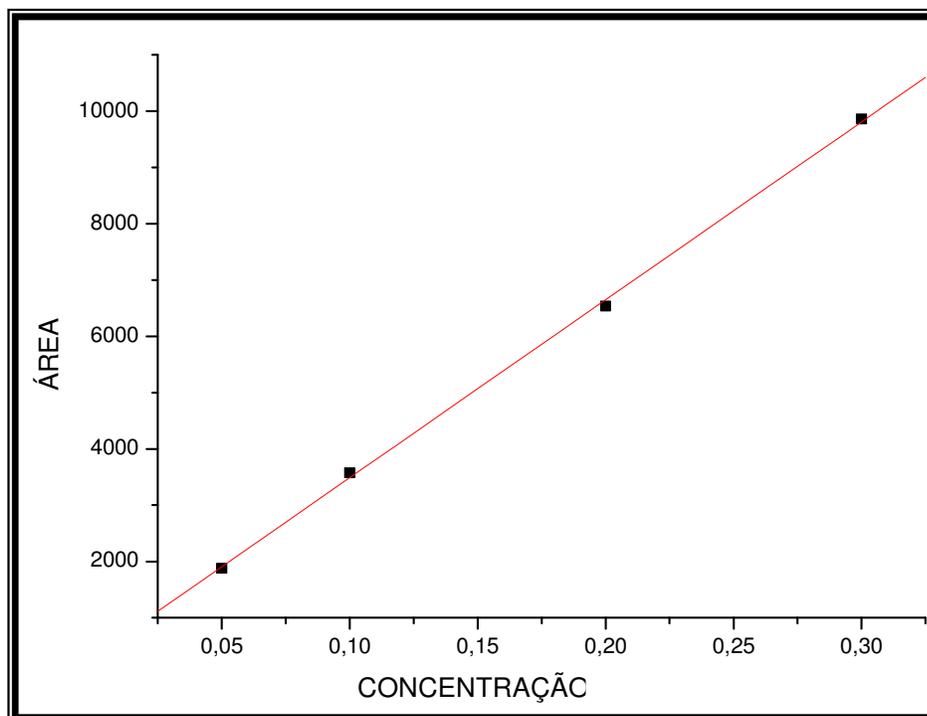


Figura 206: Curva de calibração do 2-Clorofeniletan-1-ol

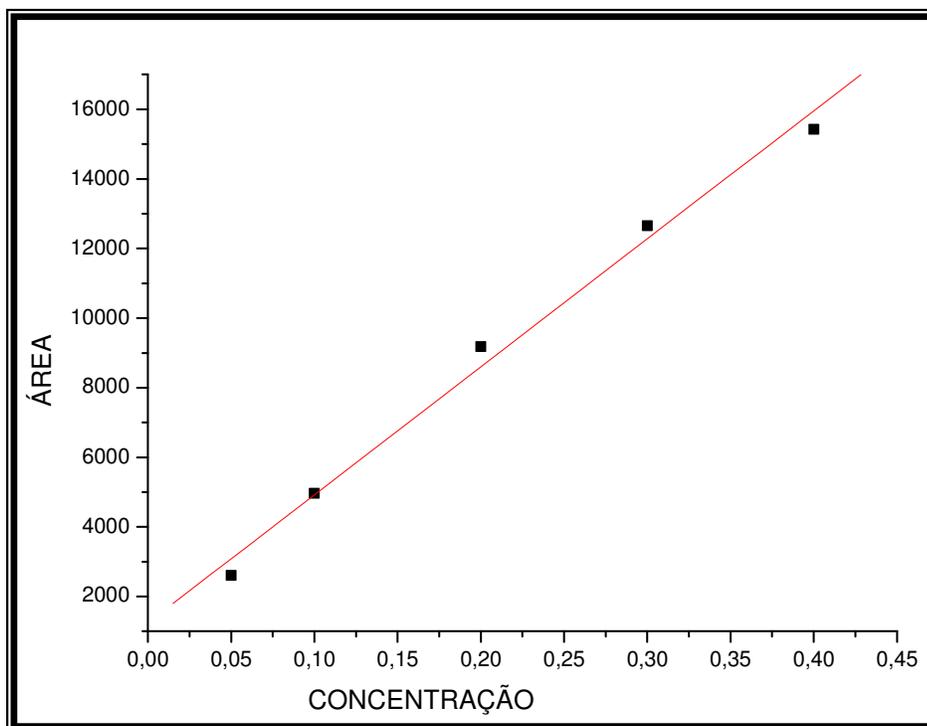


Figura 207: Curva de calibração do 2-Cloro-1-(3,4-diclorofenil)etan-1-ol

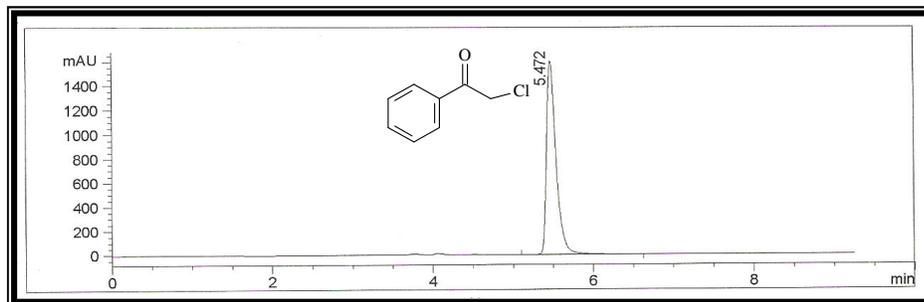


Figura 208: Cromatograma do padrão da 2-cloroacetofenona

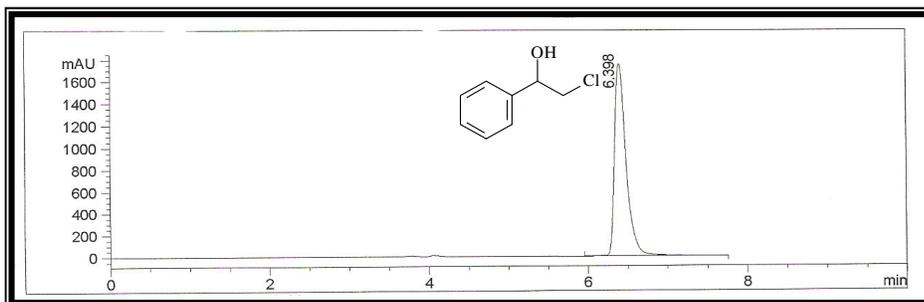


Figura 209: Cromatograma do padrão do 2-cloroafenetan-1-ol

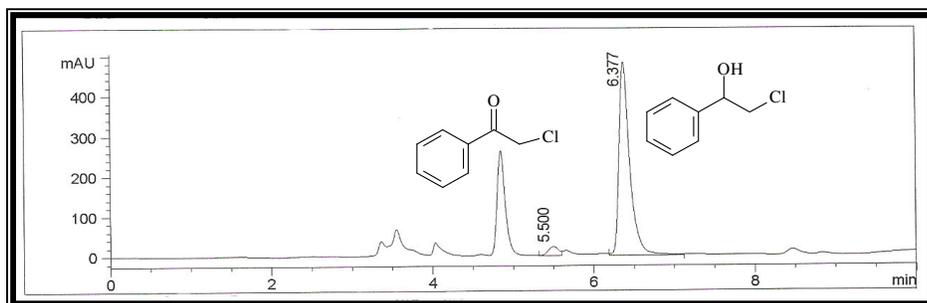


Figura 210: Cromatograma da biorredução da 2-cloroacetofenona após 1 dia

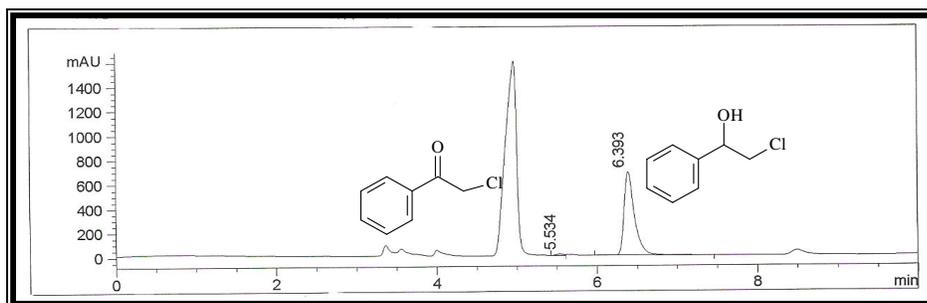


Figura 211: Cromatograma da biorredução da 2-cloroacetofenona após 3 dias

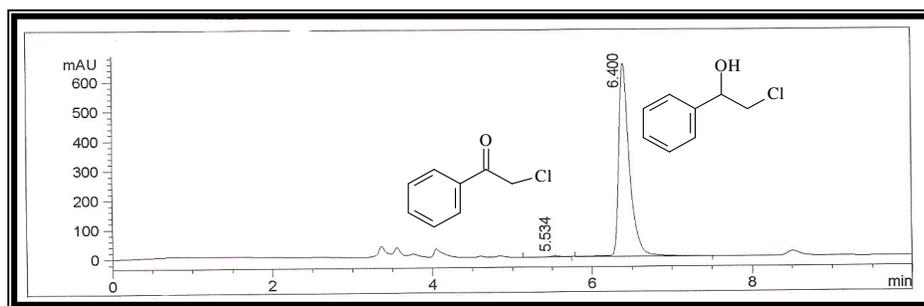


Figura 212: Cromatograma da biorredução da 2-cloroacetofenona após 6 dias

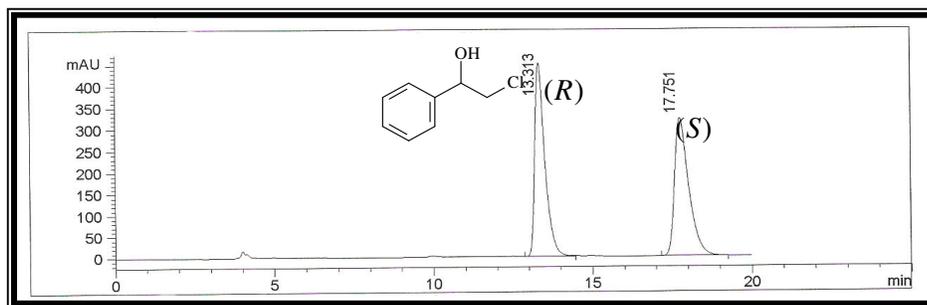


Figura 213: Cromatograma do padrão do 2-clorofeniletan1-ol em coluna quiral

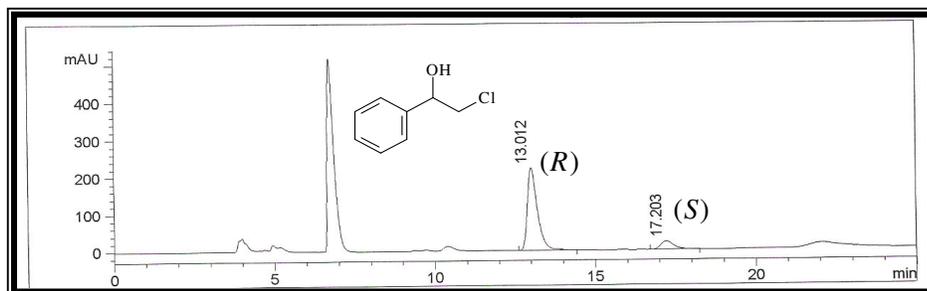


Figura 214: Cromatograma da biorredução da 2-cloroacetofenona após 1 dia em coluna quiral

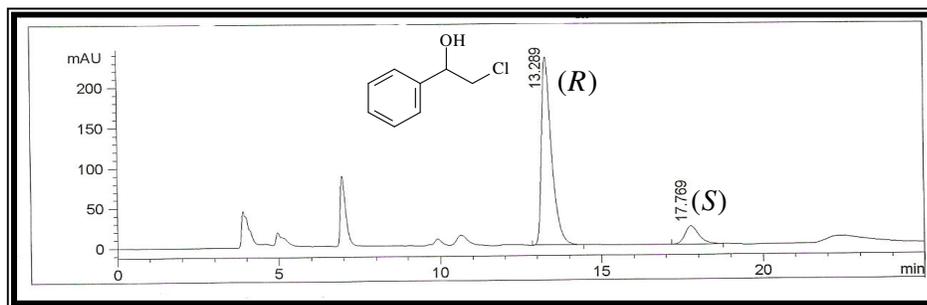


Figura 215: Cromatograma da biorredução da 2-cloroacetofenona após 3 dias em coluna quiral

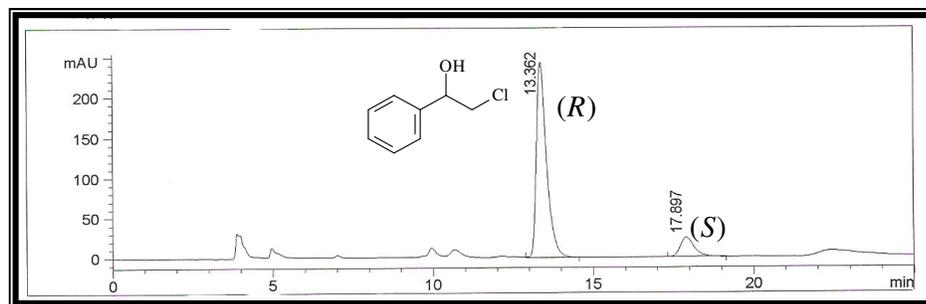


Figura 216: Cromatograma da biorredução da 2-cloroacetofenona após 6 dias em coluna quiral

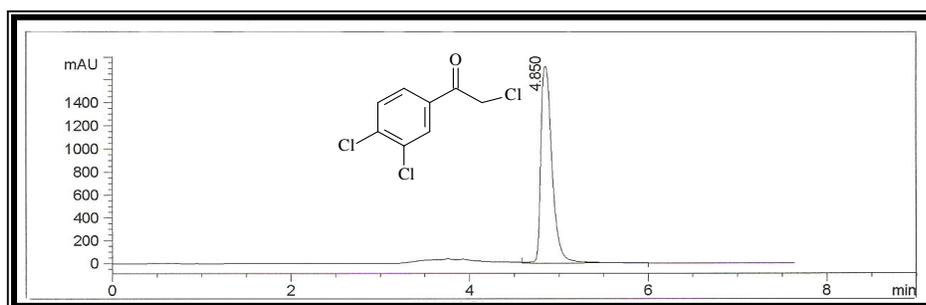


Figura 217: Cromatograma do padrão da 2,3',4'-tricloraacetofenona

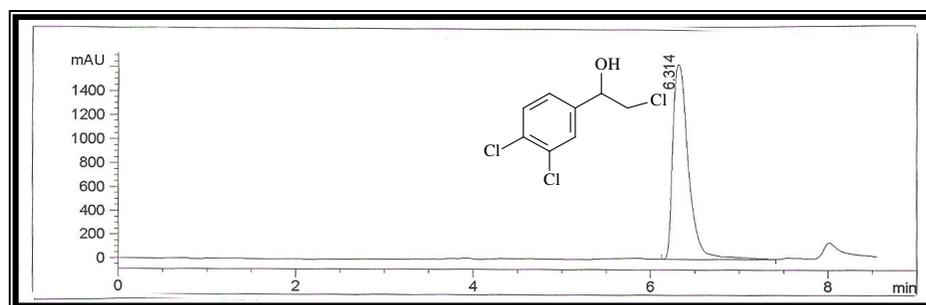


Figura 218: Cromatograma do padrão do 2-Cloro-1-(3,4-diclorofenil)etan-1-ol

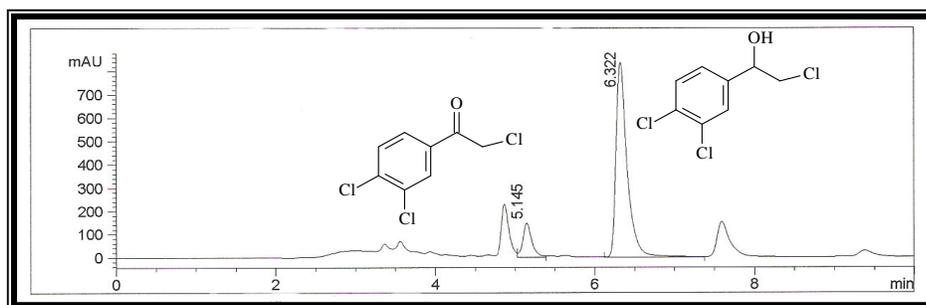


Figura 219: Cromatograma da biorredução da 2,3',4'-tricloraacetofenona após 1 dia

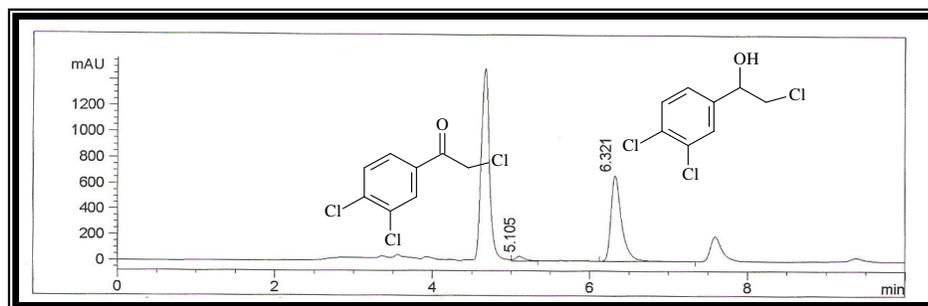


Figura 220: Cromatograma da biorredução da 2,3',4'-tricloraacetofenona após 3 dias

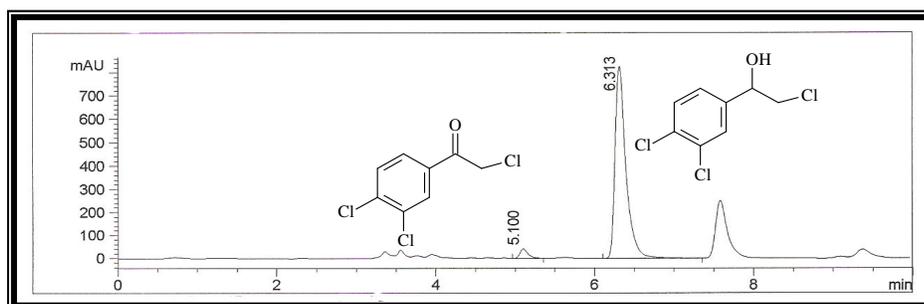


Figura 221: Cromatograma da biorredução da 2,3',4'-tricloraacetofenona após 6 dias

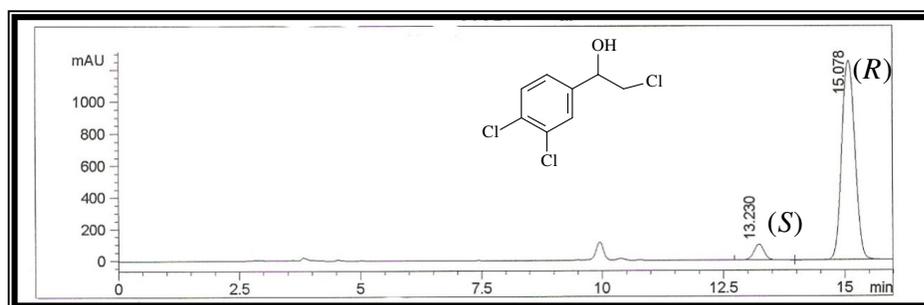


Figura 222: Cromatograma do padrão do 2-Cloro-1-(3,4-diclorofenil)etan-1-ol em coluna quiral

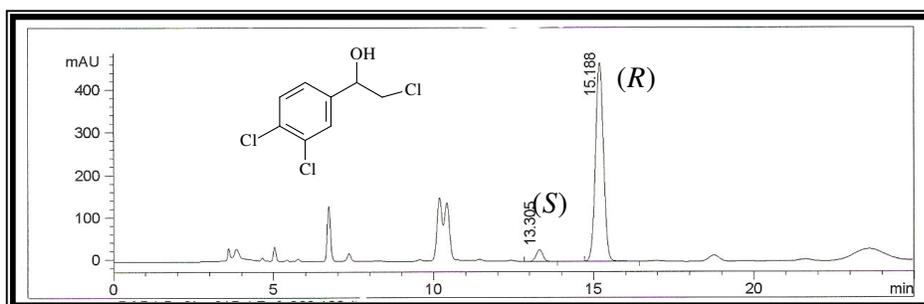


Figura 223: Cromatograma da biorredução da 2,3',4'-tricloraacetofenona após 1 dia em coluna quiral

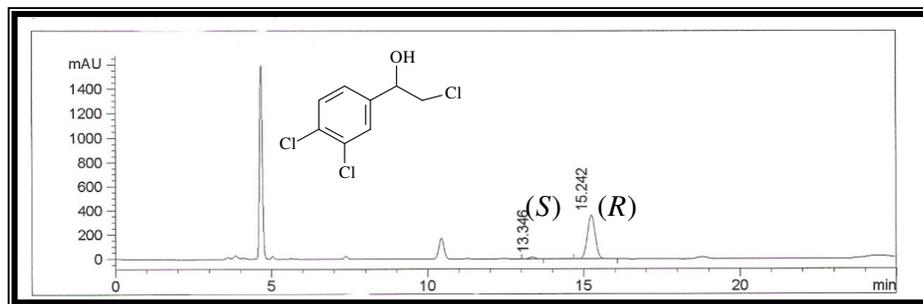


Figura 224: Cromatograma da biorredução da 2,3',4'-tricloroacetofenona após 3 dias em coluna quiral

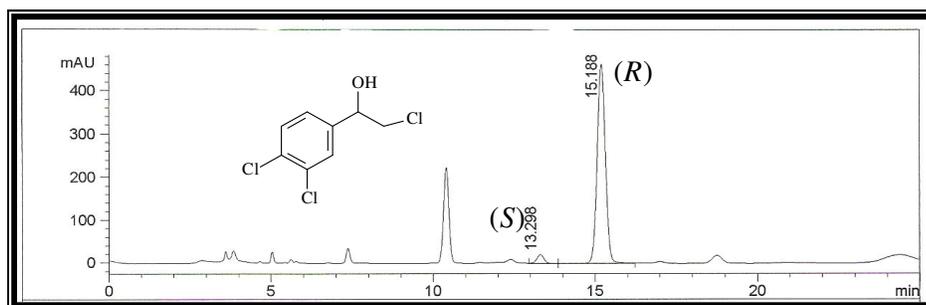
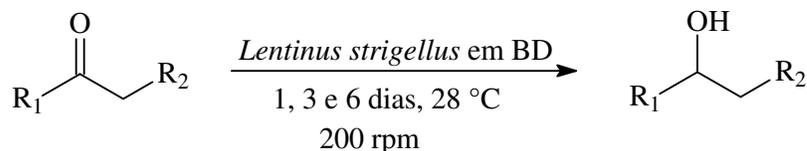


Figura 225: Cromatograma da biorredução da 2,3',4'-tricloroacetofenona após 6 dias em coluna quiral

4.4.2 Biorredução de cetonas alifáticas pró-quirais e β -cetoéster

Uma vez que o microrganismo apresentou um grande potencial biorredutor frente a cetonas aromáticas, resolveu-se analisar o potencial deste mesmo fungo quando cetonas alifáticas (**105-107**) e β -cetoéster (**104**) pró-quirais são empregados como substratos (Esquema 4). O procedimento para as reações foi o mesmo descrito anteriormente para as cetonas aromáticas.



(**104**) $\text{R}_1=\text{CH}_2\text{COOCH}$, $\text{R}_2=\text{Cl}$

(**105**) $\text{R}_1=\text{CH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$, $\text{R}_2=\text{H}$

(**106**) $\text{R}_1=\text{CH}_2(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$, $\text{R}_2=\text{H}$

(**107**) $\text{R}_1=\text{Cy}$, $\text{R}_2=\text{H}$

(**108**) $\text{R}_1=\text{CH}_2\text{COOCH}$, $\text{R}_2=\text{Cl}$

(**109**) $\text{R}_1=\text{CH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$, $\text{R}_2=\text{H}$

(**110**) $\text{R}_1=\text{CH}_2(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$, $\text{R}_2=\text{H}$

(**111**) $\text{R}_1=\text{Cy}$, $\text{R}_2=\text{H}$

Esquema 3: Cetonas alifáticas utilizadas nas biorredução com *L. strigellus*

Para a determinação das conversões, os tempos de retenção de todos os substratos e seus respectivos alcoóis foram determinados pela injeção de padrões no

CG/DIC em coluna aquiral. Os excessos enantioméricos dos álcoois formados foram determinados através da análise dos acetatos correspondentes (Item 5.10.4, p. 203) em CG/DIC (coluna quiral) (Item 5.10.6.2, p. 205).

Os resultados apresentados na Tabela 24 revelam que, embora 100% de conversão tenha sido obtido para o β -cetoéster (**104**), este apresentou baixo excesso enantiomérico no produto formado (entradas 1-3). Excelentes conversões e *ee* foram observados na biorredução da octan-2-ona (**105**). Entretanto, uma redução significativa nesses valores foi obtida com o aumento da cadeia carbônica, empregando-se a undecan-2-ona (**106**) como substrato. A biorredução da ciclo-hexilmetilcetona (**107**) gerou o álcool correspondente em excelente conversão e bom *ee*.

Assim como nas cetonas aromáticas α -cloradas, a biorredução do β -cetoéster (**104**) gerou preferencialmente um álcool de configuração *R* (Produto Prelog) em 32-43% *ee*. Quando a álcool desidrogenase YMR226c de *Saccharomyces cerevisiae* foi utilizada na biorredução deste substrato, observou-se igual excesso enantiomérico (YANG *et al.*, 2007). As três cetonas alifáticas testadas geraram alcoóis de configuração *S*, o que também era esperado para estes compostos.

Tabela 25: Resultado da biorredução das cetonas alifáticas (**104-107**) por células em crescimento de *L. strigellus*

Entrada	Cetona	t (dias)	Conversão (%)	<i>ee</i> (%)
1	β -cetoéster	1	100,0	32,0
2		3	100,0	34,5
3		6	100,0	43,0
4	Octan-2-ona	1	69,0	>99,0
5		3	96,5	>99,0
6		6	90,0	92,5
7	Undecan-2-ona	1	26,5	62,0
8		3	57,0	63,0
9		6	52,0	65,0
10	Ciclo-hexilmetilcetona	1	9,0	96,5
11		3	100,0	90,5
12		6	88,0	88,5

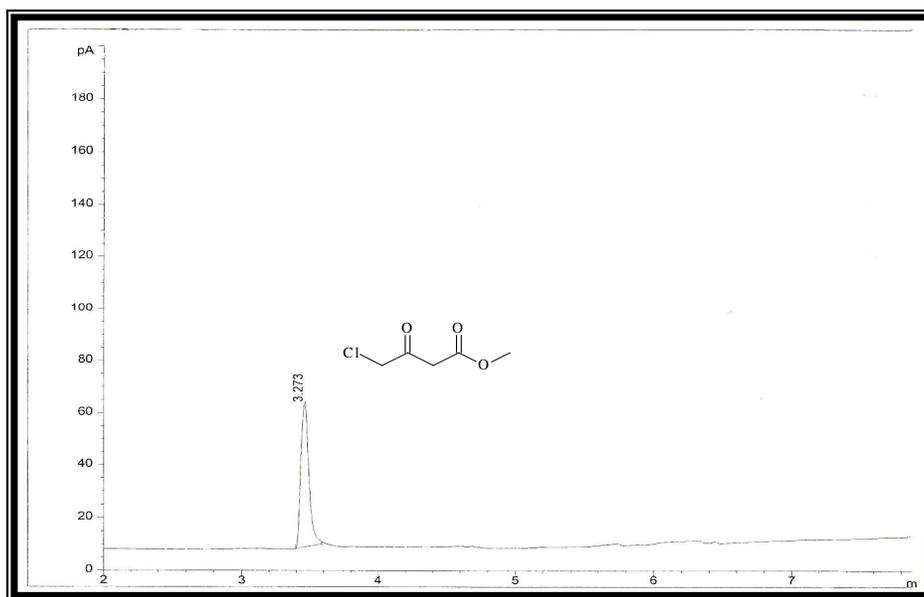


Figura 226: Cromatograma do padrão do 4-cloroacetoacetato

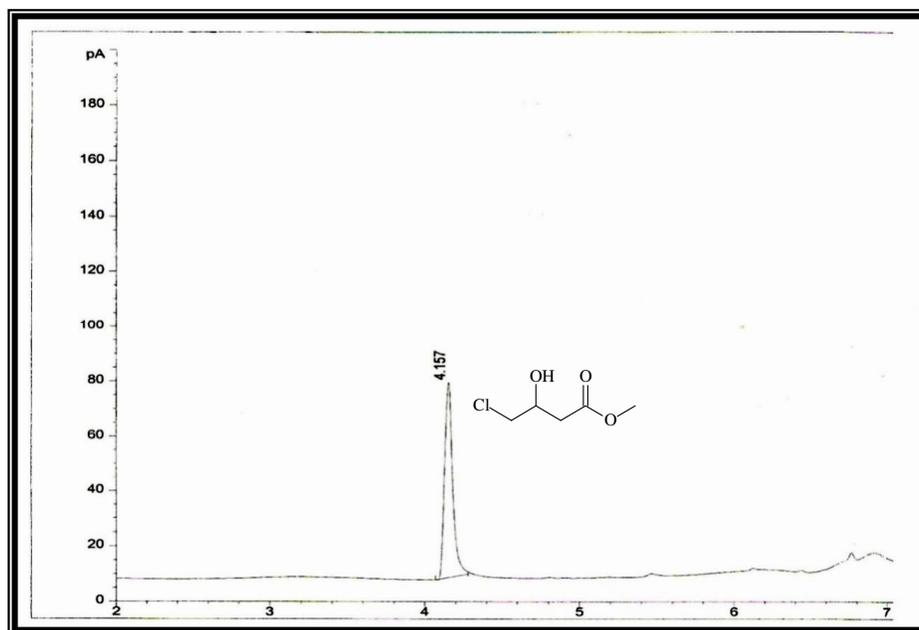


Figura 227: Cromatograma da biorredução do 4-cloroacetoacetato após 1 dia

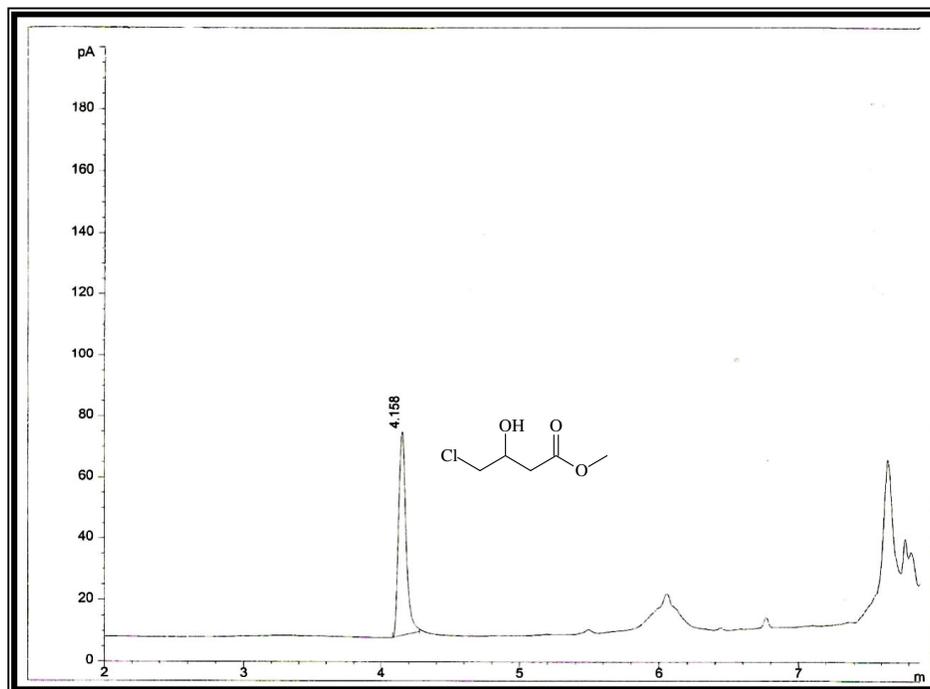


Figura 228: Cromatograma da biorredução do 4-cloroacetoacetato após 3 dias

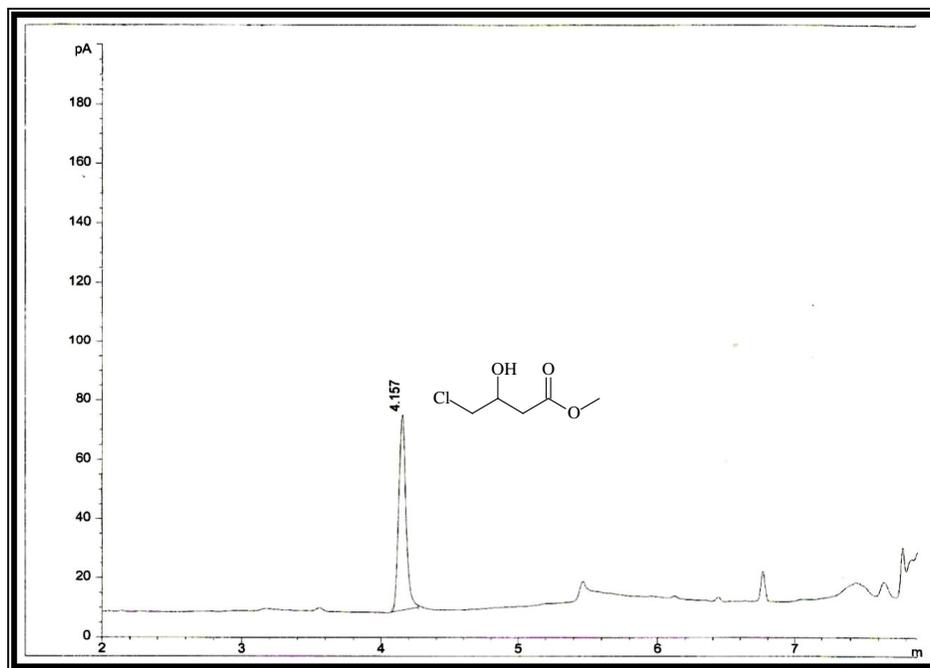


Figura 229: Cromatograma da biorredução do 4-cloroacetoacetato após 6 dias

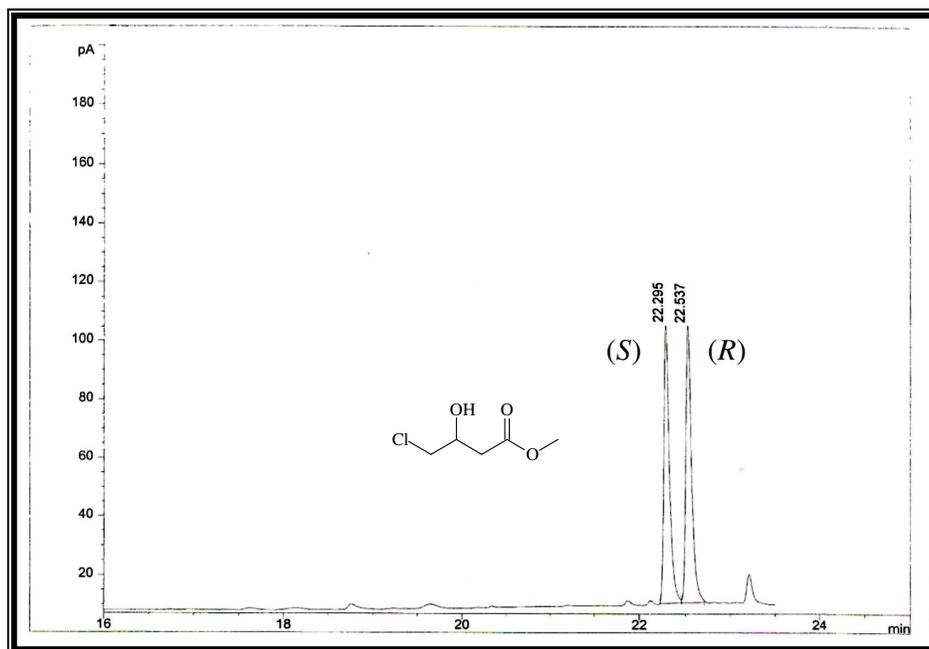


Figura 230: Cromatograma do padrão do 4-cloro-3-hidroxiutanoato de metila

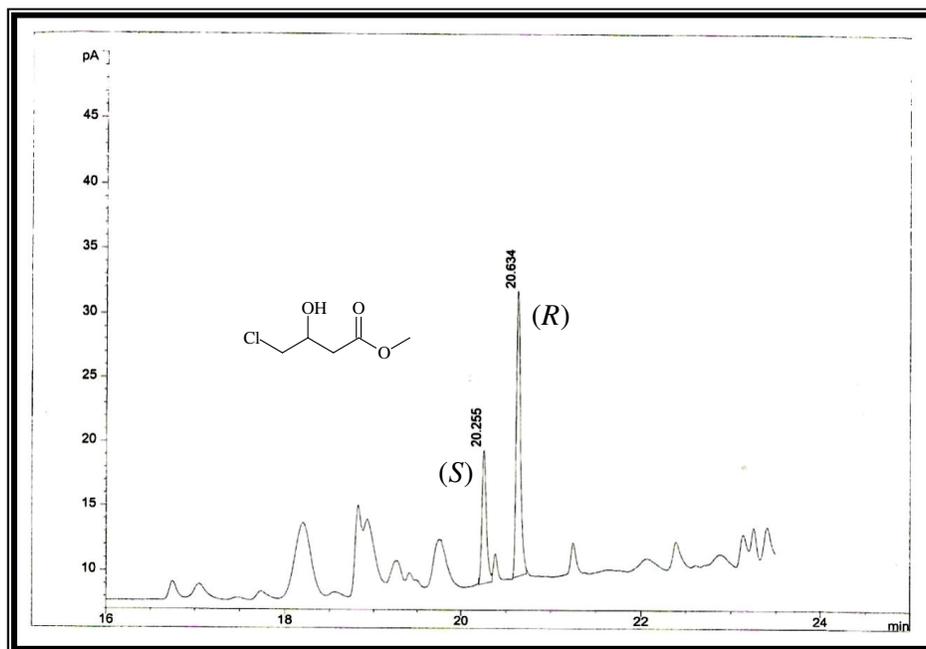


Figura 231: Cromatograma da biorredução do 4-cloroacetato após 1 dia em coluna quiral

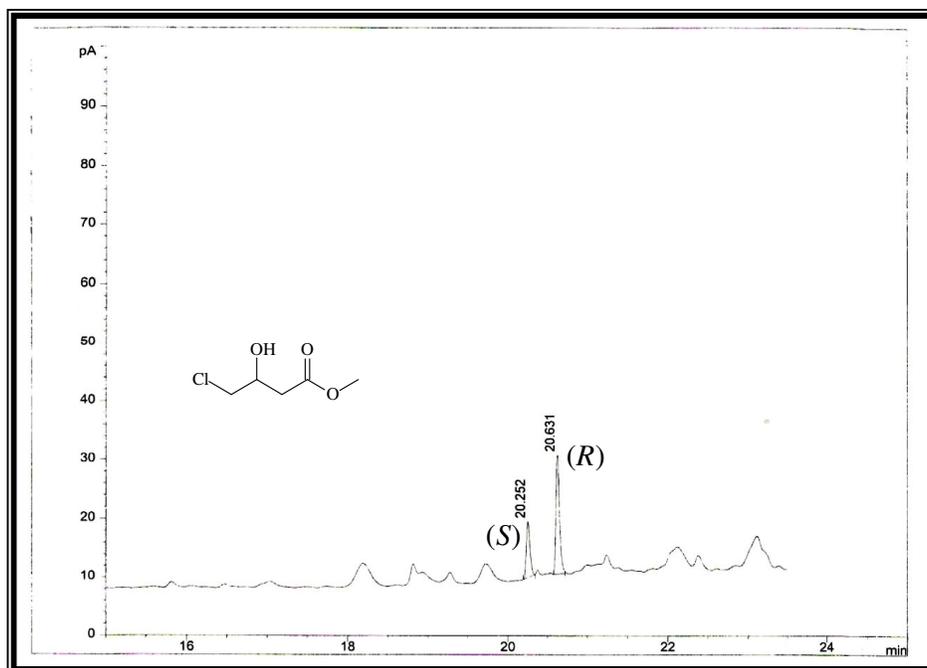


Figura 232: Cromatograma da biorredução do 4-cloroacetoacetato de metila após 3 dias em coluna quiral

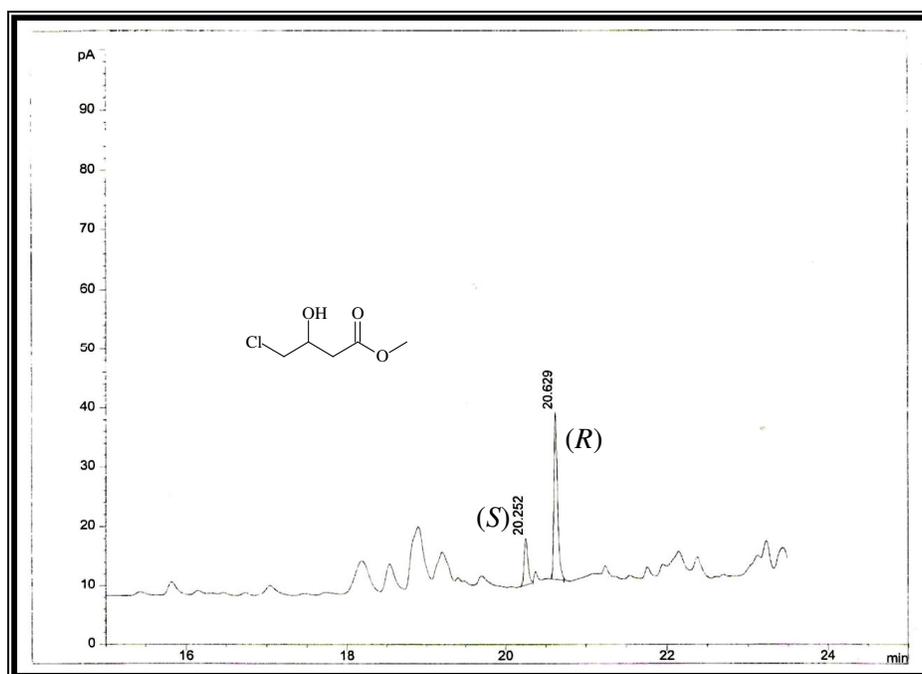


Figura 233: Cromatograma da biorredução do 4-cloroacetoacetato após 6 dias em coluna quiral

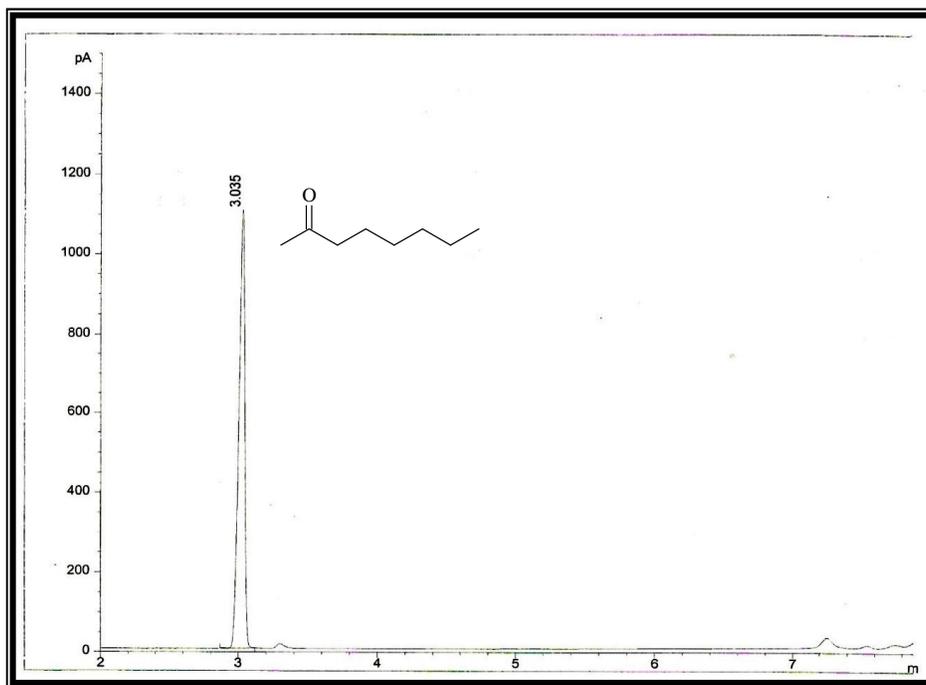


Figura 234: Cromatograma do padrão do octan-2-ona

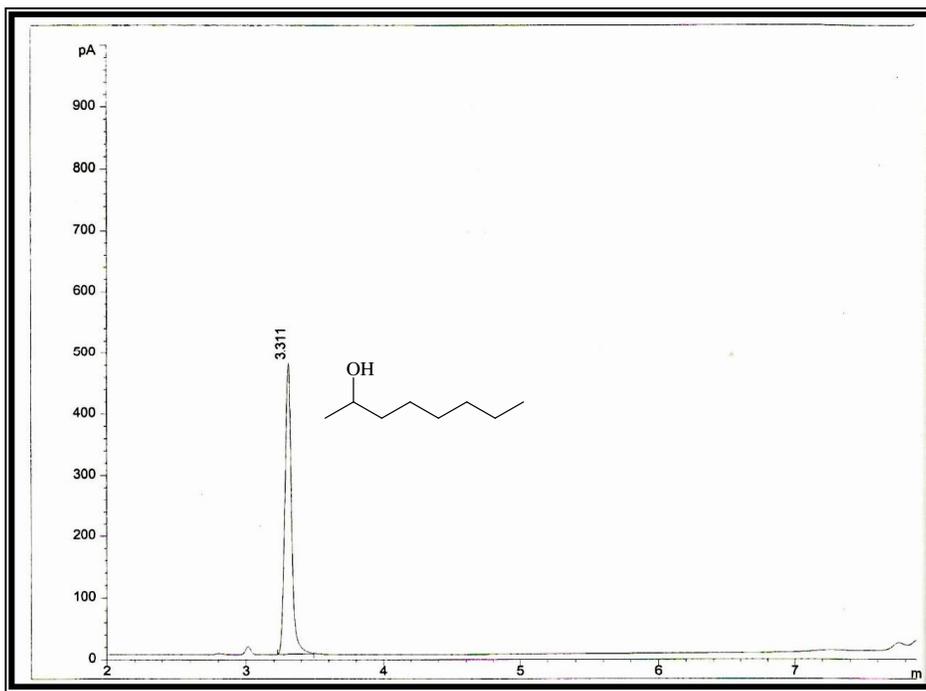


Figura 235: Cromatograma do padrão da octan-2-ol

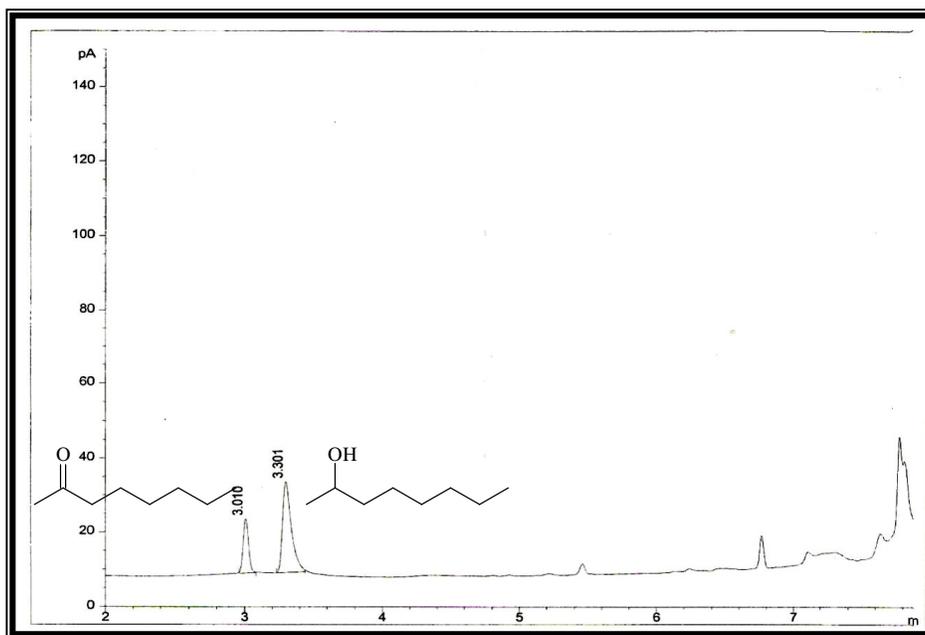


Figura 236: Cromatograma da biorredução da octan-2-ona após 1 dia

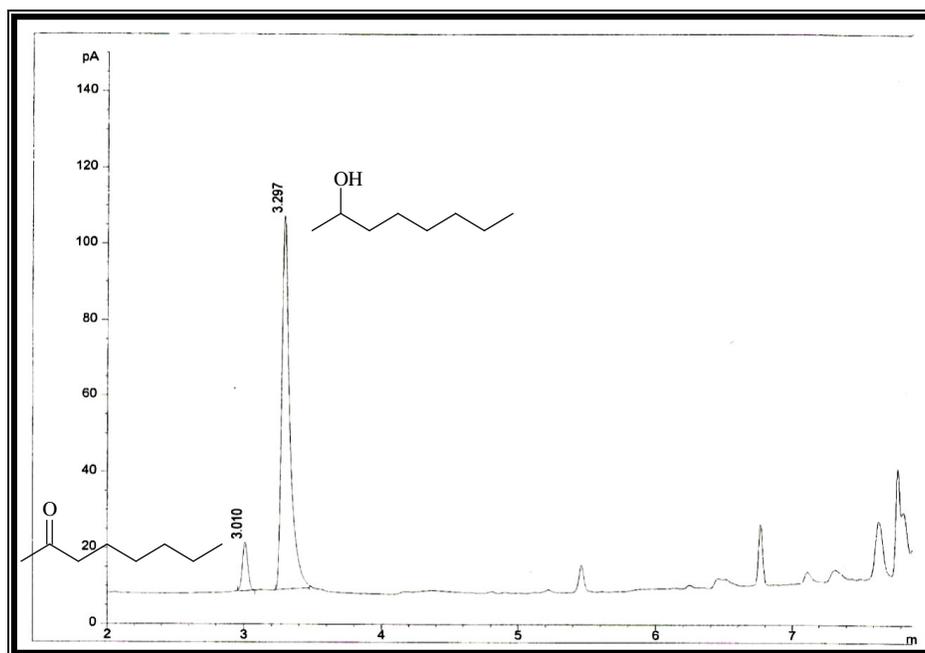


Figura 237: Cromatograma da biorredução da octan-2-ona após 3 dias

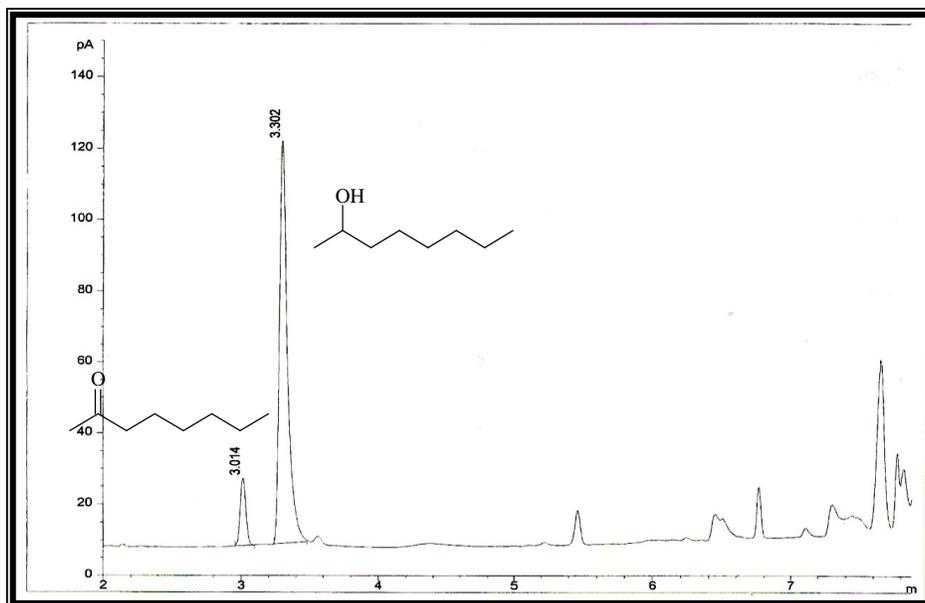


Figura 238: Cromatograma da biorredução da octan-2-ona após 6 dias

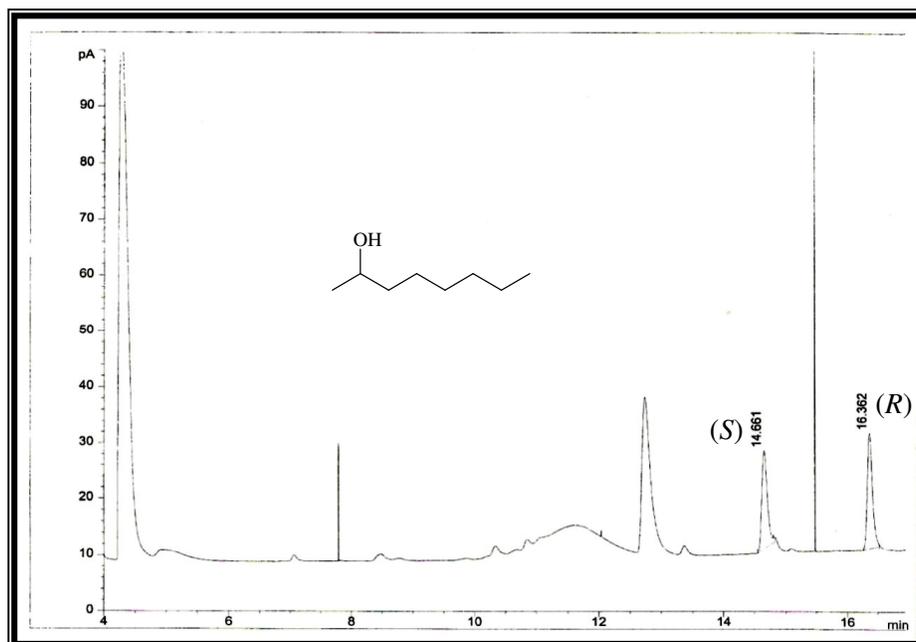


Figura 239: Cromatograma do padrão do octan-2-ol em coluna quiral

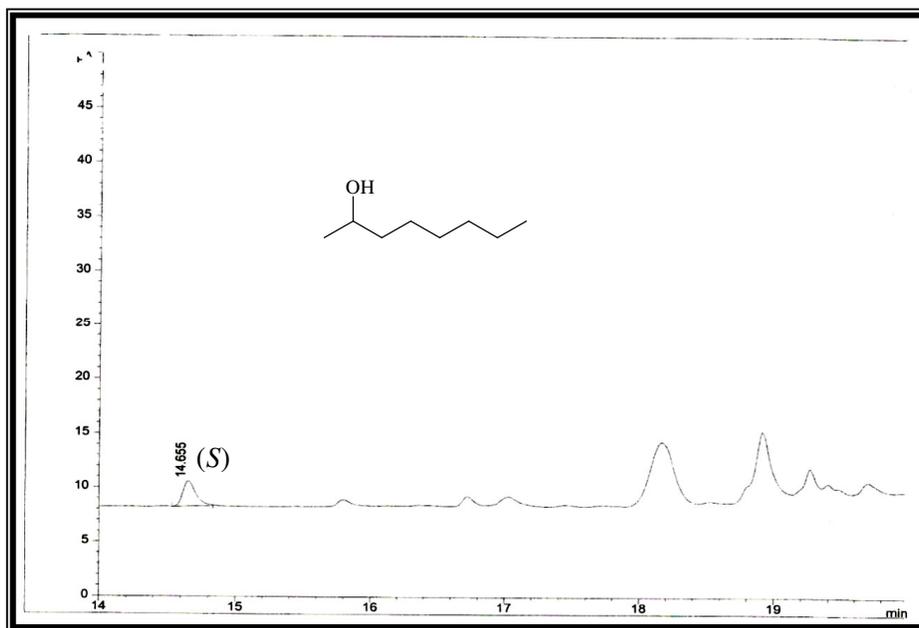


Figura 240: Cromatograma da biorredução da octan-2-ona após 1 dia em coluna quiral

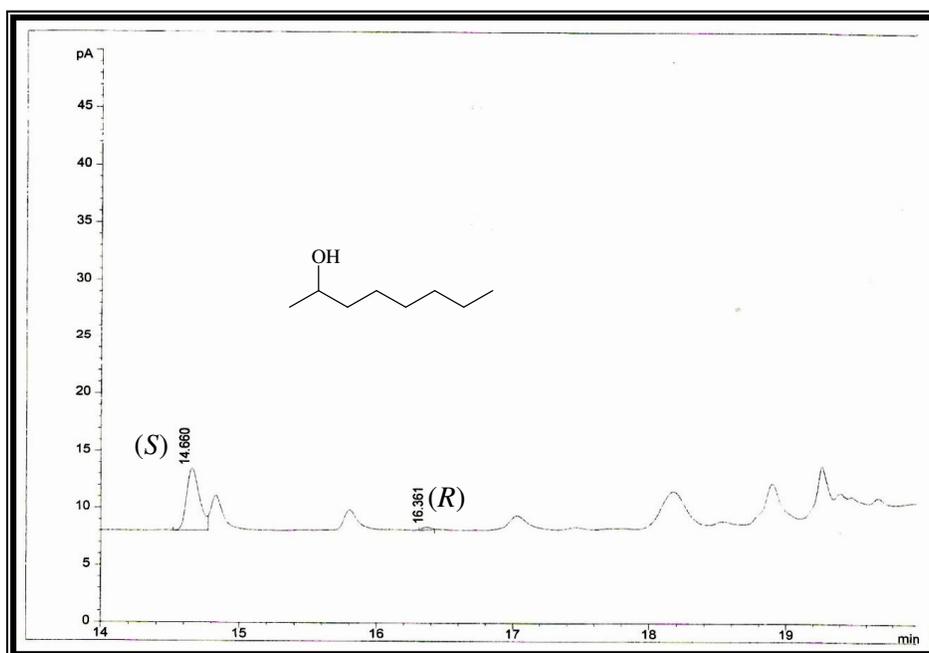


Figura 241: Cromatograma da biorredução da octan-2-ona após 3 dias em coluna quiral

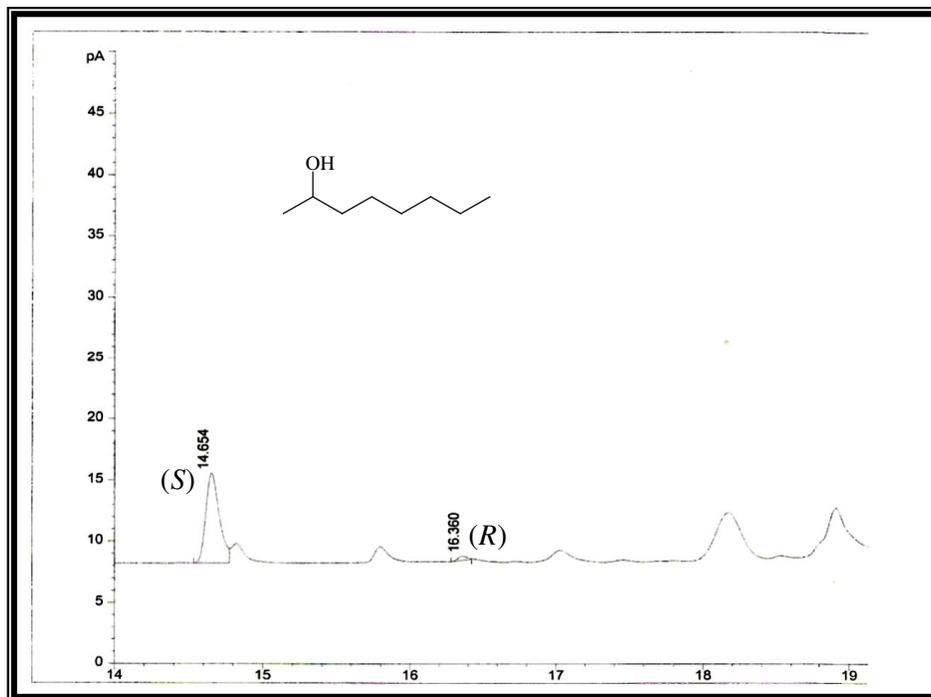


Figura 242: Cromatograma da biorredução da octan-2-ona após 6 dias em coluna quiral

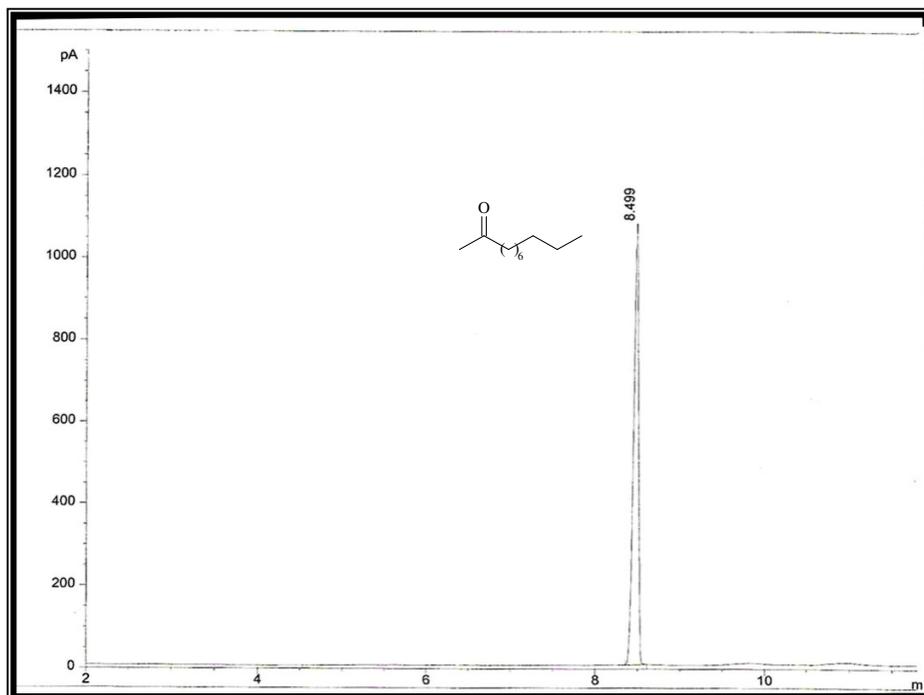


Figura 243: Cromatograma do padrão undecan-2-ona

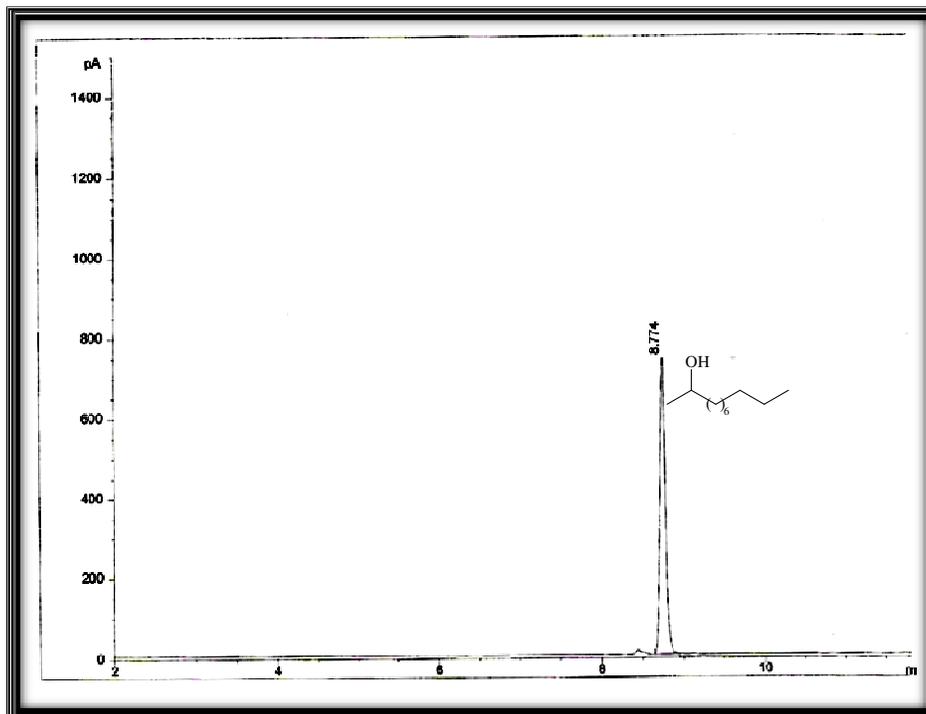


Figura 244: Cromatograma do padrão da undecan-2-ol

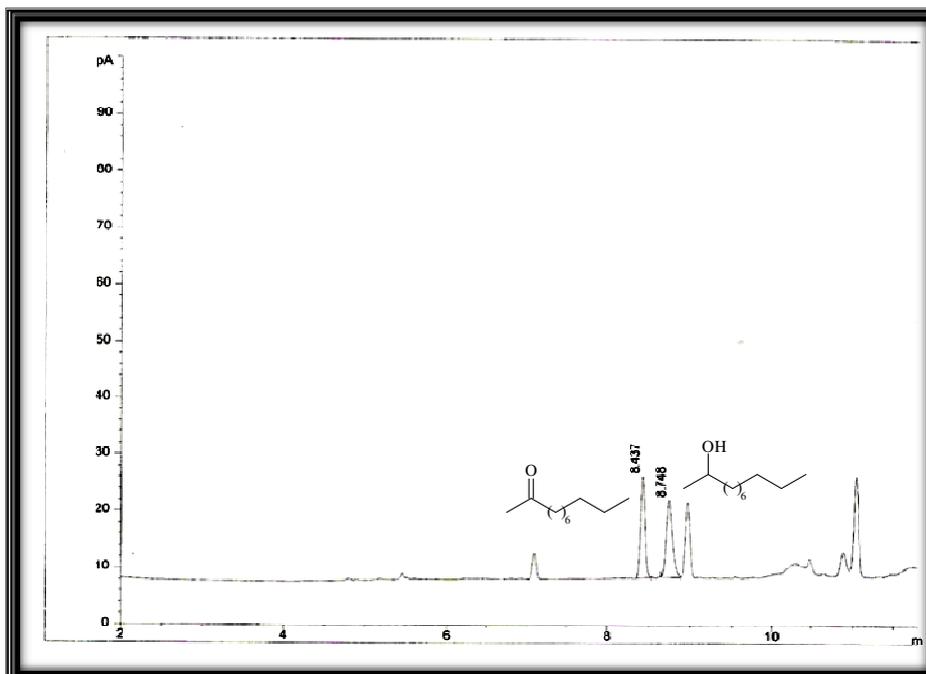


Figura 245: Cromatograma da biorredução da undecan-2-ona após 1 dia

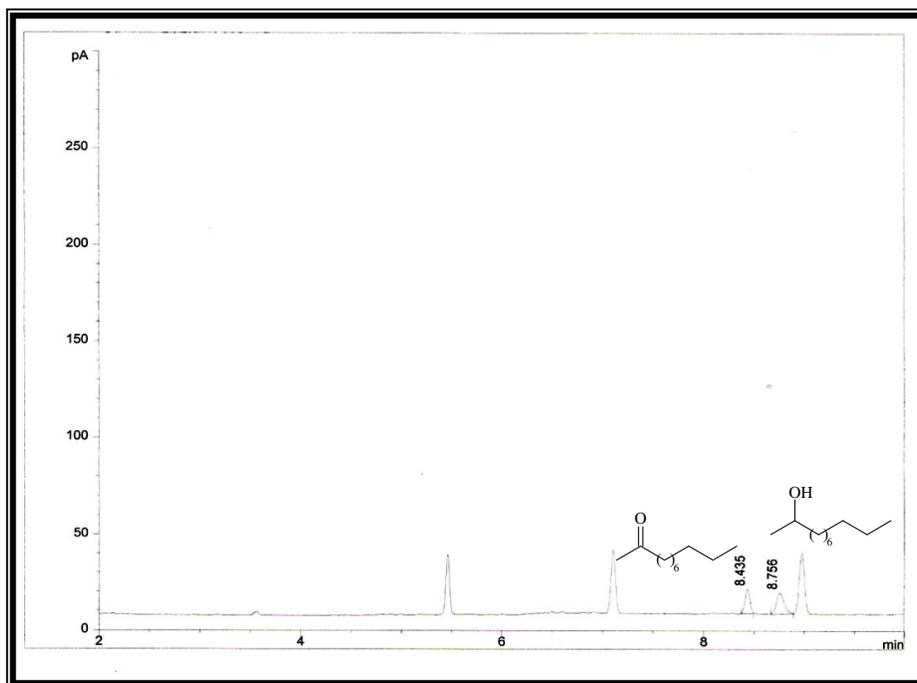


Figura 246: Cromatograma da biorredução da undecan-2-ona após 3 dias

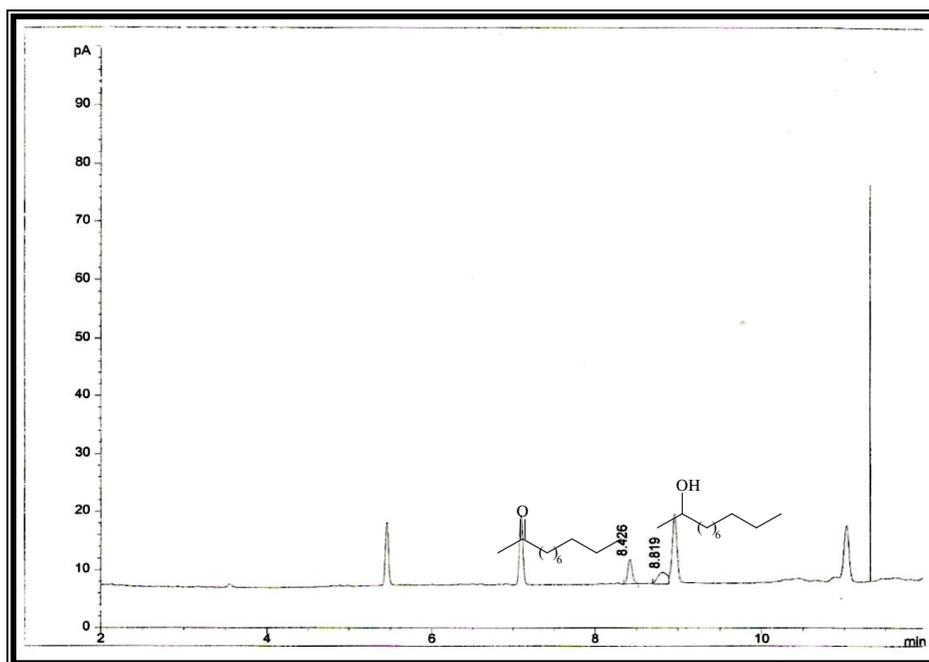


Figura 247: Cromatograma da biorredução da undecan-2-ona após 6 dias

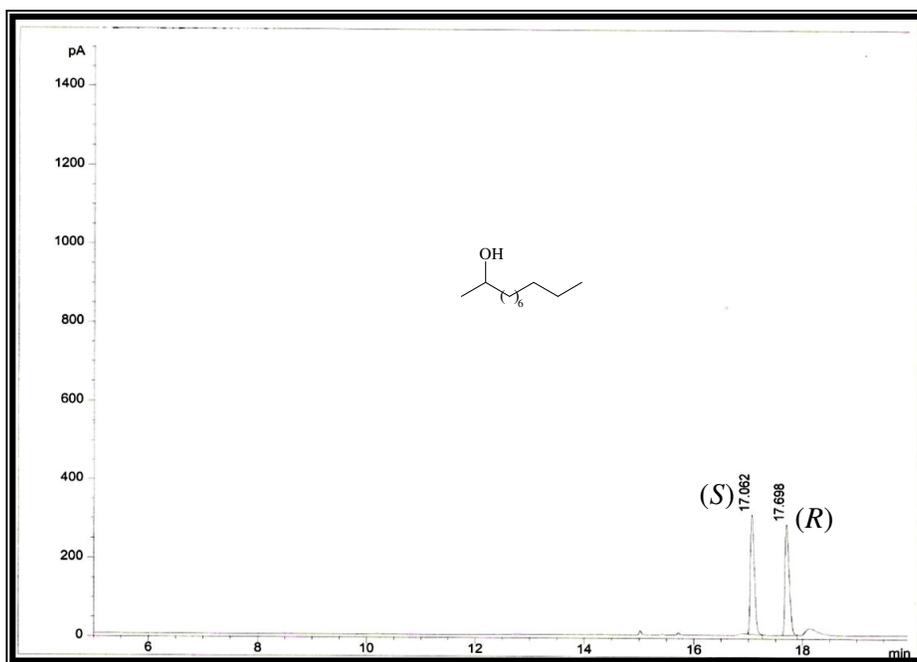


Figura 248: Cromatograma do padrão do undecan-2-ol em coluna quiral

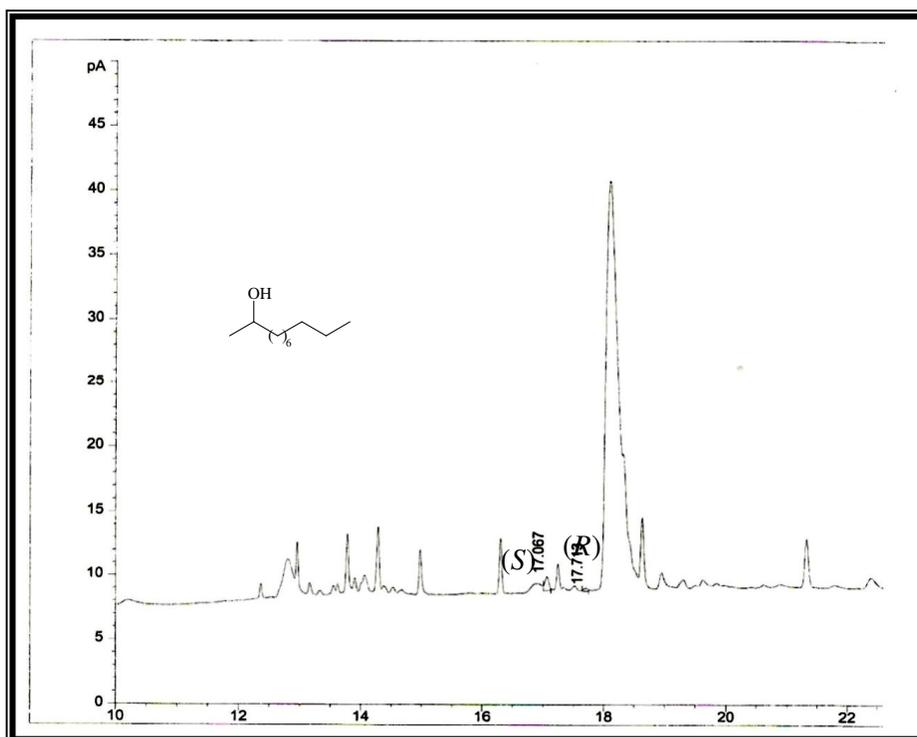


Figura 249: Cromatograma da biorredução da undecan-2-ona após 1 dia em coluna quiral

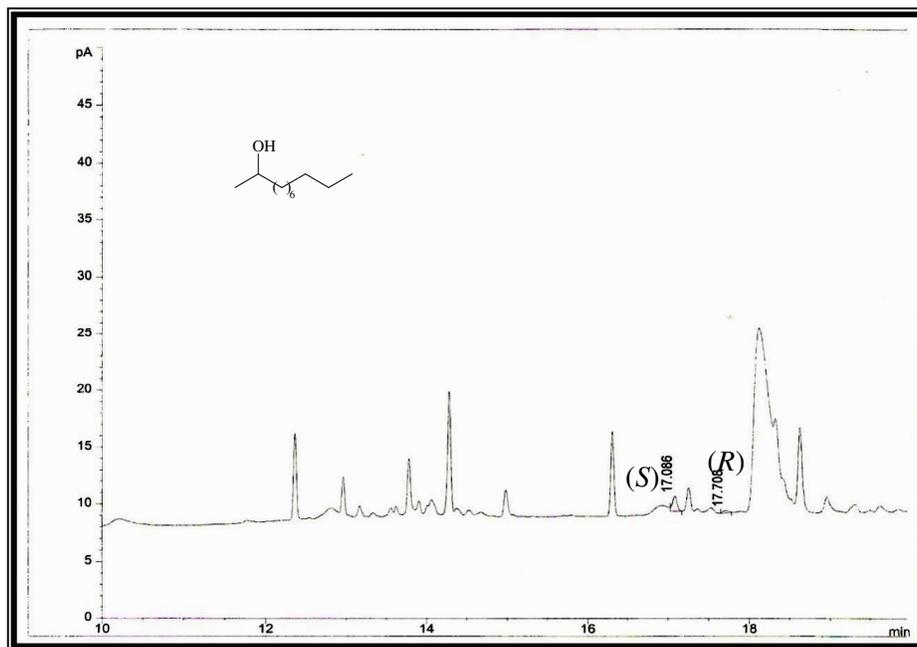


Figura 250: Cromatograma da biorredução da undecan-2-ona após 3 dias, em coluna quiral

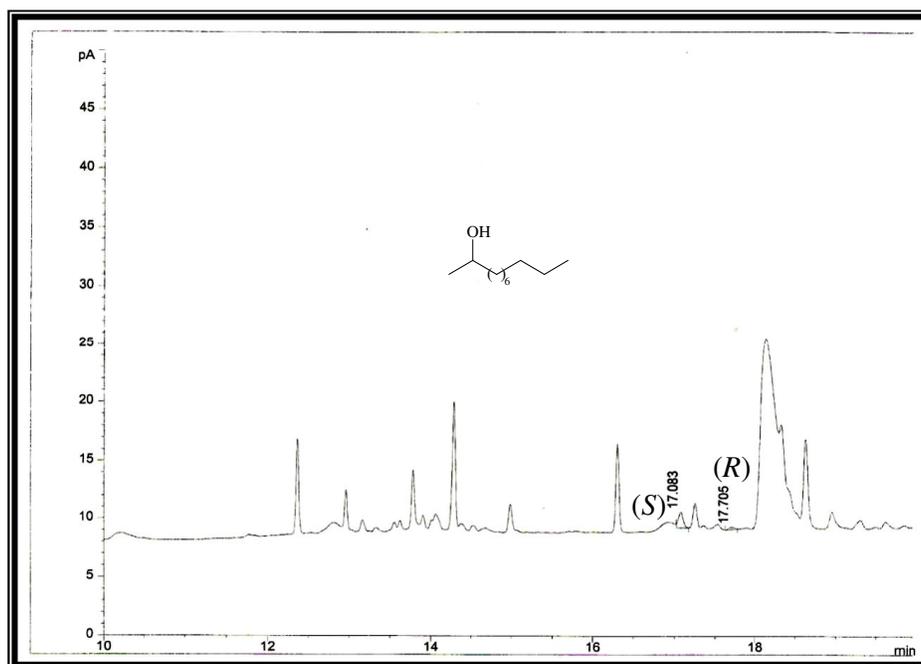


Figura 251: Cromatograma da biorredução da undecan-2-ona após 6 dias, em coluna quiral

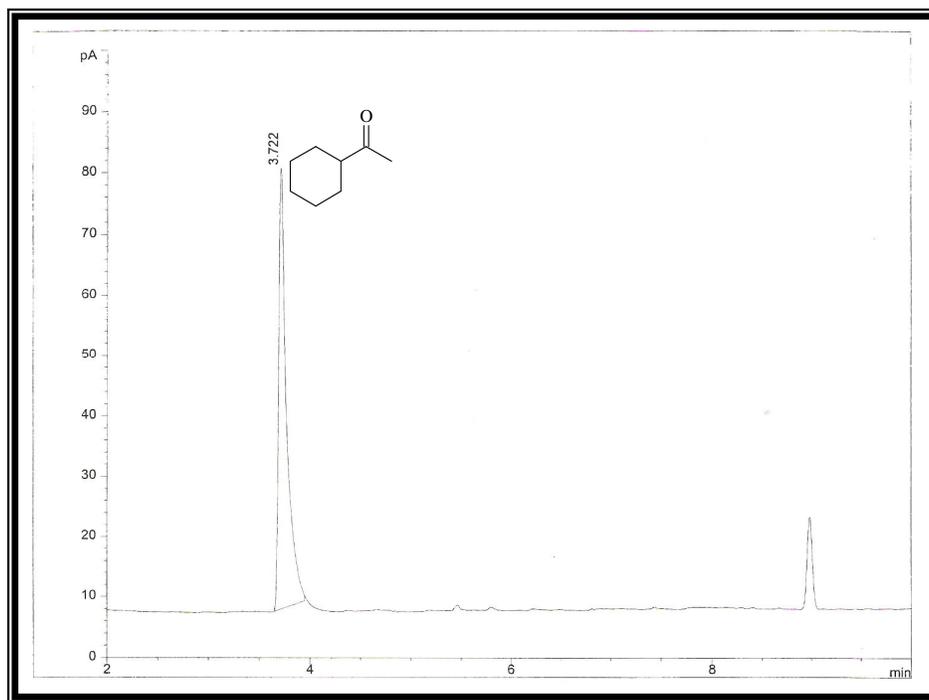


Figura 252: Cromatograma do padrão do ciclo-hexilmetilcetona

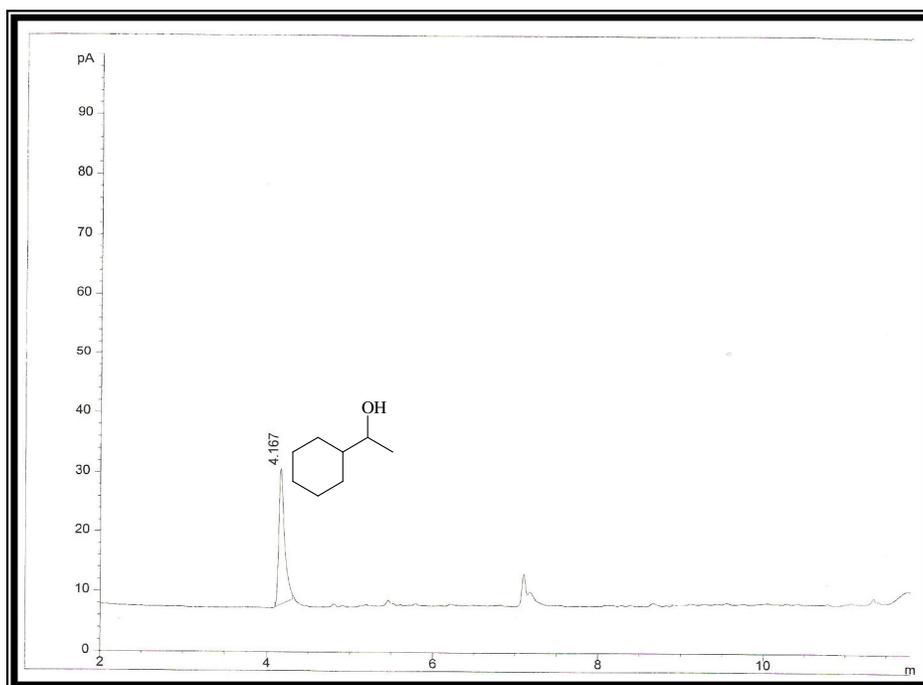


Figura 253: Cromatograma do padrão do 1-ciclo-hexilmetiletan-1-ol

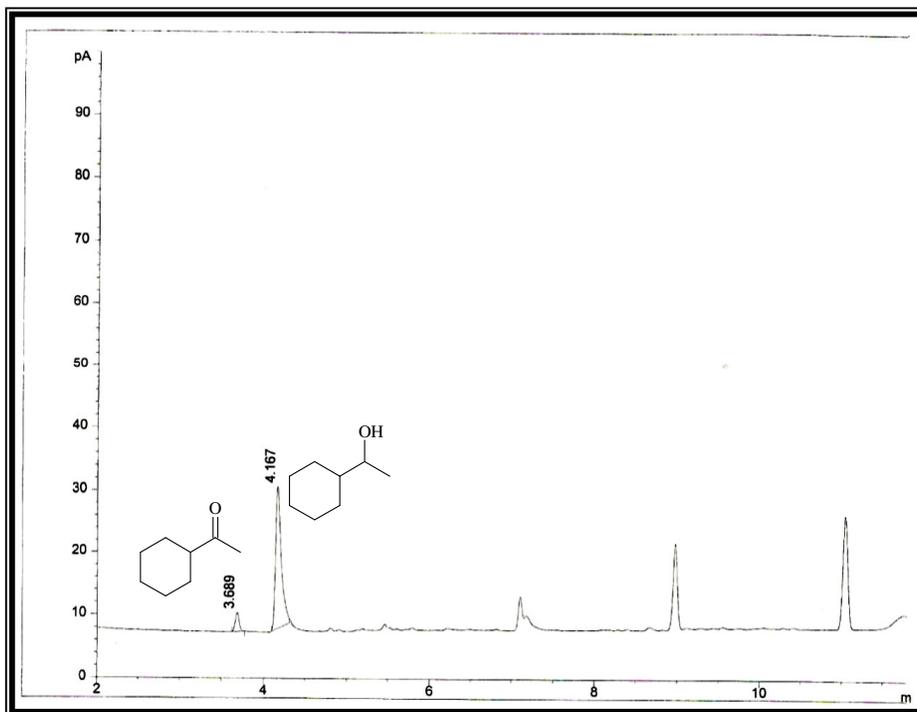


Figura 254: Cromatograma da biorredução da ciclo-hexilmetilcetona após 1 dia

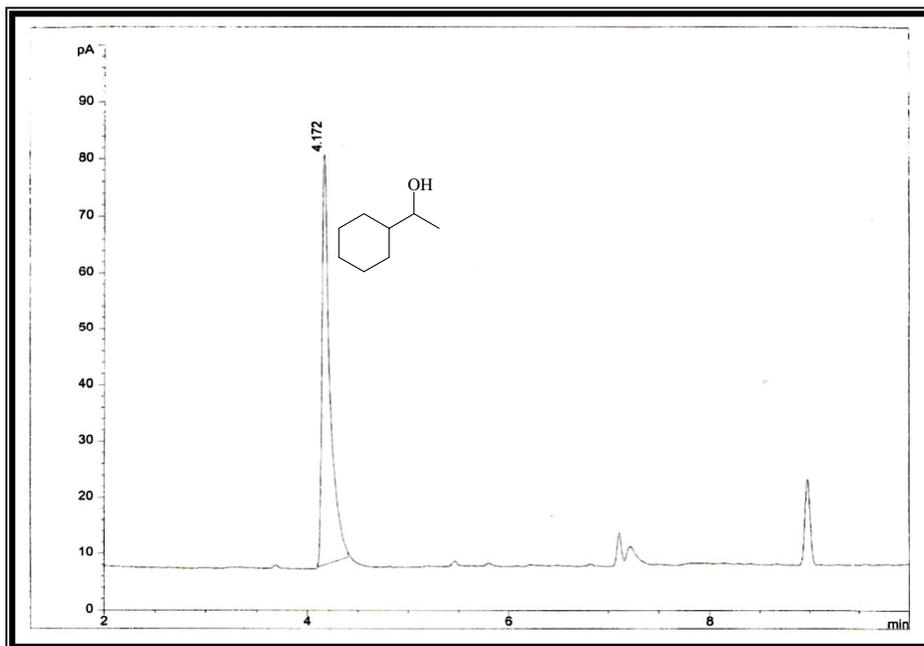


Figura 255: Cromatograma da biorredução da ciclo-hexilmetilcetona após 3 dias

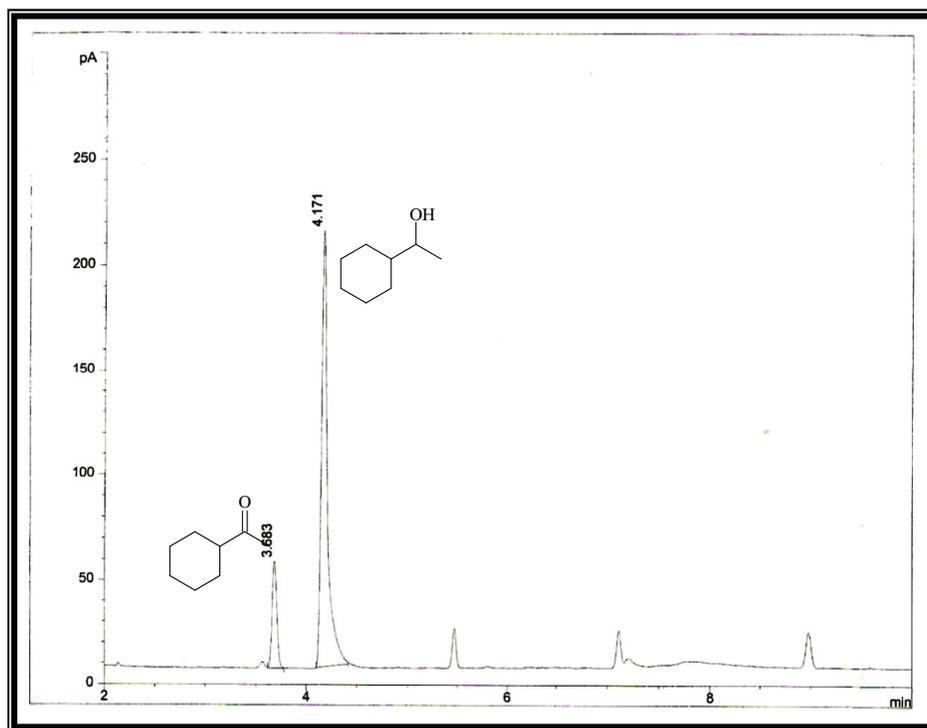


Figura 256: Cromatograma da biorredução da ciclo-hexilmetilcetona após 6 dias

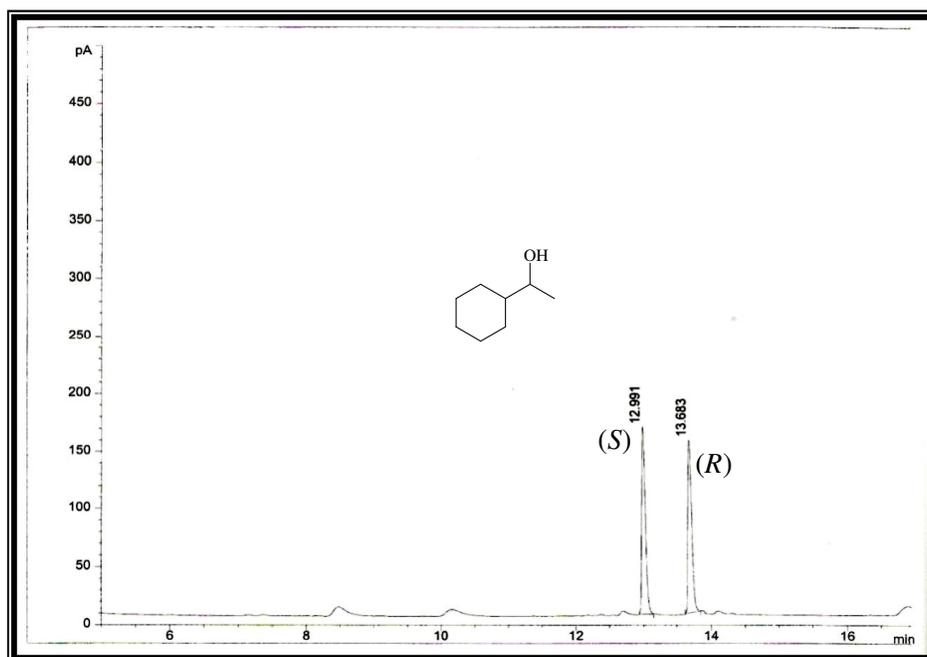


Figura 257: Cromatograma do padrão do 1-ciclo-hexiletan-1-ol em coluna quiral

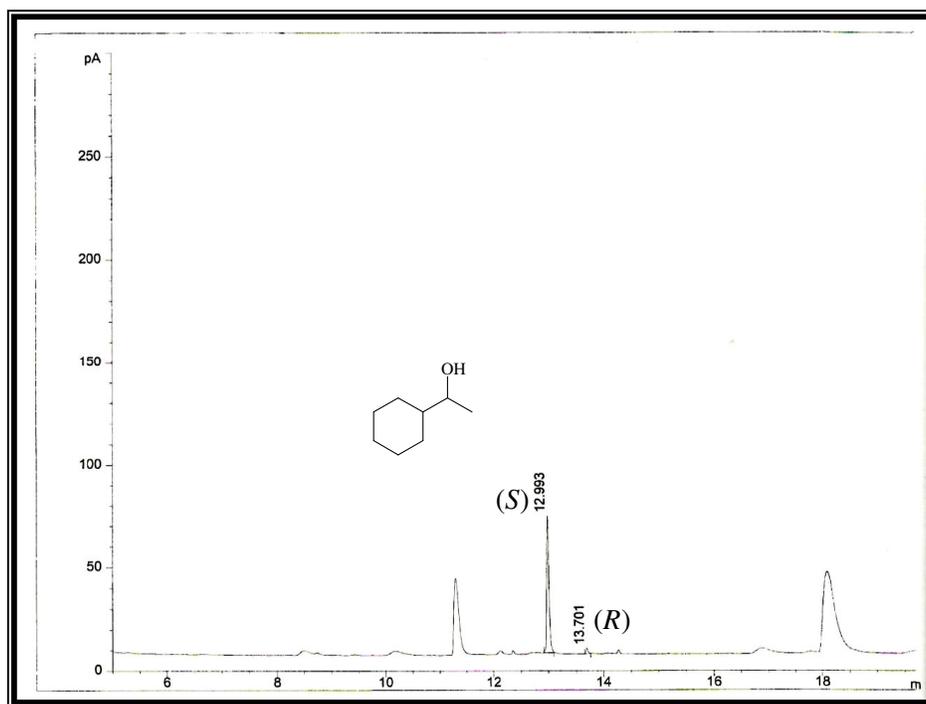


Figura 258: Cromatograma da biorredução da ciclo-hexilmetilcetona após 1 dia em coluna quiral

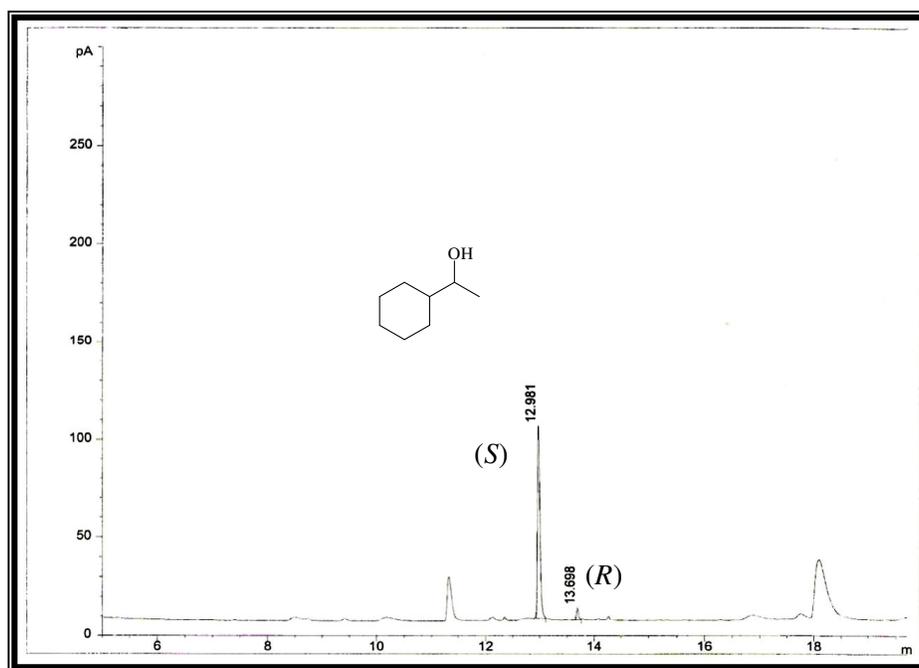


Figura 259: Cromatograma da biorredução da ciclo-hexilmetilcetona após 3 dias em coluna quiral

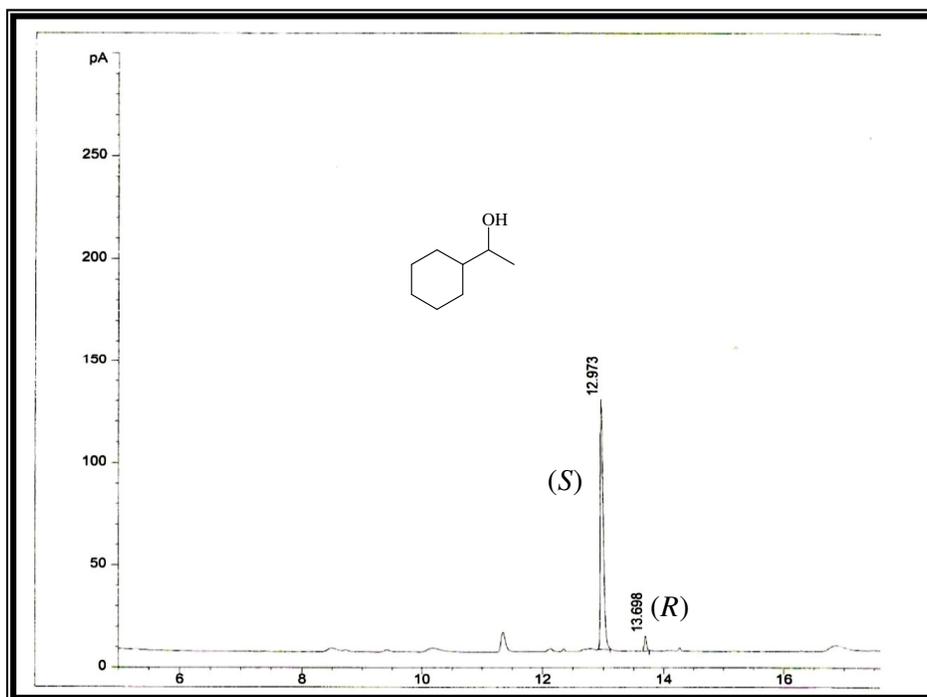


Figura 260: Cromatograma da biorredução da ciclo-hexilmetilcetona após 6 dias em coluna quiral



PARTE EXPERIMENTAL

5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1 Microrganismo

A cepa de *Lentinus strigellus* foi adquirida no Banco de Germoplasma de Cogumelos para Uso Humano da Embrapa de Brasília-DF, onde se encontra registrada na coleção sob o código CC-40. Este fungo foi coletado na cidade de Guaraqueçaba-PR.

5.2 Métodos Cromatográficos

5.2.1 Cromatografia em Gel de Sílica

As cromatografias de adsorção em coluna foram realizadas utilizando gel de sílica da VETEC (ϕ mm 0,063-0,200) cód. 195 e gel de sílica 60 da MERCK (ϕ mm 0,040-0,063). O comprimento e diâmetro das colunas variaram de acordo com as quantidades de amostra a serem cromatografadas e adsorventes utilizados.

As análises cromatográficas em camada delgada analítica (CCD) foram realizadas em cromatofolhas de alumínio e plástico cobertas com gel sílica 60 F₂₅₄ com CaSO₄ da MERCK e as preparativas foram realizadas em placas de vidro recoberta com gel de sílica 60 G da VETEC, preparadas no Laboratório de Biotecnologia e Síntese Orgânica da Universidade Federal do Ceará.

A revelação das substâncias nas cromatoplasmas foi feita pela exposição das mesmas à radiação ultravioleta (365 nm), empregando-se uma lâmpada UV modelo UVSL-25 da Mineral Light, e pulverização com solução de vanilina-ácido perclórico em etanol, seguido de aquecimento.

5.2.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

As separações cromatográficas por CLAE foram realizadas em um Hewlett Packard 1100 Chromatography, com detector de Ultravioleta (UV), do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidad de Oviedo (Espanha). Foram utilizadas as colunas Tracer Spherisorb, Daicel Chiralcel OD, Chiralpak AS e Chiralpak IA, variando as condições de análise de acordo com o substrato específico.

5.2.3 Cromatografia Gasosa acoplada a Detector de Ionização de Chama (CG/DIC)

As análises por cromatografia gasosa foram realizadas em equipamento cromatográfico Hewlett Packard 6890 Series II, do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidad de Oviedo (Espanha). As colunas HP-1 (Hewlett Packard), CP-Chirasil DEX CB (Varian) e RT-BETADEXse (Restek) foram empregadas (30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m, 1.0 bar N₂), variando as condições de análise de acordo com o substrato específico.

5.3 Métodos espectrométricos

5.3.1 Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹H) e de Carbono-13 (RMN ¹³C) uni- e bidimensionais, foram obtidos no Centro Nordestino de Aplicação e Uso de Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN), da Universidade Federal do Ceará, utilizando espectrômetro Bruker modelo Avance DRX-500, que opera na frequência do hidrogênio-1 a 500 MHz, e na frequência do carbono-13 a 125 MHz.

Nas dissoluções das amostras utilizou-se como solvente metanol, piridina e clorofórmio deuterados.

Nos espectros de hidrogênio-1 e carbono-13, os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e referenciados pelos picos do hidrogênio e do carbono pertencentes às moléculas residuais não deuteradas dos solventes. Os valores da tabela Cambrigde Isotope Laboratories Inc. foi empregada como referência.

As multiplicidades das bandas de absorção do hidrogênio nos espectros de RMN ¹H foram indicadas segundo a convenção: s (simpleto), d (dupleto), dd (duplo dupleto), ddd (duplo duplo dupleto), dl (dupleto largo), t (tripleto) e m (multipleto).

O padrão de hidrogenação dos carbonos foi descrito segundo a convenção: C (carbono não hidrogenado); CH (carbono metínico); CH₂ (carbono metilênico) e CH₃ (carbono metílico) e foi determinado através da técnica DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer) com ângulo de nutação de 135° (CH e CH₃ com amplitudes em oposição ao CH₂). Os carbonos não hidrogenados foram caracterizados pela subtração do espectro DEPT 135° do espectro BB.

5.3.2 Espectrometria de Massa (EM)

Os espectros de massa foram obtidos na Central Analítica do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, da Universidade Federal do Ceará em espectrômetro de massa QP5050A da SHIMADZU, operando com impacto eletrônico de 70 eV.

5.4 Ponto de Fusão

Os pontos de fusão não corrigidos foram obtidos no Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará em um aparelho digital da Micro Química, modelo MQAPF-302. As determinações foram realizadas a uma taxa de aquecimento de 4 °C/min.

5.5 Rotação Óptica

As rotações ópticas dos metabólitos secundários isolados de *L. strigellus* foram obtidas em polarímetro digital PERKIN ELMER 341, do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará. As rotações ópticas dos alcoóis produzidos nas reações de biotransformação foram obtidas em polarímetro digital PERKIN ELMER 241, do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade de Oviedo (Espanha).

5.6 Preparação dos Meios de Cultura

Na preservação do microrganismo e no cultivo prévio do microrganismo em placas de Petri foi utilizado o meio de cultura sólido batata-dextrose-ágar (BDA). No estudo químico de *L. strigellus* utilizou-se os meios de cultura líquidos peptona, Czapek e Czapek com caldo de batata. Nos estudos de biotransformação foi utilizado o meio de cultura sintético batata-dextrose (BD), adquirido da Sigma-Aldrich®. Na avaliação da atividade álcool desidrogenase (ADH) do microrganismo empregou-se o meio BDA acrescido de fuccina básica.

Depois de preparados, os meios foram distribuídos em erlenmeyers ou placas de Petri e autoclavados à 121 °C por 15 minutos antes da inoculação do microrganismos. O volume de cada meio nos erlenmeyers variou em função de cada experimento.

5.6.1 Meio BDA (batata-dextrose-ágar)

O meio de cultura BDA foi preparado utilizando o caldo proveniente do cozimento de batata inglesa em água destilada (200,0 g/L), seguido da filtração para retirada das partículas sólidas e adição de glicose (20,0 g/L) e ágar (17,0 g/L).

5.6.2 Peptona

O meio de cultura de peptona foi preparado utilizando peptona (1,0 g/L), extrato de levedura (2,0 g/L), glicose (39,0 g/L), KH_2PO_4 (1,0 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,2 g/L) e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (5,0 g/L).

5.6.3 Czapek

O meio de cultura Czapek foi preparado utilizando glicose (30,0 g/L), NaN_3 (3,0 g/L), KCl (0,5 g/L), KH_2PO_4 (1,0 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5 g/L) e $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,01 g/L).

5.6.4 Czapek com Caldo de Batata

O meio de cultura Czapek enriquecido com caldo de batata foi preparado utilizando o caldo proveniente do cozimento de batata inglesa em água destilada (200 g/L), seguido da filtração para retirada das partículas sólidas e adição de glicose (30,0 g/L), NaN_3 (3,0 g/L), KCl (0,5 g/L), KH_2PO_4 (1,0 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5 g/L) e $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,01 g/L).

5.6.5 BD

O meio de cultura BD foi preparado através da dissolução de 24,0 g do meio sintético da Sigma-Aldrich® em 1,0 L de água destilada.

5.6.6 BDA + fucsina básica

O meio de cultura BDA + fucsina foi preparado utilizando o caldo proveniente do cozimento de batata inglesa em água destilada (200,0 g/L), seguido da filtração para retirada das partículas sólidas, adição de glicose (20,0 g/L), ágar (17,0 g/L) e fucsina básica (25,0 mg em 5,0 mL de etanol).

5.7 Cultivos de *Lentinus strigellus*

5.7.1 Crescimento de *Lentinus strigellus* sob Condições Estáticas

O fungo *Lentinus strigellus* foi reativado através da sua incubação, de forma asséptica, em placas de Petri contendo o meio BDA a aproximadamente 29°C. O fungo foi mantido em crescimento por aproximadamente sete dias. Posteriormente, pequenos fragmentos (discos de 7,0 mm) foram distribuídos assepticamente em 30 erlenmeyers de 500,0 mL contendo aproximadamente 270,0 mL de meio de peptona por erlenmeyer (total de 8,0 L de meio de cultura), previamente autoclavados a 121 °C. O fungo foi mantido em crescimento durante 28 dias de forma estática e a temperatura ambiente (aproximadamente 29 °C). Após este período, o material foi filtrado em funil de Büchner, o micélio foi seco a temperatura ambiente até peso constante (17,5 g) e extraído com hexano, AcOEt e metanol. O filtrado (meio líquido) foi submetido à partição líquido-líquido com AcOEt. As frações orgânicas foram concentradas em evaporador rotativo e suas massas se apresentam na Tabela 25.

Tabela 26: Extratos obtidos no cultivo de *L. strigellus* em peptona sob condições estáticas

Fonte	Solvente	Fração	Massa (mg)
Micélio	Hexano	EHLS	520,0
	AcOEt	EAcLS	595,5
	MeOH	EMLS	1030,0
Meio líquido	AcOEt	PMeLS	1039,0

5.7.2 Crescimento de *Lentinus strigellus* Sob Agitação

Após o crescimento do fungo em placas de Petri, pequenos fragmentos (discos de 7 mm) foram distribuídos, assepticamente, em 30 erlenmeyers de 250,0 mL contendo aproximadamente 175,0 mL de meio (peptona, Czapek ou Czapek com caldo de batata) por erlenmeyer (total de 5,0 L de meio de cultura), previamente autoclavados a 121 °C. O fungo foi mantido em crescimento durante 28 dias sob agitação em mesa agitadora a 150 rpm. Após este período, o micélio foi filtrado em funil de Büchner e em seguida seco a temperatura ambiente até peso constante (peptona: 16,7 g; Czapek: 15,0 g; Czapek com caldo de batata: 15,5 g). O micélio foi submetido à extração com hexano,

AcOEt e metanol, e o filtrado foi particionado com AcOEt. Todos os extratos foram concentrados em evaporador rotativo e suas massas se encontram descritas na Tabela 26.

Tabela 27: Extratos obtidos nos cultivos de *L. strigellus* sob agitação

Meio	Solvente	Sigla	Massa (mg)
Peptona	Hexano	EHLISA	464,9
	AcOEt	EAcLSA	433,8
	MeOH	EMLSA	1210,0
	Partição	PMELSA	1410,0
Czapek	Hexano	EHLISAC	400,2
	AcOEt	EAcLSAC	295,0
	MeOH	EMLSAC	1400,0
	Partição	PMELISAC	1850,0
Czapek/batata	Hexano	EHLISACB	76,0
	AcOEt	EAcLSACB	392,9
	MeOH	EMLSACB	2257,0
	Partição	PMELISACB	1570,0

5.8 Isolamento de Metabolitos Secundários de *L. strigellus*

5.8.1 Isolamento de LS1

Durante a concentração do extrato AcOEt do micélio de *L. strigellus* obtido do cultivo em meio de peptona sob condições estáticas (Item 5.7.1, p. 189), observou-se a formação de um precipitado, o qual foi separado e pesado (37,7 mg). Este foi submetido a uma purificação em placa preparativa, eluída em hexano/AcOEt 50%, e forneceu 16,2 mg de um sólido branco amorfo, denominado de LS1 e identificado como sendo o alcalóide indólico echinulina (Item 4.2.1, p. 45).

5.8.2 Fracionamento Cromatográfico de EAcLS

O extrato EAcLS (380,0 mg), proveniente do cultivo de *L. strigellus* em meio de peptona sob condições estáticas, foi previamente adsorvido em uma pequena quantidade de gel de sílica *flash* e aplicado em coluna cromatográfica pré-empacotada com o mesmo adsorvente (16,0 g) em hexano. O material foi eluído com CHCl_3 (100,0 mL),

hexano/AcOEt 30% (100,0 mL), hexano/AcOEt 50% (100,0 mL) e MeOH (50,0 mL) e as frações foram analisadas por CCD para posterior agrupamento das mesmas de acordo com suas similaridades. Um total de 10 frações foi obtido, cujas massas encontram-se descritas na Tabela 27.

Tabela 28: Fracionamento cromatográfico de EAclS

Código	Frações agrupadas	Massa (mg)
EAclS 1	1-4	29,0
EAclS 2	5-12	59,0
EAclS 3	14-17	24,4
EAclS 4	18-19	14,1
EAclS 5	20-27	62,0
EAclS 6	28-31	6,6
EAclS 7	32-40	17,3
EAclS 8	41-45	12,9
EAclS 9	46-50	22,0
EAclS 10	(MeOH)	112,5
	TOTAL	359,8

5.8.3 Fracionamento cromatográfico de EAclS 2: isolamento de LS2

A fração EAclS 2 (59,0 mg), obtida no Item 5.8.2, foi previamente adsorvida em uma pequena quantidade de gel de sílica e aplicada em coluna cromatográfica pré-empacotada com gel de sílica (12,0 g) em hexano. O material foi eluído com hexano/AcOEt 5% (100,0 mL) e hexano/AcOEt 10% (100,0 mL), e as frações foram analisadas por CCD para posterior agrupamento. Foram obtidas três frações, as quais se encontram apresentadas na Tabela 28.

Tabela 29: Fracionamento cromatográfico de EAclS 2

Código	Frações agrupadas	Massa (mg)
EAclS 2,1	(1-14)	20,5
EAclS 2,2	(15-25)	5,0
EAclS 2,3	(26-34)	29,7
	TOTAL	55,2

A fração EAcLS 2,2 apresentou-se como sólido cristalino, vermelho, em forma de agulhas, que foi identificado como sendo a antraquinona fisiona (Item 4.2.2, p. 59).

5.8.4 Fracionamento cromatográfico de PMeLSA

A fração PMeLSA (865,0 mg), obtida no Item 5.7.2, foi dissolvida em metanol, aplicada com uma pipeta em coluna cromatográfica pré-empacotada com sephadex (40,0 g) em metanol e eluída com 450,0 mL do mesmo solvente. Em seguida, as frações foram analisadas por CCD e agrupadas conforme a Tabela 29.

Tabela 30: Fracionamento cromatográfico de PMeLSA

Código	Frações agrupadas	Massa (mg)
PMeLSA 1	(10-16)	3,4
PMeLSA 2	(17-26)	20,2
PMeLSA 3	(27-28)	32,0
PMeLSA 4	(29-31)	158,7
PMeLSA 5	(32-39)	459,8
PMeLSA 6	(40-42)	58,7
PMeLSA 7	(43-49)	60,9
PMeLSA 8	(50-59)	36,4
	TOTAL	830,1

5.8.5 Fracionamento Cromatográfico de PMeLSA 4: Isolamento de LS3

A fração PMeLSA 4 (158,0 mg), foi adsorvida em uma pequena quantidade de gel de sílica e aplicada em uma coluna cromatográfica pré-empacotada com gel de sílica tipo *flash* (18,0 g) em hexano. O material foi eluído com hexano/AcOEt 20% (100,0 mL), hexano/AcOEt 30% (200,0 mL), hexano/AcOEt 50% (200,0 mL), AcOEt (100,0 mL) e MeOH (100,0 mL). Em seguida as frações foram analisadas por CCD e reunidas conforme a Tabela 30 (p. 193).

Tabela 31: Fracionamento cromatográfico de PMeLSA 4

Código	Frações agrupadas	Massa (mg)
PMeLSA 4,1	(1-5)	3,5
PMeLSA 4,2	(6)	1,2
PMeLSA 4,3	(7-18)	10,2
PMeLSA 4,4	(19-36)	10,6
PMeLSA 4,5	(37-46)	4,7
PMeLSA 4,6	(47-57)	12,8
PMeLSA 4,7	(60-70)	3,7
PMeLSA 4,8	(71-77)	7,9
PMeLSA 4,9	(78-85)	10,7
PMeLSA 4,10	(86-89)	1,4
PMeLSA 4,11	(MeOH)	90,7
	TOTAL	157,4

A fração PMeLSA 4,6 apresentou-se como um líquido viscoso marrom, identificado como sendo o 4-hidroxi-2,2-dimetil-6-metoxicromano (Item 4.2.3, p. 67).

5.8.6 Fracionamento Cromatográfico de PMeLSA 5: Isolamento de LS4

A fração PMeLSA 5 (459,0 mg), obtida no Item 5.8.5, foi dissolvida em uma mistura de hexano/AcOEt 20% e aplicada em coluna cromatográfica pré-empacotada com gel de sílica tipo *flash* (35,0 g) em hexano/AcOEt 20%. O material foi eluído com hexano/AcOEt 20% (300,0 mL), hexano/AcOEt 30% (300,0 mL), hexano/AcOEt 50% (300,0 mL), AcOEt (200,0 mL) e MeOH (100,0 mL). Em seguida, as frações foram analisadas por CCD e agrupadas conforme a Tabela 31 (p. 194).

Tabela 32: Fracionamento cromatográfico de PMeLSA 5

Código	Frações agrupadas	Massa (mg)
PMeLSA 5,1	(3-7)	35,6
PMeLSA 5,2	(8-15)	20,0
PMeLSA 5,3	(16-21)	4,6
PMeLSA 5,4	(22-43)	13,1
PMeLSA 5,5	(44-63)	48,2
PMeLSA 5,6	(64-65)	1,0
PMeLSA 5,7	(67-78)	6,7
PMeLSA 5,8	(77-90)	6,1
PMeLSA 5,9	(91-101)	43,8
PMeLSA 5,10	(102-120)	14,5
PMeLSA 5,11	(121-135)	6,3
PMeLSA 5,12	(136-150)	6,7
PMeLSA 5,13	(151-178)	15,1
PMeLSA 5,14	(MeOH)	216,6
	TOTAL	438,3

A fração PMeLSA 5,1 apresentou-se como um líquido viscoso levemente esverdeado, identificado como sendo a 2,2-dimetil-6-metoxicroman-4-ona (Item 4.2.4, p. 77).

5.8.7 Fracionamento Cromatográfico de PMeLSA 5,5: Isolamento de LS5

A fração PMeLSA 5,5 (38,0 mg), obtida no Item 5.8.7, foi adsorvida em uma pequena quantidade de gel de sílica tipo *flash*, aplicada em uma coluna cromatográfica pré-empacotada com o mesmo adsorvente (14,0 g) em hexano. Após eluição com clorofórmio (100,0 mL), hexano/AcOEt (100,0 mL) e AcOEt (50,0 mL), as frações foram analisadas por CCD e agrupadas para gerar três novas frações (Tab. 32, p. 195).

Tabela 33: Fracionamento cromatográfico de PMeLSA 5,5

Código	Frações agrupadas	Massa (mg)
PMeLSA 5,5,1	(1-10)	0,7
PMeLSA 5,5,2	(11-15)	35,0
PMeLSA 5,5,3	(19-25)	1,8
	TOTAL	37,5

A fração PMeLSA 5,5,2 apresentou-se como um líquido viscoso marrom, identificado como sendo o 3*R*,4*S*-dihidroxi-2,2-dimetil-6-metoxicromano (Item 4.2.5, p. 86).

5.8.8 Fracionamento Cromatográfico de PMeLSACB

A fração PMeLSACB (1500 mg), obtida no Item 5.7.2, foi dissolvida em metanol e aplicada com uma pipeta em uma coluna cromatográfica pré-empacotada com sephadex (40,0 g). Metanol (400,0 mL) foi empregado como eluente e foram recolhidas frações de 50,0 mL. Em seguida as frações foram analisadas por CCD e agrupadas conforme a Tabela 33.

Tabela 34: Fracionamento cromatográfico de PMeLSACB

Código	Frações agrupadas	Massa (mg)
PMeLSACB 1	(1)	5,3
PMeLSACB 2	(2-3)	51,8
PMeLSACB 3	(4-5)	138,9
PMeLSACB 4	(6-8)	1302,4
	TOTAL	1498,4

5.8.9 Fracionamento cromatográfico de PMeLSACB 4

A fração PMeLSACB 4 (1300,0 mg) foi misturada com uma pequena quantidade de gel de sílica e aplicada em uma coluna cromatográfica pré-empacotada com gel de sílica (70,0 g) em hexano. O material foi eluído com os seguintes solventes: clorofórmio (400,0 mL), hexano/AcOEt 40% (300,0 mL), hexano/AcOEt 60% (300,0 mL), hexano/AcOEt 80% (350,0 mL), AcOEt (400,0 mL) e MeOH (100,0 mL), sendo recolhidas frações de 80,0 mL. Em seguida, as frações foram analisadas por CCD e agrupadas conforme a Tabela 34 (p. 196).

Tabela 35: Fracionamento cromatográfico de PMeLSACB 4

Código	Frações agrupadas	Massa (mg)
PMeLSACB 4,1	(1)	7,0
PMeLSACB 4,2	(2-4)	120,0
PMeLSACB 4,3	(5-9)	40,5
PMeLSACB 4,4	(10-11)	51,5
PMeLSACB 4,5	(12-15)	61,8
PMeLSACB 4,6	(16-18)	142,8
PMeLSACB 4,7	(19-20)	101,0
PMeLSACB 4,8	(21-25)	234,2
PMeLSACB 4,9	(26-30)	158,9
PMeLSACB 4,10	(MeOH)	350,9
	TOTAL	1268,6

5.8.10 Fracionamento Cromatográfico de PMeLSACB 4,2: Isolamento de LS4

A fração PMeLSACB 4,2 (120,0 mg) foi dissolvida em uma pequena quantidade de uma mistura de hexano/AcOEt 10% e esta foi aplicada com uma pipeta em uma coluna cromatográfica pré-empacotada em gel de sílica (14,0 g) utilizando a mesma mistura de solvente. O material foi eluído com hexano/AcOEt 10% (200,0 mL), hexano/AcOEt 20% (100,0 mL) e AcOEt (100,0 mL). Em seguida as frações foram analisadas por CCD e agrupadas conforme a Tabela 35.

Tabela 36: Fracionamento cromatográfico de PMeLSACB 4,2

Código	Frações agrupadas	Massa (mg)
PMeLSACB 4,2,1	(1-8)	2,2
PMeLSACB 4,2,2	(10-25)	107,0
PMeLSACB 4,2,3	(26-39)	2,1
PMeLSACB 4,2,4	(40-50)	2,7
	TOTAL	114,0

A fração PMeLSACB 4,2,2, apresentou-se como um líquido viscoso, que após análise por CCD, sugeriu tratar-se de um composto puro. Comparação dos seus dados de RMN ^1H com os de LS4, revelou tratar-se da mesma molécula.

5.8.11 Fracionamento Cromatográfico de PMeLSACB 4,4: Isolamento de LS5

A fração PMeLSACB 4,4 (50,0 mg), foi adsorvida numa pequena quantidade de gel de sílica *flash* e aplicada em uma coluna cromatográfica pré-empacotada com o mesmo adsorvente (14,0 g) em hexano. O material foi eluído com hexano/AcOEt 20% (200,0 mL), hexano/AcOEt 30% (100,0 mL), hexano/AcOEt 40% (100,0 mL) e AcOEt (100,0 mL). Em seguida as frações foram analisadas por CCD e agrupadas conforme a Tabela 36.

Tabela 37: Fracionamento cromatográfico de PMeLSACB 4

Código	Frações agrupadas	Massa (mg)
PMeLSACB 4,4,1	(1-8)	5,7
PMeLSACB 4,4,2	(9-20)	26,7
PMeLSACB 4,4,3	(21-40)	8,2
PMeLSACB 4,4,4	(AcOEt)	8,6
	TOTAL	49,2

A fração PMeLSACB 4,4,2 apresentou-se como um líquido viscoso, que após análise por CCD, sugeriu tratar-se de um composto puro, e após comparação com RMN ^1H mostrou-se tratar do mesmo composto de LS5.

5.8.12 Fracionamento Cromatográfico de PMeLSACB 4,5: Isolamento de LS6

A fração PMeLSACB 4,5 (61,8 mg), foi adsorvida numa pequena quantidade de gel de sílica *flash* e aplicada em uma coluna cromatográfica pré-empacotada com este mesmo adsorvente (18,0 g) em hexano. O material foi eluído com hexano/AcOEt 30% (200,0 mL), hexano/AcOEt 40% (200,0 mL) e AcOEt (100,0 mL). Em seguida as frações foram analisadas por CCD e agrupadas conforme a Tabela 37 (p. 198).

Tabela 38: Fracionamento cromatográfico de PMeLSACB 4,5

Código	Frações agrupadas	Massa (mg)
PMeLSACB 4,5,1	(1-5)	2,7
PMeLSACB 4,5,2	(9-15)	6,5
PMeLSACB 4,5,3	(16-20)	9,3
PMeLSACB 4,5,4	(AcOEt)	40,2
	TOTAL	58,7

A fração PMeLSACB 4,5,2 apresentou-se como um líquido viscoso levemente esverdeado, que após análise por CCD, sugeriu tratar-se de um único composto, que foi identificado como sendo o (3*S*,4*S*)-3,4-dihidroxi-2,2-dimetil-6-metoxicromano (Item 4.2.6, p. 95).

5.8.13 Fracionamento Cromatográfico de PMeLSACB 4,6

A fração PMeLSACB 4,6 (142,8 mg), foi dissolvida em uma mistura de hexano/AcOEt 30% e aplicada com uma pipeta em uma coluna cromatográfica pré-empacotada em gel de sílica *flash* (18,0 g) em hexano/AcOEt 30%. O material foi eluído com hexano/AcOEt 30% (300,0 mL), hexano/AcOEt 40% (100,0 mL) e AcOEt (100,0 mL). Em seguida as frações foram analisadas por CCD e reunidas conforme a Tabela 38.

Tabela 39: Fracionamento cromatográfico de PMeLSACB 4,6

Código	Frações agrupadas	Massa (mg)
PMeLSACB 4,6,1	(1-10)	18,0
PMeLSACB 4,6,2	(11-25)	57,0
PMeLSACB 4,6,3	(26-30)	35,1
PMeLSACB 4,6,4	(31-40)	20,0
	TOTAL	130,1

A fração PMeLSACB 4,6,1 apresentou-se como um líquido viscoso, que após análise por CCD, sugeriu tratar-se de um composto puro, e após comparação com RMN ¹H mostrou-se tratar do mesmo composto de LS3.

5.8.14 Fracionamento Cromatográfico de PMeLSAC

A fração PMeLSAC (1400,0 mg), obtida no Item 5.7.2, foi dissolvida em metanol e aplicada com uma pipeta em uma coluna cromatográfica pré-empacotada com sephadex (40,0 g) em metanol. O material foi eluído com 500,0 mL desse mesmo solvente, sendo recolhidas cinco frações de 100,0 mL (Tab. 39).

Tabela 40: Fracionamento cromatográfico de PMeLSAC

Código	Frações agrupadas	Massa (mg)
PMeLSAC 1	(1)	7,2
PMeLSAC 2	(2)	62,0
PMeLSAC 3	(3)	1070,0
PMeLSAC 4	(4)	180,5
PMeLSAC 5	(5)	21,7
	TOTAL	1341,4

5.8.15 Fracionamento cromatográfico de PMeLSAC 3

Uma alíquota da fração PMeLSAC 3 (1040,0 mg), obtida no Item 5.8.15, foi misturada com uma pequena quantidade de gel de sílica e aplicada em uma coluna cromatográfica pré-empacotada com o mesmo adsorvente (70,0 g) em hexano. O material foi eluído com hexano/AcOEt 50% (300,0 mL), acetona (200,0 mL) e metanol (100,0 mL), sendo recolhida frações de 50,0 mL. Em seguida, as frações foram analisadas por CCD e agrupadas de acordo com a Tabela 40.

Tabela 41: Fracionamento cromatográfico de PMeLSAC 3

Código	Frações agrupadas	Massa (mg)
PMeLSAC 3,1	(1-3)	555,0
PMeLSAC 3,2	(4-5)	132,5
PMeLSAC 3,3	(6)	78,6
PMeLSAC 3,4	(7-8)	235,1
PMeLSAC 3,5	(9-10)	31,5
	TOTAL	1032,7

5.8.16 Fracionamento Cromatográfico de PMeLSAC 3,1

A fração PMeLSAC 3,1 (555,0 mg), obtida no Item 5.8.16, foi dissolvida em hexano/AcOEt 50% e aplicada em uma coluna cromatográfica pré-empacotada em gel

de sílica tipo *flash* (35,0 g) em hexano/AcOEt 50%. Em seguida, o material foi eluído com 200,0 mL da mesma mistura de solvente, seguido de hexano/AcOEt 70% (100,0 mL), AcOEt (100,0 mL) e metanol (100,0 mL). Posteriormente, as frações foram analisadas por CCD e reunidas conforme a Tabela 41.

Tabela 42: Fracionamento cromatográfico de PMeLSAC 3,1

Código	Frações agrupadas	Massa (mg)
PMeLSAC 3,1,1	(1-6)	65,9
PMeLSAC 3,1,2	(7-9)	28,1
PMeLSAC 3,1,3	(10-17)	170,0
PMeLSAC 3,1,4	(18-20)	28,5
PMeLSAC 3,1,5	(21-25)	50,5
PMeLSAC 3,1,6	(AcOEt)	32,9
PMeLSAC 3,1,7	(MeOH)	172,5
	TOTAL	548,4

5.8.17 Fracionamento Cromatográfico de PMeLSAC 3,1,3: Isolamento de LS7

A fração PMeLSAC 3,1,3 (170,0 mg), obtida no Item 5.8.17, foi adsorvida em uma pequena quantidade de gel de sílica tipo *flash* e aplicada em uma coluna cromatográfica pré-empacotada com o mesmo adsorvente (17,0 g) em hexano. Em seguida, o material foi eluído com 200,0 mL de clorofórmio e 100,0 mL de metanol. As frações foram analisadas por CCD e agrupadas conforme na Tabela 42.

Tabela 43: Fracionamento cromatográfico de PMeLSAC 3,1,3

Código	Frações agrupadas	Massa (mg)
PMeLSAC 3,1,3,1	(5-35)	90,5
PMeLSAC 3,1,3,2	(MeOH)	70,0
	TOTAL	160,5

A fração PMeLSAC 3,1,3,1 apresentou-se como um líquido viscoso marrom que, após análise por CCD, foi identificado como sendo a panepoxidona (Item 4.2.7, p. 100).

5.8.18 Fracionamento Cromatográfico de PMeLSAC 3,1,5: Isolamento de LS8

A fração PMeLSAC 3,1,5 (50,5 mg), obtida no Item 5.8.17, foi adsorvida numa pequena quantidade de gel de sílica *flash* e aplicada em uma coluna cromatográfica pré-empacotada em gel de sílica *flash* (14,0 g) com hexano. O material foi eluído com hexano/AcOEt 20% (200,0 mL), hexano/AcOEt 40% (100,0 mL) e metanol (100,0 mL). Em seguida as frações foram analisadas por CCD e agrupadas conforme a Tabela 43.

Tabela 44: Fracionamento cromatográfico de PMeLSAC 3,1,5

Código	Frações agrupadas	Massa (mg)
PMeLSAC 3,1,5,1	(4-25)	10,5
PMeLSAC 3,1,5,2	(26-45)	25,7
PMeLSAC 3,1,5,3	(MeOH)	10,9
	TOTAL	47,1

A fração PMeLSAC 3,1,5,2 apresentou-se como um líquido viscoso marrom, identificado como sendo a isopanepoxidona (Item 4.2.8, p. 109).

5.9 Bioprospecção de Atividade Álcool Desidrogenase (ADH) de *L. strigellus*

A atividade ADH foi detectada pelo método de difusão em gel, empregando-se como meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) suplementado com 0,1% de fucsina básica e crescimento vegetativo de 7 dias. Os ensaios foram realizados em triplicata e a atividade ADH foi observada através do emprego do fungo *Fusarium oxysporum* como controle positivo.

5.10 Emprego de *L. strigellus* em Reações de Biorredução

5.10.1 Substratos Utilizados nas Reações de Biorredução

Para as reações de biorredução empregando *L. strigellus* foram utilizadas as seguintes cetonas pró-quirais, de procedência Sigma–Aldrich®: acetofenona (**84**), 2'-metoxiacetofenona (**85**), 2'-nitroacetofenona (**86**), 3'-metoxiacetofenona (**87**), 3'-nitroacetofenona (**88**), 4'-metoxiacetofenona (**89**), 4'-nitroacetofenona (**90**), 4'-metilacetofenona (**91**), 2-cloroacetofenona (**100**), 2,3',4'-triclouroacetofenona (**101**), 4-

cloroacetato de metila (**104**), octan-2-ona (**105**), undecan-2-ona (**106**) e 1-ciclo-hexilmetilcetona (**107**).

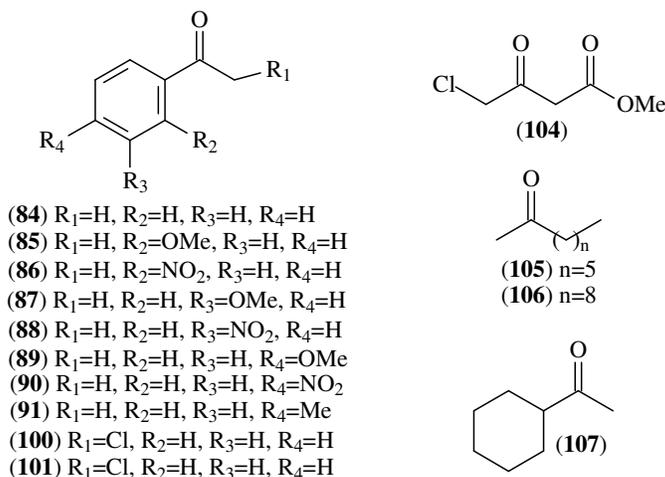


Figura 261: Cetonas pró-quirais empregadas nas reações de biorredução

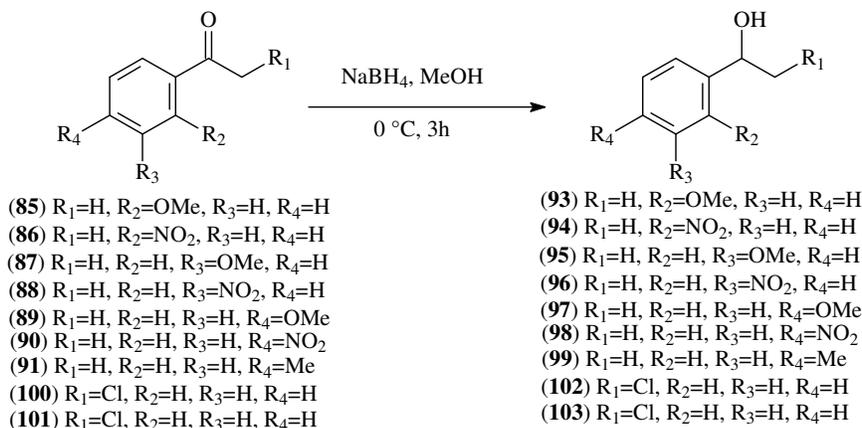
5.10.2. Álcoois e Ésteres Racêmicos Padrões

Os alcoóis racêmicos 1-feniletan-1-ol (**92**), 4-cloro-3-hidroxi-butanoato de metila (**108**), octan-2-ol (**109**) e undecan-2-ol (**110**) e foram adquiridos da Sigma–Aldrich® e o 1-ciclo-hexiletan-1-ol (**111**) da Alfa Aesar®. Os demais alcoóis foram obtidos pela redução química das cetonas comerciais correspondentes, conforme procedimento descrito no Item 5.10.3.

Os ésteres dos alcoóis racêmicos 1-ciclo-hexiletan-1-ol, octan-2-ol, undecan-2-ol e 4-cloro-3-hidroxi-butanoato de metila foram obtidos pela acetilação química dos alcoóis correspondentes com DMAP e anidrido acético em acetato de etila (GUPTA *et al.*, 2008).

5.10.3 Redução Química das Cetonas Aromáticas Comerciais (NUNES *et al.*, 2005)

As reações de redução químicas foram realizadas empregando uma solução contendo o substrato em metanol seco a 0 °C, sob atmosfera de nitrogênio, foi adicionado boridreto de sódio a mistura reacional e mantida sob agitação durante 3 h (Esquema 4, p. 203). Após este período a reação foi interrompida pela adição de água destilada e o material orgânico extraído com AcOEt (3×100,0 mL). As fases orgânicas foram combinadas e secas com Na₂SO₄ anidro, após destilação do solvente orgânico em rotaevaporador. Os produtos de cada reação foram purificados por cromatografia *flash* e os resultados são mostrados na Tabela 44 (p. 203).



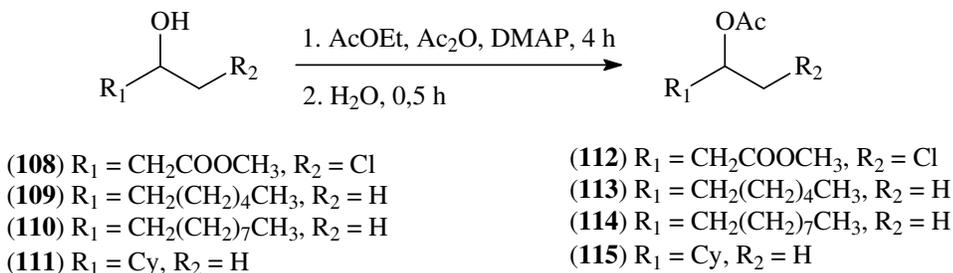
Esquema 4: Redução química das cetonas aromáticas

Tabela 45: Resultado das reduções químicas das cetonas aromáticas

Cetona	mMOL da cetona	mMOL de NaBH ₄	Rendimento
2'-metoxiacetofenona	1,3	5,1	74,0%
3'-metoxiacetofenona	1,3	5,1	85,7%
4'-metoxiacetofenona	1,3	5,1	96,0%
2'-nitroacetofenona	1,2	4,8	97,0%
3'-nitroacetofenona	1,2	4,8	95,0%
4'-nitroacetofenona	1,2	4,8	97,0%
4'-metilcetofenona	1,5	5,8	94,0%
2-clorocetofenona	1,3	5,1	83,0%
2,3',4'-triclorocetofenona	0,9	3,5	90,0%

5.10.4. Acetilação das Cetonas Alifáticas Comercias.

As acetilações foram realizadas dissolvendo as cetonas em AcOEt e usando como meio reacional anidrido acético e DMAP. O sistema foi mantido sob agitação por 4 h, seguido da adição de H₂O e posterior agitação por 30 minutos. A fase orgânica foi separada e analisada por CG/DIC (coluna quiral).



Esquema 5: Acetilação química dos alcoóis alifáticos

Tabela 46: Resultado das reduções químicas dos alcoóis alifáticos

Álcool	Álcool (μL)	DMAP*	Ac ₂ O (μL)	Rendimento
1-ciclo-hexiletan-1-ol	$1,6 \times 10^{-2}$		$3,2 \times 10^{-2}$	100
Octan-2-ol	$1,5 \times 10^{-2}$		$3,2 \times 10^{-2}$	100
Undecan-2-ol	$0,1 \times 10^{-3}$		$3,2 \times 10^{-2}$	100
4-cloro-3-hidroxi-butanoato de metila	$0,6 \times 10^{-3}$		$3,2 \times 10^{-2}$	100

*Quantidades catalíticas

5.10.5 Quantificação dos Alcoóis Obtidos nas Biorreduções

A quantificação dos alcoóis obtidos através da biorredução das cetonas pró-quirais foi realizada através de curvas de calibração dos alcoóis obtidos pelo método químico clássico. Soluções estoques desses alcoóis nas concentrações de 0,05 – 0,5 mmol foram analisadas em CLAE e os valores numéricos referentes às áreas foram plotados em uma curva de calibração (concentração *versus* área).

5.10.6 Biorredução de Cetonas Pró-Quirais por Células em Crescimento de *Lentinus strigellus*

O estudo da biorredução de cetonas pró-quirais para obtenção de alcoóis opticamente ativos foi realizado empregando-se células em crescimento do basidiomiceto *Lentinus strigellus*.

Para este estudo, o microrganismo foi inoculado de forma asséptica em erlenmeyers de 100,0 mL (cada um contendo 50,0 mL do meio de cultura batata-dextrose – 24,0 g/L) previamente autoclavados a 121 °C durante 15 minutos. Em seguida, os frascos foram mantidos sob agitação durante 7 dias a 200 rpm e 28°C em mesa agitadora. Após este período, foram adicionados 10,0 mg do substrato e retiradas alíquotas de 1,0 mL do meio reacional nos seguintes tempos: 1, 3 e 6 dias. Todas as reações foram realizadas em triplicata.

5.10.6.1 Preparação e Análise das Amostras por CLAE

Alíquotas de 1,0 mL provenientes das reações de biorredução das cetonas aromáticas foram extraídas com AcOEt (3 x 2,0 mL). A fase orgânica foi seca com

Na₂SO₄ anidro, concentrada em evaporador rotativo e dissolvida em 1,0 mL de hexano/isopropanol 10% para ser analisada por CLAE. As condições utilizadas para análise dessas alíquotas estão descritas no item 5.10.6.3.

5.10.6.2 Preparação e Análise das Amostras por CG/DIC

As alíquotas provenientes das reações de biorredução das cetonas alifáticas foram extraídas com AcOEt (3 x 2,0 mL). A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ anidro, concentrada em evaporador rotativo e dissolvida em 1,0 mL de AcOEt para ser analisada por CG/DIC. A coluna HP-1 (Hewlett Packard) foi empregada na determinação dos rendimentos reacionais e as condições de análise estão descritas no item 5.10.6.3.

Os excessos enantioméricos dos alcoóis alifáticos foram determinados através dos seus respectivos acetatos (Item 5.10.4, p. 203).

5.10.6.3 Parâmetros Cromatográficos Utilizados nas Análises de Biorredução

1-feniletan-1-ol (**92**):

Separação aquiral: CLAE: 0,8 mL/min; Hexano/isopropanol (95:5); 20 °C; 27 bar; 10,0 µL de injeção: cetona (5,8 min) e álcool (8,4 min). Coluna Spherisorb.

Separação quiral: CLAE: 0,8 mL/min; Hexano/isopropanol (95:5); 20 °C; 32 bar; 10,0 µL de injeção: (*R*)-enantiômero 15,4 e (*S*)-enantiômero 10,2 min. Coluna Chiralcel OB-H.

1-(2-metoxifenil)etan-1-ol (**93**):

Separação aquiral: CLAE 0,8 mL/min; Hexano/isopropanol (95:5); 20 °C; 29 bar; 10,0 µL de injeção: cetona (6,3 min) e álcool (7,1 min). Coluna Spherisorb.

Separação quiral: CLAE 0,8 mL/min; Hexano/isopropanol (95:5); 20 °C; 32 bar; 10,0 µL de injeção: (*S*)-enantiômero 10,3 e (*R*)-enantiômero 16,9 min. Coluna Chiralcel OB-H.

1-(2-nitrofenil)etan-1-ol (**94**):

Separação aquiral: CLAE 0,8 mL/min; Hexano/isopropanol (90:10); 20 °C; 29 bar; 10,0 µL de injeção: cetona (8,9 min) e álcool (6,3 min). Coluna Spherisorb.

Separação quiral: CLAE 0,8 mL/min; Hexano/isopropanol (95:5); 20 °C; 32 bar; 10,0 µL de injeção: (*R*)-enantiômero 22,1 e (*S*)-enantiômero 24,0 min. Coluna Chiralpak AS.

1-(3-metoxifenil)etan-1-ol (**95**):

Separação aquiral: CLAE 0,8 mL/min; Hexano/isopropanol (95:5); 20 °C; 27 bar; 10,0 µL de injeção: cetona (5,8 min) e álcool (8,4 min). Coluna Spherisorb

Separação quiral: CLAE 0,8 mL/min; Hexano/isopropanol (90:10); 20 °C; 31 bar; 10,0 µL de injeção: (*S*)-enantiômero 13,7 e (*R*)-enantiômero 18,8 min. Coluna Chiralcel OB-H.

1-(3-nitrofenil)etan-1-ol (**96**):

Separação aquiral: CLAE: 0,8 mL/min; Hexano/isopropanol (95:5); 20 °C; 29 bar; 10,0 µL de injeção: cetona (9,2 min) e álcool (12,0 min). Coluna Spherisorb.

Separação quiral: CLAE: 0,8 mL/min; Hexano/isopropanol (90:10); 20 °C; 31 bar; 10,0 µL de injeção: (*S*)-enantiômero 13,2 e (*R*)-enantiômero 14,8 min. Coluna Chiralcel OB-H.

1-(4-metoxifenil)etan-1-ol (**97**):

Separação aquiral: CLAE 0,8 mL/min; Hexano/isopropanol (95:5); 20 °C; 29 bar; 10,0 µL de injeção: cetona (7,5 min) e álcool (8,5 min). Coluna Spherisorb.

Separação quiral: CLAE: 0,8 mL/min; Hexano/isopropanol (90:10); 20 °C; 32 bar; 10,0 µL de injeção: (*S*)-enantiômero 14,4 e (*R*)-enantiômero 20,4 min. Coluna Chiralcel OB-H.

1-(4-nitrofenil)etan-1-ol (**98**):

Separação aquiral: CLAE: 0,8 mL/min; Hexano/isopropanol (90:10); 20 °C; 30 bar; 10,0 µL de injeção: cetona (6,5 min.) e álcool (7,7 min.). Coluna Spherisorb.

Separação quiral: CLAE: 0,8 mL/min; Hexano/isopropanol (80:20); 20 °C; 19 bar; 10,0 µL de injeção: (*S*)-enantiômero 13,7 e (*R*)-enantiômero 15,8 min. Coluna Chiralpak AS.

1-(4-metilfenil)etan-1-ol (**99**):

Separação aquiral: CLAE: 0,8 mL/min; Hexano/isopropanol (97:3); 20 °C; 27 bar; 10,0 µL de injeção: cetona (5,6 min.) e álcool (8,1 min.). Coluna Spherisorb.

Separação quiral: CLAE: 0,8 mL/min; Hexano/isopropanol (90:10); 20 °C; 33 bar; 10,0 µL de injeção: (*S*)-enantiômero 7,6 e (*R*)-enantiômero 9,1 min. Coluna Chiralcel OB-H.

2-clorofeniletan-1-ol (**102**):

Separação aquiral: CLAE 0,8 mL/min; Hexano/isopropanol (97:3); 20 °C; 27 bar; 10,0 µL de injeção: cetona (5,4 min) e álcool (6,4 min). Coluna Spherisorb.

Separação quiraral: CLAE 0,8 mL/min; Hexano/isopropanol (95:5); 20 °C; 31 bar; 10,0 µL de injeção: (*R*)-enantiômero 13,1 e (*S*)-enantiômero 17,2 min. Coluna Chiralcel OB-H.

2-cloro-1-(3,4-diclorofenil)etan-1-ol (**103**):

Separação aquiral: CLAE 0,8 mL/min; Hexano/isopropanol (95:5); 20 °C; 27 bar; 10,0 µL de injeção: cetona (4,9 min) e álcool (6,3 min). Coluna Spherisorb.

Separação quiraral: CLAE 0,8 mL/min; Hexano/isopropanol (95:5); 20 °C; 25 bar; 10,0 µL de injeção: (*S*)-enantiômero 13,2 e (*R*)-enantiômero 15,1 min. Coluna Chiralpak IA.

4-cloro-3-hidroxibutanoato de metila (**108**):

Separação aquiral: CG; Coluna HP1; Injetor 225 °C, Detector 250 °C e 1,0 µL de injeção; 70°C/4 min (20 °C/min) 150°C cetona 3,6 min e álcool 4,2 min

Separação quiraral: CG; Coluna RT-BETADEXse; Injetor 225 °C, Detector 250 °C e 1,0 µL de injeção; 90°C/5 min (2,5 °C/min) 105°C (5 °C/min) 130°C/2min (20 °C/min) 180°C/3min; álcool 20,3 (*R*) min e 20,6 (*S*) min.

Octan-2-ol (**109**):

Separação aquiral: CG; Coluna HP1; Injetor 225 °C, Detector 250 °C e 1,0 µL de injeção; 70°C/4 min (20 °C/min) 150°C; cetona 3,0 min e álcool 3,3 min.

Separação quiraral: CG; Coluna RT-BETADEXse; detector 225 °C, Detector 250 °C e 1,0 µL de injeção 90°C/5 min (2,5 °C/min) 105°C (5 °C/min) 130°C/2min (20 °C/min) 180°C/3min; álcool 14,7 (*S*) min e 16,4 (*R*) min.

Undecan-2-ol (**110**):

Separação aquiral: CG; Coluna HP1; Injetor 225 °C, Detector 250 °C e 1,0 µL de injeção; 70°C/4 min (20 °C/min) 100°C (5 °C/min) 130°C (20 °C/min) 200°C; cetona 8,4 min e álcool 8,8 min.

Separação quiraral: CG; Coluna CP CHIRASIL-DEX CB; Injetor 225 °C, Detector 250 °C e 1,0 µL de injeção; 90°C/5 min (2,5 °C/min) 105°C (20 °C/min) 140°C (2,5 °C/min) 160°C/15min (20 °C/min) 180°C; álcool 17,0 (*S*) min e 17,7 (*R*) min.

1-ciclo-hexiletan-1-ol (**111**):

Separação aquiral: CG; Coluna HP1; Injetor 225 °C, Detector 250 °C e 1,0 µL de injeção; 70°C/4 min (20 °C/min) 100°C (5 °C/min) 130°C (20 °C/min) 200°C; cetona 3,7 min e álcool 4,2 min.

Separação quiral: CG; Coluna CP CHIRASIL-DEX CB; Injetor 225 °C, Detector 250 °C e 1,0 µL de injeção; 90°C/5 min (2.5 °C/min) 105°C (20 °C/min) 140°C (2.5 °C/min) 160°C/15min (20 °C/min) 180°C; álcool 13,0 (*S*) min e 13,7 (*R*) min.



CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

O potencial químico do basidiomiceto *Lentinus strigellus* foi investigado, através do isolamento de metabólitos secundários produzidos pelo microrganismo em meios de cultura variados, e do emprego de suas células em crescimento como biocatalisador na redução de cetonas pró-quirais.

Do cultivo de *L. strigellus* em três meios distintos, foi possível isolar e caracterizar oito metabólitos secundários, sendo quatro benzopiranos (2,2-dimetil-6-metoxicroman-4-ona, 4-hidroxi-2,2-dimetil-6-metoxicromano, (3*R*,4*S*)-3,4-dihidroxi-2,2-dimetil-6-metoxicromano e (3*S*,4*S*)-3,4-dihidroxi-2,2-dimetil-6-metoxicromano), um alcalóide indólico (echinulina), uma antraquinona (fisciona), além da panepoxidona e seu derivado isopanepoxidona. Os benzopiranos 2,2-dimetil-6-metoxicroman-4-ona e 4-hidroxi-2,2-dimetil-6-metoxicromano foram os únicos metabólitos secundários isolados de dois meios de cultura distintos (peptona e Czapeck enriquecido com caldo de batata). Do meio de cultura mais pobre em nutrientes (Czapeck) foram isoladas a panepoxidona e a isopanepoxidona. Os únicos metabólitos isolados do micélio do fungo (crescido em peptona) foram a echinulina e a fisciona, os quais são descritos pela primeira vez no gênero *Lentinus*. Estes resultados mostraram que *L. strigellus* é produtor de diferentes classes de metabólitos secundários, biologicamente ativos, sendo a maioria produzida também por espécies congêneres. A produção destes compostos mostrou-se dependente do meio de cultura empregado.

Células em crescimento de *L. strigellus* foram empregadas como biocatalisador na redução de dez cetonas aromáticas (acetofenona e nove derivados), três cetonas alifáticas (ciclo-hexilmetilcetona, octan-2-ona e undecan-2-ona) e um β -cetoéster (4-cloroacetoacetato de metila). Na maioria dos compostos empregados, elevados valores de conversão e excessos enantioméricos foram encontrados, formando, preferencialmente, alcoóis com seletividade Prelog. Os resultados obtidos revelaram o potencial enzimático deste microrganismo e motivaram a investigação futura de suas enzimas isoladas em processos biocatalíticos.

REFERÊNCIAS

ABATE, D.; ABRAHAM, W. R. Antimicrobial metabolites from *Lentinus crinitus*. **Journal of Antibiotics**, v. 47, p. 1348-1350, 1994.

ABRAHAM, W. R.; ABATE, D. Chromanones from *Lentinus crinitus* (Basidiomycetes). **Zeitschrift fuer Naturforschung, C: Biosciences**, v. 50, p. 748-750, 1995 (*Chemical Abstracts*).

ABRAHAM, W. R.; HANSSEN, H. P.; MOEHRINGER, C. Novel sesquiterpene ethers from liquid cultures of the wood-rotting fungus *Lentinus lepideus*. **Zeitschrift fuer Naturforschung, C: Journal of Biosciences**, v. 43, p. 24-28, 1988 (*Chemical Abstracts*).

ABRAHAM, W-R.; SPASSOV, G. Biotransformations of Alkaloids: A Challenge, **Heterocycles**, v. 56, p. 711-741, 2002.

ANCHEL, M.; HERVEY, A.; KAVANAGH, F.; POLATNICK, J.; ROBBINS, W. J. Antibiotic substances from basidiomycetes *Coprinus similis* and *Lentinus degener*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 34, p. 498-502, 1948 (*Chemical Abstracts*).

BERGAMIN-FILHO, A.; KIMATE, H.; AMORIN, L. **Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos**. 3.ed. São Paulo: Ed. Agrônoma Ceres LTDA, 1995.

BHILABUTRA, W.; TECHOWISAN, T.; PEBERDY, J. F.; LUMYONG, S. Antimicrobial activity of bioactive compounds from *Periconia siamensis* CMUGE015. **Research Journal of Microbiology**, v. 2, p. 749-755, 2007.

BOMMARIUS, A. S.; RIEBE, B. R. L. **Fundamentals and applications**, Ed Wiley, 2004.

CHANG, R. Functional properties of edible mushrooms. **Nutrition Reviews**, v. 54, p. 91-93, 1996.

CHOI, J. J.; JIN, M.; LEE, J. K.; LEE, W. Y.; PARK, Y.; HAN, Y. N. Control of cytokine gene expression by PG101, a water-soluble extract prepared from *Lentinus*

lepideus. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 339, p. 880-887, 2006.

CHOI, S. G.; KIM, J.; SUNG, N.; SON, K.; CHEON, H.; KIM, K. R.; KWON, B. Anthraquinones, Cdc25B phosphatase inhibitors, isolated from the roots of *Polygonum multiflorum*. **Natural Product Research, Part A: Structure and Synthesis**, v. 21, p. 487-493, 2007.

COTA, B. B.; ROSA, L. H.; FAGUNDES, E. M. S.; MARTINS-FILHO, O. A.; CORREA-OLIVEIRA, R.; ROMANHA, A. J.; ROSA, C. A.; ZANI, C. L. A potent trypanocidal component from the fungus *Lentinus strigosus* inhibits trypanothione reductase and modulates PBMC proliferation. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, p. 263-270, 2008.

DA LUZ, W. C. **Micologia avançada I**– Taxonomia de basidiomicetos. 1.ed. Passo Fundo: Ed. RAPP, 2008.

DELAMATER, E. D.; Basic fuchsin as a nuclear stain for fungi. **Mycologia**, v. 40, p. 423-429, 1948.

DEMETRIADOU, A. K.; LAUE, E. D.; LEEPER, F. J.; STAUNTON, J. The structure of polivione, a polyketide cometabolite of citromycetin in *Penicillium frequentans*. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, v. 12, p. 762-764, 1985 (*Chemical Abstracts*).

DEMIRJIAN, D. C.; SHAH, P. C.; MORIS-VAS, F. From discovery to application. **Biocatalysis**, v. 200, p. 1-29, 1999.

ERKEL, G.; ANKE, T.; STERNER, O. Inhibition of NF- κ B activation by panepoxydone. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 226, p. 214-221, 1996.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos**: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. 1.ed. Caxias do Sul: Ed. EDUCS, 2004.

FABER, K. **Biotransformations in Organic Chemistry**. 4.ed. Berlin: Springer, 2000.

GAN, Y.; ZENG, Y.; MEI, W.; DAI, H. Isolation and identification of the chemical constituents from *Lentinus giganteus* Berk. **Zhongguo Yaowu Huaxue Zazhi**, v. 17, p. 104-107, 2007 (*Chemical Abstracts*).

GASCOIGNE, R. M.; ROBERTSON, A.; SIMES, J. J. H. The chemistry of fungi. XVII. Dehydroeburicoic acid. **Journal of the Chemical Society**, p. 1830-1837, 1953.

GELO-PUJIC, M.; GUYADER, F. L.; SCHLAMA, T. Microbial and homogenous asymmetric catalysis in the reduction of 1-[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl]ethanone. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 17, p. 2000-2005, 2006.

GUO, Z.; SHE, Z.; SHAO, C.; WEN, L.; LIU, F.; ZHENG, Z.; LIN, Y. Spectral assignments and reference data: ¹H and ¹³C NMR signal assignments of paecilin A and B, two new chromone derivatives from mangrove endophytic fungus *Paecilomyces* sp. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 45, p. 777-780, 2007.

GUPTA, P.; TANEJA, S. C.; SHAH, B. A.; MUKHERJEE, D.; PARSHAD, R.; CHIMNI, S. S.; QAZI, G. N. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 19, p. 1898-1903, 2008.

HARROWVEN, D. C.; LUCAS, M. C.; HOWES, P. D. A total synthesis of (±)-1-desoxyhyphnophilin: using ring closing metathesis for the construction of cyclic enones. **Tetrahedron Letters**, v. 41, p. 8985-8987, 2000.

HASUMI, K.; OHYAMA, S.; KOHYAMA, T.; OHSAKI, Y.; TAKAYASU, R.; ENDO, A. Isolation of SMTP-3, 4, 5 and -6, novel analogs of staplabin, and their effects on plasminogen activation and fibrinolysis. **Journal of Antibiotics**, v. 51, p. 1059-1068, 1998 (*Chemical Abstracts*).

HATVANI, N. Antibacterial effect of the culture fluid of *Lentinus edodes* mycelium grown in submerged liquid culture. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 17, p. 71-74, 2001.

HILLOCKS, R. J. The effect of root-knot nematode on vascular resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* in the stems of cotton plants. **Annals of Applied Biology**, v. 107, p. 213-218, 1985.

HU, W.; OHYAMA, S.; HASUMI, K. Activation of fibrinolysis by SMTP-7 and -8, novel staplabin analogs with a pseudosymmetric structure. **Journal of Antibiotics**, v. 53, p. 241-247, 2000 (*Chemical Abstracts*).

JANG, J. H.; KANO, K.; ADACHI, K.; SHIZURI, Y. Awajanomycin, a cytotoxic γ -lactone- δ -lactam metabolite from marine-derived *Acremonium* sp. AWA16-1. **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 1358-1360, 2006.

KANG, J. G.; SHIN, S. Y.; KIM, M. J.; BAJPAI, V.; MAHESHWARI, D. K.; KANG, S. C. Isolation and anti-fungal activities of 2-hydroxymethyl-chroman-4-one produced by *Burkholderia* sp. MSSP. **Journal of Antibiotics**, v. 57, p. 726-731, 2004.

KANOKMEDHAKUL, S.; KANOKMEDHAKUL, K.; PHONKERD, N.; SOYTONG, K.; KONGSAEREE, P.; SUKSAMRARN, A. Antimycobacterial anthraquinone-chromanone compound and diketopiperazine alkaloid from the fungus *Chaetomium globosum* KMITL-N0802. **Planta Medica**, v. 68, p. 834-836, 2002.

KIM, P.-Y.; POLLARD, D. J.; WOODLEY, J. M. Modeling of Purification Operations in Biotechnology. **Biotechnology Progress**, v. 23, p. 74-82, 2007.

KIS, Z.; CLOSSE, A.; SIGG, HANS P.; HRUBAN, L.; SNATZKE, G. Structure of panepoxydone and related fungus metabolites. **Helvetica Chimica Acta**, v. 53, p. 1577-1597, 1970.

KLIGMAN, A. M.; MESCON, H. The periodic-acid-schiff stain for the demonstration of fungi in animal tissue. **Journal of Bacteriology**, v. 60, p. 415-421, 1950.

KOMATSU, K.; NAGAYAMA, Y.; TANAKA, K.; LING, Y.; CAI, S. Q.; OMOTE, T.; MESELHY, M. R. Comparative study of chemical constituents of rhubarb from different origins. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 54, p. 1491-1499, 2006.

KROHN, K.; MICHEL, A.; BAHRAMSARI, R.; FLOERKE, U.; AUST, H. J.; DRAEGER, S.; SCHULZ, B.; WRAY, V. Biologically active metabolites from fungi. Part 7. Aposhaerin A and B: two new chroman-4-ones from *Aposphaeria* sp. **Natural Product Letters**, v. 8, p. 43-48, 1996 (*Chemical Abstracts*).

KURBANOGLU, E. B.; ZILBEYAZ, K.; KURBANOGLU, N. I.; KILIC, H. Asymmetric reduction of acetophenone analogues by *Alternaria alternata* using ram horn peptone. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 18, p. 2332-2335, 2007.

LAUER, U.; ANKE, T.; HANSSKE, F. Antibiotics from basidiomycetes. 2-Methoxy-5-methyl-1,4-benzoquinone, a thromboxane A₂ receptor antagonist from *Lentinus adhaerens*. **Journal of Antibiotics**, v. 44, p. 59-65, 1991.

LIMA, M. C. L. **Produtos Naturais obtidos de Fungos: Atividade Biológica, Isolamento e Determinação Estrutural**, 2003. Exame de Qualificação (Doutorado em Química Orgânica) – Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2003.

LIN, Y.; LAI, P.; HUANG, Y.; XIE, H. Immune-competent polysaccharides from the submerged cultured mycelium of culinary–medicinal mushroom *Lentinus strigellus* Berk. et Curt. (Agaricomycetidae). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 6, p. 49-55, 2004.

LU, H.; WANG, J.; WANG, X.; LIN, X.; WU, X. Rapid separation and determination of structurally related anthraquinones in rhubarb by pressurized capillary electrochromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 43, p. 352–357, 2007.

MACHIDA, K.; TRIFONOV, L. S.; AYER, W. A.; LU, Z. X.; LAROCHE, A.; HUANG, H. C.; CHENG, K. J.; ZANTIGE, J. L. 3(2H)-Benzofuranones and chromanes from liquid cultures of the mycoparasitic fungus *Coniothyrium minitans*. **Phytochemistry**, v. 58, p. 173-177, 2001.

MADSEN, R. D.; BAUTISTA, L. S.; PAWLAK, J. W.; PRONOVOST, A. D. Direct stain specific binding assays for microorganisms. *United States Patent* 5, 662, 1998.

MANZI, P.; AGUZZI, A.; PIZZOFERRATO, L. Nutritional value of mushrooms widely consumed in Italy. **Food Chemistry**, v. 73, p. 321–325, 2001.

MANZI, P.; PIZZOFERRATO, L. Beta glucans in edible mushrooms. **Food Chemistry**, v. 68, p. 315-318, 2000.

- MATOS, M. A. R.; SOUSA, C. C. S.; MORAIS, V. M. F. Experimental and computational thermochemistry of the isomers: chromanone, 3-isochromanone, and dihydrocoumarin. **Journal Chemical Thermodynamics**, v. 41, p. 308-314, 2009.
- MATSUDA, T.; YAMANAKA, R.; NAKAMURA, K. Recent progress in biocatalysis for asymmetric oxidation and reduction. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 20, p. 513-557, 2009.
- MAZCZKA, W. K.; MIRONOWICZ, A. Enantioselective reduction of bromo- and methoxy-acetophenone derivatives using carrot and celeriac enzymatic system. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 15, p. 1965-1967, 2004.
- MCGAHREN, W. J.; ELLESTAD, G. A.; MORTON, G. O.; KUNSTMANN, M. P. LL-D253 α , - β , and - γ , novel chromanones from the fungus *Phoma pigmentivora*. **Journal of Organic Chemistry**, v. 37, p. 1636-1639, 1972.
- MIROCHA, C. J.; ABBAS, H. K.; KOMMEDAHL, T.; JARVIS, B. B. Mycotoxin production by *Fusarium oxysporum* and *Fusarium sporotrichioides* isolated from *Baccharis* spp. from Brazil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, p. 254-255, 1989.
- MOORE, J. C.; POLLARD, B. K.; DEVINE, P. N. Advances in the enzymatic reduction of ketones. **Accounts of Chemical Research**, v. 40, p. 1412-1419, 2007.
- MORRISON, E.; RUNDBERGET, T.; KOSIAK, B.; AASTVEIT, A. H.; BERNHOFT, A. Cytotoxicity of trichothecenes and fusarochromanone produced by *Fusarium equiseti* strains isolated from Norwegian cereals. **Mycopathologia**, v. 153, p. 49-56, 2002.
- MUELLER, G. M.; BILLS, G. F.; FOSTER, M. S. **Biodiversity of Fungi**. 1.ed. San Diego: Elsevier, 2004.
- NAKAMURA, K.; TAKENAKA, K.; FUJII, M.; IDA, Y. Asymmetric synthesis of both enantiomers of secondary alcohols by reduction with a single microbe. **Tetrahedron Letters**, v. 43, p. 3629-3631, 2002.

NAMIKOSHI, M.; KOBAYASHI, H.; YOSHIMOTO, T.; MEGURO, S. Paecilospirone, a unique spiro[chroman-2,1'(3'H)-isobenzofuran] derivative isolated from tropical marine fungus *Paecilomyces* sp. **Chemistry Letters**, v. 4, p. 308-309, 2000 (*Chemical Abstracts*).

NELSON, D. L.; COX, M. M; LEHNINGER, A. L. **Princípios de Bioquímica**. 4.ed. São Paulo: Ed. Savier, 2006.

NUNES, F. M.; BARROS-FILHO, B. A.; DE OLIVEIRA, M. C. F.; MAFEZOLI, J.; ANDRADE-NETO, M.; DE MATTOS, M. C.; SILVEIRA, E. R.; PIRANI, J. R. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 43, p. 180-183, 2005.

PATEL, R. N. Primary photochemistry and energetics leading to the oxidation of the (Mn)₄Ca cluster and to the evolution of molecular oxygen in Photosystem II. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 252, p. 659-272, 2008.

PATHRE, S. V.; GLEASON, W. B.; LEE, Y. W.; MIROCHA, C. J. The structure of fusarochromanone: new mycotoxin from *Fusarium roseum*, "Graminearum". **Canadian Journal of Chemistry**, v. 64, p. 1308-1311, 1986 (*Chemical Abstracts*).

PETROVA, R. D.; WASSER, S. P.; MAHAJNA, J. A.; DENCHEV, C. M.; NEVO, E. Potential role of medicinal mushrooms in breast cancer treatment: Current knowledge and future perspectives. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 7, p. 141-155, 2005.

PETTERSSON, G. New metabolites from *Lentinus degener*. **Acta Chemica Scandinavica**, v. 20, p. 45-50, 1966 (*Chemical Abstracts*).

PINTO, A. C. Produtos naturais: atualidades, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, p. 45-61, 2002.

PIOVAN, L.; KAGOHARA, E.; RICCI, L. C.; KEPPLER, A. F.; CAPELARI, M.; ANDRADE, L. H.; COMASSETO, J. V.; PORTO, A. L. M. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 19, p. 2385-2389, 2008.

PITTAYAKHAJONWUT, P.; THEERASILP, M.; KONGSAEREE, P.; RUNGROD, A.; TANTICHAROEN, M.; THEBTARANONTH, Y. Pughinin A, a sesquiterpene

from the fungus *Kionochaeta pughii* BCC 3878. **Planta Medica**, v. 68, p. 1017-1019, 2002.

PODOJIL, M.; SEDMERA, P.; VOKOUN, J.; BETINA, V.; BARATHOVA, H.; DURACKOVA, Z.; HORAKOVA, K.; NEMEC, P. *Eurotium (Aspergillus) repens* metabolites and their biological activity. **Folia Microbiologica**, v. 23, p. 438-43, 1978 (*Chemical Abstracts*).

POLLARD, D. J.; WOODLEY, J. M. Biocatalysis for pharmaceutical intermediates: The future is now. **TRENDS in Biotechnology**, v. 25, p. 66-73, 2006.

PONTIUS, A.; KRICK, A.; MESRY, R.; KEHRAUS, S.; FOEGEN, S. E.; MUELLER, M.; KLIMO, K.; GERHAEUSER, C.; KOENIG, G. M. Monodictyochromes A and B, dimeric xanthone derivatives from the marine algicolous fungus *Monodictys putredinis*. **Journal of Natural Products**, v. 71, p. 1793-1799, 2008.

PRESECKI, A. V.; VASIC-RACKI, D. Modelling of the alcohol dehydrogenase production in baker's yeast. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2781-2791, 2005.

PUCHTLER, H.; MELOAN, S. N.; BREWTON, B. R. On structural formulas of basic fuchsin and aldehyde-schiff reaction products. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 45, p. 255-265, 1975.

REN, H.; TIAN, L.; GU, Q.; ZHU, W. Secalonic acid D: a cytotoxic constituent from marine lichen-derived fungus *Gliocladium* sp. T31. **Archives of Pharmacal Research**, v. 29, p. 59-63, 2005 (*Chemical Abstracts*).

RUKACHAISIRIKUL, V.; TANSAKUL, C.; SAITHONG, S.; PAKAWATCHAI, C.; ISAKA, M.; SUVANNAKAD, R. Hirsutane sesquiterpenes from the fungus *Lentinus connatus* BCC 8996. **Journal of Natural Products**, v. 68, p. 1674-1676, 2005.

SAENGCHANTARA, S. T.; WALLACE, T. W. Chromanols, chromanones, and chromones. **Natural Product Reports**, p. 465-475, 1986.

SALVI, N. A.; CHATTOPADHYAY, S. Studies on *Rhizopus arrhizus* mediated enantioselective reduction of arylalkanones. **Tetrahedron**, v. 57, p. 2833-2839, 2001.

SCHEPETKIN, I. A.; QUINN, M. T. Botanical polysaccharides: macrophage immunomodulation and therapeutic potential. **International Immunopharmacology**, v. 6, p. 317–333, 2006.

SCHLEGEL, B.; HAERTL, A.; DAHSE, H.; GOLLMICK, F. A.; GRAEFE, U.; DOERFELT, H. Structure determination and biological activity of a antiproliferative and immunosuppressive agent obtained from *Panus rudis* (*Lentinus strigosus*) fermentation broths. German 10213481, 22 março 2002, 10 fevereiro 2003. (*Chemical Abstracts*)

SHOTWELL, J. B.; HU, S.; MEDINA, E.; ABE, M.; COLE, R.; CREWSB, A. M.; WOODA, J. L. Efficient stereoselective syntheses of isopanepoxydone and panepoxydone: a re-assignment of relative configuration. **Tetrahedron Letters**, v. 41, p. 9639-9643, 2000.

SHOTWELL, J. B.; KOH, B.; CHOI, H. W.; WOOD, J. L.; CREWSA, C. M. Inhibitors of NF- κ B signaling: design and synthesis of a biotinylated isopanepoxydone affinity reagent. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 12, p. 3463-3466, 2002.

SILVERMAN, R. B. **The Organic Chemistry of Enzyme-Catalyzed Reactions**. 1.ed. San Diego: Elsevier, 2002.

SMETANINA, O. F.; KALINOVSKII, A. I.; KHUDYAKOVA, Y. V.; SLINKINA, N. N.; PIVKIN, M. V.; KUZNETSOVA, T. A. Metabolites from the marine fungus *Eurotium repens*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 43, p. 394-398, 2007.

SMITH, J. E.; ROWAN, N. J.; SULLIVAN, R. Medicinal mushrooms: a rapidly developing area of biotechnology for cancer therapy and other bioactivities. **Biotechnology Letters**, v. 24, p. 1845-1938, 2002.

SOB, S. V. T.; WABO, H. K.; TANE, P.; NGADJUI, B. T.; MA, D. A xanthone and a polyketide derivative from the leaves of *Cassia obtusifolia* (Leguminosae). **Tetrahedron**, v. 64, n. 34, p. 7999-8002, 2008.

SOMDEJ; K.; KWANJAI; K.; NUTCHANAT, P.; KASEM; S.; PALANGPON, K. Antimycobacterial anthraquinone-chromanone compound and diketopiperazine alkaloid

from the fungus *Chaetomium globosum* KMITL-N0802. **Planta medica**, v. 68, p. 834-836, 2002.

STADLER, M.; KELLER, N. P. Paradigm shifts in fungal secondary metabolite research. **Mycological Research**, v. 112, p. 127-130, 2008.

STRAATHOF, A. J.; PANKE, S.; SCHMIDT, A. The production of fine chemicals by biotransformations. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 548-556, 2002.

TALAPATRA, S. K.; MANDAL, S. K.; BHAUMIK, A.; MUKHOPADHYAY, S.; KAR, P.; PATRA, A.; TALAPATRA, B. Echinulin, a novel cyclic dipeptide carrying a triprenylated indole moiety from an *Anacardiaceae*, a *Cucurbitaceae* and two *Orchidaceae* plants: detailed high resolution 2D-NMR and mass spectral studies. **Journal of the Indian Chemical Society**, v. 78, p. 773-777, 2001 (*Chemical Abstracts*).

TORSELL, K. B. G. Natural Products Chemistry, 2a ed., Stockholm, Apotekarsocieteten, 1997.

VARGAS-ISLA, R.; ISHIKAWA, N. K. Optimal conditions of in vitro mycelial growth of *Lentinus strigosus*, an edible mushroom isolated in the Brazilian Amazon **Mycoscience**, v. 49, p. 215-219, 2008.

WANG, Q.; SHE, X.; REN, X.; MA, J.; PAN, X. The first asymmetric total synthesis of several 3,4-dihydroxy-2,2-dimethyl-chroman derivatives. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 15, p. 29-34, 2004.

WASSER, S. P. Medicinal mushroom as a source of antitumor and immunomodulation polysaccharides. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 60, p. 258-274, 2002.

WASSER, S. P.; WEIS A. L. Therapeutic effects of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: a modern perspective. **Critical Review Immunology**, v. 19, p. 65-96, 1999.

WEI, Z. L.; LIN, G. Q.; LI, Z. Y. Microbial transformation of 2-hydroxy and 2-acetoxy ketones with *Geotrichum* sp. **Bioorganic Medicinal Chemistry**, v. 8, p. 1129-1137, 2000.

WIJERATNE, E. M. K.; PARANAGAMA, P. A.; GUNATILAKA, A. A. L. Five new isocoumarins from sonoran desert plant-associated fungal strains *Paraphaeosphaeria quadrisepata* and *Chaetomium chiversii*. **Tetrahedron**, v. 62, p. 8439-8446, 2006.

WU, S.; KRINGS, U.; ZORN, H.; BERGER, R. G. Volatile compounds of the wild mushroom *Lentinus lepideus* grown on chestnut trees. **AFS, Advances in Food Sciences**, v. 28, p. 54-60, 2006 (*Chemical Abstracts*).

YANG, Y.; ZHU, D.; PIEGAT, T. J.; HUA, L. Enzymatic ketone reduction: mapping the substrate profile of a short-chain alcohol dehydrogenase (YMR226c) from *Saccharomyces cerevisiae*. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 18, p. 1799–1803, 2007.

ZHANG, W.; KROHN, K.; FLORKE, U.; PESCIPELLI, G.; DI BARI, L.; ANTUS, S.; KURTAİN, T.; RHEINHEIMER, J.; DRAEGER, S.; SCHULZ, B. New mono- and dimeric members of the secalonic acid family: blennolides A-G isolated from the fungus *Blennoria* sp. **Chemistry-A European Journal**, v. 14, p. 4913-4923, 2008 (*Chemical Abstracts*).