

Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Química
Departamento de Química Orgânica

TESE DE DOUTORADO

**APLICAÇÃO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR
NO ESTUDO DE BIOSÍNTESE DE METABÓLITOS
SECUNDÁRIOS E NA INVESTIGAÇÃO DA BIOQUÍMICA
DE TUMORES DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL
*IN VITRO***

Fernando César de Macedo Jr.

Orientadora: Profa. Dra. Anita J. Marsaioli
Co-orientadora: Thelma A. Pertinhez

Agosto 2004

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
DESENVOLVIMENTO DE COLEÇÕES

IIIDADE	BC
CHAMADA	+1/Unicamp
	M151a
EX	
MBO BC/	60724
OC.	16-11-04
C	☐
D	☒
REÇO	11,00
ATA	18-11-04
CPD	

15 Id 3324 37

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA
UNICAMP**

M151a

Macedo Jr., Fernando César de.

Aplicação de ressonância magnética nuclear em estudos de biossíntese de metabólitos secundários e na investigação da bioquímica de tumores do sistema nervoso central *in vitro* / Fernando César de Macedo Jr. -- Campinas, SP: [s.n], 2004.

Orientadora: Anita J. Marsaioli.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. RMN. 2. Biossíntese. 3. Produtos Naturais.
4. Neoplasias do SNC. I. Marsaioli, Anita J.
- II. Universidade Estadual de Campinas. III. Título.

*“Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.
Assim como em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive.”*

Fernando Pessoa

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pelo amor e preocupação incessante em indicar-me sempre o caminho das virtudes.

Às minhas irmãs, por todo o carinho que, mesmo à distância, não passou despercebido ao longo destes anos.

À Giselle, ao lado de quem tenho tido a maravilhosa experiência de compartilhar minha vida, por tudo que aprendemos e conquistamos juntos e, cuja companhia, ao contrário da aridez de uma jornada solitária, me leva a ansiar com coragem e confiança os próximos passos.

À Profa. Anita, pela oportunidade, por demonstrar seu entusiasmo contagiante e verdadeiro pela ciência e principalmente, pela sua preocupação e amizade durante estes anos.

À amiga Andréia com quem tive o prazer de compartilhar os momentos mais empolgantes deste processo acadêmico e cuja ternura e generosidade me marcaram para sempre.

À todos os amigos do grupo, e aos amigos, Adão, Ângelo, Betinho, Gustavo, Laverde, Liliane, Joselito e Clodoaldo pelo companheirismo, pela torcida incessante e sincera e pelas discussões científicas e filosóficas que tornam a pesquisa uma experiência profissional e humana extraordinária.

Aos Drs Thelma A. Pertinhez, Eduardo M. Cilli e ao Prof. Luiz A. Colnago pelo suporte técnico-científico e pelo envolvimento diligente, sobretudo durante as dificuldades encontradas ao longo deste projeto.

Aos Prof(s) Pilli, Moran e Fred pelo empenho e interesse gratuito pela minha formação e pela constante troca de idéias.

Formação Acadêmica/Titulação

Mestrado em Química

Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, Brasil

Título: Estudos visando a síntese de lactonas naturais de oito membros via reação de Nozaki-Hiyama-Kishi

Período: 1999 - 2001

Orientador: Ronaldo Aloise Pilli

Graduação em Química

Universidade Federal de Viçosa, UFV, Vicososa, Brasil

Período: 1994 - 1998

Trabalhos resumidos publicados em anais de evento

FARIA, A. V., MACEDO Jr, F. C., REIS, M. M., MARSAIOLI, A. J., CENDES, F.
DIFERENCIAÇÃO ENTRE METÁSTASES E TUMORES PRIMÁRIOS CEREBRAIS
ATRAVÉS DE RMN DE ¹H IN VITRO

VIII JORNADA BRASILEIRA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA,
2004, Rio de Janeiro - RJ

MACEDO Jr, F. C., MARSAIOLI, A. J.
ESTRUTURA PLANA E ESPACIAL DO TERREINOL POR RMN
VIII JORNADA BRASILEIRA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA,
2004, Rio de Janeiro - RJ.

PEREIRA, N. R., MACEDO Jr, F. C., FIGUEIREDO, I. M., MARSAIOLI, A. J., MARSAIOLI
JUNIOR, A., FERNANDES, S. A.
1H NMR AN ALTERNATIVE TOOL TO MONITOR CACAO AND CUPUASSU
FERMENTATION AND ROASTING PROCESSES
2ND PORTUGUESE-BRAZILIAN MEETING ON NMR, 2003, Sintra.

FARIA, A. V., MACEDO Jr, F. C., REIS, M. M., MARSAIOLI, A. J., CENDES, F.
DIAGNOSING BRAIN TUMOR BY 1H HIGH FIELD NMR
IX ENCONTRO DE USUÁRIOS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR,
2003, Angra dos Reis.

MACEDO Jr, F. C., MARSAIOLI, A. J.
APLICAÇÃO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ¹³C NO ESTUDO DE
ROTAS BIOSINTÉTICAS
VII JORNADA BRASILEIRA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA, 2002, Maringá - PR

MACEDO Jr, F. C., SABINO, A. A., FATIMA, A., PILLI, R. A.
STUDIES TOWARDS THE SYNTHESIS OF NATURAL LACTONES VIA THE
INTERMOLECULAR NOZAKI-HIYAMA-KISHI REACTION
BRAZILIAN MEETING ON ORGANIC SYNTHESIS, 2001, Curitiba.

MACEDO Jr, F. C., MAIA, A. A., RUBINGER, M. M. M.
ESTUDO DA OXIDAÇÃO DE 1,2:5,6-DI-O-ISOPROPILIDENO-ALFA-D-
GLICOFURANOSE COM DICROMATO DE PIRIDÍNIO EM DIFERENTES CONDIÇÕES
DE REAÇÃO

XII ENCONTRO REGIONAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA,
1998, Ouro Preto - MG

MACEDO Jr, F. C., MAIA, A. A., OLIVEIRA, C. R., MELLO, V. J., BATISTA, R. B.,
RUBINGER, M. M. M.

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE ANÁLOGOS DO AVENACIOLÍDEO
XII ENCONTRO REGIONAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA,
1998, Ouro Preto - MG

MACEDO Jr, F. C.

GENETIC MANIPULATION OF SOYBEAN QUALITY FOR THE FOOD INDUSTRY
**XXVI REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA
MOLECULAR,** 1997, Caxambú.

MACEDO Jr, F. C., MAIA, A. A., MELLO, V. J., RUBINGER, M. M. M.
SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FUNGICIDA DE ANÁLOGOS DO
AVENACIOLÍDEO

VII SIMPÓSIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 1997, Viçosa.

CARVALHO, W. L., MACEDO Jr, F. C., RIBEIRO, J. N., BARROS, E. G., MOREIRA, M. A.
DETERMINATION OF SOYBEAN PROTEASE INHIBITOR BY A SINGLE SEED, NON-
DESTRUCTIVE ENZYMATIC METHOD

**XXV REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA
MOLECULAR,** 1996, Caxambú.

CARVALHO, W. L., MACEDO Jr, F. C., OLIVEIRA, M. C. A., MOREIRA, M. A., BARROS,
E. G.

ESTUDO DA ATIVIDADE INIBITÓRIA DE INIBIDOR KUNITZ DE GENÓTIPOS DE SOJA
COM E SEM LIPOXIGENASES

XV CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS,
1996, Poços de Caldas.

Artigos completos publicados em periódicos

MACEDO Jr, F. C., PORTO, A. L. M., MARSAIOLI, A. J.

Terreinol - a novel metabolite from *Aspergillus terreus*: structure and C-13 labeling.
Tetrahedron Letters. , v.45, p.53 - 55, 2004.

RESUMO

APLICAÇÃO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR NO ESTUDO DE BIOSÍNTESE DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS E NA INVESTIGAÇÃO DA BIOQUÍMICA DE TUMORES DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL *IN VITRO*

Este trabalho consistiu em aplicações independentes da RMN dentro nas áreas da química de produtos naturais e da bioquímica. Inicialmente, a implantação e consolidação de estudos de rotas biossintéticas em nosso instituto foram alcançadas mediante experimentos de marcação com ^{13}C da terreína e do terreinol, ambos produtos naturais isolados do fungo *Aspergillus terreus*. No caso do metabólito inédito terreinol, o padrão de incorporação de $[1-^{13}\text{C}]\text{-D-glicose}$ determinado através de RMN de ^{13}C revelou uma origem mista, predominantemente policetídica com o envolvimento de seis unidades de acetil-/malonil adicionadas via coenzima A. A marcação da metila aromática do terreinol, adjacente a outra posição enriquecida, indica alquilação de um intermediário policetídico pela metionina. Ainda neste trabalho, extratos de tumores de cérebro foram investigados por RMN de ^1H de alta resolução para determinar a composição química dos tecidos buscando identificar possíveis alterações metabólicas associadas a características bioquímicas de tecidos tumorais e determinar marcadores químicos capazes de classificar os tumores quanto ao tipo e grau de agressividade. A aplicação de análise discriminatória de mínimos quadrados parciais em nossos dados mostrou, uma correlação inédita entre a razão glicina/inositol e o grau de agressividade em tumores neurogliais. Além disso, foi possível relacionar metástases a concentrações de inositol muito baixas comparadas aos tumores primários do SNC. Estas alterações metabólicas foram interpretadas em termos da indiferenciação celular, dos mecanismos de resistência e perpetuação dos tumores em meios adversos e da sua capacidade anti-apoptótica.

ABSTRACT

NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE IN THE STUDY OF THE SECONDARY METABOLITES BIOSYNTHESIS AND IN THE INVESTIGATION OF THE BIOCHEMISTRY OF CENTRAL NERVOUS SYSTEM TUMORS *IN VITRO*

The ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy, allied to isotopic labeling, played a determinant role in the extraordinary current level of comprehension about the natural processes by which living organisms build up complex molecules. In another field, ^1H NMR spectroscopy has been used to study biochemical changes in distinct pathologies *in vitro* through the metabolite distribution pattern in tissue extracts. It has been shown to be also valuable in the identification of distinct metabolic profiles for specific histological subtypes of brain tumors. This work aimed at independent applications of RMN to investigate these questions. Initially, the introduction of biosynthetic studies in our institute was achieved from ^{13}C labeling experiments on metabolites from *Aspergillus terreus*, terrein and terreinol. The pattern of $[1-^{13}\text{C}]$ -D-glucose incorporation in the novel metabolite, terreinol, as observed by ^{13}C NMR spectroscopy, indicates a predominantly polyketide origin involving six acetyl/malonyl units added by CoA. The labeling of the aromatic methyl, adjacent to another labeled position, indicates alkylation of the polyketide intermediate by methionine. Also in this work, brain tissue extrats from patients with various types of brain tumors were analyzed by high field ^1H NMR spectroscopy. Computational Partial Least Square Discriminant Analysis revealed a correlation between glycine/inositol ratio and the degree of aggressiveness in neuroglial tumors. Additionally, metastasis showed very low inositol signal intensities. These results were related to the energetic metabolism changes and high cellular turnover of tumoral tissues and, alternatively, to their resistance against adverse environments (hypoxia, osmotic and metabolic stress), their ability to avoid apoptosis and to the dedifferentiation.

LISTA DE ABREVIATURAS

- ACP - Proteína carregadora de acila
ADP - Adenosina difosfato
ATP - Adenosina trifosfato
CCT - Coleção de Culturas Tropicais
CoA - Coenzima A
DCC - Dicicloexilcarbodiimida
DMAP - Dimetilaminopiridina
INADEQUATE - Incredible Natural Abundance Double Quantum Transfer Experiment
HSQC - Heteronuclear Single Quantum Correlation
MTPA - Ácido α -metoxi- α -trifluorometil- α -fenil-acético
NAC - *N*-acetilcisteamida
NOE - Nuclear Overhauser Enhancement
NOESY - Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
PCA - Análise de Componentes Principais
PCS - Policetídeo sintase
PLS - DA - Análise Discriminatória de Mínimos Quadrados Parciais
RMI - Ressonância Magnética de Imagem
RMN - Ressonância Magnética Nuclear
SNC - Sistema Nervoso Central
TBS - *terc*-butil-dimetil-silil
THF - Tetraidrofurano

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 - Resultados dos testes de otimização de condições de obtenção do terreinol.....	30
Tabela 1.2 - Dados de RMN de ^{13}C da terreína isotopicamente marcada.....	36
Tabela 1.3 - Massa de extratos de culturas de <i>A. terreus</i> crescidas na presença de D-glicose [$1\text{-}^{13}\text{C}$].....	41
Tabela 1.4 - Integração dos sinais de RMN de ^{13}C do terreinol obtido nos experimentos com D-glicose [$1\text{-}^{13}\text{C}$].....	43
Tabela 1.5 - Valores de T_1 na presença de $\text{Cr}(\text{acac})_3$	56
Tabela 1.6 - Dados de RMN de ^1H dos derivados 3 e 4.....	63
Tabela 1.7 - Deslocamentos Químicos de ^1H e valores de $\Delta\delta^{SR}$ dos ésteres 5ab.....	67
Tabela 2.1 - Classes das amostras analisadas.....	105

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1.1 - Efeito da incorporação de acetato simplesmente marcado sobre o espectro de RMN de ^{13}C	4
Esquema 1.2 - Proposta de biossíntese da tenelina.....	5
Esquema 1.3 - Incorporação de valina marcada na cefalosporina e penicilina.....	6
Esquema 1.4 - Efeito da incorporação de acetato duplamente marcado sobre o espectro de RMN de ^{13}C	8
Esquema 1.5 - Proposta de biossíntese da bicaverina.....	9
Esquema 1.6 - Proposta de biossíntese da aspirona.....	10
Esquema 1.7 - Espectro de INADEQUATE 2D da dioncofilina marcada com acetato [$1,2\text{-}^{13}\text{C}$].....	11
Esquema 1.8 - Incorporação de acetatos marcados na brevetoxina.....	13
Esquema 1.9 - Efeito da incorporação de ^2H e ^{18}O no espectro de ^{13}C	15
Esquema 1.10 - Biossíntese da aspirona.....	18
Esquema 1.11 - Biossíntese de policetídeos e ácidos graxos.....	19
Esquema 1.12 - Incorporação de tioésteres de intermediários na doramectina.....	21
Esquema 1.13 - Etapa de cicloadição na biossíntese da nargencina.....	22
Esquema 1.14 - Incorporação de tioésteres de intermediários na nargentina.....	22
Esquema 1.15 - Etapas da via glicolítica.....	44
Esquema 1.16 - Metilação biológica de uma cadeia policetídisca.....	46
Esquema 1.17 - Biossíntese da serina a partir do 3-fosfoglicerato.....	47
Esquema 1.18 - Biossíntese da S-adenosilmetionina a partir da serina.....	47
Esquema 1.19 - Reações envolvidas na síntese do álcool 4.....	62
Esquema 1.20 - Equilíbrio conformacional esperado para o terreinol.....	64
Esquema 1.21 - Esterificação do álcool cis-4 com os ácidos (R)- e (S)-MTPA.....	66

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Estrutura das avermectinas.....	20
Figura 1.2 - Exemplo de metabólitos secundários isolados de <i>A. terreus</i>	23
Figura 1.3 - Estruturas propostas para o terreinol.....	24
Figura 1.4 - Cromatograma de íons totais e espectro de massas do terreinol.....	27
Figura 1.5 - Cromatograma de íons totais de extrato de <i>A. terreus</i> CCT 3320 obtido conforme metodologia original.....	27
Figura 1.6 - Cromatograma de íons totais e espectro de massas da terreína.....	28
Figura 1.7 - Espectro de RMN de ^1H da terreína purificada.....	29
Figura 1.8 - Cromatograma de íons totais do extrato de <i>A. terreus</i> CCT 3320 cultivado com ME DIFCO e espectro de massas do terreinol.....	30
Figura 1.9 - Espectro de RMN de ^1H do terreinol.....	32
Figura 1.10 - Cromatograma de íons totais do extrato de <i>A. terreus</i> CCT 3320 cultivado na presença de acetato de sódio e espectro de massas da terreína.....	34
Figura 1.11 - Rota biossintética proposta da terreína.....	35
Figura 1.12 - Espectro de RMN de ^{13}C da terreína isotopicamente marcada.....	37
Figura 1.13 - Ampliação do espectro da Figura 1.12.....	37
Figura 1.14 - Seqüências de pulsos de experimentos de RMN de ^{13}C e espectro de RMN de ^{13}C desacoplado sem NOE da terreína marcada.....	38
Figura 1.15 - Cromatograma de íons totais e espectro de massas do terreinol obtido na presença de glicose.....	39
Figura 1.16 - Cromatograma de íons totais e espectro de massas do terreinol obtido na presença de glicose.....	40
Figura 1.17 - Espectros de RMN de ^{13}C sem NOE do terreinol com abundância natural e enriquecido.....	41
Figura 1.18 - Espectros de RMN de ^{13}C e seqüência de pulsos do experimento de inversão-recuperação.....	42
Figura 1.19 - Posições enriquecidas do terreinol.....	43
Figura 1.20 - Padrão de incorporação de unidades C_2 intactas considerando a estrutura 2.....	48
Figura 1.19 - Esqueletos carbônicos arquétipos de precursores policetídios aromáticos de anel fundido com modos de ciclização F e S e seus padrões de incorporação de acetato.....	49

Figura 1.20 - Resultados de experimentos de NOESY 1D considerando 1.....	50
Figura 1.21 - Resultados de experimentos de NOESY 1D considerando 2.....	51
Figura 1.22 - Sequência de pulsos do experimento de INADEQUATE 2D.....	53
Figura 1.23 - Espectro de INADEQUATE 2D do terreinol.....	56
Figura 1.24 - Correlações C-C e valores de acoplamentos escalares $^1J_{CC}$ do terreinol obtidos a partir do INADEQUATE 2D.....	57
Figura 1.25 - Curva de dicroísmo circular do terreinol.....	59
Figura 1.28 - Efeito de proteção da fenila do grupo MTPA sobre os substituintes do centro estereogênico carbinólico.....	61
Figura 1.29 - Projeção do (<i>R</i>)-terreinol sobre os octantes definidos segundo por Snatzke e Gawroński para as transições $n \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \sigma^*$ respectivamente.....	67
Figura 1.30 - Espectro de RMN de 1H do composto 3.....	76
Figura 1.31 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto 3.....	76
Figura 1.32 - Espectro de RMN de 1H do composto <i>cis</i> -4.....	77
Figura 1.33 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto <i>cis</i> -4.....	77
Figura 1.34 - Espectros do experimento de DEPT do composto <i>cis</i> -4.....	78
Figura 1.35 - Espectro de HSQC do composto <i>cis</i> -4.....	78
Figura 1.36 - Espectro de RMN de 1H do composto 5a.....	79
Figura 1.37 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto 5a.....	79
Figura 1.38 - Espectro de HSQC do composto 5a.....	80
Figura 1.39 - Expansão do espectro de HSQC do composto 5a.....	80
Figura 1.40 - Expansão do espectro de HSQC do composto 5a.....	81
Figura 1.41 - Espectro de RMN de 1H do composto 5b.....	81
Figura 1.42 - Espectro de ROESY 1D do composto 5a.....	82
Figura 1.43 - Espectro de ROESY 1D do composto 5a.....	82
Figura 1.44 - Espectro de ROESY 1D do composto 5a.....	83
Figura 2.1 - Aplicação de RMN de 1H <i>in vivo</i> : imagens de RMI de um caso de oligoastrocitoma anaplásico e de glioblastoma e os respectivos espectros de RMN de 1H clínica.....	85
Figura 2.2 - Ampliação de espectro típico de extrato de tumor cerebral.....	86
Figura 2.3 - Sequência de pulsos wet1d.....	99
Figura 2.4 - Espectro de RMN de 1H de extrato aquoso de amostra do grupo controle sem supressão do sinal do solvente.....	100

Figura 2.5 - Espectro de RMN de ^1H de extrato aquoso de amostra do grupo controle com supressão do sinal do solvente.....	100
Figura 2.6 - Processo de conversão do sistema de variáveis na representação de amostras hipotéticas apresentando duas substâncias relacionadas a três sinais de RMN.....	102
Figura 2.7 - Separação das amostras em três classes diferentes em função da variação das concentrações das duas substâncias que as compõem.....	103
Figura 2.8 - a) Gráfico representando o resultado da análise discriminatória comparando tumores neurogliais de alto grau, tumores não-neurogliais, tumores neurogliais de baixo grau e controles. b) e c) Coeficientes de regressão da matriz B responsáveis pela discriminação entre as classes.....	106
Figura 2.9 - a) Gráfico representando o resultado da análise discriminatória comparando tumores neurogliais de alto grau; tumores não-neurogliais e tumores neurogliais de baixo grau; b) e c) Coeficiente de regressão da matriz B responsáveis pela discriminação entre as classes.....	108
Figura 2.10 - a) Sobreposição de ampliações dos espectros originais de extratos de tumores neurogliais de alto grau, de baixo grau e não neurogliais; b) Espectro inteiro típico e ampliações de uma amostra de astrocitoma de baixo grau e de um glioblastoma.....	109
Figura 2.11 - Sobreposições de ampliações de espectros originais de extratos de controles, tumores neurogliais de alto grau, de baixo grau e metástases.....	110

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1

1.1 - INTRODUÇÃO.....	1
1.2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
1.2.1 - Marcação simples	3
1.2.2 - Marcação dupla	6
1.2.3 - Combinação de técnicas	12
1.2.4 - Desenvolvimentos recentes	13
1.2.5 – Terreinol - um novo metabólito secundário de <i>Aspergillus terreus</i>	22
1.3 - OBJETIVOS.....	24
1.4 - RESULTADOS E DISCUSSÕES	25
1.4.1 - Otimização das condições originais de isolamento do terreinol.....	25
1.4.2 - Estudo da produção do terreinol na presença de acetato	32
1.4.3 - Estudo da incorporação de acetato [1,2- ¹³ C] na terreína.....	34
1.4.4 - Estudo da incorporação de D-glicose [1- ¹³ C] no terreinol.....	37
1.4.5 - Determinação da estrutura plana do terreinol	49
1.4.6 - Confirmação da atribuição de ¹³ C: INADEQUATE 2D	51
1.4.7 – Determinação da Configuração Absoluta do terreinol.....	57
1.5 - CONCLUSÕES.....	68
1.6 - PARTE EXPERIMENTAL.....	69
1.7 - ESPECTROS.....	75

SUMÁRIO

CAPÍTULO 2

2.1 - INTRODUÇÃO.....	84
2.2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	88
2.3 - OBJETIVOS.....	97
2.4 - RESULTADOS E DISCUSSÕES	98
2.5 - CONCLUSÕES.....	112
2.6 - PARTE EXPERIMENTAL.....	114
3 - ANEXOS.....	117

1.1 - INTRODUÇÃO

Os organismos vivos produzem miríades de compostos orgânicos cuja grande maioria parece não participar diretamente do seu crescimento e desenvolvimento. No entanto, a apreciação crescente dos diversos efeitos biológicos produzidos por estas substâncias, tradicionalmente denominadas metabólitos secundários, tem incitado uma reavaliação dos seus possíveis papéis, especialmente no contexto de interações ecológicas.

Além disso, o reconhecimento das propriedades biológicas de ampla variedade de produtos naturais, termo empregado como sinônimo de metabólitos secundários, tem alimentado uma busca intensa por novos fármacos, antibióticos, inseticidas e herbicidas.

Por estes motivos, a química de produtos naturais foi alvo de intensas investigações durante as últimas décadas resultando no desenvolvimento de teorias biossintéticas e em uma maior compreensão dos mecanismos de ação das enzimas. Estas descobertas tiveram um grande impacto sobre a imaginação dos químicos orgânicos, e a mimetização de processos bioorgânicos em laboratório levou a importantes avanços nos métodos sintéticos.

Muitos destes desenvolvimentos não teriam sido possíveis sem a ação de brilhantes pesquisas sobre as rotas biossintéticas de metabólitos secundários, onde a marcação isotópica tem desempenhado um papel fundamental.

As primeiras aplicações destes experimentos consistiam na incorporação de substratos enriquecidos em elementos radioativos, os radioisótopos. O produto natural marcado era destruído através de sequências

de degradações complexas e seus fragmentos eram monitorados quanto à emissão de radiação.

Neste contexto, o uso de isótopos estáveis, aliado à espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), consistindo em um método rápido e não destrutivo, surgiu como uma ferramenta poderosa para a elucidação de mecanismos bioquímicos.

Durante as primeiras aplicações da RMN a problemas biossintéticos^{1, 2}, no final dos anos sessenta, o destino de precursores enriquecidos em ^{13}C era monitorado a partir dos aumentos nas intensidades dos sinais de ^{13}C -H satélites no espectro de RMN de ^1H . Este método^{3, 4}, entretanto, não fornece informações de carbonos não ligados diretamente a hidrogênios e assim, foi rapidamente superado pela espectroscopia de RMN de ^{13}C .

A partir dos anos 70 o estudo de rotas biossintéticas recebeu um grande impulso com os avanços no campo da espectroscopia de RMN provenientes da introdução de técnicas pulsadas associadas à transformada de Fourier. Estes desenvolvimentos facilitaram imensamente a obtenção de espectros de ^{13}C de produtos naturais, até então, dificultada pela sua baixa sensibilidade e baixa abundância natural.

¹ D. Desaty; A. G. McInnes; L. C. Vining; D. G. Smith, *Can. J. Biochem.* **1968**, *46*, 1293.

² M. Tanabe; G. Dedre, *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 4515.

³ M. Tanabe; H. Seto; L. Johnson, *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 2157.

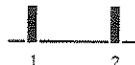
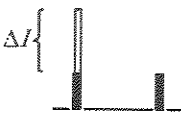
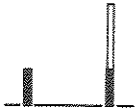
⁴ A. G. McInnes; D. G. Smith; L. C. Vining; L. Johnson, *Chem. Commun.* **1971**, 325.

1.2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.2.1 - Marcação simples

Infelizmente, sob o ponto de vista da determinação estrutural, a distribuição isotópica do carbono na natureza é de apenas 1,1% em ^{13}C (número quântico de spin, $I = 1/2$) conferindo à RMN deste núcleo uma falta de sensibilidade intrínseca. A grande maioria dos átomos de carbono (98,9%) é constituída pelo isótopo magneticamente inerte, o ^{12}C ($I = 0$). Outra consequência deste fato, não raramente esquecida, é que uma amostra, mesmo de um composto orgânico simples, é constituída por uma mistura complexa de isotopômeros. No entanto, a baixa abundância natural oferece a oportunidade de enriquecimentos possibilitando os estudos biossintéticos através da marcação isotópica. No caso do ^{13}C , um enriquecimento de cerca de apenas 1% significa em duplicar a intensidade do sinal correspondente.

Um dos métodos de marcação simples com ^{13}C mais empregados consiste na utilização de acetato marcado para mapear a sua incorporação em metabólitos. O padrão de marcação é determinado pela obtenção do espectro de RMN de ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ do metabólito marcado e comparação deste com o espectro do composto não marcado. O Esquema 1.1 mostra os resultados da incorporação de acetato enriquecido em ^{13}C em metabólitos.

Precursor	Metabólito	Espectro de ^{13}C	Observação
a) CH_3COSCoA	$\text{—C}_2\text{—C}_1\text{—}$		Abundância natural
b) $\text{CH}_3^{13}\text{CO}_2\text{Na}$	$\text{—C}_2\text{—}\overset{\bullet}{\text{C}}_1\text{—}$		Aumento da intensidade
c) $^{13}\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na}$	$\text{—}\overset{\bullet}{\text{C}}_2\text{—C}_1\text{—}$		Aumento da intensidade

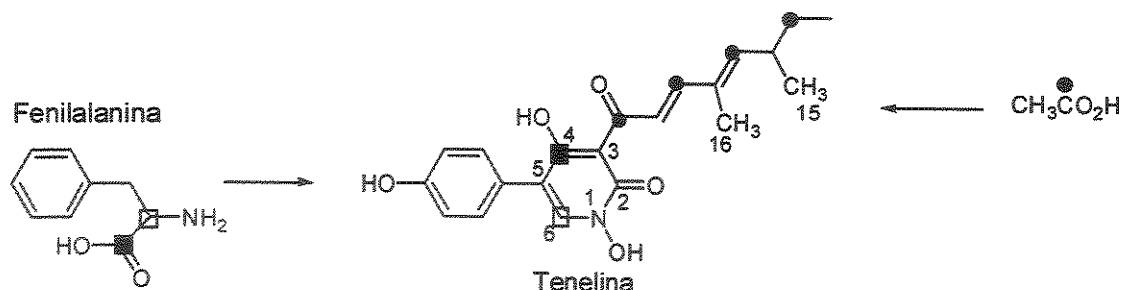
Esquema 1.1 – Efeito da incorporação de acetato marcado simplesmente sobre o espectro de RMN de ^{13}C .

A obtenção dos valores de enriquecimentos isotópicos é feita a partir da diferença entre as intensidades dos sinais no espectro de ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ do metabólito enriquecido e não enriquecido. Isto cria dificuldades óbvias quando os erros nas medidas são das mesmas ordens que as diferenças de intensidades. Parte deste problema se deve aos diferentes tempos de relaxação e de efeitos NOE (Nuclear Overhauser Enhancement) apresentados pelos diferentes carbonos na molécula. Além disso, ocorrem flutuações instrumentais nos espectros de RMN de ^{13}C sucessivos registrados nas mesmas condições operacionais que causam variações incontrolláveis nas intensidades dos sinais. Portanto, os enriquecimentos devem estar aproximadamente 0,5-1,0% em ^{13}C acima da abundância natural para serem detectados pelo método da diferença. No entanto, a utilização da marcação simples pode fornecer valiosas informações biossintéticas.

A simplicidade e elegância deste método podem ser ilustradas pelo estudo sobre a tenelina (Esquema 1.2), um metabólito isolado do fungo *Beauveria bassiana*⁵. A incorporação de precursores simplesmente marcados mostrou que o esqueleto inteiro (exceto pelos dois grupos metila, C-15 e C-16,

⁵ a) A. G. McInnes, D. G. Smith, J. L. C. Wright *et al*, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1974, 281 e b) 282.

originados da metionina) foi formado pela condensação entre uma cadeia policetídica de dez carbonos e a fenilalanina. As marcações das posições C-4 e C-6 do metabólito pela [1- ^{13}C] fenilalanina e [2- ^{13}C] fenilalanina respectivamente indicam que o carbono carboxílico é transferido de C-2 para C-3 do aminoácido durante a biossíntese.



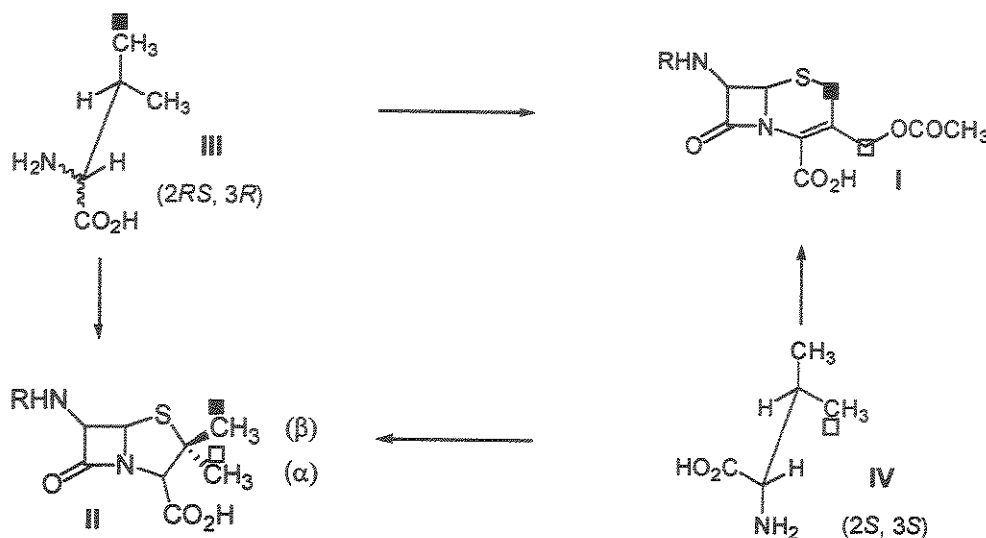
Esquema 1.2 – Proposta de biossíntese da tenelina

A conclusão a respeito do envolvimento da cadeia policetídica se baseia no mecanismo de incorporações sucessivas de unidades C-C intactas na construção destas cadeias. Neste processo, uma cadeia policetídica⁶ R-COSCoA é estendida mediante sucessivas condensações descarboxilativas com o grupo malonil de 3 carbonos resultando em um aumento de dois carbonos a cada repetição do ciclo. Assim, a incorporação de acetato simplesmente marcado em um policetídio resulta em um padrão apresentando posições marcadas e não marcadas alternadas.

Em uma outra aplicação da marcação simples, a estereoespecificidade da inserção do grupo isoprolila da valina durante a biossíntese da cefalosporina (I; Esquema 1.3) e penicilina (II) foi estabelecida pela incorporação dos precursores quirais marcados: (2*RS*, 3*R*)-valina [4- ^{13}C] (III)

⁶ T. J. Simpson, *et.al.*; *Top. Curr. Chem.* 1998, 195, 1 – 143

e (2*S*, 3*S*)-valina [4-¹³C] (IV). Estes estudos⁷ permitiram concluir que os grupos isopropilas são incorporados com retenção de configuração.



Esquema 1.3 – Incorporação de valina marcada na cefalosporina (I) e penicilina (II)

No entanto, conforme mencionado anteriormente, a obtenção dos valores de enriquecimentos isotópicos a partir da diferença entre as intensidades dos sinais no espectro de ¹³C {¹H} do metabólito enriquecido e não enriquecido apresenta sérias limitações.

1.2.2 - Marcação dupla

Apesar da praticidade da aplicação de RMN no estudo de rotas biossintéticas, os estudos envolvendo marcação simples não fornecem nenhuma informação que, pelo menos em princípio, não poderia ser acessada mediante estudos clássicos de marcação com radioisótopos. Assim, a inclusão de estudos com marcação dupla consistiu em um grande avanço que permitiu a observação de processos biossintéticos baseada no acoplamento escalar carbono-carbono (J_{CC}).

⁷ M. Binder, Ch. Tamm., *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 1973, 12, 370.

Os valores dos acoplamentos escalares $^1J_{CC}$ aumentam proporcionalmente ao caráter s dos átomos na ligação geralmente se encontram entre 35 e 220 Hz. O acoplamento $^1J_{CC}$ depende ainda do substituinte X no fragmento $^{13}C-^{13}C-X$. São valores de acoplamentos escalares típicos: 35 Hz para ligações sp^3-sp^3 ; 45 Hz para ligações sp^3-sp^2 e 60 Hz para sp^2-sp^2 . A introdução de uma ligação a mais entre os pares de ^{13}C de um sistema de spins diminui bastante os valores do acoplamento escalar. Assim, os valores de $^2J_{CC}$ são em geral 10 vezes mais baixos que os acoplamentos a uma ligação. Em geral as magnitudes dos acoplamentos são suficientemente diferentes permitindo distinguir os pares de carbonos que se encontram acoplados.

Um composto com abundância natural em ^{13}C apresenta baixa probabilidade de dois átomos de ^{13}C estarem adjacentes (0,01%) e assim, a observação dos sinais satélites resultantes do acoplamento escalar $^{13}C-^{13}C$ no espectro de RMN de ^{13}C desacoplado de 1H é normalmente suprimida (Figura 1.4a)

A introdução de precursores contendo unidades de $^{13}C-^{13}C$ aumentam as intensidades destes satélites e permite a sua observação no espectro do metabólito enriquecido caso a ligação em questão permaneça intacta ao longo da rota biossintética⁸ (Esquema 1.4b). Se, entretanto, a ligação é quebrada, os carbonos originados do precursor marcado fornecerão singletos aumentados (Esquema 1.4c).

⁸ A. G. McInnes; L. C. Vining; D. G. Smith; J. A. Walter; J. L. C. Write, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1974, 282.

Precursor	Metabólito	Espectro de ^{13}C	Observação
a) CH_3COSCoA	$\text{—C}_2\text{—C}_1\text{—}$		Abundância natural
b) $^{13}\text{CH}_3\text{ }^{13}\text{CO}_2\text{Na}$	$\text{—C}_2\text{—C}_1\text{—}$		Acoplamento $^{13}\text{C}, ^{13}\text{C}$
	↓ quebra da ligação		
c)	$\text{—}\ddot{\text{C}}_2\text{—}\dot{\text{C}}_1\text{—}$		Aumento

Esquema 1.4 - Efeito da incorporação de acetato marcado duplamente sobre o espectro de RMN de ^{13}C .

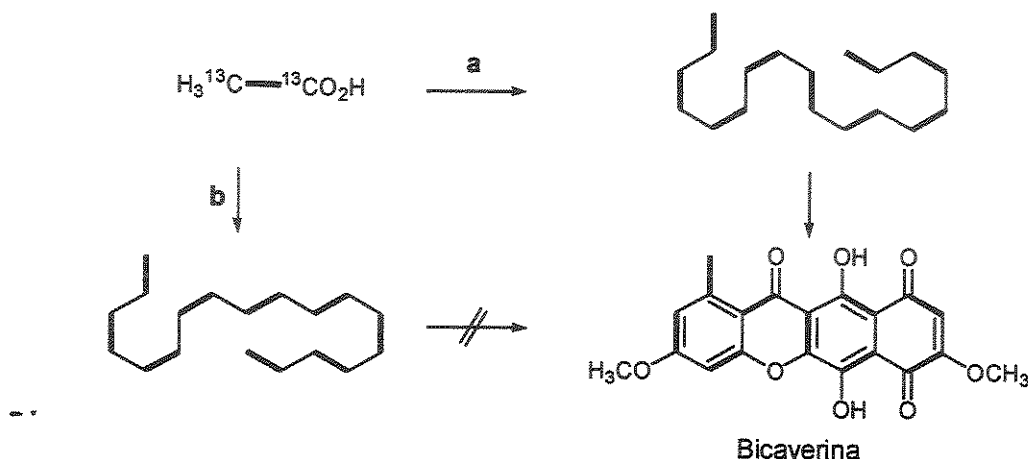
Portanto, a técnica de marcação dupla com ^{13}C apresenta maior sensibilidade uma vez que pequenos satélites de $^{13}\text{C}\text{—}^{13}\text{C}$ acoplados podem ser detectados com mais precisão que os correspondentes enriquecimentos a partir de precursores simplesmente marcados.

Deve ser enfatizado que o precursor marcado normalmente encontra-se altamente diluído na população de acetato não marcado endógena não se observando, portanto, acoplamentos J_{CC} entre pares de carbonos contíguos provenientes de diferentes unidades de acetato marcadas. Os seguintes exemplos ilustram a aplicação desta técnica poderosa na dedução de processos biossintéticos.

Durante o estudo⁹ para determinar a incorporação de acetato na estrutura da bicaverina (Esquema 1.5), a utilização deste precursor duplamente enriquecido foi crucial uma vez que os baixos valores de enriquecimentos (<0,5%) inviabilizam o estudo com substâncias marcadas em uma posição. O enriquecimento medido a partir das intensidades dos sinais satélites para cada posição foi de 0,4% e mostra o alcance deste procedimento em fornecer bons dados quantitativos a altas diluições. Todos os sinais no espectro de ^{13}C da

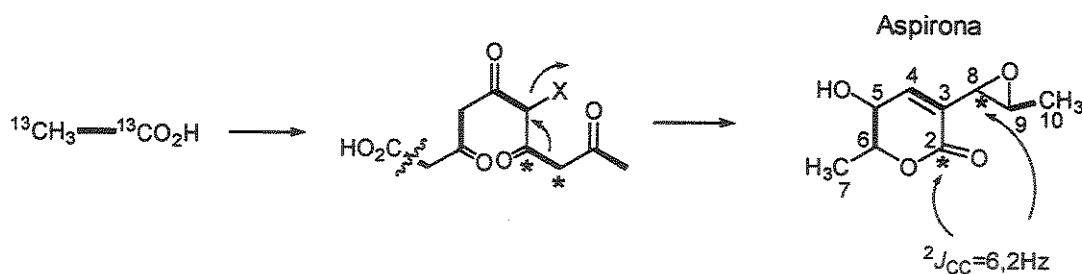
⁹ A. G. McInnes et. al. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1975, 66

bicaverina marcada (com exceção para os grupos metoxilas que foram marcados a partir da metionina) foram acompanhados de enriquecimentos dos satélites. Assim, foi possível evidenciar que o sistema de anéis benzoxantona é inteiramente formado por nove unidades intactas de acetato. O arranjo das unidades de acetato na bicaverina marcada é consonante com a participação de uma cadeia poliketídica de 18 carbonos com o padrão a em detrimento do padrão b.



Esquema 1.5 – Proposta de biossíntese da bicaverina

Estudos de marcação da aspirona, um metabólito de *Aspergillus melleus*, forneceu o padrão de incorporação mostrado no Esquema 1.6 que sugeriu sua biossíntese via uma clivagem do anel ou por rearranjo. A rota através do rearranjo mostrado foi amparada pela observação de um acoplamento $^2J_{CC}$ de 6,2 Hz entre C-2 e C-8 no espectro de RMN de ^{13}C da aspirona enriquecida com acetato [$1,2-^{13}C$].



Esquema 1.6 - Proposta de biossíntese da aspirona

Esta foi a primeira observação de um acoplamento deste tipo em estudos biossintéticos. Trabalhos mais recentes que levaram ao completo delineamento da biossíntese da aspirona serão discutidos mais adiante.

Muitas vezes o espectro de RMN de ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ de um metabólito duplamente marcado apresenta padrões complexos de sinais devido à sobreposição de sinais e ao ruído da linha de base. Nestes casos, a observação dos satélites de ^{13}C torna-se obscura e impossibilita o delineamento da biossíntese em estudo.

O experimento de RMN de ^{13}C envolvendo a sequência de pulsos INADEQUATE 2D¹⁰ tem sido extensivamente empregado¹¹ para a identificação de conectividades C-C contornando assim estas dificuldades. Este experimento quando aplicado a moléculas não enriquecidas exige várias dezenas de miligramas de amostra e o espectro obtido apresenta correlações C-C contínuas permitindo desenhar a estrutura de toda a cadeia carbônica. No entanto, quando moléculas duplamente marcadas são empregadas obtêm-se espectros rapidamente com a utilização de poucos miligramas de material. O espectro obtido, neste caso, apresenta apenas correlações isoladas correspondentes aos pares marcados ^{13}C - ^{13}C de unidades incorporadas intactas.

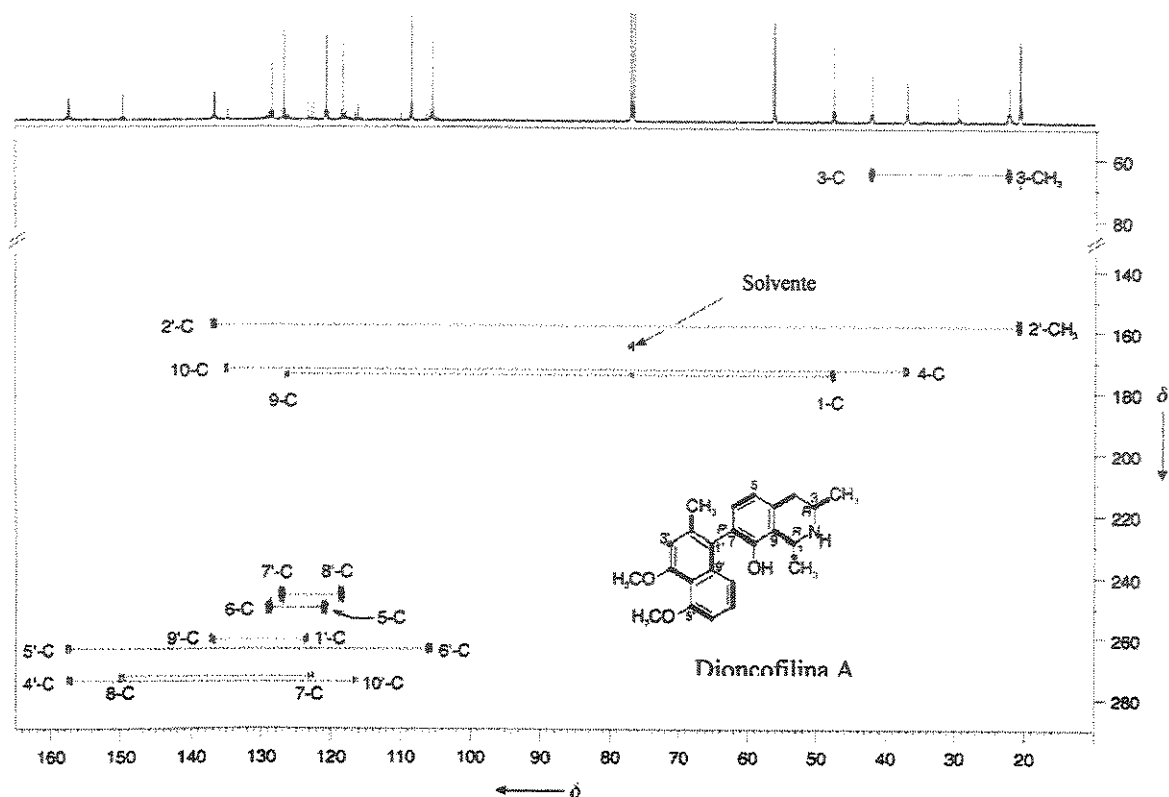
O INADEQUATE 2D foi crucial para a elucidação da biossíntese da dioncofilina A, um alcalóide de *Triphyophyllum peltatum*. Nestes estudos¹², foi estabelecida uma rota acetato-polimalonato para o esqueleto carbônico e

¹⁰ A. Bax, R. Freeman, T. A. Frenkiel, *J. Am. Chem. Soc.*, **1981**, *103*, 2102.

¹¹ a) C. Z. Wang, W. Eisenreich, et. al., *Eur. J. Org. Chem.*, **2001**, 1459. b) G. T. Carter, A. A. Fantini, J. C. James, D. B. Borders, R. J. White, *Tetrahedron Lett.*, **1984**, *25*, 255.

¹² G. Bringmann, M. Wohlfarth, H. Rischer, M. Grune, J. Schlauer, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2000**, *39*, 1464.

consiste na primeira observação deste caminho biossintético para alcalóides em plantas superiores.



Esquema 1.7 – Espectro de RMN de INADEQUATE 2D (CDCl₃; 125 MHz) da dioncofilina A marcada com acetato [1,2-¹³C]

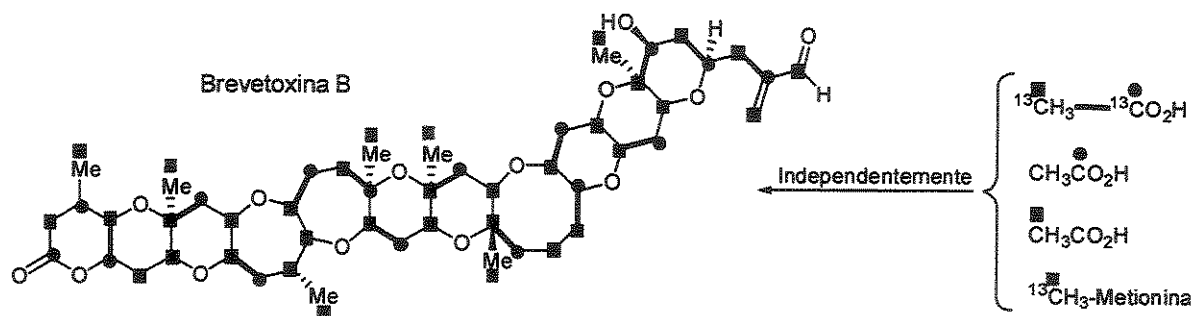
A análise do espectro da dioncofilina marcada com acetato [1,2-¹³C] indicou que todo o esqueleto carbônico deriva do acetato e que ambas as metades da molécula apresentam um padrão policetídeo idêntico (Esquema 1.7). Desta forma, a partir de seis unidades de acetato para cada metade, através de precursores β-policarbonilados idênticos, tanto a parte naftalênica como a isoquinolínica do metabólito são formadas por ciclização. No caso da isoquinolínica, a ciclização ocorre com incorporação do átomo de nitrogênio. Finalmente, os dois fragmentos resultantes são unidos originando a dioncofilina A.

1.2.3 - Combinação de técnicas

A incorporação de uma mistura de precursores simplesmente marcados pode resultar na marcação de um metabólito de forma que o acoplamento escalar ^{13}C - ^{13}C seja observado. Esta informação é útil no delineamento de processos de condensação e ciclização e sua obtenção é intensamente facilitada através de um estudo preliminar com precursores duplamente marcados.

A técnica de precursores mistos foi elegantemente empregada no estudo de atribuição dos sinais no espectro de ^{13}C e a origem biossintética da brevetoxina B, uma potente neurotoxina produzida pelo dinoflagelado *Gymnodinium breve*¹³ (Esquema 1.8).

A brevetoxina B biossintetizada a partir de acetato [$1,2\text{-}^{13}\text{C}$] foi empregada para experimentos de RMN 2D (INADEQUATE) que levou ao esclarecimento das conectividades de 14 unidades de acetato utilizando-se apenas 1,5 mg de amostra. Experimentos adicionais envolvendo a utilização de acetato [$1\text{-}^{13}\text{C}$], [$2\text{-}^{13}\text{C}$] e metionina [metila- ^{13}C] forneceram o padrão de incorporação completo.



Esquema 1.8 – Incorporação de acetatos marcados na brevetoxina

¹³ M. S. Lee, D. J. repeta, K. Nakanishi, *J. Am. Chem. Soc.*, 1986, 108, 7855.

Dos 50 átomos de carbono da brevetoxina B, 16 apresentaram enriquecimento a partir de acetato [$1\text{-}^{13}\text{C}$]; 30 de acetato [$2\text{-}^{13}\text{C}$] e quatro a partir de metionina [metila- ^{13}C].

Mais recentemente, estas técnicas de marcação foram empregadas na elucidação das rotas de vários outros metabólitos policetídicos complexos de dinoflagelados¹⁴.

1.2.4 - Desenvolvimentos recentes

No final dos anos 80 iniciou-se uma nova revolução a medida em que os pesquisadores desenvolveram métodos de identificar, purificar e manipular geneticamente enzimas individuais.

Paralelamente, na área da espectroscopia de RMN, outro grande avanço ocorreu com o desenvolvimento de gradientes de campo e com a implementação de estudos¹⁵ envolvendo precursores marcados com ^2H e ^{18}O .

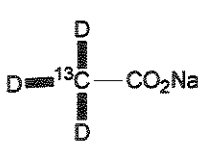
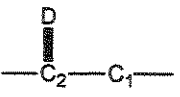
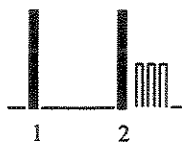
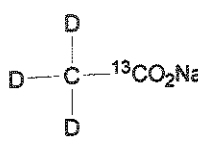
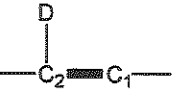
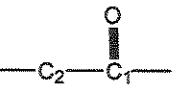
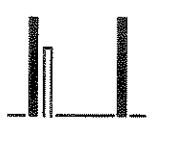
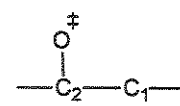
A RMN de ^2H tem sido empregada em muitas investigações biossintéticas apesar de apresentar muitas desvantagens inerentes. Por constituir um quadrupolo, o ^2H (spin 1) apresenta linhas espectrais largas e isto, combinado com a sua baixa constante magnetogírica e a estreita faixa de valores de deslocamentos químicos, freqüentemente resulta em espectros pouco resolvidos. Entretanto, em consequência da baixa abundância natural do ^2H (0,012%), são toleradas diluições muito acima daquelas permitidas em estudos com ^{13}C . Isto torna a marcação com ^2H particularmente útil para estudar a incorporação de intermediários avançados em uma rota biossintética.

¹⁴ T. Houdai, S. Matsuda, M. Murata, M. Satake, Y. Oshima, L. L. Rhodes, *Tetrahedron*, **2001**, 57, 5551.

¹⁵ T. J. Simpson, *Chem. Soc. Rev.* **1987**, 16, 123.

A falta de resolução inerente da RMN de ^2H pode ser superada pela análise dos efeitos isotópicos provocados nos deslocamentos químicos dos sinais de RMN de ^{13}C . A utilização do ^{13}C como um núcleo "delator" tanto de hidrogênio como de oxigênio representa um dos maiores avanços em estudos biossintéticos. Este método consiste na observação da mudança no deslocamento do ^{13}C provocada por uma substituição de um hidrogênio α ou β por deutério. Similarmente, a presença de ^{18}O α a um átomo de ^{13}C pode ser detectada pelo deslocamento provocado no espectro de RMN de ^{13}C .

O efeito de um átomo de deutério diretamente ligado a um núcleo de ^{13}C sobre o espectro de RMN de ^{13}C consiste no surgimento de multipletos mais blindados em relação ao sinal normal (Esquema 1.9a). A presença de cada deutério desloca o centro da frequência do sinal por 0,3 a 0,6 ppm e o acoplamento escalar spin-spin $^1J_{\text{CD}}$ produz o multipletto característico.

Precursor	Metabólito	Espectro de ^{13}C	Observação
a) 			Acoplamento $^{13}\text{C}, ^2\text{H}$; Deslocamento isotópico α
b) 			Deslocamento isotópico β
c) $\text{CH}_3\text{}^{13}\text{C}^{18}\text{O}_2\text{Na}$			Deslocamento isotópico α
d) $^{18}\text{O}_2^\ddagger$			Deslocamento isotópico α

Esquema 1.9 - Efeito da incorporação de ^2H e ^{18}O no deslocamento químico do ^{13}C .

Sinais deslocados originados de carbonos sem hidrogênios diretamente ligados apresentam razões sinal/ruído reduzidas devido à pouca relaxação e ausência de NOE. Esta é uma desvantagem do método que é ampliada ainda mais pela distribuição da intensidade entre os picos do multipeto. O desacoplamento de deutério pode auxiliar nesta questão através da remoção do acoplamento ^2H - ^{13}C .

Muitas das desvantagens associadas à ligação direta do deutério são evitadas com o posicionamento deste átomo a duas ligações do núcleo de ^{13}C relacionado (Esquema 1.9b). Uma vez que as constantes de acoplamentos geminais carbono-deutério são muito pequenas, os sinais deslocados apresentam-se efetivamente como singletos mesmo sem a aplicação de desacoplamento de deutério. Isto resulta em um aumento da razão sinal/ruído quando comparado ao experimento de deslocamento α correspondente.

Como mencionado anteriormente, a incorporação biossintética de ^{18}O também pode ser detectada pela observação do deslocamento isotópico induzido no espectro de RMN de ^{13}C . O ^{18}O pode ser convenientemente introduzido através de um precursor duplamente marcado (Esquema 9c) ou pelo crescimento sob atmosfera de $^{18}\text{O}_2$ (Esquema 1.9d). Os deslocamentos resultantes são da mesma magnitude dos deslocamentos isotópicos promovidos por β - ^2H , ou seja, aproximadamente 0,05 ppm e somente tornam-se observáveis em espectrômetros de altos campos.

O desenvolvimento de experimentos de marcação com ^{18}O e ^2H conduziram a uma reavaliação da formação da aspirona. Estudos envolvendo a incorporação de acetato [1 - ^{13}C , ^{18}O] e $^{18}\text{O}_2$ gasoso revelaram surpreendentemente que nenhum dos oxigênios derivou do acetato, sendo três

provenientes da atmosfera e um do meio de cultura¹⁶. Estes resultados foram subsequentemente verificados em um dos poucos relatos^{17,18} de aplicações de marcação com ^{17}O e RMN de ^{17}O em estudos biossintéticos. O núcleo de ^{17}O (spin 5/2) é pouco sensível e fornece linhas largas devido a relaxação quadrupolar.

A incorporação de acetato [$2\text{-}^{13}\text{C}$, $^2\text{H}_3$] na aspirona mostrou a retenção de dois hidrogênios derivados do acetato em C-7 sugerindo a participação deste carbono em uma ligação olefínica em algum ponto ao longo da rota biossintética. Para acomodar estes resultados, foi proposto um caminho envolvendo rearranjo mediado por epóxido e reações de fechamento de anel.

Posteriormente foi realizada uma espetacular série de experimentos¹⁹ de incorporações com os supostos intermediários da construção da cadeia marcados, tanto com ^2H como ^{13}C , sintetizados na forma de seus tioésteres *N*-acetilcisteamina (NAC). Estes experimentos resultaram no completo delineamento da rota de montagem catalisada pela policetídio sintase e se mantém como o mais completo e bem sucedido estudo deste tipo. A incorporação de intermediários β -hidroxitioésteres, ou seja, o tioéster NAC correspondente a VII, estabeleceu que o processo de cetorredução ocorre com a mesma estereoquímica absoluta que a biossíntese de ácidos graxos. Deste fato surgiu a proposta de que a policetídio sintase envolvida na biossíntese da aspirona poderia ser derivada da ácido graxo sintase que presumivelmente teria perdido sua capacidade de efetuar reduções de enoila. Foi mostrado que

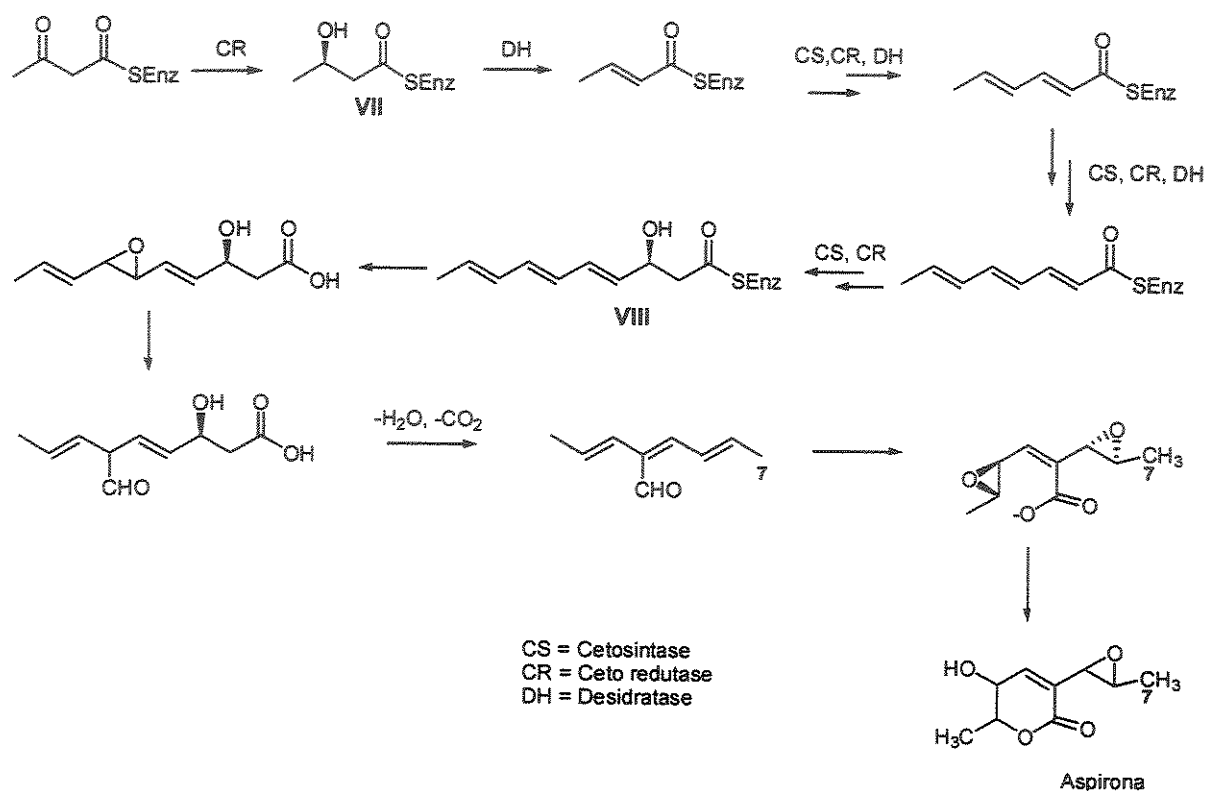
¹⁶ A. S. Ahmed, T. J. Simpson, J. Staunton, J. C. Vederas et al. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1985**, 1685

¹⁷ a) J. Staunton, A. C. Sutkowski, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1991**, 1106 b) J. Staunton, A. C. Sutkowski, et al, *J. Mag. Reson.*, **1987**, 493.

¹⁸ J. Staunton, A. C. Sutkowski, J. C. Vederas, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1985**, 1685.

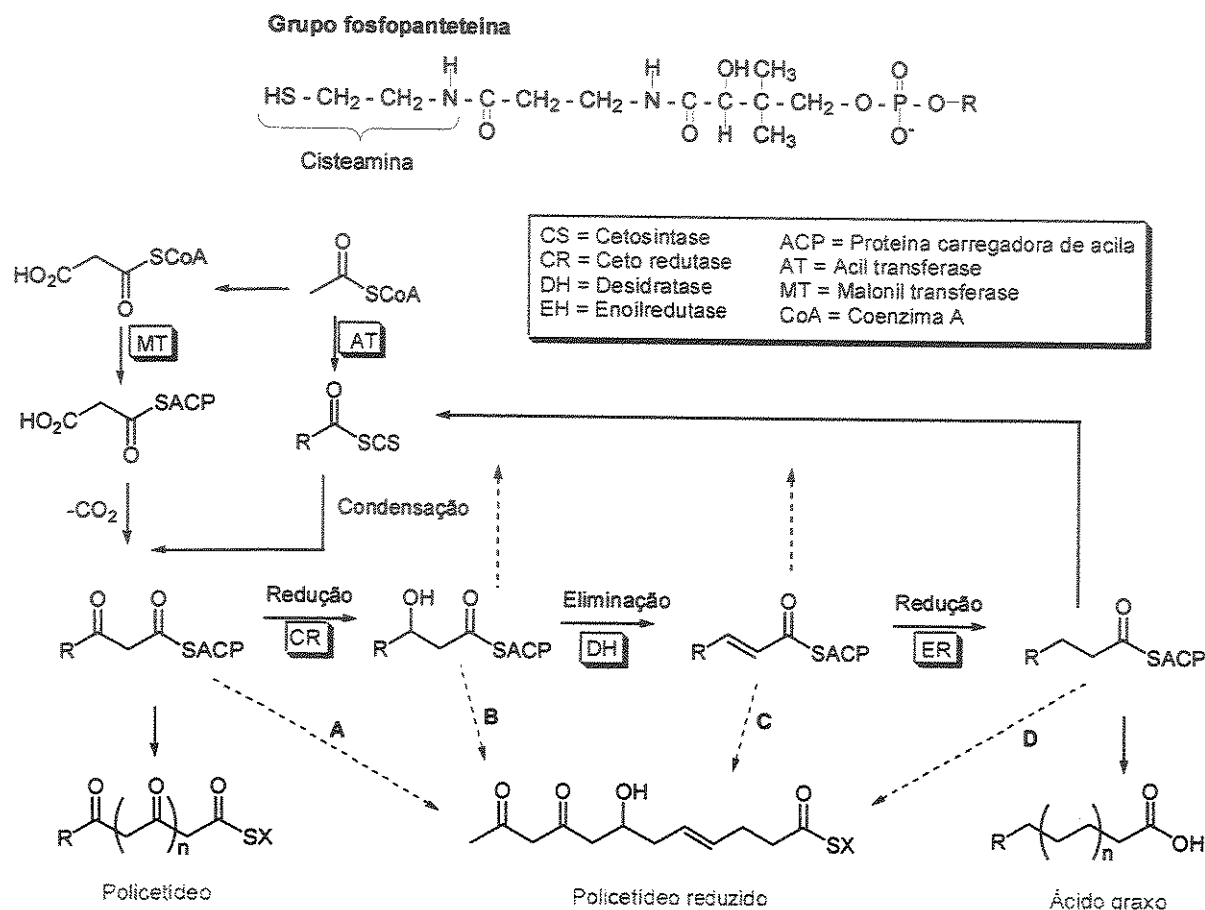
¹⁹ a) J. Staunton, A. C. Sutkowski, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1991**, 1108 b) Staunton, A. C. Sutkowski, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1991**, 1110 c) A. Jacobs, J. Staunton, A. C. Sutkowski, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1991**, 1113 d) A. Jacobs, A. Hill, J. Staunton, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1995**, 859 e) A. Hill, J. Staunton, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1995**, 861 f) A. Jacobs, J. Staunton, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1995**, 863.

as desidratações ocorrem por uma eliminação *sin*. O produto final hexacetideo VIII do processo de montagem policetídisca seria então convertido na aspirona pela seqüência mostrada no Esquema 1.10 que inclui um rearranjo de epóxido.



Esquema 1.10 – Biossíntese da aspirona

Muito do atual estágio de entendimento da formação de metabólitos policetídisca se deve a estudos usando tioésteres *N*-acetilcisteamina de intermediários avançados marcados em conjunção à análise detalhada de espectroscopia de RMN de metabólitos enriquecidos. Os tioésteres *N*-acetilcisteamina são empregados porque eles mimetizam estruturalmente a terminação tiol do grupo fosfopanteteína encontrado na coenzima A e na proteína carregadora de acila (ACP; Esquema 1.11).



Esquema 1.11 - Biossíntese de policetídeos e ácidos graxos

A etapa inicial de um processo de construção de uma cadeia policetídic²⁰ consiste em outra condensação descarboxilativa, desta vez, entre o grupo malonil-ACP e uma unidade de acetil-SCoA fornecendo o primeiro intermediário policetídic, o 1,3-dicetídio-SACP. Este intermediário pode prosseguir ao longo das várias unidades do complexo multienzimático da policetídio sintase. Cada uma destas unidades promoverá transformações redutivas específicas fornecendo outros intermediários na sequência mostrada no esquema. A partir da condensação descarboxilativa, cada um dos

²⁰ T. J. Simpson, *et al.*; *Top. Curr. Chem.* **1998**, *195*, 1 – 143

subsequentes intermediários produzidos pelo trajeto ao longo da PCS pode reingressar no início do ciclo através da substituição do grupo ACP pela SCoA. Isto dará oportunidade para que este determinado intermediário sofra um aumento de dois carbonos em sua cadeia através de uma nova condensação com a malonil-ACP.

Esta abordagem foi aplicada a vários problemas biossintéticos dentre os quais se destacam os estudos envolvendo as avermectinas, uma família de produtos naturais²¹ produzida por *Streptomyces avermitilis* constituída por oito estruturas pentacíclicas (Figura 1.1) contendo um anel macrolídico de 16 membros que exibem uma potente atividade antiparasítica.

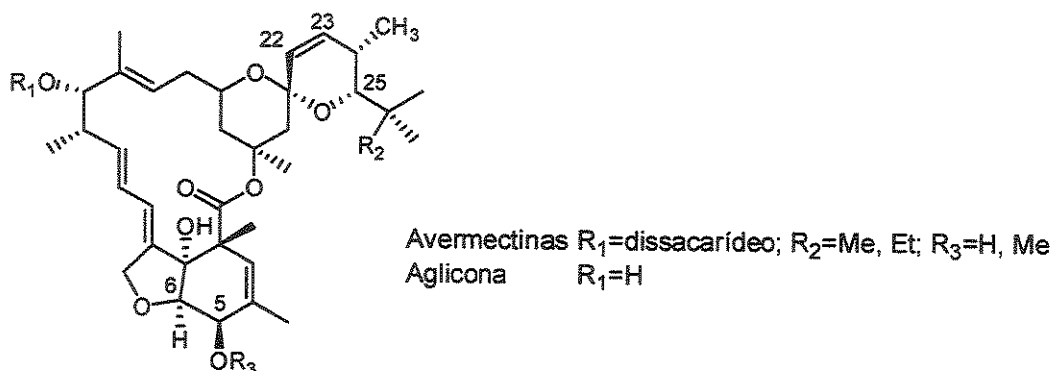


Figura 1.1 – Estrutura das avermectinas

Estes oito compostos diferem estruturalmente devido à variação de unidade iniciadora da policetídio sintase em C-25, ao padrão de *O*-metilação em C-5 e ao padrão de hidratação-desidratação em C-22/C-23.

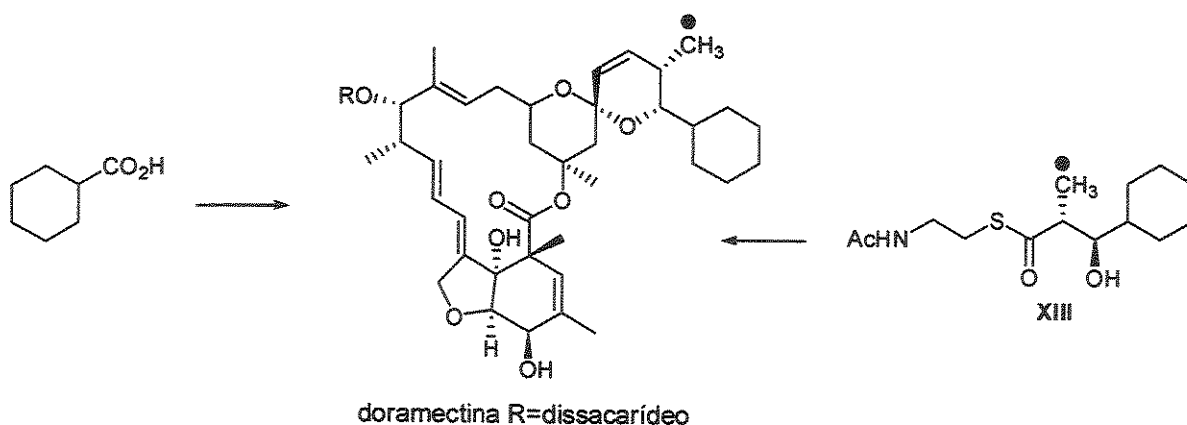
Estudos de marcação²² mostraram que a aglicona da avermectina deriva de sete unidades de acetato e cinco de propionato. As unidades iniciadoras da policetídio sintase, isobutirato e 2-metilbutirato derivam do catabolismo da L-

²¹ R. W. Burg, S. Omura, et al, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1979**, *15*, 361.

²² D. E. Cane, T. C. Liang, et al, *J. Am. Chem. Soc.*, **1983**, *105*, 4110.

valina e da L-isoleucina respectivamente. Todos átomos de oxigênio, excluindo-se aqueles ligados a C-6 e C-25, são derivados dos seus precursores carboxilados.

Várias outras avermectinas foram obtidas através da utilização de um mutante²³ da *Streptomyces avermitilis* apresentando carência da atividade descarboxilativa responsável pela produção dos ácidos iniciadores da policetídeo sintase. A administração dos ácidos iniciadores naturais a este mutante restabeleceu a produção das avermectinas naturais, enquanto que a administração de 40 ácidos iniciadores não naturais levou a muitos novos análogos das avermectinas modificados na posição C-25. A doramectina, um antiparasítico extremamente efetivo comercializado como Dectomax, foi isolado após administração do ácido cicloexilmetanóico (Esquema 1.12). O tioéster NAC XIII do intermediário biossintético dicetídico também foi incorporado²⁴ na doramectina através da linhagem mutante. Este exemplo consiste em um dos primeiros da incorporação de um análogo de um precursor natural ligado à PCS.

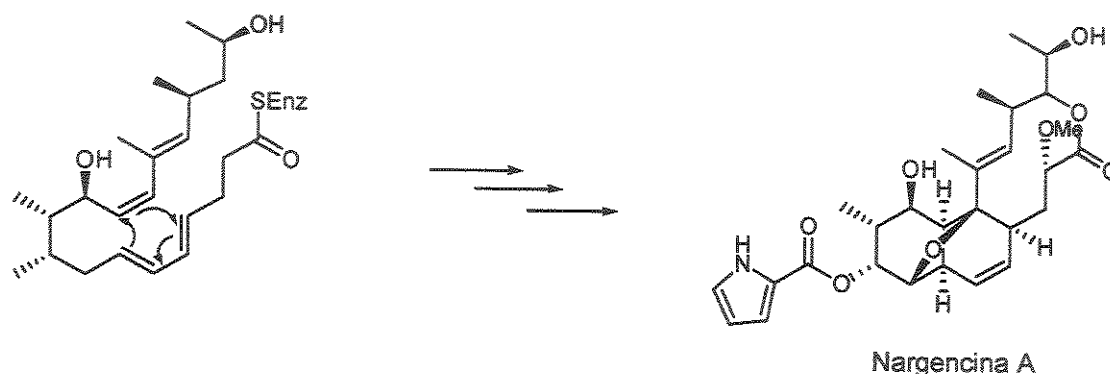


Esquema 1.12 - Incorporação de tioésteres NAC de intermediários na doramectina

²³ a) C. J. Dutton, S. P. Gibson, M. K. Richards, et al, *J. Antibiot.*, **1991**, *44*, 357.; b) E. W. Hafner, B. W. Holley, W. C. Wernau, *J. Antibiot.*, **1991**, *44*, 349.

²⁴ C. J. Dutton, A. M. Hooper, P. F. Leadlay, J. Staunton, *Tetrahedron, Lett.*, **1994**, *35*, 327.

Certas estruturas cíclicas presentes em alguns policetídeos ocorrem via reação de Diels-Alder intramolecular. Este processo foi proposto para vários metabólitos dentre os quais a nargencina A, mostrada no esquema abaixo, é um dos mais profundamente estudados.

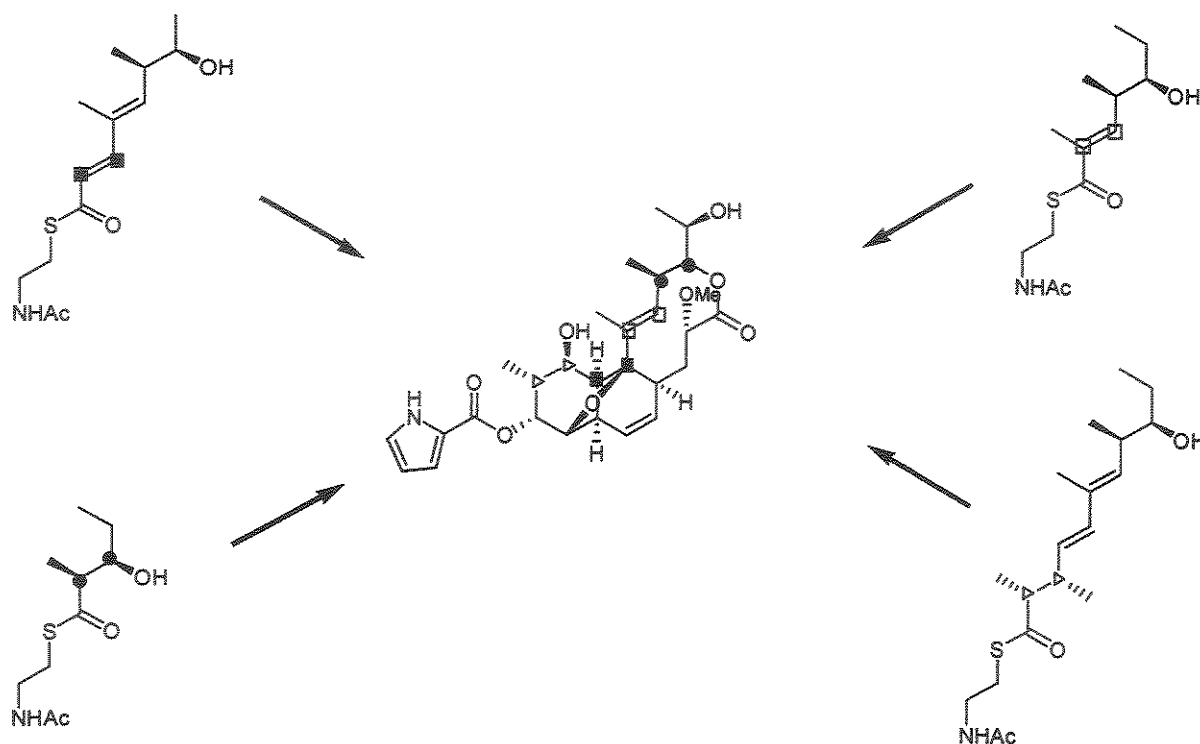


Esquema 1.13 – Etapa de cicloadição na biossíntese da nargencina A

Estudos^{25, 26} envolvendo administração de tioésteres NAC marcados com ^{13}C (Esquema 1.14) a culturas de *Nocardia argentinensis* demonstraram incorporações regioespecíficas na nargencina que são consistentes com uma ciclização intramolecular Diels-Alder de um intermediário nonacetídico linear.

²⁵ D. E. Cane, W. T. Tan, W. R. Ott, *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, *115*, 527.

²⁶ D. E. Cane, G. Luo, *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, *117*, 6633.



Esquema 1.14 - Incorporação de tioésteres NAC de intermediários na nargentina A

1.2.5 – Terreinol - um novo metabólito secundário de *Aspergillus terreus*

Dentre os diversos organismos vivos, os fungos destacam-se por sua versatilidade em produzir compostos naturais complexos, muito dos quais, apresentam reconhecida importância farmacêutica. As propriedades biológicas destes produtos e a sua disponibilidade para experimentos de marcação com ^{13}C torna os metabólitos de fungos candidatos ideais para estudos de determinações de rotas biossintéticas através de RMN.

O *Aspergillus terreus* é um fungo encontrado em uma ampla variedade de solos ao redor do mundo e consiste em uma importante fonte de compostos biologicamente ativos. Dentre estes a lovastatina (mevinolina), destaca-se na indústria farmacêutica como um potente agente anticolestereogênico²⁷. Além dos produtos naturais mostrados na Figura 2 foram isolados vários outros

²⁷ Alberts, A. W.; Chen, J.; Kuron, G.; Hunt, V.; Huff, J.; Hoffman, C.; Rothrock, J.; Lopez, M.; Joshua, H.; Harris, E.; Patchett, A.; Monaghan, R.; Currie, S.; Stapley, E.; Albers-Schonberg, G.; Hensens, O.; Hirshfield, J.; Hoogsteen, K.; Liesch, J.; Springer, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1980**, *77*, 3957.

metabólitos secundários de *A. terreus* tais como a terreína²⁸ e o ácido terréico²⁹, ambos os quais apresentam atividade antibiótica³⁰.

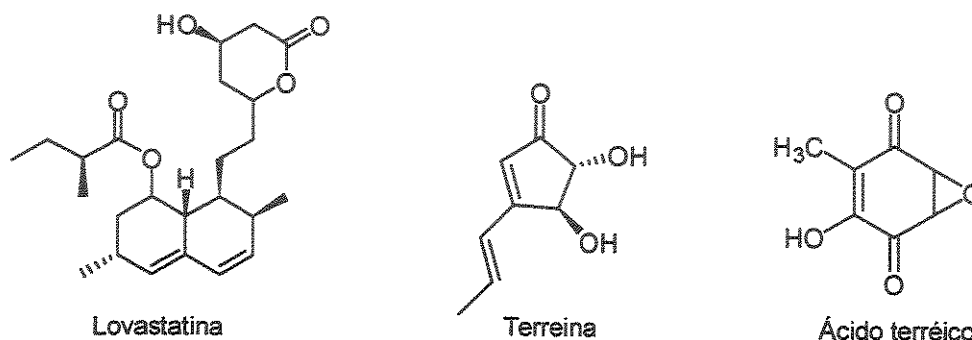


Figura 1.2 - Exemplo de metabólitos secundários isolados de *Aspergillus terreus*

Recentemente o terreinol, um metabólito inédito, foi isolado em nosso grupo³¹ a partir de culturas de *Aspergillus terreus* CCT 3320. Com base nos dados espectroscópicos adquiridos até então (IV, RMN: H,H-COSY; H,C-HSQC; H,C-gHMBC e NOESY 1D), duas estruturas possíveis foram consideradas (Figura 1.3).

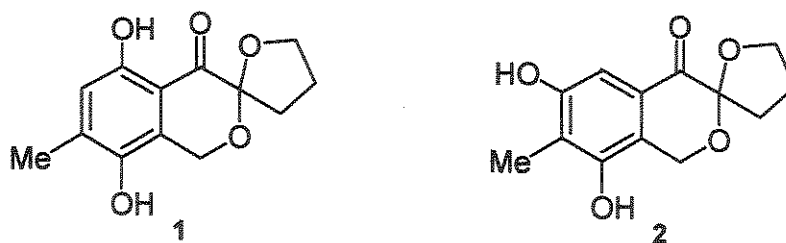


Figura 1.3 - Estruturas propostas para o terreinol, metabólito inédito de *Aspergillus terreus*.

²⁸ Raistrick, H., Smith, G. *Biochem. J.* **1935**, 29, 606.

²⁹ Kolb, H. C.; Hoffmann, M. R. *Tetrahedron: Asymmetry* **1990**, 1, 237.

³⁰ a) Sheeran, J. C.; Lawson, W. B.; Gaul, R. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, 80, 5536. b) Sheeran, J. C.; Lo, Y. S. *J. Med. Chem.* **1974**, 17, 371. c) Kiriya, N.; Higuchi, Y.; Yamamoto, Y. *Chem. Pharm. Bull.* **1977**, 25, 1265.

³¹ A. L. Porto, G. P. Manfio, S. Y. Eguchi, A. J. Marsaioli; *New metabolite from Aspergillus terreus isolated from Brazilian Atlantic Rain Forest*, 22nd IUPAC – International Symposium on the Chemistry of Natural Products, UFSCar, São Carlos, SP, Brazil, September 3-8, 2000.

1.3 - OBJETIVOS

Implementação de técnicas de enriquecimento isotópico e de estudos biossintéticos de metabólitos secundários através de RMN no Instituto de Química - UNICAMP.

Para tanto, o terreinol³¹ (Figura 1.3), recentemente isolado em nosso grupo a partir de culturas de *Aspergillus terreus* CCT 3320, foi escolhido como alvo de nossos estudos.

1.4 - RESULTADOS E DISCUSSÕES

1.4.1 - Otimização das condições originais de isolamento do terreinol

Devido à disponibilidade limitada de substratos isotopicamente enriquecidos em ^{13}C em nosso laboratório, tornou-se de fundamental importância a otimização prévia das condições experimentais de obtenção do terreinol (Figura 1.3) a partir de culturas de *A. terreus*.

Desta forma, decidimos inicialmente reproduzir os experimentos realizados pelo Dr. André L. Porto que levaram ao isolamento pioneiro do composto em questão em nosso grupo de pesquisa. As condições originais consistiram na inoculação de *Aspergillus terreus* CCT 3320 em 100 mL de extrato de malte (2%) em erlenmeyers de 500 mL sob condições estéreis. A cultura foi então mantida sob agitação mecânica constante durante oito dias, após os quais, o meio de cultura foi extraído com acetato de etila. O extrato foi submetido a separação por cromatografia em camada delgada preparativa. O terreinol purificado foi submetido a extensivos métodos espectroscópicos de RMN (^1H e ^{13}C ; H,H-COSY ; H,C-HSQC ; H,C-gHMBC e NOE), no IV e espectrométricos (EMAR) a partir dos quais a estrutura deste novo produto natural foi estabelecida. Juntamente à obtenção do terreinol foram isolados a terreína e o ácido terréico (Figura 1.2).

No entanto, em nossos estudos iniciais empregando-se as condições descritas acima, o composto de interesse não foi produzido mesmo após exaustiva repetição dos experimentos. Os extratos obtidos nestes estudos foram analisados por CCD e CG/EM (Figura 1.5) sendo que, em ambas as técnicas, foi utilizado um padrão do terreinol puro (Figura 1.4).

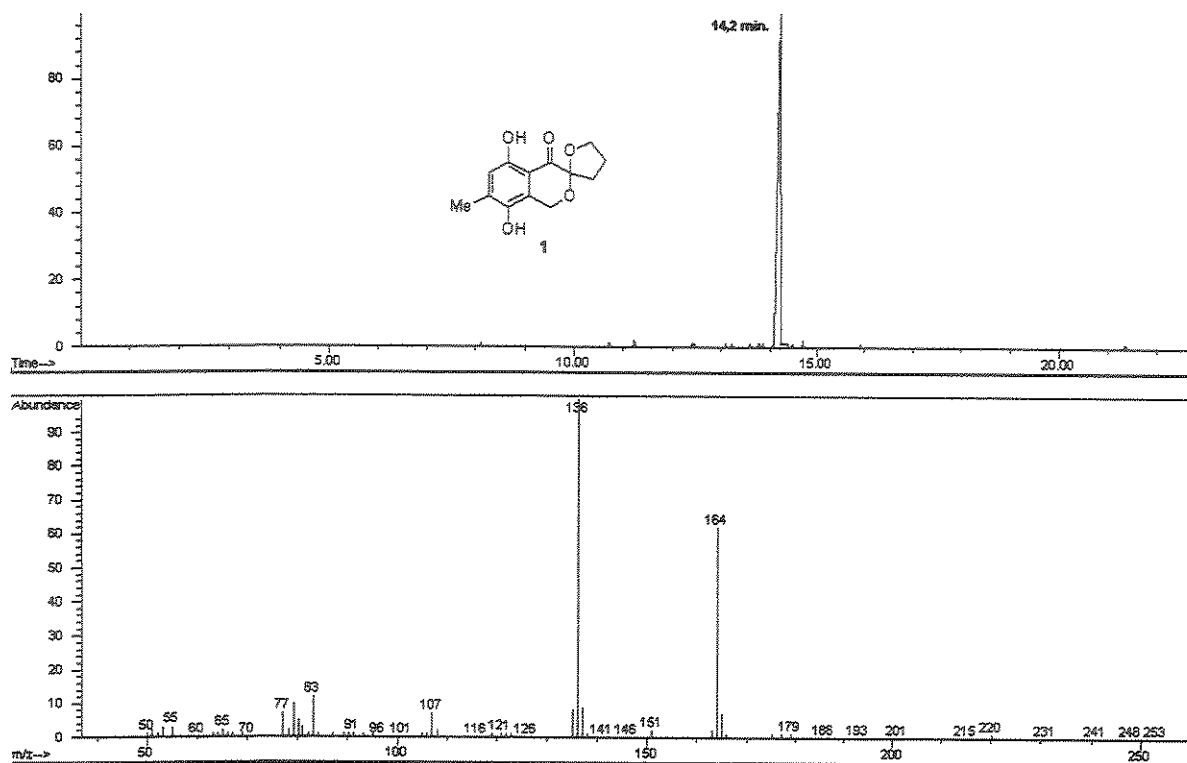


Figura 1.4 – Cromatograma de íons totais (acima) e espectro de massas (abaixo) do terreinol

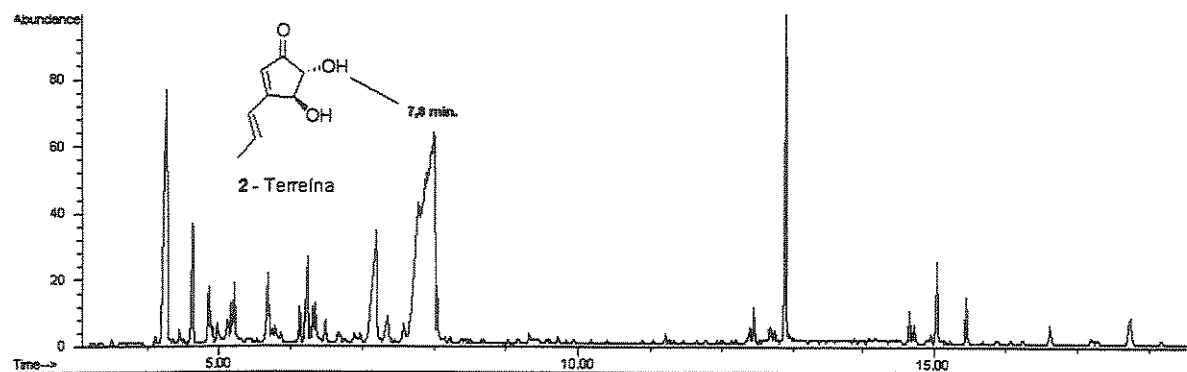


Figura 1.5 – Cromatograma de íons totais de extrato de *A. terreus* CCT 3320 obtido conforme metodologia original

Como pode ser verificado na Figura 1.5 a terreína por sua vez foi detectada como o principal composto do extrato em questão. O cromatograma e o espectro de massas do padrão deste composto são mostrados na figura abaixo.

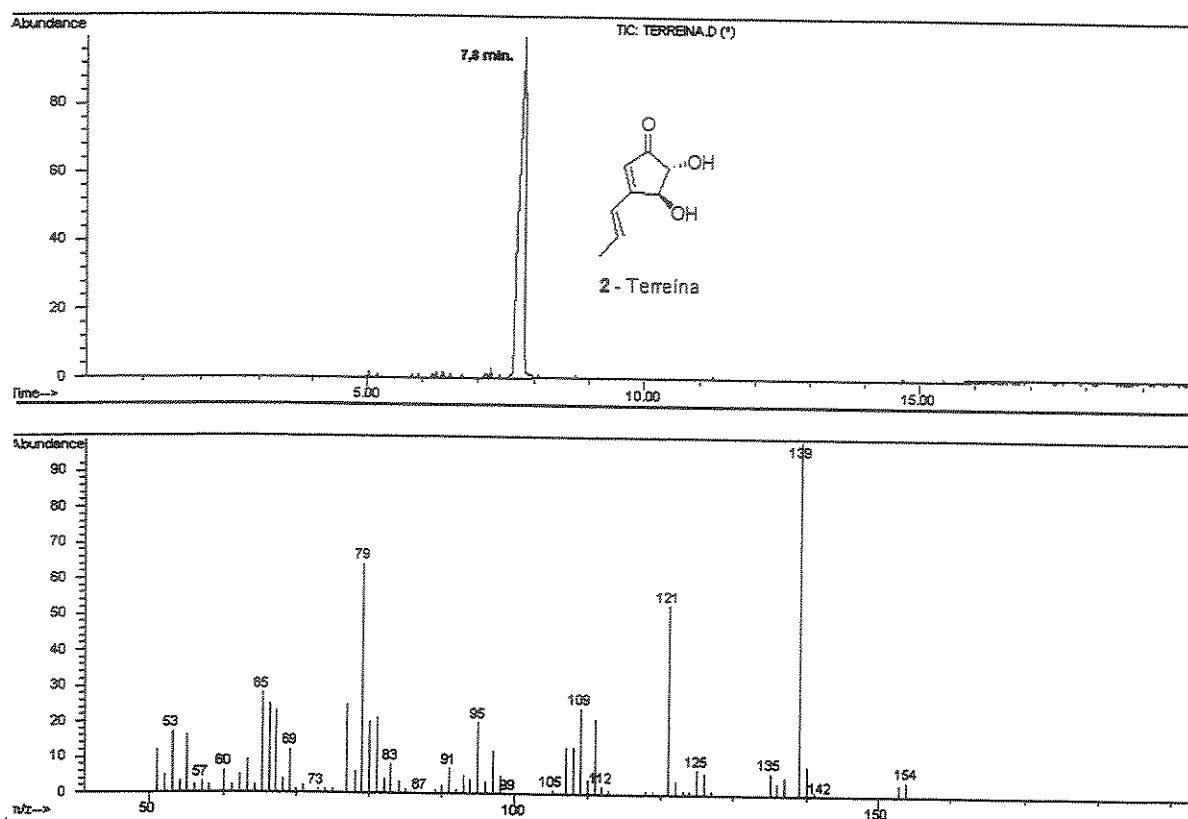


Figura 1.6 - Cromatograma de íons totais (acima) e espectro de massas (abaixo) da terpenol

No espectro de RMN de ^1H da terpenol obtida (Figura 1.7), que se mostrou idêntico ao da literatura³³, pode ser observado o sinal da metila em δ 1,95 evidenciando o seu acoplamento com o hidrogênio H-2 ($^3J = 6,6$ Hz) e o acoplamento alílico com H-3 ($^4J = 1,1$ Hz). O sinal relativo a H-2 foi observado em δ 6,80 (dq) e o sinal do hidrogênio olefínico vizinho *trans* H-3 em δ 6,45 (dl, $^3J = 15,7$). O singlete do hidrogênio olefínico α -carbonila foi observado em δ 6,02 e os dois dupletos dos hidrogênios carbinólicos apresentando uma relação *trans* foram observados em δ 4,09 (d; $^3J = 2,6$ Hz; H-8) e δ 4,80 (d; $^3J = 2,6$ Hz; H-7).

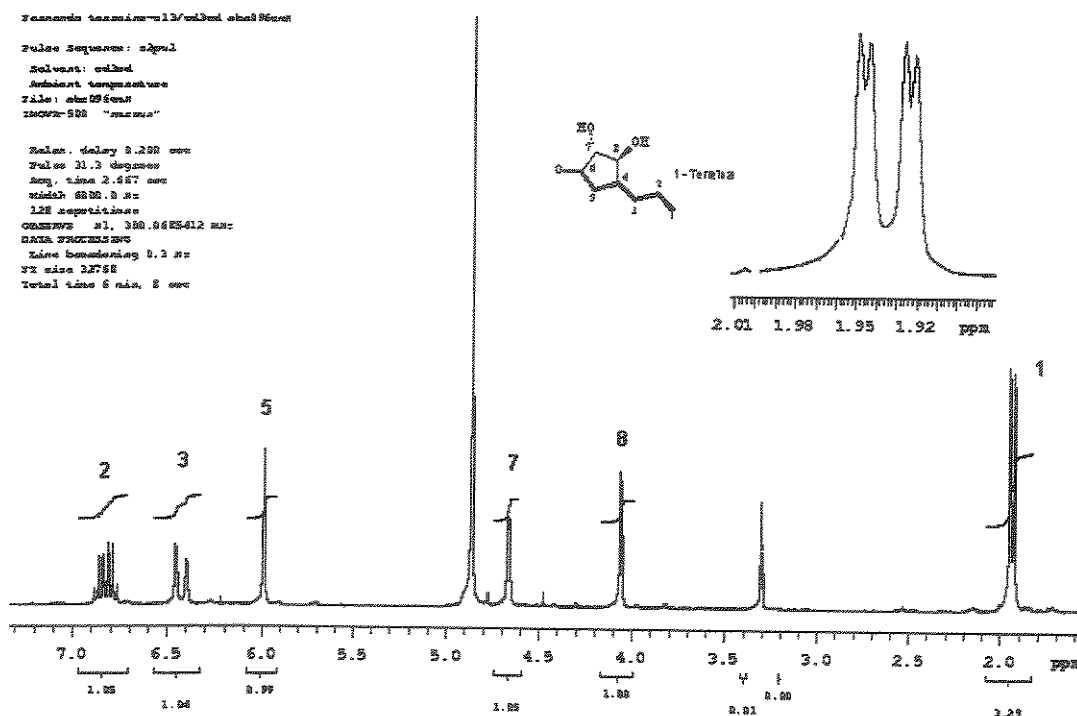


Figura 1.7 – Espectro de RMN de ^1H (300,07MHz; CD_3OD) da terreína purificada

Surpreendentemente, a substituição do extrato de malte da marca MERCK, até então empregado, pelo extrato de malte da marca DIFCO, resultou na produção do composto desejado conforme pode ser verificado no cromatograma a seguir.

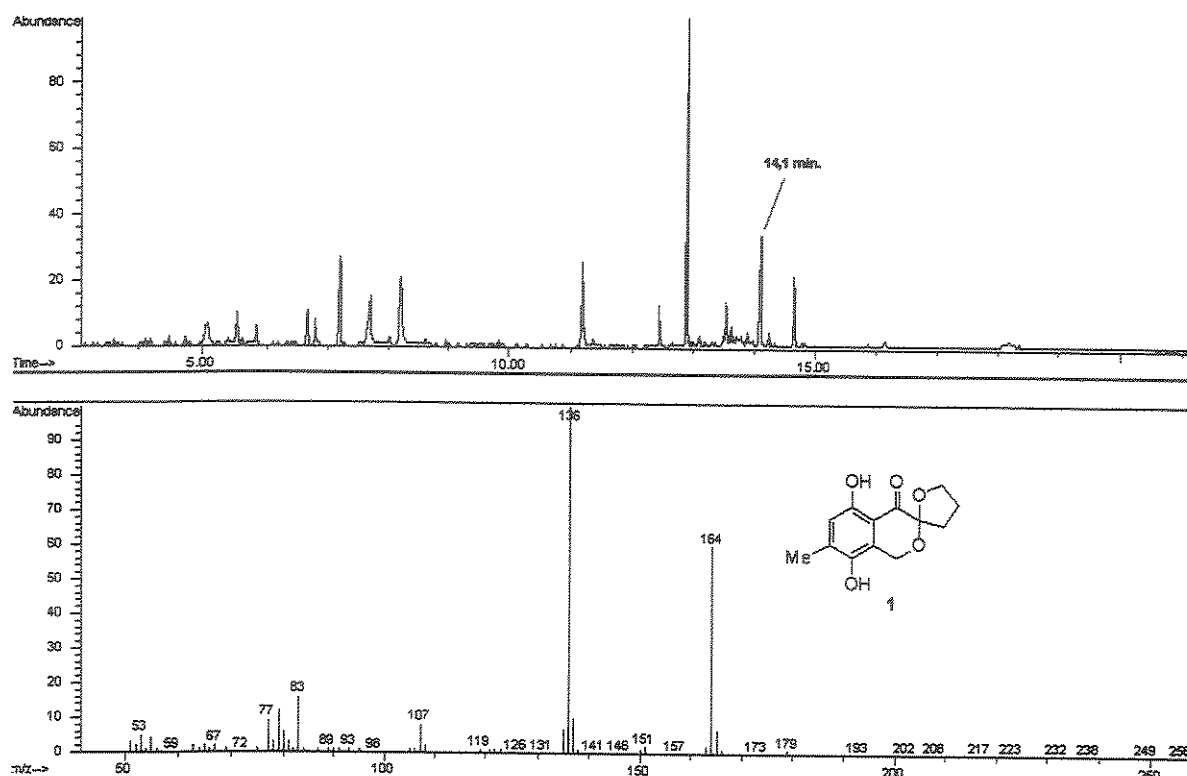


Figura 1.8 – Cromatograma de íons totais do extrato de *A. terreus* CCT 3320 cultivado com ME DIFCO (acima) e espectro de massas do terreinol (abaixo)

A confirmação da diferença na distribuição dos metabólitos produzidos nas diferentes marcas de meios de cultura foi obtida a partir de experimentos adicionais em que ambas foram comparadas mediante várias condições experimentais.

Tabela 1.1 – Resultados dos testes de otimização de condições de obtenção do terreinol.

Exp [*]	ME 2%	Temperatura	Agitação	Outros	Massa extrato bruto	Deteção terreinol ^{**}
1	DIFCO	t.a	-	luz ambiente	10 mg	+
2	DIFCO	t.a	-	escuro	8 mg	+
3	DIFCO	28 °C	-	estufa	8 mg	+
4	DIFCO	28 °C	180 rpm	agitador	11 mg	+
5	MERCK	t.a	-	luz ambiente	38 mg	-
6	MERCK	t.a	-	escuro	32 mg	-
7	MERCK	28 °C	-	estufa	30 mg	-
8	MERCK	28 °C	180 rpm	agitador	36 mg	-

^{*}Esporos de *Aspergillus terreus* CCT 3320 foram inoculados em 100 mL extrato de malte (2%). Após oito dias, o meio de cultura foi extraído com acetato de etila.

^{**}CGEM e CCD

Nestes experimentos observou-se uma baixa taxa de crescimento de massa celular no meio de cultura DIFCO em relação ao meio de cultura MERCK e, ainda, a produção de uma menor quantidade de extrato bruto conforme pode ser verificado pelos valores de rendimentos na Tabela 1.1.

O terreinol foi observado sempre que o extrato de malte DIFCO foi utilizado não tendo sido detectado, entretanto, em nenhum dos ensaios envolvendo o meio de cultura MERCK. Estes experimentos nos permitiram concluir que o meio DIFCO é menos favorável ao desenvolvimento do *A. terreus* e que a produção do terreinol deve estar associada a condições de maior estresse nutricional.

Dentre os quatro experimentos utilizando-se extrato de malte DIFCO, aquele correspondente à entrada 4 da Tabela 1.1 foi o que apresentou a maior proporção relativa do terreinol por cromatografia gasosa.

Uma vez estabelecidas as condições ótimas de produção do metabólito de interesse, realizamos testes no sentido de se determinar o momento de máxima concentração deste composto na cultura. Para tanto, frações de 1 mL de culturas conduzidas nas condições da entrada 4 foram extraídas e analisadas a intervalos de 24 h durante 20 dias. O terreinol somente foi detectado a partir do quarto dia de cultivo e, além disso, observamos um aumento na intensidade relativa do seu sinal no cromatograma até o décimo quinto dia. Desta forma estabelecemos o tempo ideal de cultivo do *A. terreus* entre 12 a 15 dias.

A partir da otimização de parâmetros (meio de cultura, tempo) foi possível obter 7 mg do composto em questão purificado a partir de 500 mL de cultura. Os dados de RMN de ^1H (Figura 1.9) se mostraram idênticos aos descritos no trabalho original de isolamento.

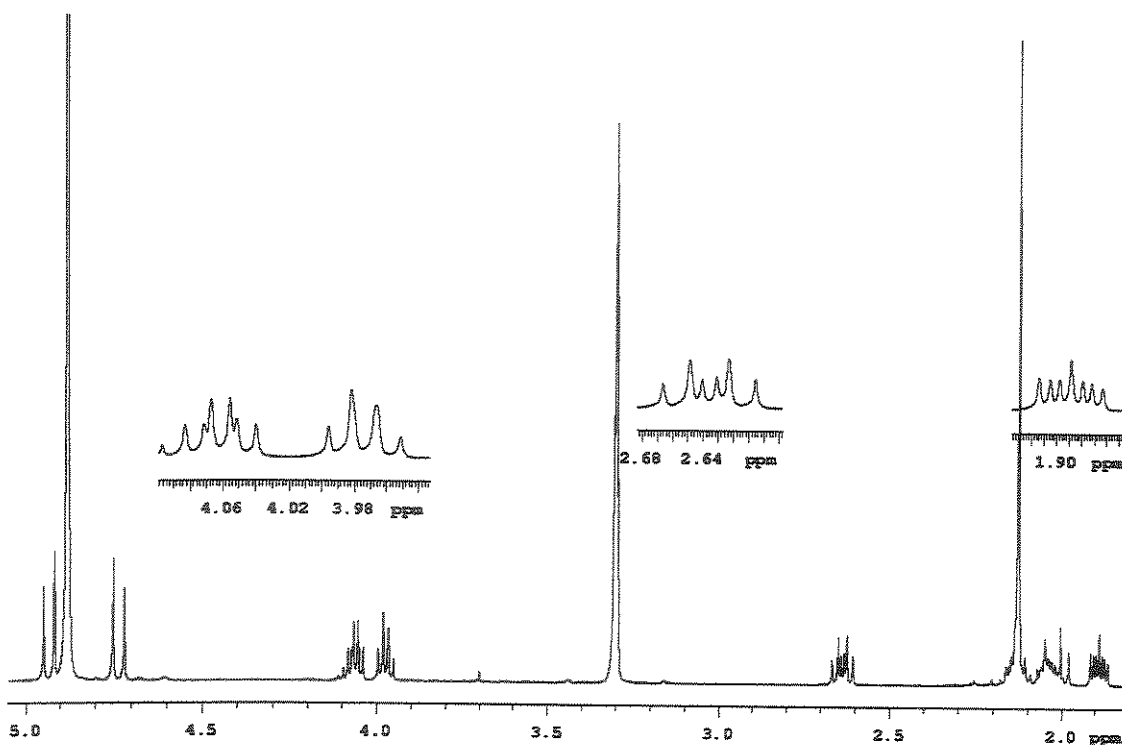


Figura 1.9 – Espectro de RMN de ^1H (300,07MHz; CD_3OD) do terreinol

Conforme pode ser observado, o espectro de RMN de ^1H do terreinol purificado apresentou um singlete em δ 6,96 atribuído ao hidrogênio do anel aromático pentassubstituído. Os sinais dos dois hidrogênios benzílicos diastereotópicos foram observados em δ 4,94 (d; $^2J=15,7$ Hz) e 4,73 (d; $^2J=15,7$ Hz). Já os sinais dos dois hidrogênios carbinólicos diastereotópicos do anel tetraidrofurano se apresentaram em δ 3,97 (dd; $J=14,6$ e $7,7\text{Hz}$) e 4,06(m). Em δ 2,64 observa-se um duplo tripleto atribuído a um dos hidrogênios do grupo metileno vizinho ao centro quaternário. O outro hidrogênio deste grupo, bem como os sinais dos hidrogênios metilênicos vizinhos e da metila aromática apresentaram-se sobrepostos em δ 2,13.

1.4.2 - Estudo da produção do terreinol na presença de acetato

Antes de submetermos o acetato de sódio [1,2-¹³C] às condições otimizadas no item 1.4.1 decidimos realizar experimentos envolvendo acetato de sódio não marcado com o objetivo de detectar possíveis alterações no metabolismo secundário do *A. terreus* na presença deste substrato. Assim, foram conduzidos experimentos nas condições da entrada 4 da Tabela 1.1 incluindo-se a adição de 20 mg de acetato de sódio em 100 mL de meio de cultura³². Em metade dos testes o reagente foi adicionado no momento da inoculação e na outra metade o mesmo foi adicionado ao final do quarto dia de cultivo. Estes testes foram acompanhados por um experimento controle sem adição de acetato mantendo-se inalteradas as demais condições.

Infelizmente, contrastando com o controle, os testes conduzidos na presença de acetato de sódio não apresentaram a produção do terreinol mesmo após 20 dias de cultivo.

Com base no desenvolvimento intenso das culturas de *A. terreus* em extrato de malte MERCK, decidimos realizar um experimento em que o cultivo foi promovido inicialmente neste meio (100 mL) e após 3 dias de crescimento nas condições estabelecidas anteriormente (Tabela 1.1, entrada 8), as células foram transferidas, sob condições estéreis, para 100 mL de extrato de malte DIFCO contendo 20 mg de acetato de sódio P.A. A nova cultura, assim preparada, foi mantida nas mesmas condições por vários dias ao longo dos quais a produção de metabólitos foi acompanhada por CG/EM e novamente não foi verificada a presença do terreinol.

Na expectativa de minimizar o efeito da presença do acetato de sódio sobre a produção do composto desejado, realizamos dois outros experimentos.

³² J. S. E. Holker, T. J. Simpson, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 1980, 1397.

O primeiro consistiu na correção do pH do meio de cultura após a adição do acetato de sódio. O meio de cultura (extrato de malte DIFCO 2%) preparado apresentou pH=6,33 e a adição do acetato (200 mg/L) elevou este valor para 6,65. Através da adição de aproximadamente 300 μ L de uma solução aquosa de HCl (2%) reajustamos o pH para 6,35. Em seguida, o meio de cultura foi esterilizado, inoculado com *A. terreus* e mantido nas condições experimentais descritas na entrada 4 da Tabela 1.1. No segundo experimento avaliamos uma concentração de acetato de sódio 2 vezes menor que o valor até então utilizado. Entretanto, o resultado em ambos os experimentos foi, como nos experimentos anteriores, a inibição da produção do terreinol.

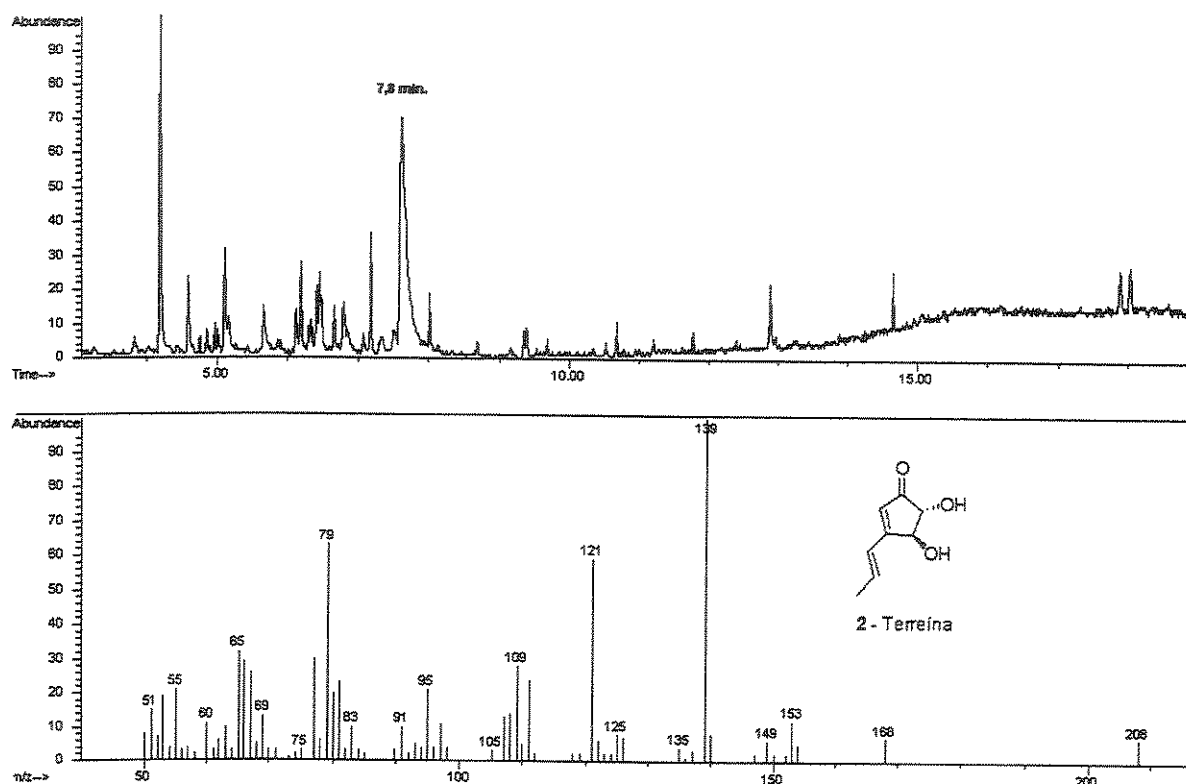


Figura 1.10 – Cromatograma de íons totais do extrato de *A. terreus* CCT 3320 cultivado na presença de acetato de sódio (acima) e espectro de massas da terreína (abaixo)

Embora, o cromatograma dos extratos brutos dos experimentos com acetato apresentem vários sinais, como pode ser observado na Figura 1.10, apenas a terreína foi isolada em quantidades apreciáveis por cromatografia em camada delgada preparativa.

1.4.3 - Estudo da incorporação de acetato [$1,2\text{-}^{13}\text{C}$] na terreína

Uma vez que o enriquecimento isotópico da terreína³³ encontra-se documentada na literatura, consideramos a reprodução destes resultados uma boa oportunidade para avaliar nossa metodologia de incorporação de substratos marcados. Estudos biossintéticos deste metabólito sugerem o envolvimento de uma etapa de contração de anel de um intermediário cíclico originado a partir de um pentacetídeo como pode ser observado na figura abaixo.

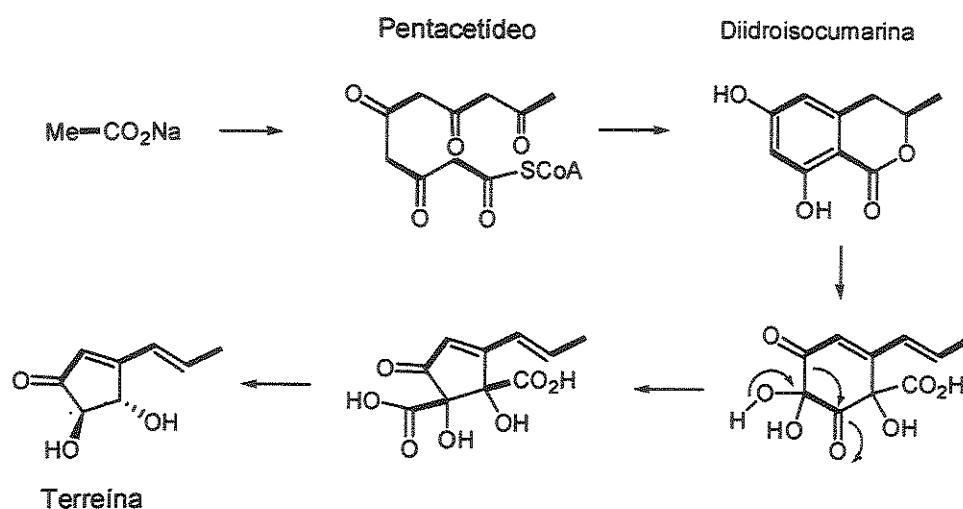


Figura 1.11 - Rota biossintética proposta da terreína

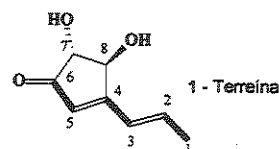
³³ J. Staunton, et. al.; *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, **1980**, 2570.

O experimento de incorporação de acetato duplamente marcado com ^{13}C na estrutura da terreína, consistiu na substituição do acetato de sódio P.A. utilizado nos testes de descritos no item 1.4.2 por acetato $[1,2-^{13}\text{C}]$. O reagente foi adicionado no momento da inoculação e a cultura foi mantida nas condições da entrada 4 da Tabela 1.1 (item 1.4.1).

Desta forma, obtivemos a terreína marcada com ^{13}C (enriquecimento > 2%; Tabela 1.2 e Figuras 1.12 a 1.14). As posições mostradas em **negrito** correspondem à incorporação de unidades de acetato marcado intactas observando-se, portanto um duplete para cada um dos carbonos de C1 a C6. As linhas simples para os carbonos 7 e 8, cujo enriquecimento é verificado pela intensificação destes sinais, evidenciam a incorporação de unidades de acetato que sofreram quebra da ligação C-C.

Tabela 1.2 – Dados de RMN de ^{13}C da terreína isotopicamente marcada

C (enriq.)	δ (mult.)	$^1J_{\text{CC}}$ (Hz)	C (enriq.)	δ (mult.)	$^1J_{\text{CC}}$ (Hz)
1 (2,6%)	19,5 (d)	42,1	5 (2,5%)	125,8 (d)	51,3
2 (2,5%)	141,7 (d)	42,1	6 (2,4%)	205,3 (d)	51,3
3 (2,6%)	126,3 (d)	56,2	7 (2,3%)	82,3 (s)	-
4 (2,3%)	170,6 (d)	56,2	8 (2,1%)	78,0 (s)	-



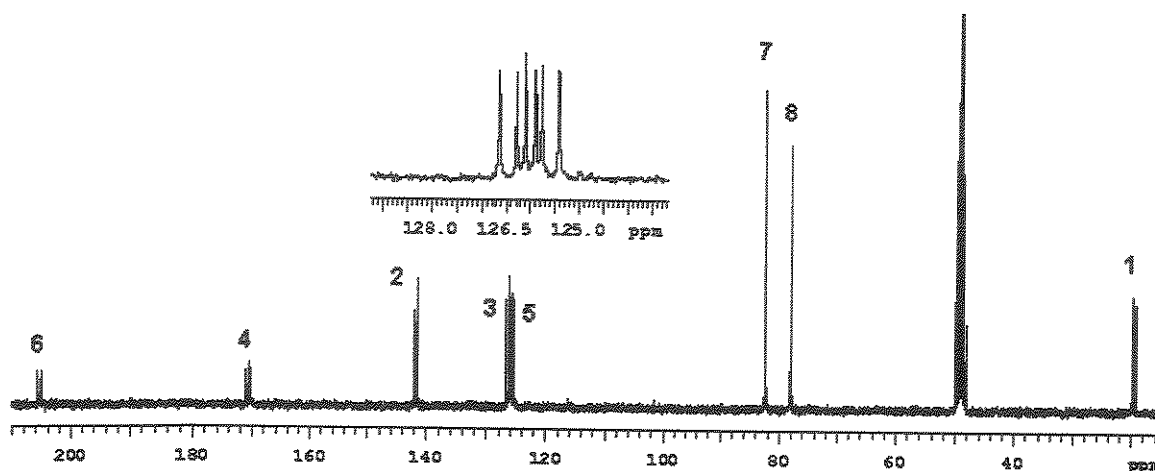


Figura 1.12 – Espectro de RMN de ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ da terreína isotopicamente marcada (75,45 MHz; CD_3OD)

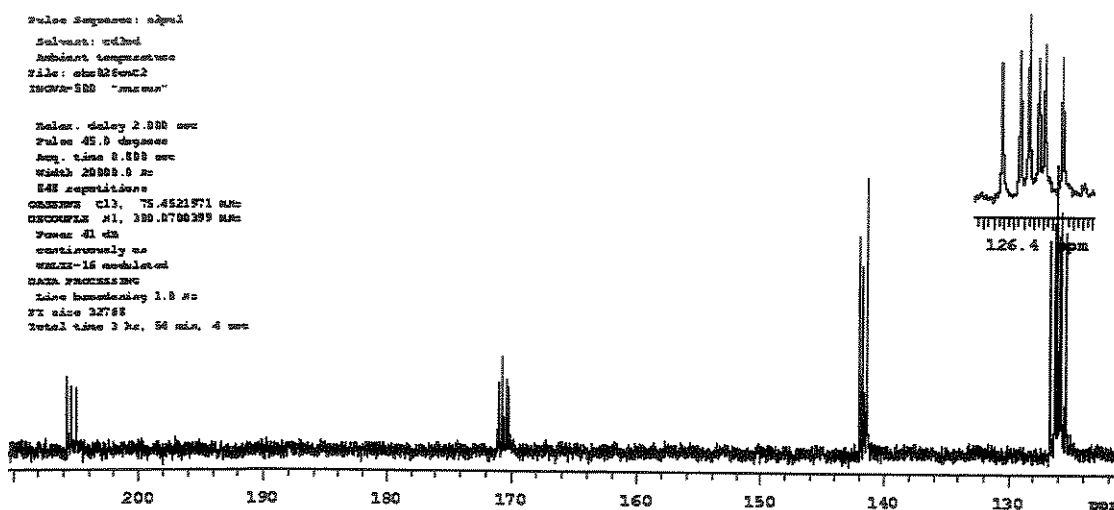


Figura 1.13 – Ampliação do espectro da Figura 1.12

Foi realizado um experimento de desacoplamento descontínuo inverso (Figura 1.14) com intervalo de tempo de $5 \cdot T_1$ entre a reciclagem de fase para remover as diferenças de relaxação principalmente para estimar com segurança os valores de incorporação nas posições 7 e 8 como pode ser observado a partir das intensidades e valores de integrais como pode ser observado no espectro abaixo.

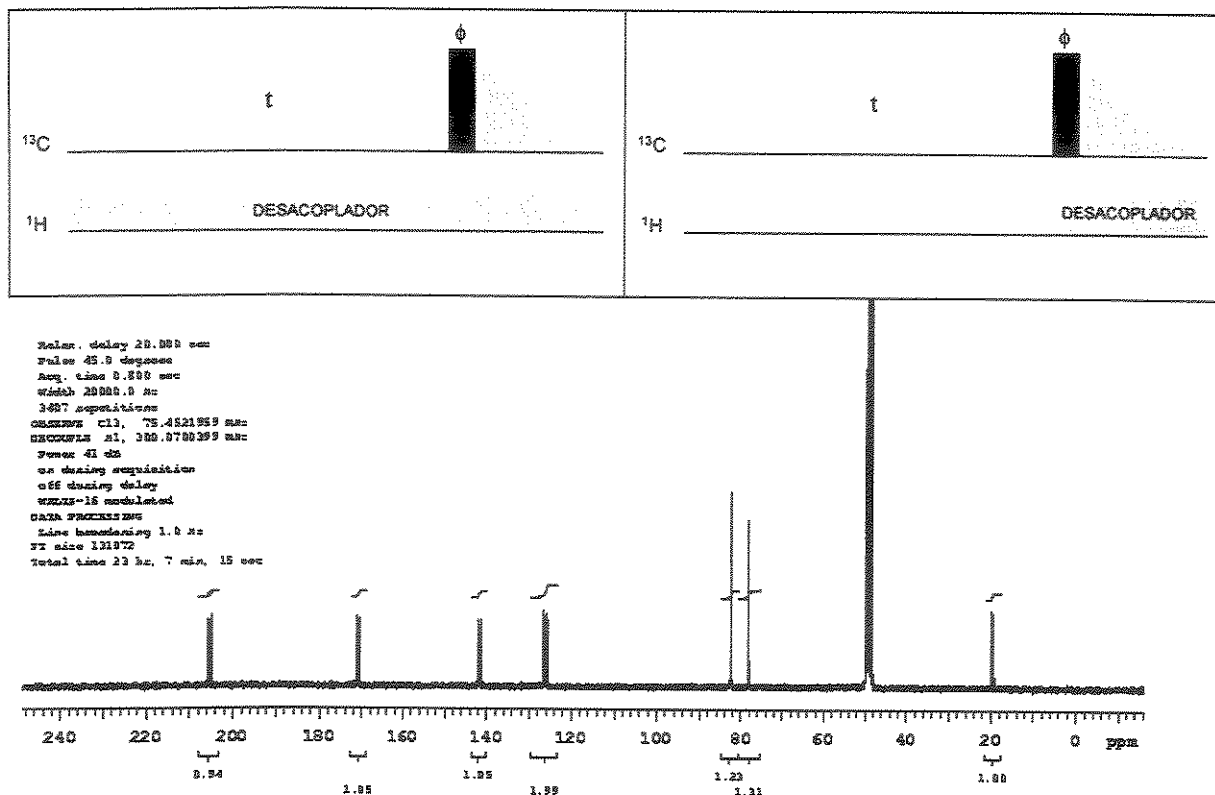


Figura 1.14 – Sequências de pulsos dos experimentos de RMN de ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ normal (esquerda) e com desacoplamento descontínuo inverso ("inverse gated decoupling"; direita). Espectro de RMN de ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ sem NOE da terreína marcada (75,45 MHz; CD_3OD)

1.4.4 - Estudo da incorporação de D-glicose [$1\text{-}^{13}\text{C}$] no terreinol

A partir de então, na tentativa de contornar as dificuldades na marcação do terreinol com ^{13}C avaliamos abordagens alternativas. Uma delas, como resultado de discussões valiosas com o Prof. Alberto Colnago (EMBRAPA – São Carlos), surgiu durante o IX Encontro da AUREMN e envolvia a utilização de D-glicose [$1\text{-}^{13}\text{C}$] como precursor.

Desta forma, realizamos alguns experimentos com D-glicose P.A. para avaliarmos a produção do metabólito de interesse por culturas de *Aspergillus terreus*. Para isto foram empregadas condições baseadas naquelas previamente

otimizadas, a saber: inoculação de *Aspergillus terreus* CCT 3320 em 100mL de extrato de malte Difco (2%) em erlenmeyers de 500 mL sob condições estéreis seguida de agitação mecânica da cultura durante dez dias.

Como pode ser observado nos cromatogramas abaixo, o terreinol foi produzido tanto nos testes em que a glicose foi adicionada no momento da inoculação como naqueles em que a mesma foi adicionada ao final do terceiro dia de cultivo. Portanto, contrariamente ao acetato de sódio, a utilização de glicose se mostrou compatível com a produção do metabólito de interesse viabilizando assim, os estudos de marcação isotópica.

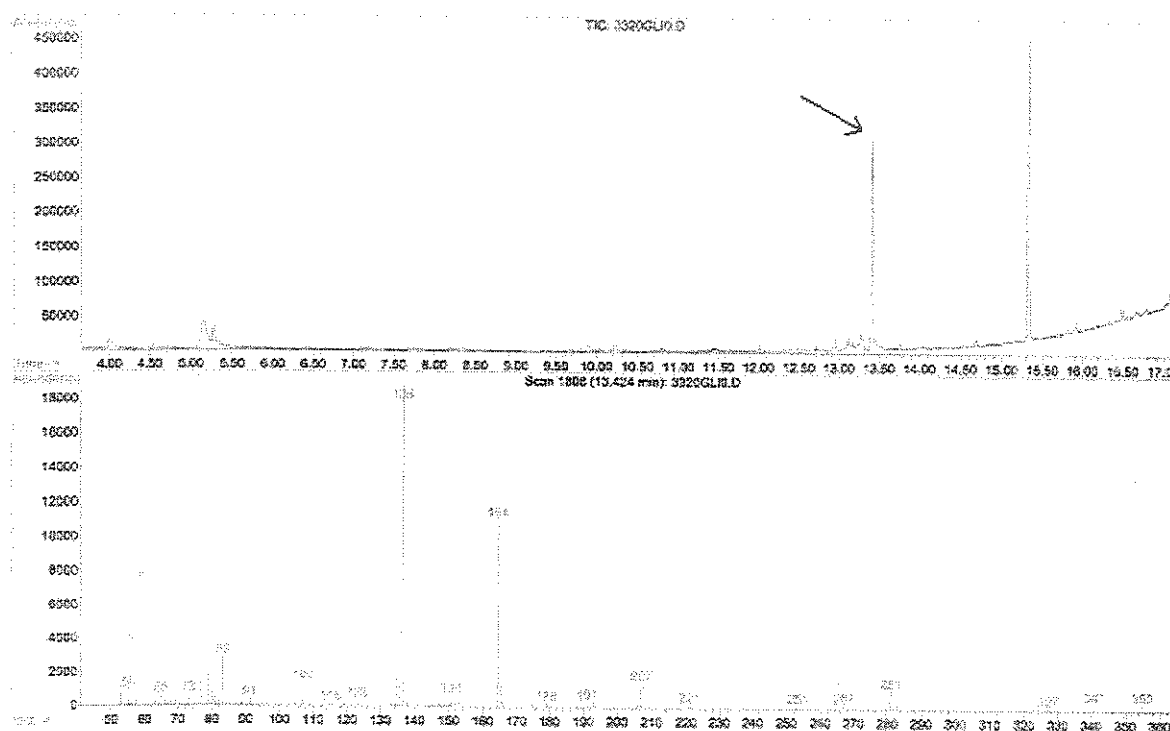


Figura 1.15 - Cromatograma de íons totais (acima) e espectro de massas (abaixo) do terreinol obtido na presença de glicose adicionada no momento da inoculação.

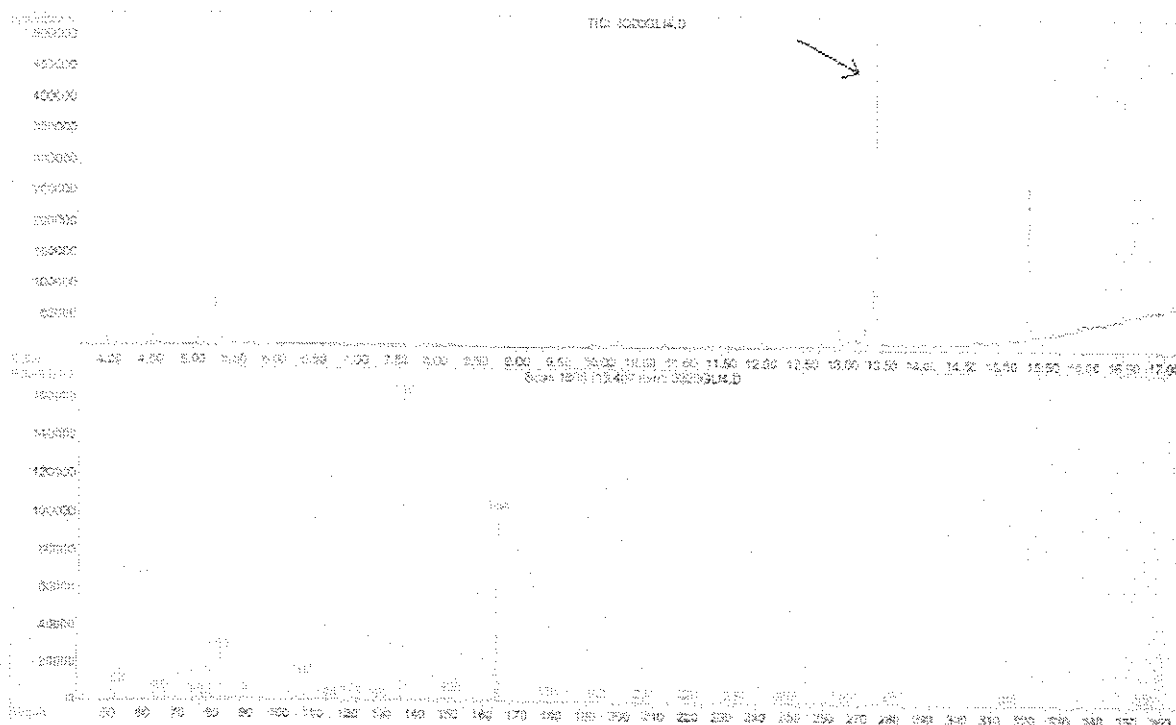


Figura 1.16 - Cromatograma de íons totais (acima) e espectro de massas (abaixo) do terreinol obtido na presença de glicose adicionada ao final do terceiro dia de cultivo.

Em seguida, foram conduzidas duas baterias de experimentos nos mesmos moldes dos testes preliminares descritos acima, porém, utilizando D-glicose [$1\text{-}^{13}\text{C}$] com 99% de pureza isotópica. Similarmente aos ensaios com glicose P.A., as culturas de *A. terreus* submetidas a estas condições também produziram o composto desejado em ambas as situações, ou seja, nos experimentos em que a adição do precursor foi efetuada no dia zero e naqueles em que o mesmo foi adicionado no terceiro dia. A tabela abaixo apresenta as massas dos extratos brutos de experimentos com glicose enriquecida.

Tabela 1.3 – Massa de extratos de culturas de *A. terreus* crescidas na presença de D-glicose [$1-^{13}\text{C}$]

Experimento	Fonte Glicose [$1-^{13}\text{C}$] 99%	Momento da adição	Massa bruta/ 100 mL	Massa terreinol puro
0	-	-	14 mg	nd
1	25 mg	Dia 0	13 mg	< 1 mg
2	25 mg	Dia 3	13 mg	< 1 mg

Esporos recém ativados de *Aspergillus terreus* CCT 3320 foram inoculados em 100 mL de extrato de malte Difco (2%) e 25 mg de D-glicose [$1-^{13}\text{C}$] (99% de pureza isotópica) em erlenmeyers de 500 mL seguida de agitação mecânica durante dez dias.

Após purificação cromatográfica dos extratos, o produto foi obtido em menos de 1 mg em cada caso. Em consequência das limitadas quantidades de D-glicose [$1-^{13}\text{C}$] disponível procuramos realizar esforços em promover os estudos de RMN de ^{13}C em escala semi-micro.

Não foram observadas variações nas intensidades dos sinais dos espectros de RMN de ^{13}C envolvendo desacoplamento descontínuo inverso³⁴ otimizado do produto obtido no experimento 2 e do produto isolado de culturas crescidas na ausência do precursor revelando, assim, a ausência de enriquecimento apreciável neste caso.

Já o metabólito **1** isolado do experimento em que a glicose foi adicionada no momento da inoculação do microorganismo (experimento 1, Tabela 1.3) apresentou claramente enriquecimentos em 7 dos 13 carbonos da molécula. O espectro de RMN de ^{13}C sem NOE do produto isolado a partir do experimento 1 apresentou sinais intensificados em relação ao espectro do metabólito com abundância natural em ^{13}C (Figura 1.17).

³⁴ Freeman, R., Hill, H. D. W., Kaptein, R. *J. Magn. Reson.* 1972, 7, 327.

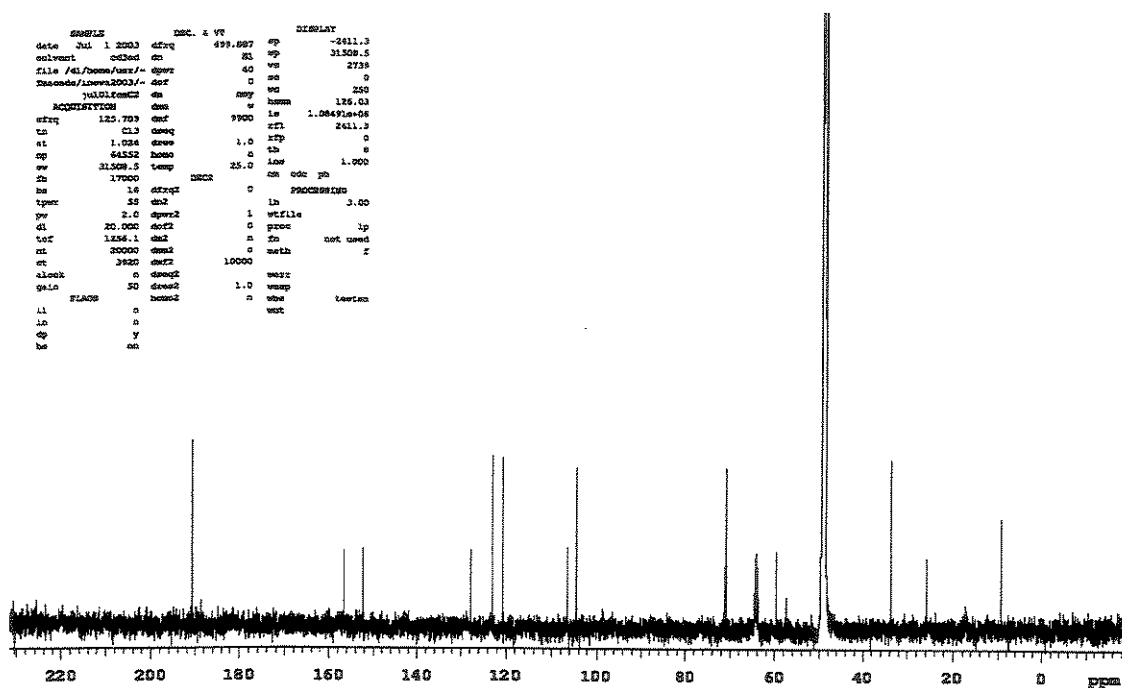
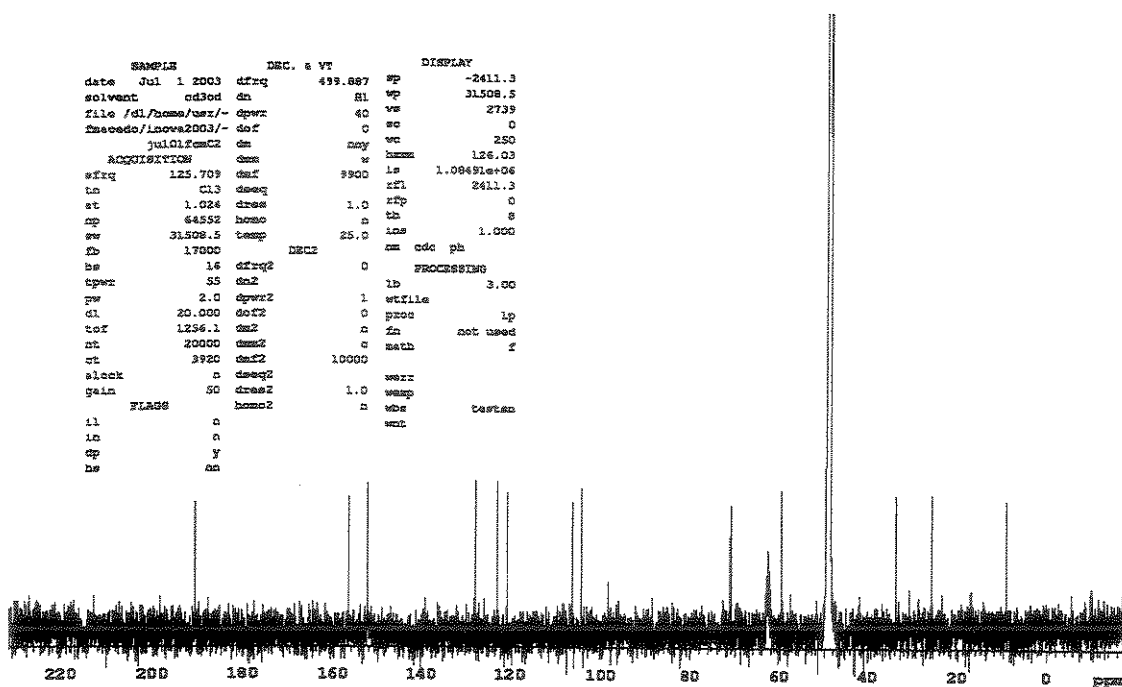


Figura 1.17 - Espectros de RMN de ^{13}C com desacoplamento descontínuo inverso do terreinol: com abundância natural (acima); e obtido no experimento 1 (abaixo) (125,69 MHz, <1mg em 50 μL de CD_3OD ; nano-sonda).

A otimização do intervalo de relaxação empregado no experimento de desacoplamento descontínuo inverso (20 s) se baseou nos valores de T_1 (Tabela 1.4) dos carbonos do terreinol obtidos através do experimento de inversão-recuperação (Figura 1.18). O maior valor de T_1 foi o da carbonila com aproximadamente 8 s. Portanto, foi utilizado um valor de cerca de $3 \times T_1$ max que se mostrou adequado conforme pode ser observado no espectro da Figura 1.18.

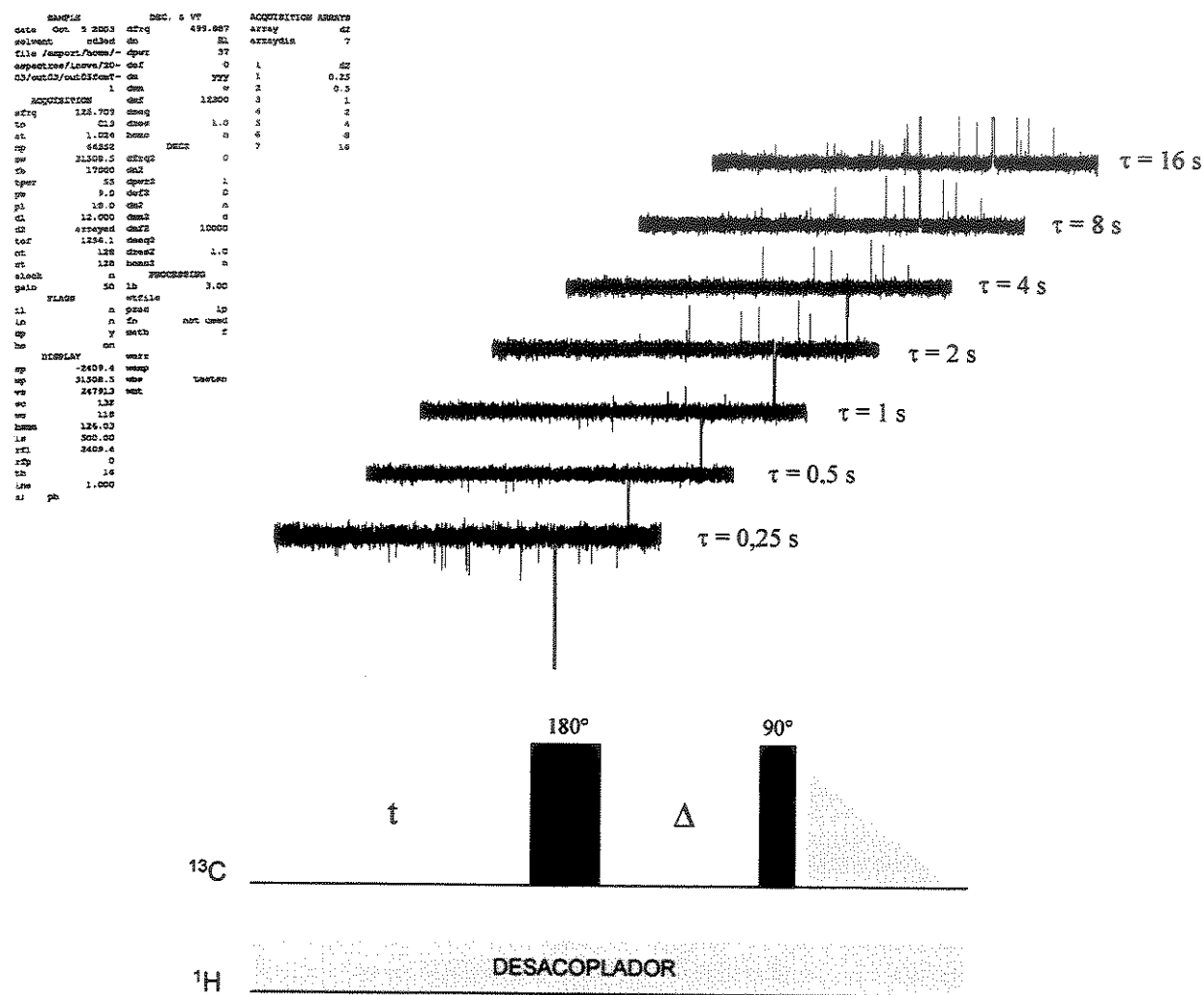


Figura 1.18 – Espectros de RMN de ^{13}C (125,71 MHz, CD_3OD) (acima) e sequência de pulsos do experimento de inversão-recuperação (abaixo)

A Figura 1.19 mostra o terreinol obtido na presença de glicose [$1-^{13}\text{C}$] e suas posições enriquecidas determinadas conforme discutido acima. O padrão de enriquecimento deve ser interpretado sob a luz dos mecanismos metabólicos e das teorias biogenéticas.

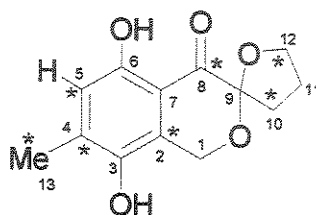


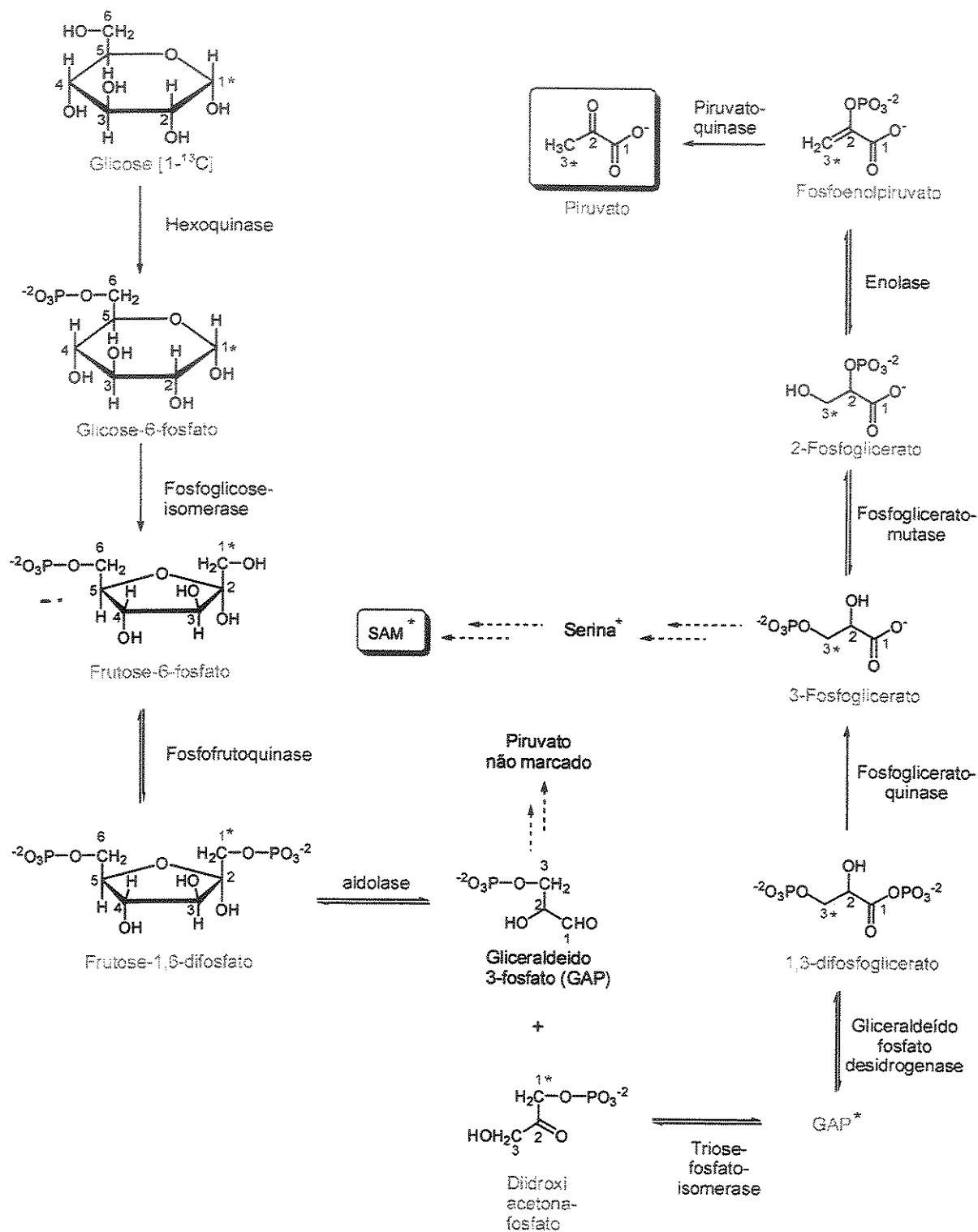
Figura 1.19 – Posições enriquecidas de 1 obtido em experimento com glicose [$1-^{13}\text{C}$]

Tabela 1.4 – Integração dos sinais de RMN de ^{13}C do terreinol obtido nos experimentos com D-glicose [$1-^{13}\text{C}$]

Carbono	δ_c	T1 (s)	Erro (%)	Integral Exp 1	Integral Exp 2
1	59.7	0,5	0,1	1,2	1,1
2	123.1	2,6	0,8	2,3	1,1
3	152.3	3,1	0,7	1,3	1,2
4	120.8	4,3	2,8	2,3	1,4
5	104.7	0,6	0,2	2,3	1,3
6	156.7	4,0	1,3	1,2	1,2
7	128.0	4,3	1,0	0,9	1,0
8	190.7	7,9	4,9	2,6	1,4
9	106.6	6,1	3,1	1,1	1,4
10	33.8	0,7	0,1	2,4	1,2
11	26.0	1,0	0,2	1,1	1,2
12	71.2	0,6	0,1	2,3	1,3
13	9.3	1,2	0,4	1,5	1,3

De acordo com a sequência de etapas da via glicolítica (Esquema 1.15) a clivagem oxidativa da glicose [$1-^{13}\text{C}$] resultará em duas moléculas de piruvato, sendo que apenas uma delas conserva uma posição enriquecida em ^{13}C . Posterior condensação descarboxilativa entre o piruvato e a HSCoA formará a acetil-SCoA em que a posição enriquecida está localizada no carbono 2 do grupo acetila, ou seja na metila. A partir de então, a acetil-SCoA pode ser transferida para a policetídio sintase por intermédio da acil-transferase. Além disso, outro caminho possível para a acetil-SCoA consiste

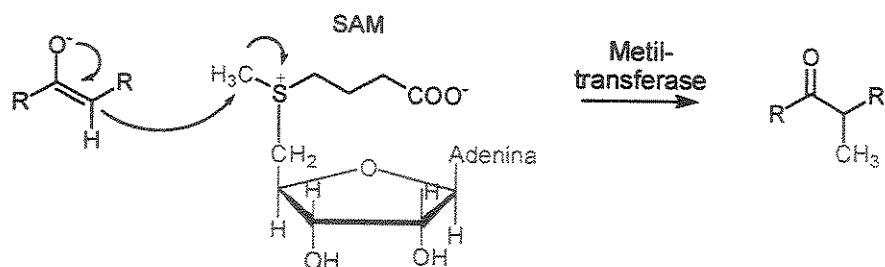
em uma homo-condensação descarboxilativa fornecendo a malonil-SCoA conforme discutido anteriormente.



Esquema 1.15 – Etapas da via glicolítica

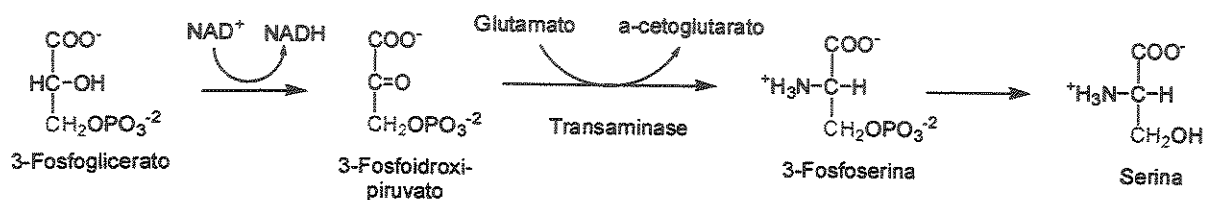
O Esquema 1.11 esquema mostra o envolvimento direto da acetil-/malonil-SCoA nas incorporações sucessivas de 2 unidades de carbono na construção das cadeias policetílicas. Sendo assim, com base neste mecanismo a incorporação de glicose [$1\text{-}^{13}\text{C}$] em um policetídio resultaria em um padrão apresentando posições marcadas e não marcadas alternadas. Além disso, espera-se que a maior parte dos carbonos oxigenados do policetídio correspondam às carbonila dos grupos acetil-/malonil-SCoA. Similarmente, espera-se que os metilenos do policetídio preferencialmente sejam originados a partir das metilas dos grupos acetil-/malonil-SCoA. Em ambos os casos, processos redutivos e oxidantes podem inverter estas previsões criando padrões de incorporação cujas interpretações são menos óbvias.

O padrão de posições enriquecidas em ^{13}C de **1** apresenta alguma correspondência com uma origem policetílica. Como pode ser observado existe uma clara predominância de alternância entre posições marcadas e não marcadas. No entanto, surpreendentemente os desvios com relação ao padrão esperado se concentraram sobre o anel aromático, grupo cuja formação a partir da ciclização de um intermediário policetílico encontra-se amplamente documentada na literatura. A marcação de posições contíguas 13 e 4 se ajusta facilmente a um modelo biossintético em que a metila aromática é inserida em uma cadeia policetílica via *S*-adenosilmetionina. A *C*-metilação via *S*-adenosilmetionina como grupo doador de metila é catalisada por uma trans-metilase específica. A reação sempre se processa via ataque eletrofílico a um metileno enolizável conforme esquematizado abaixo.



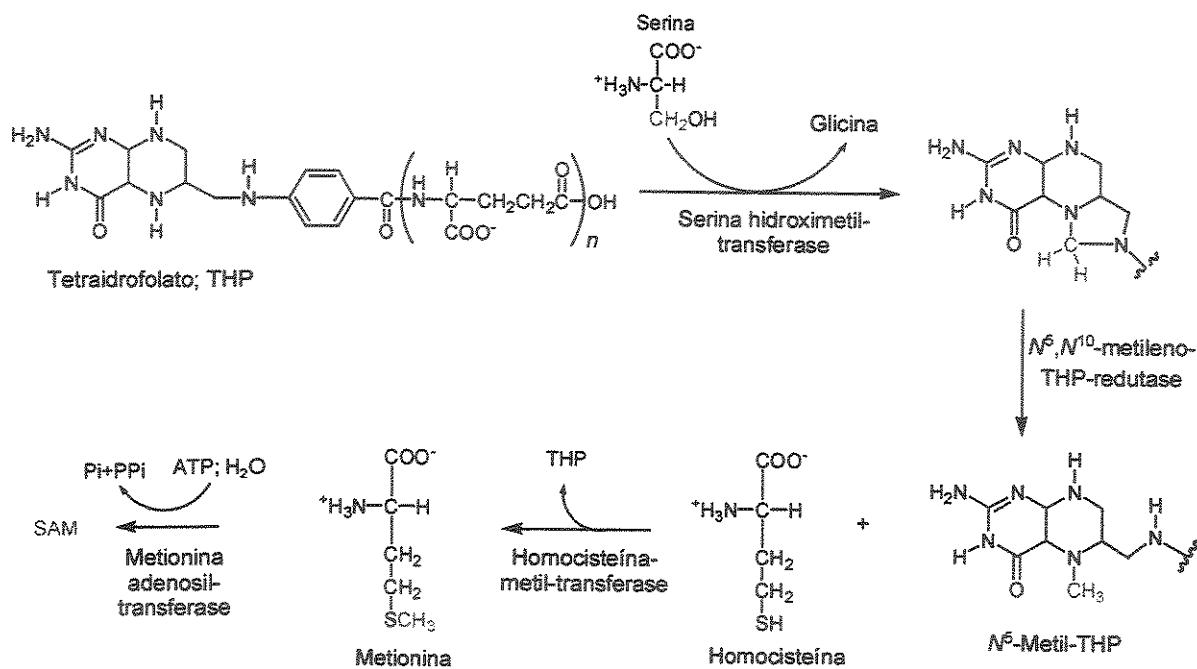
Esquema 1.16 – Metilação biológica de uma cadeia polietilídica

A rota do carbono 1 da glicose marcada até a metila da SAM inicia-se a partir do desvio de um dos intermediários da via glicolítica, o 3-fosfoglicerato, em direção à síntese da serina (Esquema 1.17).



Esquema 1.17 – Biossíntese da serina a partir do 3-fosfoglicerato

Em seguida a serina portadora do carbono marcado (vermelho) sofre a ação de uma hidroximetil-transferase sendo convertida em glicina (Esquema 1.18). O intermediário aceptor do grupo hidroximetil, após redução enzimática, é convertido na metila do N^5 -metil-tetraidrofolato. O N^5 -metil-THP, sob a ação da homocisteína metil-transferase promove a conversão da homocisteína em metionina. Finalmente esta última reage com ATP para formar a SAM já possuindo a metila enriquecida. Esta metila do íon sulfônio apresenta alta reatividade fazendo da SAM um importante agente metilante biológico.



Esquema 1.18 – Biossíntese da S-adenosilmetionina a partir da serina

O maior número de etapas (7) envolvidas na formação da SAM a partir do 3-fosfoglicerato em relação ao da rota deste último até acetil-SCoA (4 etapas) explica o valor mais baixo de enriquecimento da metila em relação à média das demais posições enriquecidas.

Já a questão da marcação contígua das posições 4 e 5, como pode ser verificado na Figura 1.19, consiste em uma grave violação do padrão alternado previsto para uma origem policetílica. Esta violação nos levou inevitavelmente a uma reconsideração da estrutura proposta no que concerne às posições dos grupos do anel aromático.

Considerações biogenéticas têm constantemente levado os químicos a revisões estruturais, abordagem que tem sido particularmente útil em estudos de poliisoprenóides e policetídeos³⁵. O sucesso da utilização de critérios biossintéticos na determinação estrutural elevou os experimentos de

³⁵ a) *Comprehensive Organic Chemistry*, Vol. 5 (Eds. D H R Barton, W D Willis, U E Haslam), Pergamon, Oxford, 1979, p. 869 b) *Ibid* p. 927

incorporação de precursores marcados na determinação estrutural ao status de extensão legítima e significativa da química orgânica experimental³⁶.

Em nosso caso, a simples inversão das funcionalidades sobre as posições 5 e 6 fornecendo a estrutura 2 mostrada anteriormente (Figura 1.3). Esta estrutura obedece impecavelmente a hipótese do acetato e uma cadeia policetídica contínua (de C1 a C12) pode ser facilmente concebida. Além disso, a única inversão do padrão de oxigenação esperado consiste no enriquecimento da carbonila (C8) que é perfeitamente possível mediante a atuação de mecanismos oxidativos subsequentes à formação da cadeia policetídica.

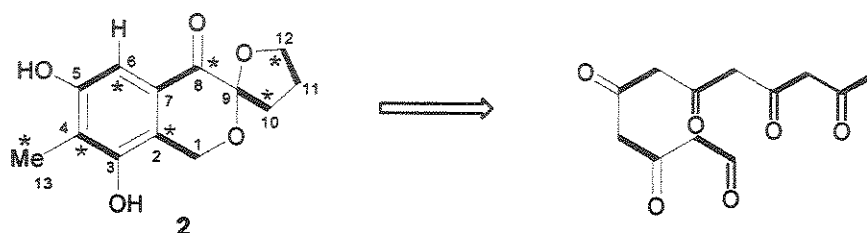


Figura 1.20 – Padrão de incorporação de unidades C₂ intactas considerando a estrutura 2

Outra evidência em favor de 2 consiste em sua concordância com a regra recentemente proposta por Thomas³⁷, que distingue os padrões de ciclização de metabólitos de Fungos (modo *F*) e de Streptomycetos (modo *S*;). Esta regra sugerida para classificação de anéis aromáticos fundidos policetídicos de fungos e bactérias filamentosas se baseia na regioespecificidade da aldol cruzada levando ao anel carbocíclico inicial. Os esqueletos carbônicos arquétipos derivados dos modos de ciclização *F* e *S* mostrados na Figura 1.21 ilustram os padrões de incorporação de unidades derivadas do malonato nos anéis iniciais nas suas duas cadeias carbônicas laterais *orto*-substituintes.

³⁶ *Ibid* p. 927

³⁷ R. Thomas, *ChemBiochem* 2001, 2, 612.



Figura 1.21 - Esqueletos carbônicos arquétipos de precursores policetídios aromáticos de anel fundido com modos de ciclização F e S e seus padrões de incorporação de acetato correspondentes. [a] C_p =primeira unidade da cadeia lateral, C_t =carboxila terminal da cadeia lateral, p =átomos de carbono da primeira unidade, n_p e n_t = números de unidades C_2 extensoras intactas nas cadeias laterais C_p e C_t respectivamente.

Assim, em metabólitos de fungos, o modo *F* de ciclização de uma cadeia policetídica linear fornece um anel cicloexânico contendo duas unidades C_2 intactas com duas cadeias laterais adjacentes, ambas apresentando um número ímpar de átomos de carbono. Os policetídios de streptomyces seguem o modo de ciclização *S* conduzindo a um anel inicial derivado a partir de três unidades C_2 íntegras, também apresentando duas cadeias laterais, mas neste caso, com um número par de átomos de carbono em cada uma.

Como será visto no item seguinte, a aquisição de novos experimentos de RMN culminou na confirmação definitiva da estrutura **2** (6',8'-diidroxí-7'-metil-4,5-diidro-3*H*-spiro[furan-2,3'-isocromen]-4'(1'*H*)-ona).

1.4.5 - Determinação da estrutura plana do terreinol

Conforme mencionado anteriormente, as estruturas propostas para o terreinol se basearam se dados espectroscópicos (IV, RMN: H,H -COSY; H,C -HSQC; H,C -gHMBC e NOESY 1D).

O padrão de substituição do anel aromático foi investigado através de experimentos de NOESY 1D do produto natural e do seu derivado dimetilado

1a (Figura 10). O hidrogênio aromático do terreinol apresentou acoplamentos dipolares apenas com a metila. A excitação seletiva da metoxila ligada a C5 de **1a** (δ_H 3,87) revelou sua proximidade aos grupos CH e CH₃ enquanto que a outra metoxila em δ_H 3,72 apresentou acoplamento dipolar com os hidrogênios benzílicos e metílicos.

A diferença dos valores de incrementos entre a 4-CH₃/6-OCH₃ (0,1%) e 4-CH₃/3-OCH₃ (0,3%) parece indicar uma maior distância entre a metila aromática e as duas metoxilas como pode ser observado na estrutura **1a** (Figura 1.22).

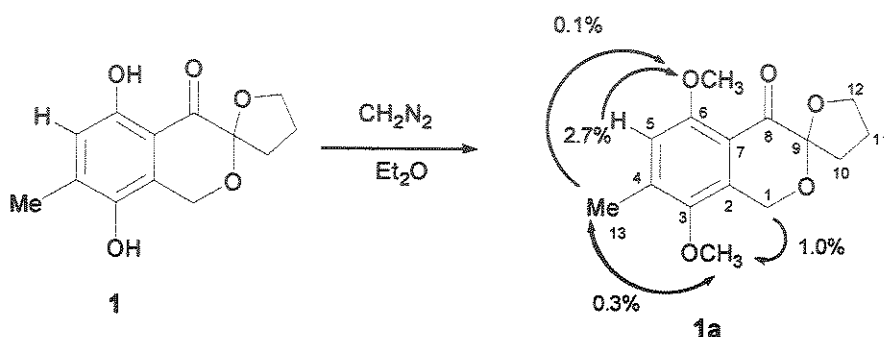


Figura 1.22– Resultados de experimentos de NOESY 1D considerando a estrutura **1**

Alternativamente, podemos explicar estes dados considerando a estrutura **2a** (Figura 1.23). Assim, esta diferença de valores de incrementos de NOE pode ser explicada invocando-se fatores conformacionais. Como pode ser observado, a metoxila 3-OCH₃ se encontra flanqueada pela metila C13 e pelo metileno benzílico C1. Interações repulsivas de Van der Waals entre 3-OCH₃ e estes dois grupos podem induzir uma conformação em que esta esteja posicionada perpendicularmente ao plano dos anéis. Já a metoxila 5-OCH₃ localizada entre a metila 13 e o hidrogênio aromático H6 e, portanto estaria voltada para este último para fugir de interações desfavoráveis com a metila 13.

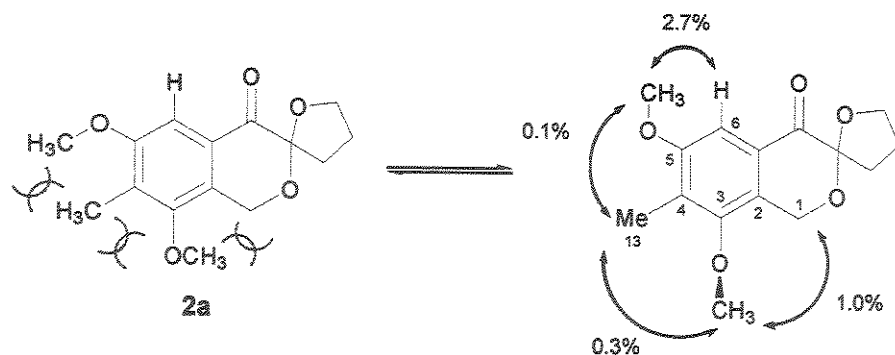


Figura 1.23 - Resultados de experimentos de NOESY 1D considerando a estrutura 2

Outra evidência em favor da estrutura 2 consiste na verificação dos valores de deslocamentos químicos de RMN de ^1H das hidroxilas fenólicas. Inicialmente, nos experimentos de RMN em CD_3OD , a presença de dois grupos fenólicos foi sugerida através dos carbonos aromáticos desblindados em δ_{C} 156,7 e δ_{C} 152,3, aliada a análise de espectroscopia no IV; e EMAR. Por conta da necessidade de atribuição precisa do padrão de substituição do anel aromático, decidimos realizar um experimento de RMN de ^1H usando CDCl_3 , onde o composto é apenas parcialmente solúvel, para avaliar a quelação entre o hidrogênio de HO-6 e o oxigênio da carbonila C8. A presença das hidroxilas não queladas à carbonila da cetona foi então indicada pela verificação dos sinais de ambas hidroxilas em δ 4,85 e 5,30³⁸.

1.4.6 - Confirmação da atribuição de ^{13}C : INADEQUATE 2D

Embora seja a abordagem mais direta e inequívoca para determinação da conectividade de carbonos em um composto orgânico por RMN, o experimento de INADEQUATE (Incredible Natural Abundance Double Quantum Transfer Experiment) sofre de uma falta de sensibilidade intrínseca

³⁸ Valores de deslocamentos químicos típicos para grupos HO-Ar quelados a carbonilas de cetonas: $\sim \delta$ 12. Ver: Pavia, D. L.; Lampman, G. M.; Kriz, G. S.; *Introduction to Spectroscopy*, 2nd, Saunders College Publishing, 1996, pag. 467.

para amostras com abundância natural em ^{13}C . Para minimizar este problema, têm sido propostas várias técnicas explorando transferência de polarização³⁹ e a adição de agentes paramagnéticos de relaxação. No entanto estes esquemas titubeiam ou mesmo falham completamente quando carbonos quaternários estão envolvidos e pequenas quantidades de amostra estão disponíveis.

A sequência de pulso do experimento de INADEQUATE foi introduzida por Bax e colaboradores⁴⁰ baseada na RMN múltiplo-quântica desenvolvida por Ernst e colab. A versão mais simples desta sequência consiste em um ciclo de dois passos cuja fase do último pulso de 90° varia entre uma etapa e outra.

A primeira parte da sequência de pulsos do INADEQUATE ($90^\circ_x - \tau - 180^\circ_y - \tau$) é idêntica ao experimento de spin eco homonuclear. Com $\tau = 1/(4J_{cc})$ uma magnetização transversal dos spins isolados (M_1) é produzida na direção $-y$ e uma magnetização dos spins acoplados (m_1 e m_2) AX na direção $(+/-) x$ (Figura 1.24b). O pulso subsequente de 90° desloca a magnetização dos spins isolados para a direção $-z$, enquanto que as magnetizações anti-fase do sistema AX é transferida para a coerência duplo quântica, alinhadas ao eixo $-y$ do sistema de coordenadas girantes duplo quântico (Figura 1.24c). O comportamento de m_1 e m_2 nesta etapa não pode ser interpretada a partir do

³⁹ a) O. W. Sorensen, R. Freeman, T. A. Frenkiel, T. H. Mareci, R. Schuck, *J. Magn. Reson.* **1982**, *46*, 180; b) P. Keller K. Voegelé, *J. Magn. Reson.* **1986**, *68*, 389; c) Y. Q. Gosser, K. P. Howard, J. H. Prestegard, *J. Magn. Reson. B*, **1993**, *101*, 126; d) J. Chung, J. R. Tolman, K. P. Howard, J. H. Prestegard, *J. Magn. Reson. B* **1993**, *102*, 137; e) J. Weigelt, G. Otting, *J. Magn. Reson. A* **1995**, *113*, 128, f) S. W. Sparks, P. D. Ellis, *J. Magn. Reson.* **1985**, *62*, 1; g) B. Reif, M. Kock, R. Kerssebaum, H. Kang, W. Fenical, C. Griesinger, *J. Magn. Reson. A* **1996**, *118*, 282.

⁴⁰ a) Bax A, Freeman R, Kempell SP. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**; **102**: 4849 b) Bax A, Freeman R, Frenkiel TA. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**; **103**: 2102; Para revisões ver: c) Buddrus J, Bauer H. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1987**; **26**: 625; d) Li D, Owen NL. *Adv. Mol. Struct. Res.* **1996**; **2**: 101; e) Buddrus J, Lambert J. *Magn. Reson. Chem.* **2002**; **40**: 3.

formalismo vetorial semi-clássico e a abordagem baseada em matriz de densidade ou operadores de spin está além do objetivo desta discussão⁴¹.

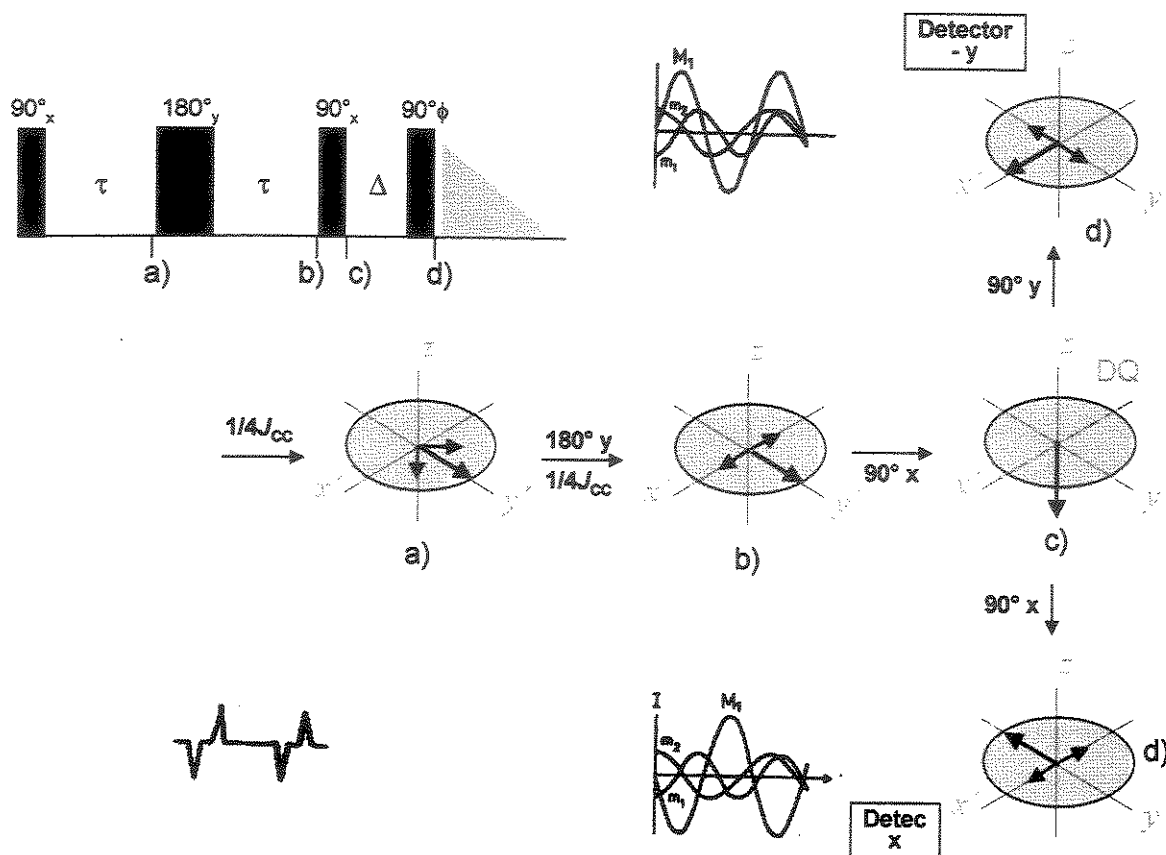


Figura 1.24 – Sequência de pulsos e padrões de FIDs do experimento de INADEQUATE 2D

A coerência duplo quântica, como qualquer outra coerência, apresenta uma frequência ν_{DQ} e uma fase. Entretanto, esta coerência não representa uma magnetização observável. O último pulso de 90° (pulso de leitura) nas direções x (primeiro passo) e y (segundo passo) desloca as magnetizações dos spins isolados para as direções $-y'$ e x' respectivamente, enquanto a coerência duplo quântica dos spins acoplados é convertida em coerência simples

⁴¹ Para uma descrição matemática mais detalhada ver Ref. 43c.

quântica alinhada sobre os eixos (+/-) x' ou (+/-) y' respectivamente (Figura 1.24d).

A fase do detector é alternada de forma a seguir apenas as magnetizações do sistema AX. A adição dos dois FIDs resulta na adição da magnetização dos spins AX (m_1 e m_2) e eliminação da intensa magnetização dos spins isolados (M_1). Finalmente a transformação de Fourier fornece o espectro de frequência contendo apenas os dois dupletos do sistema AX (cada um com seus componentes anti-fase). Portanto, teoricamente apenas duas etapas são necessárias para eliminar os sinais indesejados. Na prática, devido a condições não ideais do espectrômetro, o ciclo de duas etapas conduz a uma supressão incompleta dos sinais de ^{13}C desacoplados. Porém, os sinais residuais podem ser ainda mais reduzidos pelo uso de ciclos de fase mais extensos (16 a 256 etapas).

A sequência de pulso para o experimento de INADEQUATE 2D é a mesma da sua versão unidimensional com a exceção de que o curto intervalo Δ é incrementado passo a passo. Durante este intervalo, a coerência duplo quântica precessa no plano x,y do sistema de coordenadas girantes duplo quântico com uma frequência ν_{DQ} .

A conversão para coerência simples quântica pelo pulso de 90° final seguida da transformação de Fourier fornece os sinais satélites cujas intensidades são agora moduladas por $\cos\omega_{\text{DQ}}t_1$. Uma segunda transformação de Fourier, neste caso aplicada sobre a variação da intensidade dos sinais satélites, fornece os sinais com frequências duplo quânticas $+\omega_{\text{DQ}}$ e $-\omega_{\text{DQ}}$ (eco e anti-eco) do sistema AX. Uma vez que esta frequência é a mesma para todos os quatro sinais do sistema de spins AX, os sinais satélites aparecem na

mesma linha (f_1 =constante) do espectro bi-dimensional, embora com fases diferentes.

Apesar dos estudos de otimização descritos no item 1.4.1 terem resultado em melhores rendimentos e reprodutibilidade na obtenção do terreinol, as quantidades obtidas permaneceram muito abaixo daquelas convencionalmente requeridas para experimentos de INADEQUATE 2D. Além disso, o insucesso na incorporação de acetato $[1,2-^{13}\text{C}]$ e os altos custos da D-glicose duplamente marcada inibiram a aquisição deste experimento. No entanto, sucessivas fermentações nas condições padrão com abundância natural de ^{13}C permitiram o acúmulo de 10 mg do terreinol isolado que nos encorajaram a investir no experimento de INADEQUATE 2D em nano-sonda/Varian. O sucesso obtido nesta abordagem possibilitou a confirmação definitiva para o padrão de substituição do anel aromático pentassubstituído, como será visto em seguida.

Tabela 1.5 - Valores de T_1 na presença de $\text{Cr}(\text{acac})_3$

Carbono	δ_c	T_1 inicial (s)	Erro	T_1 (s) c/ $\text{Cr}(\text{acac})_3$
1	59.7	0,5	0,1	0,3
2	123.1	2,6	0,8	0,4
3	152.3	3,1	0,7	0,3
4	120.8	4,3	2,8	0,4
5	156.7	4,0	1,3	0,4
6	104.7	0,6	0,2	0,3
7	128.0	4,3	1,0	0,4
8	190.7	7,9	4,9	0,6
9	106.6	6,1	3,1	0,5
10	33.8	0,7	0,1	0,2
11	26.0	1,0	0,2	0,4
12	71.2	0,6	0,1	0,2
13	9.3	1,2	0,4	0,3

A adição do reagente de relaxação paramagnético acetil-acetonato de cromo reduziu os tempos de relaxação dos carbonos do terreinol em cerca de 10 vezes permitindo a utilização de um intervalo de relaxação de 1s entre as acumulações (Tabela 1.5).

Mesmo assim, não foi possível distinguir todas as correlações esperadas do ruído diretamente do espectro (Figura 1.25).

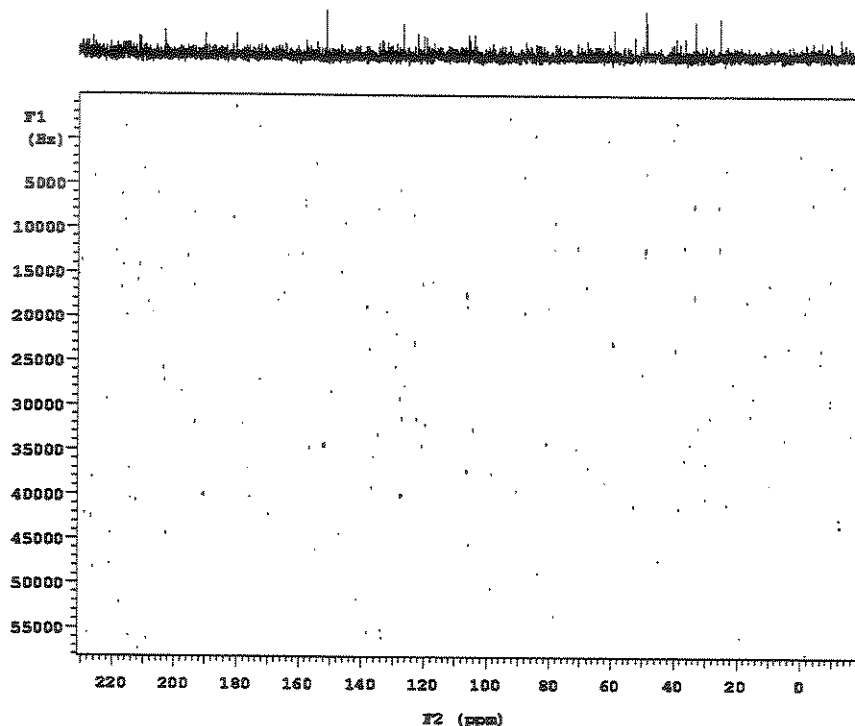


Figura 1.25 – Espectro de INADEQUATE 2D do terreinol realizado a 25.0 °C em nano-sonda/Varian com detecção direta usando 10 mg de 2 e 1 mg de Cr(acac)₃ em 50 µL de CD₃OD. 64 incrementos foram adquiridos com 1600 acumulações cada (125,69 MHz; 8K pontos em F₂ = 31508,5 Hz e 2K pontos em F₁ = 63016,9 Hz; pulso de excitação de 90° de 4 µs; $\tau=1/4J_{CC}=5,5$ ms, tempo de aquisição de 13 ms e intervalo de relaxação de 1 s).

Entretanto, as mesmas foram localizadas através da análise computacional dos experimentos de ¹³C 1D e 2D com o programa da Varian

*FRED*⁴². Este programa procura os pares de dupletos satélites antifase (levando em consideração a correspondência entre as suas constantes de acoplamento) em uma pequena área do espectro 2D em torno das ressonâncias identificadas no espectro 1D. A sensibilidade desta análise pode ser ajustada às custas de probabilidade de acerto. Em nosso caso, foi possível usar um valor suficientemente baixo de sensibilidade resultando em uma probabilidade maior que 99% nas determinações das correlações que se mostraram inteiramente consistentes com a estrutura 2 e a atribuição dos carbonos do terreinol. Adicionalmente, este experimento permitiu a obtenção dos valores das constantes de acoplamentos escalares $^1J_{CC}$.

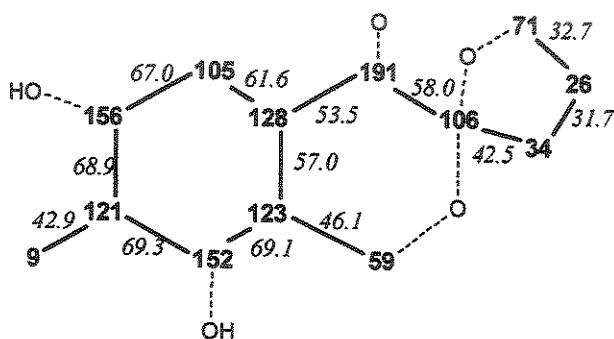


Figura 1.26 - Correlações C-C e valores de acoplamentos escalares $^1J_{CC}$ do terreinol obtidos a partir do INADEQUATE 2D

1.4.7 – Determinação da Configuração Absoluta do terreinol

O interesse na determinação da estereoquímica absoluta de compostos orgânicos quirais se origina do fato amplamente reconhecido de que a estereoquímica freqüentemente determina suas propriedades químicas, biológicas e farmacêuticas.

⁴² *Full Reduction of Entire DatasetsTM em: NMRanalystTM Automated Analysis of Multidimensional NMR Spectra (Varian)*

Existem vários métodos instrumentais para a determinação da configuração absoluta sendo a cristalografia de raios X o mais conhecido, seguido por métodos ópticos tais como dicroísmo circular, dispersão óptica rotatória e rotação óptica específica. No entanto, em nosso caso a aplicação da dispersão anômala de raios X (método de Bijvoet) foi impedida devido a inviabilidade de obtenção de amostra cristalina.

Já a utilização de efeitos Cotton foi dificultada pelo padrão complexo da curva de CD obtida para o terreinol (Figura 1.27). Várias regras de octantes tem sido propostas para correlacionar o comportamento quirótico de cetonas α,β -insaturadas à suas estereoquímicas levando em consideração a helicidade do cromóforo enônico e as contribuições das perturbações extracromofóricas. A medida em que a enona assume planaridade, as contribuições dos perturbadores extracromofóricos deveriam predominar. Snatzke e Gawronski¹³ propuseram as regras de setor mais amplamente empregadas para enonas planares, baseadas nas transições $n \rightarrow \pi^*$ (em torno de 320-350 nm) e $n \rightarrow \sigma^*$ (em torno de 195 nm) respectivamente. A curva de CD do terreinol mostrou pelo menos quatro bandas distintas. Esta complexidade pode estar associada à contribuição de alguma helicidade devido a pequenos desvios da planaridade esperada entre o anel aromático e a ligação C=O. Uma vez que estas duas contribuições atuam sobre os efeitos Cotton, não foi possível ponderar a contribuição dominante.

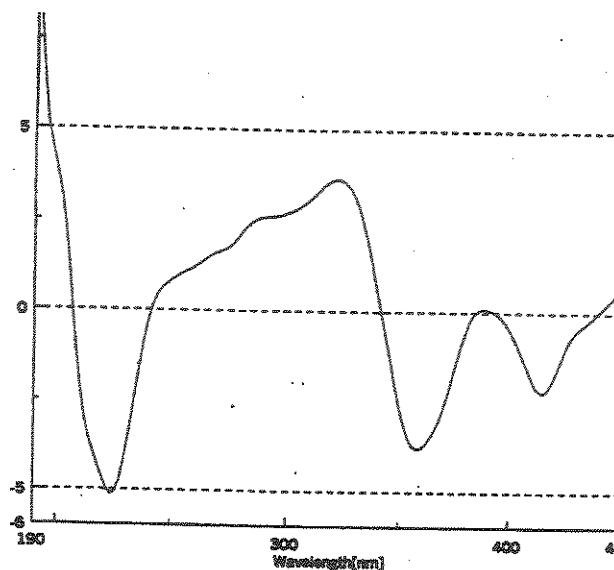


Figura 1.27 - Curva de dicroísmo circular do terreinol em metanol

Além disso, A introdução de um oxigênio endocíclico em cicloexanonas saturadas tem levado a resultados conflitantes. Assim, a ausência de um modelo na literatura para cetonas α , β -insaturadas heterocíclicas nos desencorajaram a fazer previsões confiáveis.

Recentemente, têm surgido diferentes abordagens para o problema da determinação da configuração absoluta baseadas em RMN. A possibilidade de estudos tanto de amostras em solução como sólidas é uma das principais vantagens destas técnicas.

Todos os métodos para determinação de configuração absoluta, baseados em RMN, requerem a transformação do substrato quiral em duas espécies (diastereoisoméricas ou confômeros) distintas. Uma das abordagens consiste no acoplamento do substrato quiral com cada um dos enantiômeros de um agente derivatizante quiral, seguida da comparação dos espectros de RMN de ^1H das espécies diastereoisoméricas para correlacionar a estereoquímica absoluta do centro estereogênico conhecido do auxiliar àquela do substrato.

Neste método é importante que ambos diastereoisômeros apresentem uma certa preferência por uma conformação particular, independente do substrato, para que o agente derivatizante quiral projete sua anisotropia magnética de uma maneira seletiva, ou seja, sobre L_1 em um dos derivados e sobre L_2 no outro (Figura 1.28). Assim, durante a análise consideram-se as alterações dos deslocamentos químicos dos substituintes do centro estereogênico do substrato (L_1 e L_2) nos dois derivados.

Desde que Mosher relatou pioneiramente sua utilização, o ácido α -metoxi- α -trifluorometil- α -fenil-acético (MTPA) tem sido o agente derivatizante quiral mais comumente usado para determinação da configuração absoluta de álcoois secundários por RMN. O procedimento de Mosher inicia com a esterificação do álcool com os dois enantiômeros do MTPA. Em seguida, os dois ésteres diastereoisoméricos são analisados por RMN e seus espectros (de ^{19}F , ^1H ou ^{13}C) comparados.

O uso de RMN de ^1H é sem dúvida o caminho mais comum para atribuição da configuração absoluta de álcoois secundários. Esta abordagem se baseia no efeito anisotrópico da fenila do auxiliar quiral sobre os substituintes (L_1/L_2) do álcool. Nos ésteres do MTPA é considerado como predominante o conformero em que o grupo trifluorometil, a carbonila e o hidrogênio carbinólico estão no mesmo plano (Figura 1.28).

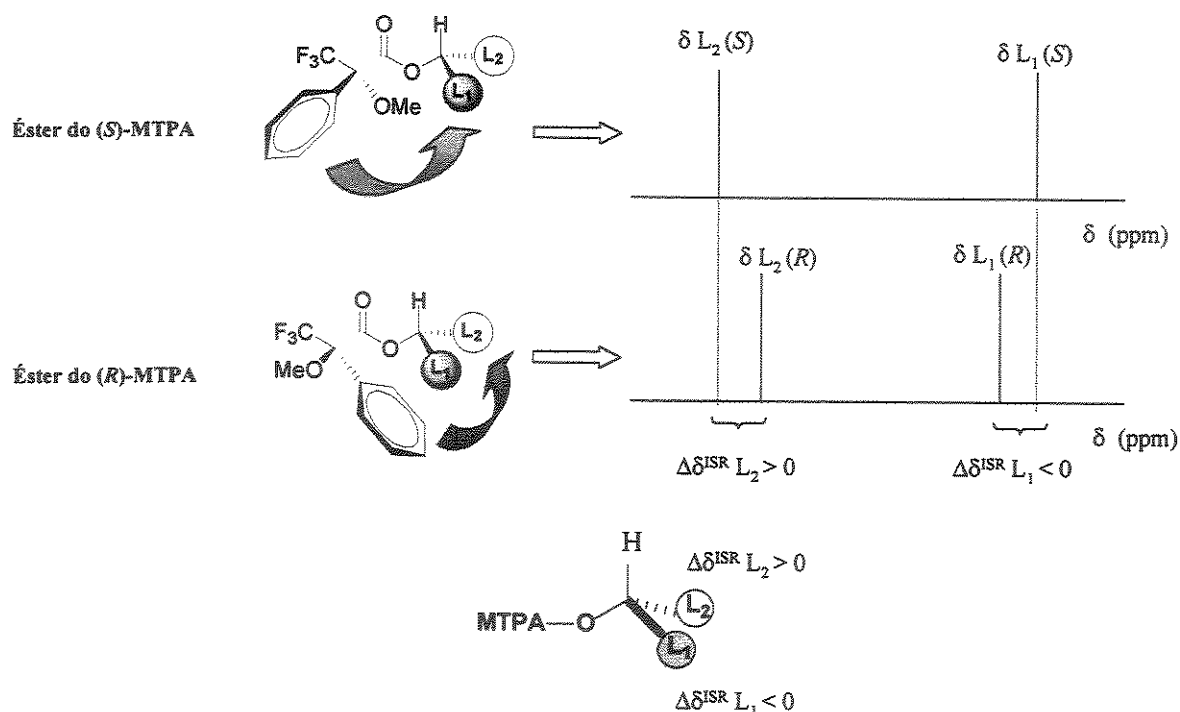


Figura 1.28 – Efeito de proteção da fenila do grupo MTPA sobre os substituintes do centro estereogênico carbinólico

Desta forma no éster (R)-MTPA a fenila blinda os hidrogênios de L_2 enquanto que aqueles de L_1 se mantém inalterados. Já no derivado (S)-MTPA o grupo blindado é L_1 enquanto que L_2 não é afetado.

Estas blindagens seletivas são expressas em termos de $\Delta\delta^{SR}$, definido como a diferença entre os deslocamentos químicos de um hidrogênio no éster (S)-MTPA e o deslocamento químico do mesmo hidrogênio no derivado (R)-MTPA. Todos os hidrogênios blindados no (R)-MTPA apresentaram valores positivos de $\Delta\delta^{SR}$, enquanto que os hidrogênios blindados no (S)-MTPA apresentaram valores de $\Delta\delta^{SR}$ negativos.

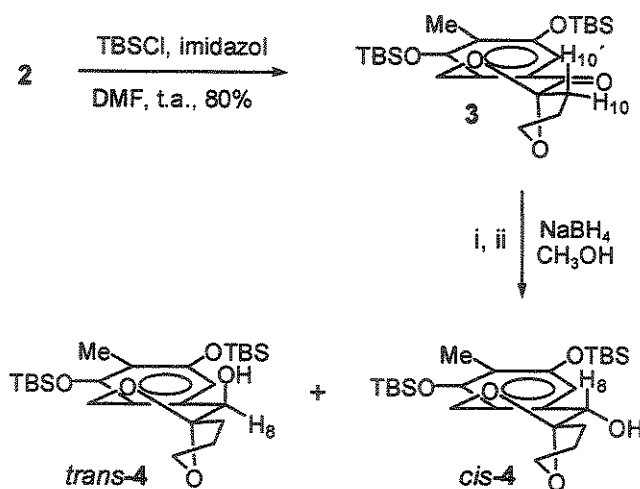
$$\Delta\delta^{SR} L_1 = \delta L_1(S) - \delta L_1(R)$$

$$\Delta\delta^{SR} L_2 = \delta L_2(S) - \delta L_2(R)$$

A estratégia adotada para a determinação da configuração absoluta do terreinol através do método de Mosher, envolveu a transformação prévia do

metabólito no álcool secundário correspondente. Em seguida a configuração deste novo centro, formado diastereosseletivamente, foi determinado através da análise dos $\Delta\delta^{SR}$ verificados nos espectros de RMN de ^1H dos ésteres (S) e (R)-MTPA. Finalmente a estereoquímica relativa e, portanto a configuração absoluta do centro estereogênico do spirocetal, foi obtida mediante análise conformacional baseada em dados de RMN de ^1H como será mostrado detalhadamente a seguir.

Inicialmente, as hidroxilas fenólicas do metabólito de partida foram protegidas mediante tratamento com cloreto de *t*-butil-dimetil-silil, fornecendo a cetona em bons rendimentos (Esquema 1.19). Os espectros de RMN (^{13}C e ^1H) do produto purificado apresentaram os sinais esperados para os dois grupos TBS.



i) t.a., 85% *cis-4*/*trans-4* (4:1); ii) 0 °C, >99% *cis-4*.

Esquema 1.19 - Reações envolvidas na síntese do álcool 4

Em seguida, a carbonila de **3** foi reduzida com NaBH₄ fornecendo uma mistura diastereoisomérica numa proporção de 4:1 (verificada por RMN de ¹H)⁴³. A tabela abaixo resume os dados de RMN de ¹H dos derivados **3** e **4**.

Tabela 1.6 - Dados de RMN de ¹H dos derivados **3** e **4** (499.89 MHz; CDCl₃)

¹ H	2	<i>cis</i> - 3	<i>trans</i> - 3
1	5,00 (1H; d; 15,3)	4,70 (1H; dd; 14,7; 1,5)	4,81 (1H; d; 14,9)
1'	4,73 (1H; d; 15,3)	4,62 (1H; d; 14,7)	4,55 (1H; d; 14,9)
6	7,16 (1H; s)	6,78 (1H; s)	6,53 (1H; s)
8	-	4,60 (1H; s)	4,81 (1H; s)
10	2,73 (1H; dt; 13,0; 8,9)	2,35 (1H; m)	2,15 #
10'	1,99 (1H; ddd; 13,0; 8,0; 4,3)	2,02-1,96 (1H; m)	2,15 #
11/11'	2,05-2,19 (2H; m)	2,12-2,19 (2H; m)	Sobreposição
12	4,11 (1H; m)	4,05 (1H; m)	4,13 #
12'	4,04 (1H; dd; 14,9; 7,3)	3,97 (1H; dd; 14,2; 8,2)	3,95 #
13	2,11 (3H; s)	2,03 (3H; s)	2,08 #
OH	-	4,60 (1H; ls)	4,81 (1H; ls)
C(CH ₃) ₃	1,03 (9H; s)	1,00 (9H; s)	Sobreposição
Si-CH ₃	0,23 (3H; s)	0,21 (3H; s)	0,37
Si-CH ₃	0,23 (3H; s)	0,21 (3H; s)	0,37
C(CH ₃) ₃	1,01 (9H; s)	1,00 (9H; s)	Sobreposição
Si-CH ₃	0,20 (3H; s)	0,19 (3H; s)	0,25
Si-CH ₃	0,18 (3H; s)	0,19 (3H; s)	0,16

Sinais sobrepostos, detectados apenas por HSQC na mistura *cis*-**4**/*trans*-**4**.

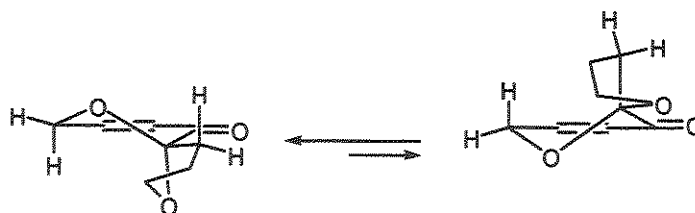
Os sinais de RMN das posições carbinólicas recém formadas foram observados em δ_H 4,60 (sl, 1H); δ_C 60,5 para o produto majoritário e em δ_H 4,81 (sl, 1H); δ_C 60,0 (observado apenas por HSQC) para o isômero minoritário.

Dentre as alterações observadas no espectro de RMN de ¹H como consequência da redução da carbonila, os efeitos sobre os hidrogênios metilênicos das posições 1 e 10, merecem atenção especial. Os sinais dos hidrogênios benzílicos na posição 1 da cetona **3** consistem em dois dupletos em δ 5,00 (1H; d; ²J 15,7 Hz) e δ 4,73 (1H; d; ²J 15,7 Hz). Já no produto majoritário de redução, o mais desprotegido destes sinais apresentou um

⁴³ Além dos produtos de redução esperados verificou-se a formação de uma proporção significativa do produto de desproteção de uma das hidroxilas fenólicas.

pequeno desdobramento adicional (dd; 2J 14,7 Hz e 5J 1,5 Hz) atribuído ao acoplamento escalar homoalílico⁴⁴ com o hidrogênio carbinólico 8. Este fenômeno não foi observado no produto minoritário. Com relação ao metileno 10-CH₂ (para a cetona: δ 2,73, dt; 1H e δ 1,99; ddd, 1H) observou-se uma desproteção do hidrogênio mais desblindado para δ 2,35 (álcool majoritário). Este efeito foi atribuído à influência da carbonila de 3 sobre o deslocamento químico deste hidrogênio uma vez que o outro componente deste metileno permaneceu inalterado após a redução. Desta forma, e levando em consideração fatores conformacionais, foi possível atribuir os hidrogênios H-10 e H-10' de 3 e 4.

Os sistemas constituídos por spirocetais⁴⁵ tendem a adotar uma conformação que favoreça a interação entre os orbitais não ligantes dos átomos de oxigênio e os orbitais anti-ligantes de baixa energia das ligações C-O (efeito anomérico). Desta forma, a conformação mais estável consiste naquela em que há o maior número de ligações C-O nas posições axiais ou pseudoaxiais como mostrado no esquema abaixo.



Esquema 1.20 - Equilíbrio conformacional esperado para os anéis BC do terreinol

De acordo com estas informações, a conformação predominante esperada para a cetona 3 consiste naquela mostrada no Esquema 1.19. Nesta conformação, o hidrogênio H-10 se encontra no plano da carbonila, ou seja,

⁴⁴ Gunther H, *NMR Spectroscopy – Basic Principles, Concepts, and Applications in Chemistry*, 2nd, John Wiley & Sons 1998, pag. 126 – 127.

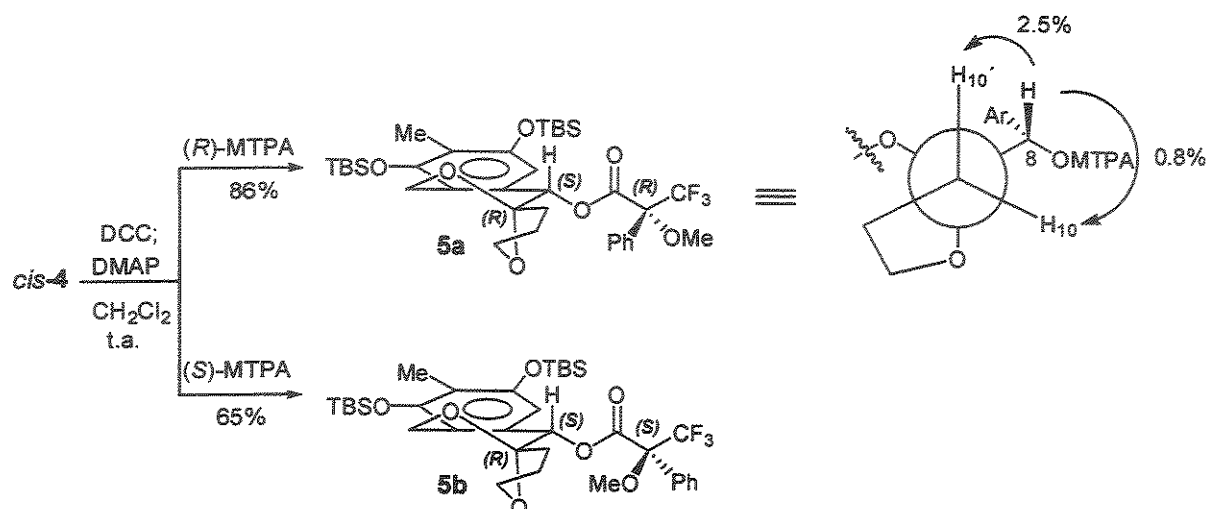
⁴⁵ Perron F, Albizzati K F *Chem. Rev.* 1989, 89, 1617 - 1661

dentro do seu cone de desproteção o que explica o efeito observado sobre seu deslocamento químico após a redução.

A utilização de temperaturas mais baixas (0 °C) levou à formação de um único diastereoisômero cujos dados de RMN se mostraram idênticos aos do produto obtido majoritariamente na reação conduzida a temperatura ambiente.

A diastereosseletividade facial observada na redução da cetona **3** deve estar relacionada à maior facilidade do ataque nucleofílico do hidreto pela face β estericamente menos congestionada do confômero C-O diaxial levando ao produto *cis*. Por outro lado, o isômero minoritário de geometria *trans* seria formado como consequência do ataque à face α . A diferença entre os valores de deslocamento químico dos hidrogênios H-8 dos álcoois diastereoisoméricos é facilmente interpretada com base nesta proposta. Como mencionado anteriormente, o sinal de H-8 do aduto majoritário se apresenta 0,2 ppm mais blindado que o isômero minoritário. Considerando novamente o confômero C-O diaxial, H-8 se localiza na posição pseudo-axial em *cis*-**4** e pseudo-equatorial em *trans*-**4**, portanto acima e no plano do anel aromático respectivamente. Assim, o efeito da anisotropia magnética do anel sobre H-8 do álcool majoritário seria de proteção ao passo que o efeito sobre H-8 de *trans*-**4** seria de desproteção confirmando as estereoquímicas relativas dos estereoisômeros.

Finalmente, a esterificação do álcool *cis*-**4** separadamente com os enantiômeros do MTPA na presença de dicicloexilcarbodiimida e dimetilaminopiridina se processou suavemente a t.a. fornecendo os dois ésteres de Mosher em rendimentos moderados (Esquema 1.21). Após purificação em coluna cromatográfica os ésteres foram submetidos às análises espectroscópicas de rotina.



Esquema 1.21 - Esterificação do álcool *cis*-4 com os ácidos (R)- e (S)-MTPA (esquerda); valores de incrementos NOE (direita)

O hidrogênio H-8 do éster (R)-MTPA sofreu uma desproteção de 1,6 ppm sendo observado em δ 6,19 (1H, sl) enquanto que o diastereoisômero (S)-MTPA foi desblindado para δ 6,25 (variação de +1,44ppm). Os sinais dos cinco hidrogênios do anel aromático do reagente de Mosher em ambos ésteres foram observados em δ 7,67 (2H, m) e 7,41 (3H, m) e as suas metoxilas em δ 3,60 (3H, s) para o (R)-MTPA e em δ 3,58 para o (S)-MTPA. Em ambos os casos a verificação dos sinais dos dois grupos O-TBS garantiram a integridade da proteção sobre as hidroxilas fenólicas. A excitação seletiva de H-8 revelou uma maior proximidade com H-10' em relação a H-10 confirmando a estereoquímica relativa *cis*.

O efeito de proteção da fenila do MTPA sobre os metilenos do sistema furânico em 5a e sobre o hidrogênio aromático H-6 em 5b (Tabela 1.7) permitiu a atribuição segura da configuração (S)-C8 e consequentemente, (R)-C9.

Tabela 1.7 – Deslocamentos Químicos de ^1H e valores de $\Delta\delta^{SR}$ dos ésteres **5a** e **5b**

^1H	5a	5b	$\Delta\delta^{SR\#}$
1	4,76	4,75	
1'	4,63	4,65	
6	6,36	6,26	-0,10
8	6,19	6,25	
10	1,92	1,97	+0,05
10'	1,65	1,79	+0,14
11	1,96	2,07	+0,11
11'	1,57	1,79	+0,22
12	3,94	4,02	+0,08
12'	3,70	3,88	+0,18
13	2,03	2,01	-0,02
$\text{C}(\text{CH}_3)_3$	1,00	1,00	0,00
Si-CH_3	0,18	0,17	-0,01
Si-CH_3	0,18	0,17	-0,01
$\text{C}(\text{CH}_3)_3$	0,97	0,95	-0,02
Si-CH_3	0,12	0,04	-0,08
Si-CH_3	0,09	0,06	-0,03
O-CH_3	3,60	3,58	-0,02

Tendo em vista estes resultados, se o efeito Cotton positivo observado em 319 nm ($\Delta\epsilon +3.8$) e negativo em 224 nm ($\Delta\epsilon -5.0$) na curva de CD do terreinol forem consideradas como consequência das transições $n \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \sigma^*$, a aplicação das regras de octantes, como definidas por Sneath e Gawronski, fornece a configuração correta para o (*R*)-terreinol na conformação C-O diaxial (Figura 1.29).

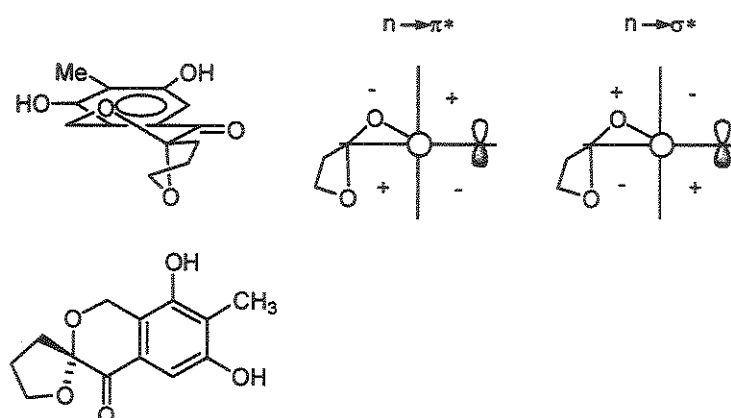


Figura 1.29 – Projeção do (*R*)-terreinol sobre os octantes definidos segundo por Sneath e Gawronski para as transições $n \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \sigma^*$ respectivamente.

1.5 - CONCLUSÕES

Durante estas investigações as condições ótimas de produção do composto inédito terreinol foram estabelecidas.

No entanto, a produção deste produto natural por culturas de *Aspergillus terreus* se mostrou bastante suscetível a pequenas variações de condições experimentais, sendo que a introdução de acetato de sódio ao meio de cultura, mesmo em quantidades mínimas, inibiu completamente a sua produção.

A obtenção da terreína marcada, embora já descrita na literatura, consistiu um importante passo para a implantação de estudos de incorporação de substratos enriquecidos em isótopos estáveis.

A utilização de D-Glicose [$1\text{-}^{13}\text{C}$] nos experimentos com culturas de *Aspergillus terreus* forneceu o terreinol inequivocamente marcado em 7 das suas 13 posições. A determinação do padrão policetídeo contribuiu para a determinação da estrutura deste metabólito. O êxito obtido nesta etapa consolidou definitivamente a implantação de estudo de rotas biossintéticas de metabólitos secundários através de RMN em nosso instituto⁴⁶.

Os estudos de INADEQUATE 2D e sua adaptação para escala de poucos miligramas através de análise computacional, realizada pioneiramente no IQ-UNICAMP, permitiram a inclusão deste experimento na rotina do laboratório de RMN.

A aplicação do método de Mosher modificado sobre o álcool secundário *cis*-3, aliada a análise conformacional, permitiu a determinação da configuração absoluta do (*R*)-terreinol via RMN de ^1H .

⁴⁶ Ver anexo

1.6 - PARTE EXPERIMENTAL

Procedimentos gerais

Os espectros de IV foram obtidos em um espectrômetro Perkin-Elmer 1600. As medidas de rotação óptica específica foram realizadas em um polarímetro Perkin-Elmer 341. Análises por CG/EM foram realizadas em equipamento Agilent 6890-5973 equipado com coluna capilar de sílica fundida do tipo J & W Scientific HP-5 (30m x 0,25mm x 0,25 μ m) e cuja fase fixa consiste de 5% de fenil metil silano e operando com uma fonte de elétrons com energia de ionização de 70 eV. As seguintes condições foram empregadas: temperatura inicial 80 °C durante 1 minuto; taxa de aquecimento 15 °C/min.; temperatura final 290 °C durante 10 minutos. O volume injetado das amostras, adequadamente diluídas foi de 1 μ L. Análises por cromatografia em camada delgada (CCD) foram realizadas em sílica em placas de alumínio Merck na qual as aplicações foram eluídas com a mistura de solventes especificada em cada caso e reveladas em luz UV a 254 e 360 nm e por imersão em uma solução ácida de anisaldeído seguida de aquecimento com ar quente. As reações envolvendo reagentes sensíveis á umidade foram conduzidas sob atmosfera de argônio em vidraria previamente aquecida com pistola de ar quente e resfriada sob pressão positiva de argônio. Os solventes, aminas e reagentes utilizados nestas reações foram tratados conforme procedimento descrito.⁴⁷ Todos os meios de cultura foram autoclavados a 121 °C durante 15 minutos antes do uso. Todos os experimentos com culturas de microorganismos foram conduzidos em duplicata.

⁴⁷ Perrin, D. D.; Armarego, W. L. F.; Perrin, D. R.; *Purification of Laboratory Chemicals*, 2nd Edition, Pergamon Press, 1978.

Aquisição dos espectros de RMN

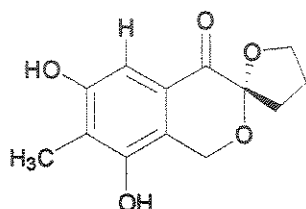
Experimentos de ^1H e ^{13}C unidimensionais de rotina foram adquiridos em espectrômetro INOVA-500/Varian operando a 499.89 MHz para ^1H (64K pontos, pulso de excitação de 30° com 2,2 μs , janela espectral de 6 KHz, tempo de aquisição de 3,3 s e intervalo de relaxação de 10 ms) e 125,69 MHz para ^{13}C (69K pontos, pulso de excitação de 45° com 7,0 μs , janela espectral de 34 KHz, tempo de aquisição de 1,0 s e intervalo de relaxação de 1,5 s) ou em espectrômetro GEMINI-300/Varian operando a 299,95 para ^1H (32K pontos, pulso de excitação de 35° com 7,8 μs , janela espectral de 6 KHz, tempo de aquisição de 2,7 s e intervalo de relaxação de 200 ms) e 75,45 MHz para ^{13}C (32K pontos, pulso de excitação de 50° com 6,5 μs , janela espectral de 19 KHz, tempo de aquisição de 0,8 s e intervalo de relaxação de 2,0 s) em sonda de 5 mm com detecção direta ou em sonda de 5 mm de tripla ressonância com detecção inversa a temperatura ambiente.

Medidas de NOE foram realizadas a 25,0 $^\circ\text{C}$ por excitação do núcleo desejado com pulso seletivo de 180° (499,89 MHz, 38K pontos, pulso de excitação seletiva de 90° com 6,5 μs , janela espectral de 6 KHz, tempo de aquisição de 3,3 s, tempo de mistura de 0,5 s e intervalo de relaxação de 5.0 s).

Espectro de INADEQUATE 2D do terreinol realizado a 25.0 $^\circ\text{C}$ em nano-sonda/Varian com detecção direta usando 10 mg de 2 e 1 mg de $\text{Cr}(\text{acac})_3$ em 50 μL de CD_3OD . 64 incrementos foram adquiridos com 1600 acumulações cada (125,69 MHz; 8K pontos em $F_2 = 31508,5 \text{ Hz}$ e 2K pontos

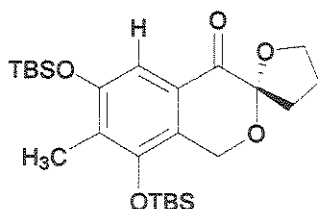
em $F_1 = 63016,9$ Hz; pulso de excitação de 90° de $4 \mu\text{s}$; $\tau=1/4J_{CC}=5,5$ ms, tempo de aquisição de 130 ms e intervalo de relaxação de 1 s).

Obtenção do terreinol



Para produção do terreinol foram utilizados meios de cultura líquidos constituídos de 2% extrato de malte (ME) Difco em água destilada (100 mL em erlenmeyers de 500 mL). As culturas foram mantidas a 28°C sob agitação constante (170 rpm) durante 10 dias. As culturas de *A. terreus* foram filtradas através de gaze através de funil de vidro. Os meios líquidos isentos de micélio foram extraídos com acetato de etila (3 X 100 mL), secados com sulfato de sódio anidro e concentradas sob pressão reduzida a temperatura ambiente em rotaevaporadores. Os extratos brutos obtidos foram analisados por CG/EM e CCD (eluidas com uma mistura 1:1 de acetato de etila e hexano e reveladas em luz UV a 254 e 360 nm e anisaldeído). Após purificação por cromatografia em coluna de sílica-gel eluída com uma mistura 1:1 de hexano e acetato de etila, o terreinol foi obtido em aproximadamente 1 mg na forma de um sólido branco amorfo.

Preparação do derivado 3



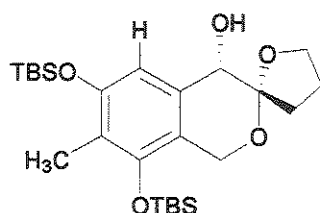
Imidazol (7,6 mg; 111,8 μmol) e cloreto de *terc*-butil-dimetilsilil (10,5 mg; 69,7 μmol) foram adicionados a uma solução do terreinol, **2** (7,0 mg; 28,0 μmol) em dimetilformamida anidra (0,5 mL). A mistura foi agitada a temperatura ambiente por 4h, diluída com Et₂O e lavada com solução saturada de NH₄Cl_(aq). Após purificação por cromatografia em coluna (hexano/acetato de etila, 95:5) obteve-se o composto **3** puro (10 mg, 75%).

$[\alpha]_D^{22} - 37.1$ (CH₃OD; c=0.7; ~50% ee)

RMN de ¹H (CDCl₃, 499.89 MHz): ver Tabela 1.6

RMN de ¹³C (CDCl₃, 125.69 MHz) δ : 188.9 (C-8); 154.2 (C-5); 149.7 (C-3); 127.7 (C-7); 126.9 (C-2); 126.3 (C-4); 109.8 (C-9); 105.3 (C-6); 70.2 (C-12); 59.0 (C-1); 33.1 (C-10); 26.0 (3CH₃); 25.7 (3CH₃); 24.9 (C-11); 18.7 (C₀); 18.2 (C₀); 12.0 (C-13); -3.0 (CH₃); -3.3 (CH₃); -4.3 (2CH₃).

Preparação do derivado **4**



NaBH₄ (0,8 mg; 21,1 μmol) foi adicionado a uma solução de **3** (9,0 mg; 18,8 μmol) em metanol (1,0 mL) a 0° C. A mistura foi agitada a temperatura ambiente por 10 min, após os quais, a reação foi diluída com acetona e os solventes evaporados. O produto bruto foi tratado com hexano/acetato de etila (9:1) e filtrado através de uma coluna curta de sílica-gel eluída com a mesma mistura de solventes fornecendo 9,0 mg (>99%) de *cis*-**4**.

$[\alpha]_D^{23} - 37.0$ (CH₃OH; c=0.7; ~50% ee)

I.V. filme, ν (cm⁻¹): 3450; 1606; 1581; 870; 757.

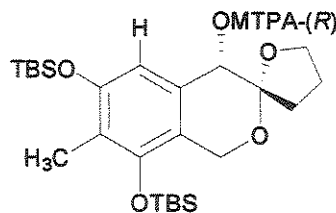
RMN de ^1H (CDCl_3 , 499.89 MHz): ver Tabela 1.6.

RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 125.69 MHz) δ : 153.6 (C-5); 149.0 (C-3); 134.0 (C-7); 118.7 (C_0); 118.2 (C_0); 110.1 (C-9); 105.3 (C-6); 69.4 (C-12); 67.3 (C-8); 60.5 (C-1); 34.0 (C-10); 26.1 (3CH_3); 25.9 (3CH_3); 24.5 (C-11); 18.9 (C_0); 18.4 (C_0); 11.5 (C-13); -2.7 (CH_3); -2.8(CH_3); -4.0 (2CH_3).

Procedimento geral para os ésteres (**5a/b**):

DMAP (3 eq.), DCC (3 eq.) e ácido MTPA (2 eq.) foram adicionados a uma solução de *cis*-**4** ($1,7 \times 10^{-2}$ mol/L) em diclorometano seco sob condições anidras e a mistura resultante foi agitada durante 12 h a temperatura ambiente. O precipitado foi removido e lavado com hexano/acetato de etila 9:1 e as soluções orgânicas combinadas foram concentradas em rotaevaporador. O produto bruto foi purificado em coluna cromatográfica (hexano/acetato de etila 9:1) fornecendo **5a** (2 mg, 86%) e **5b** (1,5 mg, 65%).

5a:



$[\alpha]_D^{22} - 23.0$ (CH_3OH ; $c=0.3$; ~50% ee)

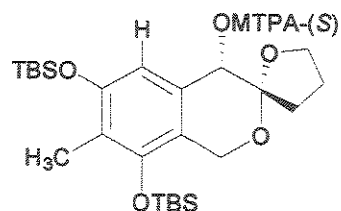
I.V. filme, ν (cm^{-1}): 1748; 1606; 1582; 873; 828

RMN de ^1H (CDCl_3 , 499.89 MHz): ver Tabela 1.6

RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 125.69 MHz) δ : 167.2 (CO); 153.8 (C-3); 149.7 (C-5); 131.6 (C_0); 129.7 (2CH); 128.8 (C_0); 128.5 (2CH); 127.6 (2CH); 124.5 (C_0); 122.2 (C_0); 119.9(C_0); 119.2 (C_0); 110.3 (C-6); 104.2 (C-9); 71.1 (C-8); 69.1 (C-12); 60.7 (C-1); 55.7 (CH_3); 34.1 (C-10); 26.0 (3CH_3); 25.7 (3CH_3); 23.9

(C-11); 18.7 (C₀); 18.2(C₀); 11.4 (C-13); -2.8 (CH₃); -3.1 (CH₃); -4.5 (CH₃) 2(CH₃).

5b:



RMN de ¹H (CDCl₃, 499.89 MHz): ver Tabela 1.6

RMN de ¹³C (CDCl₃, 125.69 MHz): δ: 167.0 (CO); 153.7 (C-5); 149.7 (C-3); 129.7 (C₀); 128.7 (2CH); 128.6 (C₀); 127.8 (2CH); 126.8 (C₀); 124.5 (C₀); 122.2 (C₀); 120.0 (C₀); 119.1 (C₀); 110.1 (C-6); 104.4 (C-9); 70.9 (C-8); 68.9 (C-12); 60.8 (C-1); 55.4 (CH₃); 33.8 (C-10); 26.0 (3CH₃); 25.7 (3CH₃); 23.8 (C-11); 18.7 (C₀); 18.2(C₀); 11.4 (C-13); -2.8 (CH₃); -3.1 (CH₃); -4.5 (CH₃); -4.6 (CH₃).

1.7 - ESPECTROS

Fernando Teixeira_TBS/cdc13 0015fcm2

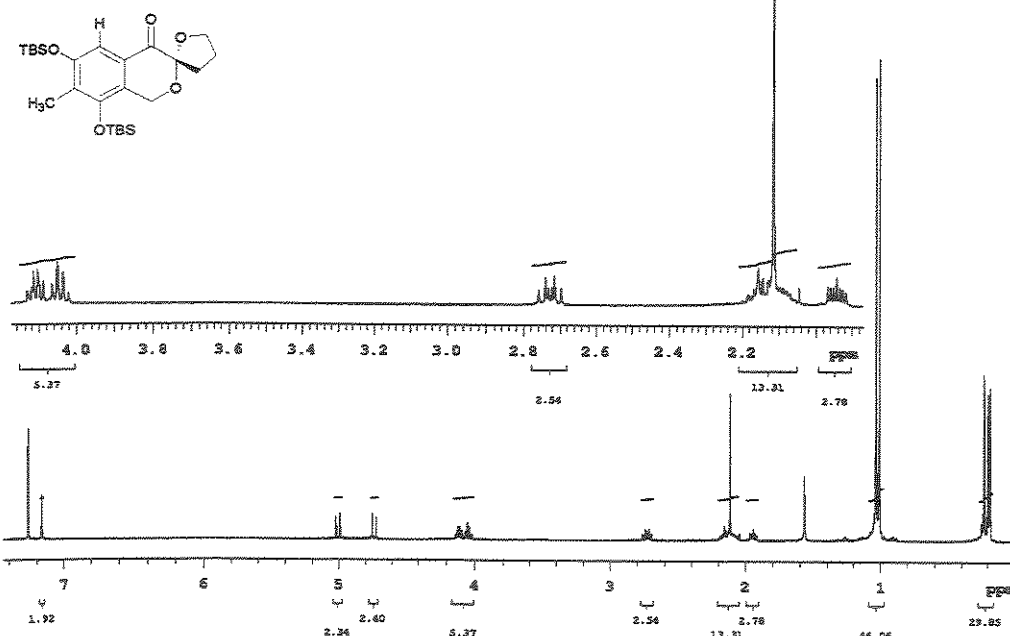


Figura 1.30 - Espectro de RMN de ¹H do composto 3 (499,89 MHz; CDCl₃)

Fernando Teixeira_TBS/cdc13 0015fcm2

Pulse Sequence: zgpg30

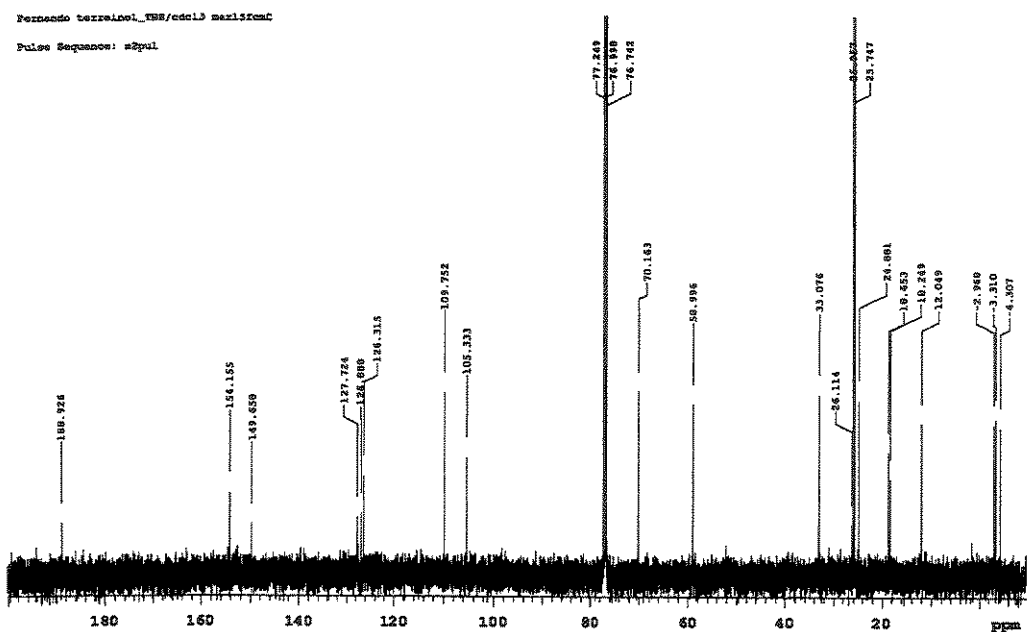


Figura 1.31 - Espectro de RMN de ¹³C do composto 3 (125,69 MHz; CDCl₃)

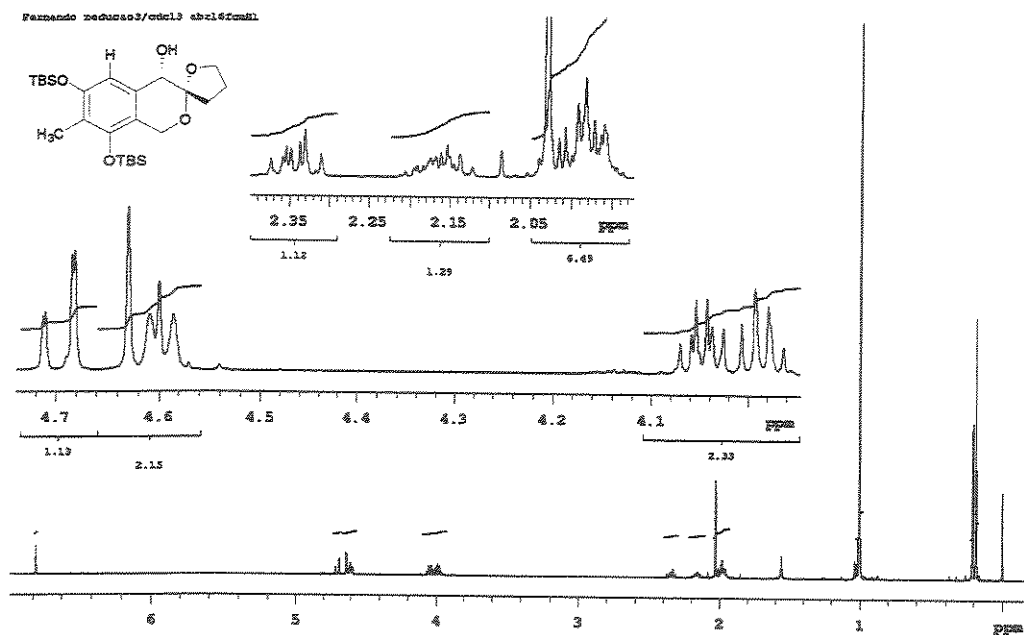


Figura 1.32 - Espectro de RMN de ^1H do composto *cis*-4 (499,89 MHz; CDCl_3)

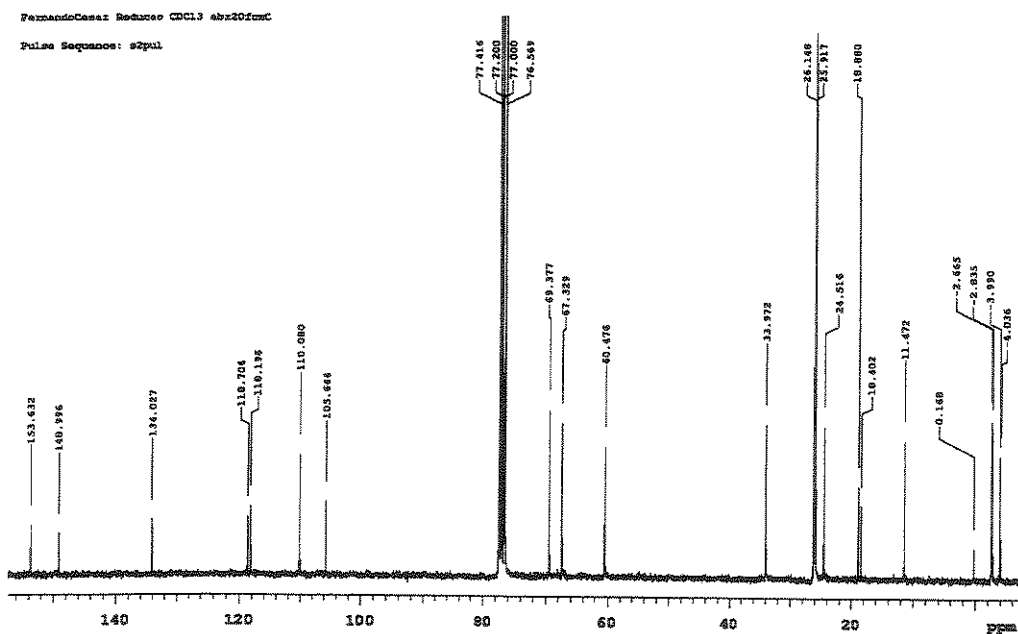


Figura 1.33 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto *cis*-4 (125,69 MHz; CDCl_3)

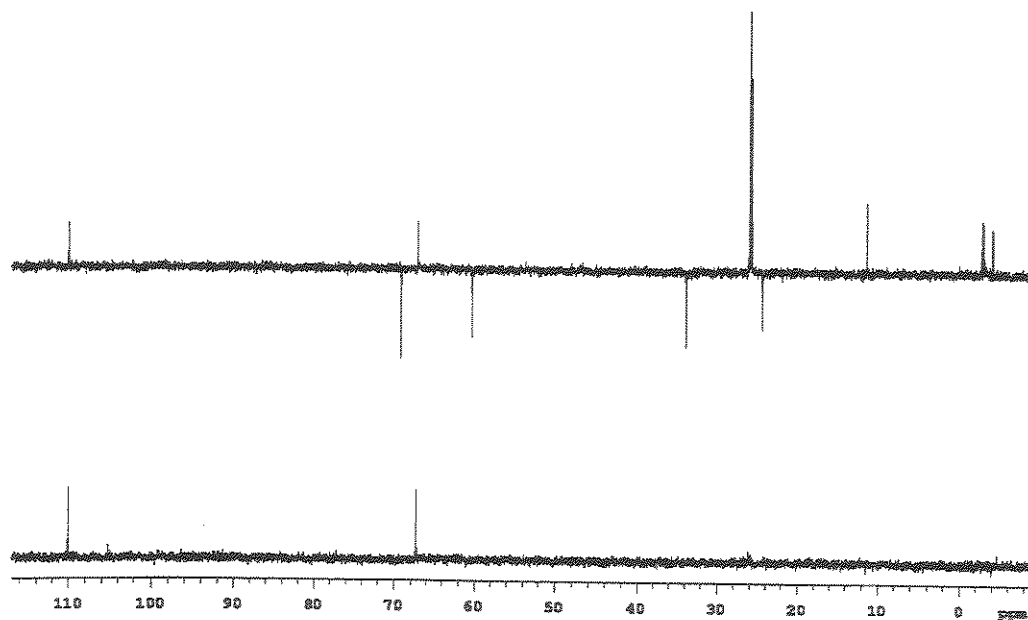


Figura 1.34 - Espectros do experimento de DEPT do composto *cis*-4 (125,69 ; CDCl_3)

Fernando redacao_fr01/cdcl3 max15fcm88qc
Pulse Sequence: 88QC
Solvent: CDCl_3
Ambient temperature
File: max15fcm88qc
INOVA-500 "maxima"

Relax. delay 1.500 sec
Acq. time 0.250 sec
WIDEB 4499.9 Hz
2D Width 25260.5 Hz
128 repetitions
2 x 128 increments
OBSERVE S1, 499.8926722 MHz
DECOUPLE C13, 125.7046033 MHz
Power 50 dB
on during acquisition
off during delay
GMP-1 modulated
DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.105 sec
F1 DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.010 sec
FT size 2048 x 2048
Total time 15 hr, 57 min, 21 sec

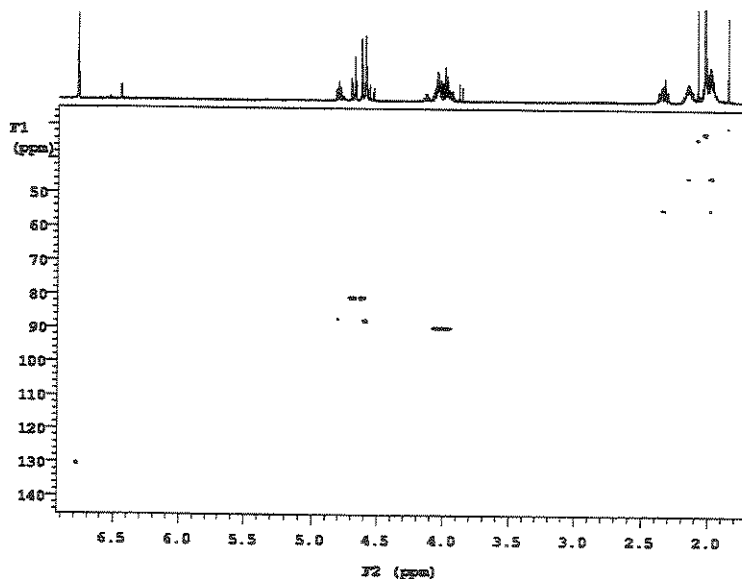


Figura 1.35 - Espectro de HSQC do composto *cis*-4 (499,89 MHz; CDCl_3)

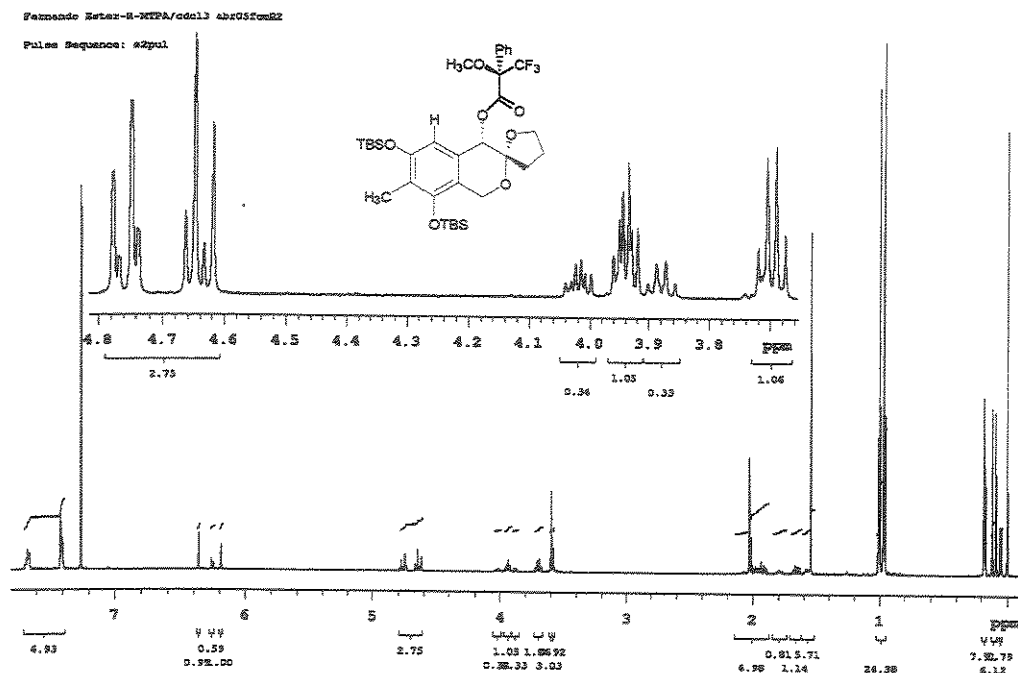


Figura 1.36 - Espectro de RMN de ^1H do composto 5a (499,89 MHz; CDCl_3)

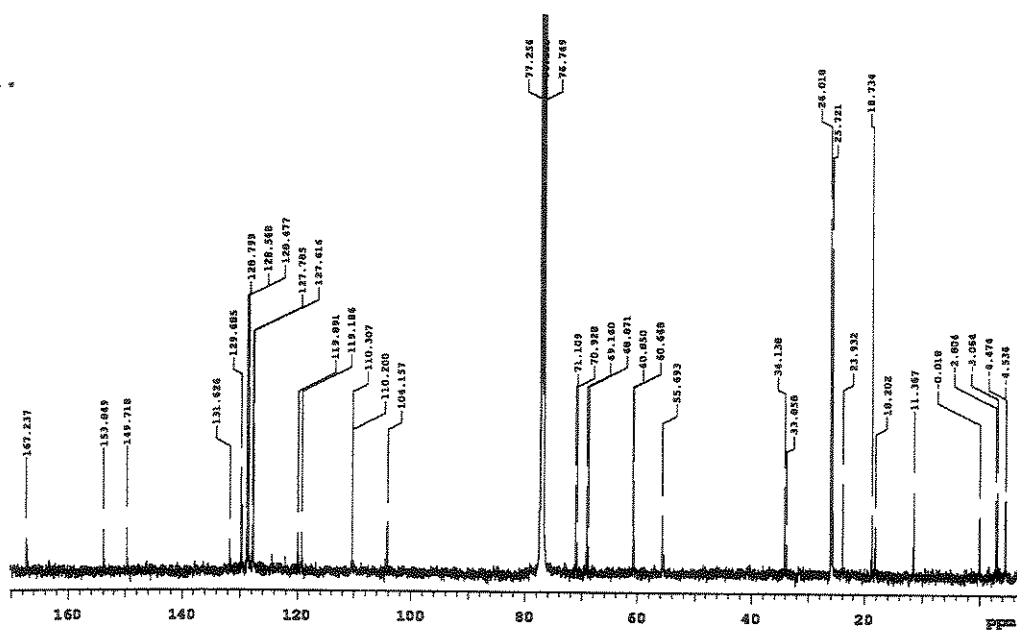


Figura 1.37 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto 5a (125,69 MHz; CDCl_3)

Fernando ester-R-MVA cdcl3 abrxlcm89qc

Pulse Sequence: HSQC

Solvent: CDCl₃
 Ambient Temperature
 User: 1-14-87
 File: abrxlcm89qc
 XNOVA-500 "nucleus"

Relax. delay 1.500 sec
 Acq. time 0.200 sec
 Width 4603.3 Hz
 2D Width 25982.5 Hz
 64 repetitions
 2 x 160 increments
 OBSERVE EL 499.882685 MHz
 DECOUPLE CL3, 125.7055854 MHz
 Power 50 dB
 on during acquisition
 off during delay
 GARP-1 modulated
 DATA PROCESSING
 Gauss apodization 0.107 sec
 F1 DATA PROCESSING
 Gauss apodization 0.011 sec
 FT size 2048 x 2048
 Total time 9 hr, 58 min, 53 sec

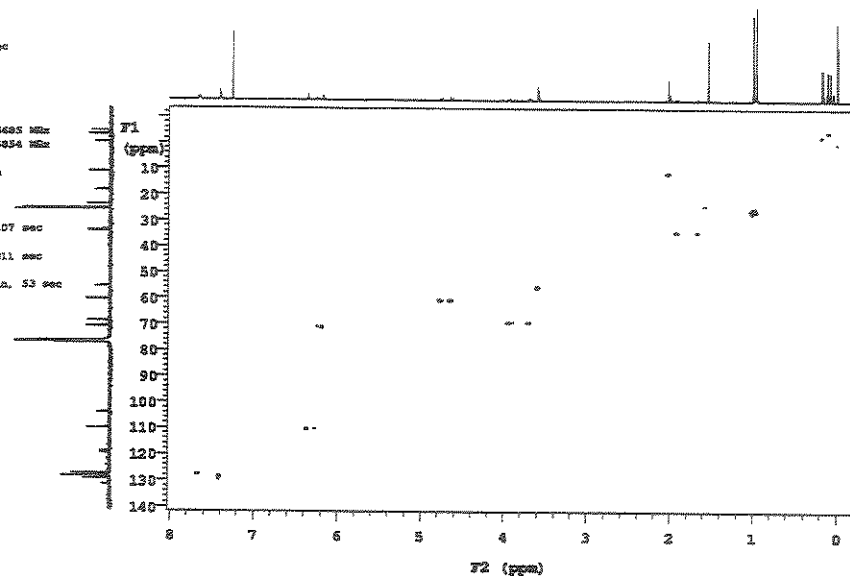


Figura 1.38 - Espectro de HSQC do composto 5a (499,89 MHz; CDCl₃)

Fernando ester-R-MVA cdcl3 abrxlcm89qc

Pulse Sequence: HSQC

Solvent: CDCl₃
 Ambient Temperature
 User: 1-14-87
 File: abrxlcm89qc
 XNOVA-500 "nucleus"

Relax. delay 1.500 sec
 Acq. time 0.200 sec
 Width 4603.3 Hz
 2D Width 25982.5 Hz
 64 repetitions
 2 x 160 increments
 OBSERVE EL 499.882685 MHz
 DECOUPLE CL3, 125.7055854 MHz
 Power 50 dB
 on during acquisition
 off during delay
 GARP-1 modulated
 DATA PROCESSING
 Gauss apodization 0.107 sec
 F1 DATA PROCESSING
 Gauss apodization 0.011 sec
 FT size 2048 x 2048
 Total time 9 hr, 58 min, 53 sec

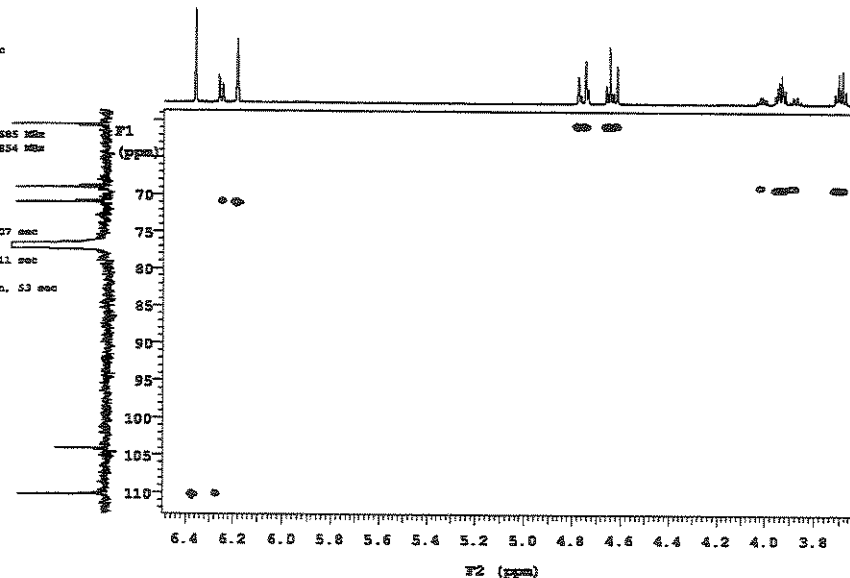


Figura 1.39 - Expansão do espectro de HSQC do composto 5a (499,89 MHz; CDCl₃)

Fernando ester-R-MYRA cdcl3 abx2fomSSQC

Pulse Sequence: SSQC

Solvent: CDCl3

Ambient temperature

User: 1-14-07

File: abx2fomSSQC

INOVA-500 "mavrun"

Relax. delay 1.500 sec
Acq. time 0.300 sec
FIDCh 4403.3 Hz
2D Width 25982.5 Hz
64 repetitions
2 x 160 increments
OBSERVE R1, 499.882685 MHz
NUC1 R1, 125.7055854 MHz
Power 50 dB
on during acquisition
off during delay
GAMP-1 modulated
DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.107 sec
F1 DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.011 sec
FT time 2048 x 2048
Total time 9 hr, 59 min, 53 sec

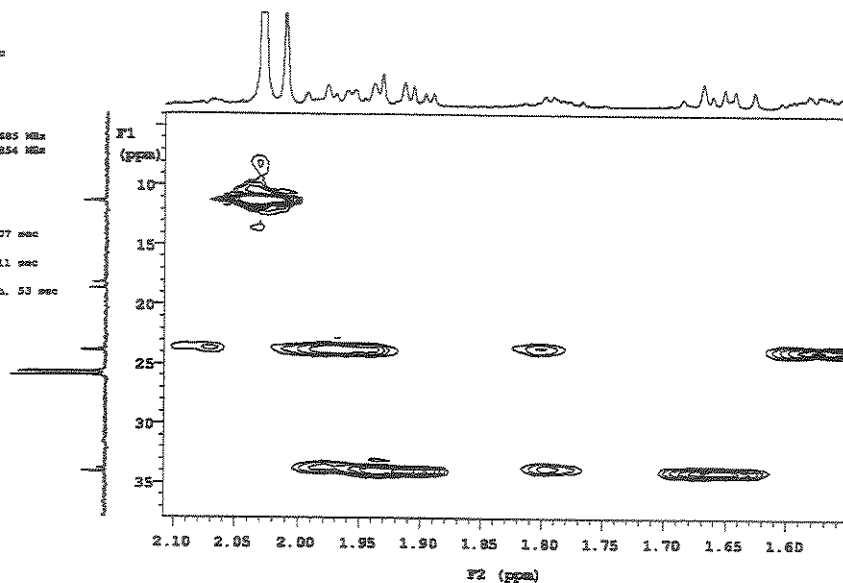


Figura 1.40 - Expansão do espectro de HSQC do composto **5a** (499,89 MHz; CDCl₃)

Fernando ester-R-MYRA/cdcl3 abx2fomSSQC

Pulse Sequence: s2pul

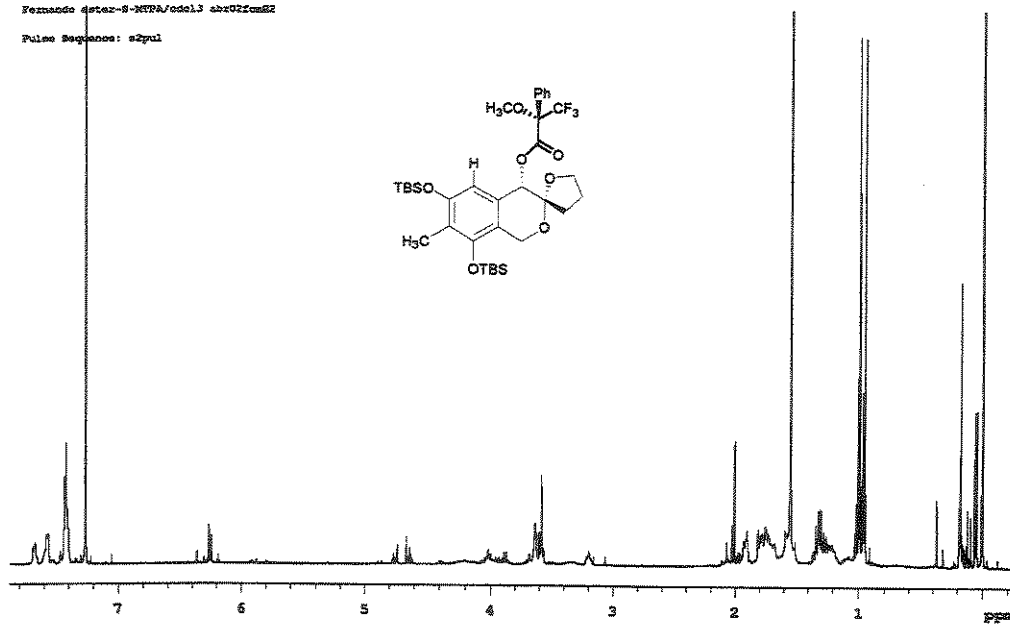


Figura 1.41 - Espectro de RMN de ¹H do composto **5b** (499,89 MHz; CDCl₃)

Fernando Ester-R-MTPA/cdcl3 abn30fcmS021
Pulse Sequence: roesyld

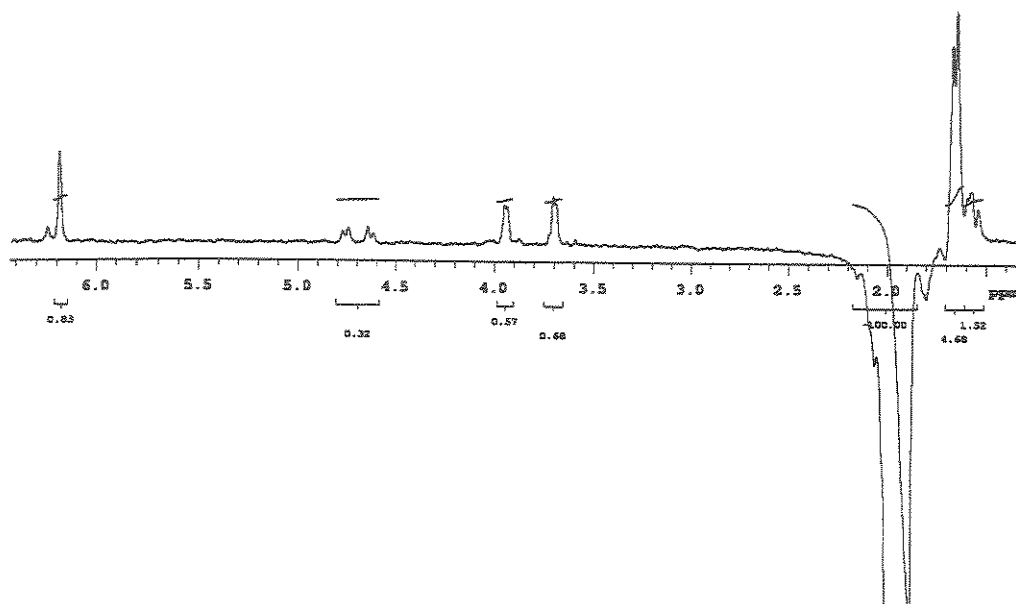


Figura 1.42 - Espectro de ROESY 1D do composto **5a** (499,89 MHz; CDCl₃)

Fernando Ester-R-MTPA/cdcl3 abn30fcmS022
Pulse Sequence: roesyld

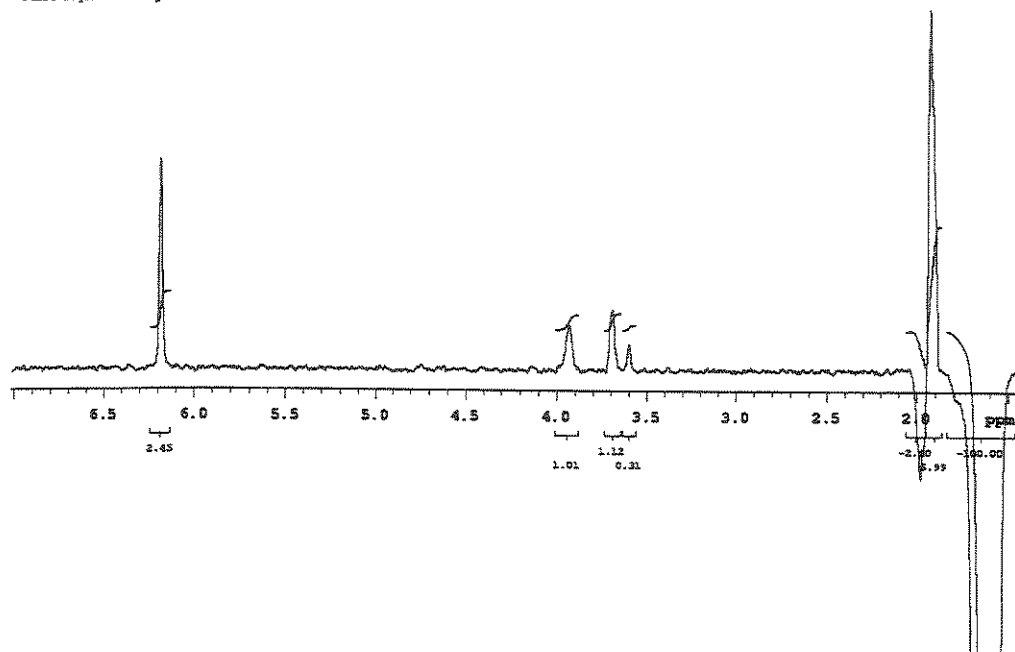


Figura 1.43 - Espectro de ROESY 1D do composto **5a** (499,89 MHz; CDCl₃)

Fernando Ester-R-MTPA/cdcl3 abx302cmRCE3
Pulse Sequence: roesy1d

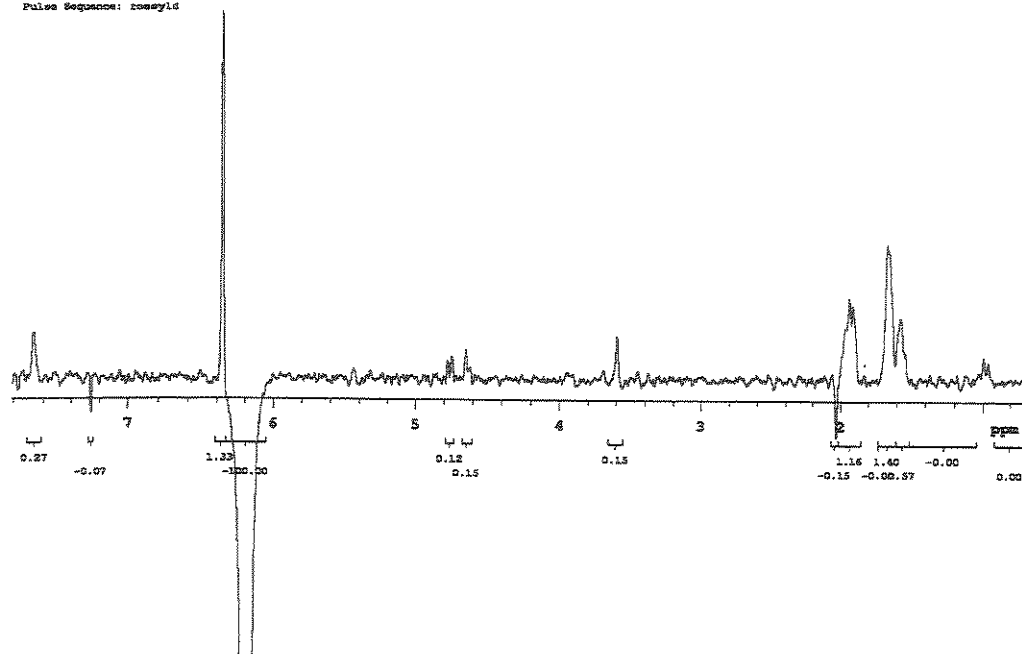


Figura 1.44 - Espectro de ROESY 1D do composto **5a** (499,89 MHz; CDCl₃)

2.1 INTRODUÇÃO

Em 2002, cerca de 400 mil novos casos de câncer foram registrados no Brasil e quase 130 mil brasileiros morreram em razão da doença. O câncer representou 13,2% de todos os óbitos do país, perdendo apenas para as doenças cardio-vasculares¹. Mundialmente, cerca de um milhão de pessoas desenvolvem câncer por ano sendo que metade dos casos culmina em morte². Destas, os tumores de sistema nervoso central (SNC) respondem por 2,4%. No entanto, graças ao desenvolvimento de métodos diagnósticos mais precisos e eficientes, dentre os quais se destaca a Ressonância Magnética de Imagem (RMI), as neoplasias têm sido detectadas em fases mais precoces e as mortes por câncer do SNC vêm diminuindo.

Embora eficaz na detecção das lesões, a RMI não permite a determinação precisa da natureza das mesmas, dado indispensável para a definição do tratamento e para aumentar as chances de evitar um procedimento invasivo. Em muitos casos os padrões de imagens de patologias bastante diferentes podem ser indistinguíveis. Nesse contexto, a espectroscopia de RMN clínica (de baixa resolução) surge como uma ferramenta não invasiva capaz de ajudar a classificar as lesões através da análise da sua composição química *in vivo*. A figura abaixo mostra a semelhança entre as imagens de dois casos de neoplasias com diagnósticos distintos e como os espectros de RMN de ¹H *in vivo* revela as diferenças entre eles.

¹ Pivetta, M. Pesquisa: Ciência e Tecnologia no Brasil – Fapesp, 2004, 99

² THE WORLD HEALTH REPORT, 1997

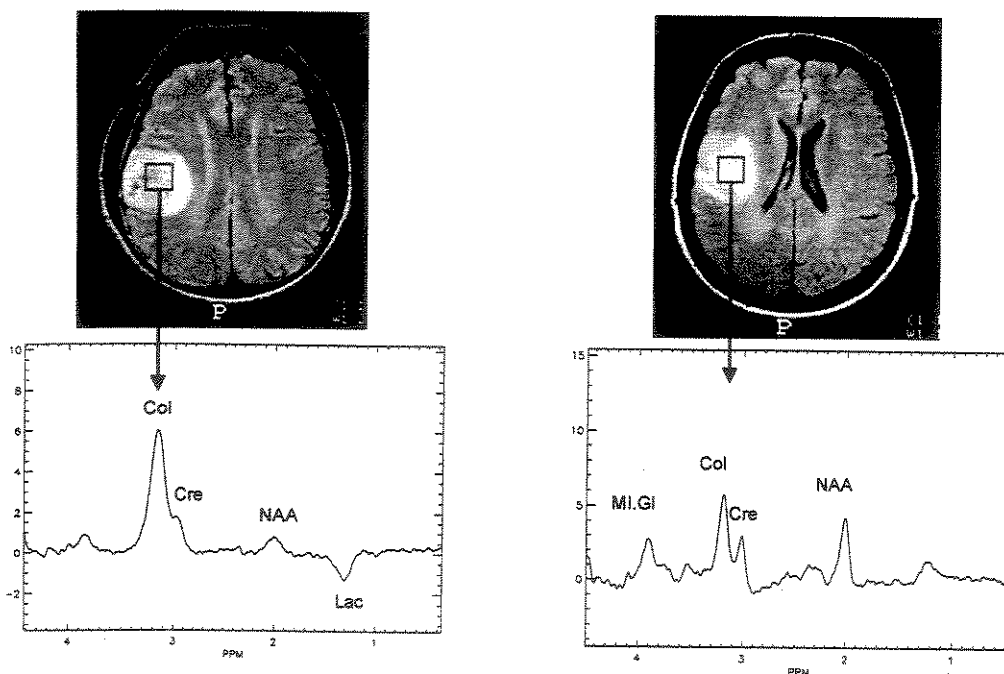


Figura 2.1 - Aplicação de RMN de ^1H *in vivo*. Acima, imagens de RMI de um caso de oligoastrocitoma anaplásico (esquerda) e de glioblastoma (direita). Abaixo, os respectivos espectros de RMN de ^1H clínica.

Além disso, análise da distribuição de metabólitos pela RMN clínica permite ainda, a investigação dos processos bioquímicos do tecido cerebral normal e aqueles envolvidos no surgimento, crescimento e manutenção dos tumores do SNC.

Pela sua própria complexidade, há muito que se conhecer sobre os mecanismos envolvidos no surgimento e perpetuação dos tumores de SNC. A escassez relativa de técnicas de estudo de processos bioquímicos dinâmicos, *in vivo*, muitas vezes incorre no uso de modelos construídos fora dos sistemas naturais podendo não exprimir o funcionamento biológico com exatidão. Assim, técnicas, como a RMN clínica, que consigam refletir o que ocorre no cérebro, *in loco*, fornecem informações seguras para o entendimento dos processos bioquímicos que ocorrem ou predominam no tecido normal e patológico.

Porém, a baixa resolução da RMN clínica resulta em espectros com muitos sinais sobrepostos ou indistinguíveis da linha de base. A utilização da RMN de ^1H de alta resolução *in vitro*, fornece informações mais detalhadas sobre a composição química de extratos de tumores permitindo a identificação de metabólitos diagnósticos e/ou bioquimicamente importantes. Uma vez identificada a importância de uma determinada substância por RMN *in vitro* os parâmetros da RMN clínica podem ser finamente ajustados aumentando a sensibilidade e resolução para a mesma³.

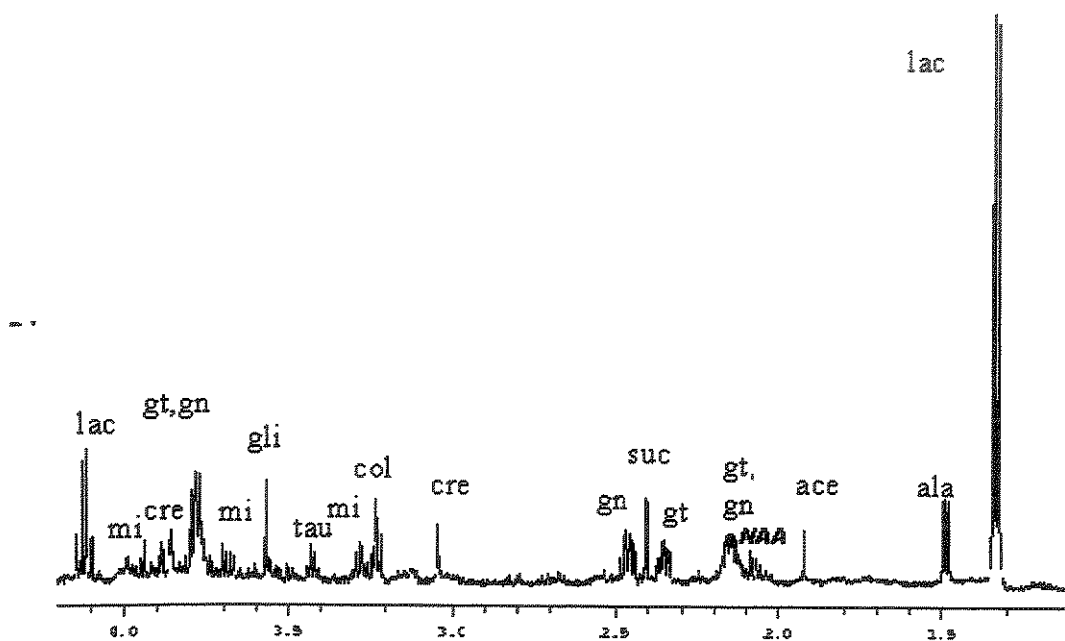


Figura 2.2 - Ampliação do espectro típico de extrato aquoso de um tumor cerebral (RMN de ^1H ; 499,89 MHz). Estão identificados sinais de inositol (mi), glicina (gl), colina (col), creatina (cre), glutamina (gn), glutamato (gt), *N*-acetil aspartato (NAA), taurina (tau), succinato (suc), acetato (ace), alanina (ala) e lactato (lac).

Recentemente investigações de extratos de tecidos por RMN de alta resolução têm apresentado resultados promissores na detecção de alterações metabólicas e rotas bioquímicas decorrentes de patologias.

³ Nafe, R.; Herminghaus, S.; Raab, P. et al. *J Neurooncol*, 2003, 63 (3), 233-45.

Embora alguns fatores, como uso de anestésicos e a isquemia do tecido decorrente da ressecção, promovam pequenas alterações nos níveis de alguns compostos, existe uma boa correlação entre os resultados obtidos por RMN *in vivo* e *in vitro*⁴, permitindo a complementaridade entre os dois métodos.

⁴ A) Gill, S. S.; Thomas, D. G. T.; Van Bruggen, N. *et al. J Comput Assist Tomogr*, 1990, 14 (4), 497-504; b) Kugel H.; Heindel W.; Ernestus R. I.; Bunke J.; Mesnil R.; Friedmann G. *Radiology*, 1992, 183, 701-9 c) Pelling, J.; Sutherland, G. *Neurology*, 1993, 43 (3), 589-94; d) Kinoshita, Y.; Kajiware, H.; Yokota, A.; Koga, Y. *Neurosurgery*, 1994, 5 (4), 606-14; e) Rutter, A.; Hugenholtz, H.; Saundres, J. K.; Smith, I. C. *J Neurochem*, 1995, 64, 1655-61; f) Preul, M. C.; Carmanos, Z.; Collins, D. L. *et al. Nat Med*, 1996, 2, 323-325.

2.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

No metabolismo cerebral normal, o consumo de energia está estreitamente relacionado à atividade neuronal. A RMN de ^1H clínica fornece informações sobre o equilíbrio entre o consumo da glicose e oxigênio, sobre a atividade celular e ainda sobre produtos intermediários e finais de cadeias como a glicólise, o ciclo de Krebs e a fosforilação oxidativa, o metabolismo de lipídeos e o anabolismo e o catabolismo de aminoácidos⁵.

As células da glia e seus grandes subgrupos, os astrócitos (células de suporte onde ocorrem inúmeras reações metabólicas para manutenção do balanço energético e movimento de fluidos), os oligodendrócitos (responsáveis pela produção e manutenção da mielina), a micróglia (que funciona como macrófagos fixos do SNC), além de inúmeras outras variações, mostram alto grau de especialização de tipos celulares no cérebro. A presença de células especializadas com funções variadas implica na predominância de determinadas reações metabólicas.

Assim, o conhecimento do papel que cada um dos metabólitos detectados pela RMN desempenha no metabolismo celular normal e tumoral é de suma importância na análise clínica do exame e no entendimento das informações sobre o micro-ambiente em que os tumores se perpetuam.

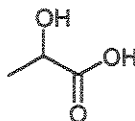
Os metabólitos clinicamente significativos mais estudados são o *N*-acetil aspartato, a colina, a creatina, o lactato, o inositol, o glutamato, a glutamina e a glicina⁶. A importância das alterações dos níveis de cada uma

⁵ Leach, M.; Moyec, L.; Podo, F. MRS of tumours: basic principles. In: *Magnetic resonance spectroscopy in biology and medicine*. Oxford: Pergamon Press, 1992. p. 295-345.

⁶ Castillo, M.; Kwok, L.; Mukherji, S. K. *Am J Neuroradiol*, 1996, 17, 1-15.

destas substâncias pode ser compreendida através do conhecimento de seu papel no metabolismo cerebral.

Lactato



O lactato e o piruvato são os principais produtos da glicólise e são usados como substratos para a produção de energia no cérebro, como provam estudos com culturas de células⁷.

O espectro de RMN de ¹H *in vivo* do lactato apresenta um sinal em 1,3 ppm cuja inversão de fase através da alteração do tempo de eco (TE) fornece a sua confirmação. O outro sinal esperado para o hidrogênio carbinólico em 4,1 ppm, na RMN de ¹H *in vivo* encontra-se afetado pela supressão da água.

Normalmente, o sinal do lactato no cérebro normal é pouco intenso, equivalente a 0,5 a 1 mMol/L, dependendo do estágio de ativação do tecido cerebral normal⁸.

O aumento do sinal do lactato geralmente indica uma falha do mecanismo normal de respiração oxidativa e ativação do catabolismo de carboidratos⁹. É um dos metabólitos mais freqüentes nos tumores e, muitas vezes, considerado marcador de agressividade tumoral, um reflexo das altas taxas de glicólise presente nas neoplasias¹⁰. No entanto, a presença de lactato é inespecífica¹¹ e ocorre também em tumores de baixa agressividade¹² e em

⁷ Schurr, A.; Miller, J. J.; Payne, R. S.; Rigor, B. M. *J. Neurosci*, **1999**, *19*, 34-35.

⁸ Merboldt, K. D.; Bruhn, H.; Hanke, W.; Michaelis, T.; Frahm, J. *Magn Reson Med* **1992**, *25*, 187-194.

⁹ Orrison, W. W.; Lewine, J. D.; Sanders, J. A.; Hartshorne M. F. *Functional Brain Imaging*. St.Louis: Mosby, **1995**. p. 419-467.

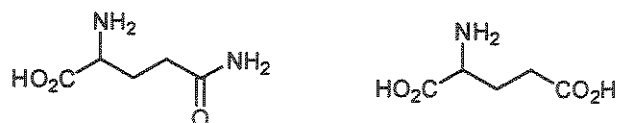
¹⁰ Small, R. T.; Thomas, D. G. T. *et al. NMR Biomed*, **1989**, *2*, 196-200.

¹¹ Stanley, J.A.; Cendes, F.; Dubeau, F.; Andermann, F.; Arnold, D. L. *Epilepsia*, **1998**, *39* (3), 267-73.

¹² Sutton, L.N.; Wang, Z.; Gusnardi, D. *et al. Neurosurgery*, **1992**, *31*, 195-201.

lesões de etiologia não neoplásica. Além disso, a contribuição do lactato proveniente de distúrbios isquêmicos da micro-circulação, causados pelo edema e efeito de massa dos tumores, impede relações diretas entre acúmulo de lactato e malignidade tumoral. Apesar destas limitações, o lactato é um indicador indireto da agressividade tumoral já que pode refletir necrose¹³.

Glutamina e glutamato



O glutamato é um neurotransmissor excitatório e desempenha funções importantes no metabolismo mitocondrial¹⁴. O excesso de glutamato é convertido em glutamina, evitando sua decomposição em amônia. A glutamina por sua vez pode ser captada pelo neurônio pré-sináptico para a nova produção de glutamato, completando o ciclo¹⁵. O ácido γ-amino butírico (GABA) é um importante produto do glutamato.

As concentrações de glutamato são de 8,1 mMol/Kg na substância branca, 12,5 mMol/Kg na cinzenta e 9,5 mMol/Kg no cerebelo¹⁶. As concentrações *in vitro* variam de 6 a 10,2 mMol/Kg¹⁷, provavelmente em decorrência da pequena queda dos seus níveis que ocorre imediatamente após a isquemia, durante a coleta do tecido¹⁸. As quantidades de glutamina no córtex representam, no máximo, 20% daquelas de glutamato. Estes dois

¹³ Bendszuz, M.; Warmuth-Metz, M.; Burger, R. *et al. Neuroradiology*, 2001, 43, 285-289.

¹⁴ Van Der Knaap, M. S.; Roos, B.; Valk, J. em: Kucharczyk, J.; Mosely, M.; Barkovich, A. J. *Magnetic resonance neuroimaging* Boca Raton, CRC Press, 1994. p. 245-318.

¹⁵ Maistretti, P. J. *Fundamental Neuroscience - Brain Energy Metabolism*. Second edition. New York: Elsevier Science, 2003. p. 339-60.

¹⁶ Michaelis T.; Merboldt K. D.; Bruhn H.; Hanicke W.; Frahm J. *Radiology*, 1993, 187, 219-27.

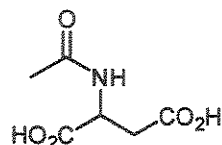
¹⁷ Petroff, A. C.; Spencer, D. D.; Alger, J. R.; Prichard, J. W. *Neurology*, 1989, 39, 1197-202.

¹⁸ Perry, T. L.; Hansen, S.; Gandhan, S. S. *J. Neurich*, 1981, 36 (2), 406-12.

metabólitos apresentam-se sobrepostos e são representados por um único sinal, *in vivo*, entre 2,1 e 2,5 ppm.

Em situações hiper-metabólicas, como nos tumores e focos epiléticos, é observado aumento dos níveis de glutamato e diminuição do GABA¹⁹.

N-acetil aspartato



A hidrólise do N-acetil aspartil glutamato na mitocôndria dos neurônios dá origem ao glutamato e ao NAA cuja hidrólise, por sua vez, fornece o aspartato, outro aminoácido excitatório. O NAA é considerado como marcador neuronal²⁰ embora suas funções biológicas ainda não sejam totalmente conhecidas. Sugere-se, ainda que o NAA desempenhe funções na síntese de neuropeptídeos²¹ ou que atue no equilíbrio osmótico como ânion orgânico nos neurônios²².

O sinal mais intenso do NAA na RMN de ¹H consiste no singlete em 2,0 ppm atribuído às metilas dos grupos N-acetil. Suas concentrações são de 2 a 3 vezes maiores que as de aspartato e distintas dos seus níveis séricos, graças à permeabilidade específica da barreira hemato-encefálica. *In vivo*, sua concentração encontra-se em torno de 11,4 mMol/Kg, com pouca variabilidade regional¹⁶. *In vitro*, a concentração de NAA é relativamente menor devido a decomposição parcial durante o tempo entre a coleta do material e seu congelamento e a hidrólise de grupos N-acetil durante o processo de extração em meio ácido^{4a}.

¹⁹ Petroff, O. A. C.; Pleban, L. A.; Spencer, D. D. *Magn Reson Imaging*, 1993, 13 (8), 1197-211.

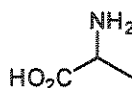
²⁰ Series, W.; Li, L. M.; Antel, S. B. *et al. Epilepsia*, 2001, 42 (2), 190-7.

²¹ Reichelt, K. L.; Kvamme, E. *J Neurochem*, 1973, 21, 849-59.

²² Macintosh, J. C.; Cooper, J. R. *J Neurochem*, 1965, 12, 825-835.

Sua concentração diminui em diferentes tipos de insulto cerebral²³. Um dos aspectos mais marcantes nos tumores é a queda da amplitude do sinal de NAA²⁴, refletindo a perda ou disfunção neuronal das regiões acometidas. Em estudos com modelos de tumores em ratos, a queda dos níveis de NAA é a primeira alteração que se observa após o implante tumoral (terceiro dia)²⁵. Nos tumores de origem neuronal e mista (neuroglial), baixa intensidade do sinal de NAA pode indicar não necessariamente a perda neuronal, mas que os neurônios tumorais não são suficientemente maduros para produzi-lo em níveis normais²⁶. Nos tumores de origem não-neuroglial, o NAA está ausente, provavelmente pela ausência de neurônios²⁷.

Alanina



A alanina é um metabólito não essencial de função biológica incerta. Seu pico ocorre entre 1,3 e 1,4 ppm e muitas vezes é obscurecido pela sobreposição ao do lactato. As concentrações *in vitro* são discretamente maiores que *in vivo* (0,3-0,8 mMol/Kg)²⁸.

Os níveis de aminoácidos como a alanina e o aspartato, sintetizados a partir da glicose apresentam-se aumentados em gliomas, meningiomas e adenomas^{4d}. Além disso, sua concentração é três vezes maior em células

²³ Tasch, E.; Cendes, F.; Li, L. M.; Andreemann, F.; Arnold, D. L. *Ann Neurol*, 1999, 45 (5), 568-76; b) Duzel, E.; Kaufmann, J.; Guderian, S. *et al. Eur J Neurol*, 2004, 11 (3), 195-205.

²⁴ Usenius, J. P. R.; Kauppinen, R. A.; Vainio, P. A. *et al. J Comput Assist Tomogr*, 1994, 18 (5), 705-713; b) Henriksen, O. *NMR Biomed*, 1995, 8, 139-148; c) Girard, N.; Wang, Z.J.; Erbetta, A. *et al. Neuroradiology*, 1998, 40, 121-125; d) Law, M.; Yang, S.; Wang, H. *et al. Am J Neuroradiol*, 2003, 24 (10), 1989-98; e) Rijpkema, M.; Schuurink, J.; Van Der Meulen, Y. *et al. NMR Biomed*, 2003, 16 (1), 12-8; f) Li, X.; Jin, H.; Lu, Y.; Oh, J.; Chang, S.; Nelson, S. J. *NMR Biomed*, 2004, 17 (1), 10-20.

²⁵ Gill, M.; Miller, S. L.; Evans, D. *et al. Invest Radiol*, 1994, 29, 301-6.

²⁶ Moller-Hartmann, W.; Krings, T.; Brunn, A.; Korinth, M.; Thron, A. *Neuroradiology*, 2002, 44 (3), 230-4.

²⁷ Howe, F. A.; Bartn, S. J.; Cudlip, S. A. *et al. Magn Reson Med*, 2003, 49 (2), 223-232.

²⁸ Peeling, J.; Sutherland G. *Magn Reson Med*, 1989, 24, 123-136.

meníngeas que nos neurônios, o que deve ser a causa de seus elevados níveis nos meningeomas³¹.

Glicina



A glicina é um aminoácido neurotransmissor excitatório e é detectada pela RMN de ^1H *in vivo* com o uso de baixos TEs, em concentrações de aproximadamente 1 mMol/Kg. Nos primeiros segundos após a ressecção tecidual ocorre uma discreta queda dos níveis de glicina¹⁸.

O singlete 3,6 ppm atribuído ao metileno da glicina encontra-se normalmente sobreposto a sinal do inositol. Assim, a discriminação entre estes dois metabólitos é problemática e a maioria dos autores considera, nos estudos clínicos, o sinal composto. O aumento das concentrações de glicina foi observado em diferentes distúrbios cerebrais como em casos de hiperglicemia²⁹, infarto cerebral, meningoencefalite, coreia de Huntington, migrânea, Parkinson e doença de Alzheimer, possivelmente refletindo lesão excitatória³⁰.

A oligodendroglia é o tipo celular mais rico em glicina, o que pode contribuir para os seus elevados teores nos tumores com esta origem celular³¹. Aumento da glicina foi relatado ainda em extratos de gliomas, variando com a malignidade tumoral.

²⁹ Gyngell, M. L.; Michaelis, T.; Horstmann, D. *et al. Magn Res Méd*, 1991, 19, 489-95.

³⁰ Sener, R.N. *Comput Med Imag Graph*, 2003, 27 (4), 297-305.

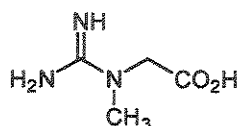
³¹ Urenjak, J.; Williams, S. R.; Gadian, D. G.; Noble, M. *J Neurosci*, 1993, 13, 981-9.

Taurina



A taurina é um metabólito que apresenta concentrações por volta de 1,2 a 1,5 mMol/Kg *in vitro* e seus grupos metílenos ligados ao nitrogênio e ao enxofre produzem um pequeno sinal *in vivo*¹⁶. Grandes quantidades de taurina são detectadas na retina. Assim, a similaridade entre o meduloblastoma e retinoblastoma pode explicar as altas concentrações de taurina nestes dois tumores^{4d}. Outras neoplasias mostram aumento dos níveis de taurina, como tumores de rim e cólon³².

Creatina



O sinal de RMN de ¹H mais intenso da creatina consiste no singlete em δ 3,0 (3H) e aparece sobreposto ao da fosfocreatina. Este sinal apresenta ainda contribuições, em menor escala, do ácido alfa amino butírico, da lisina e glutatona. O sinal do metileno da creatina pode ser observado em 3,9 ppm.

As concentrações de creatina refletem o funcionamento das mitocôndrias neuronais e gliais (onde é sintetizada) e o suprimento energético de neurônios e oligodendrócitos, responsáveis pelo seu transporte ativo³³. A quantidade de ATP no citoplasma depende do equilíbrio químico da reação PCr (fosfocreatina) + ADP + H⁺ = ATP + Cr (creatina). A fosfocreatina é portanto, uma reserva de fosfatos de alta energia e participa de um sistema tampão entre ADP e ATP. Assim, os níveis de creatina e fosfocreatina, somados, costumam

³² Wilke, M.; Eidenschink A.; Muller-Wehrich, S.; Auer, D. P. *Acta Radiol*, **2001**, 42, 39-42.

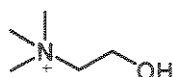
³³ Wyss, M.; Kaddurah-Daouk, R. *Physiol Rev*, **2000**, 80, 1107-1213.

ser constantes³⁴. No entanto, alterações em seus níveis podem ser induzidas por mudanças drásticas de estado energético celular.

As concentrações de creatina variam de 6,1 mMol/Kg (na substância branca), 8,2 mMol/Kg (na substância cinzenta) a 9,1 mMol/Kg no cerebelo¹⁶.

A concentração de creatina total pode ter uma correlação com a atividade tumoral³⁵.

Colina



Mais um exemplo da especialização do metabolismo celular é a produção da mielina pela oligodendroglia. A mielina é uma estrutura rica em lipídeos, com predomínio de colesterol, esfingolipídeos e fosfoglicerolipídeos (fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina). A fosfatidilcolina, juntamente com a fosfocolina, a glicerofosfocolina e a própria colina (precursor da acetilcolina) compõem o sinal de colina na RMN de ¹H *in vivo* em 3,2 ppm. Como constituinte de membrana, o aumento de colina reflete sua síntese e/ou aumento do número de células³⁶. Suas concentrações, *in vivo*, são de 1,4 mmol/Kg na substância cinzenta, 1,8 mMol/Kg na substância branca, 2,5 mMol/Kg no cerebelo e 2,9 mMol/Kg na ponte. *In vitro*, as concentrações são semelhantes, por volta de 1,8 mMol/Kg¹⁷.

Na maioria das neoplasias do SNC os níveis de colina apresentam-se aumentados e foi observada a sua diminuição em resposta ao tratamento, antes mesmo que houvesse modificação no padrão de imagem de RM do tumor³⁷. Já

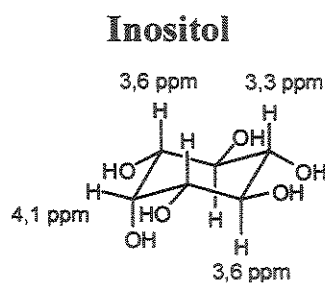
³⁴ Henriksen, O. MRS of brain In: Certaines, J.D.; Bovee, W.M.M.J.; Podo, F. *Magnetic resonance spectroscopy in biology and medicine*. Oxford: Pergamon Press, 1992. p. 31-51.

³⁵ Tzika, A. A.; Vigneron, D. B.; Dunn, R. S.; Nelson, S. L.; Ball, W. S. *Neuroradiology*, 1996, 38, 254-63.

³⁶ Granata, F.; Iorio, E.; Carpinelli, G.; Giannini, M.; Podo, F. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1483 (3), 334-42.

³⁷ Fulhan, M. J.; Bizzi, A.; Dietz, M. J.; *et al.* *Radiology*, 1992, 185, 675-686.

em processos francamente necróticos, ocorre redução ou desaparecimento do sinal de colina. Isto explica a dificuldade em separar os tumores por grau de agressividade tumoral através da colina nos estudos onde áreas necróticas foram incluídas^{4b}.



O inositol (D-inositol ou ainda, mio-inositol) é um metabólito envolvido na neurorecepção hormônio-sensitiva de marcada importância na comunicação bioquímica³⁸. O sinal mais importante do de inositol é observado em 3,6 ppm e, como já foi descrito, sobrepõe-se ao sinal de glicina dependendo do TE utilizado na RMN de ^1H *in vivo*. Suas concentrações variam de 4,7 mMol/kg na substância branca a 6,8 mMol/Kg no cerebelo, *in vivo* e 5,8 a 7 mMol/Kg, *in vitro*¹⁷.

Sua concentração pode estar alterada em tumores malignos pela destruição celular e pela ativação da via sinalizadora pela rápida divisão celular³⁹. Além disso, o inositol é um importante marcador de células gliais.

³⁸ Ceodan, S.; Parrilha, R.; Santoro, J.; Rico, M. *FEBS Lett*, **1995**, *187*, 167-72.

³⁹ Rutkowski, T.; Tarnawski, R.; Sokol, M.; Maciejewski, B. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, **2003**, *56* (5), 1381-9.

2.3 OBJETIVOS

O objetivo deste estudo é investigar extratos aquosos de tumores de cérebro por RMN de ^1H de alta resolução para determinar marcadores químicos capazes de diferenciar o tecido normal do tumoral e aqueles capazes de classificar os tumores quanto ao tipo e grau de agressividade. Além disso, propomos determinar a composição química do tecido com maior precisão buscando identificar possíveis alterações metabólicas associadas a mecanismos de adaptação e sobrevivência de tecidos tumorais.

Este estudo foi realizado em colaboração com o Prof. Fernando Cendes e a doutoranda Andréia Vasconcellos Faria. Esta interação permitiu a correlação entre os resultados de RMN de alta resolução *in vitro* obtidos no IQ-UNICAMP e aqueles obtidos através de imagens e espectros de RMN *in vivo* no Hospital das Clínicas – UNICAMP.

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Foram selecionados pacientes⁴⁰ admitidos no Hospital das Clínicas da UNICAMP cujo diagnóstico de tumor do SNC foi indicado pelo quadro clínico e exames de imagem (tomografia computadorizada e RMI) e, posteriormente, confirmado por análise histopatológica. Foram excluídos aqueles que realizaram radioterapia ou quimioterapia.

Foram analisadas 51 amostras de tecido cerebral, sendo 47 provenientes de pacientes com tumores do SNC e 4 provenientes de pacientes submetidos ao tratamento cirúrgico de epilepsia parcial, que constituíram nosso grupo controle.

Todas as amostras foram divididas em duas partes sendo uma delas encaminhada para análise histopatológica e a outra foi imediatamente congelada em nitrogênio líquido e estocada a -80°C até sua extração. A análise histopatológica dos tumores revelou astrocitoma (graus II e IV) em 13 pacientes, meningioma em 10, metástase em 5 e outros tipos de tumores em 19 pacientes (oligoastrocitoma anaplásico em 3, oligodendroglioma em 2, xantoastrocitoma em 1, neurocitoma em 1, schwanoma em 2, adenoma em 3, meduloblastoma em 2, papiloma em 1, craniofaringeoma em 2 e tumor epidermóide em 2 pacientes).

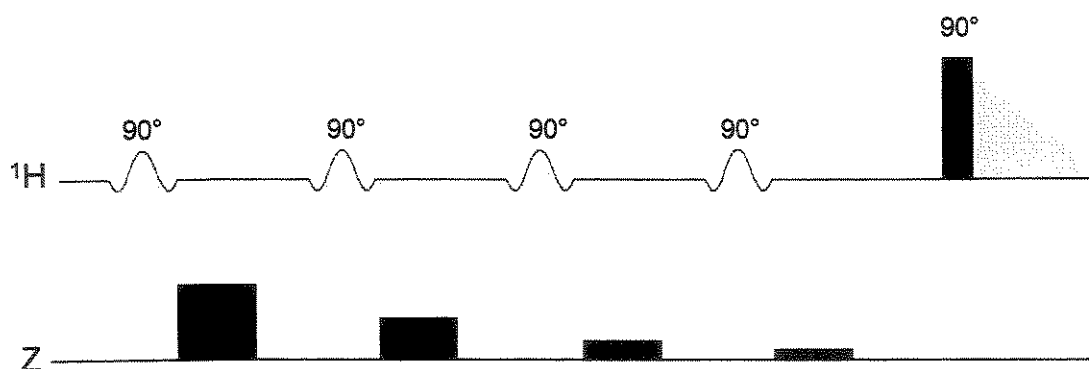
Os extratos aquosos liofilizados de cada amostra foram dissolvidos em D_2O e analisados por RMN de ^1H de alta resolução (499,89 MHz). Como os

⁴⁰ Todos os indivíduos participantes desse estudo foram devidamente esclarecidos quanto às finalidades da pesquisa, através de formulário de consentimento informado. O formulário, assim como este estudo, foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa de Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

espectros obtidos apresentaram um sinal residual do solvente (HDO) bastante intenso decidimos otimizar experimentos para suprimir este sinal.

A pré-irradiação do sinal do solvente com uma radiofrequência de onda contínua seletiva de baixa potência, forneceu bons resultados na supressão do sinal residual de HDO em D₂O. A inclusão de pulsos compostos ("composite pulses") e o ajuste da potência e do tempo de saturação resultou na remoção tanto do sinal residual em amostras em D₂O como do sinal da H₂O em amostras dissolvidas neste solvente.

Outra abordagem avaliada consistiu na utilização de pulsos seletivos ("shaped pulses") de 90°, gerados por uma função de onda, ajustados para a frequência de Larmor dos hidrogênios da água. Em seguida um pulso de gradiente é aplicado perpendicularmente ao plano xy, ou seja, no eixo z para eliminar a coerência dos spins seletivamente excitados (Figura 2.3). Esta técnica se mostrou mais seletiva e, portanto, foi adotada nestes estudos. As Figuras 2.4 e 2.5, os espectros de RMN de ¹H da mesma amostra com e sem supressão mostram a eficiência da sequência wet1d⁴¹ na remoção do sinal residual da água.



⁴¹ Smallcombe, SH; Patt, SL; Keifer, PA *J. Magn. Reson.* 1995, 117, 295

Figura 2.3 - Sequência de pulsos wet1d empregada na supressão do sinal da água.

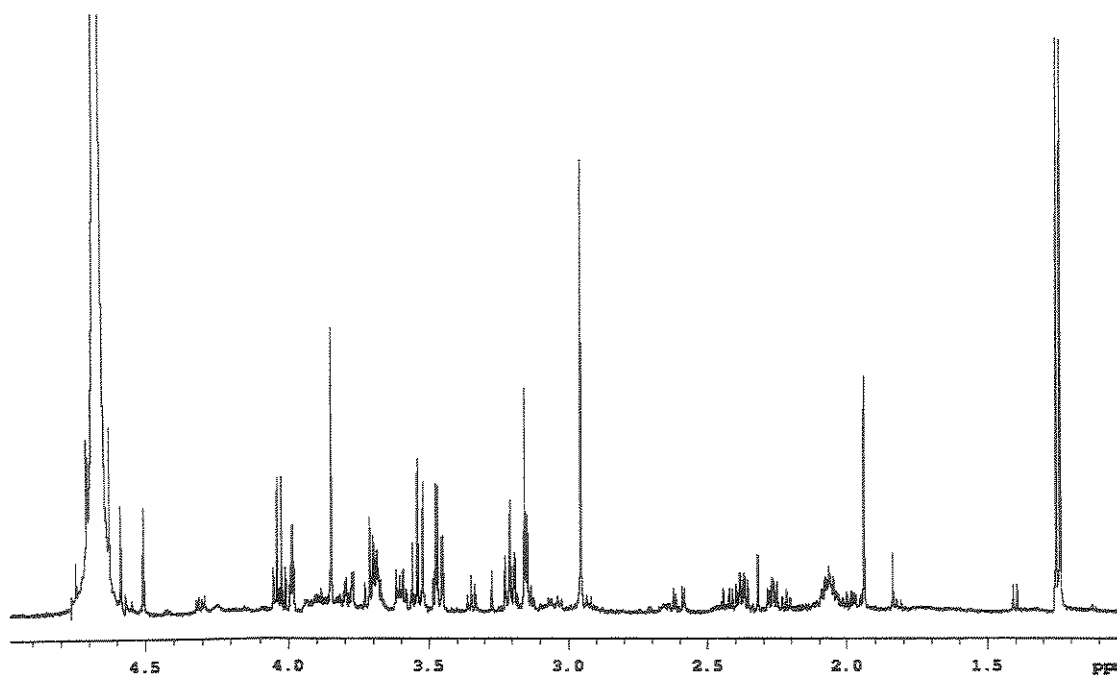


Figura 2.4 - Espectro de RMN de ^1H de extrato aquoso de amostra do grupo controle sem supressão do sinal do solvente (D_2O ; 499,89 MHz).

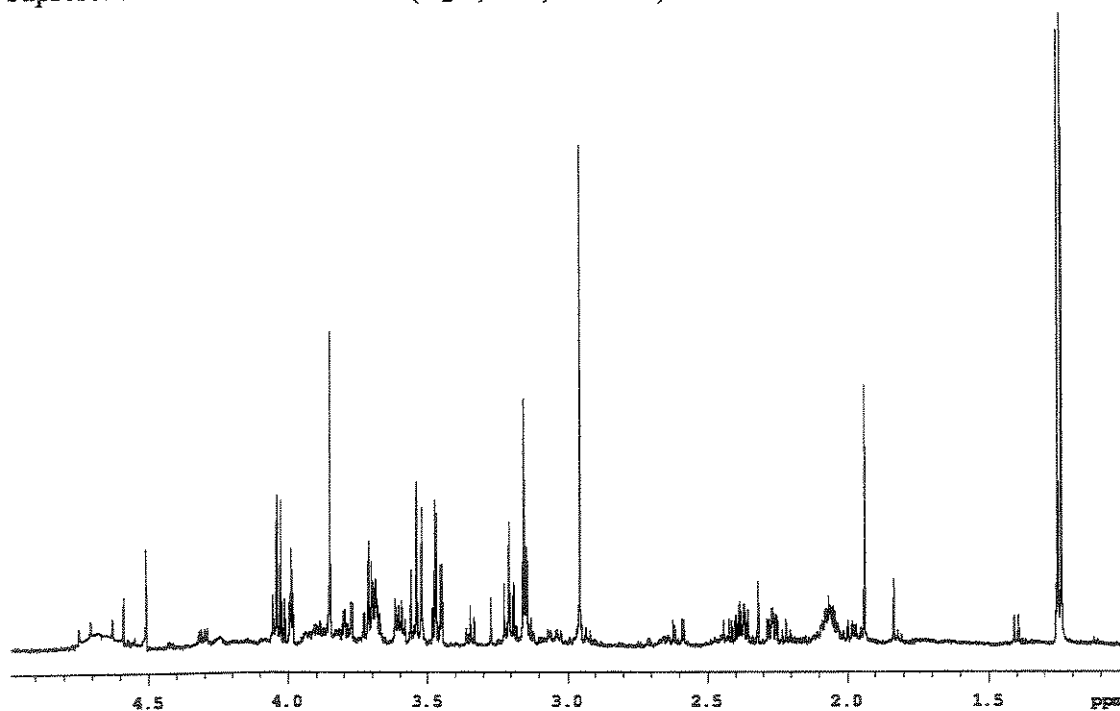


Figura 2.5 - Espectro de RMN de ^1H de extrato aquoso de amostra do grupo controle com supressão do sinal do solvente (sequência wet1d/Varian; D_2O ; 499,89 MHz).

O conjunto de espectros obtido apresenta um grande número de sinais devidos aos vários compostos presentes nas amostras. A medida em que o número de amostras aumenta, a complexidade da análise se torna cada vez maior fazendo dos métodos analíticos computacionais, ferramentas extremamente úteis.

A análise de componentes principais (PCA) é um método simples empregado para estes propósitos, e consistiu no ponto de partida para a análise dos espectros. Assim, PCA foi usado com o conjunto de dados de RMN para identificar os grupos de amostras que apresentam similaridade na distribuição de metabólitos ou na concentração dos mesmos, dada uma determinada composição química. O conceito fundamental do PCA está ilustrado na Figura 2.6, onde as intensidades correspondentes a três picos de RMN para duas amostras estão representadas em um gráfico tridimensional. Neste caso as amostras encontram-se dispersas em um plano no espaço que podem ser descritas por vetores ortogonais (PC1 e PC2). Desta forma, a PCA corresponde à projeção do conjunto de dados no novo conjunto de vetores ortogonais. Estas novas coordenadas são amplamente conhecidas como "scores" e a importância das variáveis originais nos novos vetores são chamadas de pesos ("loadings").

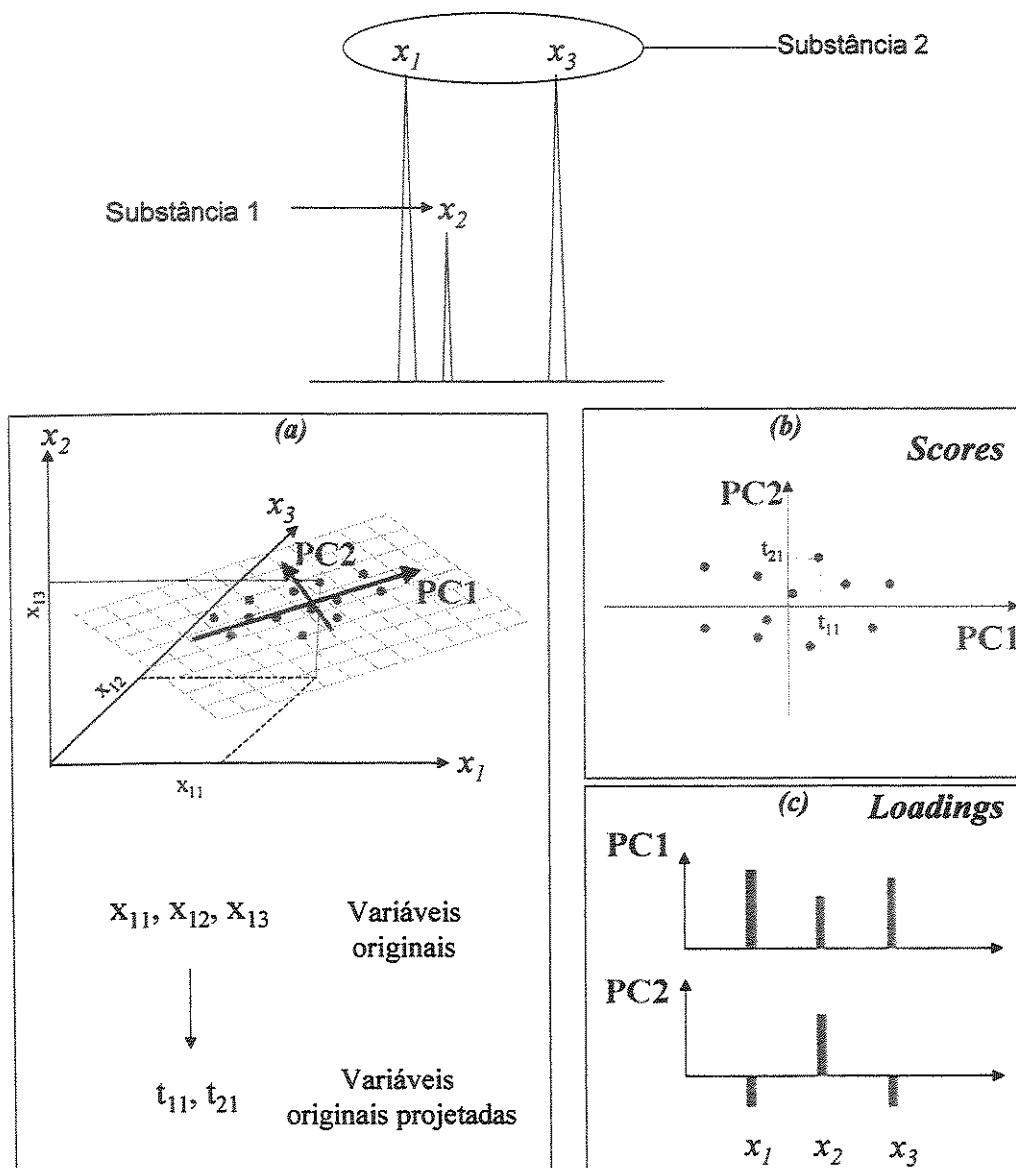


Figura 2.6 - Processo de conversão do sistema de variáveis na representação de amostras hipotéticas apresentando duas substâncias relacionadas a três sinais de RMN.

Cada um dos sinais na Figura 2.7b representa uma ressonância do espectro original. A sua amplitude é proporcional ao seu poder em determinar o agrupamento das classes.

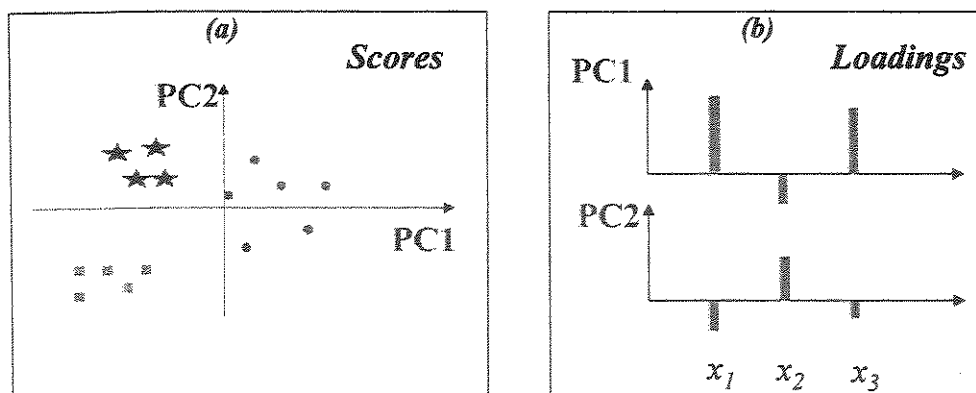


Figura 2.7 - Separação das amostras em três classes diferentes em função da variação das concentrações das duas substâncias que as compõem.

Os pontos dos espectros originais foram submetidos à análise “Wavelet”⁴² seguida de correção da linha de base através da seleção de uma região espectral contendo apenas ruído e a média desta região para cada espectro foi calculada e ajustada para zero. O resultado foi armazenado em uma matriz **X**, em que cada linha corresponde às amplitudes dos picos e cada coluna, à suas ressonâncias em hertz. Numa primeira análise os espectros foram ainda normalizados através da divisão da área de cada pico pela soma das áreas de todos os picos do espectro. No entanto, a utilização de PCA não descreveu a variação das classes de tumores esperada adequadamente. Como mencionado acima, o método PCA apresenta a restrição da ortogonalidade entre as componentes principais e não usa informações sobre as classes das amostras.

A seguir serão discutidos os resultados obtidos através da aplicação do método da análise discriminatória de mínimos quadrados parciais (Partial Least Square Discriminant Analysis - PLS-DA)⁴³ que utiliza vetores com ângulos não restritos. Neste caso, foi construído um modelo baseado na

⁴² Johnstone, I. M.; Silverman, B. W. *J Roy Statist Soc*, 1997, 59; 319-51.

⁴³ Indhal, U. G.; Sahni, N. S.; Kirkhus, B.; Naes, T. *Chemom Intell Lab Sys*, 1999, 49, 19-31; b) ⁷⁵ Lowuerse, D. J.; Tates, A. A.; Smilde, A. K.; Koot, G. L. M.; Berndt, H. *Chemom Intell Lab Sys*, 1999, 46, 197-206.

informação sobre as classes de tumores para ser ajustado pelo método através de minimização. Assim, uma matriz resposta Y de n linhas (correspondentes aos espectros da matriz X) e k colunas (correspondentes aos números das classes de tumores) foi construída da seguinte maneira: seja um espectro de uma determinada linha de X pertencente à classe K . Na linha correspondente de Y , o número 1 foi colocado na coluna de número correspondente à classe K e 0 em todas as demais colunas desta linha. Conseqüentemente, uma matriz B satisfazendo a condição $Y' = XB$ (onde Y' é a matriz minimizada baseada em Y) indica que frequências em B são importantes para discriminar as classes em Y . Nota-se que a intenção aqui não é obter modelos para reconhecimento de padrões, mas sim, encontrar picos e seus compostos correspondentes, responsáveis pelas diferenças entre as classes.

As amostras foram divididas em cinco grupos: controles, metástases, tumores não neurogliais (schwanomas, adenomas, meningiomas e papiloma), tumores neurogliais de alto grau de agressividade (glioblastomas e oligoastrocitomas anaplásicos) e neurogliais de baixo grau de agressividade (astrocitomas e oligodendrogliomas) de acordo com a tabela abaixo.

Tabela 2.1 - Classes das amostras analisadas

Grupos		Número de pacientes
I Tumores neurogliais de alto grau	Astrocitomas de grau 2	10
	Oligoastrocitomas anaplásicos	3
II Tumores neurogliais de baixo grau	Astrocitomas de grau 4	3
	Oligoastrocitomas	2
III Tumores não neurogliais	Meningeomas	10
	Schwanomas	2
	Adenomas	3
	Papiloma	1
IV Metástases		5
V Controles		4

A confiabilidade dos resultados obtidos⁴⁴ foi indicada (Figura 2.8) em uma primeira análise envolvendo os grupos I, II, III e V com os espectros normalizados. A separação entre os grupos controle e tumorais nesta análise ocorreu devido a altas concentrações de colina e lactato nos tumores e baixas

⁴⁴ Durante a análise dos dados foram observados pequenos deslocamentos químicos devido a mínimas variações de pH nas amostras. Porém, estes deslocamentos não prejudicaram a identificação dos metabólitos responsáveis pela discriminação entre os grupos.

de creatina e NAA, confirmando estudos prévios⁴⁵, realizados *in vivo* e *in vitro*.

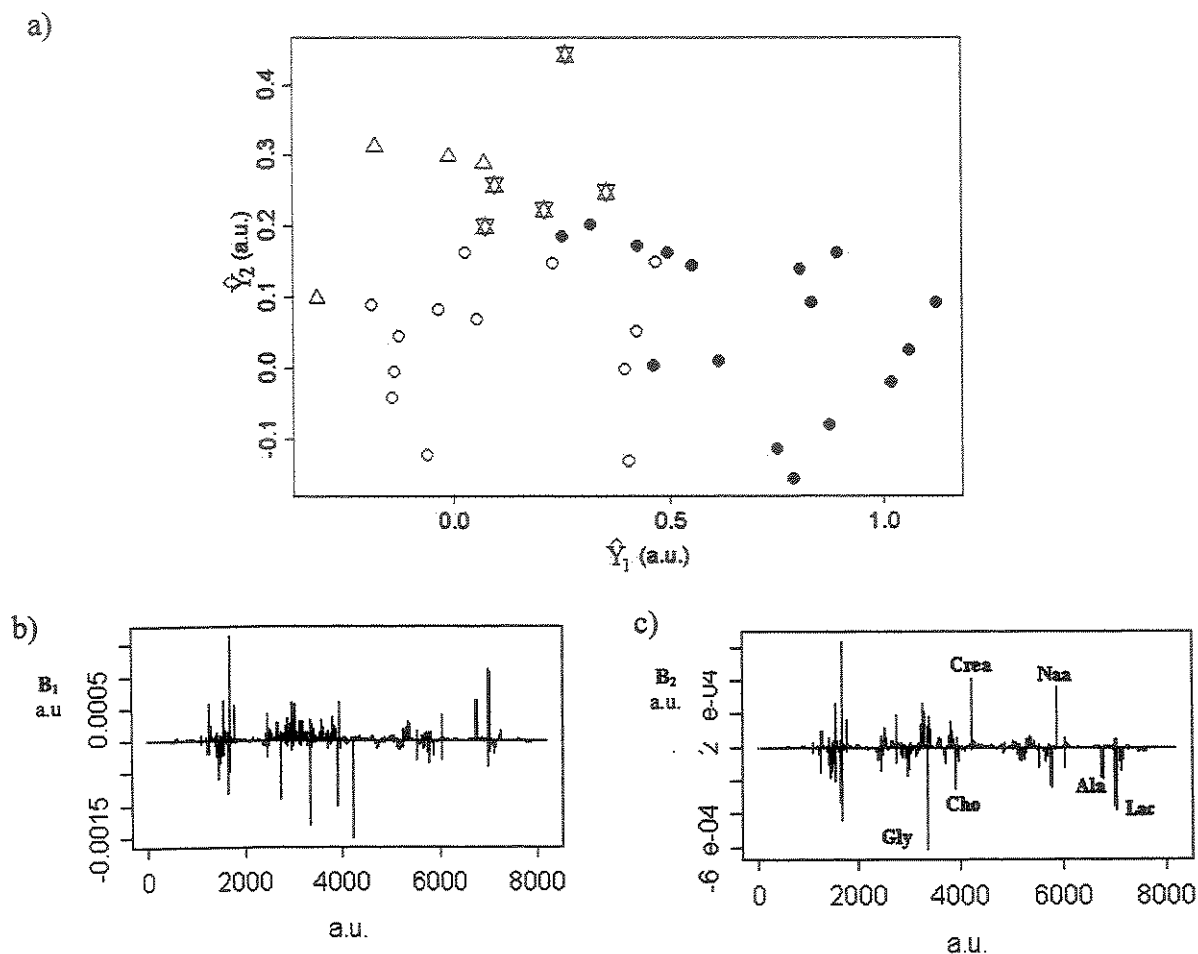


Figura 2.8 - a) Gráfico representando o resultado da análise discriminatória comparando tumores neurogliais de alto grau (círculos abertos '○'), tumores não-neurogliais (círculos cheios '●'), tumores neurogliais de baixo grau (estrelas '✱') e controles (triângulos 'Δ'). $\hat{Y}$ se refere a $\hat{Y}$ minimizado e o subscrito se refere ao número da coluna; b) e c) Coeficientes de regressão da matriz $\mathbf{B}$ responsáveis pela discriminação entre as classes. a.u.: "arbitrary unit".

⁴⁵ a) Mostert, H. W.; Oth, N. J.; Rhijnsburger, E. H.; Mackay, W. M.; Van Den Berge, J. H.; Stefanko, S. Z. *Acta Neuropathologica*, **1986**, 70, 296-301. b) Luyten, P. R.; Marien, A. J. H.; Heindel, W. Et al. *Radiology*, **1990**, 176, 791-799. c) Krumschnabel, G.; Schwarzbaum, P. J.; Lisch, J.; Biasi, C.; Wieser, W. *J Exp Biol*, **2000**, 203: 951-9.

Neste caso, os sinais determinantes do agrupamento das classes foram os de creatina (Crea), NAA, glicina (Gly), colina (Cho), alanina (Ala) e lactato (Lac). Amostras localizadas na região superior da Figura 2.8a (em sua maioria, controles e tumores neurogliais de baixo grau) foram assim dispostas por apresentarem maiores concentrações de creatina e NAA e aquelas localizadas na metade inferior, apresentaram as maiores concentrações de glicina, colina, alanina e lactato. As altas taxas de glicina foram imprescindíveis para o agrupamento dos tumores neurogliais de alto grau no quadrante inferior esquerdo e maiores níveis de alanina foram importantes no agrupamento dos tumores não neurogliais (predominantemente compostos por meningeomas) no quadrante inferior. Como foi visto na seção 2.2, as alterações nos níveis destes metabólitos tem sido relatadas e interpretadas com base em alterações do metabolismo energético, no alto turnover e destruição das células tumorais.

A análise discutida acima foi realizada com os espectros não normalizados exacerbando a importância das concentrações dos compostos. Portanto, uma análise adicional com os espectros normalizados de forma a favorecer o agrupamento de amostras em função de quantidades similares de um dado composto, não importando se a quantidade do mesmo é pequeno comparado aos demais.

A Figura 2.9 mostra a PLS-DA dos grupos, não neurogliais, neurogliais de alto grau e neuroglial de baixo grau. A análise comparativa entre os estes dois últimos grupos permitiu o estudo das alterações bioquímicas segundo o grau de agressividade dentro do espectro de malignidade. Como pode ser observado, os tumores neurogliais de alto grau apresentaram altas razões glicina/inositol, quando comparadas aos tumores neurogliais de baixo grau.

Neste caso, os sinais determinantes do agrupamento das classes foram os de glicina, inositol e acetato. As amostras localizadas no quadrante superior esquerdo da Figura 2.9a (tumores neuroglicais de alto grau) apresentaram as maiores concentrações de glicina e menores de inositol.

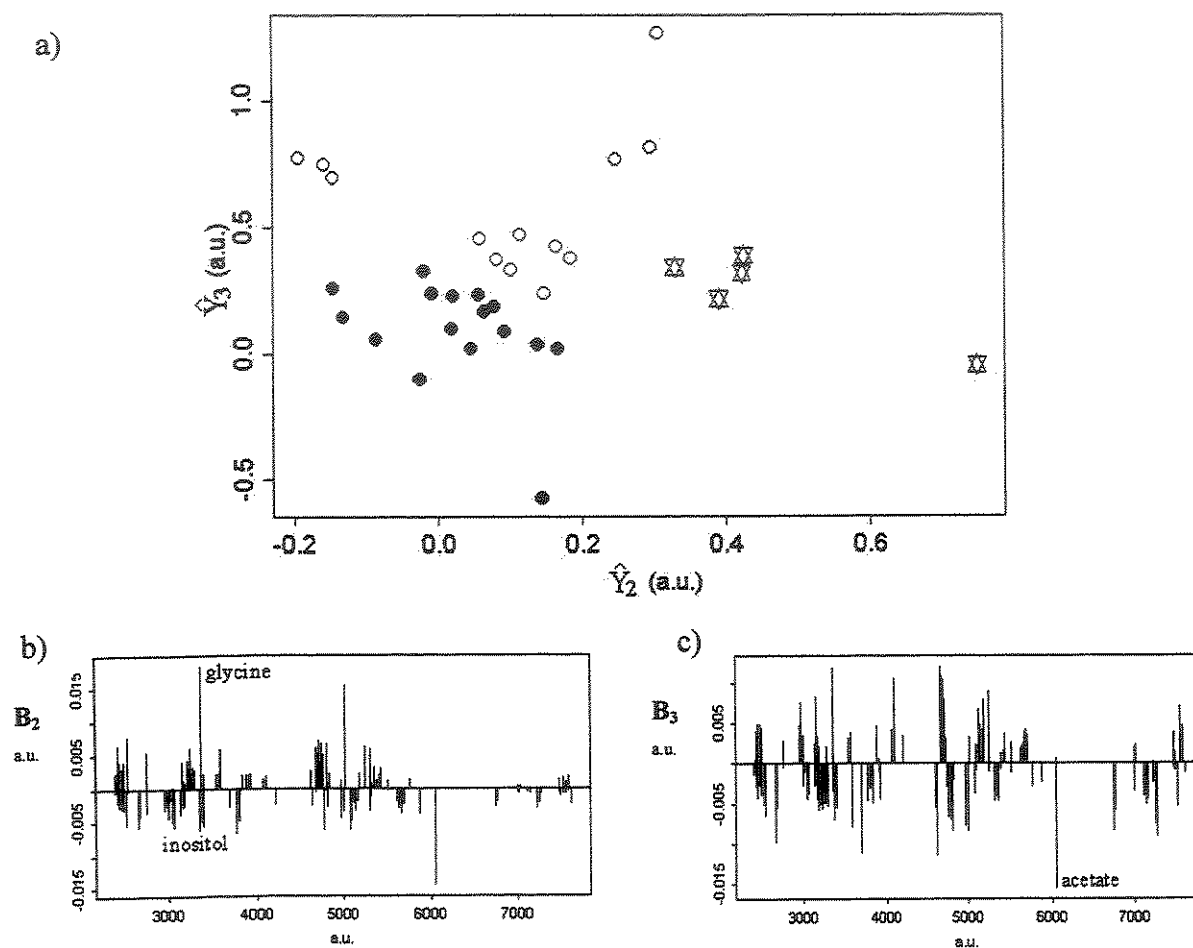


Figura 2.9 - a) Gráfico representando o resultado da análise discriminatória comparando tumores neuroglicais de alto grau (círculos abertos 'o'); tumores não-neuroglicais (círculos cheios '•') e tumores neuroglicais de baixo grau (estrelas '*'). $\hat{Y}$ se refere a Y minimizado e o subscrito se refere ao número da coluna; b) e c) Coeficiente de regressão da matriz B responsáveis pela discriminação entre as classes. a.u.: "arbitrary unit".

Análise independente foi feita com os espectros originais confirmou o aumento da razão glicina/inositol nos tumores neurogliciais de alto grau (Figura 2.10)

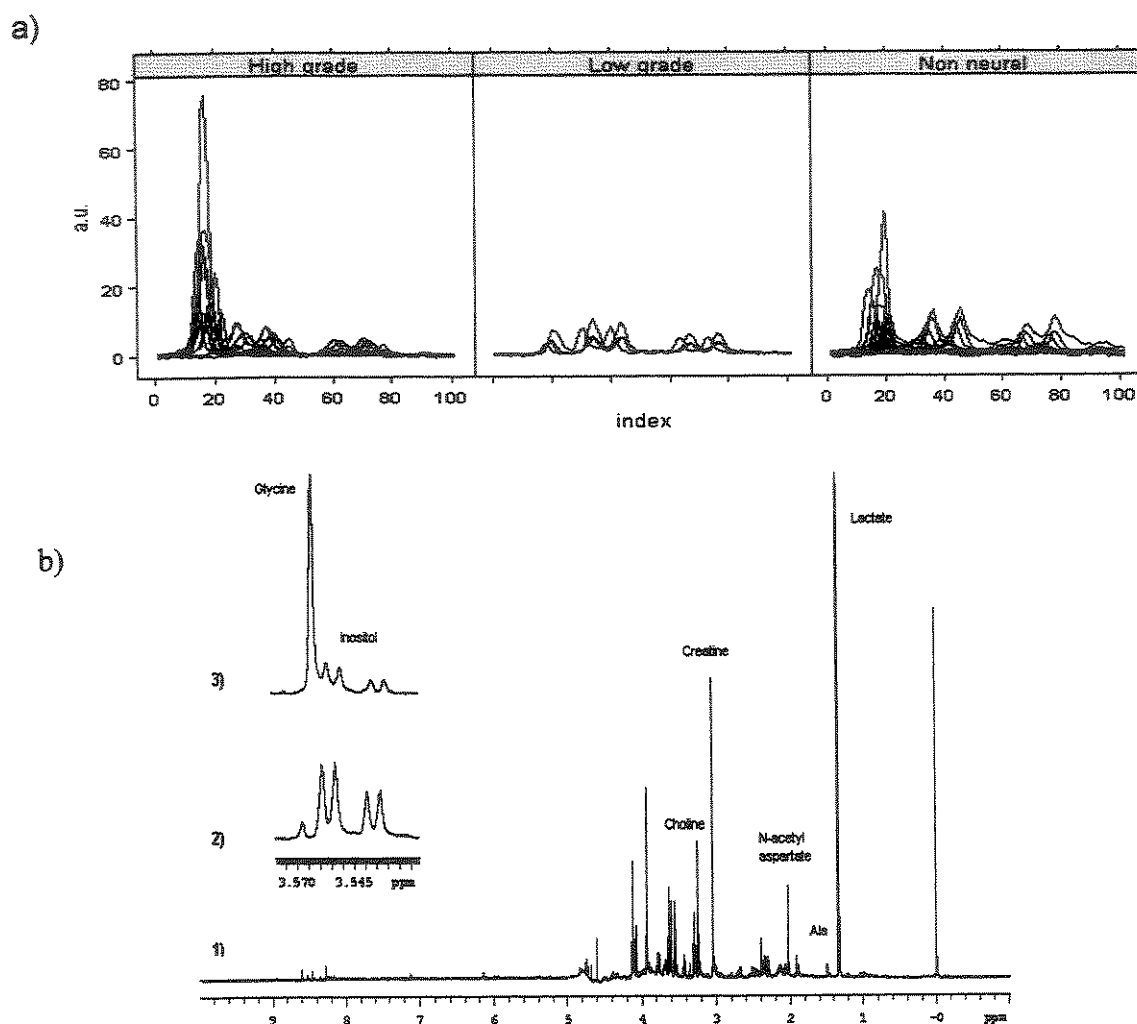


Figura 2.10 - a) Sobreposição de ampliações da região entre 3,50 – 3,60 ppm dos espectros originais de extratos de tumores neurogliciais de alto grau (high grade), de baixo grau (low grade) e não neurogliciais (non neural); b) Espectro inteiro típico (1) e ampliações da região entre 3,50 – 3,60 ppm de uma amostra de astrocitoma de baixo grau (2) e de um glioblastoma (3).

Além disso, a inclusão do grupo das metástases na análise com os espectros originais revelou que concentrações muito baixas de inositol são responsáveis pela discriminação das metástases de tumores neurogliciais de alto e de baixo grau e do grupo controle (Figura 2.11). Como pode ser observado, os sinais de inositol nas metástases apresentaram-se praticamente indistinguíveis da linha de base.

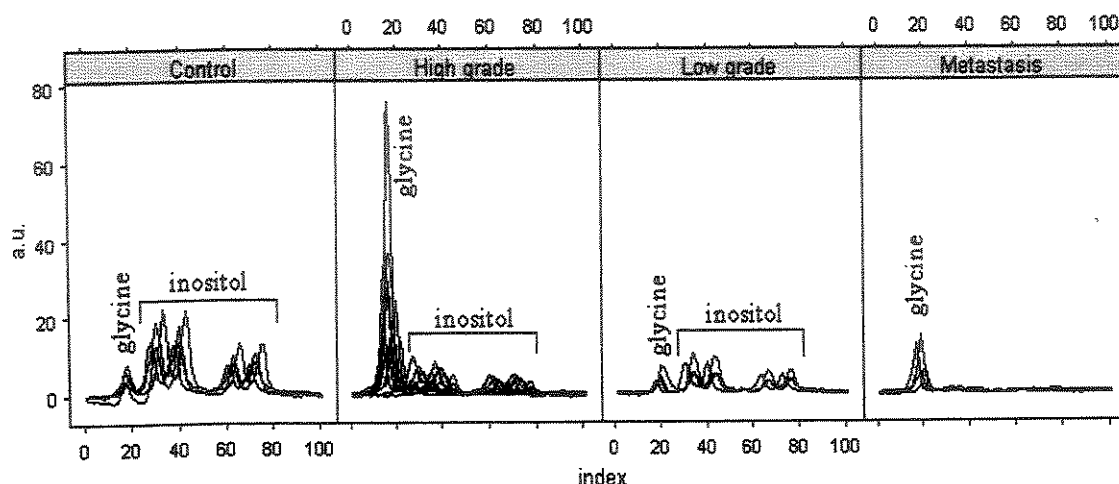


Figura 2.11 - Sobreposições de ampliações da região entre 3,50 – 3,60 ppm de espectros originais de extratos de controles (control), tumores neurogliciais de alto grau (high grade), de baixo grau (low grade) e metástases (metastasis).

As razões glicina/inositol foram responsáveis pela classificação dos tumores de acordo com o grau de agressividade.

A glicina é um substrato indireto do ciclo de Krebs⁴⁶ e a variação em suas concentrações pode refletir alterações no metabolismo energético tumoral. Estudos clássicos demonstraram que a grande maioria de tumores em animais desvia seu metabolismo para vias anaeróbicas, como a glicólise, uma

⁴⁶ Gilham, B.; Papachristodoulou, D. K.; Thomas, J. H. In: Wills. *Biochemical basis of medicine. Third edition.* Oxford: Butterworth Heinemann, 1997. p. 57-60

observação que vem sendo repetidamente confirmada⁴⁷, inclusive em culturas de células gliais⁴⁸. Assim, a depressão da via aeróbica poderá resultar no aumento da glicina. Além disso, mesmo quando o ciclo de Krebs ocorre, a célula tumoral tende a utilizar substratos alternativos como glutamato, glutamina e GABA, resultando assim, num acúmulo de substratos clássicos como a glicina⁴⁸.

A capacidade de sobreviver em meios adversos (como os estresses osmótico e hipóxico) e seus mecanismos de evitar apoptose são características particularmente importantes da célula tumoral. Assim, as variações bioquímicas encontradas podem ser interpretadas, alternativamente, com base em alterações em vias metabólicas que participam ou são consequência do estabelecimento e manutenção tumoral.

Foi verificado que células indiferenciadas de tumor de cólon apresentam taxas reduzidas de inositol contrastando com as células diferenciadas do mesmo tumor⁴⁹. Além disso, inositol é capaz de reverter a inibição da diferenciação causada por antígenos carcinogênicos em células epiteliais⁵⁰ e de aumentar as taxas de apoptose nas células hepáticas⁵¹. Assim, a redução de inositol nas metástases pode estar relacionada com a disfunção apoptótica e indiferenciação.

A glicina ao contrário previne a morte celular⁵². Assim como outros aminoácidos, a glicina parece proteger as células submetidas a estresse

⁴⁷ Dang, C. V.; Semenza, G. L. *TIBS*, 1999, 24, 68-72.

⁴⁸ a) Portais, J.C.; Pianet, I.; Allard, M. *et al. Biochimie*, 1991, 73 (1), 93-7. b) Pascual, J. M.; Carceller, F.; Roda, J. M.; Cerdan, S. *Stroke*, 1998, 29, 1048-56.

⁴⁹ Galons, J. P.; Fantini, J.; Vion-Dury, J.; Cozzoni, P. J.; Canioni, P. *Biochimie*, 1989, 71 (8), 949-61.

⁵⁰ Jyonouchi, H.; Sun, S.; Iijima, K.; Wang, M.; Hecht, S. S. *Carcinogenesis*, 1999, 20, 139-45.

⁵¹ Lee, Y. I.; Kang-Park, S.; Do, S. I.; Lee, Y. I. *J Biol Chem*, 2001, 276, 16969-77.

⁵² Shapiro, A.; Imreh, M.; Leonchiks, A.; Imrek, S.; Masucci, M. G. *Nat Med*, 1998, 4, 939-44. b) Franek, F.; Fismolova, I.; Eckschlager, T. *Arch Biochem Biophys*, 2002, 398, 141-6; c) Moreno-Manazano, V.; Lucio-Cazana, J.; Konta, T.; Nakayama, K.; Kitamura, M. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 277, 293-8; d) Kim, J. S.; Qian, T.; Lemasters J. J. *Gastroenterology*, 2003, 124, 494-503.

nutricional e osmótico⁵³, situações em que células tumorais se encontram constantemente submetidas⁵⁴. A glicina apresenta ainda um papel importante na inibição da autofagia celular mediada pela mitocôndria⁵⁵. Conseqüentemente, o aumento dos níveis de glicina pode relacionar-se a baixas taxas de apoptose e contribuir para a sobrevivência celular em meio adverso.

2.5 CONCLUSÕES

Os resultados demonstram que aumento dos níveis de lactato e colina, e diminuição de creatina e NAA diferenciam tumores e controles normais conforme trabalhos prévios.

Observamos ainda, uma correlação marcante entre a razão glicina/inositol e o grau de agressividade em tumores neurogliais. A diferenciação das metástases também foi possível por apresentarem concentrações de inositol muito baixas comparadas aos tumores primários.

Sob o ponto de vista diagnóstico a determinação destas correlações através de RMN de ¹H *in vitro* permite a otimização dos parâmetros da RMN de ¹H *in vivo*, como por exemplo, o uso de menores tempos de eco para melhor resolução dos sinais de glicina e inositol na suspeita de astrocitomas ou metástases.

Além disso, estes resultados fornecem uma interpretação alternativa acerca das bases bioquímicas das alterações metabólicas em tumores,

⁵³ Dezengotita, V. M.; Abston, L. R.; Schmelzer, A. E.; Shaw, S.; Miller, W. M. *Biotechnol Bioeng*, **2002**, *78*, 741-52.

⁵⁴ Tuz, K.; Ordaz, B.; Vaca, L.; Quesada, O.; Pasantes-Morales, H. *J Neurochem*, **2001**, *79*, 143-51.

⁵⁵ Lemasters, J. J.; Qian, T.; He, L. *et al. Antioxid Redox Signal*, **2002**, *4*, 769-81.

refletindo seus mecanismos de perpetuação em meios adversos, sua capacidade anti-apoptótica e indiferenciação celular.

2.6 PARTE EXPERIMENTAL

Os tecidos congelados foram pesados, macerados sob nitrogênio líquido e extraídos com solução aquosa de ácido perclórico gelada (0,3 mol/L; 10:1 volume:peso). As suspensões resultantes foram então centrifugadas (3000 x g, 10 minutos, 0°C). O precipitado foi descartado e os sobrenadantes foram neutralizados (pH ajustados para 7,2) com uma solução aquosa de KOH (1,5 mol/L) e liofilizados. Cinquenta miligramas dos extratos liofilizados foram ressuspensos em 0,6 mL de uma solução de *d*₄-trimetilsililpropionato de sódio (0.625 mmol/L) em D₂O. As suspensões foram sonicadas, centrifugadas (3000 x g, 10 minutos, 25°C) e transferidas tubos de RMN de 5 mm.

Os espectros foram adquiridos em espectrômetro Varian INOVA-500 ($B_0 = 11,7$ T), operando a 499,886 MHz para ¹H, usando sonda tripla de ressonância (H, C, N) de 5 mm. Cada experimento foi adquirido com 128 acumulações a 25° C. O sinal residual da água foi suprimido usando pulso seletivo de 90°, seguido por gradiente de campo pulsado no eixo z (wet 1d). Os deslocamentos químicos foram expressos em ppm e referenciados em relação ao *d*₄-trimetilsililpropionato de sódio calibrado para 0 ppm.

Toda análise computacional foi realizada com o programa 'R' (www.r-project.org), contendo o pacote Wavetresh para efetuar a análise wavelet.

3 - ANEXOS

Terreinol—a novel metabolite from *Aspergillus terreus*: structure and ^{13}C labeling[☆]

Fernando C. Macedo, Jr., André L. M. Porto and Anita J. Marsaioli*

Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, CP 6154, Campinas 13084-971, SP, Brazil

Received 29 September 2003; revised 20 October 2003; accepted 22 October 2003

Abstract—A novel metabolite from *Aspergillus terreus*, named terreinol, was isolated and its biosynthetic origin was determined by NMR based on the incorporation of $[1-^{13}\text{C}]\text{-D-glucose}$. The labeling pattern indicated a predominant polyketide biosynthetic origin for this metabolite.

© 2003 Published by Elsevier Ltd.

1. Introduction

Fungi are accomplished chemists that produce a wide range of complex organic molecules with important applications in the pharmaceutical industry. The biological properties of these compounds and the availability of ^{13}C labeling make fungal metabolites good candidates for studying biosynthetic pathways exploitations using NMR.¹

The fungus *Aspergillus terreus* has a worldwide distribution in different soils. This microorganism produces lovastatin (mevinolin), a natural product used as a cholesterol lowering agent² and several other metabolites such as terrein³ 2 and terreic⁴ acid 3, both of which have antibiotic activity (Fig. 2).⁵

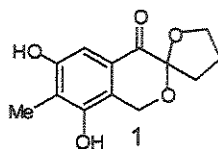


Figure 1. Terreinol: a novel metabolite from *A. terreus*.

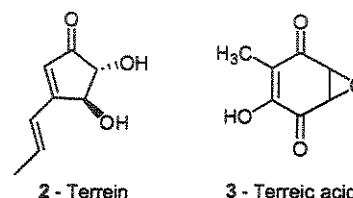


Figure 2. Structures of two other natural products of *A. terreus*.

We now report the isolation of a novel metabolite from *A. terreus*⁶ (compound 1, Fig. 1) and its biosynthetic origin, based on the pattern of ^{13}C incorporation.

2. Isolation and characterization of metabolite 1

While screening for enzymatic activity in malt extract cultures of Brazilian strains⁶ of *A. terreus*, we observed that this fungus produced compounds 2 and 3, and the new compound 1, all of which were isolated from ethyl acetate extracts. Terreic acid was the major product in 2-day cultures whereas compound 1 was not present. On the other hand, in older cultures (>4 days), 1 was produced in higher amounts than compounds 2 and 3, as confirmed by GC/MS analysis.

The production of these metabolites was time dependent and was also influenced by the culture medium. Thus, the formation of compound 1 was totally suppressed when culture media richer than malt extract were used.

Keywords: Terreinol; Novel metabolite; *Aspergillus terreus*; Isotopic labeling.

[☆] Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.tetlet.2003.10.128](https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2003.10.128)

* Corresponding author. Tel.: +55-19-3788-3067; fax: +55-19-3788-3023; e-mail: anita@iqm.unicamp.br

Table 1. ^1H and ^{13}C NMR data for compound

Carbon	δ_{C}	δ_{H} (int, mult, J)	HMBC ($^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$)
1	59.7	4.94 (1H, d, 15.7 Hz); 4.73 (1H, d, 15.7 Hz)	106.6; 123.1; 128.0; 190.0
2	123.1	—	—
3	152.3	—	—
4	120.8	—	—
5	156.7	—	—
6	104.7	6.97 (1H, s)	120.8; 156.7; 190.7
7	128.0	—	—
8	190.7	—	—
9	106.6	—	—
10	33.8	2.64 (1H, dt, 12.6 and 8.8 Hz); 1.89 (1H, ddd, 12.6, 8.2, and 4.5 Hz)	26.0; 71.2; 106.6; 190.7
11	26.0	2.13 (1H, overlapping); 2.04 (1H, m)	26.0; 71.2; 106.6; 190.7
12	71.2	4.06 (1H, m); 3.97 (1H, dd, 14.6 and 7.7 Hz)	26.0; 33.8; 106.6
13	9.3	2.13 (3H, s)	9.3; 120.8; 152.3; 156.7

The spectra were acquired under the following conditions: 1–2 mg of **1**, CD_3OD , 25 °C, 499.885 MHz for ^1H and 125.696 MHz for ^{13}C .

Moreover, metabolite production was strongly influenced by the malt extract (ME) manufacturer.⁷ To maximize the production of **1**, other experimental conditions were optimized and, to confirm its microbiological source, a blank assay using the appropriate medium without inoculation was run.

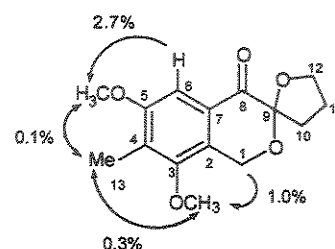
The structure of this new optically active⁸ natural product was established by mass spectrometry and extensive spectroscopic analysis (UV,⁹ IR, MS, COSY, HSQC, g-HMBC, and NOESY 1D).

The molecular ion at m/z 250.08485 (17%) in the HRMS agreed with the formula ($\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{O}_5$; calcd: 250.08413). The IR spectrum showed intense phenolic hydroxyl and carbonyl peaks at 3421 and 1735 cm^{-1} , respectively, while the sp^2 electron-rich aromatic ring carbon–carbon vibrations occurred at 1609 cm^{-1} .

The presence of a pentasubstituted aromatic ring was established based on the occurrence of only one aromatic methine group in the ^1H and ^{13}C NMR spectra (δ_{H} 6.97, δ_{C} 104.7), both of which depicted a correlation in the HSQC spectrum. Two doublets at δ_{H} 4.94 and δ_{H} 4.73 ($^2J = 15.7$ Hz) were assigned to the diastereotopic benzylic methylene H1a,b, an AX spin system clearly visualized in the H,H-COSY spectrum. The ^1H NMR signals of the diastereotopic methylene H12a,b and the methylene 11 were observed at δ 4.06, 3.97 and δ 2.13, 2.04, respectively, with the expected integrals and multiplicities.

The last methylenic hydrogen pair, H10a,b, which was strongly influenced by the proximity of a stereogenic center, was assigned to the NMR signals at δ_{H} 2.64 and δ_{H} 1.89. All of these four pairs of methylenic hydrogens showed homonuclear correlations in the COSY spectrum. Moreover, their respective attached carbon atoms were unequivocally assigned based on the correlations observed in the HSQC and HMBC 2D NMR spectra (Table 1).

Long range scalar couplings observed between the quaternary carbon C9 at δ 106.6 and the alicyclic hydrogens (H1, H10, H11, and H12) were taken as evidence for the

Figure 3. NOE increment data for derivative **1a**.

presence of a dioxaspiro moiety. Similar chemical shift values have been reported^{10a,b} for oxaspiro-type carbons.

Finally, the signals at δ_{C} 9.3 and δ_{H} 2.13 were assigned to the aromatic methyl group. The presence of two phenolic groups was suggested by the deshielded aromatic carbons at δ_{C} 156.7 and δ_{C} 152.3, and this was confirmed by signals at 4.85 and 5.30 in NMR experiments using CDCl_3 , in which **1** was only partially soluble.

The substitution pattern of the aromatic ring was assigned based on NOESY 1D experiments of the natural product and its dimethyl derivative **1a**.¹¹ The aromatic hydrogen of **1** displayed dipolar coupling only with the methyl group. The selective excitation of the methoxy group attached to the C5 of **1a** (δ_{H} 3.87) revealed its proximity to the CH and CH_3 groups by signal enhancement (Fig. 3) while the other methoxy group at δ_{H} 3.72 showed dipolar coupling with the benzylic and methyl hydrogens (Fig. 3). These data convincingly allowed the proposition of 6',8'-dihydroxy-7'-methyl-4,5-dihydro-3*H*-spiro[furan-2,3'-isochromen]-4'(1'*H*)-one (compound **1**).

3. ^{13}C labeling experiments

One of the simplest and most widely used means of probing biosynthetic routes consists of incorporating labeled acetate into the natural product. However, the addition of the sodium acetate to the culture medium,

Table 2. NMR data for the [1-¹³C]-D-glucose-labeled compound 1

Carbon	δ_c	Integral
1	59.7	1.2
2	123.1	2.3
3	152.3	1.3
4	120.8	2.3
5	156.7	1.2
6	104.7	2.3
7	128.0	0.9
8	190.7	2.6
9	106.6	1.1
10	33.9	2.4
11	26.0	1.1
12	71.2	2.3
13	9.4	1.5

The spectra were acquired under the following conditions: <1 mg of 1, 50 μ L of CD₃OD, 125.696 MHz, 25 °C.

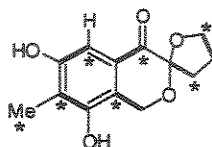


Figure 4. Pattern of [1-¹³C]-D-glucose incorporation into compound 1: * indicates the ¹³C-labeled positions; bold bonds indicate the incorporation of intact acetyl units.

even in minimal amounts, completely suppressed the production of metabolite 1 under several different growth conditions. On the other hand, the use of [1-¹³C]-D-glucose as a labeled precursor resulted in formation of this metabolite.

The positions of glucose incorporation into compound 1 were unequivocally observed with ¹³C NMR spectroscopy using optimized¹² inverse gated decoupling.¹³ Despite the small amounts of the compound (<1 mg) and the low levels of incorporation (~1.5%), the enrichment could still be accurately quantified (Table 2).

The pattern of incorporation shown in Figure 4 indicates that 1 had a predominantly polyketide origin¹⁴ involving six acetyl/malonyl units added by CoA.

The labeling of the aromatic methyl, adjacent to another labeled position, may indicate alkylation of the polyketide intermediate by methionine.

Full delineation of the biosynthetic steps of compound 1 requires further studies involving putative labeled intermediates. These studies and determination of the configuration of the stereogenic center are currently underway.

The supplementary data (UV and NMR spectra) are available online with the paper in ScienceDirect.

Acknowledgements

The authors thank Profs. Alberto Colnago, EMB-RAPA—São Carlos, Fred Yukio Fujiwara (Instituto de Química—UNICAMP), for helpful discussions and the donation of reagents. CNPq and FAPESP fellowships supported F.C.M. and A.L.M.P.

References and Notes

1. Simpson, T. J. *Top. Curr. Chem.* **1998**, *195*, 1.
2. Alberts, A. W.; Chen, J.; Kuron, G.; Hunt, V.; Huff, J.; Hoffman, C.; Rothrock, J.; Lopez, M.; Joshua, H.; Harris, E.; Patchett, A.; Monaghan, R.; Currie, S.; Stapley, E.; Albers-Schonberg, G.; Hensens, O.; Hirshfield, J.; Hoogsteen, K.; Liesch, J.; Springer, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1980**, *77*, 3957.
3. Raistrick, H.; Smith, G. *Biochem. J.* **1935**, *29*, 606.
4. Kolb, H. C.; Hoffmann, M. R. *Tetrahedron: Asymmetry* **1990**, *1*, 237.
5. (a) Sheeran, J. C.; Lawson, W. B.; Gaul, R. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 5536; (b) Sheeran, J. C.; Lo, Y. S. *J. Med. Chem.* **1974**, *17*, 371; (c) Kiriya, N.; Higuchi, Y.; Yamamoto, Y. *Chem. Pharm. Bull.* **1977**, *25*, 1265.
6. Strain CCT3320 isolated from the Brazilian Atlantic Rain Forest by Fundação Tropical André Tosello.
7. Difco malt extract (100 mL) (2%) in 500 mL Erlenmeyers was used. For the enrichment assays, 25 mg of [1-¹³C]-D-glucose was added to 100 mL of this medium. In all experiments, the cultures were maintained at 28 °C with stirring at 170 rpm in a rotatory shaker.
8. 1a was readily obtained treating 1 with an excess of freshly distilled diazomethane.
9. λ_{max} MeOH: 222, 282, and 336 nm.
10. (a) Szilágyi, L.; Fehér, K. *J. Mol. Struct.* **1998**, *471*, 195; (b) For a review on spiroketals, see: Perron, F.; Albizzati, K. F. *Chem. Rev.* **1989**, *89*, 1617.
11. $[\alpha]_D^{20}$ -74° (c 1.15, CH₃OH).
12. Relaxation delay = 20 s; acquisition time = 1 s.
13. Freeman, R.; Hill, H. D. W.; Kaptein, R. *J. Magn. Reson.* **1972**, *7*, 327.
14. Thomas, R. *ChemBioChem* **2001**, *2*, 612.