

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Biotransformação de naftoquinonas por fungos filamentosos e
bactérias do trato gastrointestinal e avaliação da atividade
citotóxica dos derivados obtidos**

Marcela Etchebehere Severiano

Ribeirão Preto
2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Biotransformação de naftoquinonas por fungos filamentosos e
bactérias do trato gastrointestinal e avaliação da atividade
citotóxica dos derivados obtidos**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do
Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientada: Marcela Etchebehere Severiano

Orientadora: Profa. Dra. Nieve A. J. C. Furtado

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciências Farmacêuticas em 30/11/2016. A versão original
encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão
Preto/USP.

Ribeirão Preto
2016

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Severiano, Marcela Etchebehere.

Biotransformação de naftoquinonas por fungos filamentosos e bactérias do trato gastrointestinal e avaliação da atividade citotóxica dos derivados obtidos .
Ribeirão Preto, 2016.

215 p.; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientadora: Furtado, Nieve Araçari Jacometti Cardoso.

1. Naftoquinonas. 2. Biotransformação. 3. Citotoxicidade

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: Marcela Etchebehere Severiano

Título do trabalho: Biotransformação de naftoquinonas por fungos filamentosos e bactérias do trato gastrointestinal e avaliação da atividade citotóxica dos derivados obtidos.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientadora: Profa. Dra. Nieve Araçari Jacometti Cardoso Furtado

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

*Dedico esse trabalho a todas as pessoas que me apoiaram na
realização deste sonho, sobretudo aos meus pais Paulo e Jussara,
ao meu marido João Henrique e minha amada filha Helena por ser
a razão do meu viver.*

Agradeço à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro indispensável para a realização do presente trabalho (Processos FAPESP 2011/21700-5 e 2012/01468-3) .

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me concedido vida, saúde, sabedoria, condições espirituais e materiais para que eu chegasse até aqui e por ter sido minha fortaleza em todos os momentos difíceis.

À Professora Niede por toda a orientação durante o trabalho.

À Professora Dra. Raquel Alves dos Santos pela realização dos ensaios de citotoxicidade.

Ao Prof. Dr. Antônio Gilberto Ferreira, do Departamento de Química da UFSCAR, pela obtenção dos espectros de RMN.

Ao técnico José Carlos Tomaz pela obtenção dos espectros de massas.

Aos técnicos de laboratório da FCFRP especialmente ao Mário Ogasawara e Valter Lopes (Laboratório de Farmacognosia) bem como a Áurea Lanchote e Jaqueline Nakau pela disponibilidade em ajudar com os experimentos.

Aos meus amigos do laboratório de Farmacognosia que de muitas maneiras contribuíram para a realização deste trabalho. Cresci muito aprendendo um pouquinho com cada um de vocês!

Á todos os professores do programa de pós-graduação, por ser parte fundamental da minha formação científica, em especial aos professores Luiz Alberto (Betinho) e Jairo K. Bastos da FCFRP.

Aos professores Anderson Moraes (FFCLRP), Flavio Emery (FCFRP), Gino Del Ponte (FCFRP), Alberto Federman (FCFRP), Vladimir Heleno (Unifran), Ricardo Vessecchi (FFCLRP) e Antonio E.M. Crotti (FFCLRP) pelo imenso auxílio nos experimentos com as quinonas.

À Coordenação do programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da FCFRP-USP.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, local de realização do trabalho.

À FAPESP e CAPES pelo apoio financeiro.

“ [Eu] Pensava que nós seguíamos por caminhos já feitos, mas parece que não os há.

O nosso ir faz o caminho”

(C.S.Lewis)

RESUMO

SEVERIANO, M. E. **Biotransformação de naftoquinonas por fungos filamentosos e bactérias do trato gastrointestinal e avaliação da atividade citotóxica dos derivados obtidos.** 2016. 215f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

As naftoquinonas são quinonas relacionadas com o sistema naftalênico. Essas substâncias constituem também uma classe de intermediários toxicológicos gerados através da biotransformação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, estrógenos, catecolaminas e de vários outros fármacos.. Micro-organismos têm sido utilizados como ferramentas para prever o metabolismo dos fármacos, servindo como uma plataforma de estudos muito eficiente. Nesse sentido, os fungos filamentosos são utilizados por promover transformações mimetizando as reações hepáticas *in vivo* dos fármacos. As bactérias intestinais também têm sido empregadas, pois quando as substâncias entram em contato com a microbiota intestinal, também podem ser modificadas por essas bactérias. Juntos, esses micro-organismos podem contribuir para a elucidação de rotas metabólicas dos compostos, fornecendo informações sobre a geração de substâncias mais ativas, inativas ou tóxicas. Além disso, estudos de biotransformação podem ser ferramentas muito úteis para obtenção de novos derivados. Dessa forma, o presente trabalho relata os estudos de metabolismo microbiano de oito naftoquinonas com diferentes substituições (1,2-naftoquinona, 1,4-naftoquinona, lausona, menadiona, lausona metoxilada, plumbagina, 5-hidroxi-naftoquinona e vitamina K1) por diferentes espécies de fungos filamentosos (*C.elegans*, *A.niger*, *A.brasiliensis*, *A.alliaceus*, *C.echinulata*, *M.rouxii*, *A.phoenicis*, *A.ochraceus* e *R.stolonifer*) e bactérias intestinais (*Bifidobacterium* sp, *L.acidophilus* e *E.coli*) bem como pela levedura probiótica *S.boulaardii*. Para isso, inicialmente, foram estabelecidas as condições de cultivo adequadas para cada micro-organismo. Foram feitos estudos sobre a estabilidade dos substratos nas condições experimentais padronizadas, bem como para o estabelecimento das condições de extração dos mesmos. As reações de biotransformação foram monitoradas por 10 dias para os fungos filamentosos e por 36 horas para as bactérias intestinais e para a levedura probiótica e os processos mais promissores foram selecionados para serem realizados em escala ampliada visando o isolamento dos derivados produzidos. A biotransformação da lausona metoxilada possibilitou a produção do derivado codificado como **BLM1**, identificado como lausona. As reações com a menadiona possibilitaram o isolamento e identificação de cinco metabólitos codificados como **BM1**, **BM2**, **BM4**, **BM5** e **BM6**. Todas as naftoquinonas utilizadas como substratos nos processos de biotransformação e os derivados obtidos foram submetidos a ensaios de citotoxicidade frente a linhagens celulares normais e tumorais. De uma forma geral, as naftoquinonas não apresentaram citotoxicidade elevada quando comparadas com o controle positivo do experimento (doxorubicina). No entanto, pode-se correlacionar o efeito das pequenas modificações nas estruturas químicas das naftoquinonas com diferentes respostas biológicas. Pôde-se estabelecer também que a manutenção dos grupos cetônicos do núcleo quinonóide são indispensáveis para o aparecimento da atividade citotóxica.

Palavras-chave: Naftoquinonas, Biotransformação, Citotoxicidade.

ABSTRACT

SEVERIANO, M. E. **Biotransformation of naphthoquinones by filamentous fungi and bacteria from the gastrointestinal tract and evaluation of the cytotoxic activity of the derivatives.** 2016. 215f. Thesis (Ph.D.). School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto – University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Quinones are important organic compounds widely distributed in nature and used as colorants in cosmetics and food. These compounds are also used in medicine as anti-tumor, anti-inflammatory, antimicrobial, among other applications. Naphthoquinones are quinones related to the naphthalene system. These molecules belong to a class of toxic intermediates generated by the biotransformation of polycyclic aromatic hydrocarbons, estrogens, catecholamines and other drugs. The determination of safety and efficacy of drugs is closely related to the study of derivatives formation by *in vivo* metabolism reactions. Microorganisms have been used as tools to predict drug metabolism and are considered a very efficient platform of studies. Hereof, filamentous fungi are used due to their ability to promote chemical modifications that mimics *in vivo* liver reactions. Intestinal bacteria have also been used since they are known to modify drugs and other substances that may come into contact with the gut microbiota. Both fungi and bacteria can contribute to the elucidation of metabolic pathways of compounds, providing information about the generation of more active, inactive or toxic substances. Furthermore, biotransformation studies can be useful tools to obtain new derivatives. Hence, the goal of this work was to study the microbial metabolism of eight naphthoquinones with different substitutions (1,2-naphthoquinone, 1,4-naphthoquinone, lawsone, menadione, methoxy lawsone, plumbagin, 5-hydroxy-naphthoquinone and vitamin K1) by several species of filamentous fungi (*C.elegans*, *A.niger*, *A.brasiliensis*, *A.alliaceus*, *C.echinulata*, *M.rouxii*, *A.phoenicis*, *A.ochraceus* e *R.stolonifer*), intestinal bacteria (*Bifidobacterium* sp, *L.acidophilus* e *E.coli*) and the probiotic yeast *S.boulardii*. Additionally, all naphthoquinones used as substrates in biotransformation processes and the obtained derivatives were evaluated in cytotoxicity assays using normal and tumor cell lines. Initially, appropriate growth conditions were established for each microorganism. Stability studies with the substrates and the determination of appropriate extraction conditions were also carried out. The biotransformation reactions were monitored during 10 days for the filamentous fungi and during 36 h for intestinal bacteria and probiotic yeast. The most promising processes were selected to be carried out in enlarged scale for the isolation of the produced derivatives. The biotransformation of the methoxy-lawsone produced a compound encoded as **BLM1** and identified as lawsone. Five metabolites encoded as **BM1**, **BM2**, **BM4**, **BM5** e **BM7** were identified and isolated from the menadione biotransformations. Regarding the cytotoxicity experiments, the naphthoquinones in general did not display high cytotoxicity when compared with the positive control doxorubicin. However, slight modifications in the naphthoquinones chemical structures were correlated to different biological responses. Additionally, the maintenance of ketone groups of the quinonoid nucleus were considered essential for the cytotoxic activity.

Key words: Naphthoquinones, Biotransformation, Cytotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura básica das quinonas (núcleo quinoide)	2
Figura 2. Formação da benzoquinona a partir do ácido quínico	3
Figura 3. Estruturas químicas de quinonas já isoladas e descritas na literatura	3
Figura 4. Estruturas químicas das naftoquinonas mitomicina C, adriamicina e daunorrubicina	5
Figura 5. Quinonas de importância bioquímica	6
Figura 6. Estruturas químicas de diferentes tipos de quinonas	7
Figura 7. Estrutura química de <i>orto</i> - e <i>para</i> -quinonas	8
Figura 8. Gráfico do número de estudos sobre as naftoquinonas publicados na literatura entre 1900-2016. Fonte de Pesquisa: Base de Dados SciFinder (Acesso em 01/06/2016)	9
Figura 9. Formas tautoméricas resultantes do equilíbrio apresentado pelas quinonas	10
Figura 10. Formas da Lausona, uma hidroxinaftoquinona	10
Figura 11. Estruturas químicas de naftoquinona bioativas	13
Figura 12. Estruturas químicas das vitaminas do grupo K	14
Figura 13. Ciclo redox das quinonas	16
Figura 14. Estruturas químicas de quinonas com atividade citotóxica	18
Figura 15. Biotransformação do etanol em ácido acético	19
Figura 16. Biotransformação do acetaminofeno	26
Figura 17. Biotransformações do dietilbestrol (A) e do 2-hidroxi-estradiol (B) em metabólitos contendo o núcleo quinonoide	27
Figura 18. Biotransformação da chiconina por bactérias intestinais	33
Figura 19. Biotransformação da chiconina por <i>Bacteroides fragilis</i>	33
Figura 20. Clivagem oxidativa realizada por <i>S.platensis</i>	34
Figura 21. Biotransformação da naftoquinona INO 5042	34
Figura 22. Biotransformação da 5-amino-8-hidroxi-1,4-naftoquinona	35
Figura 23. Biotransformação do lapachol por <i>C.lunata</i>	35
Figura 24. Produtos de biotransformação do lapachol descritos por Silva e colaboradores (2014).	36
Figura 25. Biotransformação do lapachol descrita por Otten & Rosazza	37
Figura 26. Biotransformação do lapachol por <i>C.echinulata</i>	37
Figura 27. Produtos de biotransformação da β -lapachona descritos Paludo e colaboradores	38
Figura 28. Estruturas químicas das naftoquinonas selecionadas para os estudos de biotransformação	40
Figura 29. Curvas de crescimento dos fungos em meio pré-fermentativo, incubado a 30 °C, sob agitação constante de 120 rpm, por um período de quatro dias consecutivos.	79
Figura 30. Curvas de crescimento dos fungos em meio fermentativo Czapek modificado, incubado a 30 °C, sob agitação constante de 120 rpm, por um período de seis dias consecutivos.	81

- Figura 31.** Curva de crescimento de *C.elegans* ATCC 10028b na presença de naftoquinonas. 82
- Figura 32.** Curvas de crescimento das bactérias probióticas em seus respectivos meios de cultura 83
- Figura 33.** Curvas de crescimento da bactéria *E.coli* na presença e ausência dos substratos selecionados 85
- Figura 34:** Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD dos extratos dos meios de cultura contendo menadiona obtidos por extrações com resinas poliméricas (A) e por partição líquido-líquido (B). O círculo sob a escala destaca a intensidade dos picos observados. As condições cromatográficas foram: Cromatógrafo Shimadzu, Coluna Kromasil C18, fase móvel constituída por gradiente de acetonitrila e água (20-100% Fase orgânica em 35 minutos), vazão de 0,8ml min⁻¹, volume de injeção de 30µL, detecção em UV 220nm e análise a temperatura ambiente. 88
- Figura 35.** Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD dos extratos de diferentes meios de cultura contendo a 1,2 -naftoquinona após 24 horas de incubação. (A:fase aquosa liofilizada após extração; B: meio MH; C: meio MRS; D: meio MRS suplementado e E: meio Czapek modificado). As condições cromatográficas foram: Cromatógrafo Shimadzu, Coluna Kromasil C18, fase móvel constituída por gradiente de acetonitrila e água (20-100% Fase orgânica em 35 minutos), vazão de 0,8ml min⁻¹, volume de injeção de 30µL, detecção em UV 220nm e análise a temperatura ambiente. 92
- Figura 36.** Estruturas químicas das naftoquinonas empregadas em reações de biotransformação descritas na literatura 96
- Figura 37.** Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD dos extratos de soluções do meio Czapek modificado contendo 1,2-naftoquinona após incubação por 0 minutos (A), 30 minutos (B), 60 minutos (C) e 24 horas (D). As condições cromatográficas foram: Cromatógrafo Shimadzu, Coluna Kromasil C18, fase móvel constituída por gradiente de acetonitrila e água (20-100% Fase orgânica em 35 minutos), vazão de 0,8ml min⁻¹, volume de injeção de 30µL, detecção em UV 220nm e análise a temperatura ambiente. 95
- Figura 38.** Curvas de consumo da menadiona por diferentes fungos filamentosos 96

- Figura 39.** Cromatogramas oriundos da biotransformação da menadiona ($rT=15,71$ min, indicada pela seta) por *A.alliaceus* após 120 horas de reação: (A) Extrato de biotransformação e (B) Extrato do controle de *A.alliaceus* no mesmo período. Cromatógrafo Waters, Coluna Sinergi Polar RP, fase móvel constituída por gradiente de acetonitrila e água (20-100% Fase orgânica em 35 minutos), vazão de $0,8\text{ml min}^{-1}$, volume de injeção de $30\mu\text{L}$, detecção em UV 220nm e análise a temperatura ambiente 97
- Figura 40.** Cromatogramas oriundos da biotransformação da menadiona ($rT=23,84$ min, indicada pela seta) por *C.elegans* após 96 horas de reação: (A) Extrato de biotransformação e (B) Extrato do controle de *C. elegans* no mesmo período. As condições cromatográficas foram: Cromatógrafo Shimadzu, Coluna Kromasil C18, fase móvel constituída por gradiente de acetonitrila e água (20-100% Fase orgânica em 35 minutos), vazão de $0,8\text{ml min}^{-1}$, volume de injeção de $30\mu\text{L}$, detecção em UV 254nm e análise a temperatura ambiente 98
- Figura 41.** Cromatogramas oriundos da biotransformação da menadiona (seta indicando T_r) por *A.brasiliensis* após 120 horas de reação: (A) Extrato de biotransformação e (B) Extrato do controle de *A.brasiliensis* no mesmo período. As condições cromatográficas foram: Cromatógrafo Shimadzu, Coluna Kromasil C18, fase móvel constituída por gradiente de acetonitrila e água (20-100% Fase orgânica em 35 minutos), vazão de $0,8\text{ml min}^{-1}$, volume de injeção de $30\mu\text{L}$, detecção em UV 254nm e análise a temperatura ambiente 99
- Figura 42.** Cromatogramas oriundos dos extratos celulares de *C.elegans* ATCC 10028b (A), *A.alliaceus* (B) e *A.brasiliensis* (C) obtidos durante os experimentos de biotransformação da menadiona. As condições cromatográficas foram: Cromatógrafo Waters, Coluna Polar RP, fase móvel constituída por gradiente de acetonitrila e água (20-100% Fase orgânica em 35 minutos), vazão de $0,8\text{ml min}^{-1}$, volume de injeção de $30\mu\text{L}$, detecção em UV 254nm e análise a temperatura ambiente 100
- Figura 43.** Curva de consumo da menadiona pela bactéria *E.coli* em cultivos líquido e sólido. 101

- Figura 44.** Cromatograma do extrato de biotransformação da menadiona (pico destacado com a seta) por *E.coli* cultivada em meio líquido após 12 horas de incubação. As condições cromatográficas foram: Cromatógrafo Waters, Coluna Polar RP, fase móvel constituída por gradiente de acetonitrila e água (20-100% Fase orgânica em 35 minutos), vazão de $0,8\text{ml min}^{-1}$, volume de injeção de $30\mu\text{L}$, detecção em UV 254nm e análise a temperatura ambiente 102
- Figura 45.** Cromatograma do extrato de biotransformação da menadiona (pico destacado com a seta) por *E.coli* cultivada em meio sólido após 48 horas de incubação. As condições cromatográficas foram: Cromatógrafo Shimadzu, Coluna Polar RP, fase móvel constituída por gradiente de acetonitrila e água (20-100% Fase orgânica em 35 minutos), vazão de $0,8\text{ml min}^{-1}$, volume de injeção de $30\mu\text{L}$, detecção em UV 254nm e análise a temperatura ambiente 102
- Figura 46.** Cromatogramas oriundos dos extratos celulares de *E.coli* em cultivo líquido (A) e sólido (B) obtidos durante os experimentos de biotransformação da menadiona. As condições cromatográficas foram: Cromatógrafo Waters, Coluna Polar RP, fase móvel constituída por gradiente de acetonitrila e água (20-100% Fase orgânica em 35 minutos), vazão de $0,8\text{ml min}^{-1}$, volume de injeção de $30\mu\text{L}$, detecção em UV 254nm e análise a temperatura ambiente 103
- Figura 47.** Curvas de consumo da lausona metoxilada por diferentes fungos filamentosos 104
- Figura 48 .** Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD dos extratos de biotransformação da lausona metoxilada pelos fungos: (A) *A.alliaceus* (96 horas), (B) *M.rouxii* (72 horas), (C) *C.elegans* ATCC 10028b (96 horas)e (D) *C.elegans* ATCC 9245 (96 horas) . As condições cromatográficas foram: Cromatógrafo Waters , Coluna Sinergi Polar RP, fase móvel constituída por gradiente de acetonitrila e água (20-100% Fase orgânica em 35 minutos), vazão de $0,8\text{ml min}^{-1}$, volume de injeção de $30\mu\text{L}$, detecção em UV 220nm e análise a temperatura ambiente. 105
- Figura 49.** Curva de consumo da plumbagina por diferentes fungos filamentosos 106

Figura 50. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD dos extratos de biotransformação da plumbagina pelos fungos *C.elegans* atcc 10028b (A), *C.elegans* ATCC 9245 (B) e *A. niger* (C). As condições cromatográficas foram: Cromatógrafo Waters , Coluna Sinergi Polar RP, fase móvel constituída por gradiente de acetonitrila e água (20-100% Fase orgânica em 35 minutos), vazão de 0,8ml min⁻¹, volume de injeção de 30µL, detecção em UV 220nm e análise a temperatura ambiente. 107

Figura 51. Estrutura química da Vitamina K1 109

Figura 52. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD dos extratos dos processos de biotransformação da menadiona realizados com a adição do substrato na fase exponencial (A) e estacionária (B) da bactéria *E. coli*. As condições cromatográficas foram: Cromatógrafo Waters, Coluna Kromasil C18, fase móvel constituída por gradiente de acetonitrila e água (20-100% Fase orgânica em 35 minutos), vazão de 0,8ml min⁻¹, volume de injeção de 30µL, detecção em UV 220nm e análise a temperatura ambiente. 111

Figura 53: Cromatograma obtido por CLAE-DAD do extrato obtido do processo de biotransformação da menadiona por *C. elegans* com a adição da mesma na fase exponencial de crescimento. As condições cromatográficas foram: Cromatógrafo Waters, Coluna Kromasil C18, fase móvel constituída por gradiente de acetonitrila e água (20-100% Fase orgânica em 35 minutos), vazão de 0,8ml min⁻¹, volume de injeção de 30µL, detecção em UV 220nm e análise a temperatura ambiente. 112

Figura 54: Cromatograma obtido por CLAE-DAD do extrato **EBM_{Ce}** . Cromatógrafo Shimadzu, Coluna Sinergi Polar RP, fase móvel constituída por gradiente de acetonitrila e água (20-100% Fase orgânica em 35 minutos), vazão de 0,8ml min⁻¹, volume de injeção de 30µL, detecção em UV 254nm e análise a temperatura ambiente. 114

Figura 55: Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD dos compostos **BM1**, **BM2** e **BM3**, isolados do extrato **EBM_{Ce}**. Cromatógrafo Waters, Coluna Sinergi Polar RP, fase móvel constituída por gradiente de acetonitrila e água (20-100% Fase orgânica em 35 minutos), vazão de 0,8ml min⁻¹, volume de injeção de 30µL, detecção em UV 254nm e análise a temperatura ambiente. 115

- Figura 56** : Cromatograma obtido por CLAE-DAD do extrato **EBMEc I** . Cromatógrafo Shimadzu, Coluna Sinergi Polar RP, fase móvel constituída por gradiente de acetonitrila e água (20-100% Fase orgânica em 35 minutos), vazão de 0,8ml min⁻¹, volume de injeção de 30µL, detecção em UV 254nm e análise a temperatura ambiente. 117
- Figura 57.** Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD dos compostos **BM4** e **BM5**. Cromatógrafo Waters, Coluna Sinergi Polar RP, fase móvel constituída por gradiente de acetonitrila e água (20-100% Fase orgânica em 35 minutos), vazão de 0,8ml min⁻¹, volume de injeção de 30µL, detecção em UV 254nm e análise a temperatura ambiente. 118
- Figura 58.** Cromatograma obtido por CLAE-DAD do extrato **EBMEc II** . Cromatógrafo Waters, Coluna Sinergi Polar RP, fase móvel constituída por gradiente de acetonitrila e água (20-100% Fase orgânica em 35 minutos), vazão de 0,8ml min⁻¹, volume de injeção de 30µL, detecção em UV 254nm e análise a temperatura ambiente. 119
- Figura 59.** Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD dos compostos **BM6** e **BM7**. Cromatógrafo Waters, Coluna Sinergi Polar RP, fase móvel constituída por gradiente de acetonitrila e água (20-100% Fase orgânica em 35 minutos), vazão de 0,8ml min⁻¹, volume de injeção de 30µL, detecção em UV 254nm e análise a temperatura ambiente. 120
- Figura 60.** Cromatograma obtido por CLAE-DAD da reação de biotransformação da menadiona por *A.alliaceus* após 96 horas de incubação. Cromatógrafo Waters, Coluna Sinergi Polar RP, fase móvel constituída por gradiente de acetonitrila e água (20-100% Fase orgânica em 35 minutos), vazão de 0,8ml min⁻¹, volume de injeção de 30µL, detecção em UV 254nm e análise a temperatura ambiente. 121
- Figura 61.** Cromatograma obtido por CLAE-DAD do extrato **EBMab** . Cromatógrafo Shimadzu, Coluna Sinergi Polar RP, fase móvel constituída por gradiente de acetonitrila e água (20-100% Fase orgânica em 35 minutos), vazão de 0,8ml min⁻¹, volume de injeção de 30µL, detecção em UV 254nm e análise a temperatura ambiente. 122

- Figura 62:** Cromatograma obtido por CLAE-DAD da reação de biotransformação da lausona metoxilada por *C.elegans* ATCC 9245 após 96 horas de incubação. Cromatógrafo Waters, Coluna Sinergi Polar RP, fase móvel constituída por gradiente de acetonitrila e água (20-100% Fase orgânica em 35 minutos), vazão de 0,8ml min⁻¹, volume de injeção de 30µL, detecção em UV 254nm e análise a temperatura ambiente. 123
- Figura 63:** Cromatograma obtido por CLAE-DAD do composto **BLM1**. Cromatógrafo Waters, Coluna Sinergi Polar RP, fase móvel constituída por gradiente de acetonitrila e água (20-100% Fase orgânica em 35 minutos), vazão de 0,8ml min⁻¹, volume de injeção de 30µL, detecção em UV 254nm e análise a temperatura ambiente. 123
- Figura 64.** Cromatograma do extrato de biotransformação da plumbagina em escala ampliada. Cromatógrafo Waters, Coluna Sinergi Polar RP, fase móvel constituída por gradiente de acetonitrila e água (20-100% Fase orgânica em 35 minutos), vazão de 0,8ml min⁻¹, volume de injeção de 30µL, detecção em UV 260nm e análise a temperatura ambiente. 124
- Figura 65.** Estrutura química numerada da 2-metil-1,4-naftoquinona ou menadiona. 125
- Figura 66.** Estrutura química numerada do metabólito **BM1** 127
- Figura 67.** Estrutura química numerada do metabólito **BM2** 130
- Figura 68.** Estrutura química sugerida para o metabólito **BM4** 133
- Figura 69.** Estrutura química sugerida para o metabólito **BM5** 136
- Figura 70.** Estrutura química sugerida para o metabólito **BM7** 139
- Figura 71.** Estrutura química numerada da 2-metoxi-1,4-naftoquinona ou lausona metoxilada 141
- Figura 72.** Estrutura química sugerida para o metabólito **BLM1** 143
- Figura 73.** Produtos de biotransformação da menadiona 145
- Figura 74.** Biotransformação da lausona metoxilada por fungos 146
- Figura 75.** Estruturas químicas das naftoquinona avaliadas nos ensaios de citotoxicidade 151

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais vantagens e desvantagens dos processos de biotransformação	21
Tabela 2. Estruturas químicas e propriedades físico-químicas das naftoquinonas empregadas nos estudos de biotransformação.	47
Tabela 3: Condições de cultivo selecionadas para os fungos filamentosos (produção de esporos)	77
Tabela 4. Condições de cultivo das bactérias intestinais	84
Tabela 5: Solubilidade de naftoquinonas em diferentes solventes	86
Tabela 6. Valores de concentração inibitória mínima (CIM) das naftoquinonas frente aos micro-organismos utilizados nas reações de biotransformação	89
Tabela 7. Estabilidade das naftoquinonas em diferentes meios de cultura	91
Tabela 8. Reações de biotransformação descritas para as naftoquinona	94
Tabela 9: Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) da menadiona ($\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$)	126
Tabela 10: Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) de BM1 ($\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$)	129
Tabela 11: Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) de BM2 ($\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$)	131
Tabela 12: Dados de RMN de ^1H (400 MHz) de BM4 ($\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$)	134
Tabela 13: Dados de RMN de ^{13}C (100 MHz) de BM4 ($\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$)	135
Tabela 14: Dados de RMN de ^1H (400 MHz) de BM5 ($\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$)	137
Tabela 15: Dados de RMN de ^{13}C (100 MHz) de BM5 ($\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$)	137
Tabela 16: Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) de BM7 ($\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$)	140
Tabela 17: Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) da lausona metoxilada ($\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$)	141
Tabela 18. Dados de RMN de ^1H do metabólito BLM 1 (600 MHz, $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$, <i>multiplicidade</i> , J em Hz).	144
Tabela 19. Dados de RMN de ^{13}C do metabólito BLM 1 (600 MHz, $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$)	144
Tabela 20. Rendimento reacional dos produtos de biotransformação.	147
Tabela 21. Valores de CI_{50} (micromolar) obtidos para as naftoquinonas e seus produtos de biotransformação frente as linhagens celulares tumorais e normal.	151

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
AcOEt	Acetato de etila
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
<i>d</i> *	Dupleto
<i>dd</i> *	Duplo dupleto
ESI	<i>(do inglês Electrospray Ionization)</i> - Ionização por Eletrospray
ESI-TOF	Espectros de massas obtidos em equipamento com fonte de Ionização por Eletrospray e analisador de massas Tempo de Vôo
EtOH	Etanol
HPLC	<i>(do inglês High Performance Liquid Chromatography)</i> - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
HPLC-DAD	<i>(do inglês High Performance Chromatography-Diode Array Detector)</i> - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao Detector de Arranjo de Diódos
HPLC-MS	<i>(do inglês High Performance Chromatography-Mass Spectrometry)</i> - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas
Hz	Hertz
CI ₅₀	Concentração Inibitória para 50% da população
<i>J</i>	Constante de Acoplamento em Hz
<i>m</i> *	Multiplete
MS	<i>(do inglês Mass Spectrometry)</i> - Espectrometria de Massas
<i>m/z</i>	Razão entre a massa atômica de um íon pelo seu número de cargas
NRRL	<i>National Regional Research Laboratory</i>
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN de ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
RMN de ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
rpm	Rotação por minuto
UFC	Unidade formadora de colônia
XTT	Sal tetrazólio (hidróxido de 2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenilamina)carbonil]-2H-tetrazólio)

LISTA DE SIMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
δ	Deslocamento químico (ppm)
λ	Comprimento de onda
®	Marca registrada

SUMÁRIO

RESUMO	I
ABSTRACT	II
LISTA DE FIGURAS	III
LISTA DE TABELAS	X
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	XI
LISTA DE SÍMBOLOS	XII
1. INTRODUÇÃO	
1.1. Quinonas	2
1.2. Naftoquinonas	9
1.3. Citotoxicidade das quinonas	15
1.4. Biotransformação	18
1.5. Biotransformação e estudos de metabolismo	23
1.6. Micro-organismos	27
1.6.1. Bactérias lácticas	30
1.7. Biotransformação de naftoquinona	32
2. OBJETIVOS	
2.1. Objetivos gerais	40
2.2. Objetivos específicos	41
3. MATERIAL E MÉTODOS	
3.1. Equipamentos utilizados	43
3.2. Meios de cultura utilizados	44
3.3. Reagentes e solventes utilizados	45
3.4. Obtenção das naftoquinona utilizadas como substrato	46
3.5. Avaliação da solubilidade dos substratos	49
3.6. Teste de extração dos substratos em diferentes solventes orgânicos	50
3.7. Comparação de diferentes processos de extração de naftoquinona (resinas poliméricas x extração líquido-líquido)	51
3.8. Avaliação da estabilidade das naftoquinona nos meios de cultura utilizados	52
3.9. Micro-organismos utilizados nos processos de biotransformação	52
3.10. Preservação das culturas dos micro-organismos utilizados	53
3.11. Cuidados adotados durante os procedimentos realizados envolvendo as naftoquinonas e seus derivados	55
3.12. Estudos sobre as condições de cultivo dos fungos filamentosos para os procedimentos de biotransformação	56
3.12.1. Padronização da produção de esporos	56
3.12.2. Padronização da produção de biomassa em meio pré-fermentativo	56
3.12.3. Produção de biomassa em etapa fermentativa	57
3.13. Estudo sobre as condições de cultivo das bactérias probióticas para os procedimentos de biotransformação	58

3.14.	Toxicidade dos substratos frente aos micro-organismos	60
3.15.	Verificação da influência da presença das naftoquinona no perfil de crescimento dos micro-organismos	62
3.16.	Biotransformação de naftoquinona por bactérias do trato gastrointestinal	62
3.16.1.	Biotransformações por <i>E.coli</i> .	62
3.16.2.	Biotransformações por <i>Bifidobacterium sp</i>	63
3.16.3.	Biotransformações por <i>L. acidophilus</i>	64
3.16.4.	Biotransformações em culturas mistas	65
3.16.5.	Biotransformação em meio sólido	65
3.17.	Biotransformação de naftoquinona por fungos filamentosos	66
3.18.	Biotransformação de naftoquinona pelo fungo leveduriforme <i>S. boulardii</i>	67
3.18.1.	Biotransformações em meio líquido	68
3.18.2.	Biotransformações em meio sólido	68
3.19.	Biotransformações em fase exponencial	69
3.20.	Preparo dos controles experimentais	70
3.21.	Preparo e análise dos extratos obtidos através dos processos de biotransformação	70
3.22.	Preparo dos extratos celulares	71
3.23.	Biotransformações em escala preparativa (scale up)	72
3.24.	Isolamento dos componentes dos extratos de biotransformação	72
3.25.	Análises espectroscópicas	73
3.26.	Análises espectrométricas	74
3.27.	Avaliação da Citotoxicidade dos derivados obtidos	74

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1.	Padronização das condições de cultivo dos fungos para as reações de biotransformação	77
4.2.	Estabelecimento das condições de cultivo das bactérias do trato gastrintestinal para as reações de biotransformação	82
4.3.	Teste de solubilidade das naftoquinonas	85
4.4.	Verificação dos efeitos inibitórios das naftoquinona frente aos micro-organismos utilizados (CIM)	88
4.5.	Estabilidade das naftoquinona nos meios de cultura empregados	90
4.6.	Estudos sobre a biotransformação das naftoquinonas	96
4.6.1.	Biotransformações da menadiona	96
4.6.2.	Biotransformações da lausona metoxilada	103
4.6.3.	Biotransformações da plumbagina	106
4.6.4.	Biotransformações da Vitamina K1	108
4.7.	Biotransformações em fase exponencial de crescimento dos micro-organismos	109
4.8.	Obtenção dos extratos de biotransformação em escala ampliada	113
4.8.1.	Biotransformação da menadiona por <i>C.elegans</i> ATCC 10028b	114
4.8.2.	Biotransformação da menadiona por <i>C.elegans</i> ATCC 10028b	116
4.8.3.	Biotransformação da menadiona por <i>A. alliaceus</i>	120
4.8.4.	Biotransformação da menadiona por <i>A.brasiliensis</i>	121
4.8.5.	Biotransformação da lausona metoxilada por <i>C.elegans</i> ATCC 9245	122

4.8.6. Biotransformação da lausona metoxilada por <i>C.elegans</i> ATCC 9245	124
4.9. Caracterização estrutural dos metabolitos obtidos	125
4.9.1. Menadiona	125
4.9.2. BM1	127
4.9.3. BM2	130
4.9.4. BM3	131
4.9.5. BM4	133
4.9.6. BM5	135
4.9.7. BM6	138
4.9.8. BM7	138
4.9.9. Lausona metoxilada	140
4.9.10. BLM1	143
4.10. Considerações a respeito dos derivados obtidos	145
4.11. Avaliação da citotoxicidade das naftoquinonas e metabólitos obtidos	147
5. CONCLUSÕES	153
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	156
7. APÊNDICES	166

Introdução

1.INTRODUÇÃO

1.1 Quinonas

As quinonas são um grupo de compostos orgânicos caracterizados pela presença de dois grupos carbonilas em um sistema conjugado com duas duplas ligações C-C (Simões, 2007). Esses requisitos estruturais constroem o chamado núcleo quinonoide, apresentado na **Figura 1**.

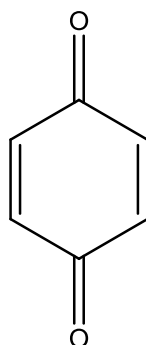


Figura 1. Estrutura básica das quinonas (núcleo quinonóide)

Na maioria dos casos essas moléculas podem ser consideradas produtos da oxidação de fenóis, porém algumas podem ser formadas a partir dos terpenóides. São amplamente disseminadas na natureza, sobretudo em plantas (angiospermas), fungos, líquens e bactérias, mas podem também ter origem sintética (Thomson, 1991).

Em 1838, a molécula da 1,4-benzoquinona, primeira descrita para essa classe, foi obtida pela primeira vez a partir de uma reação de oxidação do ácido quínico (**Figura 2**), a partir do qual foi instituído o termo quinona. Esse composto é usualmente produzido por insetos para espantar predadores (Solomons & Fryhle, 2006).

Dados já antigos apontavam que existem mais de 1500 quinonas isoladas de produtos naturais descritas na literatura (Thomson, 1991). No entanto, além de serem antigos, esses dados não contabilizam as quinonas de origem sintética e /ou semi-sintética. Não foram encontrados dados mais recentes a respeito do número atual, porém pela quantidade de trabalhos publicados a cada ano a respeito dessa classe de compostos, estima-se que esse número seja muito maior. De acordo com uma pesquisa feita na base de dados SciFinder (Data de consulta: 01 de julho de 2016), até 1991, ano da publicação de Thomson, existiam cerca de 49.341 referencias a respeito dessa classe de compostos. Entre 1991 e 2016, foram publicados mais 84.711 trabalhos envolvendo quinonas, o que demonstra a relevância e o contínuo interesse pela classe. Esse interesse se dá tanto do ponto de vista químico, por serem consideradas estruturas “privilegiadas” para a química orgânica (elevada reatividade química), quanto por suas propriedades biológicas e farmacológicas.

Na medicina tradicional plantas ricas em quinonas eram utilizadas no tratamento de diversas doenças (Martinez & Benito, 2005). Formulações e extratos contendo quinonas, já eram utilizados como corantes naturais pela humanidade há milhares de anos (Lemos et al., 2007).

A importância dessa classe de compostos é evidenciada pelo grande número de substâncias contendo o núcleo quinoide que apresentam aplicações conhecidas, sendo muitas delas já utilizadas comercialmente, como por exemplo, as mitomicinas e antraciclinas (Silva et al., 2003). As mitomicinas são um grupo de quinonas produzidas por fungos e que se destacam por sua atividade antimicrobiana e antitumoral. Dentre estas, uma das mais conhecidas é a Mitomicina C, utilizada no tratamento de diversos tumores sólidos (Silva et al. 2003). As antraciclinas também são quinonas bioativas produzidas por actinobactérias do gênero *Streptomyces*. Muitas delas apresentam

atividade antimicrobiana, devido a sua complexação com bases purínicas e pirimidínicas, inibindo a síntese de moléculas de DNA dos micro-organismos (Silva et al., 2003). Entre estas destacam-se a daunorrubicina e a adriamicina. A daunorrubicina também possui efeito terapêutico contra leucemia humana (Acton et al., 1979) além de ser inibidora do crescimento de alguns parasitas do gênero *Trypanosoma* (Wilhanson, 1981). As estruturas de algumas dessas naftoquinonas estão apresentadas na **Figura 4**.

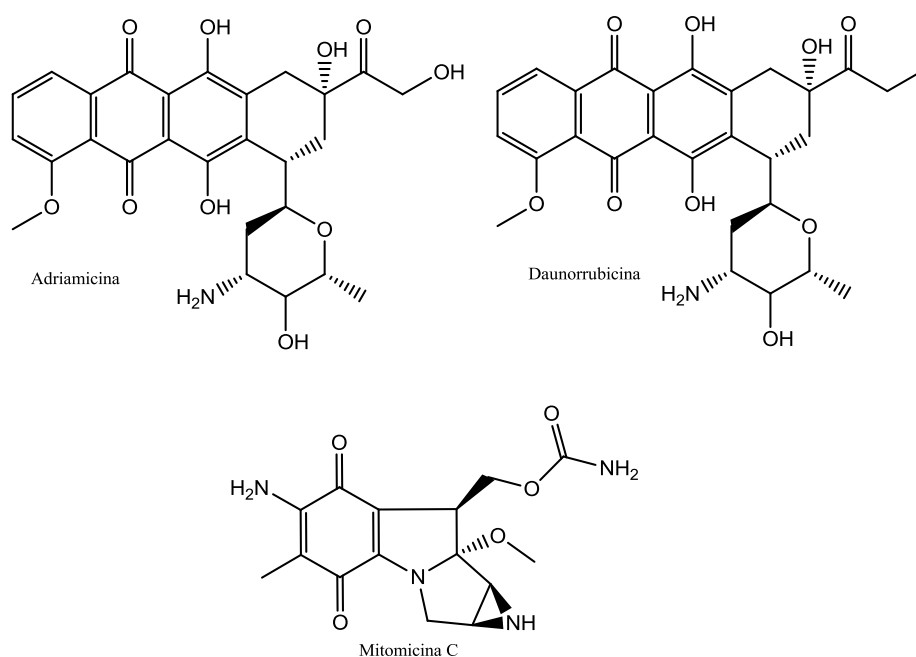


Figura 4. Estruturas químicas das naftoquinonas mitomicina C, adriamicina e daunorrubicina

Outras quinonas como a ubiquinona (coenzima Q10), plastoquinonas e tocoferilquinona, se destacam em termos bioquímicos por sua influência em algumas reações metabólicas como apresentado na **Figura 5**.

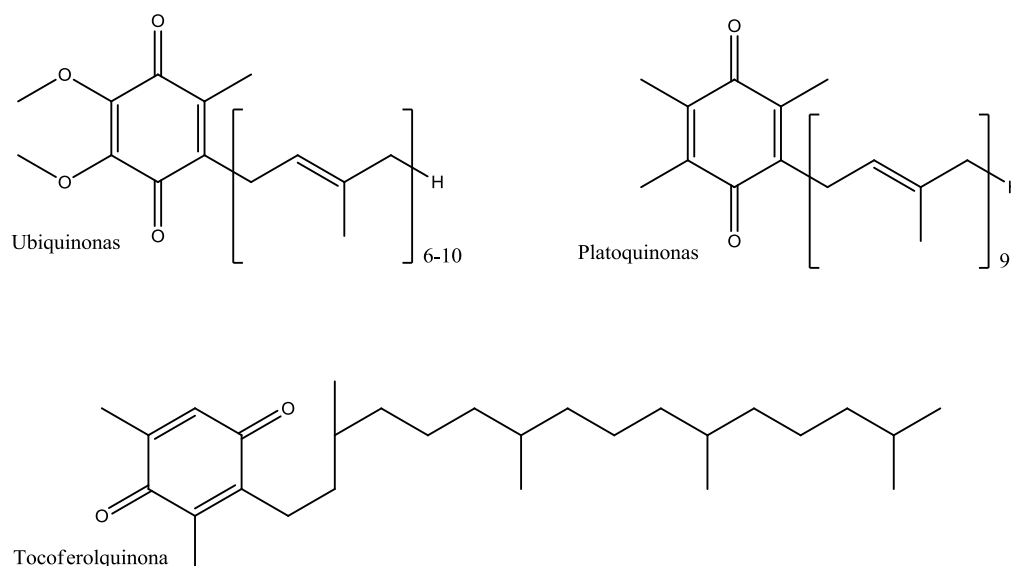


Figura 5. Quinonas de importância bioquímica

Muitas quinonas participam de processos bioquímicos vitais para seres vivos como os vegetais, fungos, bactérias, vírus, artrópodes, algas, entre outros. A ampla disseminação dessas moléculas entre os seres vivos, junto à variação de atividades biológicas apresentadas em diferentes sistemas, confere-lhe uma propriedade muito importante, conhecida como “biodinamicidade”, ou seja, a capacidade de uma molécula apresentar múltiplas propriedades biológicas (Silva et al., 2003). Tal fato explica o grande potencial farmacológico dessa classe de moléculas, com destaque para a atividade anti-inflamatória (Cuellar et al., 2001; Wei et al., 2001; Kuo et al., 2001), antioxidante (Scheibler, 1997; Yen et al., 2000; Yuan & Gao, 1997; Yen et al., 1998; Choi et al., 2000), antifúngica (Semple et al., 2001; Ioset et al., 2000; Currelli et al., 2001; Mahoney et al., 2000), antibacteriana (Khan et al., 2001; Manojlovic et al., 2002; Hatano et al., 1999), antiparasitária (Donoun et al., 1999; Weiss et al., 2000; Kapadia et al., 2001) e antitumoral (Kamei et al., Lee, 2001; Lee et al., 2001; Pecere et al., 2000; Wasserman et al., 2002).

As quinonas, são em geral, moléculas bastante reativas, e como tal, tem suas propriedades biológicas modificadas dependendo do teor de oxigênio a que são expostas bem como pelo tipo de enzima presente no meio em que se encontra (Welleigton, 2015). A capacidade das quinonas em gerar espécies reativas de oxigênio, também conhecidas como radicais livre, está entre as características mais peculiares dessas moléculas.

Do ponto de vista químico, as estruturas das quinonas podem ser classificadas de acordo com o tipo de anel aromático que sustenta o núcleo quinonóide básico em: benzoquinonas (núcleo quinonóide em um anel benzênico), naftoquinonas (anel naftalênico) e antraquinonas (anel antracênico linear ou angular), conforme apresentado nas estruturas químicas da **Figura 6** (Simões, 2007 ; Silva et al., 2003). Juntas esses três tipos de quinonas são as mais frequentemente encontradas na natureza, porém podem ainda haver quinonas de esqueleto mais complexo como as quinonas policíclicas ou as derivadas de terpenos (Martínez & Benito, 2005).

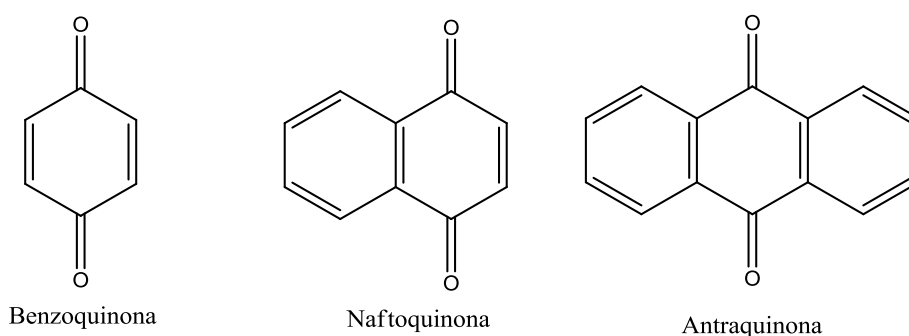


Figura 6. Estruturas químicas de diferentes tipos de quinonas

Esses compostos também são classificados de acordo com a disposição relativa de suas carbonilas em *orto*-quinonas, quando esses grupos funcionais são vizinhos e *para*-quinonas quando os mesmos apresentam dois átomos de carbono entre si (Silva et

al., 2003). Em algumas quinonas policíclicas pode haver maior distanciamento das carbonilas devido a seus possíveis arranjos isoméricos. Esses diferentes arranjos isoméricos modificam significativamente suas propriedades químicas, físicas e biológicas. A **Figura 7** apresenta estruturas de *orto* e *para*-quinonas.

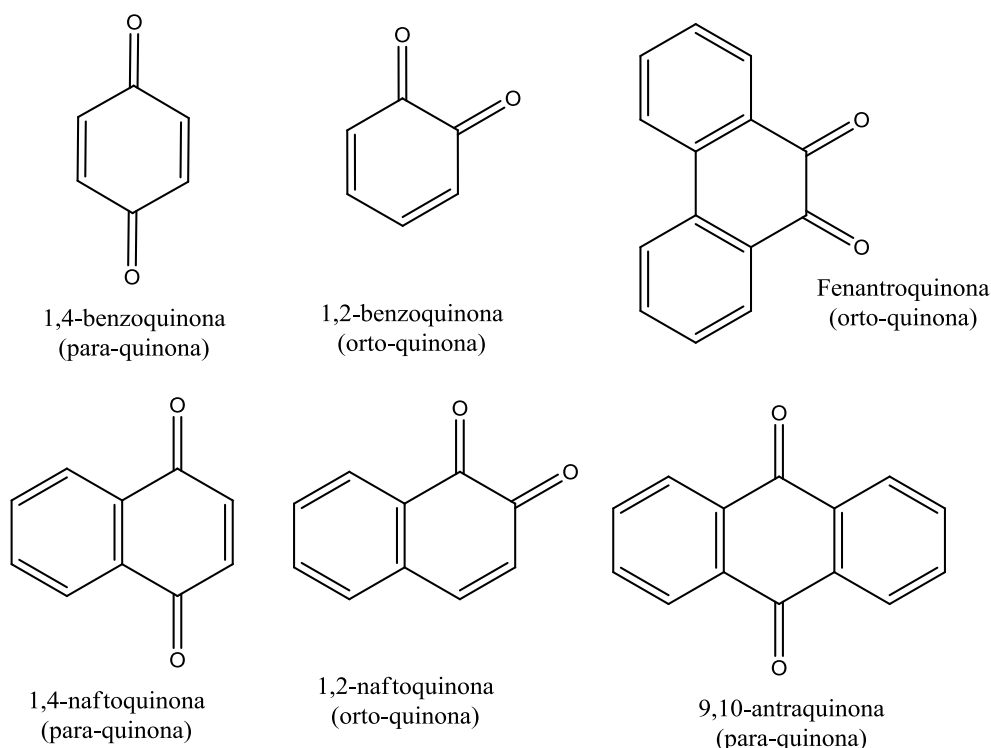


Figura 7. Estrutura química de *orto*- e *para*-quinonas

A simples alteração de posição das carbonilas no núcleo quinonóide leva a alteração significativa das propriedades físico-químicas e biológicas apresentadas entre os isômeros. Como exemplo pode-se citar a diferença na coloração apresentada por uma *o*-quinona, com as carbonilas inseridas na posição 1 e 2 do núcleo quinóide (cor laranja), bem como a de seu isômero que possui as carbonilas nas posições 1 e 4 (*p*-quinona, cor verde). Outro exemplo é o caso da β -lapachona, uma *orto*-naftoquinona muito mais ativa contra o *Trypanosoma cruzi* que seu isômero natural α -lapachona, uma *para*-naftoquinona (Silva et al., 2003).

Em um estudo publicado em 2001 a respeito da regeneração de aceptores de elétrons usados por várias flavoenzimas em biotransformações mostraram que *p*-quinonas, diferentemente de *o*-quinonas, não foram bons substratos para os estudos conduzidos com celobiose desidrogenase (Baminger et al., 2001).

1.2 Naftoquinonas

As naftoquinonas são quinonas relacionadas ao sistema naftalênico. A química e as propriedades biológicas das naftoquinonas já foram extensivamente estudadas, porém a importância da classe é tão grande, que a cada ano aumenta-se o número de publicações a respeito dessas moléculas. A **Figura 8**, mostra um gráfico da progressão do número de trabalhos publicados da década de 50 até o presente ano. Os dados utilizados nesse gráfico, foram obtidos através de busca na base de dados SciFinder (Data de consulta:01/07/2016).

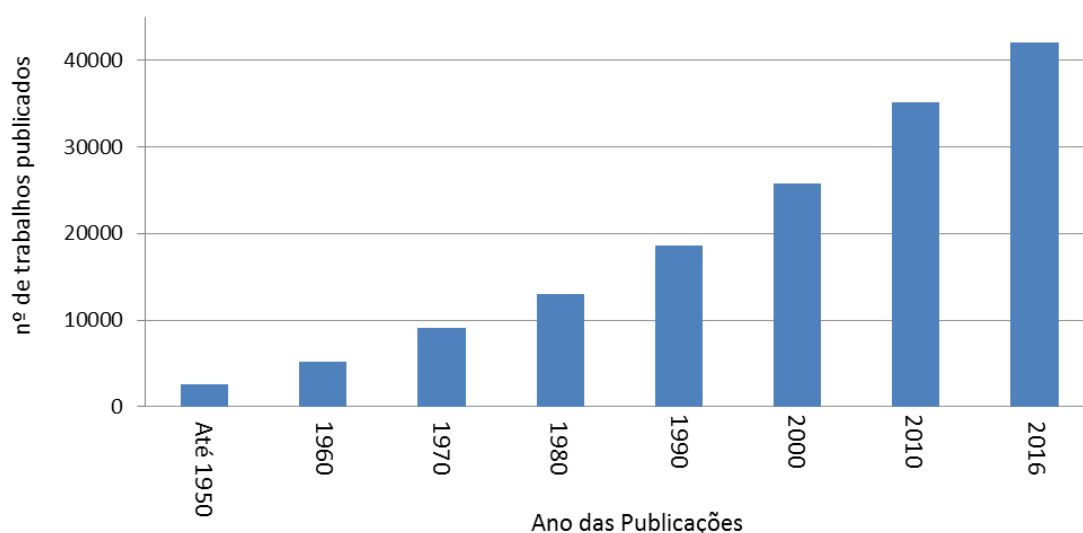


Figura 8. Gráfico do número de estudos sobre as naftoquinonas publicados na literatura entre 1900-2016. Fonte de Pesquisa: Base de Dados SciFinder (Acesso em 01/06/2016)

Uma característica comum entre a maioria das naftoquinonas, bem como das quinonas de um modo geral, é a presença de diferentes formas que encontram-se

normalmente em equilíbrio, porém sabe-se que dependendo do ambiente em que as mesmas se encontram, esse equilíbrio pode estar deslocado para uma forma ou outra. A

Figura 9 esquematiza as formas apresentadas pelas quinonas:

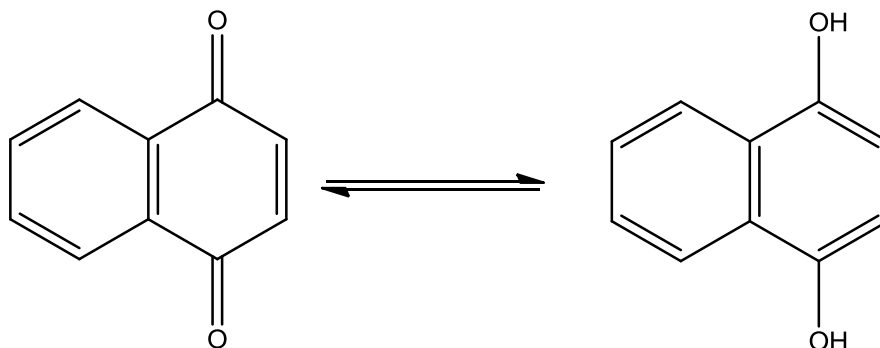


Figura 9. Formas tautoméricas resultantes do equilíbrio apresentado pelas quinonas

Algumas quinonas, podem apresentar ainda mais variações, como é o caso de algumas hidroxinaftoquinonas como a lausona, que apresenta uma hidroxila na posição α em relação as carbonilas do núcleo quinonóide. Na **Figura 10** estão apresentadas as três formas possíveis para a lausona (Chaudhary & Khurana, 2016):

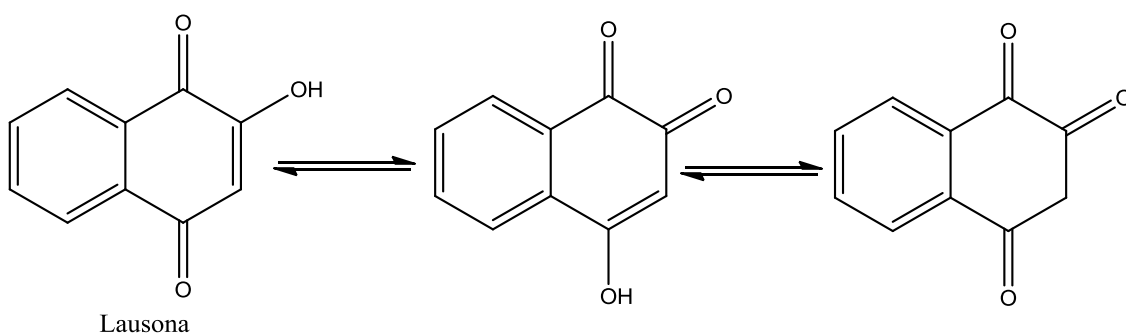


Figura 10. Formas da Lausona, uma hidroxinaftoquinona (Chaudhary & Khurana, 2016).

Dentre as naftoquinonas, os compostos 1,2- e 1,4-naftoquinonas, as mais simples entre a classe, são muito utilizadas na química orgânica e química medicinal, tendo em vista a facilidade com que estas sofrem os processos de oxidação e redução do núcleo quinonóide, que é a base para os processos de transporte de elétrons e de fosforilação oxidativa (Da Siva Junior et al., 2008). A presença de anéis redox acoplados a sistemas heterocíclicos (furânicos, pirânicos, pirrólicos, entre outros) nas posições 2,3 ou 3,4 do sistema naftalênico nas naftoquinonas, são algumas características estruturais que estão geralmente relacionados com ao aumento da bioatividade apresentada pelas mesmas (Silva et al, 2003).

A lausona, uma das naftoquinonas mais conhecidas e estudadas é componente majoritário das folhas de Henna (*Lawsonia inermis*). Extratos e tinturas desta planta têm sido utilizados como corantes naturais para cabelo e corpo, desde o antigo Egito, há mais de 4000 anos (Lemos et al., 2007). Devido a seu potencial biológico, a lausona, bem como as hidroxinaftoquinonas de um modo geral, têm sido muito utilizadas pelos químicos orgânicos sintéticos visando a obtenção de derivados químicos para avaliação da atividade biológica que os mesmos apresentam (Chaudhary & Khurana, 2016).

Outras naftoquinonas utilizadas como pigmentos naturais são a alcanina e a shiconina, presentes principalmente nas raízes de *Arnebia densiflora*, e utilizadas como corantes pela indústria farmacêutica, cosmética e têxtil (Lemos et al., 2007). O Zicao, extrato das raízes das plantas *Lithospermum erythrorhizon*, *Arnebia euchroma* e *Arnebia guttata* é muito utilizado, sobretudo pela medicina chinesa para o tratamento de diversas doenças, principalmente de lesões na pele e queimaduras. Esta formulação é rica em quinonas sendo que a shiconina se destaca com composto majoritário (Chen et al., 2002; Croft et al., 1985; Fournet et al., 1992 ; Lemos et al., 2007). A planta *Rubia cordifolia*, rica na naftoquinona molugina também é muito utilizada na medicina chinesa, pela sua

atividade antitumoral (Itokawa et al., 1993; Lumb et al., 2005; Lemos et al., 2007). A plumbagina, isolada de *Arnebia densiflora* é utilizada no tratamento da leishmaniose cutânea (Croft et al., 1985; Fournet et al., 1992; Lemos et al., 2007).

O lapachol é uma das naftoquinonas naturais mais conhecidas e estudadas. Conhecida desde 1858, essa molécula ocorre em abundância em plantas da família Bignoniaceae, particularmente no gênero *Tabebuia*, recentemente reclassificado como *Handroanthus*. Essa naftoquinona já foi produzida e comercializada como medicamento para o tratamento de alguns tipos de câncer, mas não está mais disponível no mercado em decorrência dos efeitos colaterais que acabavam agravando o estado clínico dos pacientes em tratamento, entre eles, a anemia, distúrbios de coagulação sanguínea e gastrointestinais (Da Silva et al., 2003; Oliveira et al., 1990). Além da atividade citotóxica, outras atividades biológicas já foram atribuídas ao lapachol, tais como antiparasitária (Goulart et al., 1997; Pinto et al., 2000), antimicrobiana, antifúngica (Garnier et al., 1996), anti-inflamatória (Almeida, 1990), entre outras.

A β -lapachona, componente minoritário de espécies do gênero *Handroanthus*, apresenta atividades biológicas como antibacteriana, antiparasitária, e sobretudo antineoplásica (Cavalcante et al., 2008). Existem muitas patentes envolvendo essa naftoquinona e seus derivados o que ressalta sua importância. Essa quinona também tem sido muito utilizada em estudos sintéticos, gerando, muitas vezes, derivados mais ativos que o material de partida, como ocorre no trabalho de Ferreira e colaboradores (2008), que ao promover modificação no anel pirônico dessa lapachona, conseguiu um derivado de elevada atividade antiparasitária (formas tripomastigotas de *T. cruzi*). As estruturas químicas de algumas naftoquinonas bioativas estão apresentadas na **Figura 11**.

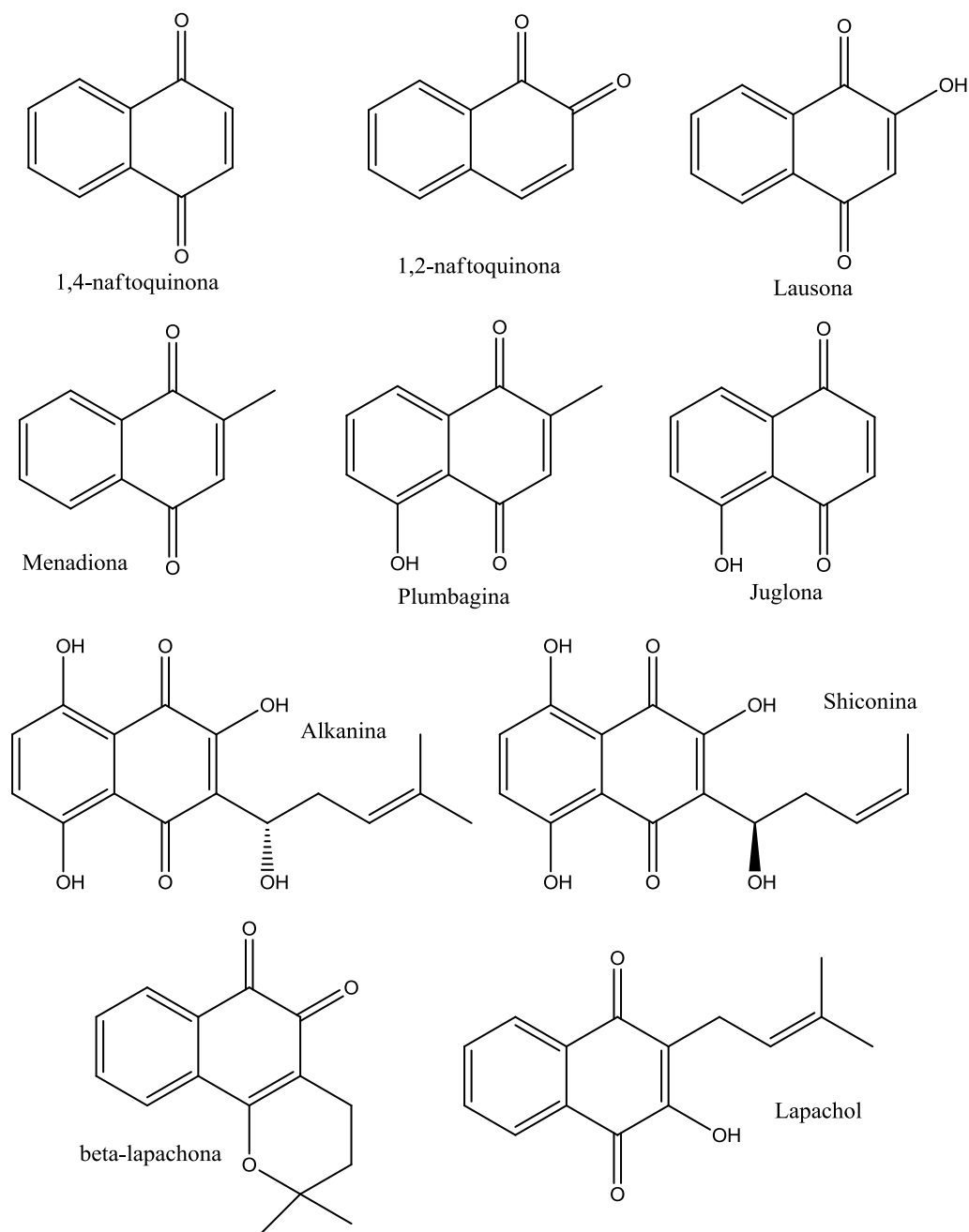


Figura 11. Estruturas químicas de naftoquinonas bioativas

A Vitamina K, é uma vitamina lipossolúvel muito conhecida por seu importante papel na coagulação sanguínea, mas que atua também nos mecanismos de regulação da calcificação dos vasos sanguíneos e proteção contra o estresse oxidativo (Shearer & Newman, 2008; Booth, 2009; Saito et al., 2007; Rajabi et al., 2010). Existem algumas formas diferentes de vitaminas K, porém todas elas apresentam o núcleo quinonóide

característico, variando apenas o substituinte da posição 3 do núcleo principal. A menadiona, que contém apenas uma metila na cadeia lateral é conhecida como a forma sintética da vitamina K. A filoquinona apresenta um grupo fitil na cadeia lateral e é o principal tipo de vitamina K presente em nossa dieta. A menaquinona, contém um grupo terpênico na cadeia lateral, e apesar de, em geral, ser pouco abundante nos alimentos, está presente em alguns tecidos sendo responsável por muitas propriedades atribuídas a essa classe de vitaminas (Shearer & Newman, 2008, Rajabi et al., 2010).

Durante o metabolismo, a cadeia lateral da filoquinona é removida, formando a menadiona, que se torna a principal forma da vitamina K conjugada e excretada pela urina. Ao invés de excretada, a menadiona pode também migrar para alguns tecidos e encontrar o grupo fitil eliminado da filoquinona, sendo então preniladas para formar a menaquinona (Rajabi et al., 2010; Martius, 1971). A **Figura 12** mostra os diferentes tipo de vitamina K.

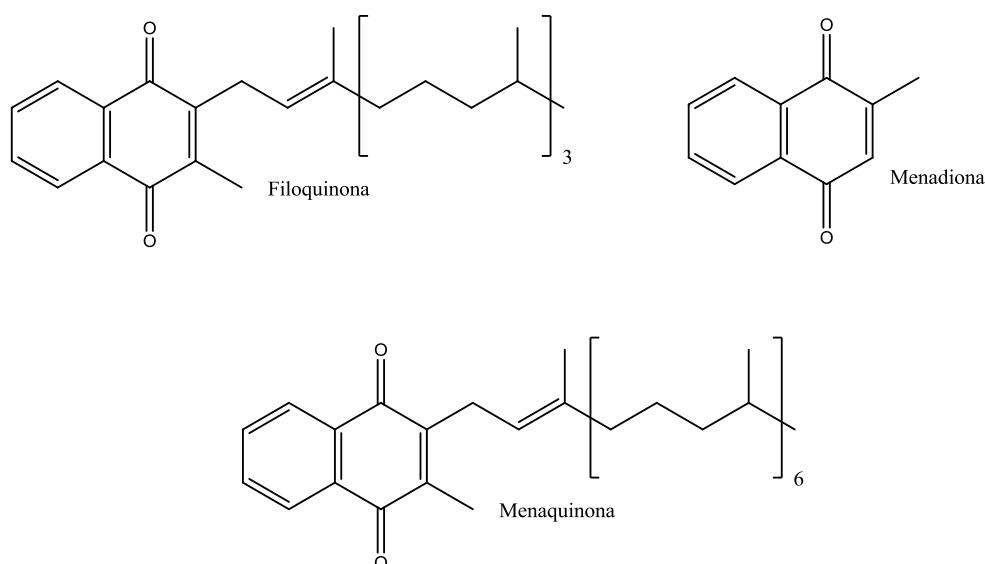


Figura 12. Estruturas químicas das vitaminas do grupo K

1.3 Citotoxicidade das quinonas

Dentre todas as atividades biológicas apresentadas pelas quinonas, a atividade citotóxica é destacada pelo grande número de trabalhos reportados na literatura. A medicina popular tem utilizado preparações de plantas medicinais ricas em quinonas para o tratamento de tumores há muitos anos (Martinez & Benito, 2005).

Um dos exemplos se dá pelo uso das raízes ou rizomas da planta *Rheum palmatum* L., popularmente conhecida como Ruibarbo, rica na antraquinona emodina, ou ainda pelas folhas de *Aloe vera* L., ricas na antraquinona aloe-emodina. Existem estudos que comprovam que esses compostos são capazes de induzir a apoptose de algumas células tumorais de forma específica, sendo, portanto atóxicas para as células normais (Kamei et al., 1998; Lee, 2001; Lee et al., 2001; Shi et al., 2001).

A β -lapachona, encontrada nas folhas de plantas do gênero *Handroanthus*, bem como seus derivados sintéticos, estão entre as naftoquinonas mais estudadas por sua atividade antitumoral, sobretudo em linhagens de células de tumores de próstata e mama (Martinez e Benito, 2005). Muitas outras naftoquinonas apresentam atividade antitumoral, dentre estas, a juglona, plumbagina e menadiona.

A atividade citotóxica apresentada por tantas quinonas torna possível sugerir que tal propriedade seja intrínseca ao núcleo quinonóide e que pode ser intensificados de acordo com os grupos químicos presentes em cada molécula (Da Silva et al., 2003; Brand & Fisher, 1990). O mecanismo pelo qual as quinonas exercem o efeito citotóxico ainda não foi totalmente elucidado e, acredita-se que esta propriedade deve ocorrer por diferentes mecanismos.

A toxicidade das quinonas pode ser atribuída ao estresse oxidativo induzido pelo ciclo redox desses compostos nas células. Nesse ciclo, as quinonas podem seguir por dois caminhos diferentes (**Figura 13**). O primeiro caso se dá através da redução de um

elétron no núcleo quinoide, resultando na formação de uma espécie (radical) chamada semiquinona que pode reagir com átomos de oxigênio, que promovem sua oxidação e a consequente formação de um radical superóxido. A dismutação desse radical gera espécies de H_2O_2 , que, na presença do peptídeo glutaciona (em sua forma reduzida, GSH), pode ser metabolizada em água pela enzima glutaciona peroxidase, que faz parte do sistema de defesa antioxidante celular. Os radicais livres remanescentes a esse processo são altamente deletérios para as células, levando-as a morte. Outro caso seria a redução de dois elétrons na estrutura das quinonas que, nesse caso, resultaria em uma hidroquinona sem a formação de radicais livres como intermediários (Chiou et al., 1997; Jewell et al., 1982; Thor et al., 1982 Tzeng et al., 1994). Caso as células não consigam eliminar por completo os elementos que causam o estresse oxidativo, o balanço dos sinais envolvidos na divisão celular é alterado, induzindo o processo de apoptose (Da Silva et al., 2003).

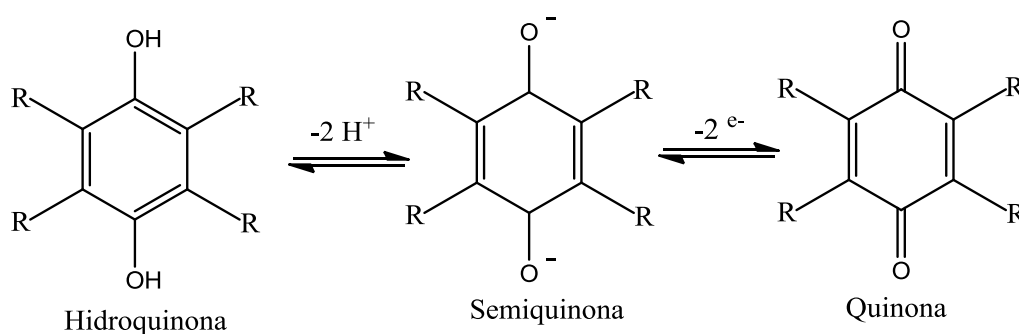


Figura 13. Ciclo redox das quinonas (Da Silva et al., 2003).

Outros fatores que podem estar relacionados com a atividade citotóxica das quinonas é a capacidade de serem reduzidas por flavoenzimas celulares, ou devido a redução das carbonilas presentes, que ativam a saída de grupos abandonadores presentes

no núcleo quinonóide, gerando intermediários alquilantes (agentes antineoplásicos biorredutores) (Da Silva et al., 2003; Salmon-Chemin et al., 2001; Lin et al., 2001).

Tal atividade pode ser explicada também pela capacidade de inibição da enzima DNA-polimerase I (Martinez e Benito, 2005). Estudos comprovaram que naftoquinonas que apresentam ao menos um grupo fenólico em sua estrutura, são inibidores mais potentes desse tipo de enzima (Plyta et al., 1998; Hisa et al., 1998). Estudos de Gokhale e colaboradores (2000) mostraram que a complexação de íons metálicos com as hidroxinaftoquinonas antitumorais pode potencializar ainda mais essa propriedade, sendo a atividade máxima apresentada pela lausona complexada com cobre. Sabe-se também que as *p*-quinonas possuem maior potencial antitumoral que as *o*-quinonas (sobretudo as que contêm grupos reativos ou as heterocíclicas) (Powis, 1989).

A quinona, 2-metil-*p*-benzoquinona, foi o primeiro composto testado como agente antitumoral pelo *National Cancer Institute* (NCI) nos Estados Unidos, em 1955. A partir daí mais de 1500 quinonas já foram avaliadas, e hoje as quinonas são a segunda maior classe de compostos aprovados para uso clínico como agentes antitumorais nos Estados Unidos, perdendo apenas para os agentes alquilantes. Muitas outras quinonas ainda estão em fases de desenvolvimento clínico e pré-clínico (Beall & Winski, 2000; Driscoll et al., 1974; Powis, 1989). Alguns exemplos de estruturas químicas de quinonas citotóxicas estão apresentados na **Figura 14**.

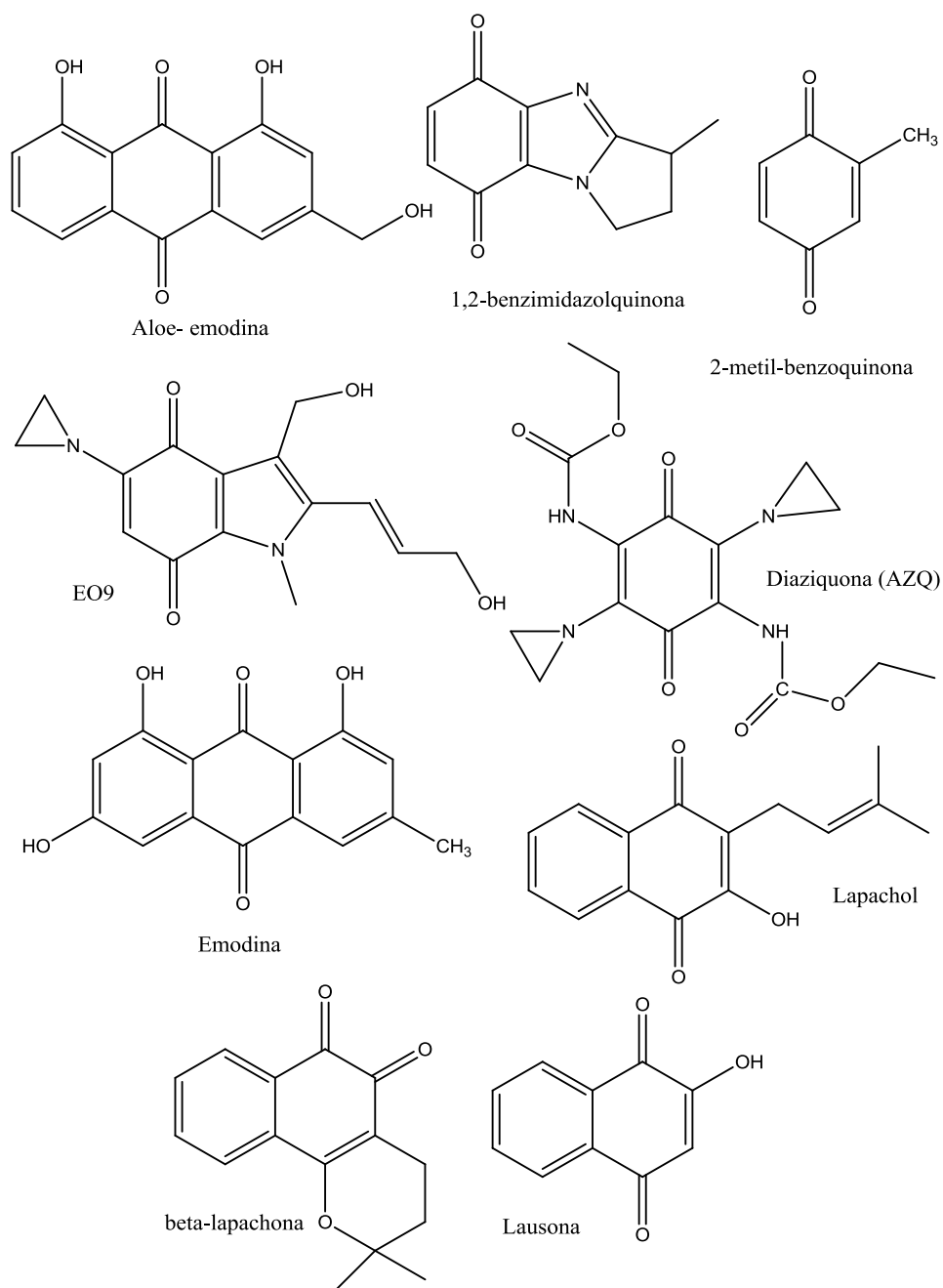


Figura 14. Estruturas químicas de quinonas com atividade citotóxica

1.4 Biotransformação

Historicamente as biotransformações têm sido investigadas desde os tempos de Pasteur e foram impulsionadas por grandes químicos e bioquímicos do século XIX. As reações de biotransformação são definidas como o uso de sistemas biológicos para

realização de modificações químicas em estruturas que não são seus substratos naturais (Hanson, 1995). Através desta técnica, moléculas orgânicas podem ser modificadas com degradação ou não do esqueleto carbônico. Apesar das biotransformações empregarem enzimas isoladas ou qualquer sistema biológico que as contenham, o uso de células íntegras de organismos vivos (fungos, bactérias, algas ou células vegetais) é particularmente vantajoso, pois estes apresentam uma taxa de crescimento rápida e um sistema multienzimático de fácil formação (Bastos, 2005).

Historicamente as biotransformações têm sido investigadas desde os tempos de Pasteur e dados históricos apontam que o primeiro processo de biotransformação ocorreu na antiga Babilônia com a transformação de etanol em ácido acético (vinagre), catalisada por *Acetobacter* (Leresche & Meyer, 2006), assim como apresentado no esquema da **Figura 15**.

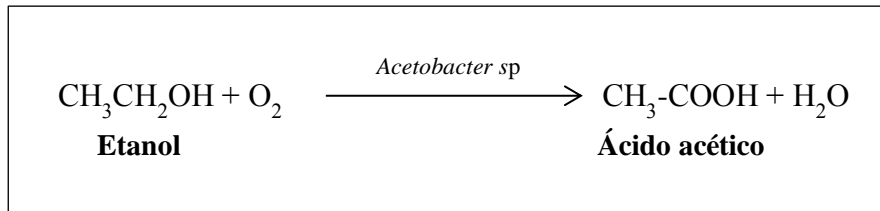


Figura 15. Biotransformação do etanol em ácido acético

O progresso do uso das biotransformações foi relativamente lento até 1950, quando o uso de micro-organismos para modificar núcleos esteroidais foi estudado em laboratórios acadêmicos e industriais, despertando novamente o interesse na aplicação desses catalisadores biológicos em problemas da química orgânica sintética. A partir daí, o impacto da técnica só tem aumentado, sobretudo na área farmacêutica, que tem investido bilhões de dólares no setor (Wilke, 1995). Dados de 2002 apontaram que 134

processos utilizando biotransformação estavam sendo empregados em escala industrial (Straathof, 2002).

Uma das principais razões pelo interesse nas reações de biotransformação se dá pela variedade de tipos de enzimas diferentes, que são capazes de promover quase todos os tipos de reações existentes (Lereshe & Meyer, 2006). Apesar dessa variedade, pode-se observar que a maioria dos processos enzimáticos costuma envolver hidrolases (44%) e oxidoredutases (30%). Algumas bases de dados específicas da área registraram a existência de mais de 35.000 reações enzimáticas até o ano de 2002 (Straathof, 2002). Outro aspecto interessante de se utilizar reações enzimáticas é que essas colaboram com a atual tendência da química verde, que incentiva os processos que não prejudicam o meio ambiente, oferecendo alternativas para substituir os metais pesados presentes na maioria dos reagentes da síntese orgânica. Vale lembrar que, ainda nessa vertente, as reações de biotransformação acontecem em fase aquosa e não necessitam de temperatura e pressão extremas para ocorrerem o que diminui o uso energético, fazendo a técnica mais ecologicamente correta (Bull et al., 1999; Held et al., 2000).

As enzimas são biocatalisadores capazes de promoverem reações orgânicas de modo muito similar ao dos reagentes químicos. Uma das vantagens da catálise enzimática frente à catálise química é baseada na alta especificidade da reação promovida em relação a estrutura e a estereoquímica do substrato (material de partida) utilizado e do produto formado. Além disso, sabe-se que em condições reacionais brandas as taxas de formação de um produto em uma reação enzimática são otimizadas, graças à baixa energia de ativação necessária para a formação do complexo enzima-substrato. Outras características dessas bioreações estão listadas na **Tabela 1** (Adaptada de Hudlicky & Reed, 2009).

Tabela 1. Principais vantagens e desvantagens dos processos de biotransformação (Adaptada de Hudlicky & Reed, 2009).

Biotransformações	
Vantagens	Desvantagens
<ul style="list-style-type: none"> - Aplicação a diversos tipos de substratos - Elevada régio-, enantio- e estereoseletividade - Condições reacionais brandas - Técnica ecologicamente adequada (“Química Verde”) - Formação e quebra de ligações C-C - Baixos custos operacionais - Não é necessário proteger e desproteger grupos químicos - Diminuição da formação de reações indesejadas - Alta versatilidade 	<ul style="list-style-type: none"> - Necessidade de triagem para seleção do sistema biológico utilizado - Baixa previsibilidade do processo - Baixo rendimento reacional - Tempo experimental médio-longo

Por se tratarem de reações mediadas por sistemas biológicos de organismos vivos, as reações de biotransformação são sensíveis às condições experimentais utilizadas, sendo que, mínimas alterações metodológicas, podem resultar em grandes modificações no resultado obtido. Portanto, variações na temperatura, composição do meio, pH do meio, condições de incubação, agitação e aeração das culturas, fase de desenvolvimento do organismo que atuará como biocatalisador, entre diversos outros fatores devem ser considerados. Assim, todos os aspectos experimentais devem ser avaliados e padronizados a fim de se obter o melhor resultado possível. Não existem regras para esses procedimentos, as melhores condições experimentais devem ser estabelecidas a partir dos resultados experimentais (Leuenberger, 1990).

Em termos experimentais, as reações de biotransformação consistem, basicamente em cultivar o organismo que realizará a reação para posterior adição da substância orgânica de interesse (substrato ou material de partida) em contato com o sistema biológico escolhido, pelo tempo necessário para a obtenção do produto desejado. Após esse período, o caldo resultante das culturas dos organismos biocatalisadores é separado de sua biomassa, para posterior extração das partes com o(s) solvente (s) orgânicos adequados. O(s) extrato(s) são então concentrados e analisados para se detectar se houve ou não a formação do produto desejado. Se o produto for formado, são elaborados então estratégias de isolamento e separação para purificá-lo. É importante que se prepare o controle dos experimentos realizados, a fim de distinguir quais produtos são oriundos da biotransformação do substrato e quais são produtos do metabolismo do organismo.

Toda essa vantagem tem feito da biotransformação uma ferramenta cada vez mais útil para modificação estrutural de compostos orgânicos, sobretudo de substâncias de origem natural, que podem ter seus complexos esqueletos químicos modificados, fornecendo moléculas, por vezes inéditas e de propriedades, químicas, biológicas e toxicológicas ainda desconhecidas. Muitos relatos na literatura empregam essa estratégia e observa-se que, em muitos casos, as biotransformações promovem pequenas alterações no esqueleto químico de diversos produtos naturais, melhorando seu potencial farmacológico e diminuindo seu potencial toxicológico (Straathof et al., 2002; Leuenberger, 1990). Diversas substâncias de origem natural já foram utilizadas como material de partida nas reações de biotransformação, dentre elas os esteroides, flavonoides, alcaloides, terpenos, entre outros.

1.5 Biotransformação e estudos de metabolismo

Moléculas de fármacos, toxinas, contaminantes ambientais e todas as demais substâncias químicas endógenas ou exógenas que são absorvidas por nossos organismos, entram em contato com as células sofrendo transformações pelos sistemas enzimáticos presente nas mesmas. Apesar do termo metabolismo e biotransformação serem usados como sinônimos em muitos casos sabe-se que por definição o termo metabolismo é utilizado para descrever modificações enzimáticas em substratos endógenos enquanto biotransformação se refere a modificações em substratos exógenos conhecidos também como xenobióticos (Barreiro et al., 1996).

Para se compreender o efeito de uma substância em nosso organismo é preciso conhecer o modo de ação desse composto, a toxicidade apresentada pelo mesmo, os padrões farmacocinéticos de distribuição, excreção e armazenamento do xenobiótico, bem como seu perfil de metabolização (Asha & Vidyavatchi, 2009).

Os estudos de metabolização de fármacos são uma etapa importante durante o desenvolvimento de novos fármacos quer seja pela identificação química dos derivados formados bem como por suas propriedades farmacológicas e toxicológicas. Os dados obtidos ajudam a identificar os sítios moleculares mais suscetíveis a modificação, possibilitando a previsão dos resultados obtidos (Person & Wienker, 2008). Além disso, o conhecimento das bases moleculares de biotransformação dos fármacos permite racionalizar a respeito dos requisitos estruturais necessários para uma determinada atividade, fazendo com que seja possível o delineamento de moléculas mais ativas e menos tóxicas (Barreiro et al., 1996). Nos organismos vivos, as reações de metabolismo podem ser divididas em dois tipos: As reações de metabolismo podem ser divididas em fase I (oxidações, reduções e hidrólise) e reações de fase II (glicuronidação, sulfatação, acilação, metilação e formação de adutos com a glutatona) (Coleman, 2010).

Mudanças moleculares singelas nos compostos administrados podem acarretar em profundas alterações nas respostas biológicas apresentadas pelos mesmos. A maioria das reações de biotransformação tornam os substratos mais polares para facilitar a excreção dos metabólitos pela urina e outros fluídos corporais, mas podem ainda servir para ativar ou inativar compostos (Person & Wienker, 2008). Um dos exemplos que ressaltam a importância da biotransformação de fármacos é o caso do Prantosil, que após sofrer uma reação de redução, se transforma na sulfonilamida, uma molécula de conhecida atividade antibiótica.

Apesar da importância de se compreender o metabolismo dos fármacos, as discussões e implementação desse tipo de estudos só tem ganhado espaço recentemente. Em 2008, a agência americana *Food and drug Administration* (FDA) lançou um guia para os testes de segurança relacionados aos metabólitos de fármacos (FDA, 2008). No ano seguinte foi à vez da agência europeia lançar suas preconizações (EMA, 2009). De acordo com essas especificações, deve-se avaliar a toxicidade dos metabólitos que sejam formados em quantidade igual ou maior que 10% em relação a quantidade de fármaco administrada ou ainda para aqueles metabólitos que foram identificados em humanos após os estudo clínicos. A organização mundial de saúde (OMS) estabelece que os estudos de metabolismo sejam parte obrigatória da avaliação clínica e pré-clínica de novos fármacos (Barreiro et al., 1996).

Além de servirem como ferramenta eficaz para a obtenção de compostos bioativos, os estudos de biotransformação feitos através de células íntegras de micro-organismos cultivados em meios apropriados, onde toda a maquinaria enzimática está disponível, podem mimetizar as reações de metabolização que ocorrem nos animais *in vivo* após a administração de xenobióticos (Asha & Vidyavatachi, 2009). Isso se dá pela

similaridade entre o metabolismo hepático nos animais e o metabolismo enzimático microbiano.

Os estudos de metabolismo convencionais utilizam modelos animais, o que além de encarecer o processo, ainda apresentam pontos críticos como as questões éticas relacionadas a própria experimentação animal, bem como pela diferença significativa entre os sistemas biológicos das espécies testadas. Além disso, as técnicas convencionais ficam limitadas as pequenas quantidades de produto formadas, sobretudo em casos onde o composto em questão apresentar toxicidade e, portanto deverá ser administrado em baixas concentrações.

Há descrições na literatura da formação de quinonas citotóxicas após a metabolização oxidativa de alguns xenobióticos (medicamentos, poluentes ambientais e toxinas). Como exemplo deste processo pode-se citar o caso do fármaco acetaminofeno, vastamente utilizado como analgésico e antipirético, e que em altas doses pode causar icterícia e outros danos hepáticos severos, podendo levar o indivíduo a morte. A hepatotoxicidade do acetaminofeno é atribuída a N-acetil-p-benzoquinoneimina, a qual após hidrólise resulta em uma simples para-benzoquinona. Outro exemplo é a fenacetina, cujo metabólito ativo também é o paracetamol, mas que apesar de seu potencial analgésico, teve seu uso descontinuado, também devido à formação de metabólitos quinoides tóxicos, após a metabolização hepática. Embora esses compostos apresentem estrutura muito similar, as reações adversas são distintas entre eles. A fenacetina pode levar a nefropatia grave, razão pela qual foi retirada do mercado em muitos países. Já o paracetamol, apesar de causar necrose às células hepáticas, integra mais de 20 formulações farmacêuticas no Brasil (Barreiro et al., 1996). Essas reações são mostradas na **Figura 16**

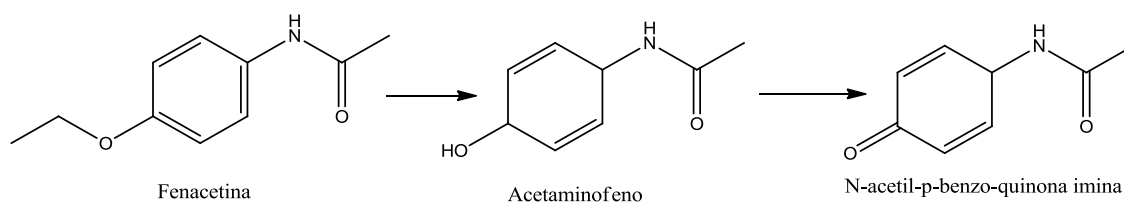


Figura 16. Biotransformação do acetaminofeno (Barreiro et al., 1996).

Outro exemplo é o dos hormônios esteroidais estrogênicos, como por exemplo, o dietilbestrol e 2-hidroxi-estradiol (**Figura 17**), que após sofrerem metabolização, passam a conter o núcleo quinonoide em sua estrutura. Tais metabólitos podem causar câncer de mama (O'brien, 1991 ; Bolton et al., 2000).

Experimentalmente, os estudos de metabolismo necessitam de técnicas analíticas sensíveis e eficazes aliadas a procedimentos de extração eficientes para detectar os metabólitos formados, que usualmente ocorrem em pequenas concentrações. Para isso é importante à previsão das características físico-químicas e da estabilidade desses derivados, permitindo a racionalização das escolhas dos procedimentos experimentais empregados (Barreiro et al., 1996).

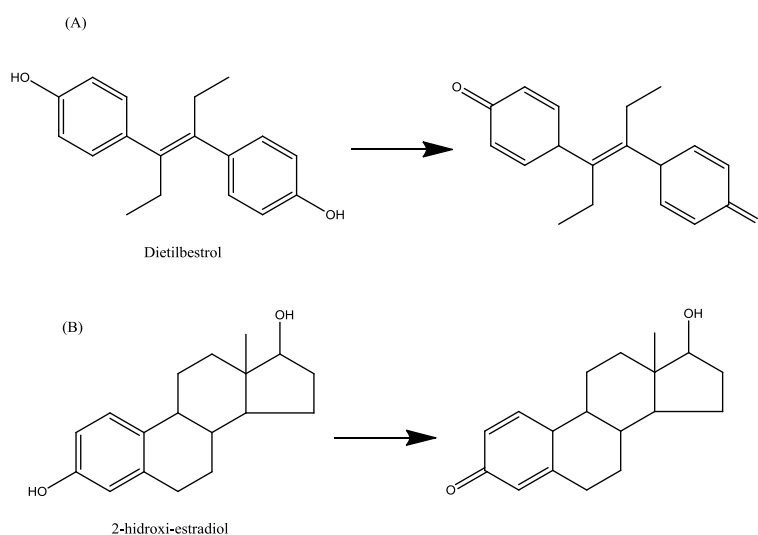


Figura 17. Biotransformações do dietilbestrol (A) e do 2-hidroxi-estradiol (B) em metabólitos contendo o núcleo quinonoide (Barreiro et al., 1996).

1.6 Micro-organismos

Os micro-organismos são conhecidos há mais de um século, entretanto, alguns têm sido utilizados por milhares de anos sem o prévio reconhecimento de sua existência (Finkelstein & Ball, 1992). Com certeza a vida na terra não seria possível sem a presença deles. O mundo microbiano é rico em espécies, as quais possuem imensa variedade de enzimas agrupadas, possibilitando uma ampla gama de reações em diversas classes de substâncias químicas.

1.6.1 Fungos

A diversidade de micro-organismos existentes é imensa, e sendo assim, muitas são as possibilidades de escolha do organismo para o processo desejado. Em geral, os fungos são os sistemas celulares mais empregados nas reações de biotransformação (Ma et al., 2011), tanto pela variedade de reações catalisadas (oxidações, reduções, epoxidações, o-desmetilações, glicosilações entre outras), quanto pela facilidade no cultivo e maior produção de biomassa (Srisilam & Veeresham, 2003). O primeiro trabalho empregando fungos como modelos para o metabolismo de mamíferos foi publicado em 1974 por Smith e Rosazza, e desde então, o número de trabalhos relacionados tem aumentado cada vez mais.

A utilização de fungos como modelos para metabolização de xenobióticos está baseada no princípio de que os fungos são organismos eucariotos cujo aparato enzimático se assemelha com o dos mamíferos (Abourached et al., 1999). Sabe-se que as enzimas do citocromo P450 humanas podem ser reproduzidas com facilidade nesse tipo de micro-organismos (Ma et al., 2006).

Já existem descritos na literatura alguns modelos microbianos clássicos para serem utilizados nos estudos de metabolismo. Um dos exemplos mais difundidos são os

fungos do gênero *Cunninghamella* conhecidos por serem modelos confiáveis de predição de metabolismo. Ao todo, o gênero conta com 14 espécies que possuem destacado potencial para realizar reações de hidrólise e redução (Asha & Vidyavathi et al., 2009).

Cunninghamella elegans é um fungo filamentosos encontrado no solo e em plantas, principalmente em zonas subtropicais e no Mediterrâneo, sendo este uma das principais espécies de seu gênero (Hoog et al., 2000; Larone, 1995; St-Germain & Summerbell, 1996; Sutton et al., 1998). Esse micro-organismo é capaz de metabolizar uma grande variedade de xenobióticos, realizando tanto reações de fase I , quanto de fase II (Zhang et al., 1996).

Fármacos como o propranolol (beta bloqueador), prednisona (anti-inflamatório esteroide), naproxeno (anti-inflamatório), levonorgestrel (contraceptivo oral), furosemida (diurético), artemisinina (anti malárico) já foram submetidos a estudos de biotransformação por fungos do gênero *Cunninghamella* e os metabólitos encontrados foram similares aos obtidos nos estudos *in vivo*. O trabalho de Asha & Vidyavathi (2009), apresenta uma revisão sobre o uso desses micro-organismos para estudos de metabolismo, comparando os metabólitos produzidos por mamíferos e por micro-organismos de 91 moléculas diferentes, destacando a similaridade entre muitos exemplos.

Os fungos do gênero *Aspergillus* correspondem a um grupo diverso de micro-organismos saprofitos, capazes de crescer em uma vasta quantidade de substratos orgânicos diferentes. Estima-se que cerca de 180 espécies pertençam a este gênero (Henry et al.,2000). São apontados como a causa mais frequente em infecções invasivas em pacientes imunodeprimidos, mas, apesar desses aspectos negativos, trata se de um conjunto de micro-organismos extremamente versáteis em termos metabólicos, (Geiser

et al., 1996; Pelcsar et al., 1997; Magnoli et al., 1998). Além disso, muitas espécies de *Aspergillus* são úteis do ponto de vista industrial, quer seja na produção de antibióticos, em fermentações industriais, na biotecnologia e na produção de enzimas comerciais (Yokoyama et al., 2001; Abarca et al., 2009).

Existe um crescente número de informações sobre o uso desse gênero em reações de biotransformação visando modificações seletivas em estruturas de produtos naturais e sintéticos, tais como flavonoides (Miyazawa et al., 2004), cumarinas (Aguirre-Pranzon et al., 2011), lignanas (Miyazawa et al., 1993), esteroides (Al-Aboudi et al., 2009) além de várias classes de terpenoides (Demyttenaere et al., 2000, Shen et al., 2003; Arakawa et al., 2005). Em geral, fungos deste gênero tem realizado vários tipos de reações, como desmetilações (Miyazawa et al., 2004), hidrólises (Demyttenaere et al., 2000; Miyazawa et al., 2004), mas sobretudo oxidações (Aguirre-Pranzoni et al., 2011; Keppler et al., 2005; Lamm et al., 2008; Miyazawa et al., 2003).

Outros micro-organismos também foram utilizados com sucesso em processos de biotransformação para reproduzir o metabolismo de fármacos em mamíferos, entre estes: *Aspergillus alliaceus*, *Curvularia lunata*, *Beauveria bassiana*, espécies de *Cunninghamella*, *Streptomyces* e do gênero *Pseudomonas* (Venisetty & Ciddi, 2003).

1.6.1 Bactérias lácticas

Além da utilização de fungos para avaliação da biotransformação de fármacos, o uso de bactérias da microbiota intestinal também se torna uma ferramenta extremamente útil, uma vez que xenobióticos, quando ingeridos, podem ser metabolizados por esses micro-organismos.

Bactérias lácticas, também conhecidas como probióticos, constituem um grande grupo de bactérias produtoras de ácido láctico, como produto final do processo de fermentação. Essas bactérias se encontram usualmente no intestino, que possui condições apropriadas de crescimento das mesmas, sobretudo em torno da válvula ileocecal (Faigle, 1993).

Estes micro-organismos pertencentes a microbiota gastrointestinal desenvolvem funções importantes no local em que colonizam. Evidências indicam que a microbiota intestinal regula a nossa fisiologia e metabolismo (Lahti et al. 2013) e dentre estas funções destacam-se: a capacidade de impedir ou reduzir a multiplicação de micro-organismos exógenos que eventualmente penetrem no ecossistema digestivo; capacidade de modular algumas características da fisiologia digestiva, como a imunidade da mucosa e a permeabilidade intestinal; capacidade de oferecer diversas fontes energéticas e de vitaminas; capacidade de realizar reações metabólicas de redução, hidrólise e ruptura de anéis heterocíclicos, produzindo substâncias menos polares de baixo peso molecular (Sekirov et al., 2010).

Dados de 2005 apontam que existam no intestino mais de 800 espécies de bactérias, entre elas as do gênero *Bifidobacterium* sp e *Lactobacillus* sp (Van der Mooter & Kinget, 1995; Backhed et al., 2005). Dessas, cerca de 30 espécies pertencem ao gênero *Bifidobacterium*, bactérias filogeneticamente agrupadas como actinomicetos Gram-positivos (Sgorbati et al., 1995), e representam até 25% das bactérias fecais cultiváveis em adultos e 80% em lactantes. Como agentes probióticos, as bifidobactérias foram estudadas por sua eficácia na prevenção e no tratamento de um amplo espectro de transtornos gastrointestinais (Picard et al., 2005).

Os lactobacilos são utilizados em muitos produtos probióticos. Dentre as espécies, destaca-se *Lactobacillus acidophilus* que propicia efeitos benéficos à saúde

como: modulação da atividade metabólica de bactérias intestinais, prevenção de diarreia associada a antibióticos, preservação da integridade intestinal durante a radioterapia, estimulação da resposta imune sistêmica, aumento da biodisponibilidade do ferro e produção de substâncias antimicrobianas (Mountzouris et al., 2009; Vaughan et al., 1999).

Escherichia coli é uma bactéria Gram-negativa que normalmente faz parte da microbiota intestinal (Duriez et al., 2001). Biotransformações utilizando diferentes cepas de *E. coli* revelaram a capacidade metabólica dessa espécie frente as isoflavonas daidzeína e genisteína (Hur et al., 2000). Outros autores constataram que a mesma promove N-acetilação no fármaco celecoxibe (Srisailam e Veeresham, 2010). Diante dessas características, essa bactéria se torna uma ótima opção para estudos direcionados a biotransformação de fármacos.

Sabe-se que mais de 30 fármacos disponíveis no mercado são modificados pelas bactérias intestinais (Sousa et al., 2008). É necessário conhecer a influência que tal microbiota exerce no metabolismo de todas as classes de fármacos a fim de não somente revolucionar as estratégias terapêuticas para muitas doenças, mas também para garantir a eficácia dos medicamentos. A ação da microbiota sobre fármacos deveria integrar os procedimentos para desenvolvimento de novos medicamentos (Sousa et al., 2008). Alguns exemplos de fármacos metabolizados pela microbiota intestinal são o cloranfenicol, protonsil, digoxina e a imipramina. Estes compostos chegam ao intestino, onde são expostos a bactérias intestinais que podem catalisar uma grande variedade de reações metabólicas gerando substâncias benéficas como, por exemplo, os fitoestrógenos ou ainda compostos prejudiciais ou tóxicos (Raimondi et al., 2009). Em contraste com a predominância do metabolismo oxidativo e conjugativo que ocorre na mucosa do fígado e do intestino, o metabolismo bacteriano é composto, em grande

parte, por degradação hidrolítica e redutora com um grande potencial para a ativação metabólica e de desintoxicação de xenobióticos, devido à produção de enzimas como β -glucosidases, β -glucuronosidases, nitroreduases, sulfóxido-reduases, amida hidroxilases, desaminases, acetiltransferases, β -galactosidases, etc (Ilett et al., 1990).

1.7 Biotransformação de naftoquinonas

Através da análise de dados disponíveis na literatura pode-se perceber que existem poucos estudos a respeito da biotransformação das naftoquinonas. Meselhy e colaboradores (1994) realizaram a biotransformação da chiconina por bactérias isoladas de fezes humanas, obtendo quatro produtos de biotransformação, sendo dois deles oriundos da dimerização do esqueleto da chiconina (**Figura 18**). Ainda neste trabalho, a mesma naftoquinona foi biotransformada pela bactéria *Bacteroides fragilis*, originando outros dois derivados estruturais (**Figura 19**).

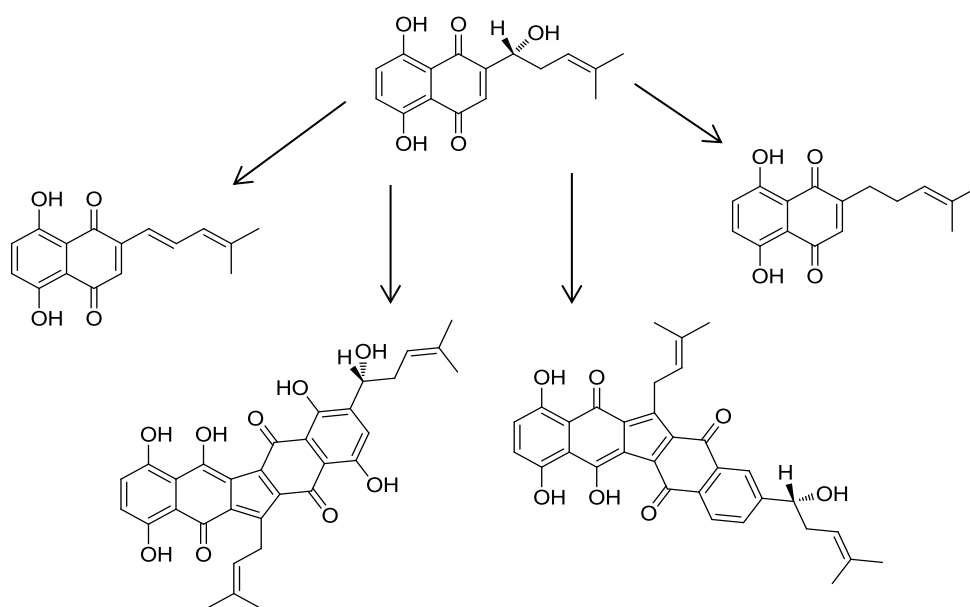


Figura 18. Biotransformação da chiconina por bactérias intestinais (Meselhy et al., 1994)

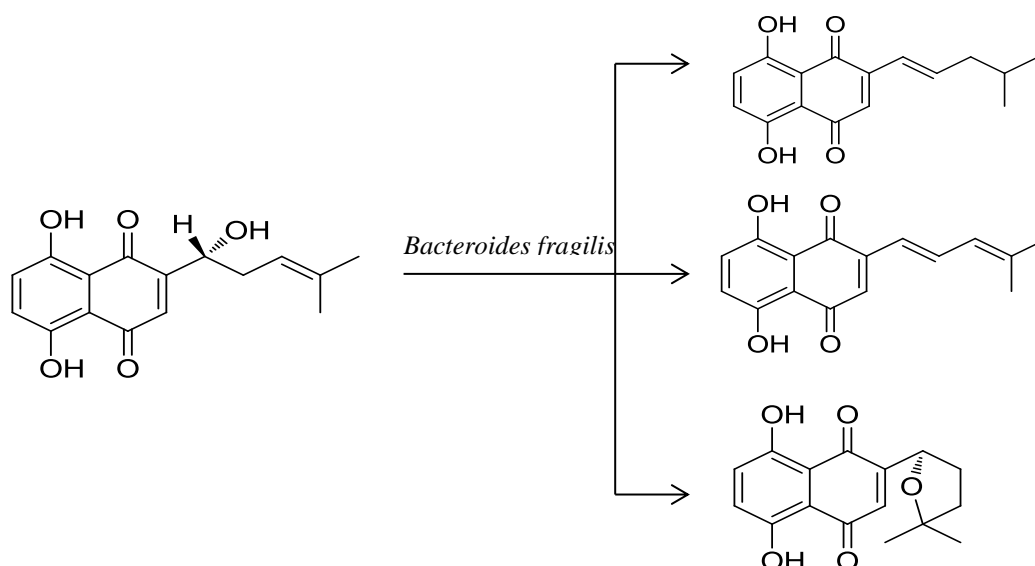


Figura 19. Biotransformação da chiconina por *Bacteroides fragilis* (Meselhy et al., 1994)

Outro exemplo interessante foi à clivagem oxidativa realizada por *Streptomyces platensis* NRRL 2364, capaz de formar um produto com rendimento de 65% (após purificação) após 48 horas de reação (**Figura 20**) (Le Texier et al., 2001).

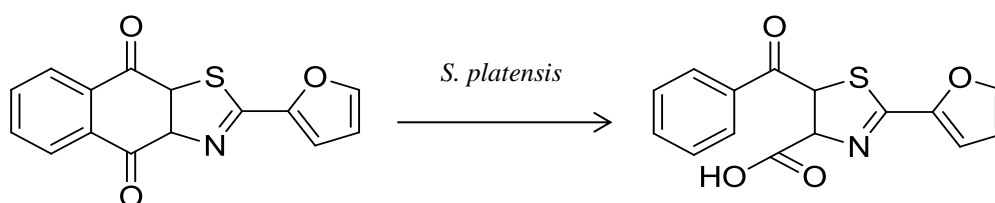


Figura 20. Clivagem oxidativa realizada por *S.platensis* (Le Texier et al., 2001).

Fosse e colaboradores (2004) demonstraram a biotransformação da naftoquinona codificada por INO5042 por cepas do gênero *Streptomyces*. Este micro-organismo foi

capaz de realizar a clivagem oxidativa do núcleo quinoide com bons rendimentos reacionais (**Figura 21**).

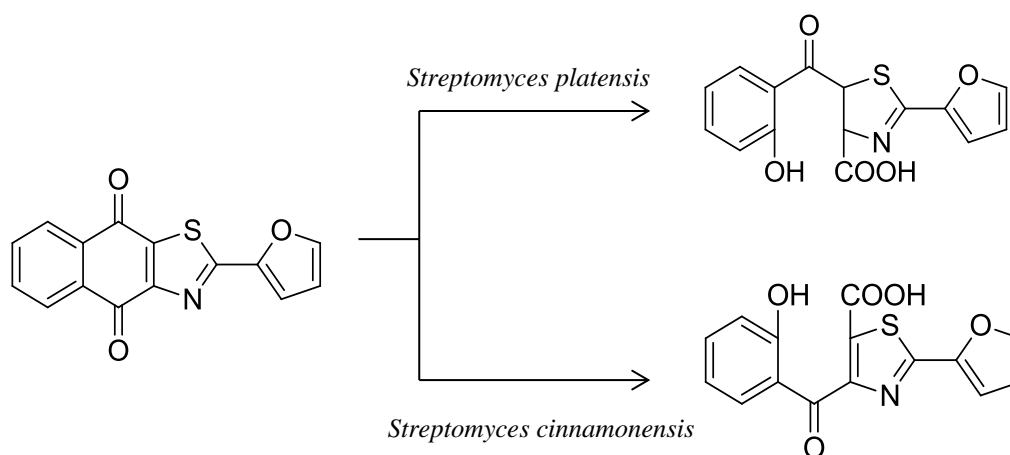


Figura 21. Biotransformação da naftoquinona INO 5042 (Fosse et al., 2004).

Em outro trabalho, Medina e colaboradores (2005) demonstraram a redução não usual da naftoquinona 5-amino-8-hidroxi-1,4-naftoquinona por uma linhagem padrão de *Staphylococcus aureus* após 24 horas de incubação (**Figura 22**). Essa reação foi inesperada, uma vez que até o presente momento, apenas reações de redução na carbonila, levando a formação de hidro- e semiquinonas, tinham sido reportadas para esse micro-organismo. A redução da ligação dupla na posição C₂-C₃ não havia sido reportada nessa classe de compostos até o presente momento.

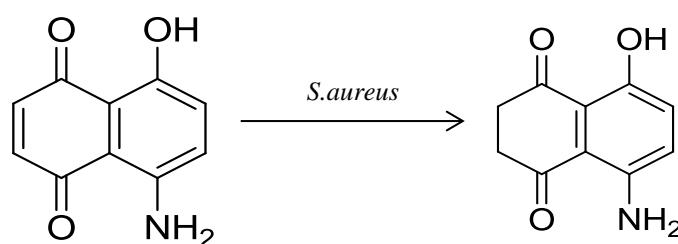


Figura 22. Biotransformação da 5-amino-8-hidroxi-1,4-naftoquinona (Medina et al., 2005).

O fungo *Curvularia lunata*, foi capaz de modificar o lapachol produzindo a dehidro- α -lapachona (Otten & Rosazza, 1979), conforme estruturas da **Figura 23**.

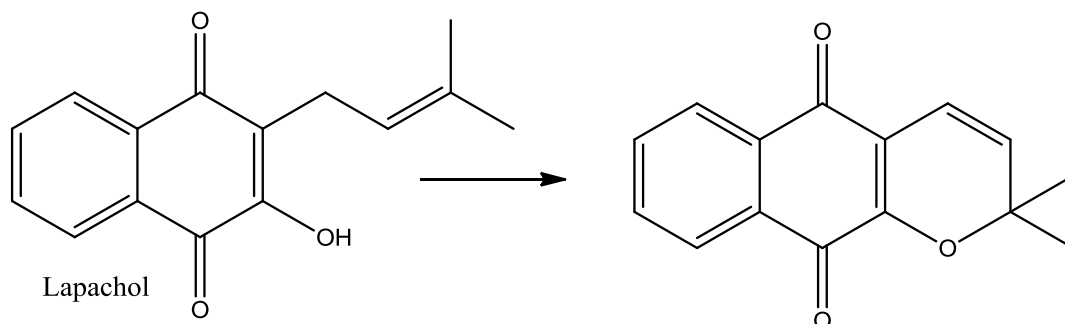


Figura 23. Biotransformação do lapachol por *C.lunata* (Otten & Rosazza, 1979).

Em nosso grupo de pesquisas temos exemplos de sucesso na biotransformação de naftoquinonas. Silva e colaboradores (2014) obtiveram derivados do lapachol através da biotransformação por culturas isoladas e mista de *Bifidobacterium* sp. e *L.acidophilus* sendo um deles a dehidro- α -lapachona, descrita por Otten & Rosazza, 1979 (**Figura 24**)

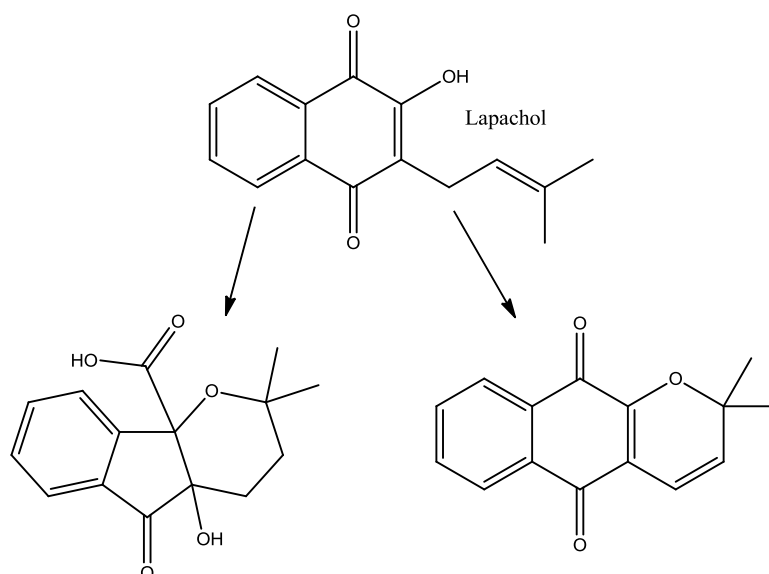


Figura 24. Produtos de biotransformação do lapachol descritos por Silva e colaboradores (2014).

Otten & Rosazza (1978) realizaram um screening de diversos fungos para verificação da capacidade dos mesmos em realizar a biotransformação do lapachol. Os resultados obtidos mostraram que os fungos *Penicillium notatum*, *Mucor mucedo* e *C.echinulata* foram capazes de promover a abertura do núcleo quinonóide (clivagem oxidativa) adicionando um grupamento ácido a sua estrutura, tornando-o mais polar que seu material de partida, conforme mostrado na **Figura 25**.

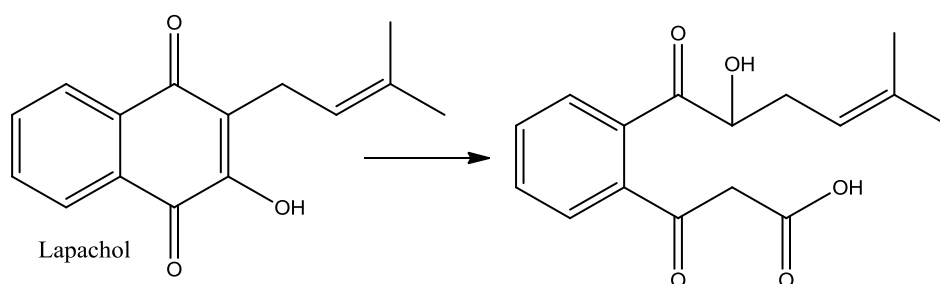


Figura 25. Biotransformação do lapachol descrita por Otten & Rosazza (1978).

Otten & Rosazza (1981), obtiveram outros três derivados do lapachol, sendo um deles glicosilados, a partir da biotransformação com o fungo *C.echinulata*. Os derivados obtidos estão apresentados na **Figura 26**.

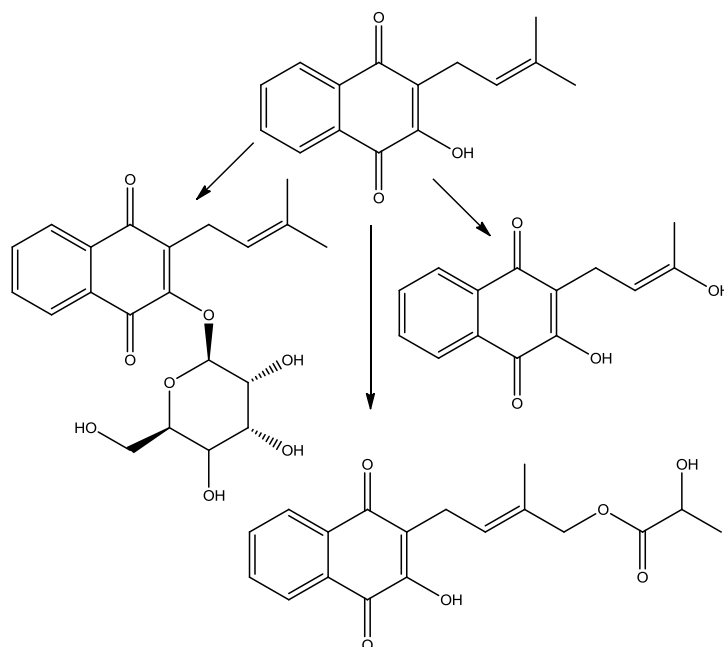


Figura 26. Biotransformação do lapachol por *C.echinulata* (Otten & Rosazza, 1979).

Em outros trabalhos do nosso grupo foram obtidos derivados da β -lapachona com diferentes micro-organismos (Paludo, 2013 e Paludo et al., 2014), conforme **Figura 27**.

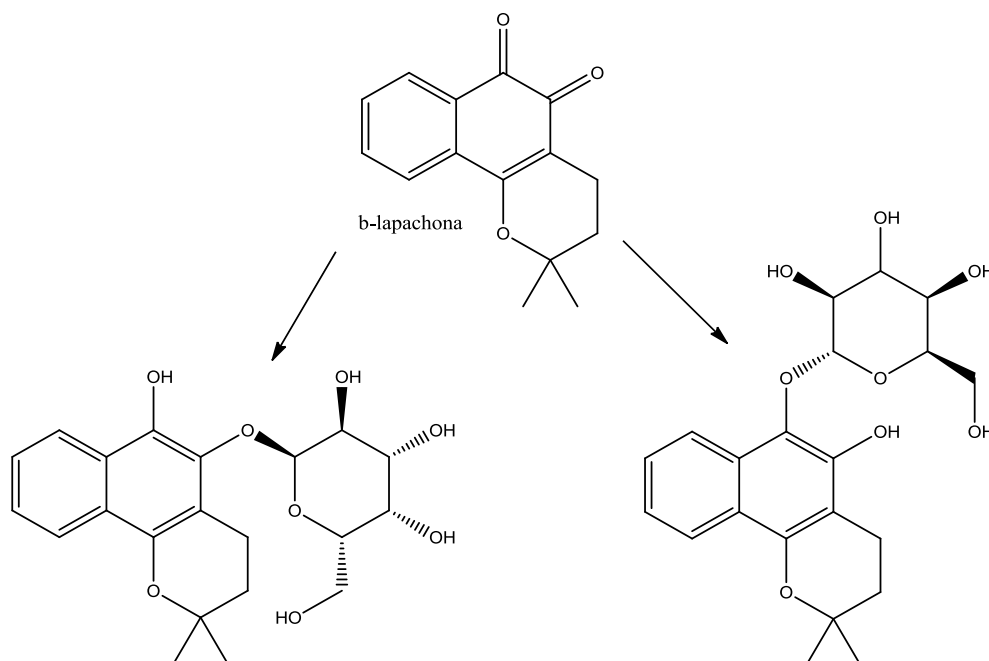


Figura 27. Produtos de biotransformação da β -lapachona descritos Paludo e colaboradores (2014).

Neste contexto, o objetivo central deste trabalho foi realizar os estudos de biotransformação de naftoquinonas de estruturas químicas diversificadas utilizando fungos filamentosos, uma levedura probiótica e bactérias intestinais e avaliar a citotoxicidade dos derivados obtidos.

Objetivos

2.OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Realizar processos de biotransformação de algumas naftoquinonas (**Figura 28**), frente a diversas linhagens de fungos e culturas isoladas e mistas de bactérias do trato gastrointestinal e avaliar a citotoxicidade dos metabólitos majoritários produzidos.

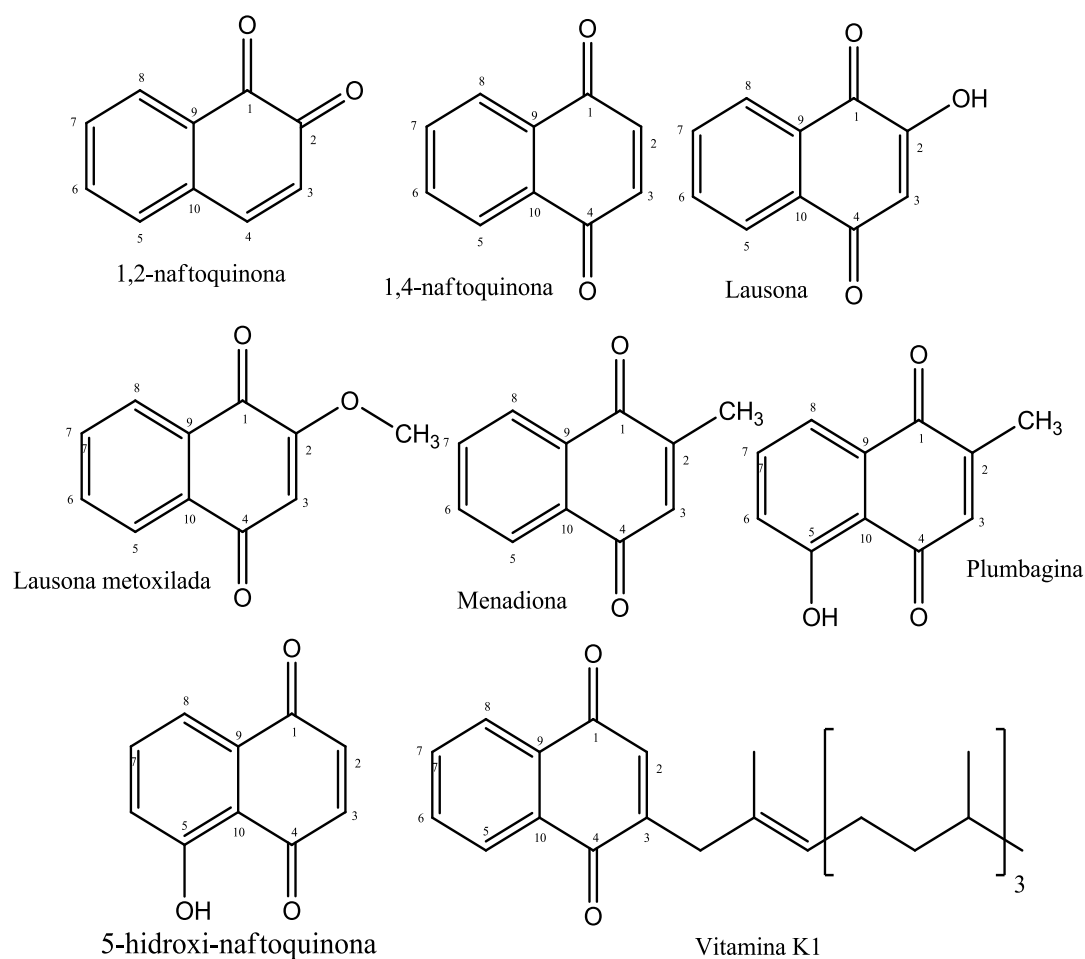


Figura 28. Estruturas químicas das naftoquinonas selecionadas para os estudos de biotransformação

2.2 Objetivos específicos

Para esse propósito, os objetivos específicos do trabalho foram:

1. Determinar as condições para obtenção de biomassa de duas linhagens de fungos filamentosos;
2. Determinar as condições para o crescimento das bactérias do trato gastrointestinal a serem avaliadas em culturas isoladas e mistas;
3. Determinar os valores de concentração inibitória mínima das naftoquinonas frente aos micro-organismos a serem utilizados;
4. Desenvolver os processos de biotransformação das naftoquinonas em escala analítica frente aos micro-organismos a serem avaliados;
5. Selecionar os processos mais promissores para cada substância, mediante avaliação dos perfis químicos, para o desenvolvimento em escala ampliada;
6. Desenvolver os processos selecionados em escala ampliada;
7. Isolar os produtos de biotransformação majoritários;
8. Avaliar a atividade citotóxica dos produtos majoritários obtidos.

Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Equipamentos utilizados

Procedimento gerais:

- Balança analítica digital (Ohaus).
- Banho Ultrassônico (Unique)
- Evaporador rotativo sob pressão reduzida (Fisatom, modelo 801)
- Evaporador rotativo sob pressão reduzida (Büchi)
- Ultrapurificador de água MiliQ (Millipore)
- Destilador de água
- Evaporador centrífugo Speed vacuum (Thermo Cooperation)
- Sistema de Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (DAD) e sistema controlador computadorizado com software Empower. (Waters, modelo).
- Sistema de Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (PDA) e sistema controlador computadorizado com software ClassVP (Shimadzu, SPD-M20A).
- Sistema de Cromatografia líquida de alta eficiência com detector UV/VIS e sistema controlador computadorizado com software LCSolution (Shimadzu, SPD-20A).

Procedimentos microbiológicos:

- Autoclave vertical (Phoenix, modelo AV)
- Capela de fluxo laminar vertical (Pachane , modelo PCR T 2.5)
- Estufa bacteriológica .
- Estufa de ar circulante BOD .
- Microscópio óptico

- Agitador tipo Vortex
- Câmara de anaerobiose (Don Whitley Scientific)
- Espectrofotômetro (Femto)
- Agitador magnético (Fisatom)
- Incubador rotativo (shaker) (Cientec, modelo CT713).
- Incubadora rotativo (shaker) (Tecnal)

3.2 Meios de cultura utilizados

Meios sólidos:

- *Ágar dextrose batata (PDA)*: 3,9% de meio PDA (Himedia) em água destilada.
- *Ágar DeMan-Rogosa-Sharpe (MRS)*: 6,72% Ágar MRS (Oxoid), 2% inulina grau alimentício (Latec) em água destilada.
- *Ágar DeMan-Rogosa-Sharpe suplementado (MRS suplementado)*: 6,72% Ágar MRS (Oxoid), 2% inulina grau alimentício (Latec) e 33,3% (baseado no peso seco) de glicose (Synth) em água destilada.
- *Ágar Miller Hinton (MH)*: 3,8% de Ágar Mueller Hinton (Himedia) e 2% inulina grau alimentício (Latec) em água destilada.
- *Ágar extrato de malte*: 2,0% de extrato de malte (Himedia); 2,0% de glicose (Synth); 0,1% de peptona (Himedia) e 1,8% de ágar (Himedia) em água destilada.
- *Ágar aveia*: 4,0 % de farinha de aveia em flocos finos (Quacker) e 1,8 % de ágar (Himedia) em água destilada.

Meios líquidos:

- *Caldo DeMan-Rogosa-Sharpe (MRS):* 5,5% de Caldo MRS (Oxoid) e 2% inulina grau alimentício (Latec) em água destilada.
- *Caldo DeMan-Rogosa-Sharpe suplementado (MRS suplementado):* 5,5% de Caldo MRS (Oxoid), 2% inulina grau alimentício (Latec) e 33,3% (baseado no peso seco) de glicose (Synth) em água destilada.
- *Caldo Miller Hinton (MH):* 2,1% de caldo Mueller Hinton (Himedia) e 2% inulina grau alimentício (Latec) em água destilada.
- *Meio pré-fermentativo de Jackson (Jackson et al, 1993):* 0,25% de pó de milho (Veranita), 1,0% de glicose (Synth), 1,0% de farinha de aveia (Quaker), 4,0% de pasta de tomate (Quero), 1,0% de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Vetec) e 10,0 mL/L da solução com traços de elementos em água destilada.
- *Solução de elementos traços:* 0,1% de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Vetec), 0,1% de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Vetec), 0,0025% de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Vetec), 0,01% de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Vetec), 0,056% de H_3BO_3 (Vetec), 0,0019% de $(\text{NH}_4)_6\text{MoO}_7 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Vetec) e 0,02% de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Vetec) em água destilada.
- *Meio Czapek:* 3,0% de sacarose (Synth), 0,2% de NaNO_3 (Vetec), 0,1% de K_2HPO_4 (Vetec), 0,05% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Vetec), 0,05% de KCl (Vetec) e 0,001% de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Vetec).
- *Meio Czapek modificado:* 1% de glicose (Synth), 0,2% de NaNO_3 (Vetec), 0,1% de K_2HPO_4 (Vetec), 0,05% de KCl (Vetec).

Todos os meios de cultura foram preparados com água destilada ou ultrapurificada (utilizada nas etapas fermentativas) e esterilizados em autoclave a 121°C, por 15 minutos.

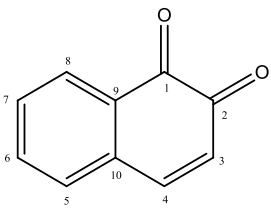
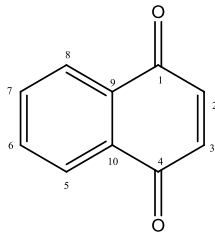
3.3 Reagentes e solventes utilizados

- Acetato de etila destilado
- Acetona (Synth)
- Acetona grau cromatográfico (J.T.Baker)
- Acetona deuterada (Sigma-Aldrich)
- Acetonitrila grau cromatográfico (Tedia e J.T.Baker)
- Acetonitrila deuterada (Sigma-Aldrich)
- Butanol (Synth)
- Cloreto de Sódio (Vetec)
- Clorofórmio (Synth)
- Clorofórmio deuterado (Sigma-Aldrich)
- Diclorometano (Synth)
- Dimetilsulfóxido (Merck)
- Etanol (Synth)
- Glicerol (Synth)
- Hexano (Synth)
- Metanol destilado
- Metanol grau cromatográfico (J.T.Baker),
- Penicilina (Sigma-Aldrich)
- Sangue desfibrinado de carneiro (Biotério Rodrigues)
- Sulfato de sódio anidro (Vetec)
- Tween 80 (Synth)

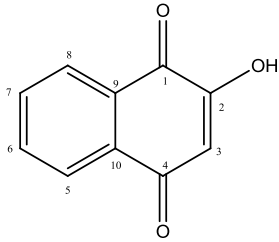
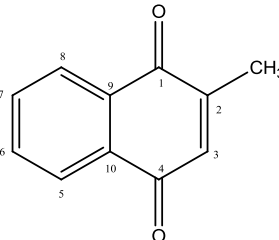
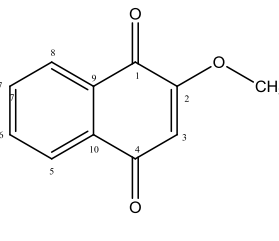
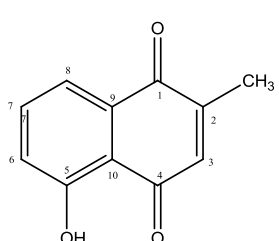
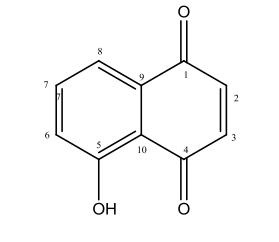
3.4 Obtenção das naftoquinonas utilizadas como substratos

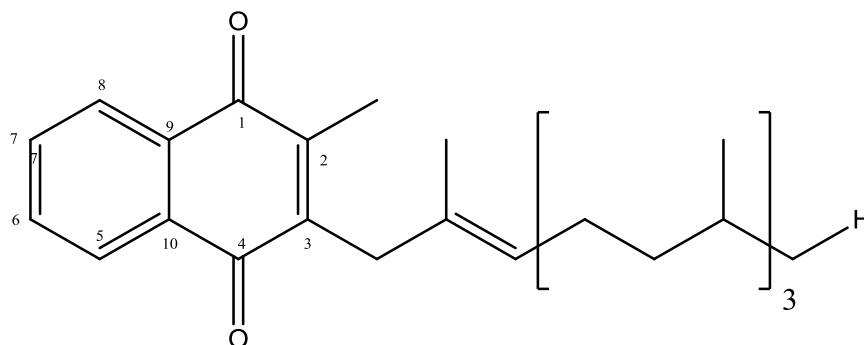
Todas as naftoquinonas utilizadas como substratos para as reações de biotransformação foram adquiridas comercialmente da empresa Sigma-Aldrich e, segundo laudo que as acompanham, possuem entre 96-98% de pureza. A **Tabela 2**, mostra as estruturas e algumas propriedades físico-químicas das naftoquinonas utilizadas no trabalho.

Tabela 2. Estruturas químicas e propriedades físico-químicas das naftoquinonas empregadas nos estudos de biotransformação.

NAFTOQUINONAS	PROPRIEDADES
 <p data-bbox="300 1249 539 1283">1,2 -Naftoquinona</p>	<p data-bbox="639 1014 1390 1048">-Nome comercial: 1,2-naftoquinona ou <i>orto</i>-naftoquinona</p> <p data-bbox="639 1093 1050 1126">-Fórmula Molecular: C₁₀H₆O₂</p> <p data-bbox="639 1171 1026 1205">-Massa molecular: 158,0368</p> <p data-bbox="639 1238 1286 1272">-Aspecto: sólido de coloração amarelo alaranjado</p>
 <p data-bbox="300 1630 539 1664">1,4 -Naftoquinona</p>	<p data-bbox="639 1395 1398 1429">-Nome comercial: 1,4-naftoquinona ou <i>para</i>-naftoquinona</p> <p data-bbox="639 1462 1050 1496">-Fórmula Molecular: C₁₀H₆O₂</p> <p data-bbox="639 1541 1026 1574">-Massa molecular: 158,0368</p> <p data-bbox="639 1608 1110 1641">-Aspecto: sólido de coloração verde</p>

Continuação da Tabela 2

 <p style="text-align: center;">Lausona</p>	<p>-Nome químico: 2-hidroxi-1,4-naftoquinona</p> <p>-Fórmula Molecular: C₁₀H₆O₃</p> <p>-Massa molecular: 174,0317</p> <p>-Aspecto: sólido amorfo de coloração laranja intensa</p>
 <p style="text-align: center;">Menadiona</p>	<p>-Nome químico: 2-metil-1,4-naftoquinona</p> <p>-Fórmula Molecular: C₁₁H₈O₂</p> <p>-Massa molecular: 172,0524</p> <p>-Aspecto: sólido cristalino amarelo</p>
 <p style="text-align: center;">Lausona metoxilada</p>	<p>-Nome químico: 2-metoxi-1,4-naftoquinona</p> <p>-Fórmula Molecular: C₁₁H₈O₃</p> <p>-Massa molecular: 188,0473</p> <p>-Aspecto: sólido amorfo de coloração verde</p>
 <p style="text-align: center;">Plumbagina</p>	<p>-Nome químico: 5-hidroxi- 2-metil-1,4-naftoquinona</p> <p>-Fórmula Molecular: C₁₁H₈O₃</p> <p>-Massa molecular: 188,0473</p> <p>-Aspecto: sólido cristalino de coloração laranja intensa</p>
 <p style="text-align: center;">5-hidroxi-naftoquinona</p>	<p>-Nome químico: 5-hidroxi-1,4-naftoquinona</p> <p>-Fórmula Molecular: C₁₀H₆O₃</p> <p>-Massa molecular: 174,0317</p> <p>-Aspecto: sólido amorfo de coloração alaranjada</p>

Continuação da **Tabela 2**

Vitamina K1 ou fitomenadiona

-Nome químico: 2-metil-3-fetil-1,4-naftoquinona

-Fórmula Molecular: $C_{31}H_{46}O_2$

-Massa molecular: 450,707

-Aspecto: líquido de coloração amarelada

3.5 Avaliação da solubilidade dos substratos

Para estabelecer o padrão de solubilidade das naftoquinonas deste trabalho nos diferentes tipos de meio e solventes, foram realizados alguns testes de solubilidade em pequenos tubos de ensaio transparentes nos quais foram adicionados 1 mg das naftoquinonas utilizadas e em seguida 2 mL dos seguintes solventes: água, meio de cultura Czapek modificado, n-hexano, éter etílico, acetato de etila, n-butanol, diclorometano, acetonitrila, acetona e clorofórmio. Após agitação dos respectivos tubos, foi observado o grau de solubilidade das naftoquinonas. Este teste foi repetido, com o previa solubilização das naftquinonas em acetona antes da adição do solvente em cada um dos tubos.

3.6 Teste de extração dos substratos em diferentes solventes orgânicos

A análise de dados da literatura aponta que as naftoquinona de uma forma geral podem ser extraídas em solventes de diferentes tipos de polaridade. Sendo assim, decidiu-se fazer um teste para a determinação do solvente que seria mais adequado para ser empregado durante o processo de extração por partição líquido-líquido dos extratos de biotransformação.

Nesse teste foram preparados 10 mL de solução de cada naftoquinona em acetona grau cromatográfico (1mg de substrato/mL). O volume de 1 mL da solução preparada foi adicionado a 5 tubos de ensaio contendo 10 mL de meio Koch's K1 e 5 tubos de ensaio contendo o mesmo volume de meio Czapek. Todos os tubos de ensaio preparados foram incubados por 1 hora em incubadora shaker (120 rpm de rotação e 30°C), e em seguida, o conteúdo dos mesmos foi extraído com 15 ml (três extrações consecutivas de 5 mL/cada) de um dos solventes a seguir: *n*-hexano, clorofórmio, diclorometano, éter etílico, acetato de etila e *n*-butanol. Em seguida, o volume de solvente orgânico obtido foi seco com Na₂SO₄ anidro e concentrado em evaporador rotativo.

Foram preparadas amostras dos extratos preparados em acetonitrila na concentração de 1mg/mL, para análise por CLAE-DAD, juntamente com os respectivos padrões das naftoquinonas preparados na mesma concentração das amostras. Essas análises foram realizadas em um cromatógrafo Shimadzu® acoplado a um detector de arranjo de diodos (DAD) com auxílio do software CLASS-VP. Foi utilizada coluna de fase reversa C18 (Kromasil® 100-5, 250x4,60 mm de diâmetro interno, tamanho de partícula de 5 µm, acoplada a uma coluna de guarda contendo com a mesma fase estacionária) com gradiente composto de acetonitrila e água (iniciando com 30% de acetonitrila, alcançando 100% de solvente orgânico em 30 minutos) e vazão de 1mL/min. Os

resultados desse teste foram obtidos através da relação dos valores das áreas dos picos correspondentes a naftoquinona analisada e dos extratos preparados nos diferentes solventes, em porcentagem.

3.7 Comparação de diferentes processos de extração de naftoquinonas (resinas poliméricas x extração líquido-líquido)

Este experimento foi realizado para comparar a eficiência de diferentes processos de extração das naftoquinonas incubadas por 0 e 24 horas nos meios de cultura empregados durante as reações de biotransformação (Czapek modificado, MH, MRS e MRS suplementado). Para extração foram utilizados o processo de partição líquido-líquido dos meios de culturas contendo as naftoquinonas com acetato de etila e adsorção por resinas poliméricas XAD-4 e XAD-16.

Para o experimento com cada naftoquinona, foram preparados dois frascos tipo Erlenmeyers (125 mL contendo 15 mL de volume) de cada um dos meios de cultura. Foram preparadas soluções das naftoquinonas (0,1g de substrato por litro de meio de cultura- solução de naftoquinona em acetona 1mg/mL), conforme a proporção utilizada nos experimentos de biotransformação. Um volume de 1,5 mL da solução das naftoquinonas preparadas foi adicionado nos respectivos frascos dos meios de cultura. Para o experimento com cada naftoquinona, um grupo contendo um frasco de cada tipo de meio de cultura foi mantido durante 10 minutos em incubadora shaker, a 30°C e rotação de 120 rpm e outro grupo foi mantido sob incubação durante 24 horas.

Após o devido período de incubação, para cada naftoquinona, um dos frascos de cada meio de cultura, foi extraído com acetato de etila destilado (3 extrações consecutivas de 10 mL cada) e ao outro foram adicionados 2g de uma mistura de resinas poliméricas do tipo XAD-4 e XAD-16 na proporção 1:1. Os frascos contendo resina

foram novamente incubados durante 24 horas em incubadora shaker nas mesmas condições anteriores e após 24 horas de incubação, os mesmos foram filtrados à vácuo e a cada um deles foram adicionados 20 ml de acetona. Após agitação manual a resina foi novamente filtrada a vácuo e o volume de solvente resultante dos processos extrativos foi concentrado em evaporador rotativo.

Todos os extratos obtidos foram analisados por CLAE-DAD e a área do pico correspondente a cada naftoquinona foi comparada a área do seu respectivo padrão de concentração conhecida, a fim de mensurar a eficiência dos dois processos extrativos.

3.8 Avaliação da estabilidade das naftoquinonas nos meios de cultura utilizados

Para verificar a influência da água no comportamento das naftoquinonas inclusas no trabalho, 1 mL de soluções das mesmas (1mg/mL), preparadas em acetona foram adicionadas a tubos contendo 10 mL de cada um dos meios de cultura utilizados: MRS, MRS suplementado, MH, Czapek modificado, além de água. Essa mistura foi mantida em mesa agitadora a 30°C durante 24 horas. Após esse período o conteúdo de cada frasco foi submetido a partição líquido-líquido com 9 ml de acetato de etila (3 extrações consecutivas de 3 ml/cada), e os respectivos extratos foram concentrados e analisados por CLAE-DAD.

3.9 Micro-organismos utilizados nos processos de biotransformação

Os fungos filamentosos *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404, *Cunninghamella elegans* ATCC 10028b, *Cunninghamella echinulata* var. *elegans* ATCC 8688a, *Aspergillus alliaceus* ATCC10060 e *Mucor rouxii* NRRL 1894, foram adquiridos comercialmente de coleções de culturas. As linhagens *Cunninghamella elegans* ATCC 9245 e *Aspergillus niger* NRRL 599 foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Igor

Parshikov. *Aspergillus niger*, *Aspergillus phoenicis*, *Aspergillus ochraceus* e *Rhizopus stolonifer* foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. João Atílio Jorge da FFCLRP.

A bactéria *Escherichia coli* ATCC 25922 também foi adquirida comercialmente pela ATCC e as culturas das bactérias probióticas *Lactobacillus acidophilus* (FERM FD DVS LA-5® - Probio-Tec™) , *Bifidobacterium* (FERM FD DVS BB 12®- Probio-Tec™) e cultura láctica de cepas mistas contendo *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* sp. e *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* (FERM F DVS ABT-4) foram adquiridas da empresa CHR Hansen, uma das responsáveis pelo fornecimento de micro-organismos para as indústrias alimentícias produtoras de alimentos probióticos. A cultura de *Saccharomyces boulardii* foi obtida através do conteúdo liofilizado do medicamento Floratil®(Merck).

3.10 Preservação das culturas dos micro-organismos utilizados

A fim de assegurar as características genéticas das espécies de fungos e bactérias utilizados, foram preparados diferentes tipos de estoques de cada cultura microbiana, em quantidade suficiente para a realização de todos os experimentos deste trabalho, assegurando assim que o trabalho utilize sempre micro-organismos de mesmo padrão genético, o que assegura a reprodutibilidade dos experimentos realizados.

Para a confecção dos estoques das culturas fúngicas, esses micro-organismos foram cultivados em placas de Petri contendo meio de cultura PDA, durante 7 dias em incubadora (B.O.D) a 30°C. Após esse período foram retirados três discos de ágar de aproximadamente 5 mm de diâmetro contendo os micélios e conídios das respectivas culturas , obtidos com o auxílio de tubos de transferência esterilizados (Transfertube®, Sigma-Aldrich) e os mesmos foram transferidos para tubos criogênicos de polipropileno com 2 mL de capacidade, contendo 1,5 mL de água destilada estéril. Após adição dos discos de micélio, esses tubos foram vedados com película aderente flexível e mantidos

sob refrigeração (4°C). Foram preparados também estoques das mesmas culturas em glicerol. Para isso foram preparadas culturas dos respectivos fungos, em tubos de ensaio contendo 30ml de meio PDA cultivadas durante 7 dias em estufa do tipo B.O.D. a 30°C. Após esse período, a cada tubo de cultura foram adicionados 5 mL de solução aquosa de glicerol a 60%, seguida da raspagem mecânica dos conídios produzidos. Essa suspensão foi alíquotada em tubos criogênicos de 2 ml, contendo 1,5 mL de suspensão de conídios em cada tubo, aos quais foram vedados e armazenados em freezer (-20°C).

Além disso, foram preparadas culturas dos fungos em tubos de meio PDA para serem armazenados em temperatura ambiente. Periodicamente eram adicionadas frações de água destilada aos tubos para manter a umidade e evitar a desidratação dos meios de cultura.

Os estoques das culturas das bactérias probióticas de *L.acidophilus* foram preparados em tubos criogênicos contendo caldo MRS suplementado com 33,3% de glicose (peso seco) acrescido de L-cisteína/HCl (0,05%) e 20% v/v de glicerol. Para a bactéria *Bifidobacterium* sp, foi adotado o mesmo procedimento, sendo que nesse caso foi utilizado o caldo MRS tradicional sem suplementação. Para a cultura mista não foram preparados estoques, visto que a bactéria *S. salivarius* perde a viabilidade em estoque, sendo que no mesmo só prevalecem às bactérias *Bifidobacterium* sp. e *L. acidophilus*. Sendo assim, os experimentos com a cultura mista foram feitos a partir da fonte original das culturas, fornecida pela empresa CHR Hansen. Os estoques da linhagem de *E.coli* foram preparados em meio MH contendo 40% de glicerol.

3.11 Cuidados adotados durante os procedimentos realizados envolvendo as naftoquinonas e seus derivados

A fim de evitar problemas com o comportamento químico das naftoquinonas utilizadas como material de partida e de seus derivados, alguns cuidados específicos foram empregados durante os procedimentos experimentais. A maioria dos procedimentos foi realizada em área de trabalho equipada com lâmpadas de luz amarela ao invés das lâmpadas tradicionais, para evitar a possível fotodegradação das amostras. Além disso, durante todos os processos, sobretudo durante o uso dos evaporadores rotativos para concentrar extratos, evitou-se trabalhar com temperaturas além dos 40°C, o que foi monitorado através da inserção de um termômetro no banho de aquecimento do equipamento. Outra preocupação era quanto ao tempo de contato entre os solventes e as amostras em questão. Para a eliminação desses solventes nas amostras, sobretudo nas que apresentavam difícil secagem, optou-se por utilizar sistema de secagem com nitrogênio, que por ser um gás inerte, seca as amostras rapidamente sem degradá-las ou ainda através do uso de evaporadores centrífugos, sem aplicar temperatura no mesmo. Os processos microbiológicos em capela de fluxo laminar foram executados sem o emprego da luz do equipamento, uma vez que a mesma poderia propiciar a ocorrência de modificações indesejadas a essa classe de compostos. Em ocasiões gerais, onde era necessário o contato das amostras com a luz ambiente, todas as amostras e extratos contendo as naftoquinonas foram cuidadosamente protegidos com papel- alumínio para evitar a ação da luz. Todas as amostras foram condicionadas em refrigeradores enquanto não eram manipuladas e após preparadas e secas, foram acondicionadas em freezer (-20°C).

3.12 Estudos sobre as condições de cultivo dos fungos filamentosos para os procedimentos de biotransformação

3.12.1 Padronização da produção de esporos

Para a padronização da produção de esporos, os fungos filamentosos foram cultivados em tubos de ensaio contendo 10 mL dos seguintes meios de cultura: 1- meio aveia-ágar, 2- meio extrato de malte e 3- ágar dextrose batata. As culturas foram então incubadas em diferentes períodos de tempo (7, 10 e 14 dias) em estufa BOD e após o término do período de incubação foram adicionados 5,0 mL de solução aquosa estéril de Tween 80 a 2 % a cada tubo de ensaio. Em seguida, foi efetuada a contagem (triplicata) do número de conídios presentes nas suspensões em microscópio óptico com auxílio de uma câmara de Neubauer. Para a produção da biomassa em meio pré-fermentativo foi selecionado o meio de cultura e o tempo de incubação em que o fungo produziu a maior quantidade de esporos.

3.12.2 Padronização da produção de biomassa em meio pré-fermentativo

Para a produção da biomassa dos fungos filamentosos em meio pré-fermentativo de Jackson, esses micro-organismos foram cultivados em tubos de ensaio seguindo as condições previamente estabelecidas. Para cada fungo, ao final do período de incubação, foram adicionados 5 mL de água destilada estéril em cada tubo preparado e feita a raspagem mecânica dos conídios e micélios presentes na superfície do ágar com auxílio de uma agulha microbiológica. Em seguida, o volume das suspensões dos tubos foi filtrado utilizando um pedaço de gaze estéril e transferido para um frasco estéril com tampa, visando uniformizar o inóculo preparado. Procedeu-se então a contagem do número de esporos presentes na suspensão preparada.

Em seguida, o volume de suspensão correspondente a 1×10^8 esporos, foi transferido para quinze frascos Erlenmeyers (250 mL) contendo 50 mL do meio descrito por Jackson e colaboradores (1993). Todas as culturas foram desenvolvidas em mesa incubadora tipo shaker, com rotação de 120 rpm a 30°C, e a cada 24 horas três unidades de cada um dos diferentes meios utilizados, foram retiradas e filtradas em funil de Buchner e as massas miceliais obtidas foram reservadas até completa secagem. Após esse processo, o peso das biomassas foi aferido em balança semi-analítica e os valores obtidos foram utilizados para a construção de uma curva de crescimento pré-fermentativa. Essa análise foi fundamental para selecionar o tipo de meio e o tempo que cada fungo deve permanecer nessa etapa de desenvolvimento, chamada etapa pré-fermentativa, antes de ser transferido para o meio fermentativo, onde ocorrerão as reações de biotransformação.

3.12.3 Produção de biomassa em etapa fermentativa

A fim de certificar-se do perfil de crescimento dos fungos nessa nova etapa de cultivo e estabelecer o tempo em que cada micro-organismo inicia sua fase estacionária, decidiu-se verificar o crescimento diário dos fungos filamentosos no meio selecionado para a etapa fermentativa, Czapek modificado.

Inicialmente, foram cultivadas 60 unidades de meio pré-fermentativo sob as condições previamente estabelecidas (etapa pré-fermentativa). As massas miceliais obtidas foram então filtradas a vácuo e transferidas para 15 Erlenmeyers de 500 mL de capacidade, contendo 100 mL de cada um dos quatro tipos de meios fermentativos avaliados. As culturas foram desenvolvidas a 30° C durante 6 dias. Durante esse período, a cada 24 horas, três unidades de cada um dos meios utilizados, foram retiradas e filtradas em funil de Buchner. Após completa secagem, as massas miceliais

produzidas tiveram suas massas aferidas em balança semi-analítica. A média da biomassa produzida diariamente por três unidades de cada tipo de meio de cultura empregado foi utilizada para a construção de uma curva de crescimento diária dos fungos nessa etapa do processo. Assim pôde-se estabelecer o período selecionado para adição dos substratos nas reações de biotransformação.

3.13 Estudo sobre as condições de cultivo das bactérias probióticas para os procedimentos de biotransformação

A fim de estabelecer as condições de cultivo adequadas para as bactérias durante os estudos de biotransformação, foram realizados experimentos para determinar o perfil de crescimento (curvas de crescimento) desses micro-organismos. Para isso, as culturas das bactérias probióticas foram inicialmente cultivadas em caldo MRS acrescido de L- cisteína/HCl (0,05%) para a bactéria *Bifidobacterium sp.* e do mesmo meio com suplementação de 33,3% (em relação ao peso seco do meio de cultura) de glicose para as bactérias *L.acidophilus* e cultura mista. Todas as culturas foram incubadas a 37°C, em câmara de anaerobiose (atmosfera de 85% de nitrogênio, 10% de dióxido de carbono e 5% de gás hidrogênio) durante 72 horas. Após esse período, alíquotas dessas culturas foram retiradas e depositadas em placas contendo meio ágar MRS com L-cisteína (0,05%) e também suplementado com glicose para a cultura mista e a bactéria *L.acidophilus*, conforme descrito anteriormente. As placas foram incubadas em câmara de anaerobiose a 37°C por 72 horas. Para a bactéria *E. coli*, o mesmo procedimento foi realizado, porém, neste caso, o meio MH (caldo e ágar) foi utilizado. A incubação dessas culturas foi realizada a 37°C por 24 horas sob atmosfera aeróbia e anaeróbia.

Para a quantificação do inóculo bacteriano foi realizada uma padronização em espectrofotômetro no comprimento de onda de 625nm. Após o crescimento em placas de ágar, colônias das respectivas bactérias foram transferidas para tubos contendo caldo (MRS ou MH, conforme necessidade do micro-organismo utilizado), e estes foram homogeneizados e a leitura da turbidez foi realizada em espectrofotômetro. Em seguida foram realizadas diluições seriadas dos caldos preparados em solução salina e 10µL de cada diluição foram transferidos para placas de Petri contendo o meio de cultura (contendo ágar) adequado ao seu crescimento. Essas placas foram novamente incubadas em câmara de anaerobiose para que, após o período de crescimento, fosse realizada a contagem das unidades formadoras de colônia (UFC). A partir das leituras das diluições realizadas e das correlações dessas com o número de colônias formadas, foi possível estipular a absorbância que o inóculo de cada bactéria deveria apresentar para que pudesse corresponder a aproximadamente 10^7 UFC/mL, ideal para os experimentos realizados. Como branco, para zerar o espectrofotômetro, foi utilizado o meio de cultura adequado para cada bactéria, sem nenhum inóculo.

Para a elaboração das curvas de crescimento das bactérias, foram preparados inóculos contendo 10^7 UFC/mL, conforme absorbância determinada anteriormente. Dos inóculos preparados, foi retirado 1 mL para ser adicionado em cada um dos 16 Erlenmeyers de 125 mL de capacidade contendo 30 mL do caldo de cultura MRS ou MH, dependendo do micro-organismo utilizado (concentração final no caldo de cultura 10^6 UFC/mL) . Alíquotas das culturas foram retiradas nos tempos de 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 30, 36, 48, 54, 60, 66 e 72 horas, inoculadas em placa de ágar e incubadas adequadamente, para posterior enumeração das células viáveis formadas. Assim pôde-se estabelecer o momento em que cada um desses micro-organismos alcança e fase

estacionária e o tempo em que permanecem nela, antes de entrarem nas fases de declínio e morte.

3.14 Toxicidade dos substratos frente aos micro-organismos

Para a determinação das concentrações seguras das naftoquinonas a serem utilizadas durante os processos de biotransformação com diferentes micro-organismos evitando a morte celular ou ainda a inibição dos mesmos, foram realizados ensaios antimicrobianos utilizando o método de microdiluição em microplaca, de acordo com a metodologia preconizada pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), atualmente denominado Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), com adaptações (CLSI, 2008; CLSI, 2007).

Para isso, os micro-organismos utilizados foram cultivados previamente nos meios semi-sólidos que propiciam seu crescimento adequado, conforme padronização descrita nos 3.12.1 e 3.13. Para a realização dos ensaios de microdiluição em microplacas tentou-se mimetizar as condições experimentais dos processos de biotransformação no que diz respeito ao meio de cultura e tamanho de inóculo utilizados. Para isso o meio de cultura utilizado no ensaio com as bactérias probióticas foi o caldo MRS (com suplementação de glicose para *L. acidophilus* e cultura mista) e para *E. coli* foi o caldo MH, sendo o tamanho do inóculo de 10^6 UFC/mL em todos os casos. Para os fungos propostos, foi utilizado o meio de cultura Czapek modificado, e o inóculo preparado foi de 5×10^8 conídios/mL.

As concentrações testadas de cada naftoquinona variaram de 400 a 0,195 $\mu\text{g/mL}$ por meio de diluição seriada. Para isso, para cada uma das substâncias, 1 mg de sua massa foi dissolvido em 125 μL de acetona sendo essa solução denominada “solução mãe” (8000 $\mu\text{g/mL}$). Posteriormente, 20 μL da “solução mãe” foram diluídos em 80 μL

do caldo de cultivo utilizado, sendo essa solução denominada “solução 1” (1600 µg/mL). Então, os 100 µL da solução 1 preparados foram colocados no primeiro poço para iniciar a diluição seriada, em que cada poço da fileira já continha 100 µL de meio de cultura, sendo que a concentração do primeiro ficava em 800 µg/mL. Depois de proceder com a diluição seriada, foram adicionados em cada poço 80µL de caldo e 20 µL de inóculo, diluindo a concentração de cada poço pela metade, ficando a concentração final do primeiro poço igual a 400 µg/mL.

Foram feitos controles de esterilidade dos meios de cultivo, de viabilidade do inóculo na presença de 1% de acetona, sendo esta a concentração final do diluente nas amostras, de esterilidade das naftoquinonas, de viabilidade do inoculo sem acetona e também controles positivos (variação 5,9 a 0,0028 µg/mL), utilizando miconazol para os fungos, penicilina para as bactérias probióticas e estreptomicina para a bactéria *E. coli*. A visualização do crescimento microbiano foi realizada através da observação visual da turbidez dos poços da placa do ensaio em comparação com os poços dos controles positivo e negativo do experimento. Optou-se por não utilizar indicadores de viabilidade celular no ensaio (exemplo, rezasurina), uma vez que a coloração forte apresentada pelas próprias quinonas dificulta a leitura do resultado.

A partir desse ensaio pode-se estabelecer-se as concentrações adequadas dos substratos nos experimentos de biotransformação. A Concentração Bactericida Mínima (CBM) é definida como a menor concentração das amostras em que não houve crescimento bacteriano visível. Para realização da CBM foi retirada alíquotas de 1µL de cada poço das placas de 96 poços, anteriormente descritas para a determinação da CIM, e inoculadas em placas de Petri contendo agar. Esta técnica permitiu saber se as substâncias avaliadas nos ensaios antimicrobianos atuaram com ação fungicida (causando a morte dos fungos) ou ação fungiestática (inibindo o crescimento fúngico).

3.15 Verificação da influência da presença das naftoquinonas no perfil de crescimento dos micro-organismos

Para verificar a influência da presença das naftoquinonas no crescimento dos micro-organismos, foram realizadas novas curvas de crescimento para a bactéria *E. coli* e o fungo *C. elegans* na presença dos substratos menadiona e 1,2-naftoquinona. Para isso, foram realizados os mesmos procedimentos de padronização do crescimento dos micro-organismos descrito nos 3.12.1 e 3.13, porém junto a inoculação dos meios de cultura com os micro-organismos foi adicionado também 1 mL da solução de substrato em acetona (3mg/mL). A medida de biomassa micelial ou contagem do número de células bacterianas foi feita da mesma forma descrita para as curvas de crescimento elaboradas anteriormente sem a presença das naftoquinonas.

3.16 Biotransformação de naftoquinonas por bactérias do trato gastrointestinal

3.16.1 Biotransformações por *E.coli*.

Os experimentos com a bactéria *E.coli* foram incubados em estufa microbiológica e a etapa de biotransformação foi realizada em incubadora shaker, em temperatura de 37 °C. Para a realização dos processos de biotransformação, uma alíquota de cultura estoque dessa bactéria foi transferida para tubo de ensaio contendo meio MH e mantida incubada durante 24 horas para reativação das células microbianas presentes. Após o requerido tempo, alíquotas da nova cultura foram inoculadas em Placas de Petri contendo meio MH ágar (repique por esgotamento visando a obtenção de colônias isoladas), que também foram mantidas incubadas durante 24 horas. A partir das colônias formadas pela bactéria foi preparado um inóculo de 10^9 UFC/mL em meio MH (turbidimetria), com auxílio de um espectrofotômetro de UV (leitura em 625 nm).

O volume de 1 ml do inóculo preparado foi transferido para Erlenmeyers de 125 mL contendo 30 mL de caldo MH. As bactérias foram cultivadas sob agitação por 12 horas, quando atingem então a fase estacionária de crescimento, conforme estabelecido. Nesse ponto foi adicionado as culturas 1 mL de uma solução de substrato preparada em acetona na concentração de 3mg/mL. As reações de biotransformação foram monitorada por 6,12,18, 24 e 48 horas, e para isso, em cada um desses tempos, um frasco foi retirado da câmara de incubação, transferido para um tubo tipo Falcon e o volume presente foi centrifugado durante quatro minutos a 4000 rpm, sob refrigeração de 15 °C. Após esse processo, os sobrenadantes foram reservados para extração líquido-líquido e a massa celular residual resultante desse processo (“pellet”) foi lavada com água destilada, centrifugada novamente, e separada para posterior extração.

3.16.2 Biotransformações por *Bifidobacterium sp.*

Todos os procedimentos de cultivo e biotransformação empregando *Bifidobacterium sp.* foram realizados em câmara de anaerobiose (atmosfera controlada contendo 85% de nitrogênio, 10% de dióxido de carbono e 5% de gás hidrogênio), em temperatura de 37 °C. Para a realização dos processos de biotransformação, uma alíquota de cultura estoque dessa bactéria foi transferida para tubo de ensaio contendo meio MRS e mantida incubada durante 24 horas para reativação das células microbianas presentes. Após o requerido tempo, alíquotas da nova cultura foram inoculadas em Placas de Petri contendo meio MRS ágar que também foram mantidas incubadas durante 72 horas.

A partir das colônias formadas pela bactéria nas placas, foi preparado um inóculo de 10^9 UFC/mL em meio MRS (turbidimetria), com auxílio de um espectrofotômetro (leitura em 625 nm). O volume de 1 ml do inóculo preparado foi

transferido para Erlenmeyers de 125 mL contendo 30 mL de caldo MRS. As bactérias foram cultivadas sob agitação, com auxílio de barra magnética estéril, por 36 horas, quando atingem então a fase estacionária de crescimento, conforme estabelecido. Nesse ponto foi adicionado as culturas 1 mL de solução de substrato preparada em acetona na concentração de 3mg/mL. A reação de biotransformação foi monitorada por 6,12,18, 24 e 48 horas, e para isso, em cada um desses tempos, um frasco foi retirado da câmara de incubação, transferido para um tubo tipo Falcon e o volume presente foi centrifugado durante quatro minutos a 4000 rpm, sob refrigeração de 15 °C. Após esse processo, os sobrenadantes foram reservados para extração líquido-líquido.

3.16.3 Biotransformações por *L.acidophilus*.

Da mesma forma descrita anteriormente, todos os procedimentos incubação foram realizado em câmara de anaerobiose a 37 °C. Para a realização dos processos de biotransformação, uma alíquota de cultura estoque dessa bactéria foi transferida para tubo de ensaio contendo meio MRS suplementado e mantida incubada durante 24 horas. Após a reativação, alíquotas da nova cultura foram inoculadas em Placas de Petri contendo ágar MRS suplementado e mantidas incubadas durante 72 horas. Após esse período de crescimento foi preparado o inóculo de 10^9 UFC/mL em meio MRS suplementado assim como descrito anteriormente.

O volume de 1 ml do inóculo preparado foi transferido para Erlenmeyers de 125 mL contendo 30 mL de caldo MRS suplementado. As bactérias foram cultivadas sob agitação por 12 horas (fase estacionária de crescimento), conforme estabelecido, seguida da adição da solução de substrato em acetona na concentração de 3mg/mL e a reação foi monitorada por 6,12,18, 24 e 48 horas, da mesma forma descrito anteriormente.

3.16.4 Biotransformações em culturas mistas

O experimento realizado com culturas mistas das bactérias probióticas foi feito através do preparo dos inóculos individuais de *L. acidophilus*, *Bifidobacterium sp.* e *E. coli*, misturados durante o experimento. Ambos foram incubados em câmara de anaerobiose a 37 °C.

Para a realização do experimento iniciou-se pela ativação das culturas de *Bifidobacterium sp.*, *L.acidophilus* e *E.coli*, em seus respectivos meios de cultura. Após 24 horas, alíquotas do caldo de reativação foram transferidas para placas contendo o meio sólido mais adequado para o crescimento de cada uma das espécies. Após o devido período de incubação, foram preparados, individualmente, os inóculos contendo 10^9 UFC/mL de cada micro-organismo. O volume de 1 mL de cada um desses inóculos foi transferido para Erlenmeyers de 125 mL contendo 30 mL de caldo MRS suplementado. Essas culturas foram incubadas por 18 horas (fase estacionária de crescimento) e então foi adicionado 1 mL de uma solução de substrato preparada em acetona na concentração de 3mg/mL as culturas e a reação foi monitorada por 6,12,18, 24 e 48 horas.

3.16.5 Biotransformações em meio sólido

A bactéria *E.coli* foi selecionada para ser utilizada nos experimentos de biotransformação em meio sólido, juntamente com as naftoquinonas menadiona e lausona metoxilada. Para isso as culturas estocadas dessa bactéria foram reativadas e após 24 horas de incubação, 20 µL do caldo inoculado foi transferido para placas de ágar MH suplementado (5 placas de tamanho médio) mantidas incubadas por 24 horas em estufa a 37°C.

Após esse período, colônias de *E.coli* foram transferidas para um frasco do tipo Erlenmeyer contendo 50 ml de caldo MH suplementado em cada. Foram realizadas diluições do caldo inoculado a fim adequar a concentração celular correspondente a aproximadamente 10^9 UFC/mL. Alíquotas de 1 mL do inóculo preparado foram adicionadas a frascos Erlenmeyers contendo 50 mL de ágar MH suplementado ainda em estado líquido (temperatura de 35-40°C), após homogeneização esse conteúdo foi transferido para placas de Petri grandes contendo 1 mL de solução de substrato a ser utilizado na reação de biotransformação. Todo o volume da placa foi homogeneizado em movimentos circulares (forma de 8). Após completa solidificação, as placas foram incubadas em estufa a 37°C durante 72 horas. Nesse período, a cada 24 horas, uma das placas era retirada, e o meio de cultura presente foi picado em pedaços pequenos e transferidos para frascos tipo Erlenmeyers. Em seguida a cada um desses frascos, foi adicionado 50 mL de acetato de etila, permanecendo em maceração durante 24 horas. Após esse período, essa mistura foi filtrada e o processo de extração repetido por outras duas vezes. O volume de solvente utilizado foi então reduzido em evaporador rotativo gerando os extratos de biotransformação que foram analisados por CLAE-DAD.

3.17 Biotransformação de naftoquinonas por fungos filamentosos

Para iniciar os experimentos de biotransformação, esses micro-organismos foram previamente inoculados nos meios de cultura e condições adequados para a produção de conídios conforme padronização descrita 3.12. Após o referido período de incubação foi preparada uma suspensão conídios desses micro-organismos cujo número de células foi estabelecido através da contagem das mesmas em microscópio ótico com auxílio de uma câmara de Neubauer. Em seguida, o volume de suspensão correspondente a 1×10^8 esporos, foi transferido para dez frascos Erlenmeyers (250 mL)

contendo 50 mL de meio pré-fermentativo descrito por Jackson e colaboradores (1993). Todas as culturas foram desenvolvidas nesse meio pelo tempo estabelecido e então transferidas para o meio de cultura Czapek modificado, onde permaneceram até início da fase estacionária, e então foi adicionada a solução de substrato para a reação de biotransformação. A incubação foi feita em mesa incubadora tipo shaker, com rotação de 120 rpm a 30°C, e a cada 24 horas um dos frascos era retirado e seu conteúdo filtrado em funil de Buchner. O caldo resultante desse processo foi reservado para a extração e as respectivas massas miceliais foram lavadas com água destilada e congeladas para o preparo dos extratos celulares.

3.18 Biotransformação de naftoquinonas pelo fungo leveduriforme *S.boulardii*

Os experimentos de biotransformação empregando essa levedura foram realizados em meio líquido e meio sólido, para as naftoquinonas que apresentaram melhores resultados nos experimentos anteriormente realizados, sendo elas: menadiona, lausona metoxilada, plumbagina e vitamina K1.

Nesse caso, uma capsula do produto farmacêutico Floratil, constituído por células liofilizadas da levedura *S.boulardii* (utilizado como medicamento para reposição de flora e comercializado livremente em farmácias), foi desinfetada em solução de hipoclorito e aberta de forma asseptica para liberação do conteúdo em um frasco tipo Erlenmeyer contendo 50 ml de meio para leveduras. Em seguida esse frasco foi mantido incubado em shaker durante 12 horas.

3.18.1 Biotransformações em meio líquido

Para cada naftoquinona, alíquotas de 1 mL do inóculo previamente preparado foram adicionadas a 3 frascos tipo Erlenmeyers de 125 mL contendo 50 mL de meio caldo para a levedura. Em seguida, em cada um dos frascos foi adicionado também 1,7 mL de solução do substrato em acetona (3mg/mL) e todos eles foram incubados em shaker durante 72 horas. Nesse período, a cada 24 horas, um dos frascos foi retirado e o conteúdo dos mesmos foi transferido para tubo falcon e centrifugado a 4000rpm durante 4 minutos a 15°C. O volume de sobrenadante obtido foi extraído com acetato de etila (3 extrações consecutivas de 50 ml) e o precipitado (“pellet”) remanescente foi separado para preparo do extrato celular. O volume de solvente utilizado foi então reduzido em evaporador rotativo gerando os extratos de biotransformação que foram analisados por CLAE-DAD.

3.18.2 Biotransformações em meio sólido

Alíquotas de 1 mL do inóculo previamente preparado foram adicionadas a frascos tipo Erlenmeyers de 125 mL contendo 50 mL de meio agar para levedura ainda em estado líquido (temperatura mantida em torno de 40°C). O conteúdo de cada um desses frascos foi vertido para placas de Petri grandes contendo 1,7 mL de solução dos substratos em acetona (3mg/mL). Após completa solidificação, as placas foram incubadas em estufa a 37°C, durante 72 horas. Nesse período, a cada 24 horas, uma das placas era retirada, e o meio de cultura era picado em pedaços pequenos, transferidos para Erlenmeyers e mantidos maceração de acetato de etila por 24 horas. Após esse período, essa mistura foi filtrada e extraída outras duas vezes com o mesmo solvente durante 2 horas cada uma. O volume de solvente utilizado foi então reduzido em evaporador rotativo gerando os extratos de biotransformação que foram analisados por CLAE-DAD.

3.19 Biotransformações em fase exponencial

Para verificar a influência da fase de crescimento do micro-organismo em que é adicionado o substrato da reação de biotransformação, repetiu-se o experimento de biotransformação da 1,2-naftoquinona e da menadiona pelo fungo *C.elegans* ATCC 10028b e pela bactéria *E.coli*, onde a adição dos substratos foi feita durante a fase exponencial de desenvolvimento desses micro-organismos.

No experimento realizado com a bactéria *E. coli*, 1 mL de solução em acetona das naftoquinonas selecionadas (3mg/mL) foi adicionado a culturas de *E. coli* duas horas depois do inóculo desta bactéria no meio fermentativo MH. Alíquotas foram retiradas após 12 e 24 horas de incubação dos substratos. No experimento com o fungo *C.elegans*, a solução de substrato foi adicionada as culturas logo após transferência da biomassa deste micro-organismo em meio pré-fermentativo para o meio fermentativo Czapek modificado. Alíquotas foram retiradas a cada 24 horas durante 3 dias, extraídas por partição líquido-líquido com acetato de etila e analisadas por CLAE-DAD.

A viabilidade dos micro-organismos foi monitorada durante todo o processo por meio da inoculação de alíquotas das respectivas culturas em placas de petri contendo os meios de cultura MH para o experimento com a bactéria *E.coli* ou PDA para o fungo *C.elegans*.

3.20 Preparo dos controles experimentais

Todos os experimentos de biotransformação realizados foram acompanhados dos seguintes tipos de controles:

- **Controle de micro-organismo:** Composto pelo meio de cultura, inóculo do micro-organismo utilizado e volume de solvente (acetona) igual ao adicionado nos frascos das reações de biotransformação.

- **Controle de substrato:** Meio de cultura sem inóculo contendo solução de substrato em acetona.
- **Controle de meio de cultura:** Meio de cultura sem inóculo contendo o mesmo volume de solvente (acetona) igual ao adicionado nos frascos das reações de biotransformação.
- **Controle tempo zero:** Meio de cultura sem inóculo ao qual a solução de substrato em acetona é adicionada e imediatamente extraída sem haver período de incubação. Serve como controle de extração dos substratos.

3.21 Preparo e análise dos extratos obtidos através dos processos de biotransformação

Após o término dos períodos de incubação das reações de biotransformação, os caldos das culturas foram submetidos à partição com 50 mL de acetato de etila destilado (3 extrações consecutivas). O volume resultante desse solvente foi então concentrado em evaporador rotativo para obtenção dos respectivos extratos. Os extratos dos processos de biotransformação, incluindo os extratos controles, foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência nos seguintes equipamentos: Cromatógrafo Shimadzu® acoplado a um detector de arranjo de diodos (DAD) com auxílio do software CLASS-VP e cromatógrafo Waters® também acoplado a um detector de arranjo de diodos (DAD), com auxílio do software Empower. Durante as análises, foi utilizada dois tipos de colunas cromatográficas: coluna de fase reversa C18 (Kromasil® 100-5, 250x4,60 mm de diâmetro interno, tamanho de partícula de 5 µm, acoplada a uma coluna de guarda com a mesma fase estacionária e coluna Synergi Polar-RP (Phenomenex®, 5µm, 4,6 X 250 mm). Os valores das áreas referente aos picos dos materiais de partida em cada extrato foram utilizados para a construção de uma curva para verificar o perfil de consumo do substrato no período de tempo monitorado.

As análises cromatográficas iniciaram com a injeção de 20 μL de uma solução do substrato na concentração de 1 mg/mL, seguidos das análises dos extratos obtidos. Para a realização dessas análises, foi utilizado como fase móvel um sistema de eluição gradiente de acetonitrila e água com vazão de 0,8 mL/min. As amostras analisadas também foram preparadas na concentração de 1mg/mL (solubilizadas em ACN) e centrifugadas por 5 minutos antes da injeção. Após esse procedimento, 20 μL dessas soluções foram injetadas no cromatógrafo e o valor da área do pico referente à naftoquinona presente em extrato foi utilizado para verificar a eficiência do micro-organismo em promover a conversão dos metabólitos.

3.22 Preparo dos extratos celulares

Nos experimentos realizados com fungos filamentosos, ao término do requerido tempo de incubação dos experimentos de biotransformação, as massas miceliais resultantes da filtração das culturas, foram lavadas com água destilada, e congeladas por 48 horas. Após esse período, as biomassas foram trituradas em graal e os fragmentos resultantes foram transferidos para frascos tipo Erlenmeyers seguido da adição de 50 ml de acetona grau cromatográfico. As massas miceliais foram mantidas em maceração por 24 horas e então filtradas. Esse procedimento foi repetido mais 2 vezes e então o volume de solvente resultante foi concentrado em evaporador rotativo gerando os extratos miceliais.

Para as bactérias e para a levedura *S.bouardii* , após centrifugação e separação do caldo resultante da última alíquota retirada de cada processo, as massas celulares (precipitado) foram lavadas com água destilada e centrifugadas novamente. Após retirada do volume de água da lavagem, a massa celular foi acrescida de 25mL de acetato de etila e mantidas em banho de ultrassom durante 20 minutos. Após este

período, o solvente resultante foi particionado com água destilada e a fase orgânica resultante foi concentrada em evaporador rotativo. Alíquotas dos extratos foram preparadas em acetonitrila (1mg/mL) e analisadas por CLAE-DAD.

3.23 Biotransformações em escala preparativa (scale up)

Os processos que se mostraram promissores em escala analítica foram realizados em escala ampliada visando o isolamento dos compostos produzidos. Para os processos realizados em meios líquidos a ampliação de escala foi feita mantendo as exatamente as condições estabelecidas na condição de triagem, aumentando, portanto, o número de frascos produzidos. Nos experimentos em meio sólido, a ampliação da escala analítica para preparativa foi feita substituindo as placas de Petri por garrafas de Roux de 1000 mL de capacidade. O preparo dos referidos extratos também foi feito conforme padronização da escala de triagem. Em cada um desses experimentos foi utilizado 300mg de substrato.

3.24 Isolamento dos componentes do extratos de biotransformação

Antes do processo de isolamento, os extrato de biotransformação foram analisados por CLAE-DAD para verificação de seu perfil cromatográfico. Optou-se por realizar o isolamento dos componentes químicos de cada extrato diretamente por CLAE preparativa. Para isso, primeiramente estabeleceu-se as condições cromatográficas que melhor separaram os componentes presentes no extrato, utilizando CLAE-DAD em modalidade analítica.

Realizou-se os processos de isolamento utilizando uma coluna Polar-RP, 250x10 mm de diâmetro interno, tamanho de partícula de 5 µm, acoplada a uma coluna de guarda com a mesma fase estacionária em um sistema de CLAE preparativa (Shimadzu®) com detecção em UV/VIS. O sistema eluente utilizado foi o mesmo

empregado nas análises da modalidade analítica (gradiente compostos por acetonitrila e água, variando de 30- 100% em 50 minutos, com uma vazão de 2 mL/min para **EBMCE** e **EBMEc** e gradiente compostos por acetonitrila e água, variando de 20- 100% em 30 minutos, com uma vazão de 3 mL/min para **EBLMCE**). O volume de injeção foi de 100 μ L e a quantidade injetada foi de 2 mg por injeção. As frações obtidas foram evaporadas em evaporador centrífugo (Speed-vacum Savant SPD2010) a 45 °C durante 24 horas.

Após coletadas, as frações submetidas à purificação foram analisadas novamente por CLAE-DAD (gradiente de acetonitrila e água variando de 20-100% de solvente orgânico em 30 minutos) para verificar os perfis químicos. As amostras que apresentaram maior grau de pureza foram enviadas para análises de RMN de ^1H e ^{13}C , bem como, para análises por espectrometria de massas para determinação de suas estruturas químicas.

3.25 Análises espectroscópicas

As análises de espectroscopia de ressonância nuclear (RMN) foram realizadas no Laboratório de RMN do Departamento de Química da UFSCAR, sob-responsabilidade do Prof. Dr. Antônio Gilberto Ferreira.

Os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C , subespectros e mapas de contornos (COSY, HMBC e HSQC) foram obtidos utilizando o espectrômetros da marca Bruker DRX400 (9,4 Tesla) e DRX500 (11,75 Tesla). Como referência interna foi utilizado o sinal do tetrametilsilano (TMS) presente nos solventes deuterados da marca *Sigma Aldrich* (Sigma Aldrich Chemical Company Inc., Milwaukee, WI – EUA). Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz). O processamento dos espectros unidimensionais foi realizado pelo MestReNova versão 6.0.2 e os bidimensionais pelo

software SpinWorks® versão 2.5, desenvolvido pela Chemistry NMR Lab da Universidade de Manitoba.

3.26 Análises espectrométricas

Os estudos realizados por CLAE-EM/EM foram realizados na Central Analítica da FCFRP-USP, sob supervisão do Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes, utilizando um espectrômetro de massas tipo TOF, modelo AmaZon da marca Bruker Daltonics com fonte de ionização electrospray (ESI) em modo positivo.

3.27 Avaliação da Citotoxicidade dos derivados obtidos

Os ensaios citotóxicos das naftoquinonas foram realizados em parceria com a Profa. Dra. Raquel Alves dos Santos, no Laboratório de Genética e Biologia Molecular (LAGBIM) da Universidade de Franca (UNIFRAN). O método utilizado foi o ensaio de citotoxicidade XTT. As linhagens celulares utilizadas no ensaio foram a de adenocarcinoma humano mamário (MCF-7), adenocarcinoma humano pulmonar (A549) além de uma linhagem de tumor cervical (HeLa) bem como de uma linhagem celular de fibroblastos humanos GM07402-A. As linhagens foram obtidas do banco de células do Rio de Janeiro e foram cultivadas em meio de cultivo composto por meio HAM F10+DMEM (Sigma, St Louis, EUA) suplementado com 10%-20% de soro bovino fetal (SBF) e mistura de antibióticos penicilina/estreptomicina (10 mL.L^{-1} , Sigma, St Louis, EUA) acrescido de sulfato de canamicina (10 mg. L^{-1}) utilizando garrafas de cultivo de 25 mm^2 (TPP, Suíça) ou placas de poços múltiplos quando necessário. Durante o tempo de cultivo e tratamentos as células foram mantidas em estufa de CO_2 à 37°C . Os tempos de cultivo e tratamento foram determinados com base nos resultados obtidos pelos ensaios de citotoxicidade. A citotoxicidade foi determinada por meio da utilização do Cell Proliferation Kit (Roche Applied Science), baseado na clivagem do sal amarelo

tetrazolium XTT pelas células metabolicamente ativas formando o corante formazana alaranjado. As células foram semeadas em placas de 96 poços e mantidas em estufa de CO₂ à 37°C por 24 h. Após esse período o protocolo de tratamento consistiu em expor as células às diferentes concentrações das naftoquinonas (7,8 a 1000 µg/mL) por 24 horas. As substâncias testadas foram diluídas em etanol, sendo a concentração máxima do diluente em cultura de 0,1%. Como controle positivo foi utilizado cloridrato de doxorrubicina (0,5 µM) (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA).

Após 24 horas de exposição foi realizada a lavagem das células com tampão salino fosfato (PBS) 1X e incubação das mesmas em meio DMEM sem fenol vermelho acrescido da solução XTT/elétron por 4 h. Após esse tempo, foi realizada a leitura colorimétrica em espectrofotômetro (492-690 nm), sendo então determinada a proporção de células viáveis em razão das medidas de absorbância. Os ensaios foram realizados em triplicata. Os resultados foram analisados com auxílio do GraphPad Prisma 5.0 e foram determinados os valores de CI50.

Resultados e discussão

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Padronização das condições de cultivo dos fungos para as reações de biotransformação

Para realização dos estudos de biotransformação empregando micro-organismos é necessário, primeiramente, que sejam estabelecidas as condições de cultivo adequadas para que os micro-organismos consigam crescer, se desenvolver para assim produzir as enzimas que poderão atuar nas reações. Sendo assim foi possível verificar qual o meio de cultura e a condição de incubação ideal para o crescimento e produção de esporos pelos fungos selecionados na etapa de reativação das cepas. Para essa avaliação foram selecionados três diferentes meios de cultura incubados durante 7, 10 e 14 dias a 30 °C em estufa BOD. As condições que propiciaram maior produção de esporos para cada micro-organismo estão apresentadas na **Tabela 3**, expressas como a média de três medidas independentes.

Tabela 3: Condições de cultivo selecionadas para os fungos filamentosos (produção de esporos)

Fungo	Meio de Cultura	Período de Incubação (Dias)	Nº de esporos (mL)
<i>A.alliaceus</i> (ATCC 10060)	PDA	7	4,5x10 ⁸
<i>A.brasiliensis</i> (ATCC 16404)	PDA	7	2,3x10 ⁹
<i>A.niger</i> (NRRL 599)	PDA	7	9,8x10 ⁹
<i>A.niger</i>	PDA	7	8,8x10 ⁹
<i>A.ochraceus</i>	PDA	7	7,8x10 ⁸
<i>A.phoenicis</i>	Ágar extrato de malte	10	3x10 ⁸
<i>C.echinulata var. elegans</i>	Ágar extrato de malte	10	1,5x10 ⁸
<i>C.elegans</i> ATCC 10028b	Ágar extrato de malte	7	3,5x10 ⁸

Continuação da Tabela 3

<i>C.elegans</i> ATCC 9245	Ágar extrato de malte	7	$3,8 \times 10^8$
<i>M.rouxii</i> NRRL 1894	Ágar extrato de malte	7	$1,5 \times 10^8$
<i>R.stolonifer</i>	Ágar extrato de malte	7	$1,2 \times 10^8$

Os resultados expressos na **Tabela 3** mostraram que cada um dos fungos avaliados requer condições diferentes para produção máxima de esporos. De uma forma geral, os fungos do gênero *Cunninghamella*, cresceram melhor quando incubados em meio ágar extrato de malte, enquanto a maioria dos micro-organismos do gênero *Aspergillus* teve melhor crescimento quando cultivados meio PDA. Tal fato destaca a importância da realização dos estudos de cultivo durante os experimentos de biotransformação.

Pode-se perceber também que o número de esporos produzidos em todos os casos foi superior a 1×10^8 esporos/mL, sendo assim esse valor foi padronizado para iniciar o cultivo em meio pré-fermentativo.

O perfil de crescimento dos fungos filamentosos em meio de cultura líquido pode ser dividido em 4 fases principais: fase lag, fase exponencial, fase estacionária (idiofase) e fase de declínio (Finkelstein & Ball, 1992). A regulação do metabolismo dos fungos está relacionada com as fontes de carbono e nitrogênio, sendo que a atividade das enzimas utilizadas para a biossíntese dos metabólitos secundários, bem como também para a realização dos processos de biotransformação, são amplificadas após o crescimento celular completo, na fase denominada idiofase ou fase estacionária (Finkelstein & Ball, 1992).

Para que os micro-organismos alcançassem a fase estacionária mais rapidamente optou-se por fazer um cultivo prévio dos fungos em uma etapa denominada pré-fermentativa. Neste caso, optou-se por empregar o meio descrito por Jackson e

colaboradores (1993), rico em nutrientes o que permite o desenvolvimento rápido e eficiente da massa micelial a partir das células reprodutivas. Relatos na literatura apontam que o cultivo dos micro-organismos em duas etapas de crescimento (pré-fermentativa e fermentativa) tem demonstrado resultados promissores para os estudos de biotransformação (Severiano et al., 2010; Severiano et al., 2013). A **Figura 29**, mostra, comparativamente, as curvas de crescimento dos diferentes micro-organismos utilizados nesse estudo em meio pré-fermentativo.

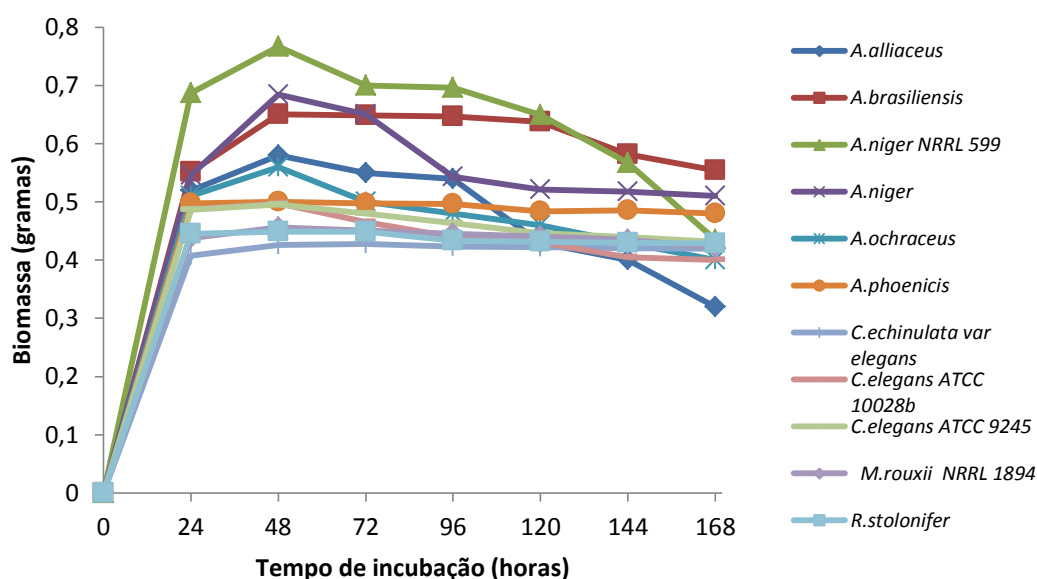


Figura 29. Curvas de crescimento dos fungos em meio pré-fermentativo, incubado a 30 °C, sob agitação constante de 120 rpm, por um período de quatro dias consecutivos.

A análise do gráfico da **Figura 29** mostrou que apesar de haver variação na quantidade de biomassa produzida pelos diferentes micro-organismos, todos apresentam o ápice de crescimento após 48 horas de incubação, sendo esse o período selecionado para transferência da biomassa para o meio Czapek modificado iniciando a etapa fermentativa. Após esse período, o crescimento deles é estabilizado ou entra em decaimento.

A composição do meio de cultura em que os micro-organismos estão sendo desenvolvidos pode afetar a biossíntese de enzimas envolvidas no processo de biotransformação (Facciotti et al. 1991; Janusz et al., 2007). Como exemplo, podemos citar a hidroxilação de sesquiterpenóides pelo fungo *Mucor plumbeus* que é diretamente influenciada pela presença de ferro no meio de cultura (Collins et al., 2002). Demyttenaere e colaboradores (2001) e Adams e colaboradores (2003) demonstraram respectivamente, que os processos de transformação microbiana do linalol pelo fungo *Aspergillus niger* e do limoneno por *Penicillium digitatum* são influenciados significativamente pela composição do meio de cultura e pelo solvente utilizado para solubilizar o substrato a ser biotransformado.

Os meios fermentativos mais empregados em estudos de produção de metabólitos secundários e de biotransformação são os meios Koch's K1 e Czapek. O meio Koch's K1 apresenta em sua composição nutricional, duas fontes complexas de nutrientes, a peptona e o extrato de levedura, que podem conter aminoácidos e íons metálicos que poderiam de alguma forma afetar o comportamento das naftoquinonas durante os processos de biotransformação (Burton & David, 1952; Amaki et al, 2011). Sendo assim, optou-se por utilizar uma versão do meio fermentativo Czapek, substituindo a sacarose (3%) por glicose (1%) e retirando da composição o sulfato ferroso e sulfato de magnésio na tentativa de evitar a interferência desse íons no comportamento das quinonas. A **Figura 30** mostra um gráfico do perfil de crescimento dos micro-organismos estudados em meio fermentativo Czapek modificado.

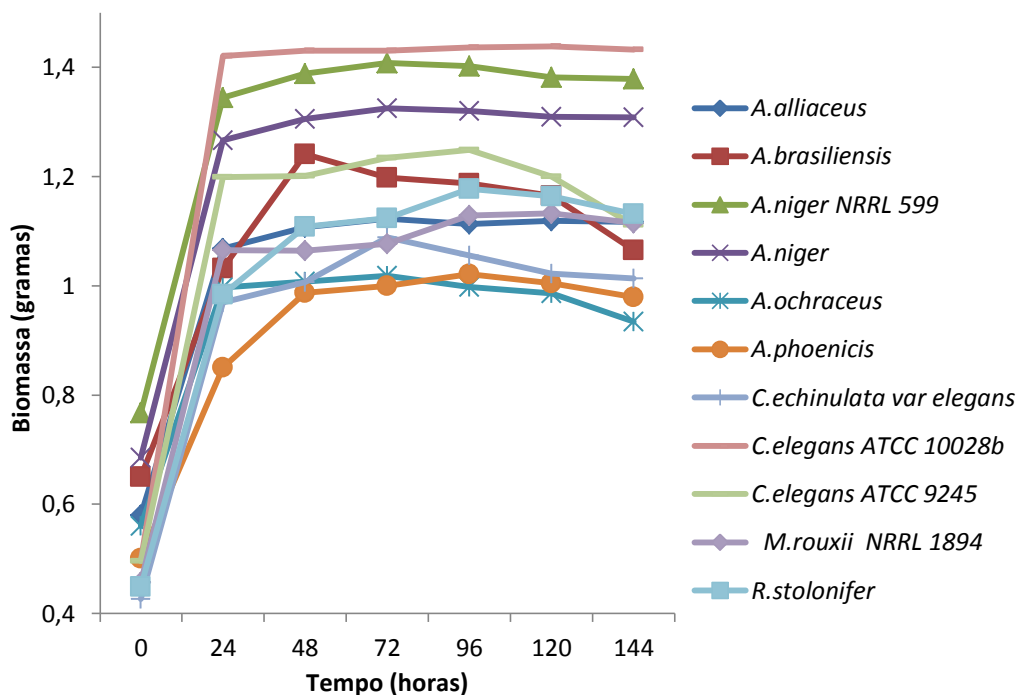


Figura 30. Curvas de crescimento dos fungos em meio fermentativo Czapek modificado, incubado a 30 °C, sob agitação constante de 120 rpm, por um período de seis dias consecutivos.

Pela análise do gráfico apresentado, pode-se perceber que os micro-organismos avaliados, ao serem transferidos para o meio fermentativo, permanecem por um tempo em fase exponencial até entrar na idiofase. Esse período foi de 48 horas para os fungos *A.brasiliensis*, *A.phoenicis* e *R.stolonifer* e de 24 horas para os demais. Essa etapa foi selecionada para a adição dos substratos e início das reações de biotransformação.

Para verificar se a presença das naftoquinonas poderia alterar o perfil de crescimento dos fungos, repetiu-se a curva de crescimento do fungo *C.elegans* ATCC 10028b na presença das naftoquinonas menadiona e 1,2-naftoquinona. A **Figura 31**, mostra o gráfico comparativo do crescimento deste fungo na presença e ausência das naftoquinonas avaliadas.

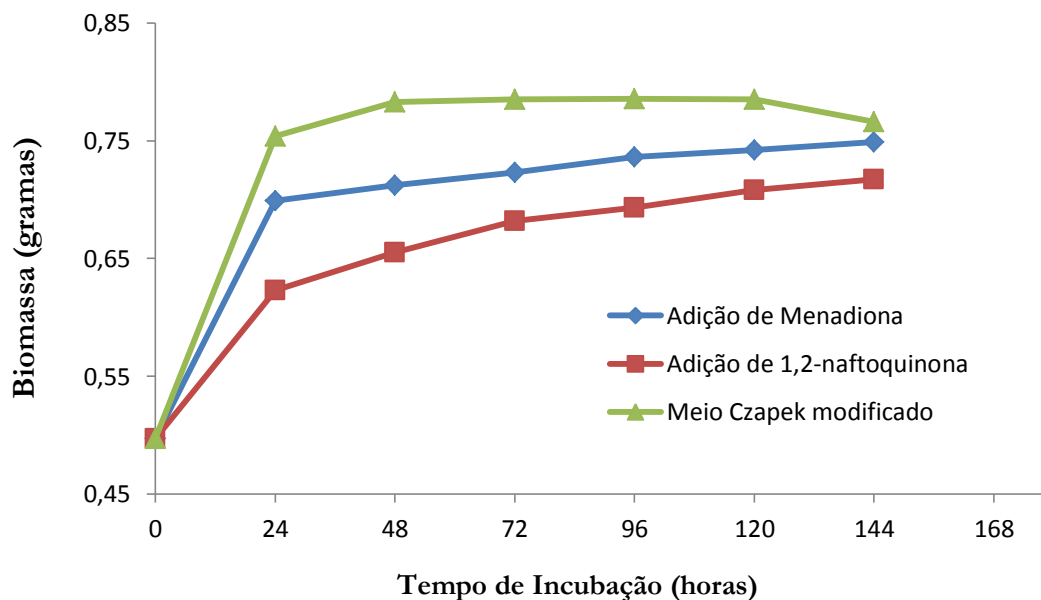


Figura 31. Curva de crescimento de *C.elegans* ATCC 10028b na presença de naftoquinonas.

Como pode ser observado, o crescimento de *C.elegans* é maior na ausência das naftoquinonas. Pode-se observar também que a presença da 1,2-naftoquinona afeta mais o crescimento desse micro-organismo se comparado a naftoquinona menadiona. Contudo, em todas as curvas de crescimento, pode-se observar o início da fase estacionária depois de 24 horas de cultivo no meio fermentativo, o que não muda o tempo padronizado para adição dos substratos nas culturas.

4.2. Estabelecimento das condições de cultivo das bactérias do trato gastrintestinal para as reações de biotransformação

A padronização das condições de crescimento das bactérias iniciou-se através da relação entre os valores de absorbância das suspensões das bactérias com o número de unidades formadoras de colônias presentes. Foi padronizado que o inóculo dos experimentos com as bactérias seria de 10^7 UFC/mL e a absorbância correspondente a esse inóculo variou entre as bactérias sendo de 0,122 para *L.acidophilus*, 0,109 para

Bifidobacterium sp, de 0,129 para a cultura mista e de 0,109 para *E. coli*. O gráfico da **Figura 32** apresenta as curvas de crescimento das bactérias estudadas.

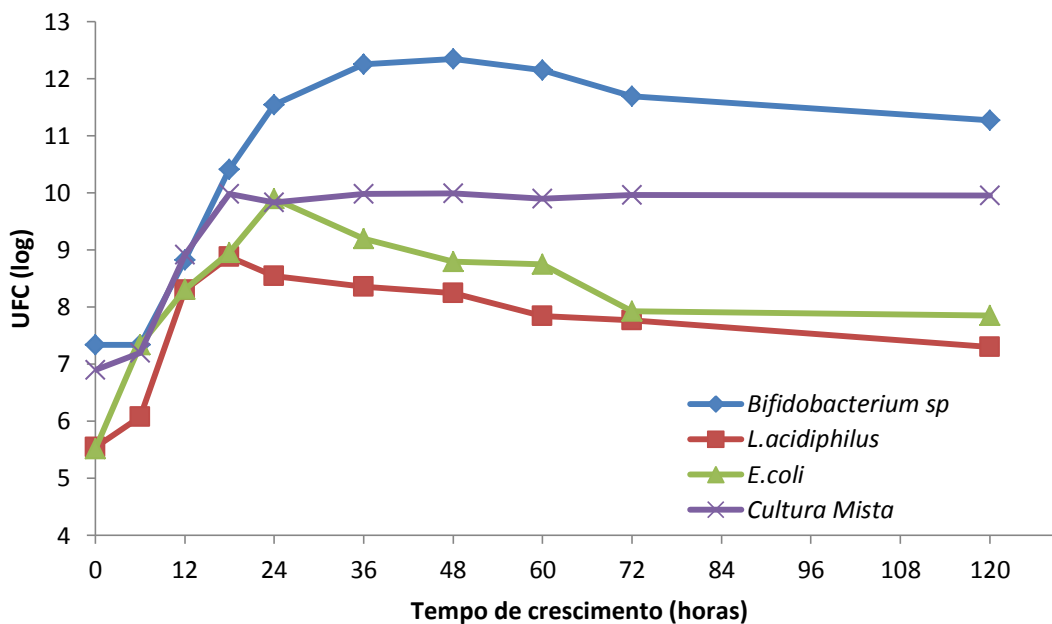


Figura 32. Curvas de crescimento das bactérias probióticas em seus respectivos meios de cultura

Analisando as curvas de crescimento das bactérias observou-se que as bactérias *L. acidophilus* e *E. coli* nos meios de cultura e condições avaliadas iniciaram a fase estacionária após 12 horas de incubação no meio líquido, porém permanecem em tempos diferentes nessa fase, sendo de 24 horas e menos de 3 horas, respectivamente. A cultura mista atinge a fase estacionária com 18 horas de cultivo, permanecendo por 30 horas e *Bifidobacterium* sp atinge com 36 horas após o início do cultivo, permanecendo por 24 horas.

Os resultados das curvas de crescimento demonstram que as culturas de bactérias do trato gastrointestinal possuem perfis de crescimentos diferentes. Assim que cada cultura iniciou sua fase estacionária foi adicionada a solução de substrato e as reações de biotransformação foram monitoradas por 6, 12 e 24 horas.

Vale ressaltar que as bactérias do trato gastrointestinal apresentam requerimentos nutricionais e de cultivo bastante específicos e portanto não é possível fazer grandes variações na composição dos meios de cultura utilizados como foi feito com os fungos filamentosos. A **Tabela 4** resume as condições de cultivo e tempo padronizado para início da fase estacionária de cada bactéria.

Tabela 4. Condições de cultivo das bactérias intestinais

Bactéria	Meios de cultura (Caldo e Agar)	Absorbância do inóculo	Início da fase estacionária	Atmosfera de incubação
<i>Bifidobacterium sp.</i>	MRS	0,109	36 horas	Anaerobiose
<i>L.acidophilus</i>	MRS suplementado	0,122	12 horas	Anaerobiose
Cultura mista	MRS suplementado	0,129	18 horas	Anaerobiose
<i>E. coli</i>	MH	0,109	12 horas	Aerobiose e anaerobiose

Da mesma forma descrita para os fungos filamentosos, realizou-se a verificação da influência da presença das naftoquinonas no perfil de crescimento das espécies bacterianas. Para isso utilizou-se a bactéria *E.coli* na presença das naftoquinonas menadiona e 1,2-naftoquinona. A **Figura 33**, mostra o gráfico comparativo do crescimento do micro-organismo na presença e ausência dos substratos selecionados.

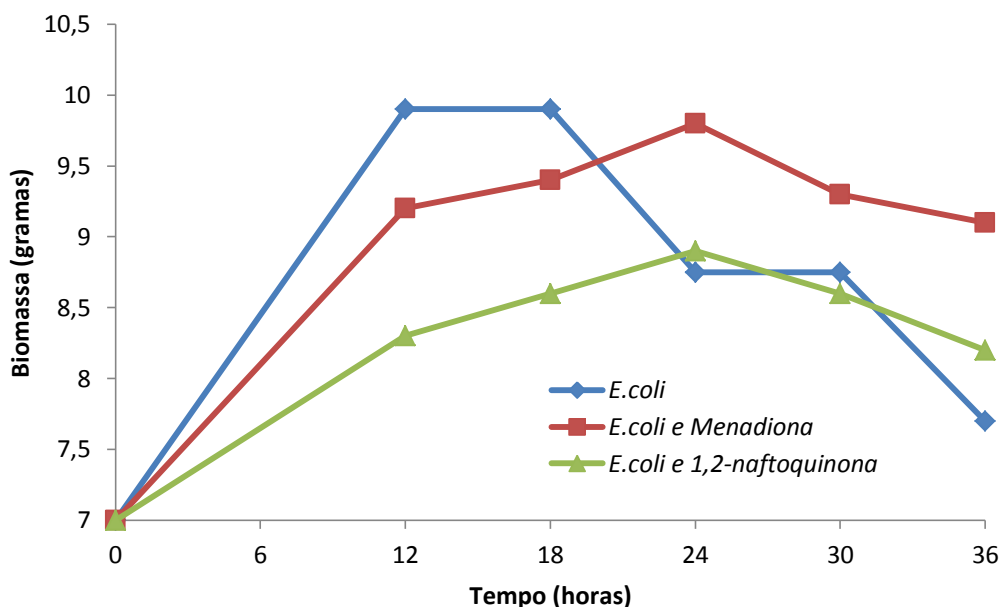


Figura 33. Curvas de crescimento da bactéria *E. coli* na presença e ausência dos substratos selecionados

Pode-se observar que, assim como no caso do experimento com fungos, houve diminuição no crescimento celular das bactérias quando na presença das naftoquinonas, no entanto, em todas as condições essa bactéria entrou em fase estacionária no mesmo tempo padronizado na ausência das naftoquinonas. Vale ressaltar que a presença das naftoquinonas faz esse micro-organismo permanecer na idiofase por um período maior retardando sua fase de declínio e morte celular.

4.3. Teste de solubilidade das naftoquinonas

Para iniciar os estudos com as naftoquinonas, decidiu-se primeiramente avaliar a solubilidade desses compostos em água e em alguns tipos de solventes orgânicos comumente empregados nos experimentos de biotransformação visando selecionar as opções mais adequadas durante os processos de extração e preparo de amostras. A **Tabela 5** apresenta os dados obtidos.

Tabela 5: Solubilidade de naftoquinonas em diferentes solventes

Naftoquinona	TIPOS DE SOLVENTES										
	Água	AcOEt	<i>n</i> -butanol	Clorofórmio	Diclorometano	Éter etílico	<i>n</i> -hexano	Acetona	Álcool etílico	Álcool metílico	Acetonitrila
1,2-naftoquinona	I	S	PS	S	S	PS	PS	S	S	S	S
1,4-naftoquinona	I	S	PS	S	S	PS	PS	S	S	S	S
Lausona	I	S	S	S	S	PS	I	S	S	S	S
Menadiona	I	S	S	S	S	S	PS	S	PS	PS	S
Plumbagina	I	S	S	S	S	S	PS	S	S	S	S
Metoxilausona	I	S	PS	S	S	S	S	S	PS	I	S
Vitamina K1	I	S	I	S	S	S	S	S	I	I	S
5-hidroxi-naftoquinona	I	S	S	S	PS	PS	I	S	S	S	S

Legenda: S: solúvel I: insolúvel PS: parcialmente solúvel

Através dos dados obtidos e descritos na tabela acima, pode-se verificar que nenhuma das naftoquinonas avaliadas apresenta solubilidade em água. Conforme esperado, substratos como a 5-hidroxi-naftoquinona e a lausona (maior polaridade) apresentam maior solubilidade em solventes orgânicos mais polares enquanto as naftoquinonas de maior caráter apolar (vitamina k1, metoxilausona), apresentam maior solubilidade em solventes como hexano, diclorometano e éter etílico sendo, portanto insolúveis ou pouco solúveis em solventes como o etanol, metanol e butanol. De uma forma geral, pode-se perceber que todos os substratos avaliados são solúveis nos solventes: acetonitrila, acetona, acetato de etila e clorofórmio.

Por serem capazes de solubilizar eficientemente as naftoquinonas envolvidas nesses estudos além de serem imiscíveis em água, os solventes acetato de etila e clorofórmio seriam as opções mais viáveis para serem empregados nas extrações líquido-líquido (partição) dos extratos de biotransformação. Dentre eles, optou-se por utilizar o acetato de etila por se tratar de um solvente menos tóxico (não clorado).

A extração por partição líquido-líquido, além de apresentar diversas vantagens com relação ao custo, facilidade e rapidez, também mostrou-se mais eficiente quando comparada com os resultados obtidos pelo uso da mistura de resinas poliméricas do tipo XAD. Na **Figura 34** estão apresentados os cromatogramas obtidos por CLAE-DAD dos extratos dos meios de cultura contendo menadiona obtidos por extrações com resinas poliméricas e por partição líquido-líquido.

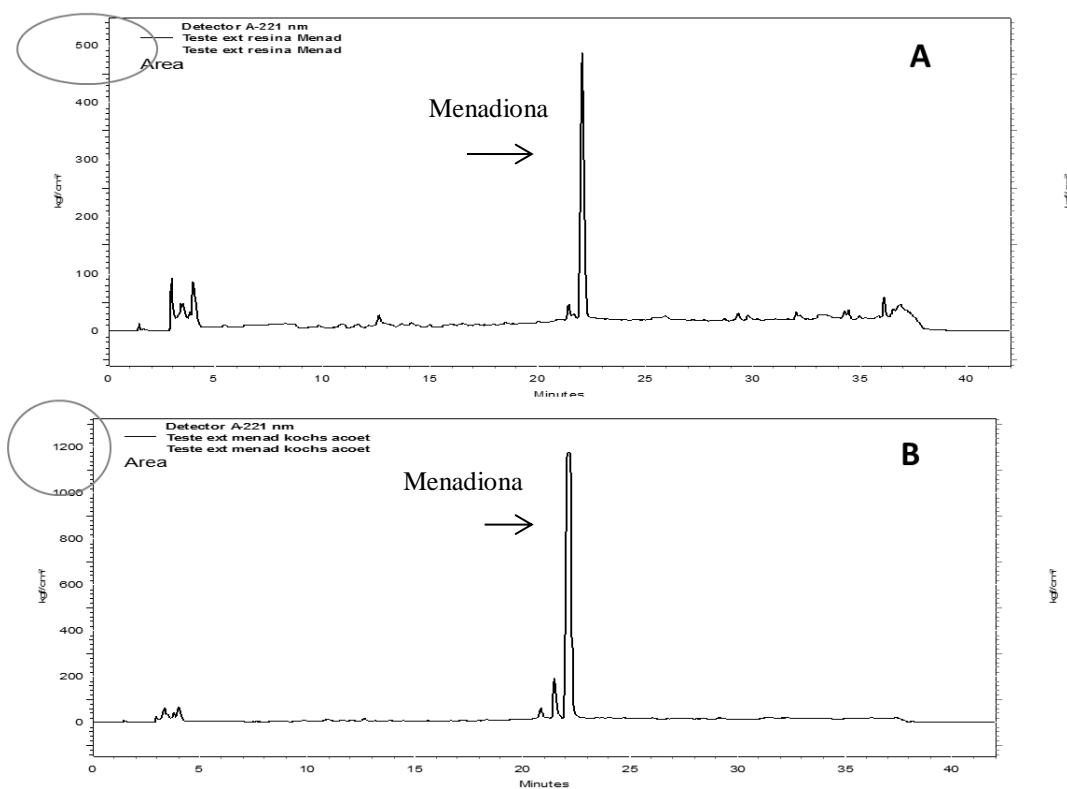


Figura 34: Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD dos extratos dos meios de cultura contendo menadiona obtidos por extrações com resinas poliméricas (A) e por partição líquido-líquido (B). O círculo sob a escala destaca a intensidade dos picos observados. As condições cromatográficas foram: Cromatógrafo Shimadzu, Coluna Kromasil C18, fase móvel constituída por gradiente de acetonitrila e água (20-100% Fase orgânica em 35 minutos), vazão de $0,8\text{ml min}^{-1}$, volume de injeção de $30\mu\text{L}$, detecção em UV 220nm e análise a temperatura ambiente.

4.4. Verificação dos efeitos inibitórios das naftoquinonas frente aos micro-organismos utilizados (CIM)

Foi realizada a determinação das concentrações de substratos adequadas para serem utilizadas nas reações de biotransformação sem causar morte dos micro-organismos envolvidos nas biorreações. Os resultados obtidos estão apresentados na

Tabela 6:

Tabela 6. Valores de concentração inibitória mínima (CIM) das naftoquinonas frente aos micro-organismos utilizados nas reações de biotransformação

MICRO-ORGANISMO	Valores de CIM (µg/mL)							
	1,2-naftoquinona	1,4 naftoquinona	Lausona	Menadiona	Vitamina K1	Plumbagina	5-hidroxi-naftoquinona	Lausona metoxilada
<i>A.alliaceus ATCC 10060</i>	>400	>400	>400	>400	>400	100	>400	>400
<i>A.brasiliensis ATCC 16404</i>	200	200	200	200	>400	100	>400	>400
<i>A.niger NRRL 599</i>	>400	>400	>400	>400	>400	100	>400	>400
<i>A.niger</i>	>400	>400	>400	>400	>400	200	>400	>400
<i>A.ochraceus</i>	200	200	400	>400	>400	100	400	200
<i>A.phoenicis</i>	200	200	200	>400	>400	50	200	200
<i>Bifidobacterium sp.</i>	>400	>400	>400	>400	>400	25	200	>400
<i>C.echinulata</i>	>400	>400	200	200	200	100	200	200
<i>C.elegans ATCC 9245</i>	200	400	200	200	200	100	200	200
<i>C.elegans ATCC 10028b</i>	200	200	100	200	200	100	200	200
<i>E.coli ATCC 25922</i>	>400	200	>400	>400	>400	200	>400	>400
<i>L.acidophilus</i>	>400	> 400	> 400	> 400	>400	100	200	>400
<i>M.rouxii</i>	400	400	>400	>400	400	100	>400	200
<i>R.stolonifer</i>	400	400	400	> 400	>400	200	400	400
<i>S.boulardii</i>	200	200	400	>400	>400	200	400	400
<i>Cultura mista</i>	>400	>400	>400	>400	>400	100	400	>400

Apesar desses micro-organismos não sofrerem inibição considerável de crescimento na presença de concentrações elevadas das naftoquinonas testadas, definiu-se que, nos experimentos de biotransformação seria utilizada a concentração de 100µg/mL de substrato em meio de cultura. Essa concentração foi selecionada por já ter sido utilizada em trabalhos de biotransformação gerando bons resultados (Capel et al., 2011; Severiano et al., 2010; Severiano et al., 2013). Ainda é válido destacar a capacidade das quinonas em gerar espécies reativas de oxigênio, as quais são responsáveis por grande parte dos efeitos biológicos e toxicológicos desta classe de compostos, o que pode inibir a metabolização das mesmas pelos micro-organismos (Hahn et al., 2013; Pinto & Castro, 2009).

4.5. Estabilidade das naftoquinonas nos meios de cultura empregados

Para verificar a compatibilidade das naftoquinonas com os meios de cultura utilizados, foi feito um teste de incubação de cada substrato nos diferentes meios de cultura empregados no trabalho, sendo eles: meio MRS, meio MRS suplementado, meio MH, meio Czapek modificado e em água destilada e água ultrapurificada. Foram realizadas extrações dos caldos utilizando acetato de etila imediatamente após a incubação dos substratos (controle de tempo zero) e após 24 horas de incubação.

Os resultados desse experimento mostraram que, todas as naftoquinonas puderam ser extraídas com eficiência dos meios de cultura avaliados quando os mesmos não foram mantidos em incubação (frascos codificados como tempo zero). Após a incubação das naftoquinonas por 24 horas, não foi possível observar o pico referente a 1,2-naftoquinona, 1,4-naftoquinona, lausona e 5-hidroxi-naftoquinona nos seus respectivos extratos. O mesmo resultado foi observado quando essas naftoquinonas foram incubadas apenas na presença de água, o que descarta a hipótese de que isso tenha a ver com a presença de algum componente dos meios de cultura. Os resultados

da **Tabela 7** apresentam a estabilidade das naftoquinonas empregadas no trabalho nos diferentes meios de cultura utilizados.

Tabela 7. Estabilidade das naftoquinonas em diferentes meios de cultura

Naftoquinona	Meio de incubação					
	Água destilada	Água Ultrapura	Czapek modificado	MH	MRS	MRS suplementado
1,2-naftoquinona	Não	Não	Não	Não	Não	Não
1,4-naftoquinona	Não	Não	Não	Não	Não	Não
Lausona	Não	Não	Não	Não	Não	Não
Lausona metoxilada	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Menadiona	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Plumbagina	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Vitamina K1	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
5-hidroxi-naftoquinona	Não	Não	Não	Não	Não	Não

Legenda Sim: Naftoquinona detectada no meio de cultura Não: Naftoquinona não detectada no meio cultura

As fases aquosas remanescentes a esse processo de extração foram liofilizadas e também analisadas por CLAE-DAD, a fim de se verificar a possível presença dessas naftoquinonas, mas a análise dos cromatogramas não mostrou o pico referente a nenhuma delas em seus respectivos extratos. Como exemplo pode-se analisar a **Figura 35** que mostra os cromatogramas referentes aos extratos obtidos com o experimento da 1,2-naftoquinona em diferentes meios de cultura.

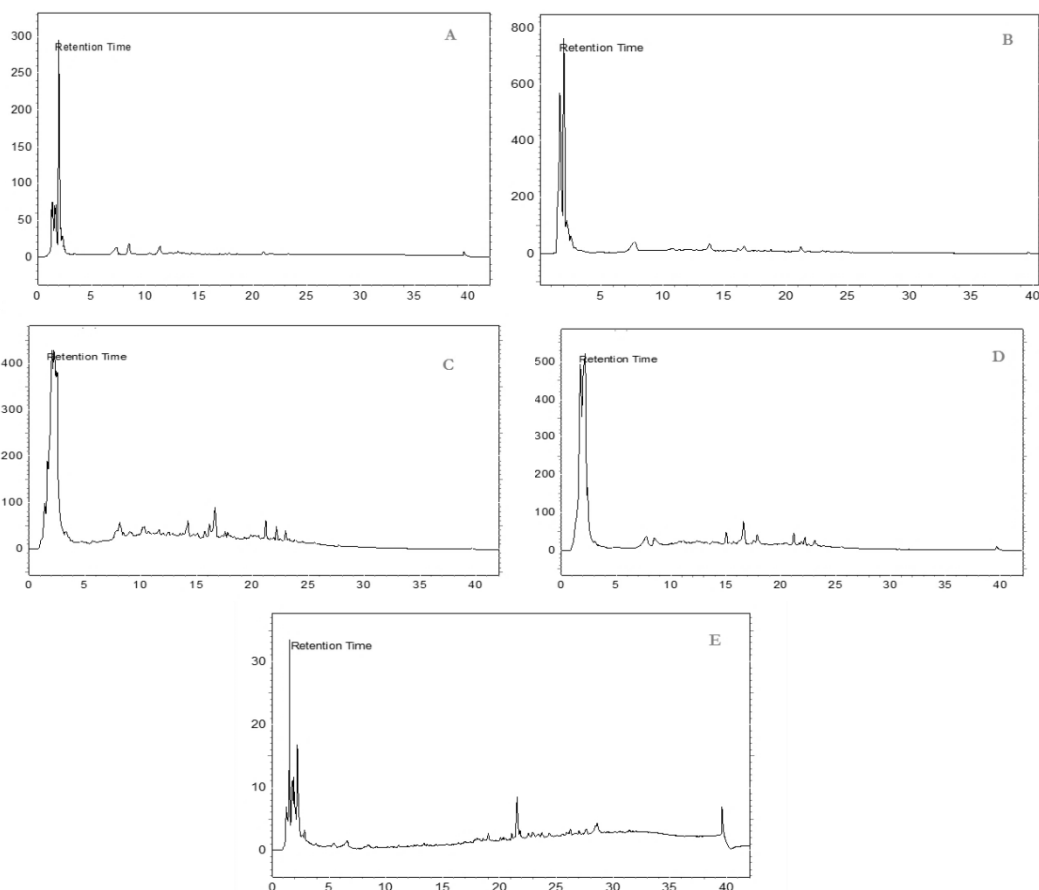


Figura 35. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD dos extratos de diferentes meios de cultura contendo a 1,2 –naftoquinona após 24 horas de incubação. (A:fase aquosa liofilizada após extração; B: meio MH; C: meio MRS; D: meio MRS suplementado e E: meio Czapek modificado). As condições cromatográficas foram: Cromatógrafo Shimadzu, Coluna Kromasil C18, fase móvel constituída por gradiente de acetonitrila e água (20-100% Fase orgânica em 35 minutos), vazão de 0,8ml min⁻¹, volume de injeção de 30µL, detecção em UV 220nm e análise a temperatura ambiente.

É importante ressaltar que, em outros trabalhos do nosso grupo de pesquisa, empregando os mesmos meios de cultura e métodos deste trabalho, foi possível obter derivados do lapachol (Silva, 2014 ; Silva et al., 2014), naftoquinona bastante conhecida por sua propriedade antitumoral (Epifano et al., 2014; Cragg & Newman, 2005; Rao et al., 1968), bem como da β -lapachona, através de biotransformação utilizando fungos que mimetizam o metabolismo humano e bactérias do trato gastrointestinal (Paludo, 2013; Paludo et al., 2014). As estruturas químicas de alguns dos derivados obtidos foram apresentadas na **Figura 27** e **Figura 31**.

Os métodos empregados nesses estudos foram os mesmos utilizados no presente trabalho e não foram encontradas dificuldades relacionadas a detecção dos substratos nos meios utilizados o que sugere que problemas experimentais observados estejam relacionados ao comportamento químico das naftoquinonas selecionadas. Não foram encontrados dados na literatura relacionados aos resultados obtidos, porém sabe-se que apesar das naftoquinonas serem moléculas muito antigas, de estrutura química simples e propriedades químico-biológicas bastante relevantes, existem poucos relatos de trabalhos de biotransformação das mesmas. Não foi encontrado nenhum relato na literatura de trabalhos de biotransformação com as naftoquinonas selecionadas ou mesmo de naftoquinonas pouco substituídas. A **Tabela 8** apresenta resumidamente os principais trabalhos de biotransformação descritos na literatura a respeito das naftoquinonas e as estruturas químicas dos respectivos produtos encontram-se na **Figura 36**.

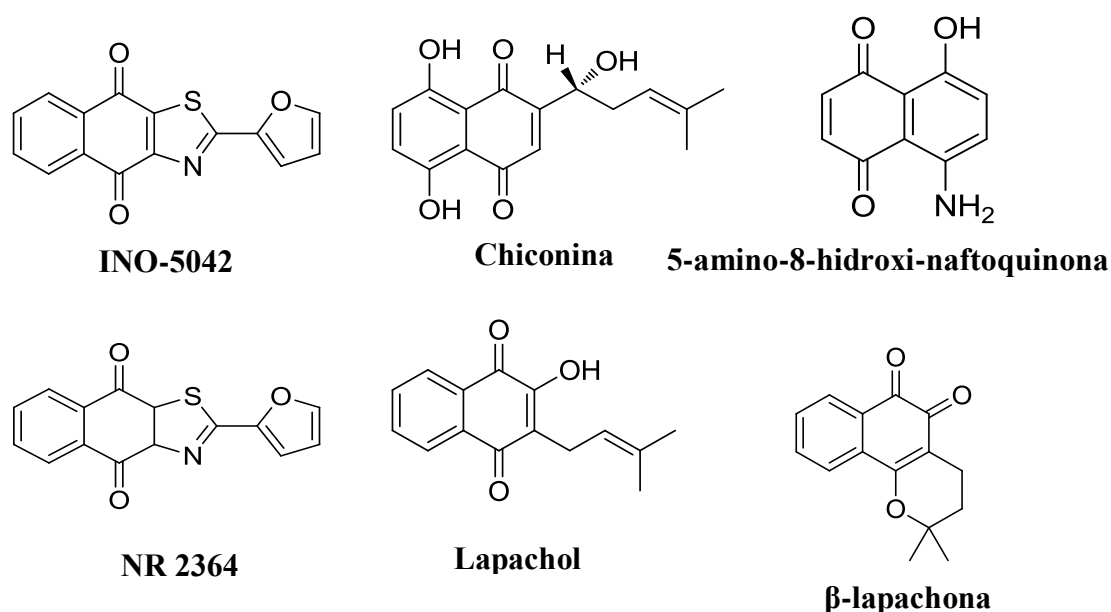


Figura 36. Estruturas químicas das naftoquinonas empregadas em reações de biotransformação descritas na literatura

Tabela 8. Reações de biotransformação descritas para as naftoquinonas

Naftoquinona	Micro-organismos	Reação promovida	Referência
Chiconina	Bactérias de fezes humana	Dimerizações	Meselhy et al., 1994
Chiconina	<i>B.fragilis</i>	Formação de duplas ligações e ciclização	Meselhy et al., 1994
NR 2364	<i>S.platensis</i>	Clivagem oxidativa	Le Texier et al., 2001
INO 5042	Linhagens de <i>Streptomyces</i>	Clivagem oxidativa	Fosse et al., 2004
5-amino-8-hidroxi-naftoquinona	<i>S.aureus</i>	Reduções de duplas ligações e carbonilas	Medina et al., 2006
Lapachol	<i>A.brasiliensis</i>	Oxidações de Hooker	Silva et al, 2015
β-lapachona	<i>C.elegans e C.echinulata</i>	Glicosilações	Paludo et al., 2015

Pode-se verificar que as naftoquinonas contendo substituintes na cadeia lateral (sobretudo os alquílicos) tendem a ser mais estáveis, e, portanto, mais apropriadas para a realização dos estudos de biotransformação nas condições requeridas para o desenvolvimento dos micro-organismos. Tal fato corrobora com os resultados obtidos no teste de comportamento das naftoquinonas nos meios de cultura descritos anteriormente.

Foi realizado um experimento para verificar a relação da não detecção dessas quinonas com o tempo de incubação nas culturas, tomando como base a 1,2-naftoquinona. Neste experimento pôde-se constatar que só foi possível detectar o substrato até 30 minutos de incubação, decorrido este período não mais se observa o pico referente a essa naftoquinona. Na **Figura 37** estão apresentados os cromatogramas dos extratos obtidos da extração da 1,2-naftoquinona em meio aquoso após diferentes tempos de incubação.

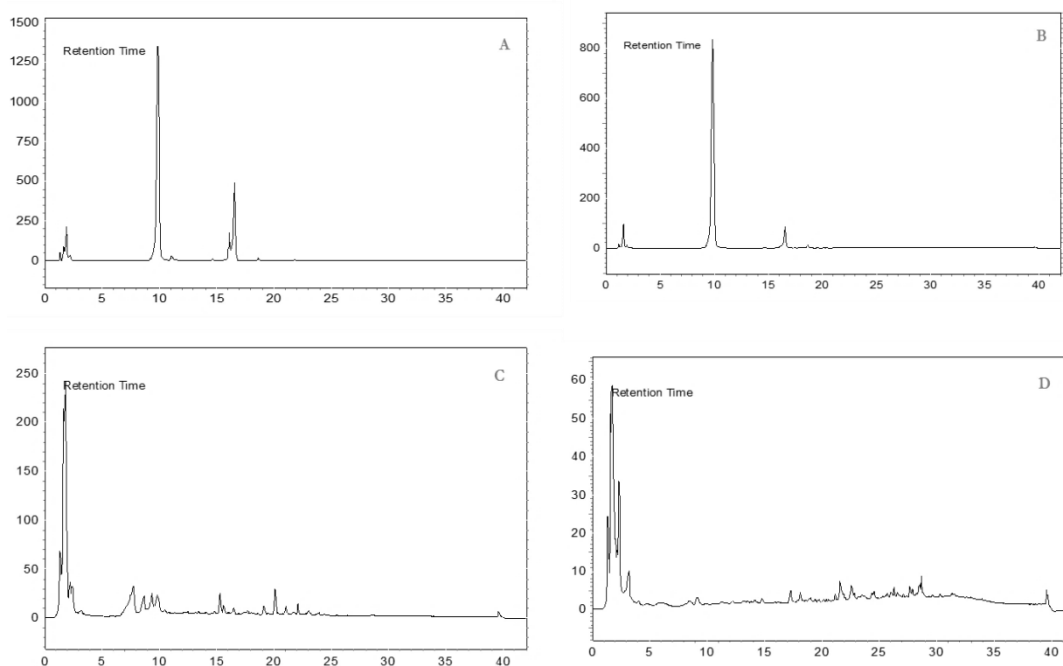


Figura 37. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD dos extratos de soluções do meio Czapek modificado contendo 1,2-naftoquinona após incubação por 0 minutos (**A**), 30 minutos (**B**), 60 minutos (**C**) e 24 horas (**D**). As condições cromatográficas foram: Cromatógrafo Shimadzu, Coluna Kromasil C18, fase móvel constituída por gradiente de acetonitrila e água (20-100% Fase orgânica em 35 minutos), vazão de $0,8\text{ml min}^{-1}$, volume de injeção de $30\mu\text{L}$, detecção em UV 220nm e análise a temperatura ambiente.

Com base nos resultados obtidos, foi possível estabelecer que os estudos de biotransformação com as naftoquinonas lausona, 5-hidroxi-naftoquinona, 1,2- e 1,4-naftoquinona ficam inviabilizados. Com base nos resultados apresentados na **Tabela 8**, oriundos das análises cromatográficas dos extratos obtidos, pôde-se concluir que as

naftoquinonas lausona metoxilada, menadiona, vitamina K e plumbagina foram extraídas e detectadas sem sofrer alteração nas condições empregadas, indicando que os substratos selecionados podem ser submetidos aos processos de biotransformação padronizados.

4.6. Estudos sobre a biotransformação das naftoquinonas

4.6.1. Biotransformações da menadiona

A análise dos perfis cromatográficos dos extratos das reações de biotransformação da menadiona mostraram que, dentre todos os micro-organismos avaliados nas condições padronizadas, apenas a bactéria *E.coli* (cultivo aeróbicos líquido e sólido) e os fungos *C.elegans* ATCC10028b , *A.brasiliensis* e *A.alliaceus* foram capazes de biotransformarem a estrutura desse substrato. A partir dos valores diários das áreas referentes ao pico da menadiona nos cromatogramas, foi possível construir curvas de consumo do substrato (resultados obtidos em duplicata), apresentadas na **Figura 38**.

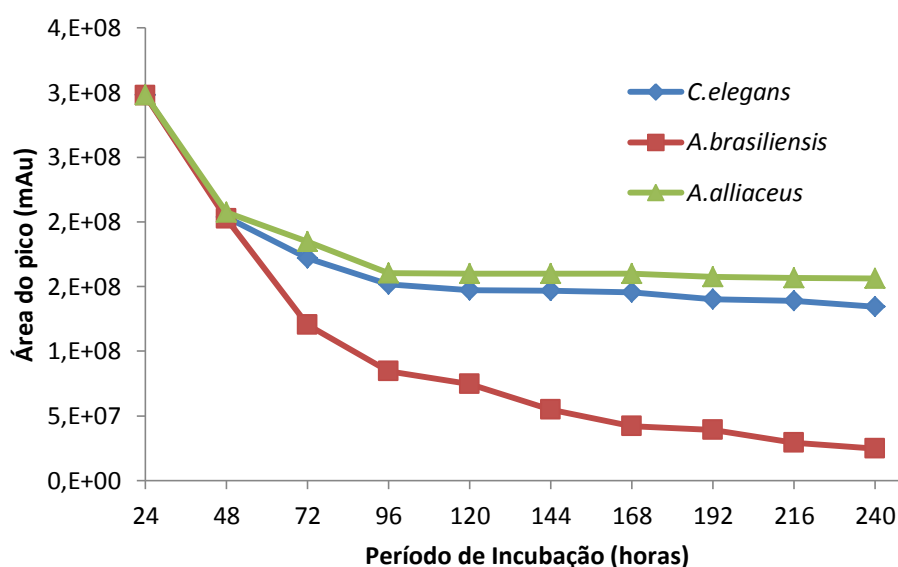


Figura 38. Curvas de consumo da menadiona por diferentes fungos filamentosos

Durante o monitoramento pode-se perceber que os fungos *C.elegans* ATCC 10028b e *A.alliaceus* não foram capazes de consumir toda a menadiona do meio de cultura. No entanto, ambas as reações apresentaram a formação de produtos de biotransformação. A análise diária dos perfis cromatográficos dessas reações permitiu selecionar o tempo em que estes produtos estavam presentes em maior concentração, sendo esse de 96 horas para a reação com *C.elegans* e 120 horas no caso do fungo *A.alliaceus*. O perfil cromatográfico dos extratos de biotransformação selecionados, bem como de seus respectivos controles, estão demonstrados na **Figura 39 e 40**.

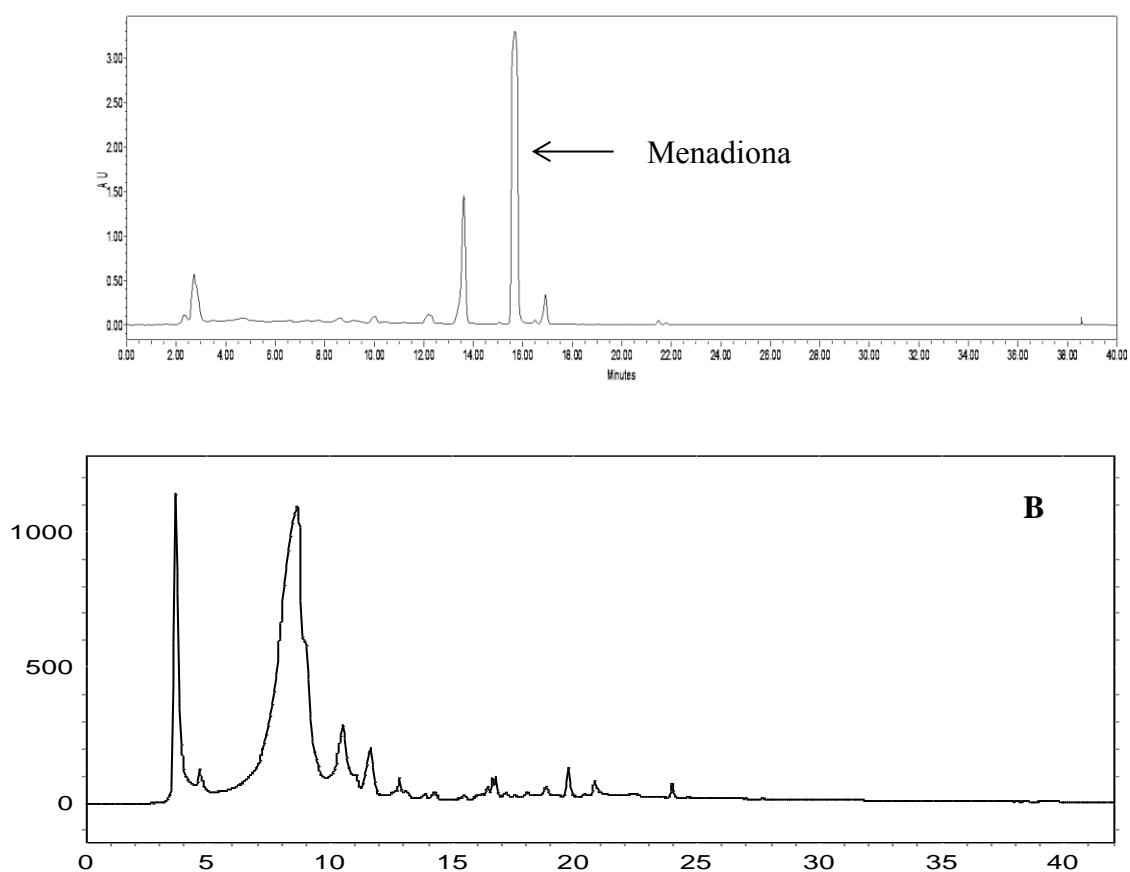


Figura 39. Cromatogramas oriundos da biotransformação da menadiona ($rT=15,71$ min, indicada pela seta) por *A.alliaceus* após 120 horas de reação: (A) Extrato de biotransformação e (B) Extrato do controle de *A.alliaceus* no mesmo período. Cromatógrafo Waters, Coluna Sinergi Polar RP, fase móvel constituída por gradiente de acetonitrila e água (20-100% Fase orgânica em 35 minutos), vazão de $0,8\text{ml min}^{-1}$, volume de injeção de $30\mu\text{L}$, detecção em UV 220nm e análise a temperatura ambiente

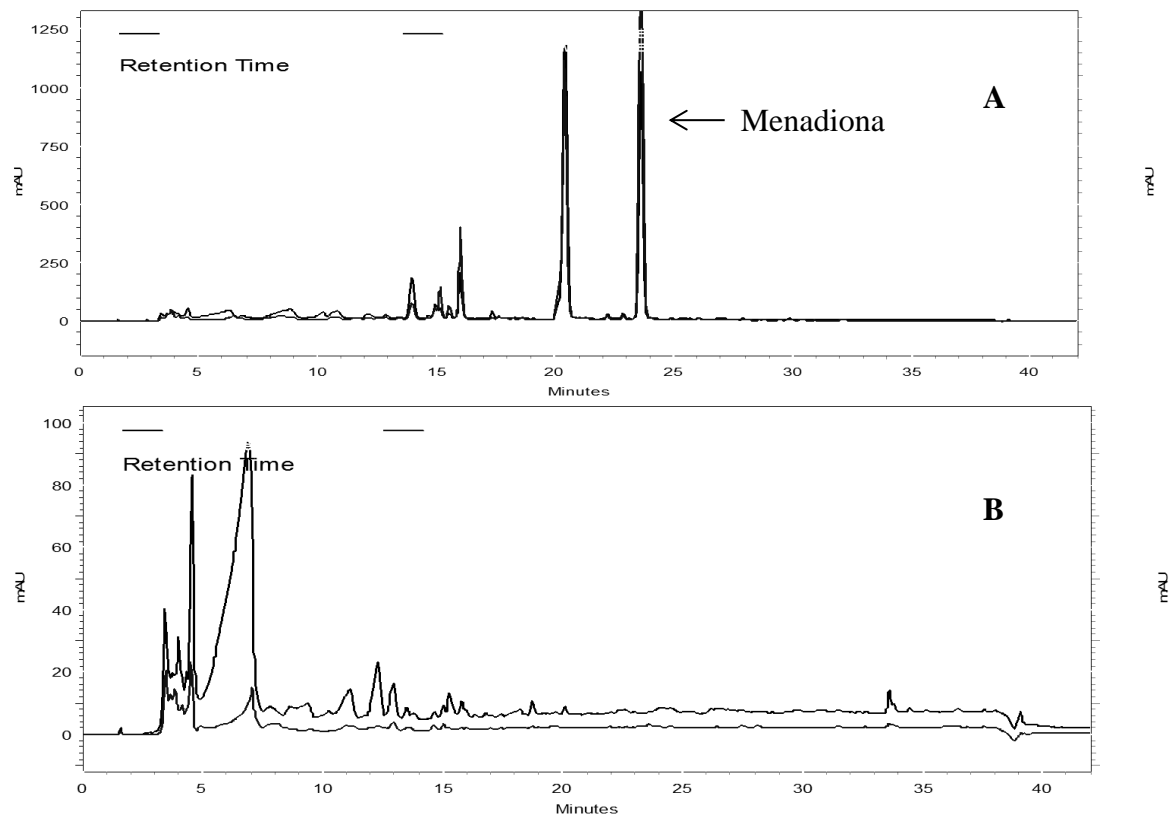


Figura 40. Cromatogramas oriundos da biotransformação da menadiona ($rT=23,84$ min, indicada pela seta) por *C.elegans* após 96 horas de reação: (A) Extrato de biotransformação e (B) Extrato do controle de *C. elegans* no mesmo período. As condições cromatográficas foram: Cromatógrafo Shimadzu, Coluna Kromasil C18, fase móvel constituída por gradiente de acetonitrila e água (20-100% Fase orgânica em 35 minutos), vazão de $0,8\text{ml min}^{-1}$, volume de injeção de $30\mu\text{L}$, detecção em UV 254nm e análise a temperatura ambiente

Com relação ao processo com o fungo *A.brasiliensis*, pode-se observar o consumo significativo do substrato ao término do período de incubação selecionado, segundo o gráfico apresentado na **Figura 38**. A análise dos perfis cromatográficos obtidos durante o monitoramento, estabeleceu-se que a partir de 120 horas de reação havia baixa concentração do material de partida e elevada concentração dos produtos formados. Na **Figura 41** pode-se observar o perfil cromatográfico da biotransformação no tempo selecionado e seus respectivos controles.

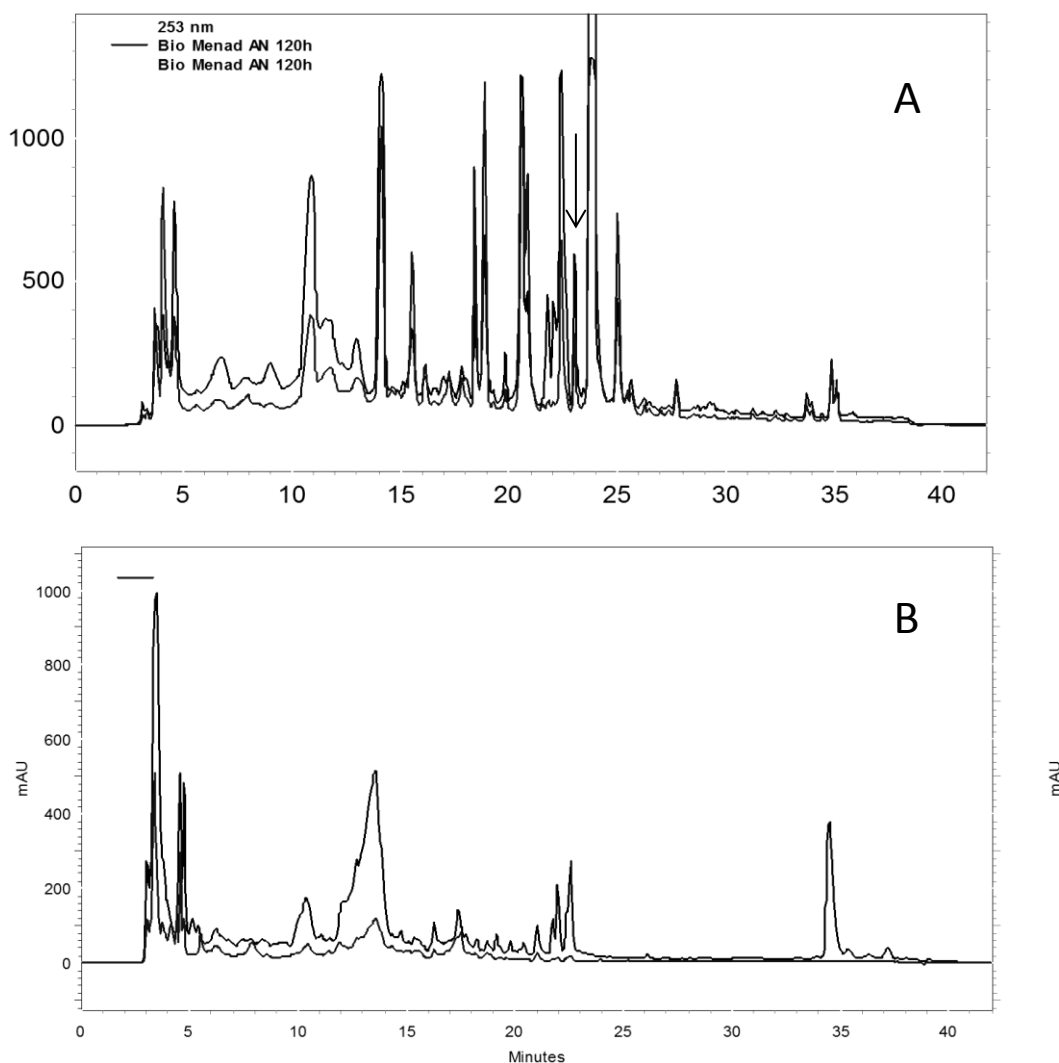


Figura 41. Cromatogramas oriundos da biotransformação da menadiona (seta indicando Tr) por *A.brasiliensis* após 120 horas de reação: (A) Extrato de biotransformação e (B) Extrato do controle de *A.brasiliensis* no mesmo período. As condições cromatográficas foram: Cromatógrafo Shimadzu, Coluna Kromasil C18, fase móvel constituída por gradiente de acetonitrila e água (20-100% Fase orgânica em 35 minutos), vazão de $0,8\text{ml min}^{-1}$, volume de injeção de $30\mu\text{L}$, detecção em UV 254nm e análise a temperatura ambiente

A análise das biomassas miceliais obtidas durante a etapa de triagem não apresentaram o pico referente à menadiona e nem picos referentes a possíveis produtos da mesma. Na **Figura 42** observam-se os cromatogramas dos extratos celulares dos fungos avaliados durante as reações de biotransformação.

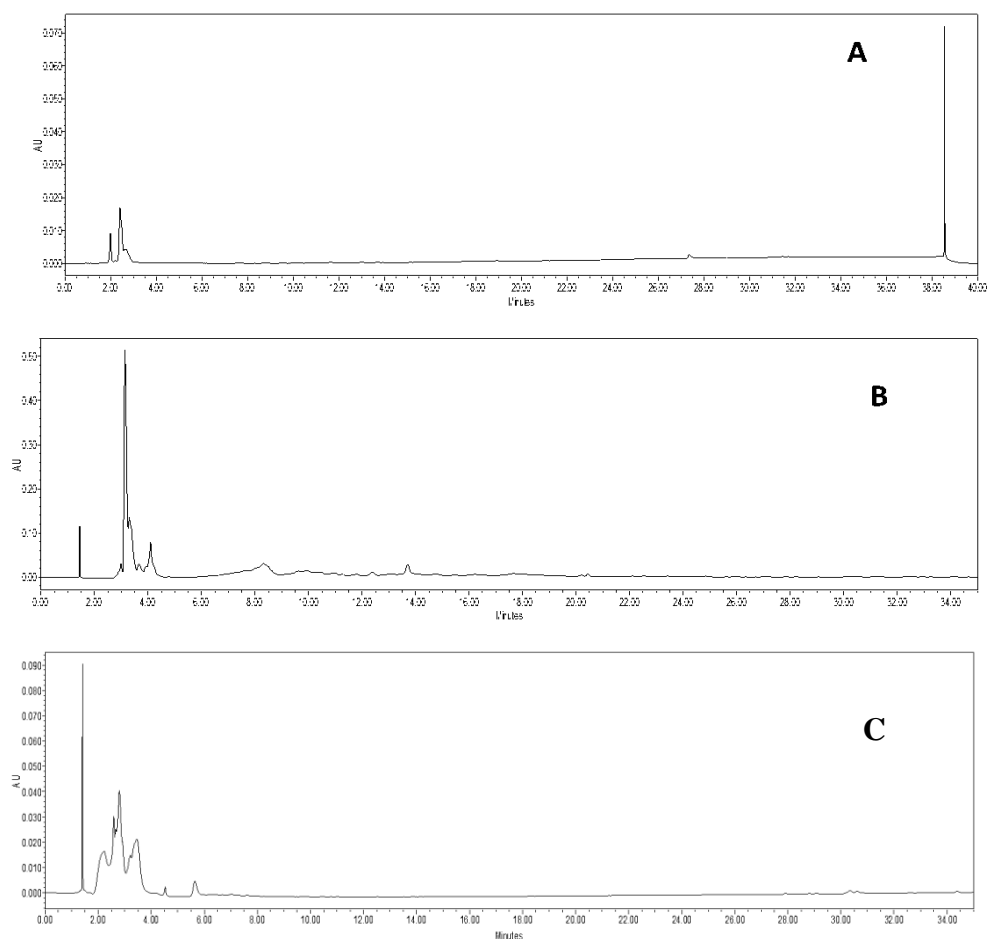


Figura 42. Cromatogramas oriundos dos extratos celulares de *C.elegans* ATCC 10028b (A), *A.alliaceus* (B) e *A.brasiliensis* (C) obtidos durante os experimentos de biotransformação da menadiona. As condições cromatográficas foram: Cromatógrafo Waters, Coluna Polar RP, fase móvel constituída por gradiente de acetonitrila e água (20-100% Fase orgânica em 35 minutos), vazão de $0,8\text{ml min}^{-1}$, volume de injeção de $30\mu\text{L}$, detecção em UV 254nm e análise a temperatura ambiente

Além dos fungos filamentosos, a bactéria *E.coli* também foi capaz de biotransformar a estrutura da menadiona. Essa reação foi monitorada e a curva de consumo do substrato em meio sólido e líquido está apresentada na **Figura 43** (experimento obtido em duplicata).

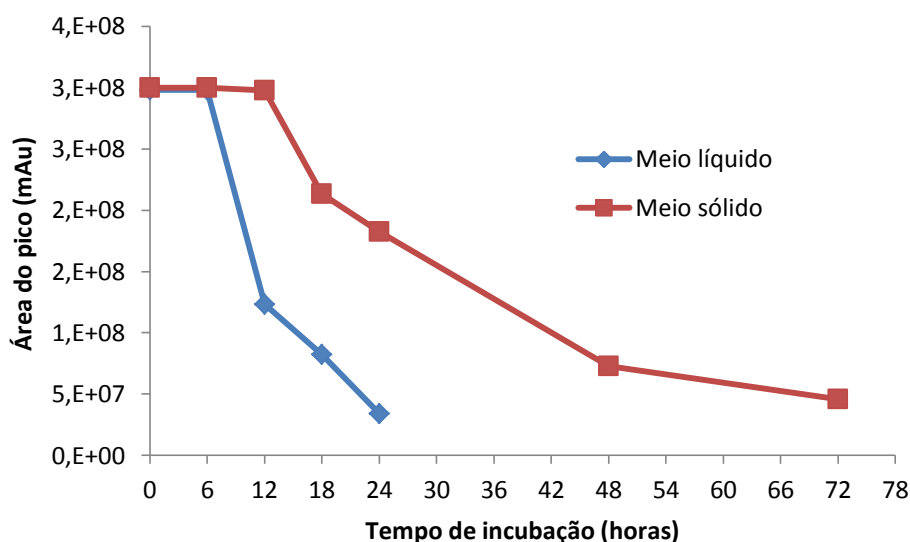


Figura 43. Curva de consumo da menadiona pela bactéria *E.coli* em cultivos líquido e sólido.

Sabe-se que o crescimento da bactéria *E.coli* em meio líquido é mais rápido do que em meio sólido e nesse caso, conseqüentemente, o consumo da menadiona foi quase total em apenas 24 horas de reação. Pela análise da curva de crescimento dessa bactéria em meio líquido pode-se afirmar também que, após 24 horas de incubação, a mesma entra em fase de declínio e morte celular. O processo de biotransformação em meio sólido é mais lento e só foi possível observar o consumo do substrato após 72 horas de incubação. Nos dois casos houve a formação de produtos de biotransformação da menadiona, e os picos relativos a esses produtos apresentaram diferentes T_r , o que aponta que o metabolismo do substrato é diferente de acordo com a condição experimental utilizada. Em ambos os casos, o tempo de biotransformação foi definido pelo período em que houve consumo considerável do substrato e formação das concentrações máximas dos produtos de biotransformação, conforme cromatogramas da **Figura 44** e **Figura 45**.

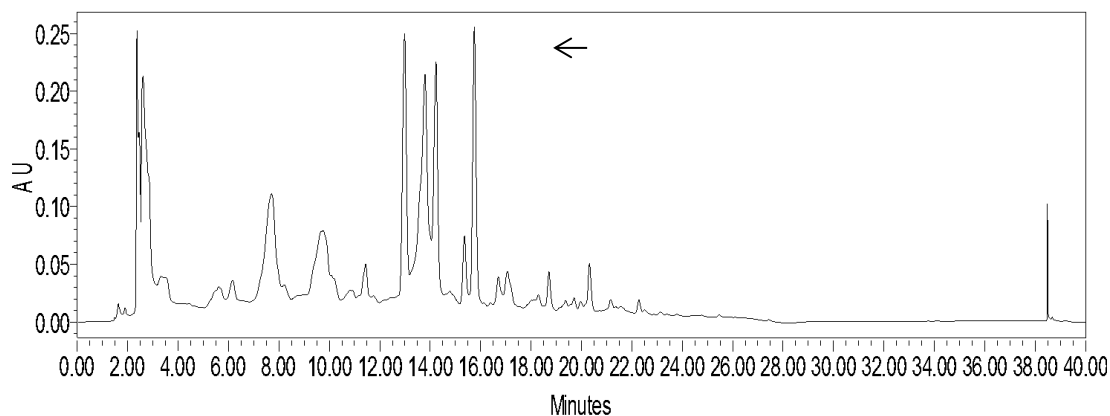


Figura 44. Cromatograma do extrato de biotransformação da menadiona (pico destacado com a seta) por *E.coli* cultivada em meio líquido após 12 horas de incubação. As condições cromatográficas foram: Cromatógrafo Waters, Coluna Polar RP, fase móvel constituída por gradiente de acetonitrila e água (20-100% Fase orgânica em 35 minutos), vazão de $0,8\text{ml min}^{-1}$, volume de injeção de $30\mu\text{L}$, detecção em UV 254nm e análise a temperatura ambiente

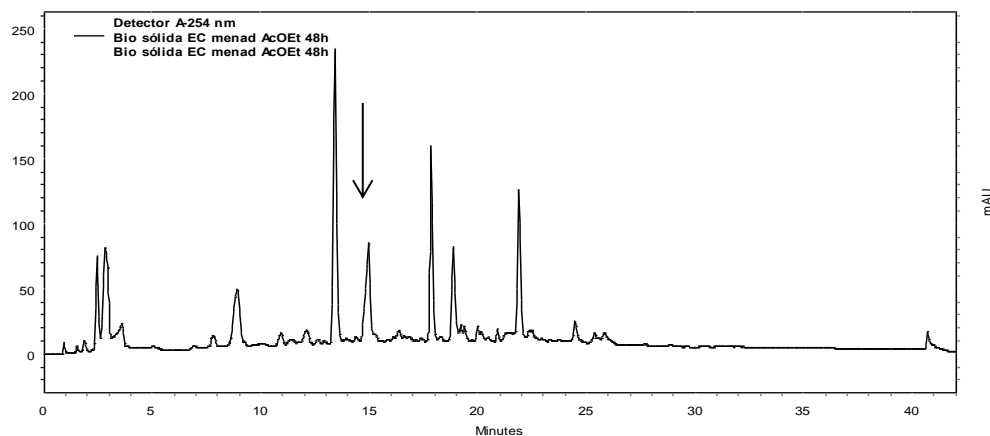


Figura 45. Cromatograma do extrato de biotransformação da menadiona (pico destacado com a seta) por *E.coli* cultivada em meio sólido após 48 horas de incubação. As condições cromatográficas foram: Cromatógrafo Shimadzu, Coluna Polar RP, fase móvel constituída por gradiente de acetonitrila e água (20-100% Fase orgânica em 35 minutos), vazão de $0,8\text{ml min}^{-1}$, volume de injeção de $30\mu\text{L}$, detecção em UV 254nm e análise a temperatura ambiente

A análise dos extratos celulares de *E.coli* durante os processos selecionados também não apresentou o pico referente à menadiona ou possíveis derivados, conforme pode ser observado na **Figura 46**.

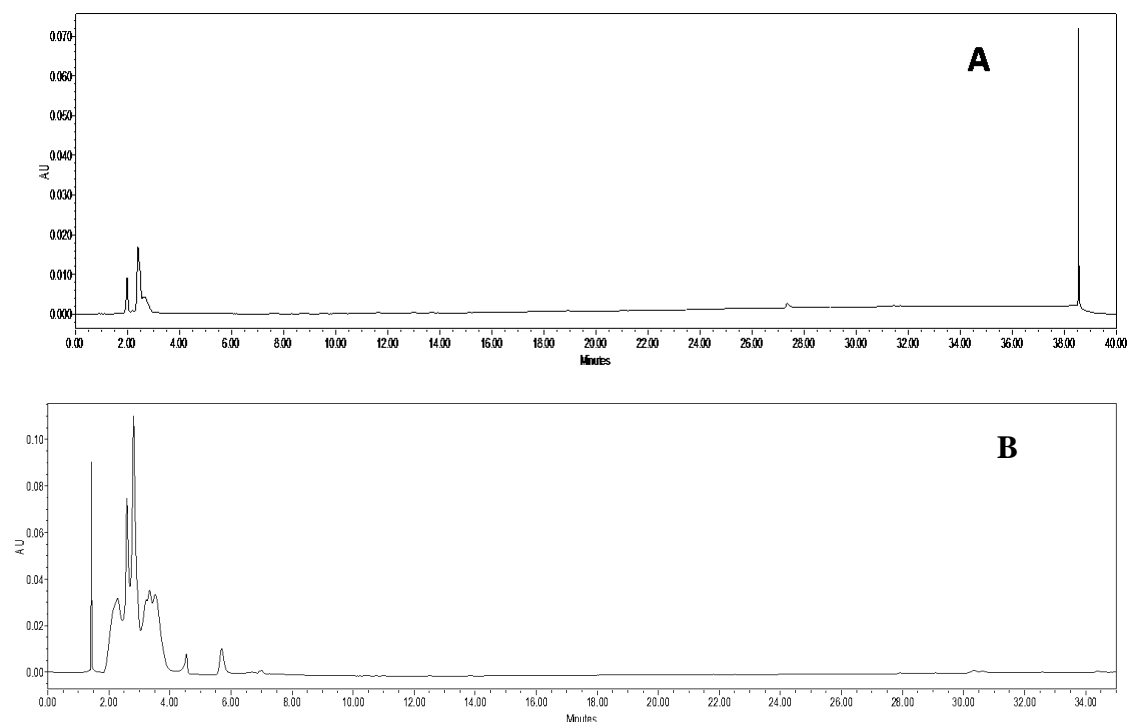


Figura 46. Cromatogramas oriundos dos extratos celulares de *E.coli* em cultivo líquido (A) e sólido (B) obtidos durante os experimentos de biotransformação da menadiona. As condições cromatográficas foram: Cromatógrafo Waters, Coluna Polar RP, fase móvel constituída por gradiente de acetonitrila e água (20-100% Fase orgânica em 35 minutos), vazão de $0,8\text{ml min}^{-1}$, volume de injeção de $30\mu\text{L}$, detecção em UV 254nm e análise a temperatura ambiente

A partir da padronização das condições reacionais na etapa de triagem descrita, as reações foram repetidas em escala ampliada para permitir o isolamento dos produtos formados. Optou-se por fazer a ampliação da escala mantendo os mesmos parâmetros padronizados na escala analítica e aumentando o número de frascos de cultura para evitar problemas da reprodutibilidade do perfil reacional.

4.6.2 Biotransformações da lausona metoxilada

A análise dos perfis cromatográficos dos extratos das reações de biotransformação da lausona metoxilada mostrou que os fungos *C.elegans* ATCC 9245, *C.elegans* ATCC 10028b, *M.rouxii* e *A.alliaceus* foram capazes de biotransformar a estrutura desse substrato. Nos demais processos não houve consumo e nem formação de

produtos desta naftoquinona. A partir dos valores diários das áreas referentes ao pico desta naftoquinona nos processos, foi possível construir uma curva de consumo do substrato para os diferentes micro-organismos, apresentada na **Figura 47**.

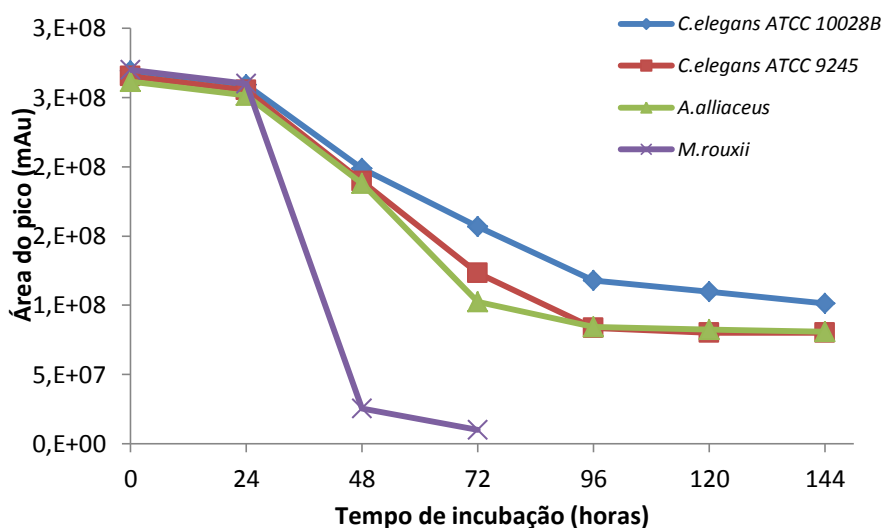


Figura 47. Curvas de consumo da lausona metoxilada por diferentes fungos filamentosos

A análise diária dos perfis cromatográficos das reações da lausona metoxilada mostrou que todos os micro-organismos em questão produziram basicamente os mesmos derivados de biotransformação, variando apenas a concentração dos mesmos em cada processo. A curva de consumo do substrato mostrou que o fungo *M.rouxii* foi capaz de biotransformar totalmente o substrato da reação em 96 horas, enquanto para os outros processos, houve diminuição significativa, mas não total da área do composto durante o período monitorado. Da mesma forma descrita para os experimentos anteriores, não foi encontrado o pico da lausona metoxilada nos extratos da massa micelial dos fungos em questão.

Apesar da eficiência de transformação do fungo *M.rouxii*, o processo de biotransformação desta naftoquinona pelo fungo *C.elegans ATCC 9245* apresentou a

maior concentração dos produtos formados, após 96 horas de reação. Os perfis cromatográficos dos extratos selecionados estão demonstrados na **Figura 48**.

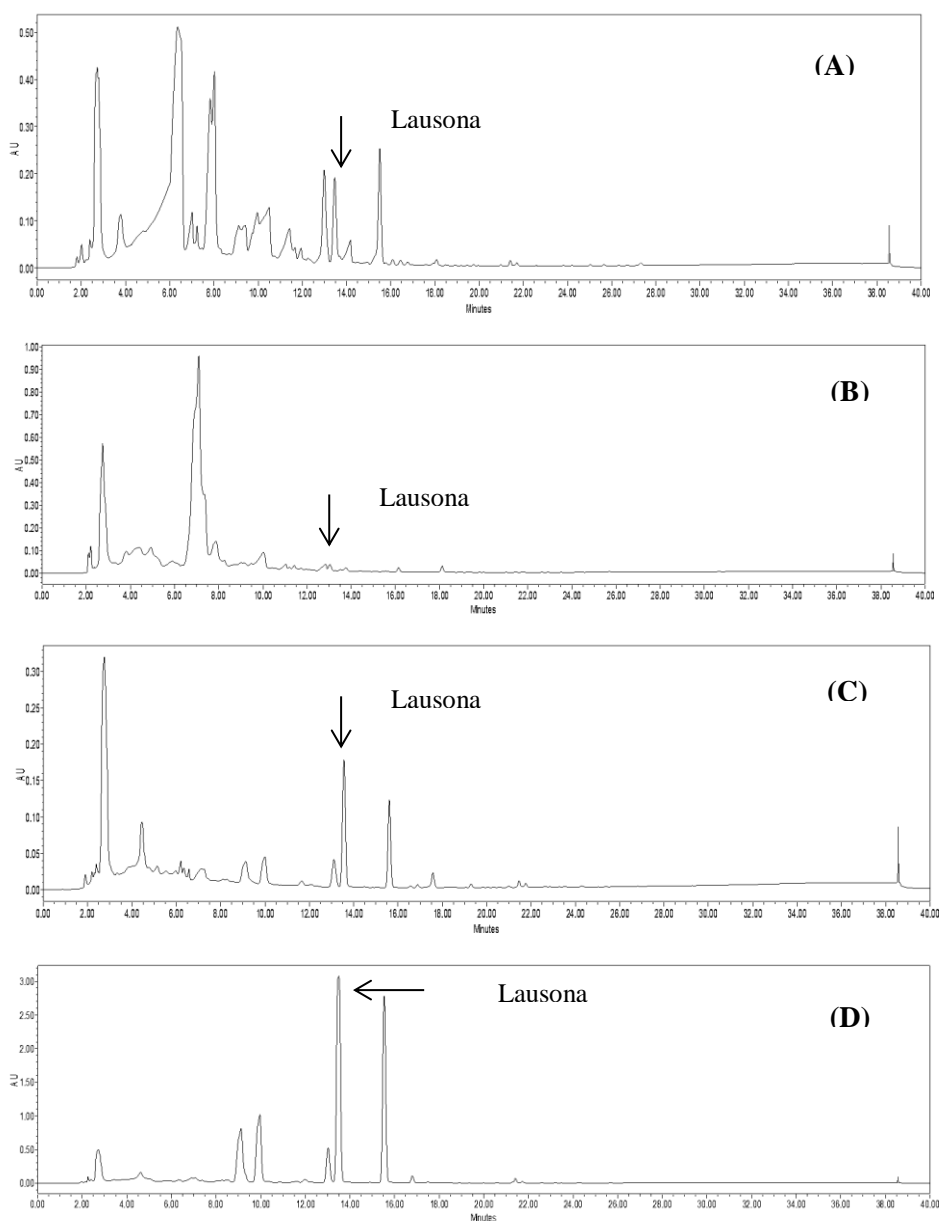


Figura 48 . Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD dos extratos de biotransformação da lausona metoxilada pelos fungos: **(A)** *A.alliaceus* (96 horas), **(B)** *M.rouxii* (72 horas), **(C)** *C.elegans* ATCC 10028b (96 horas) e **(D)** *C.elegans* ATCC 9245 (96 horas) . As condições cromatográficas foram: Cromatógrafo Waters , Coluna Sinergi Polar RP, fase móvel constituída por gradiente de acetonitrila e água (20-100% Fase orgânica em 35 minutos), vazão de $0,8\text{ml min}^{-1}$, volume de injeção de $30\mu\text{L}$, detecção em UV 220nm e análise a temperatura ambiente.

4.6.3. Biotransformações da plumbagina

A análise dos cromatogramas obtidos por CLAE-DAD dos extratos das culturas desenvolvidas com a plumbagina mostrou que os fungos *C.elegans* ATCC 10028b, *C.elegans* ATCC 9245 e *A.niger*, foram capazes de biotransformar a estrutura desse substrato, gerando produtos ausentes nos respectivos controles experimentais. A curva de consumo comparativa da plumbagina pelos diferentes fungos filamentosos está apresentada na **Figura 49**.

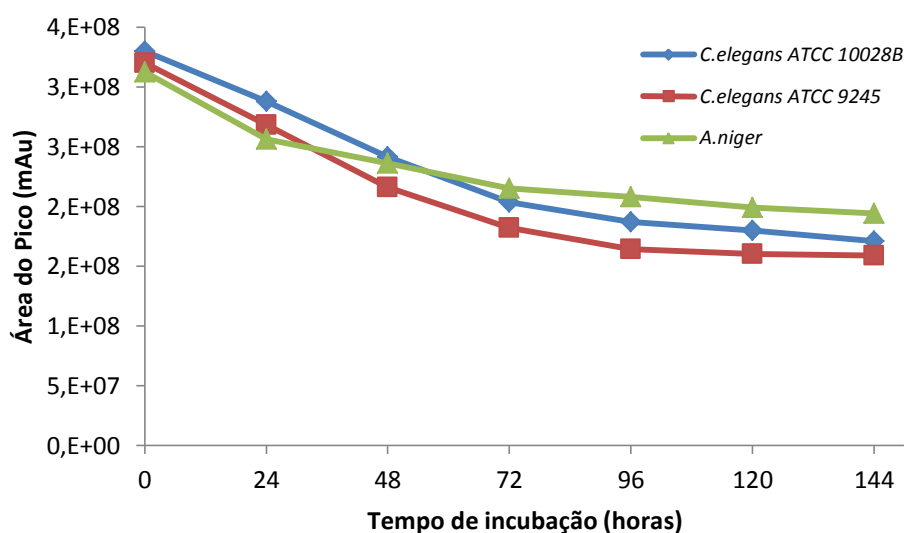


Figura 49. Curva de consumo da plumbagina por diferentes fungos filamentosos

A partir dos resultados obtidos, pode-se verificar que o substrato em questão não foi totalmente consumido durante o período de incubação monitorado e a variação do consumo do mesmo foi pequena entre os diferentes micro-organismos. No entanto, o perfil cromatográfico dos extratos mostrou a produção do derivado com $t_r=15,3$ minutos, produzidos por todos os micro-organismos. O fungo *C.elegans* ATCC 9245 foi também capaz de produzir, além desta substância, alguns metabólitos minoritários, que aparecem no cromatograma eluindo entre 7-13 minutos (**Figura 50**). Este processo

foi selecionado para ser conduzido em escala ampliada, visando à obtenção dos produtos formados, sobretudo do produto majoritário.

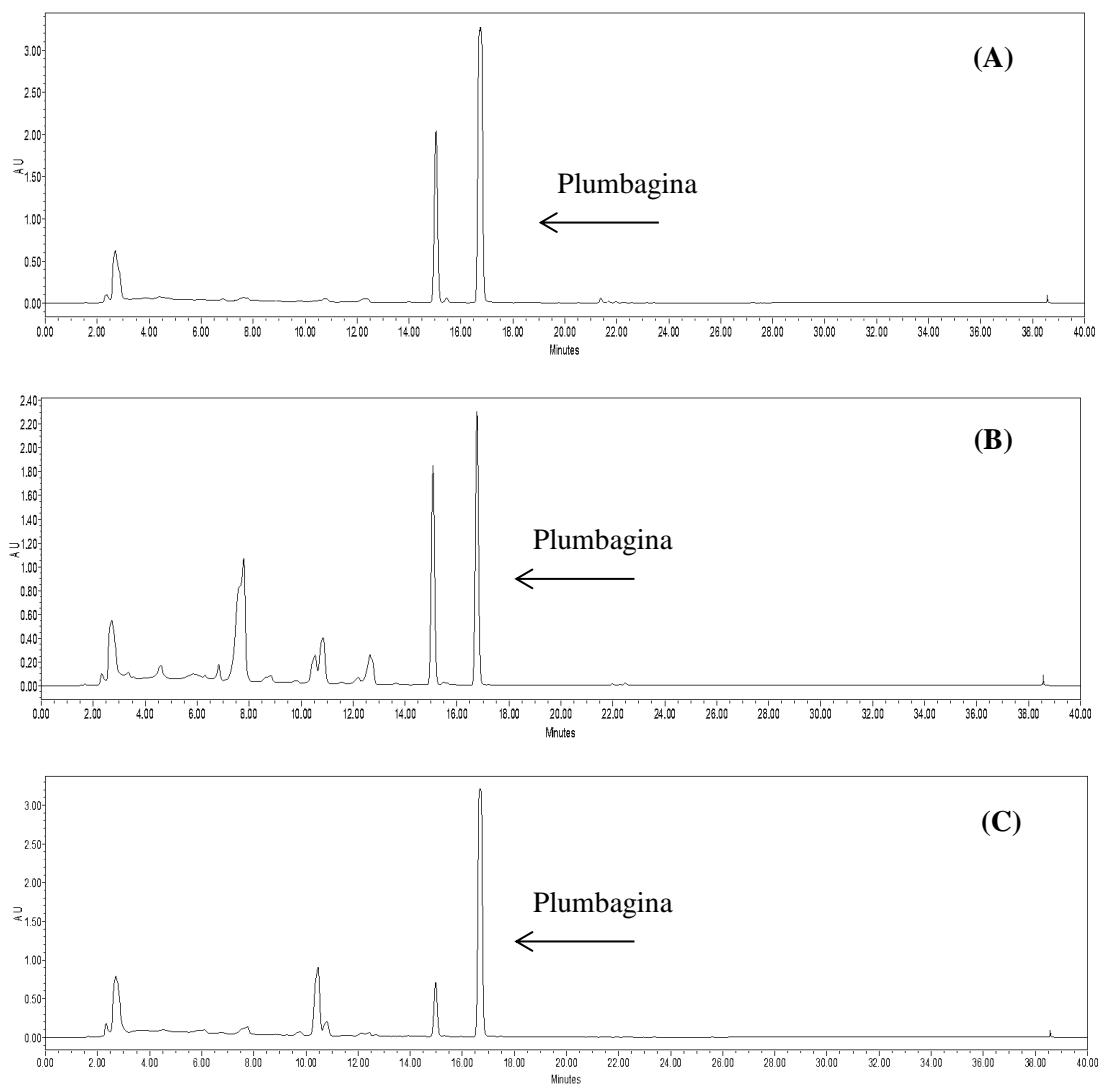


Figura 50. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD dos extratos de biotransformação da plumbagina pelos fungos *C.elegans* atcc 10028b (A), *C.elegans* ATCC 9245 (B) e *A. niger* (C). As condições cromatográficas foram: Cromatógrafo Waters, Coluna Sinergi Polar RP, fase móvel constituída por gradiente de acetonitrila e água (20-100% Fase orgânica em 35 minutos), vazão de $0,8\text{ml min}^{-1}$, volume de injeção de $30\mu\text{L}$, detecção em UV 220nm e análise a temperatura ambiente.

Apesar de três micro-organismos serem capazes de biotransformar a plumbagina, a biotransformação desta naftoquinona pelo fungo *C.elegans* ATCC 9245 apresentou a maior concentração dos produtos formados em 96 horas de reação, e sendo

assim, esse foi o tempo de biotransformação estabelecido para ser realizado em escala ampliada visando o isolamento dos derivados dessa naftoquinona. Da mesma forma descrita para os experimentos anteriores, não foi encontrado o pico da plumbagina em nenhum dos extratos de massa micelial dos fungos em questão.

4.6.4. Biotransformações da Vitamina K1

A vitamina K (**Figura 51**) tem sido muito estudada, tendo em vista sua importância biológica e, sobretudo bioquímica. Os estudos relacionados ao metabolismo desta naftoquinona tem gerado grande interesse por diferentes grupos de pesquisa, porém ainda há muito o que ser acrescentado a respeito das vias metabólicas dessa vitamina bem como para a caracterização dos metabólitos formados. Os experimentos de biotransformação realizados com essa naftoquinona mostraram que, nenhum dos micro-organismos avaliados foram capazes de biotransformar a estrutura desta naftoquinona nas condições experimentais investigadas.

As quinonas são, em geral, moléculas bastante reativas e apesar dos estudos de biotransformação das mesmas nesse trabalho empregarem diferentes tipos de sistemas enzimáticos (bactérias, fungos e leveduras) não foi possível observar a formação de derivados da Vitamina K1. A partir dos resultados obtidos, sugere-se que a cadeia carbônica inserida na posição 3 do núcleo quinonóide dessa molécula provavelmente lhe confere grande estabilidade dificultando portanto que haja qualquer alteração em seu esqueleto químico. Os demais trabalhos da literatura que reportam produtos de biotransformação dessa classe de compostos utilizam como substratos moléculas com cadeia lateral menor e menos complexa.

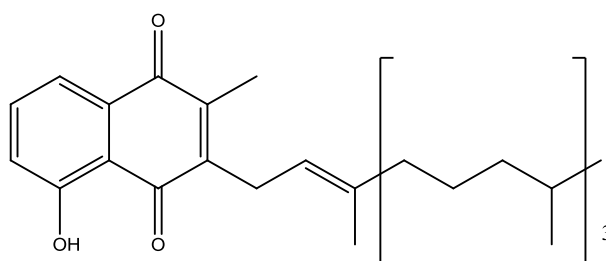


Figura 51. Estrutura química da Vitamina K1

4.7. Biotransformações em fase exponencial de crescimento dos micro-organismos

Pode-se notar que as reações de biotransformação empregando micro-organismos são realizadas preferivelmente na fase estacionária de desenvolvimento dos mesmos. Essa estratégia é adotada devido à menor especificidade das enzimas e os substratos naturais dos organismos nesta fase de desenvolvimento, o que aumenta a possibilidade dessas enzimas promoverem reações em substâncias exógenas, o que é ideal nas reações de biotransformação. Se estes substratos estivessem disponíveis durante o período de crescimento desses micro-organismos, a competição entre substratos exógenos e naturais poderia prejudicar o desenvolvimento dos mesmos, devido à ineficiência da conversão de metabólitos essenciais a sua sobrevivência. Tal fato corrobora com a preconização do CLSI para a realização dos ensaios antimicrobianos durante a fase exponencial de desenvolvimento dos micro-organismos (18-24 horas) onde estes são mais sensíveis à ação das substâncias exógenas (CLSI, 2007). Contudo, não foram encontrados trabalhos na literatura que comparem a diferença entre a capacidade de biotransformação de micro-organismos em diferentes fases de desenvolvimento.

Assim, para avaliar o efeito da adição dos substratos nas fases exponencial e estacionária sobre as reações de biotransformação, foram repetidos os experimentos de biotransformação da naftoquinona menadiona pelo fungo *C. elegans* e pela bactéria *E. coli*, onde a solução do substrato foi adicionada na fase exponencial das culturas e os resultados foram comparados com os obtidos quando o mesmo substrato havia sido adicionado na fase estacionária das culturas. Não foi observado crescimento de colônias de *E. coli* quando as naftoquinonas foram adicionadas nas culturas durante o período exponencial de crescimento (ausência de colônias em placas de meio sólido inoculadas periodicamente com alíquotas das culturas). Este fato pode estar relacionado à maior susceptibilidade das células bacterianas a substâncias exógenas quando estas estão na fase exponencial de crescimento. No perfil químico do extrato obtido do processo de biotransformação da menadiona adicionada na fase exponencial (**Figura 52**), observa-se apenas o pico referente ao substrato, sem a formação de produtos ou ainda metabólitos produzidos por *E. coli*, resultado bem diferente do que o observado para o processo realizado com a adição do substrato na fase estacionária, no qual produtos de biotransformação foram detectados após 24 horas de incubação (resultados descritos anteriormente).

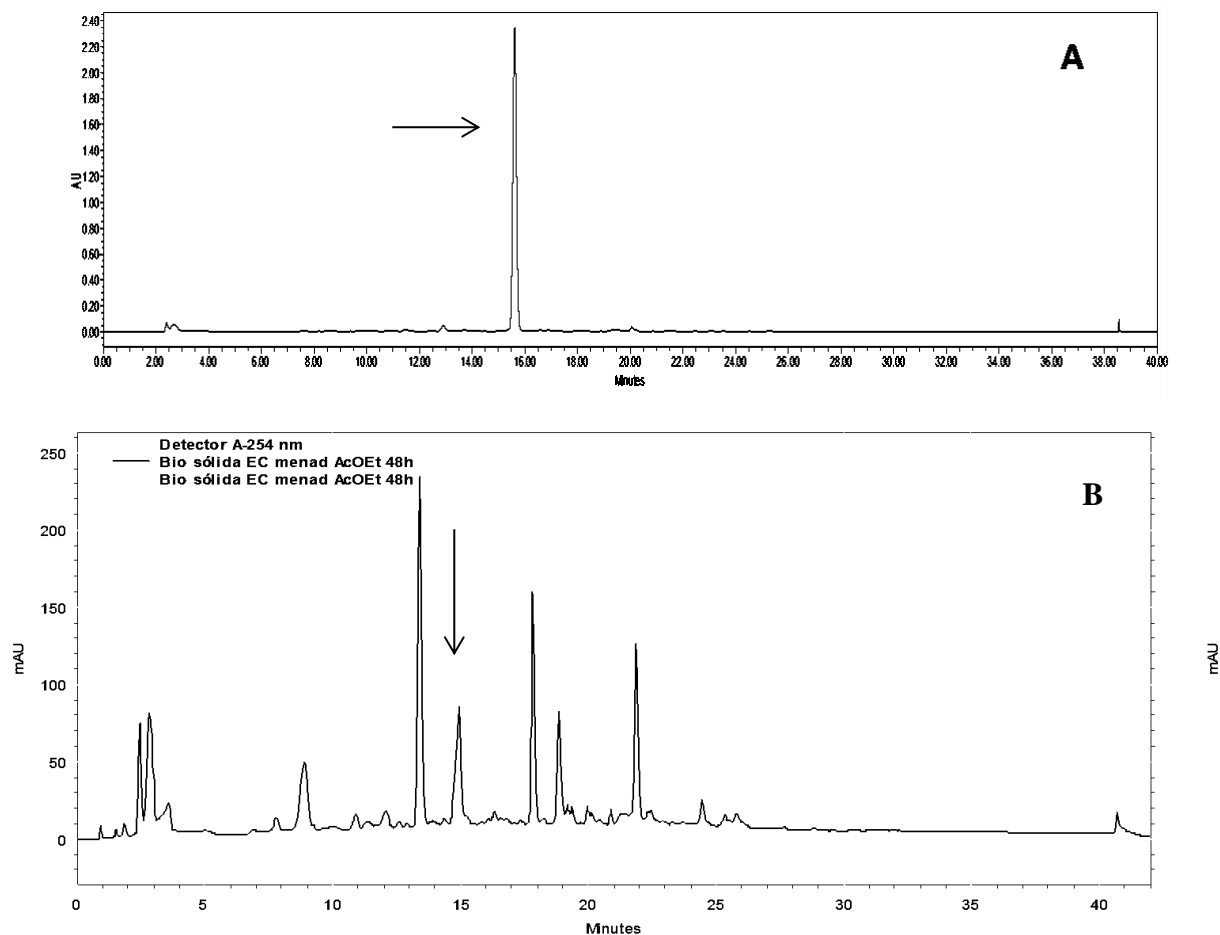


Figura 52. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD dos extratos dos processos de biotransformação da menadiona realizados com a adição do substrato na fase exponencial (A) e estacionária (B) da bactéria *E. coli*. As condições cromatográficas foram: Cromatógrafo Waters, Coluna Kromasil C18, fase móvel constituída por gradiente de acetonitrila e água (20-100% Fase orgânica em 35 minutos), vazão de $0,8\text{ml min}^{-1}$, volume de injeção de $30\mu\text{L}$, detecção em UV 220nm e análise a temperatura ambiente.

Foi avaliada também a influência da presença das naftoquinonas no crescimento do fungo *C. elegans* em meio Czapek modificado após adição das naftoquinonas na fase exponencial de crescimento. Nesse caso, pode-se perceber que a adição das naftoquinonas na fase exponencial foi prejudicial ao desenvolvimento do fungo. Comparando estes resultados com os obtidos com a bactéria *E.coli*, a qual não conseguiu se desenvolver após adição das naftoquinonas na fase exponencial de crescimento, o fungo *C.elegans* apresentou menor sensibilidade na presença das substâncias utilizadas. Este fato pode estar relacionado à maior sensibilidade das células

bacterianas, mas também ao fato dos experimentos com fungos contarem com uma etapa pré-fermentativa de cultivo. Nesta etapa, os fungos são pré-cultivados em meios de cultura ricos em nutrientes (neste caso foi utilizado o meio descrito por Jackson e colaboradores, 1993) que promovem a produção de maior biomassa devido ao fornecimento de nutrientes, cofatores e coenzimas necessários, senão essenciais ao seu desenvolvimento (Lehninger, 1985).

Não foram detectados produtos de biotransformação da menadiona quando a mesma foi adicionada na fase exponencial de crescimento do fungo *C. elegans*. Apenas o pico referente ao material de partida foi detectado no cromatograma (**Figura 53**). Nos experimentos anteriores, onde a menadiona utilizada durante a fase estacionária, foi possível detectar a formação de produtos de biotransformação.

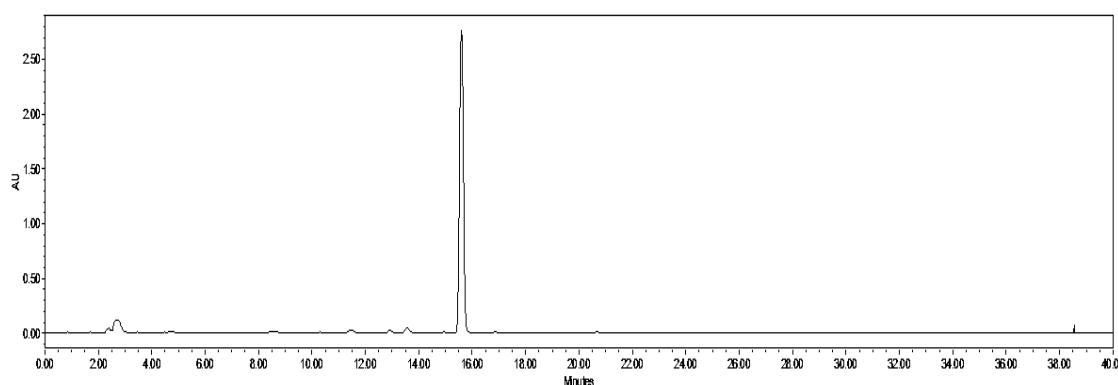


Figura 53: Cromatograma obtido por CLAE-DAD do extrato obtido do processo de biotransformação da menadiona por *C. elegans* com a adição da mesma na fase exponencial de crescimento. As condições cromatográficas foram: Cromatógrafo Waters, Coluna Kromasil C18, fase móvel constituída por gradiente de acetonitrila e água (20-100% Fase orgânica em 35 minutos), vazão de $0,8\text{ml min}^{-1}$, volume de injeção de $30\mu\text{L}$, detecção em UV 220nm e análise a temperatura ambiente.

Embora o fungo *C. elegans* ATCC 10028b tenha se desenvolvido após a adição da menadiona na fase exponencial de crescimento, a redução da biomassa do fungo pode ter sido acompanhada por supressão das atividades enzimáticas já que não foram

detectados produtos de biotransformação da menadiona. Outro fator que deve ser considerado é que a adição das naftoquinonas na fase exponencial de crescimento, na qual as células estão mais susceptíveis a ação de substâncias exógenas, pode ter ocasionado à geração de espécies reativas de oxigênio, as quais são responsáveis por grande parte dos efeitos biológicos e toxicológicos das naftoquinonas, fato que pode ter também inibido a transformação das mesmas pelos micro-organismos (Pinto & Castro, 2009). Sendo assim, a melhor estratégia a ser utilizada neste trabalho é a da adição dos substratos na fase estacionária dos micro-organismos, conforme padronizado anteriormente.

4.8. Obtenção dos extratos de biotransformação em escala ampliada

A partir dos experimentos de biotransformação realizados em escala analítica, foi possível selecionar quais micro-organismos foram capazes de biotransformar as naftoquinonas selecionadas e o tempo mais adequado para a ocorrência dessa reação. Os processos mais promissores foram selecionados para ser realizados em escala ampliada a fim de permitir o isolamento dos metabólitos produzidos.

Optou-se por fazer as ampliações de escala através do aumento do número de frascos de cultura, não alterando as condições de cultivo ou o volume das respectivas culturas, para evitar problemas com a reprodutibilidade dos perfis químicos dos extratos, comparados aos perfis obtidos em escala analítica.

4.8.1. Biotransformação da menadiona por *C.elegans* ATCC 10028b

Conforme descrito anteriormente, o fungo *C.elegans* ATCC 10028b foi capaz de consumir a menadiona produzindo 2 derivados principais: um com Tr:20,51 (majoritário) e outro com Tr:16,23 (minoritário). O extrato obtido com esse processo em escala ampliada apresentou a massa de 567 mg e foi codificado como **EBMCE** (Extrato de Biotransformação da Menadiona por *C.elegans*). A análise desse extrato por CLAE-DAD mostrou um perfil diferente do que foi obtido durante a triagem. Neste caso, houve menos consumo do material de partida durante a reação, mas, apesar disso, pode-se observar picos referentes a produtos de biotransformação no novo extrato e com isso, o mesmo foi submetido a fracionamento por CLAE em modalidade preparativa com detecção UV. A **Figura 54**, mostra o cromatograma do extrato **EBMCE**, os picos dos produtos estão indicados com pela seta.

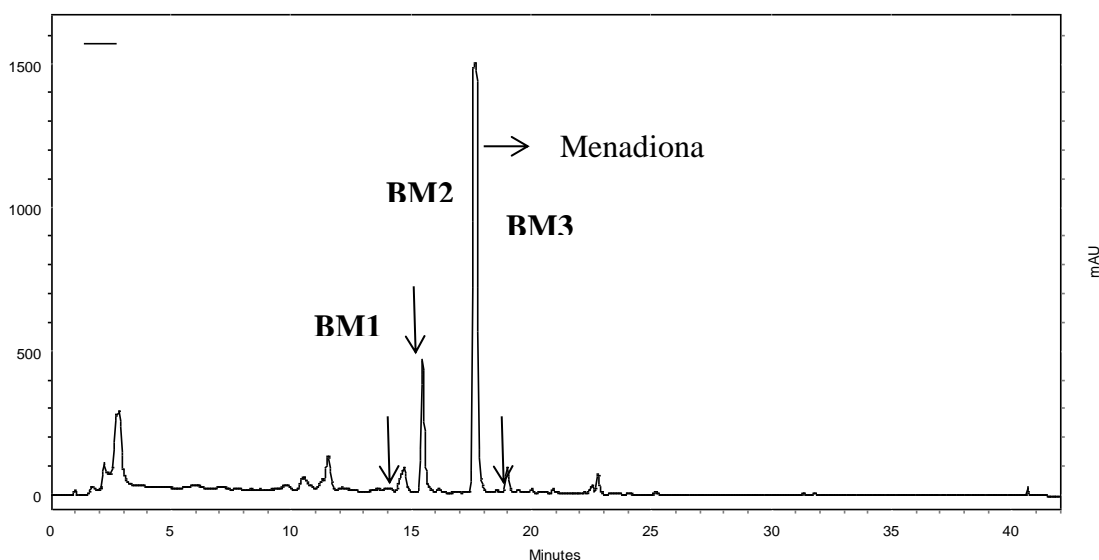


Figura 54: Cromatograma obtido por CLAE-DAD do extrato **EBMCE**. Cromatógrafo Shimadzu, Coluna Sinergi Polar RP, fase móvel constituída por gradiente de acetonitrila e água (20-100% Fase orgânica em 35 minutos), vazão de 0,8ml min⁻¹, volume de injeção de 30µL, detecção em UV 254nm e análise a temperatura ambiente.

Durante o fracionamento deste extrato os picos desses metabólitos foram coletados e a análise do perfil das frações coletadas, permitiu obter três amostras com pureza cromatográfica suficiente para caracterização estrutural. Essas amostras foram codificadas como **BM1** (4,1 mg- 1,3% de rendimento), **BM2** (8,2 mg- 2,7% de rendimento) e **BM3** (3,9 mg- 1,3% de rendimento) e enviadas para caracterização estrutural por RMN de ^1H e ^{13}C . A caracterização estrutural dessas substâncias será discutida no **Item 4.9**. Os cromatogramas dos picos dos metabólitos em questão estão apresentados na **Figura 55**.

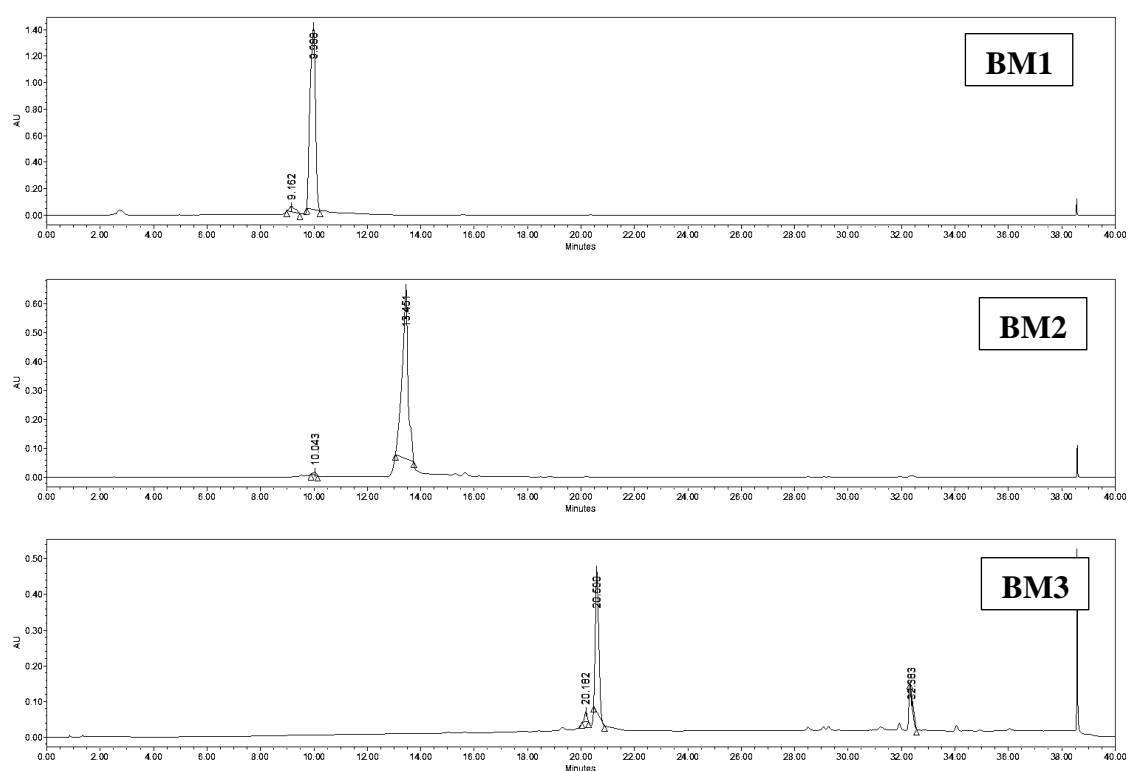


Figura 55: Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD dos compostos **BM1**, **BM2** e **BM3**, isolados do extrato **EBMCE**. Cromatógrafo Waters, Coluna Sinergi Polar RP, fase móvel constituída por gradiente de acetonitrila e água (20-100% Fase orgânica em 35 minutos), vazão de 0,8ml min⁻¹, volume de injeção de 30μL, detecção em UV 254nm e análise a temperatura ambiente.

4.8.2 Biotransformação da menadiona por *E.coli*

Durante os experimentos de triagem, a bactéria *E.coli* cultivada em meio sólido, foi capaz de consumir significativamente a menadiona produzindo quatro derivados principais com os Tr:13,49 (majoritário), Tr: 17,90, Tr: 19,02 e outro com Tr:22,23. O extrato obtido com esse processo em escala ampliada apresentou a massa de 423 mg e foi codificado como **EBMEc I** (Extrato de Biotransformação da Menadiona por *E.coli* em meio sólido). Assim como observado no extrato anterior, a análise desse extrato por CLAE-DAD mostrou um perfil diferente do que foi obtido durante a triagem. Mesmo assim, pode-se observar consumo total do material de partida e a formação de quatro picos principais, sendo que dois deles também foram identificados (comparação de Tr e espectro de ultravioleta) no extrato **EBMCe I**. Este extrato foi submetido a fracionamento por CLAE-UV para purificação dos produtos de biotransformação. Neste processo, foram obtidos os picos referentes ao metabólito **BM1** e **BM2**, bem como de dois outros picos codificados como **BM4** e **BM 5**, conforme indicados no cromatograma da **Figura 56**.

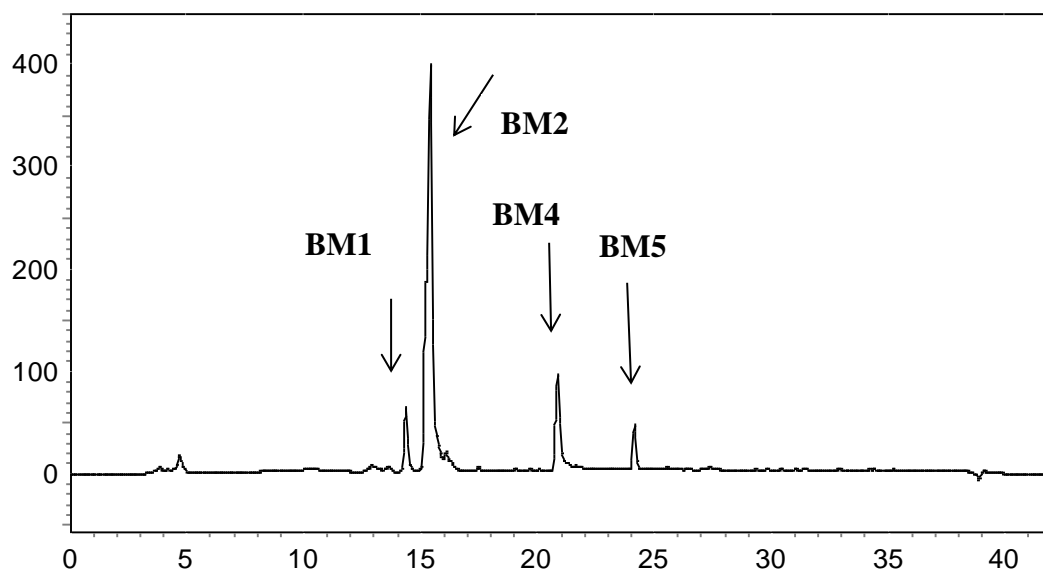


Figura 56 : Cromatograma obtido por CLAE-DAD do extrato **EBMEc I** . Cromatógrafo Shimadzu, Coluna Sinergi Polar RP, fase móvel constituída por gradiente de acetonitrila e água (20-100% Fase orgânica em 35 minutos), vazão de 0,8ml min⁻¹, volume de injeção de 30µL, detecção em UV 254nm e análise a temperatura ambiente.

A análise do perfil das frações coletadas, permitiu obter quatro amostras com pureza cromatográfica suficiente para caracterização estrutural sendo elas **BM1** (3,4 mg- 1,13% de rendimento)e **BM2** (8,4 mg- 2,8% de rendimento) foram identificadas por comparação de Tr e espectro de UV e **BM4** (4,9 mg- 1,1% de rendimento) e **BM5** (3,2 mg- 1.6 % de rendimento) foram enviadas para caracterização estrutural por RMN de ¹H e ¹³C. A caracterização estrutural dessas substâncias será discutida no **Item 4.9**. Os cromatogramas dos picos dos metabólitos **BM4** e **BM 5** estão apresentados na **Figura 57**.

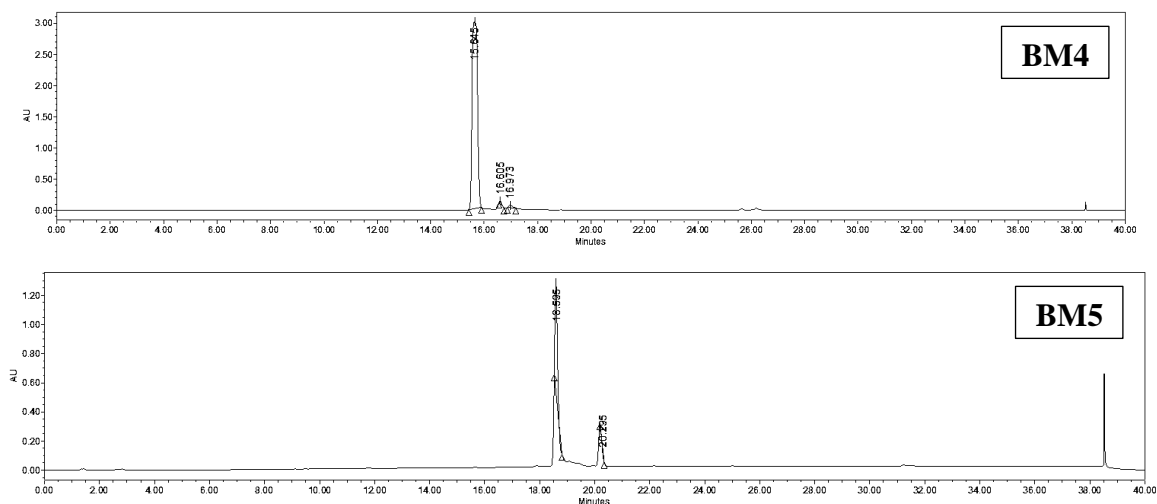


Figura 57. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD dos compostos **BM4** e **BM5**. Cromatógrafo Waters, Coluna Sinergi Polar RP, fase móvel constituída por gradiente de acetonitrila e água (20-100% Fase orgânica em 35 minutos), vazão de 0,8ml min⁻¹, volume de injeção de 30µL, detecção em UV 254nm e análise a temperatura ambiente.

A bactéria *E.coli* foi cultivada também em meio líquido para a biotransformação da menadiona. Durante os experimentos de triagem essa bactéria havia sido capaz de consumir significativamente a menadiona produzindo diversos picos referentes a derivados dessa naftoquinona (ausentes nos controles experimentais), com destaque para os picos em $Tr=14,41$, $Tr=13,03$, $Tr=13,59$ e $Tr=15,33$.

O extrato obtido com esse processo em escala ampliada apresentou a massa de 330 mg e foi codificado como **EBMEc II** (Extrato de Biotransformação da Menadiona por *E.coli* em meio líquido). Assim como observado nos demais extratos, a análise desse extrato por CLAE-DAD mostrou um perfil diferente e mais complexo do que foi obtido durante a triagem, conforme apresentado no cromatograma da **Figura 58**.

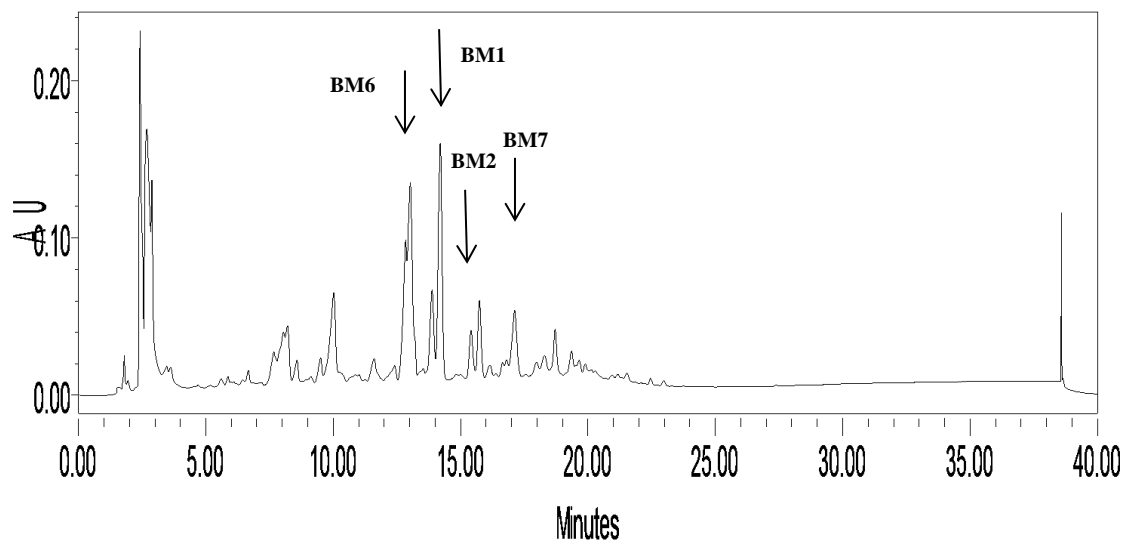


Figura 58: Cromatograma obtido por CLAE-DAD do extrato **EBMEc II**. Cromatógrafo Waters, Coluna Sinergi Polar RP, fase móvel constituída por gradiente de acetonitrila e água (20-100% Fase orgânica em 35 minutos), vazão de 0,8ml min⁻¹, volume de injeção de 30µL, detecção em UV 254nm e análise a temperatura ambiente.

Mesmo assim, pode-se observar o consumo do material de partida e a formação de diversos picos de derivados da menadiona. A partir da comparação dos valores de Tr e espectro de absorção no UV, pode –se identificar neste extrato a produção dos metabólitos **BM1** (2,2 mg – 0,7% de rendimento) e **BM2** (1 mg – 0,3% de rendimento). Este extrato foi submetido a fracionamento por CLAE-UV, sendo possível obter também os picos referentes ao metabólito **BM6** (1,2 mg- 0,4 % de rendimento) e **BM7** (1 mg- 0,3 % de rendimento) enviados para caracterização estrutural por RMN de ¹H e ¹³C. A caracterização estrutural dessas substâncias será discutida no **Item 4.9.** e os cromatogramas desses metabólitos estão apresentados na **Figura 59.**

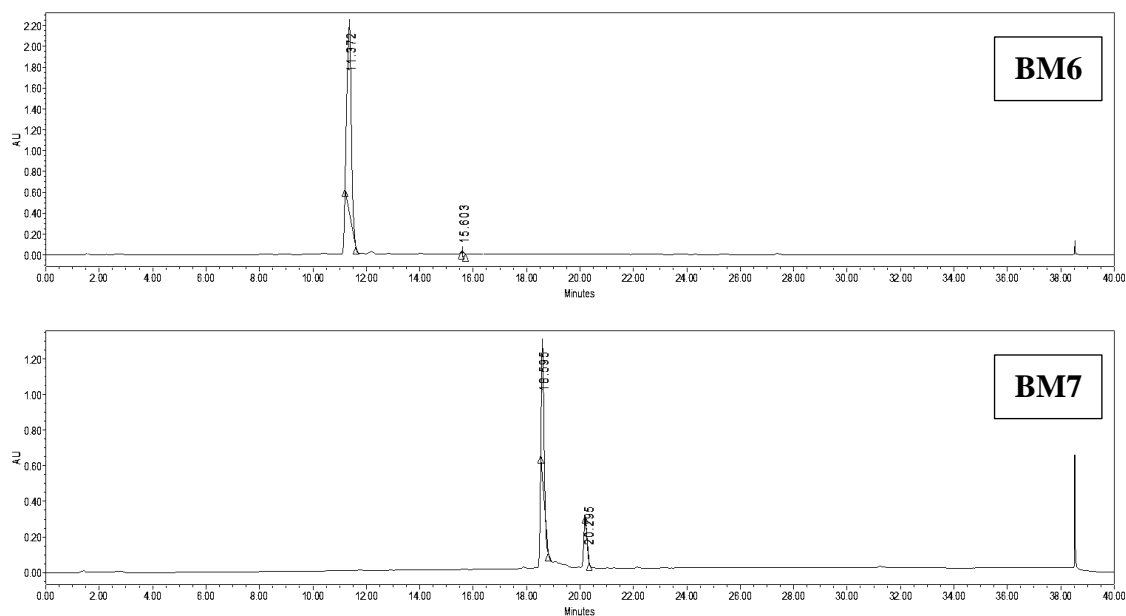


Figura 59: Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD dos compostos **BM6** e **BM7**. Cromatógrafo Waters, Coluna Sinergi Polar RP, fase móvel constituída por gradiente de acetonitrila e água (20-100% Fase orgânica em 35 minutos), vazão de 0,8ml min⁻¹, volume de injeção de 30µL, detecção em UV 254nm e análise a temperatura ambiente.

4.8.3. Biotransformação da menadiona por *A.alliaceus*

Durante os experimentos de triagem, pode-se perceber que *A.alliaceus* foi capaz de biotransformar completamente a estrutura da menadiona, produzindo um derivado principal com Tr= 15,60, que por comparação de valor de Tr e espectro de UV foi identificado como sendo o do composto **BM2** e um pico de menor intensidade com Tr=13,40 e espectro de UV compatíveis com os do composto identificado com **BM6**, conforme cromatograma da **Figura 60**.

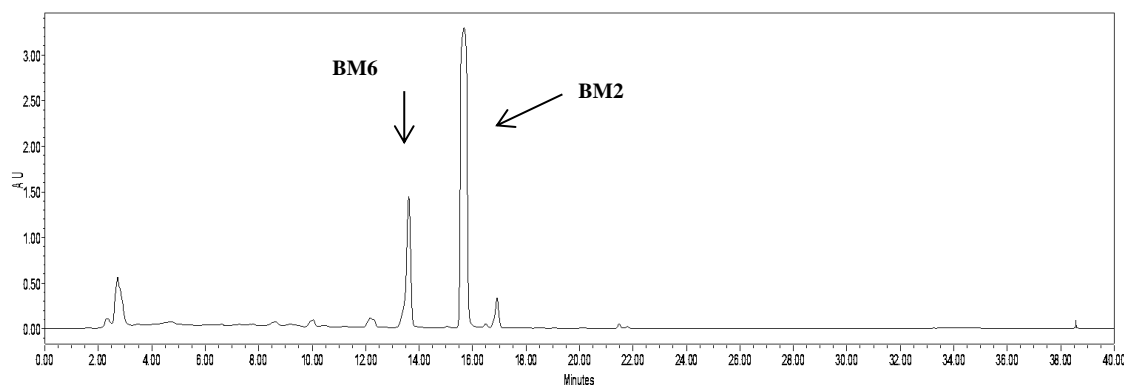


Figura 60: Cromatograma obtido por CLAE-DAD da reação de biotransformação da menadiona por *A.alliaceus* após 96 horas de incubação. Cromatógrafo Waters, Coluna Sinergi Polar RP, fase móvel constituída por gradiente de acetonitrila e água (20-100% Fase orgânica em 35 minutos), vazão de 0,8ml min⁻¹, volume de injeção de 30µL, detecção em UV 254nm e análise a temperatura ambiente.

4.8.4. Biotransformação da menadiona por *A.brasiliensis*

O fungo *A.brasiliensis* também foi capaz de biotransformar a menadiona durante os experimentos de triagem, produzindo picos referentes a derivados dessa naftoquinona. O extrato obtido com esse processo em escala ampliada apresentou a massa de 280 mg e foi codificado como **EBMAb (Extrato de Biotransformação da Menadiona por *A.brasiliensis*)**. No entanto, a análise do perfil cromatográfico desse extrato mostrou grande diferença no perfil químico obtido e a ausência de qualquer produto de biotransformação identificado durante a etapa de triagem. Tal fato inviabilizou a continuidade dos estudos com esse extrato. O cromatograma de **EBMAb** está apresentado na **Figura 61**.

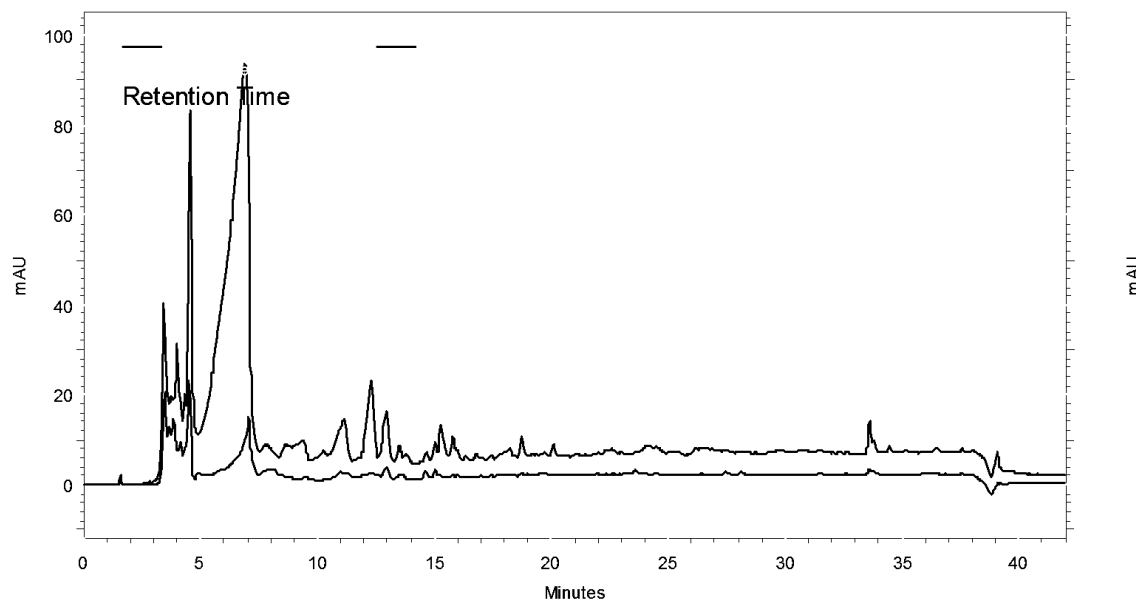


Figura 61: Cromatograma obtido por CLAE-DAD do extrato **EBMAb**. Cromatógrafo Shimadzu, Coluna Sinergi Polar RP, fase móvel constituída por gradiente de acetonitrila e água (20-100% Fase orgânica em 35 minutos), vazão de 0,8ml min⁻¹, volume de injeção de 30µL, detecção em UV 254nm e análise a temperatura ambiente.

4.8.5. Biotransformação da lausona metoxilada por *C.elegans* ATCC 9245

Durante a escala de triagem, estabeleceu-se que os fungos *C.elegans* ATCC 10028b, *C.elegans* ATCC 9245 e *A.alliaceus* foram capazes de biotransformar a estrutura da lausona metoxilada, produzindo basicamente os mesmos produtos em concentrações diferentes. O experimento empregando o fungo *C.elegans* ATCC 9245 foi selecionado para ser realizado em escala ampliada visando isolar e identificar os compostos produzidos.

O extrato obtido (358mg) foi codificado como **EBLMCe** (Extrato de Biotransformação da Lausona Metoxilada por *C.elegans* ATCC 9245) e o perfil cromatográfico do mesmo em escala preparativa não reproduziu o estabelecido na escala de triagem, conforme apresentado no cromatograma da **Figura 62**.

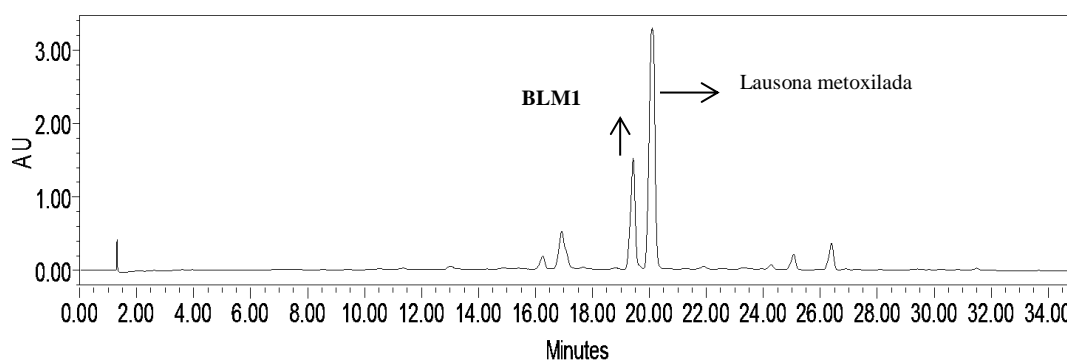


Figura 62: Cromatograma obtido por CLAE-DAD da reação de biotransformação da lausona metoxilada por *C.elegans* ATCC 9245 após 96 horas de incubação. Cromatógrafo Waters, Coluna Sinergi Polar RP, fase móvel constituída por gradiente de acetonitrila e água (20-100% Fase orgânica em 35 minutos), vazão de 0,8ml min⁻¹, volume de injeção de 30µL, detecção em UV 254nm e análise a temperatura ambiente.

O fracionamento deste extrato foi feito diretamente por CLAE-UV e a análise do perfil das frações coletadas, permitiu obter uma amostra com pureza cromatográfica suficiente para caracterização estrutural codificada como **BLM1** (9,1 mg- 3% de rendimento). Essa amostra foi enviada para caracterização estrutural por RMN de ¹H e ¹³C. A caracterização estrutural dessas substâncias será discutida no **Item 4.9**. O cromatograma do pico desse metabólito está apresentado na **Figura 63**.

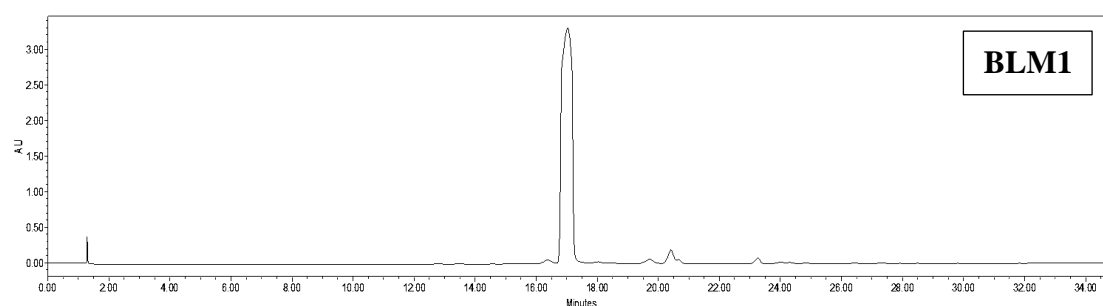


Figura 63: Cromatograma obtido por CLAE-DAD do composto **BLM1**. Cromatógrafo Waters, Coluna Sinergi Polar RP, fase móvel constituída por gradiente de acetonitrila e água (20-100% Fase orgânica em 35 minutos), vazão de 0,8ml min⁻¹, volume de injeção de 30µL, detecção em UV 254nm e análise a temperatura ambiente.

4.8.6. Biotransformação da plumbagina por *C.elegans* ATCC 9245

Na etapa de triagem estabeleceu-se que os fungos *A.niger* e as espécies *C.elegans* ATCC 10028b e ATCC 9245 foram capazes de produzir produtos de biotransformação da plumbagina. Conforme já descrito, em todos os processos houve a formação de um pico majoritário com $T_r=15,32$, sendo que no caso do extrato produzido pelo fungo *C.elegans* ATCC 9245 observa-se ainda alguns picos de produtos minoritários. Sendo assim, esse processo foi selecionado para ser realizado em escala ampliada, fornecendo, portanto o extrato codificado como **EBPCe** (Extrato de Biotransformação da Plumbagina por *C.elegans* ATCC 9245- 385mg).

A análise do perfil cromatográfico do extrato **EBPCe**, mostrou que não houve consumo nenhum da plumbagina, e conseqüentemente não houve a formação de produtos de biotransformação esperados pelo mesmo, conforme cromatograma apresentado na **Figura 64**. Sendo assim, os estudos de biotransformação desse substrato foram inviabilizados.

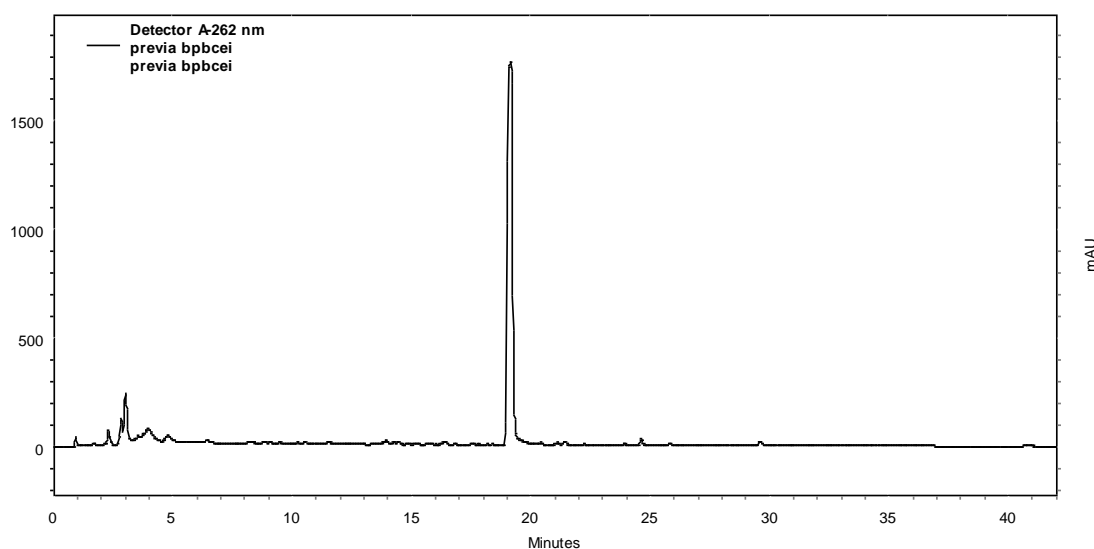


Figura 64. Cromatograma do extrato de biotransformação da plumbagina em escala ampliada. Cromatógrafo Waters, Coluna Sinergi Polar RP, fase móvel constituída por gradiente de acetonitrila e água (20-100% Fase orgânica em 35 minutos), vazão de $0,8\text{ml min}^{-1}$, volume de injeção de $30\mu\text{L}$, detecção em UV 260nm e análise a temperatura ambiente.

Com relação a baixa reprodutibilidade de todos os processos realizados em escala preparativa é possível sugerir duas hipóteses. Uma delas é de que essas reações não sejam robustas o suficiente para serem reprodutivas ou a de que o derivado que havia sido observado durante a escala analítica, não apresentava estabilidade suficiente sendo então reconvertido em uma versão mais estável, nesse caso ao próprio material de partida da reação.

4.9. Caracterização estrutural dos metabolitos obtidos

4.9.1. Menadiona

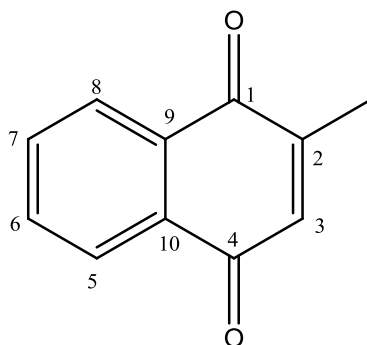


Figura 65. Estrutura química numerada da 2-metil-1,4-naftoquinona ou menadiona.

A naftoquinona 2-metil-1,4-naftoquinona (**Figura 65**) também conhecida como menadiona, empregada nas reações de biotransformação, foi adquirida comercialmente da empresa Sigma Aldrich[®], apresentando, segundo laudo que a acompanha, entre 95% e 98% de pureza. A confirmação estrutural desse substrato foi realizada utilizando-se a técnica de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e de carbono (RMN de ¹H e de ¹³C) e comparação com dados previamente descritos por Zielenkiewicz et al., 2007. Os dados espectroscópicos obtidos encontram-se descritos na **Tabela 9**.

Tabela 9: Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) da menadiona ($\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$)

Posição	δ ^1H , multiplicidade, (J Hz), integral	δ ^{13}C
1	-	184,6
2	-	133,9
3	6,91 <i>q</i> (1,5) 1H	133,8
4	-	185,3
5	8,04 <i>m</i> 1H	125,8*
6	7,84 <i>m</i> 1H	126,3**
7	7,84 <i>m</i> 1H	132,5**
8	8,04 <i>m</i> 1H	125,1*
9	-	135,5
10	-	148,3
11	2,17 <i>d</i> (1,5)3H	15,6

* e ** podem ser trocáveis entre si

O espectro de RMN de ^1H da menadiona (**Apendice 1**) permite observar a presença de dois multipletos (*m*) integrados para 2H cada, com deslocamentos típicos de hidrogênios encontrados em anéis aromáticos. Um dos sinais mencionados se encontra em δ_{H} 8,04 correspondente aos hidrogênios das posições 5 e 8 e o outro em δ_{H} 7,84, correspondente aos hidrogênios 6 e 7. Pode-se observar também a presença de um quadrupeto integrado para 1H encontrado em δ_{H} 6,91, região típica de um hidrogênio de ligação dupla ($J = 1,5$ Hz referente ao acoplamento com os hidrogênios da metila na

posição 11), atribuído ao hidrogênio da posição 3 (α em relação a carbonila) . Por fim observa-se um dubleto ($J=1,5$) integrado para 3H em δ_H 2,17, atribuído aos hidrogênios metílicos da posição 11. No espectro de RMN de ^{13}C (**Apêndice 2**) observa-se a presença de 11 sinais, dentre eles os sinais dos carbonos carbonílicos das posições C1 e C4 do núcleo quinonóide , localizados respectivamente em δ_C 185,3 e δ_C 185,9 e o sinal dos átomos de carbono olefínicos em δ_C 149,0 e δ_C 126,2, referentes ao C2 e C3, respectivamente. Pode-se observar também a presença do carbono da metila na posição C11 em δ_C 16,3.

Os dados obtidos por espectrometria de massas (ionização por electrospray em modo positivo) mostrou o íon de m/z 173 ($[M+H]^+$) que sugere uma massa molecular de 172 Da, consistente com a estrutura da molécula (**Apêndice 3**) .

4.9.2. BM1

O metabólito **BM1** foi identificado como 2-metil-1,4-hidroxi-naftalenodiol (Frei et al., 1986), e sua estrutura química esta apresentada na **Figura 66**.

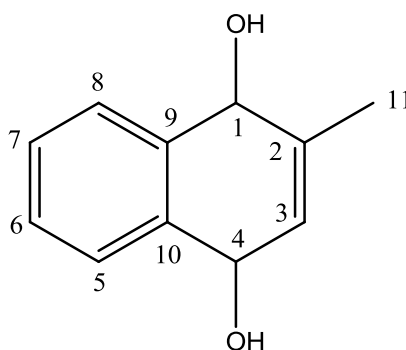


Figura 66. Estrutura química numerada do metabólito **BM1**

A análise do espectro de ^1H (**Apêndice 4**) de **BM1** mostrou grande similaridade com os sinais da menadiona utilizada como substrato para a reação de biotransformação. Observa-se a presença de sinais de hidrogênios aromáticos em δ_{H} 8,16 (*m*) e 8,11 (*m*), integrados para 1H cada, além de um sinal em δ_{H} 7,90 (*m*), integrado para 2H. Pode-se observar também o sinal em δ_{H} 6,96 (*q* $J=1,5\text{Hz}$) integrado para 1H referente ao hidrogênio da posição H-3, e o sinal em δ_{H} 2,25 (*d*, $J=1,5$) integrado para 3H referentes aos hidrogênios metílicos da posição H-2, todos eles presentes também no espectro da menadiona.

Diferentemente do espectro da menadiona, pode-se observar a presença de dois sinais na região de deslocamento de hidrogênios carbinólicos em δ_{H} 3,94 (singleto largo) e 3,98 (*s*), indicando que houve a redução das carbonilas da posição H-1 e H-4 a álcoois.

O espectro de carbono (**Apêndice 5**) está condizente com a proposta estrutural, pois além dos sinais característicos dos carbonos da metila, dos aromáticos e sp^2 da menadiona, observou-se a presença de dois sinais referentes a carbonos carbinólicos em δ_{C} 42,4 e δ_{C} 53,1.

No entanto, pode-se verificar ainda a presença dos sinais referentes às carbonilas em δ_{C} 186,4 e δ_{C} 185,7, que indicam que esse composto não se encontra apenas nessa forma, mas em equilíbrio com sua forma oxidada equivalente a própria menadiona. Os dados espectroscópicos obtidos encontram-se descritos na **Tabela 10**.

Tabela 10: Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) de **BM1** ($\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$)

Posição	δ ^1H , multiplicidade, (J Hz), integral	δ ^{13}C
1	3,98 <i>s</i> 1H	53,1
2	-	149,3
3	6,96 <i>q</i> (1,5) 1H	136,3
4	3,94 <i>s</i> (1)	42,4
5	8,16 <i>m</i> 1H	127,0*
6	7,90 <i>m</i> 1H	134,7**
7	7,90 <i>m</i> 1H	133,2**
8	8,11 <i>m</i> 1H	126,1*
9	-	134,7
10	-	136,3
11	2,25 <i>d</i> (1,5) 3H	20,1

* e ** podem ser trocáveis entre si

4.9.3. BM2

O metabólito **BM2** foi identificado como 2-metil-1-hidroxi-naftalenol (Chara et al., 2007), e sua estrutura química esta apresentada na **Figura 67**.

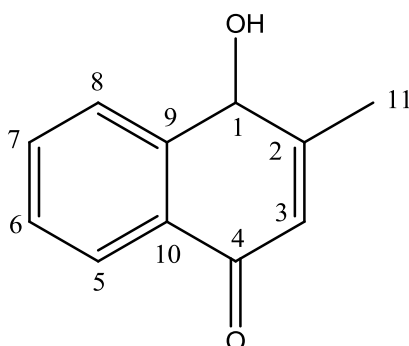


Figura 67. Estrutura química numerada do metabólito **BM2**

A análise do espectro de ^1H da amostra **BM2** (**Apêndice 6**) mostrou grande similaridade de sinais com o metabólito **BM1**. Observa-se a presença de sinais de hidrogênios aromáticos em δ_{H} 8,07 (*m*) e 8,03 (*m*), integrados para 1H cada e δ_{H} 7,84 (*m*), integrado para 2H. Pode-se observar também o sinal em δ_{H} 6,89 (*q* $J=1,5\text{Hz}$) integrado para 1H referente ao hidrogênio da posição H-3, e o sinal em δ_{H} 3,21 (*d*, $J=1,5$) integrado para 3H referente aos hidrogênios metílicos da posição H-11, todos eles presentes também no espectro da menadiona, além de um sinal na região de deslocamento de hidrogênios carbinólicos em δ_{H} 3,98 (*s*) integrado para 1H, indicando que houve a redução apenas da carbonila da posição C-1.

O espectro de ^{13}C (**Apêndice 7**) está condizente com a proposta estrutural, pois além dos sinais característicos dos carbonos da metila, dos aromáticos e sp^2 também apresentado por **BM1**, observou-se a presença de um sinal referente a um carbono carbinólicos em δ_{C} 53,1. No entanto, pode-se verificar ainda a presença dos sinais referentes às carbonilas em δ_{C} 186,2 3 $\delta_{\text{C}}= 185,7$, que indicam que essa amostra também

esta em equilíbrio com sua forma oxidada equivalente a própria menadiona. Os dados espectroscópicos obtidos encontram-se descritos na **Tabela 11**.

Tabela 11: Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) de **BM2** ($\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$)

Posição	δ ^1H , multiplicidade, (J Hz), integral	δ ^{13}C
1	3,98 s 1H	53,1
2	-	149,2
3	6,89 q (1,5) 1H	136,2
4	-	186,2
5	8,03 m 1H	126,9*
6	7,84 m 1H	134,6**
7	7,84m 1H	133,0**
8	8,07 m 1H	126,5*
9	-	134,6
10	-	136,2
11	3,21 d (1,5) 3H	16,3

* e ** podem ser trocáveis entre si

4.9.4. BM3

A análise do espectro de RMN de ^1H (**Apêndice 8**) do metabólito **BM3** mostrou que este composto apresenta os mesmos sinais encontrados no espectro da própria menadiona utilizada como material de partida. Foi possível observar a presença dos

sinais dos hidrogênios aromáticos em δ_H 8,07 (*m* – integrado para 2H) e δ_H 7,72 (*m*, integrado para 2H), o sinal do hidrogênio vinílico referente a posição H3 em δ_H 6,84 (*q*, $J=1,5$ Hz – integrado para 1 H) e a presença do sinal dos hidrogênios metílicos da posição H-11 em δ_H 2,20 (*d*, $J=1,5$ Hz – integrado para 3H). O espectro de ^{13}C (**Apêndice 9**) também está de acordo com a estrutura da menadiona, com destaque para os carbonos das carbonilas da posição C1 e C4 em δ_C 185,1 e em δ_C 185,7, respectivamente, o sinal dos carbonos vinílicos em δ_C 149,0 e δ_C 136,2 correspondentes as posições C2 e C3, respectivamente além do carbono metílico da posição C11 em δ_C 16,20.

Se considerarmos o fato de que o tempo de retenção no CLAE-DAD do pico referente ao metabólito **BM3** não era o mesmo do apresentado pela menadiona e que foram observadas diferenças também no espectro no ultravioleta, pode-se sugerir que o produto de biotransformação inicialmente formado e isolado foi convertido a menadiona, provavelmente por essa ser uma molécula de estrutura química mais estável que a do produto original. Outra observação importante é a de que o espectro desse composto, atribuído como da menadiona, apresenta menos impurezas do que o espectro obtido a partir da menadiona comercial.

4.9.5. BM4

O metabólito **BM4** foi identificado como 1,2,3,4-tetrahidro-2-metil-1,4-naftalenodiol (Argabright et al., 1965), e sua estrutura química esta apresentada na

Figura 68.

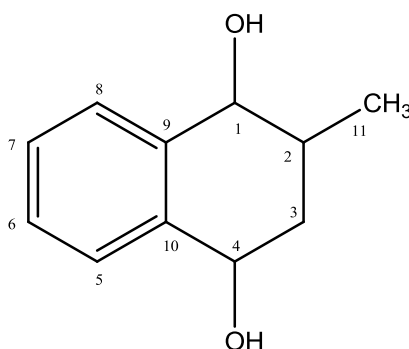


Figura 68. Estrutura química sugerida para o metabólito **BM4**

Analisando o espectro de ^1H do composto **BM4** (**Apêndice 10**), é possível verificar a presença de um metabólito principal e que este se trata de uma naftoquinona derivada da menadiona, obtida pelo processo de biotransformação, uma vez que o pico referente a essa substância não foi encontrado nos controles do experimento.

Observam-se sinais que podem ser atribuídos aos hidrogênios aromáticos em δ_{H} 8,03 (*dd*), δ_{H} 7,82 (*m*), δ_{H} 7,73(*m*) e δ_{H} 7,50 (*m*) integrados para 1H cada, referentes, respectivamente aos hidrogênios das posições H5, H7, H6 e H8, bem como o sinal integrado para 3H em δ_{H} 1,33 (*d*) referente aos hidrogênios metílicos da posição H11. O metabólito isolado, também não possui o sinal do hidrogênio H3 em δ_{H} 6,91, referente ao hidrogênio olefínico da posição α à carbonila em C4 da menadiona. Pode-se observar também a presença do sinal do hidrogênio carbinólico, em δ_{H} 5,06 (*m*) integrado para 1H . Observa-se também o sextupeto de duplete em δ_{H} 2,77 ($J= 4,3$ e $6,7$ Hz), o duplo triplete (*dt*) em δ_{H} 2,49 ($J=4,3$ e $12,3$ Hz) e um multiplete (*m*) em δ_{H} 1,90, integrados para 1H cada, e o sinal hidrogênios metílicos (*d*) da posição 11 em δ_{H} 1,33 integrado

para 3H com a constante de acoplamento de 6,7 Hz. Observa-se também a presença do sinal de um outro hidrogênio carbinólico em $\delta_{\text{H}} = 3,81$, (*m*, integrado para 1H). Como não houveram alterações nos demais sinais do espectro, é possível sugerir que, nesse metabólito, tenha ocorrido também a redução da carbonila em C4 a um álcool.

Os dados de RMN de ^{13}C (**Apêndice 11**) são compatíveis com a proposta sugerida. Neste espectro, observa-se o desaparecimento do sinal do carbono dos dois grupos carbonílicos das posições C1 e C4 no núcleo quinonóide. O aparecimento do sinal em $\delta_{\text{C}} = 55,6$ e $\delta_{\text{C}} = 51,4$ é compatível com o sinal de carbonos contendo um grupo hidroxílico de um álcool, reforçando a sugestão da redução das duas carbonilas. Foi observado o sinal de um carbono metilênico em $\delta_{\text{C}} = 40,3$, porém não se observou a presença do sinal do carbono referente a posição C2, o que pode ter ocorrido por o sinal correspondente a esse carbono ter o mesmo deslocamento de C3 ou ainda por estar sendo ocultado pela presença do sinal do solvente em $\delta_{\text{C}} = 48,7$. Os dados espectroscópicos obtidos encontram-se descritos nas **Tabelas 12 e 13**.

Tabela 12: Dados de RMN de ^1H (400 MHz) de **BM4** ($\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$)

Hidrogênio	δ ^1H BM4
H-1	5,06 - <i>dd</i> - J= 4,3 e 11,3
H-2	2,77 - <i>sd</i> - J= 4,3 e 6,7
H-3A	2,49 - <i>dt</i> - J= 4,3 e 11,3
H-3B	1,90 - <i>m</i>
H-4	3,81 <i>m</i>
H-5	8,03 - <i>dd</i> *
H-6	7,73 - <i>m</i> **
H-7	7,82 - <i>m</i> **
H-8	7,50 - <i>m</i> *
H-11	1,33 - <i>d</i> - J= 6,7

* e ** podem ser trocáveis entre si

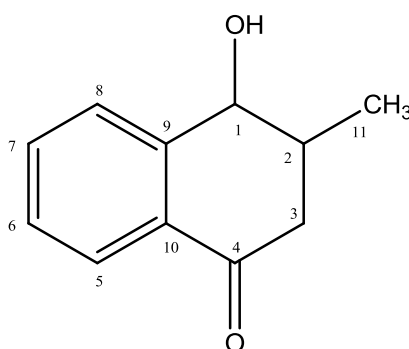
Tabela 13: Dados de RMN de ^{13}C (100 MHz) de **BM4** ($\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$)

Carbono	$\delta^{13}\text{C}$ BM4
C-1	55,6
C-2	Não observado
C-3	40,3
C-4	51,4
C-5	126,7
C-6	126,8
C-7	128,6
C-8	125,0
C-9	128,4
C-10	134,8
C-11	23,2

A análise desse metabólito por espectrometria de massas (**Apêndice 12**), realizada por electrospray em modo positivo mostrou a presença do íon de m/z 179 ($[\text{M}+\text{H}]^+$) sugerindo uma massa molecular de 178 Da, condizente com a proposta estrutural.

4.9.6. BM5

O metabólito **BM5** foi identificado como 2-metil-1-hidroxi-naftalenol (Boylard & Mason, 1951) , e sua estrutura química esta apresentada na **Figura 69**.

**Figura 69.** Estrutura química sugerida para o metabólito **BM5**

Analisando o espectro de ^1H de **BM5 (Apêndice 13)**, é possível verificar a semelhança estrutural com o metabólito **BM 4**. Observam-se sinais que podem ser atribuídos aos hidrogênios aromáticos em δ_{H} 8,03 (*dd*), δ_{H} 7,81 (*m*), δ_{H} 7,72(*m*) e δ_{H} 7,50 (*m*) integrados para 1H cada, referentes, respectivamente aos hidrogênios das posições H5, H7, H6 e H8, bem como o sinal integrado para 3H em δ_{H} 1,33 (*d*) referente aos hidrogênios metílicos da posição H11. Diferentemente dos sinais do espectro de ^1H da menadiona, o metabólito isolado, não possui o sinal do hidrogênio H3 em δ_{H} 6,91, referente ao hidrogênio olefinico da posição α à carbonila em C4. Pode-se observar também a presença de um sinal na região típica de deslocamento de um hidrogênio carbinólico, em δ_{H} 5,06 (*dd* $J=4,8$ e $11,3$ Hz) integrado para 1H. Observa-se um sextupeto de duplete em δ_{H} 2,77 ($J= 4,3$ e $6,7$ Hz), um duplo triplete (*dt*) em δ_{H} 2,49 ($J=4,3$ e $12,3$ Hz) e um multipeto (*m*) em δ_{H} 1,90, integrados para 1H cada. A análise do espectro mostrou também a presença do sinal dos hidrogênios metílicos da posição 11 integrado para 3H na forma de um duplete (*d*), assim como no espectro da menadiona, porém no caso dessa outra substância, esse sinal se encontra menos deslocado (δ_{H} 1,33) e com a constante de acoplamento alteradas para 6,7 Hz. O desaparecimento do sinal do hidrogênio na posição 3 sugere que tenham ocorrido modificações naquela posição. Os sinais de hidrogênio que aparecerem entre δ_{H} 2,77 e 1,90 e o sinal dos hidrogênios da metila em H11, bem como suas respectivas multiplicidades, apontavam uma redução da ligação dupla entre H2-H3, com a entrada de um hidrogênio em cada uma dessas posições. A presença do sinal do hidrogênio carbinólico em δ_{H} 5,06 também indica a redução da cetona em C1 á um álcool.

Os dados de RMN de ^{13}C (**Apêndice 14**) são compatíveis com a proposta sugerida. Neste espectro, observa-se o desaparecimento do sinal do carbono do grupo carbonílico da posição C1 no núcleo quinonóide, restando apenas a carbonila da posição

C4 em δ_C 199,5. O aparecimento do sinal em δ_C 67,2, é compatível com o sinal de um átomo de carbono contendo um grupo hidroxílico de um álcool, reforçando a sugestão da redução da carbonila. Diferentemente do espectro da menadiona, não foram observados os sinais dos carbonos olefínicos e sim o sinal de dois carbonos metilênicos em δ_C 41,6 e δ_C 41,0 correspondentes as posições C2 e C3 . Os dados espectroscópicos obtidos encontram-se descritos nas **Tabela 14 e 15**.

Tabela 14: Dados de RMN de ^1H (400 MHz) de **BM5** ($\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$)

Hidrogênio	δ ^1H BM5
H-1	5,06 - <i>dd</i> - J= 4,3 e 11,3
H-2	2,77 - <i>sd</i> - J= 4,3 e 6,7
H-3A	2,49 - <i>dt</i> - J= 4,3 e 11,3
H-3B	1,90 - <i>m</i>
H-5	8,03 - <i>m</i> *
H-6	7,72 - <i>m</i> **
H-7	7,81 - <i>m</i> **
H-8	7,50 - <i>m</i> *
H-11	1,33 - <i>d</i> - J= 6,7

* e ** podem ser trocáveis entre si

Tabela 15: Dados de RMN de ^{13}C (100 MHz) de **BM5** ($\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$)

Carbono	δ ^{13}C BM5
C-1	67,2
C-2	41,6
C-3	41,0
C-4	199,5
C-5	126,4
C-6	127,3
C-7	130,8
C-8	126,4
C-9	133,4
C-10	148,0
C-11	14,7

A análise desse metabólito por espectrometria de massas de alta resolução (**Apêndice 15**), realizada por electrospray em modo positivo mostrou a presença do íon de m/z 177 ($[M+H]^+$) sugerindo uma massa molecular de 176 Da, condizente com a proposta estrutural. A análise de dados da literatura mostrou que esta molécula não é inédita, e já foi descrita em uma publicação de 1951 sobre a redução de *para*-quinonas utilizando o hidreto de alumínio e lítio como agente redutor (Boyland & Mason, 1951). No entanto, essa publicação não descreve os dados de RMN da molécula em questão, inviabilizando a comparação dos dados obtidos.

4.9.7. BM6

A análise desse espectro de RMN de ^1H (**Apêndice 16**) de **BM6** mostrou a presença de muitos sinais diferentes, indicando que essa amostra não se trata de uma substância pura. No entanto, pode-se perceber que existem diversos sinais nas regiões típicas de deslocamento dos hidrogênios da menadiona e de seus derivados, indicando que se pode tratar de uma amostra contendo mistura de naftoquinonas e não de uma amostra contendo apenas impurezas. Além disso, pela pureza prévia do pico do metabólito CLAE-DAD, pode-se sugerir que os compostos ali presentes possam ser inter convertíveis.

4.9.8. BM7

O metabólito **BM7** foi identificado como dímero da menadiona (Azuma et al., 2012), e sua estrutura química esta apresentada na **Figura 70**.

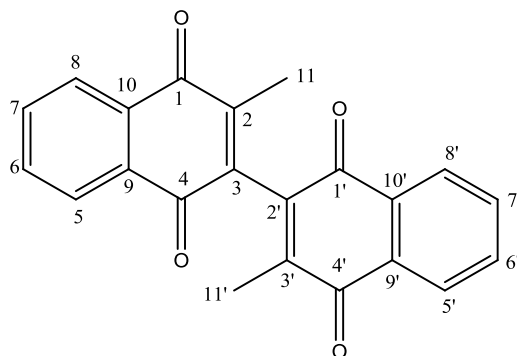


Figura 70. Estrutura química sugerida para o metabólito **BM7**

Analisando o espectro de ^1H (**Apêndice 17**) dessa substância, é possível verificar a presença de um metabólito principal e que este se trata de uma naftoquinona derivada da menadiona, obtida pelo processo de biotransformação, uma vez que o pico referente a essa substância não foi encontrado nos controles do experimento.

Assim como no espectro do material de partida (menadiona), foi possível observar os sinais atribuídos aos hidrogênios aromáticos em δ_{H} 8,15 (*m*) δ_{H} 8,13 (*m*), δ_{H} 7,88 (*m*) e δ_{H} 7,83(*m*) integrados para 1H cada. O sinal do hidrogênio metílico da posição 11 da menadiona, também está presente no espectro desse derivado, porém na forma de um singlete com o deslocamento químico em δ_{H} 2,10 (3H). A diferença principal entre os dois espectros se dá pela ausência do sinal do hidrogênio da posição 3 (posição alfa em relação a carbonila) sem o aparecimento de outros sinais no espectro.

A análise desse metabólito por espectrometria de massas de alta resolução (**Apêndice 18**), realizada por electrospray em modo positivo mostrou a presença do íon de m/z 365 ($[\text{M}+\text{Na}]$) sugerindo uma massa molecular de 342 Da. Sendo assim, sugeriu-se que este composto trata-se de um dímero da menadiona. Os dados de RMN de ^{13}C são compatíveis com a estrutura química sugerida para este derivado. Os espectros desses compostos estão na **Tabela 16**.

Tabela 16: Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) de **BM7** ($\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$)

Posição	δ ^1H , multiplicidade, (J Hz), integral	δ ^{13}C
1	-	185,8
2	-	Não observado
3	-	Não observado
4	-	181,7
5	8,15 <i>m</i> 1H	126,7
6	7,83 <i>m</i> 1H	127,0
7	7,83 <i>m</i> 1H	127,0
8	8,13 <i>m</i> 1H	126,7
9	-	134,0
10	-	135,5
11	2,11 <i>s</i> 3H	8,75

4.9.9. Lausona metoxilada

A naftoquinona 2-metoxi-1,4-naftoquinona (**Figura 71**) também conhecida como lausona metoxilada (Valente et al, 2007), empregada nas reações de biotransformação também foi adquirida comercialmente da empresa Sigma Aldrich[®], apresentando, segundo laudo que a acompanha, 98% de pureza. A confirmação estrutural desse substrato foi realizada utilizando-se a técnica de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e de carbono (RMN de ^1H e de ^{13}C , **Apêndice 19** e **20**, respectivamente). Os dados espectroscópicos obtidos encontram-se descritos na **Tabela 17**.

Tabela 17: Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) da lausona metoxilada ($\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$)

Posição	δ ^1H , multiplicidade, (J Hz), integral	δ ^{13}C
1	-	180,0
2	-	160,3
3	6,2 <i>s</i> 1H	136,2
4	-	184,7
5	8,13 <i>m</i> 1H	126,9*
6	7,77 <i>m</i> 1H	134,3**
7	7,77 <i>m</i> 1H	134,6**
8	8,08 <i>m</i> 1H	126,5*
9	-	148,4
10	-	149,0
11	3,9 <i>s</i> 3H	16,3

* e ** podem ser trocáveis entre si

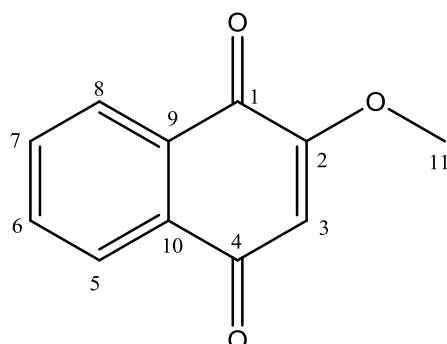


Figura 71. Estrutura química numerada da 2-metoxi-1,4-naftoquinona ou lausona metoxilada

O espectro de RMN de ^1H da lausona metoxilada (**Apêndice 18**) permite observar a presença de dois multipletos (*m*) integrados para 2H cada, com deslocamentos típicos de hidrogênios encontrados em anéis aromáticos. Um dos sinais mencionados se encontra em δ_{H} 8,13 correspondente aos hidrogênios das posições 5 e 8 e o outro em δ_{H} 7,77, correspondente aos hidrogênios 6 e 7. Pode-se observar também a presença de um singlete integrado para 1H encontrado em δ_{H} 6,20 atribuído ao hidrogênio da posição 3 (α em relação a carbonila) . Por fim observa-se um singlete integrado para 3H em δ_{H} 3,9, atribuído aos hidrogênios metílicos da posição 11. No espectro de RMN de ^{13}C (**Apêndice 19**) observa-se a presença de 11 sinais, dentre eles os sinais dos carbonos carbonílicos das posições C1 e C4 do núcleo quinonóide , localizados respectivamente em δ_{C} 184,7 e δ_{C} 180,0 e o sinal dos átomos de carbono olefínicos em δ_{C} 149,0 e δ_{C} 126,2, referentes ao C2 e C3, respectivamente. Pode-se observar também a presença do carbono da metila na posição C11 em δ_{C} 56,3.

Os dados obtidos por espectrometria de massas de alta resolução (ionização por electrospray em modo positivo) mostrou o íon de m/z 189 ($[\text{M}+\text{H}]^+$) e o íon m/z 211 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$) que sugere uma massa molecular de 188 Da, consistente com a estrutura da molécula (**Apêndice 21**) .

4.9.10. BLM1

O metabólito **BLM1** foi identificado como lausona (Elavarasan et al., 2014) conforme estrutura química apresentada na **Figura 72**.

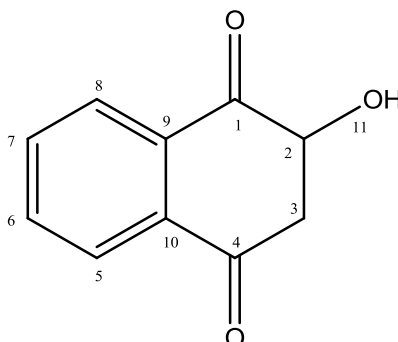


Figura 72. Estrutura química sugerida para o metabólito **BLM1**

A análise do espectro de RMN de ^1H (**Apêndice 22**), apresentou apenas os sinais dos hidrogênios aromáticos em δ_{H} 7,84 (m, integrado para 2H) e em δ_{H} 8,10 (m, integrado para 2H), e o sinal do hidrogênio da posição H-3 em δ_{H} 2,67 (s (largo), integrado para 1 H). Nesse espectro, pode-se notar também a presença do sinal do hidrogênio da hidroxila em δ_{H} 4,02 (s (l)).

O espectro de RMN de ^{13}C (**Apêndice 23**) também está de acordo com a proposta realizada. Pode-se notar a presença dos sinais dos carbonos das carbonilas em δ_{C} 184,8 e δ_{C} 181,9, referentes a posição C4 e C1 respectivamente, os carbonos da ligação dupla entre C2-C3 em δ_{C} 156,3 e δ_{C} 110,7, bem como dos carbonos aromáticos. Os dados de RMN obtidos estão listados nas tabelas abaixo (**Tabela 18 e 19**).

Tabela 18. Dados de RMN de ^1H do metabólito **BLM 1** (600 MHz, $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$, multiplicidade, J em Hz).

Hidrogênio	BLM 1 ($\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$)	Lausona (CDCl_3)
H-2	4,02 – <i>s(l)</i>	Não observado
H-3	6,27 – <i>s(l)</i>	6,37 - <i>s</i>
H-5	7,84 - <i>m</i>	7,76 - <i>m</i>
H-6	8,10 - <i>m</i>	8,12 - <i>m</i>
H-7	8,10 - <i>m</i>	8,12- <i>m</i>
H-8	7,84 - <i>m</i>	7,76 - <i>m</i>

Tabela 19. Dados de RMN de ^{13}C do metabólito **BLM 1** (600 MHz, $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$,

Carbono	LBM 1	Lausona
C-1	183,1	181,9
C-2	160,6	156,3
C-3	112,2	110,7
C-4	187,1	184,9
C-5	127,1	126,7
C-6	136,0	135,3
C-7	134,6	133,7
C-8	127,5	126,5
C-9	132,1	129,4
C-10	134,0	132,9

A análise desse metabólito por espectrometria de massas de alta resolução, realizada por electrospray em modo positivo mostrou a presença do íon de m/z 175 ($[\text{M}+\text{H}]^+$) sugerindo uma massa molecular de 174 Da, condizente com a proposta estrutural (**Apendice 24**).

4.10. Considerações a respeito dos derivados obtidos

A **Figura 73** esquematiza as principais reações de biotransformação realizadas a partir da menadiona.

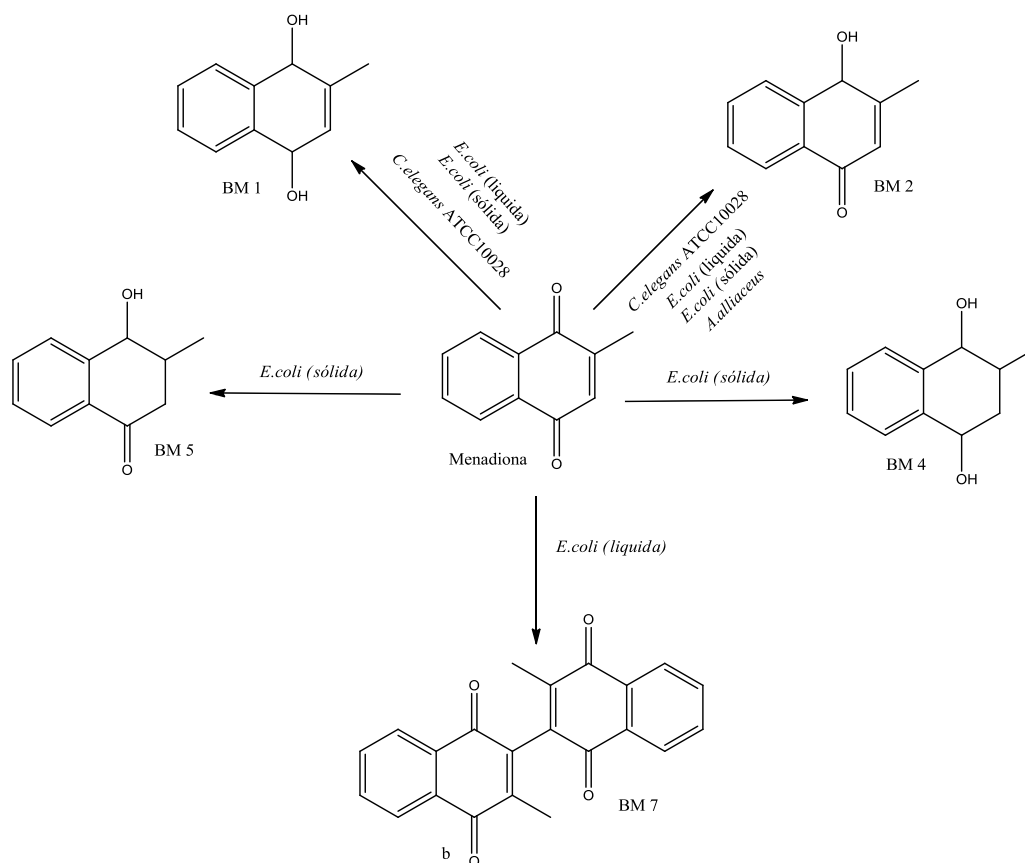


Figura 73. Produtos de biotransformação da menadiona

A partir dos resultados obtidos, pode-se observar que todas as modificações moleculares foram realizadas no núcleo quinonoide dos compostos, não havendo portanto alterações na porção aromática das moléculas. Pode-se observar que os micro-organismos avaliados tem a capacidade de reduzir as naftoquinona, tanto em

relação a carbonila das moléculas, gerando as correspondentes hidroquinonas, quanto reduzindo também a ligação dupla entre os carbonos 2 e 3.

Os compostos **BM1** e **BM2** foram formados na maioria dos processos, e embora essa reação pareça ser facilitada, acredita-se que não seja um processo espontâneo pois os mesmos compostos não foram observados nos controles experimentais analisados. Pode-se afirmar que a bactéria *E.coli* se mostrou bastante eficiente em biotransformar a estrutura da menadiona, produzindo diferentes metabólitos nos cultivos líquido e sólido. Os compostos **BM4** e **BM5** só foram produzidos nos experimentos em meio sólido, enquanto o dímero **BM7** só foi observado durante os cultivos líquidos. Todos esses derivados puderam ser isolados, identificados e avaliados quanto a sua citotoxicidade.

Os fungos *A.alliaceus*, *C.elegans* ATCC 9245 e 10028b foram capazes de promover uma desmetilação da estrutura da lausona metoxilada, produzindo a lausona. Essa hidroxinaftoquinona é bastante conhecida e estudada, mas ainda não foram encontrados na literatura relatos de formação desse composto a partir da lausona metoxilada (**Figura 74**).

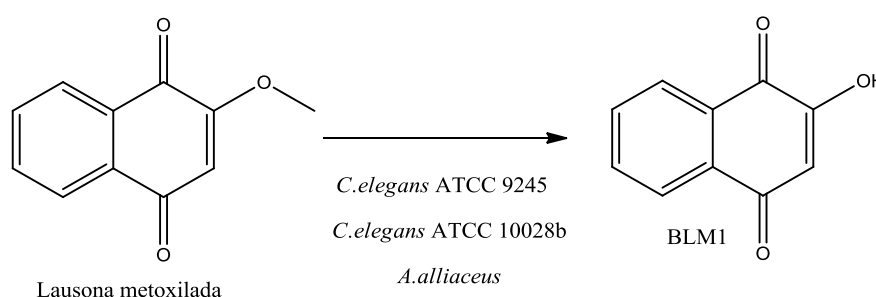


Figura 74. Biotransformação da lausona metoxilada por fungos

Uma das dificuldades mais comuns dos estudos de biotransformação se dá em relação ao rendimento apresentado pelos produtos produzidos, que por ser usualmente

muito baixo, torna muitas vezes inviável seu isolamento e avaliação de suas propriedades biológicas. Neste trabalho, foi possível obter os derivados das naftoquinona em quantidades suficiente para o isolamento e identificação estrutural desses derivados bem como para os ensaios de avaliação citotóxica dos derivados obtidos. Os rendimentos reacionais dos produtos de biotransformação estão apresentados na **Tabela 20**.

Tabela 20. Rendimento reacional dos produtos de biotransformação.

Produto	Micro-organismo	Rendimento Reacional (mg)
BM1	<i>C.elegans ATCC 10028B</i>	4,1
BM2	<i>C.elegans ATCC 10028B</i>	8,2
BM4	<i>E.coli (sólido)</i>	4,9
BM5	<i>E.coli (sólido)</i>	3,2
BM7	<i>E.coli (líquido)</i>	1
BLM1	<i>C.elegans ATCC 10028B</i>	9,1

4.11. Avaliação da citotoxicidade das naftoquinonas e metabólitos obtidos

Dentre todas as atividades biológicas apresentadas pelas quinonas, a atividade citotóxica é destacada pelo grande número de trabalhos reportados na literatura.

Neste sentido, no presente trabalho avaliou oito naftoquinonas utilizadas como material de partida para as reações de biotransformação, bem como de 6 derivados obtidos com o intuito de comparar a seletividade dos compostos em questão (**Figura 75**). A citotoxicidade induzida pelas naftoquinonas substituídas foi avaliada sobre linhagens celulares normais de adenocarcinoma mamário (MCF-7) e tumorais de

adenocarcinoma pulmonar (A549) e de tumor cervical (HeLa), bem como também em uma linhagem celular de fibroblastos humanos GM07402-A. O ensaio do MTT que se baseia na viabilidade mitocondrial (MOSMANN, 1983) foi o método utilizado. Os resultados obtidos estão apresentados na **Tabela 21**.

De um modo geral, pode-se afirmar que nenhum dos substratos apresentou elevada citotoxicidade se comparada aos valores apresentados pela doxorrubicina durante os ensaios. No entanto, através dos valores de CI_{50} obtidos pode-se verificar que pequenas variações no esqueleto de uma molécula podem significar alterações na atividade citotóxica apresentada. De modo geral os resultados variaram dependendo do tipo de quinona e da célula escolhida, o que dificulta a correlação entre a relação estrutura, atividade e/ou seletividade para esses compostos. Pode-se observar que não houve seletividade na atividade contra células normais e tumorais, sendo que essas quinonas parecem ser um pouco mais tóxicas para células normais do que para as células tumorais avaliadas. O lapachol, uma naftoquinona muito conhecida por sua atividade antitumoral, apresentou valores altos de IC_{50} para as células da linhagem normal de fibroblastos humanos GM074002-A e muito baixos para células de linhagens tumorais, como por exemplo a SKBR3 de origem de células tumorais mamárias, sendo portanto mais eficiente para essa finalidade (Silva, E.O., 2014).

A naftoquinona que apresentou nos ensaios realizados maior citotoxicidade foi o composto BM7, identificado como dímero da menadiona. Apesar de não possuírem valores de CI_{50} baixos, as naftoquinonas isoméricas 1,2- e 1,4-naftoquinona possuem diferenças marcantes para todos os tipos de células, sendo que, a *orto*-naftoquinona se mostrou mais citotóxica que seu isômero, *para*-quinona em todas as linhagens. Dentre os resultados obtidos para os metabólitos de biotransformação da menadiona, pode-se observar que os compostos que apresentaram redução das carbonilas, tiveram sua

citotoxicidade diminuída, e quando houve consecutiva redução da ligação dupla do núcleo quinonoide, esse efeito diminuiu ainda mais. Os derivados que apresentaram modificação na cadeia lateral da naftoquinona mantendo as carbonilas apresentaram citotoxicidade maior do que os demais.

De forma geral, a menadiona apresentou os menores valores de CI_{50} , exceto frente à linhagem HeLa, apresentando, portanto, maior citotoxicidade entre seus derivados. A biotransformação da naftoquinona lausona metoxilada forneceu um produto de desmetilação, a lausona. A análise da atividade citotóxica desses compostos mostrou que esse produto, é mais tóxico que a lausona metoxilada empregada como material de partida. No entanto, a 5-hidroxi-naftoquinona, também utilizada nas reações de biotransformação, apresenta valores de CI_{50} menores do que a lausona, evidenciando sua maior citotoxicidade.

Os efeitos citotóxicos de quinonas têm sido relacionados, por alguns estudos, a uma propriedade química intrínseca da unidade quinonoídica, associada a outros fatores estruturais, os quais são responsáveis pela intensidade da atividade antitumoral (Da Silva et al., 2003; Garuti, et al., 2004). Outros estudos têm relatado também que o efeito citotóxico apresentado por estes compostos depende diretamente da natureza dos substituintes associados ao grupo quinonoídico, uma vez que os mesmos podem interferir no equilíbrio do sistema quinoide afetando a ocorrência do ciclo redox e consequentemente, a produção de EROs (Garuti, et al., 2004; Benites et al., 2008a e b; Benites et al., 2009). Farias (2014) verificou que a toxicidade das 1,4-naftoquinonas substituídas é influenciada principalmente pelos substituintes ligados diretamente ao núcleo naftoquinona onde grupos doadores e aceptores de elétrons modulam as propriedades eletrônicas do átomo de nitrogênio presente nessas moléculas, facilitando ou dificultando a ocorrência do ciclo redox (Benites et al., 2009).

Ficou clara a importância da presença das carbonilas no núcleo quinonoide para que as naftoquinona possam exercer os efeitos citotóxicos.

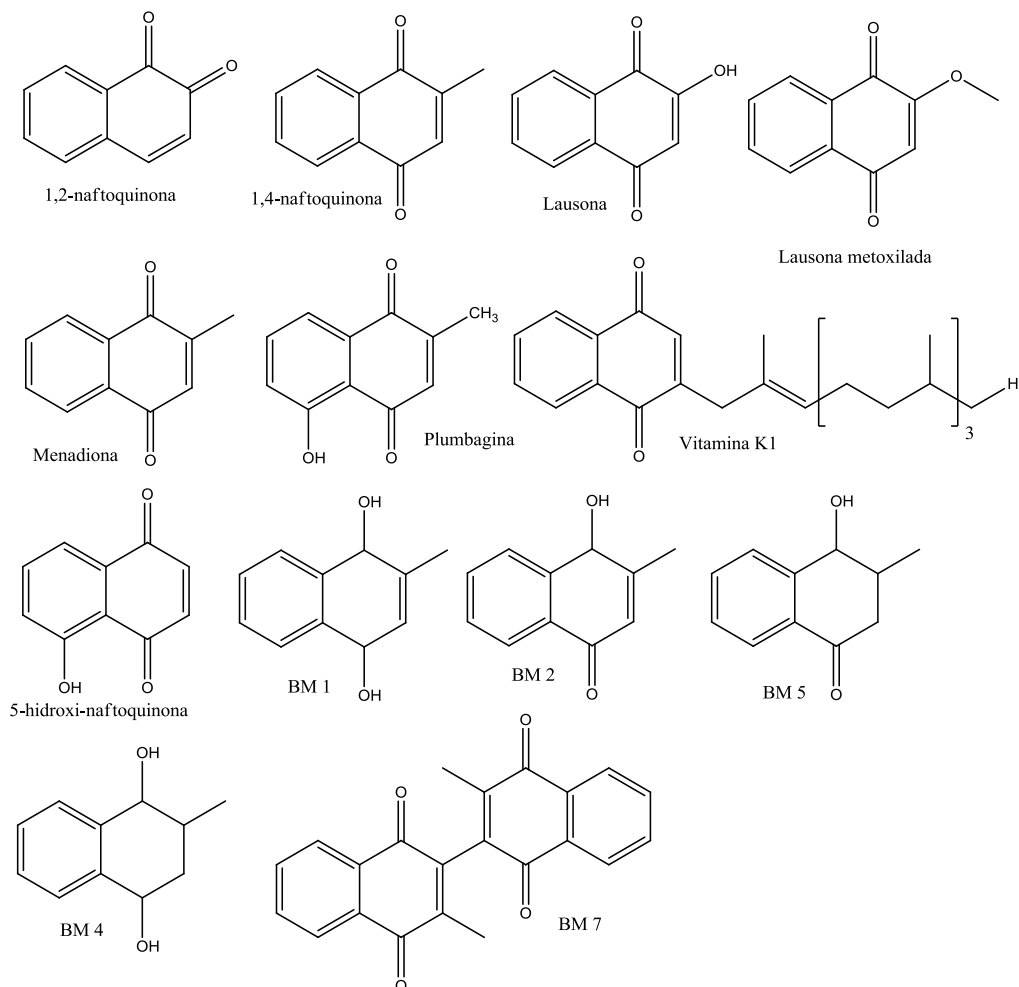


Figura 75. Estruturas químicas das naftoquinona avaliadas nos ensaios de citotoxicidade

Tabela 21 - Valores de CI_{50} (micromolar) obtidos para as naftoquinonas e seus produtos de biotransformação frente as linhagens celulares tumorais e normal.

LINHAGENS CELULARES				
Substância	GM07492-A	MCF-7	A549	HeLa
1,2-naftoquinona	1563±3,4	1977±2,2	>6329	1002±7,1
1,4-naftoquinona	4945±5,2	>6329	>6329	>6329
Vitamina K1	1043±4,0	>2222	>2222	>2222
Menadiona	804±2,8	1249±9,4	1670±7,1	1170±9,5
5-hidroxi-naftoquinona	675±5,3	1159±6,5	1789±5,2	670±8,2
Plumbagina	543±8,4	417±6,4	1009±3,4	225±2,9
Lausona metoxilada	2723±3,3	>5319	>5319	1659±4,6
BLM 1 (lausona)	1734±5,4	1088±7,0	>5747	833±5,3
BM1	2401±6,7	>5681	>5681	>5681
BM2	1820±4,3	1256±4,8	>5747	301±3,3
BM4	4412±2,9	>5617	>5617	1942±3,7
BM5	2327±3,5	>5681	>5681	>5681
BM7	363±5,3	295±2,0	846±3,7	752±4,9
Doxorrubicina	31,2	26,6	27,8	27,8

Conclusões

5. CONCLUSÕES

Pelos resultados obtidos com o presente projeto é possível concluir que

-O processo de partição líquido-líquido empregando acetato de etila foi eficiente para as extrações das naftoquinonas durante os experimentos de biotransformação.

- Com exceção da menadiona, da lausona metoxilada e da vitamina K1, as demais naftoquinonas envolvidas na proposta do projeto não apresentaram estabilidade nas condições experimentais empregadas para os estudos de biotransformação requeridas pelos micro-organismos estudados. Esse processo foi ainda mais crítico com relação aos experimentos utilizando bactérias, que requerem meios de cultura mais complexos para crescimento e os constituintes desses meios podem interferir no comportamento dessas moléculas dificultando e inviabilizando os estudos.

- A adição dos substratos na fase estacionária dos micro-organismos foi a melhor estratégia para as reações de biotransformação.

-Os fungos *C.elegans* ATCC 10028b , *A.alliaceus* e a bactéria *E.coli* foram capazes de biotransformar a menadiona, produzindo 6 produtos de biotransformação. Dentre as modificações realizadas, destacam-se as reduções e dimerizações. Vale ressaltar que os diferentes cultivos de *E.coli* resultaram na formação de diferentes produtos de biotransformação. As reações promovidas por essa bactéria são bastante relevantes considerando que esta bactéria está presente no intestino de todos os indivíduos.

- Os fungos *C.elegans* ATCC 10028b, ATCC 9245 e *A.alliaceus* realizaram a desmetilação da lausona metoxilada, formando a lausona, uma das naftoquinona de maior importância biológica.

- Mesmo com o aumento no tempo de incubação, nenhum dos micro-organismos utilizados foi capaz de metabolizar a Vitamina K1. Sugere-se que a cadeia carbônica

que este composto apresenta na sua cadeia lateral atue de forma a impossibilitar a ocorrência de biotransformação.

- Através dos ensaios realizados, pôde-se perceber pela análise dos valores de CI_{50} , que alterações pequenas no esqueleto dos substratos altera significativamente os resultados obtidos. As substâncias avaliadas pareceram ser relativamente mais tóxicas para a linhagem celular normal avaliada do que frente às linhagens tumorais. De todas as substâncias avaliadas e caracterizadas, a menadiona e a plumbagina apresentaram-se mais tóxica que as demais. No entanto, se compararmos os valores obtidos ao do controle positivo utilizado, pode-se afirmar que, de um modo geral, todas as substâncias avaliadas possuem atividade citotóxica baixa. Vale afirmar ainda, que foi possível observar a importância da manutenção das carbonilas do núcleo quinonóide para a atividade citotóxica apresentada pelas mesmas.

Referências Bibliográficas

6. Referências bibliográficas

- ABARCA, M. L.; ACCENSI, F.; CANO, J.; CABAÑES, F. J. Taxonomy and significance of black aspergilli. **Antonie van Leeuwenhoek, Dordrecht**, v. 86, n. 1, p. 33-49, 2004.
- ABOURASHED, E. A.; CLARK, A. M.; HUFFORD, C. D. Microbial models of mammalian metabolism of xenobiotics: An updated review. **Current Medicinal Chemistry**, v. 6, p. 359-374, 1999.
- ACTON, E. M.; TONG, G. L.; MASHER, C. W.; SMITH, T. H.; HENRY, D. W.; **Journal Medicinal Chemistry**, v. 22, p. 922, 1979.
- ADAMS, A.; DEMYTTENAERE, J. C. R.; KIMPE, N. D. Biotransformation of (R)-(+)- and (S)-(-)-limonene to terpineol by *Penicillium digitatum* - investigation of the culture conditions. **Food Chemistry**, v. 80, p. 525-534, 2003.
- AGUIRRE-PRANZONI, C.; ORDEN, A.A.; BISOGNO, F.R.; ARDANAZ, C.E.; TONN, C.E.; KURINA-SANZ, M. **Fungal Biology**, 2009.
- AL-ABOUDI, A.; MOHAMMAD, M. Y.; HADDAD, S.; AL-FAR, R.; CHOUDHARY, M. I.; ATTA-UR-RAHMAN. Biotransformation of methyl cholate by *Aspergillus niger*. **Steroids**, v. 74, p. 483–486, 2009.
- ALMEIDA, E. R.; SILVA-FILHO, A. A. A.; SANTOS, E. R.; LOPES, C. A. J. Antiinflammatory action of lapachol. **Ethnopharmacology**, v. 29, p. 239-242, 1990.
- AMAKI, K.; SAITO, E.; TANIGUCHI, K.; JOSHITA, K.; MURATA, M. Role of chlorogenic acid quinone and interaction of chlorogenic acid quinone and catechins in the enzymatic browning of apple. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v. 75, p. 829-832, 2011.
- ARAKAWA, N.S. Transformações microbianas e avaliação da citotoxicidade de lactonas sesquiterpênicas de *V.robusta* (Asteraceae). **Dissertação de mestrado**. Ribeirão Preto: USP, 2007.
- ARGABRIGHT, P. A.; RIDER, H. D.; HANNA, M. W. Hydrogenation Of 1,4-Naphthoquinone And 2-Methyl-1,4-Naphthoquinone With A Copper Chromite Catalyst. **Tetrahedron**, v. 21, p. 1931-1939, 1965
- ASHA S.; VIDYAVATHI M. *Cunninghamella* – A microbial model for drug metabolism studies – A review. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 16-29, 2009.
- ASCHE, C. Antitumour quinones. **Mini-Review Medicinal Chemistry**, v. 5, p. 449-452, 2005.

- AZUMA, S.; NISHIO, K.; KUBO, K.; SASAMORI, T.; TOKITOH, N.; KURAMOCHI, K.; KAZUNORI TSUBAK, K. Three Different Dimerizations of 2-Bromo-3-methyl-1, 4-naphthoquinones. **Journal of Organic Chemistry**, v. 77, p. 4812-4820, 2012.
- BACKHED, F.; DING, H.; WANG, T.; HOOPER, L. V.; KOH, G. Y.; NAGY, A. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. **Proceedings of the National Academy Science**, 2004; v. 101, p. 1571- 1578, 2004.
- BAMINGER, U.; NIDETZKY, B.; KULBE, K.D.; HALTRICH, D. A simple assay for measuring cellobiose dehydrogenase activity in the presence of laccase. **Journal of Microbiological Methods**, v. 35, p. 253-259, 1999.
- BARREIRO, E. J.; SILVA, J. F. M.; FRAGA, C. A. M. Noções básicas do metabolismo de fármacos. **Química Nova**, v. 19, p. 641-650, 1996.
- BASTOS, C. N. Produção de enzimas extracelulares por *Crinipellis perniciososa*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, p. 286-289, 2005.
- BEALL, H. D.; WINSKI, S.I. Mechanisms of action of quinone-containing alkylating agents. I: NQO1-directed drug development. **Frontiers in Bioscience**, v. 5, p. 639-648, 2000.
- BOLTON, J. L.; TRUSH, M. A.; PENNING, T. M.; DRYHURST, G.; MONKS, T. J. Role of quinones in toxicology. **Chemical Research in Toxicology**, v. 13, p. 136-160, 2000.
- BOOTH, S. L. Roles for Vitamin K Beyond Coagulation. **Annual Review of Nutrition**, v. 29, p. 5.1–5.22, 2009.
- BOYLAND, E.; MANSON, D. The reduction of p-quinones with lithium aluminium hydride. **Journal Chemical Society**, p. 1837-1840, 1951.
- BRAND, J. D.; FISHER, F. J. Reductive transformation of 10-deoxydaunomycinone. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 55, p. 2518-2530, 1990.
- CAPEL, C. S.; DE SOUZA, A. C. D.; CARVALHO, T. C.; DE SOUSA, J. P. B.; AMBROSIO, S. R.; MARTINS, C. H. G.; CUNHA, W. R.; GALÁN, R. H.; FURTADO, N. A. J. C. Biotransformation using *Mucor rouxii* for the production of oleanolic acid derivatives and their antimicrobial activity against oral pathogens. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 38, p. 1493. 2011.
- CARD, D. J.; GORSKA, R.; CUTLER, J.; HARRINGTON, D. J. Vitamin K metabolism: current knowledge and future. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 58, p. 1590-1600, 2014.

CHAUDHARY, A.; KHURANA, J. M. 2-Hydroxy-1,4-naphthoquinone: A versatile synthon in organic synthesis. **Current Organic Chemistry**, v. 20, p. 1314-1344, 2016.

CHEN, X.; YANG, L.; ZHANG, N.; TURPIN, J. A.; BUCKHEIT, R. W.; OSTERLING, C.; OPPENHEIM, J. J.; HOWARD, O. M. Shikonin, a component of Chinese herbal medicine, inhibits chemokine receptor function and suppresses human immunodeficiency virus type 1. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, p. 2810-2816, 2003.

CLSI. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. Approved standard CLSI document M11-A7. Clinical and Laboratory Standard Institute. Wayne. 2007.

CLSI. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. Approved standard CLSI document M38-A2. Clinical and Laboratory Standard Institute. Wayne. 2008.

COLLINS, D. O.; RUDDOCK, P. L. D.; GRASSE, J. C.; REYNOLDS, W. F.; REESE, P. B. Microbial transformation of cadina-4,10(15)-dien-3-one, aromadendr-1(10)-en-9-one and methyl ursolate by *Mucor plumbeus* ATCC 4740. **Phytochemistry**, v. 59, p. 479-488. 2002.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Plants as a source of anti-cancer agents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 22, p. 72-79, 2005.

CURRELI, S.; ROMERIO, F.; MIRANDOLA, P.; BARION, P.; BEMIS, K.; ZELLA, D. Human primary CD4 + T cells activated in the presence of IFN-alpha 2b express functional indoleamine 2,3-dioxygenase. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 21, p. 431-437, 2001.

DA SIVA JUNIOR, E. N.; DE SOUZA, M. C. B. V.; FERNANDES, M. C.; MENNA-BARRETO, R. F. S.; PINTO, M. C. F. R.; LOPES, F. A.; DE SIMONE, C. A.; ANDRADE, C. K. Z.; PINTO, A. V.; FERREIRA, V. F.; CASTRO, S. L. Synthesis and anti-trypanosoma cruzi activity of derivatives from nor-lapachones and lapachones. **Bioorganic Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 5030-5038, 2008.

DEMYTTENAERE, J. C. R.; HERRERA, C. M.; DE KIMPE, N. Biotransformation of geraniol, nerol and citral by sporulated surface cultures of *Aspergillus niger* and *Penicillium* sp. **Phytochemistry**, v. 55, p. 363-373, 2000.

DEMYTTENAERE, J. C. R.; DE POOTER, H. L. Biotransformation of citral and nerol by spores of *Penicillium digitatum*. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 13, p. 1029–1036, 1998.

ELAVARASAN, S.; GOPALAKRISHNAN, M. Synthesis, structural analysis, theoretical studies of some lawsone derivatives. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 133, p. 1-6, 2014.

EPIFANO, F.; GENOVESE, S.; FIORITO, S.; MATHIEU, V.; KISS, R. Lapachol and its congeners as anticancer agents: a review. **Phytochemistry Reviews**, v. 13 p. 37–49, 2014.

FERREIRA, S. B.; GONZAGA, D. T. G.; SANTOS, W. C.; ARAÚJO, K. G. L.; FERREIRA, V. F. β -Lapachona: Sua importância em química medicinal e modificações estruturais. **Revista Virtual de Química**, v. 2, p. 140-160, 2010.

FINKELSTEIN, D.B.; BALL, C. Biotechnology of filamentous fungi: technology and products. **Butterworth-Heinemann**, 2002.

FOSSE, C.; LE TEXIER, L.; ROY, S.; DELAFORGE, M.; GRÉGOIRE, S.; NEUWELS, M.; AZERAD, R. Parameters and mechanistic studies on the oxidative ring cleavage of synthetic heterocyclic naphthoquinones by *Streptomyces strains*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65, p. 446, 2004.

FREI, B.; WINTERHALTER, K. H.; RICHTER, C. Menadione- (2-Methyl- 1,4-naphthoquinone-) Dependent Enzymatic Redox Cycling and Calcium Release by Mitochondria. **Biochemistry**, v. 25, p. 4438-4443, 1986.

GARNIER, S.; WOLFENDER, J. L.; NIANGA, M.; STOECKLI-EVANS, H.; HOSTETTMANN, K. Antifungal and antibacterial naphthoquinones from *Newbouldia laevis* roots. **Phytochemistry**, v. 42, p. 13-15, 1996.

GEISER, D. M.; TIMBERLAKE, W. E.; Arnold, M. L. Loss of meiosis in *Aspergillus*. **Journal of Molecular Evolution**, v.13, p. 809-817, 1996.

GOKHALE, N.; PADHYE, S.; NEWTON, C; PRITCHARD, R. Hydroxynaphthoquinone metal complexes as antitumor agents x: synthesis, structure, spectroscopy and in vitro antitumor activity of 3-methyl-phenylazo lawsone derivatives and their metal complexes against human breast cancer cell line mcf-7. **Metal-Based Drugs**, v. 7, p. 121-128, 2000.

GOULART, M. O. F.; ZANI, C. L.; TONHOLO, J.; FREITAS, L. R.; DE ABREU, F.C.; OLIBEIRA, A.B.; RASLAN, D.S.; STARLING, S.; CHIARI, E. Trypanocidal activity and redox potential of heterocyclic – and 2-hydroxy-naphthoquinones. **Bioorganic Medicinal Chemistry Letters**, v. 7, p. 2043-2048, 1997.

Hanson, J. R. An introduction to biotransformations in organic chemistry. **Oxford**, W. H. Freeman Spektrum (1995).

HATANO, T.; VEBAYASHI, H.; ITO, H.; SHIOTA, S.; TSUCHIYA, T.; YOSHIDA, T.; Phenolic constituents of Cassia seeds and antibacterial effect of some naphthalenes and anthraquinones on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 47, p. 1121 -1127, 1999.

HELD, M; SCHMID, A; VAN BEILEN, J. B; WITHOLT, B. Biocatalysis. Biological systems for the production of chemicals. **Pure and Applied Chemistry**. Research triangle Park. v. 72, n. 7, p. 1337-1343, 2000

HENRY, D.W.; *ACS Symp. Ser. 30*; **American Chemical Society**: Washington D. C., p. 15, 1976.

HISA, T.; KIMURA, Y.; TAKADA, K.; SUZUKI, F.; TAKIGAWA, M. Shikonin, an ingredient of *Lithospermum Erythrorhizon*, inhibits angiogenesis *in vivo* and *in vitro*. **Anticancer Research**, v. 18, p. 783-790, 1998.

HOOG, G. S.; GUARRO, J.; GENE, J.; FIGUERAS, M. J. Atlas of clinical fungi. 2nd ed. (2000)

HUR, H. G.; LAY J.R.; BEGER, R. D.; FREEMAN, J. P.; RAFII, F. Isolation of human intestinal bacteria metabolizing the natural isoflavone glycosides daidzin and genistin. **Archives of Microbiology**, v. 174, p. 422-428, 2000.

ILETT, K. F.; TEE, L. B. G.; REEVES, P. T.; MINCHIN, R. F. Metabolism of drugs and other xenobiotics in the gut lumen and wall. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 46 p. 67-93, 1990.

JACKSON, M.; KARWOSWSKI, J.P.; HUMPHREY, P.E.; KOHL, W.L.; BARLOW, G.J.; TANAKA, S.K. Calbistrins, novel antifungal agents produced by *Penicillium restrictum*. **Journal of Antibiotics**. v. 46, p. 34-38, 1983.

KAPADIA, G. J.; AZUINE, M. A.; BALASUBRAMANIAN, V.; SRIDHAR, R. Aminonaphthoquinones--a novel class of compounds with potent antimalarial activity against *Plasmodium falciparum*. **Pharmacological Research**, v. 43, p. 363-367, 2001.

KHAN, M. R.; KIHARA, M.; OMOLOSO, A. D. Antimicrobial activity of *Cassia alata*. **Fitoterapia**, v, 72, p. 561-564, 2001.

LAMM, A. S.; CHEN, A. R. M.; REYNOLDS, W. F.; REESE, P. B.; Fungal hydroxylation of (-)santonin and its analogues. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 59, p. 292-296, 2009.

LERESCHE, J. E.; MEYER, H. P. Chemocatalysis and Biocatalysis (Biotransformation): Some Thoughts of a Chemist and of a Biotechnologist. **Organic Process Research Development**, v. 10, p. 572 – 580, 2006.

LIN, T. S.; ANTONINI, I.; COSBY, L. A.; SARTORELLI, A. C. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 27, p. 813, 2001.

MARTINEZ, M. J. A.; BENITO, P. B. Biological activity of quinones. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 30, p. 303- 366, 2005.

MEDINA, L.F.C.; STEFANI, V.; BRANDELLI, A. An unusual reduction on the quinonoid ring of 5-amino-8-hydroxy-1,4-naphthoquinone by *Staphylococcus aureus*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 42, p. 381–385, 2006.

MESEHY, M. R.; KADOTA, S.; TSUBOMO, K.; KUSAI, A.; HATTORI, M.; NAMBA, T. Shikometabolins A, B, C and D, novel dimeric naphthoquinone metabolites obtained from shikonin by human intestinal bacteria. **Tetrahedron Letters**, v. 35, p. 583-584, 1994.

MIYAZAWA, M., KASAHARA, H., KAMEOKA, H. Biotransformation of Lignans: A Specific Microbial Oxidation of (+)-eudesmin and (+)-magnolol by *Aspergillus niger*. **Phytochemistry**, v. 34, p. 1501-1507, 1993.

MOUNTZOURIS, K. C.; KOTZAMPASSI, K.; TSIRTSIKOS, P.; KAPOUTZIS, K.; FEGEROS, K. Effects of *Lactobacillus acidophilus* on gut microflora metabolic biomarkers in fed and fasted rats. **Clinical Nutrition**, v. 28, p. 318-324, 2009.

O'BRIEN, P. J. Molecular mechanisms of quinone cytotoxicity. **Chemical-Biological Interactions**, v. 80, p. 1-14, 1991.

OGATA, T.; YOSHIDA, T.; SHIMIZU, M.; TANAKA, M.; FUKUHARA, C.; ISHII, J.; NISHIUCHI, A.; INAMOTO, K.; KIMACHI, T. Unusual, chemoselective etherification of 2-hydroxy-1,4- naphthoquinone derivatives utilizing alkoxymethyl chlorides: scope, mechanism and application to the synthesis of biologically active natural product (±)-lantalucratin C. **Tetrahedron**, v. 72, p. 1423-1432, 2016.

OHARA, K.; HASHIMOTO, Y.; HAMADA, C.; NAGAOKA, S-I. Time-resolved EPR investigation on the photoreactions of vitamin K with antioxidant vitamins in micelle systems. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry** v. 200, p. 239–245, 2008.

OLIVEIRA, R. B.; ALVES, R. J. Bioreductive antineoplastic agents: a new approach to the treatment of solid tumors. **Quimica Nova**, v. 25, p. 976-984, 2002.

OTTEN, S. L.; ROSAZZA, J. P. Microbial transformations of natural antitumor agentes: oxidation of lapachol by *Penicillium notatum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 35, p. 554-557, 1978.

OTTEN, S. L.; ROSAZZA, J. P. Microbial transformation of natural antitumor agents: conversion of lapachol to dehydro- α -lapachone by *Curvularia lunata*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 38, p. 311-313, 1979.

OTTEN, S. L.; ROSAZZA, J. P. Microbial transformations of natural antitumor agents: conversions of lapachol by *Cunninghamella echinulate*. **Journal of Natural Products**, v. 44, p. 562-568, 1981.

PALUDO, C. R. Biotransformação da β -lapachona utilizando culturas microbianas: uma alternativa para estudos de metabolismo *in vitro*. **Dissertação de Mestrado**, FCFRP-USP, 2013.

PALUDO, CAMILA R.; DA SILVA-JUNIOR, EDUARDO A.; SANTOS, RAQUEL A.; PUPO, MONICA T.; EMERY, FLAVIO S.; FURTADO, NIEGE A. J. C.. Microbial transformation of beta-lapachone to its glycosides by *Cunninghamella elegans* ATCC 10028b. **Phytochemistry Letters**, v. 6, n. 4, p. 657-661, 2013.

PAVIA, D.L., LAMPMAN, G.M., KRIZ, G.S., VYVYAN, J.R., Introdução à Espectroscopia, Cengage Learning, 2010.

PICARD, C.; FIORAMONTI, J.; FRANCOIS, A.; ROBINSON, T.; NEANT, F.; MATUCHANSKY, C. *Bifidobacteria* as probiotic agents - physiological effects and clinical benefits. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 22, p. 495- 512, 2005.

PINTO, C. N.; DANTAS, A. P.; DE MOURA, K. C. G.; EMERY, F. S.; POLEQUEVITCH, P. F.; PINTO, M. D.; DE CASTRO, S. L.; PINTO, A.V. Chemical reactivity studies with naphthoquinones from *Tabebuia* with anti-trypanosomal efficacy. **Arzneimittelforsch**, v. 50, p. 1120-1128, 2000.

PINTO, A.V., CASTRO, S.L. The trypanocidal activity of naphthoquinones: A review. **Molecules**, v.14, p.4570-4590, 2009.

SGORBATI, b.; BIAVATI, B.; PALENZONA, D. The genus *Bifidobacterium*. In WOOD, B. J. B.; HOLZAPFEL, W. H. The lactic Acid bacteria. V. 2. The genera of lactic acid bacteria, cap. 8, p. 279-306, **Blackie Academic**, Londres, 1995.

SALMON-CHEMIN, L.; BUISINE, E.; YARDLEY, V.; KOHLER, S.; DEBREU, M.-A.; LANDRY, V.; SERGHERAERT, C.; CROFT, S. L.; KRAUTH-SIEGEL, R. L.;

DAVIOUD-CHARVET, E. 2- and 3-Substituted 1,4-Naphthoquinone Derivatives as Subversive Substrates of Trypanothione Reductase and Lipoamide Dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*: Synthesis and Correlation between Redox Cycling Activities and *in vitro* Cytotoxicity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, p. 548, 2001.

SEVERIANO, M. E.; SIMÃO, M. R.; PORTO, T. S.; MARTINS, C. H. G.; VENEZIANI, R. C. S.; FURTADO, N. A. J. C.; ARAKAWA, N. S.; SAID, S.; DE OLIVEIRA, D. C. R.; CUNHA, W. R.; GREGÓRIO, L. E.; AMBRÓSIO, S.R. Anticariogenic properties of *ent*-pimarane diterpenes obtained by microbial transformation. **Molecules**, 15, 8553-8566, 2010.

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

SILVA, M. N.; FERREIRA, V. F.; SOUZA, M. C. B. V. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na beta-lapachona e derivados. **Química Nova**, v. 26, p. 407-416, 2003.

SILVA, E. O.; CARVALHO, T. C.; PARSHIKOV, I. A.; SANTOS, R. A.; EMERY, F. S.; FURTADO, N. A. J. C. F. Citotoxicity of lapachol metabolites produced by probiotics. **Letter in applied microbiology**. v. 59, p. 108-114, 2014.

SILVA, E.O. Estudos sobre o metabolismo microbiano de naftoquinonas e avaliação da citotoxicidade dos metabólitos obtidos. **Tese de Doutorado**, FCFRP-USP, 2014.

SIMÕES, C. M. O. Farmacognosia da planta ao medicamento. 6 Ed, Porto Alegre/ Florianópolis: UFRGS/ UFSC (2004).

SOLOMONS, T. W. GRAHAM; FRYHLE, CRAIG B. **Química Orgânica**, vol. 1 e 2. 9 ed. LTC, 2009.

SOUSA, T.; PATERSONB, R.; MOOREB, V.; CARLSSONC, A.; ABRAHAMSSOND, B.; BASIT, A. W. The gastrointestinal microbiota as a site for the biotransformation of drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 363, p. 1-25 2008.

SRISILAM, K. & VEERESHAM, C. Biotransformation of drugs by microbial cultures for predicting mammalian drug metabolism. **Biotechnology Advances**, v. 21, p. 3-39 2003.

STRAATHOF, A. J. J.; PANKE, S.; SCHIMID, A. The Production of Fine Chemical by Biotransformation. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 548-556, 2002.

ST-GERMAIN, G.; SUMMERBELL, R. Identifying filamentous fungi—a clinical laboratory handbook. 1st ed. Belmont, California: Star Publishing Company 1996.

THOMSON, R. H. In Naturally Occurring Quinones; **Academic Press**: New York, 1971.

THOMPSON, R. H. In Naturally Occuring Quinones IV: **Recent Advances**; Chapman & Hall: London, 1997.

VALENTE, C.; MOREIRA, R.; GUEDES, R. C.; ILEY, J.; JAFFARC, M.; DOUGLAS, K. T. The 1,4-naphthoquinone scaffold in the design of cysteine protease inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry** v. 15, p. 5340–5350, 2007.

VAUGHAN, E. E.; MOLLET, B.; DEVOS, W. M. Functionality of probiotics and intestinal lactobacilli: light in the intestinal tract tunnel. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 10, p. 505-510, 1999.

WEI, B.L.; WU, S.H.; CHUNG, M.I.; WON, S.J.; LIN, C.N. Synthesis and cytotoxic effect of 1,3-dihydroxy-9,10-anthraquinone derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 35, p. 1089-1098, 2006.

Werbinl, H.; Stromlb, E. T. Photochemistry of Electron-Transport Quinones. I. Model Studies with 2-Methyl- 1,4-naphthoquinone (Vitamin K₃). **Journal American Chemical Society**, v. 90, p. 7296-7301, 1968.

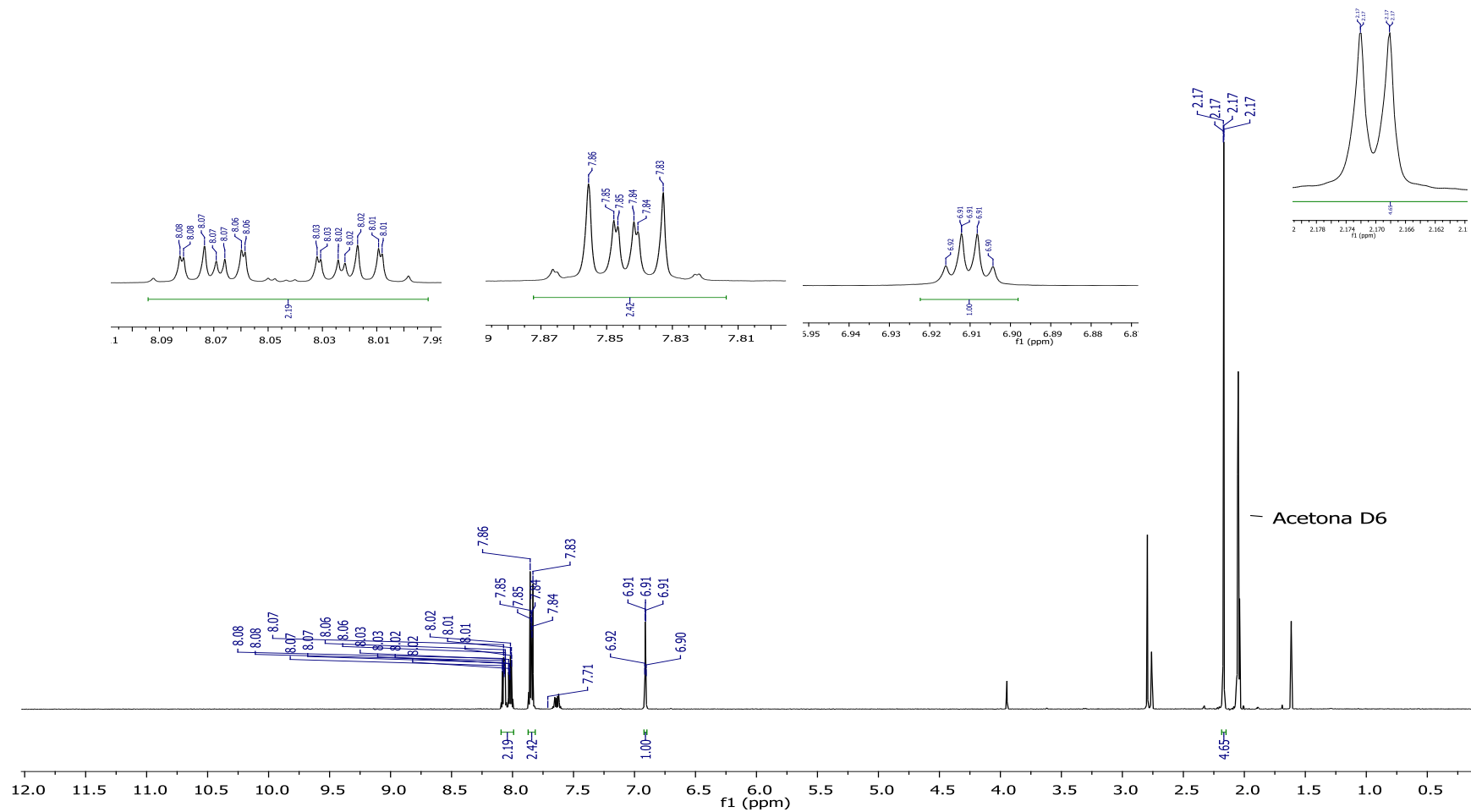
YEN, G.C; DUH, P.D.; CHUANG, D.Y. Antioxidant activity of anthraquinones and anthrone. **Food Chemistry**, v. 70, p. 437-441, 2000.

YANG, X.; SUMMERHUST, D.K.; KOVAL, S.F.; FICKER, C; SMITH, M.L.; BEMARDS, M.A. Isolation of an antimicrobial compound from *Impatiens balsamina* L. using bioassay-guided fractionation. **Phytotherapy Research**, v.15, p. 676-680, 2005.

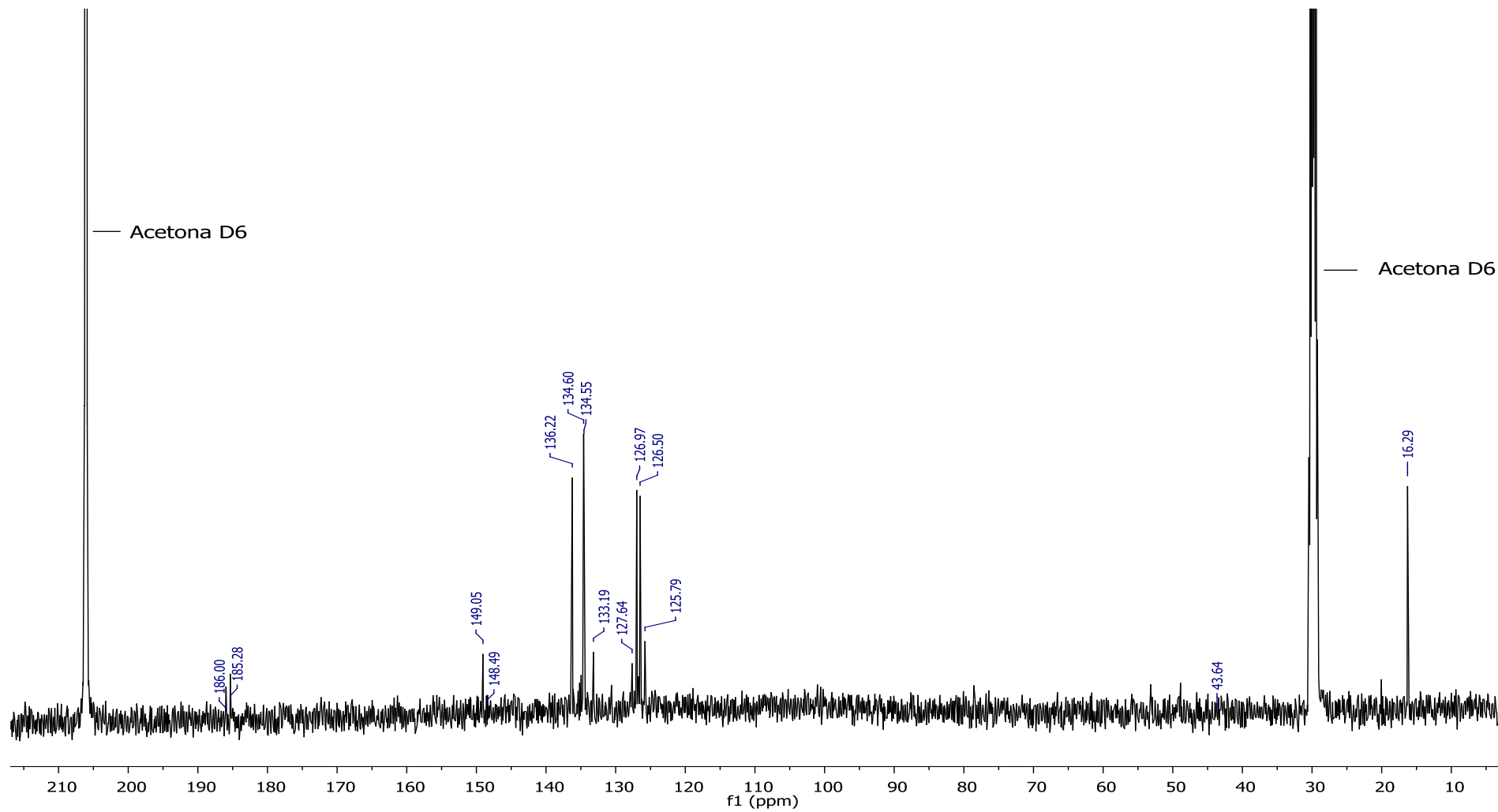
ZHANG, D.; YANG, Y.; LEAKEY, J.E.; CERNIGLIA, C.E. Phase I and phase II enzymes produced by *Cunninghamella elegans* for the metabolism of xenobiotics. **Microbiology Letters**, v. 6, p. 138:221, 2006.

Zielenkiewicz, W.; Terekhova, I. V.; Koz'biał, M.; Poznanski, J.; Kumeev, R. S. Inclusion of menadione with cyclodextrins studied by calorimetry and spectroscopic methods. **Journal of Physical Organic Chemistry**, v. 20, p. 656-661, 2007.

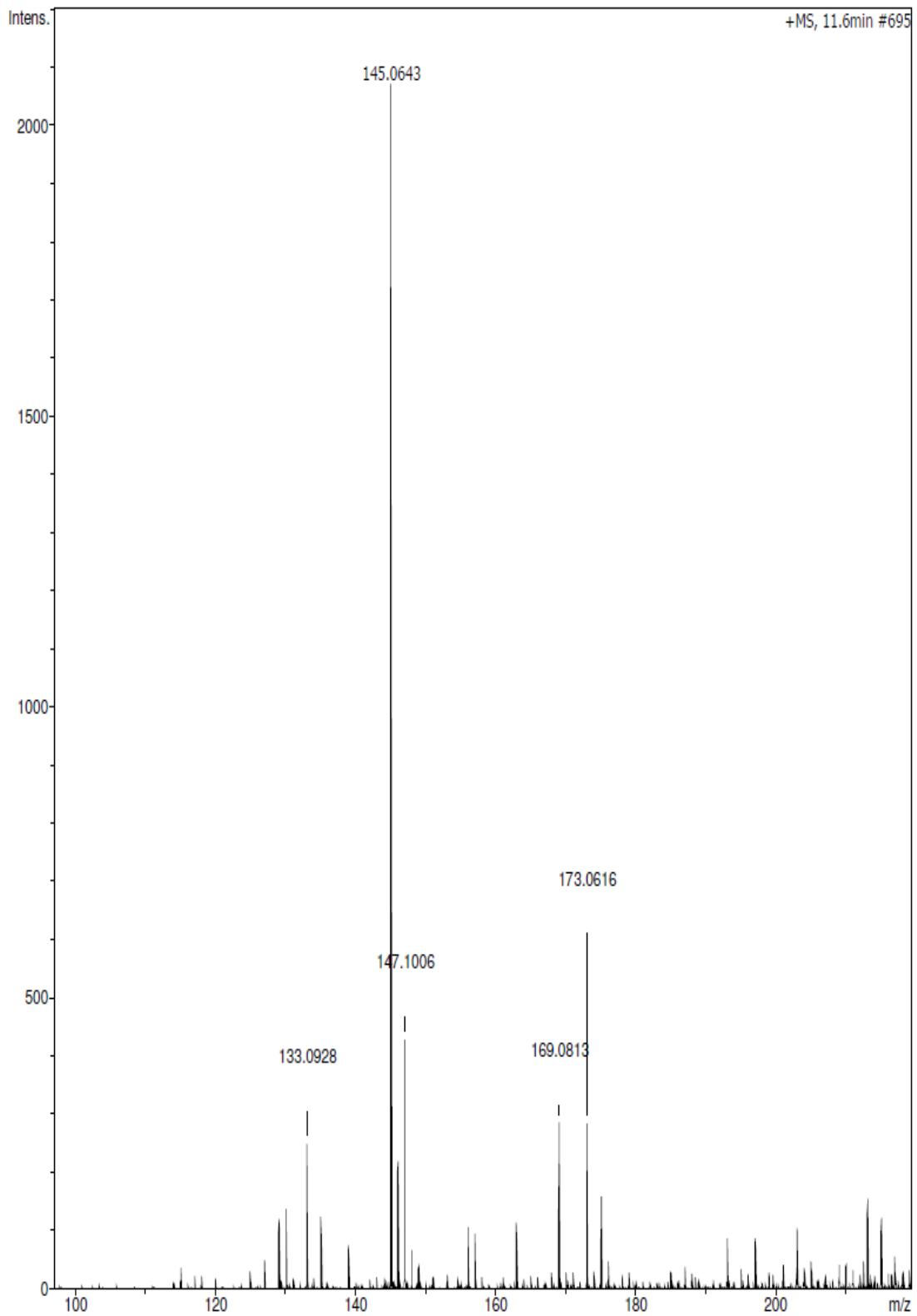
Apêndices



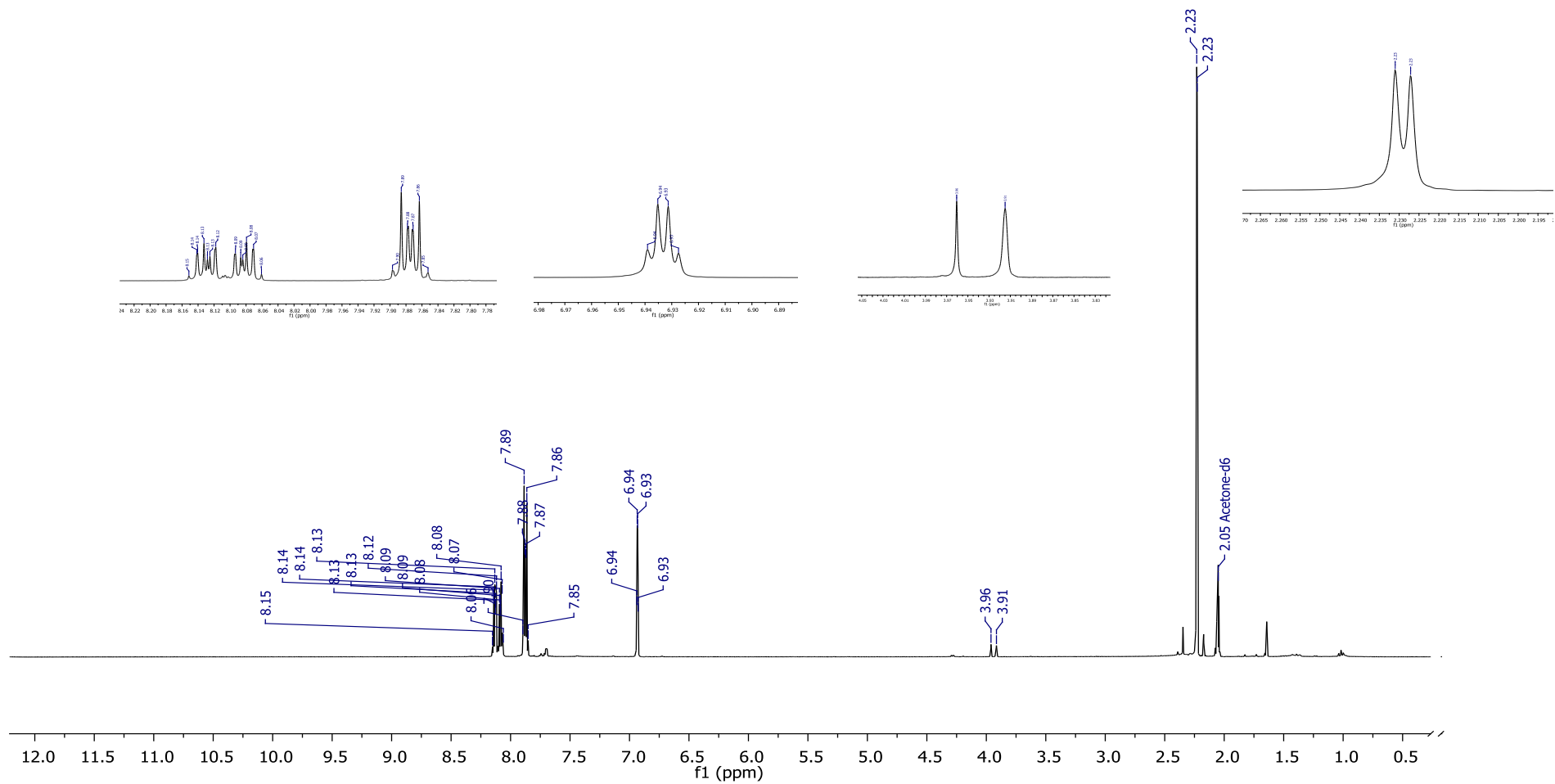
Apêndice 1: Espectro de ^1H da menadiona



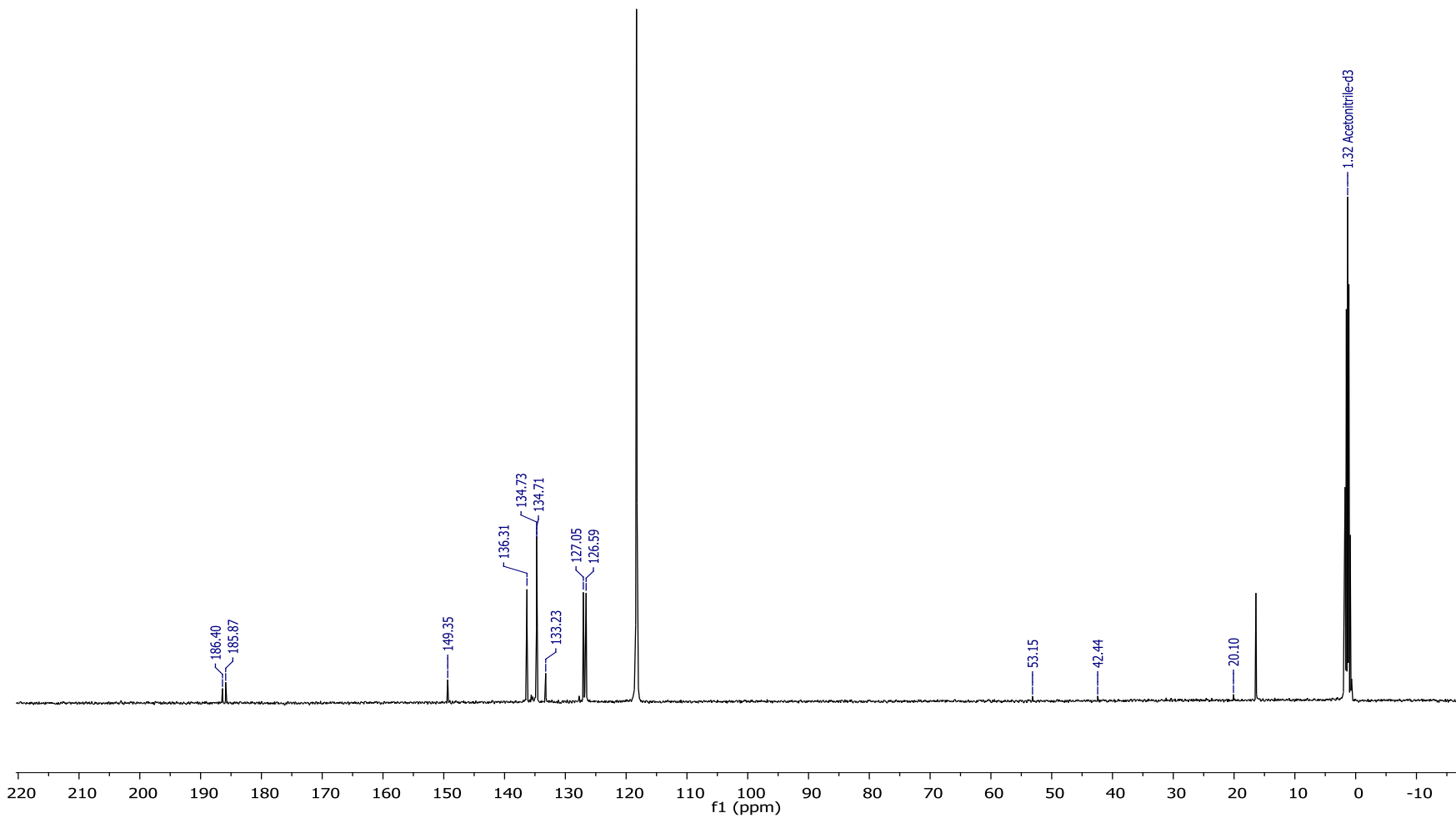
Apêndice 2: Espectro de ^{13}C da menadiona



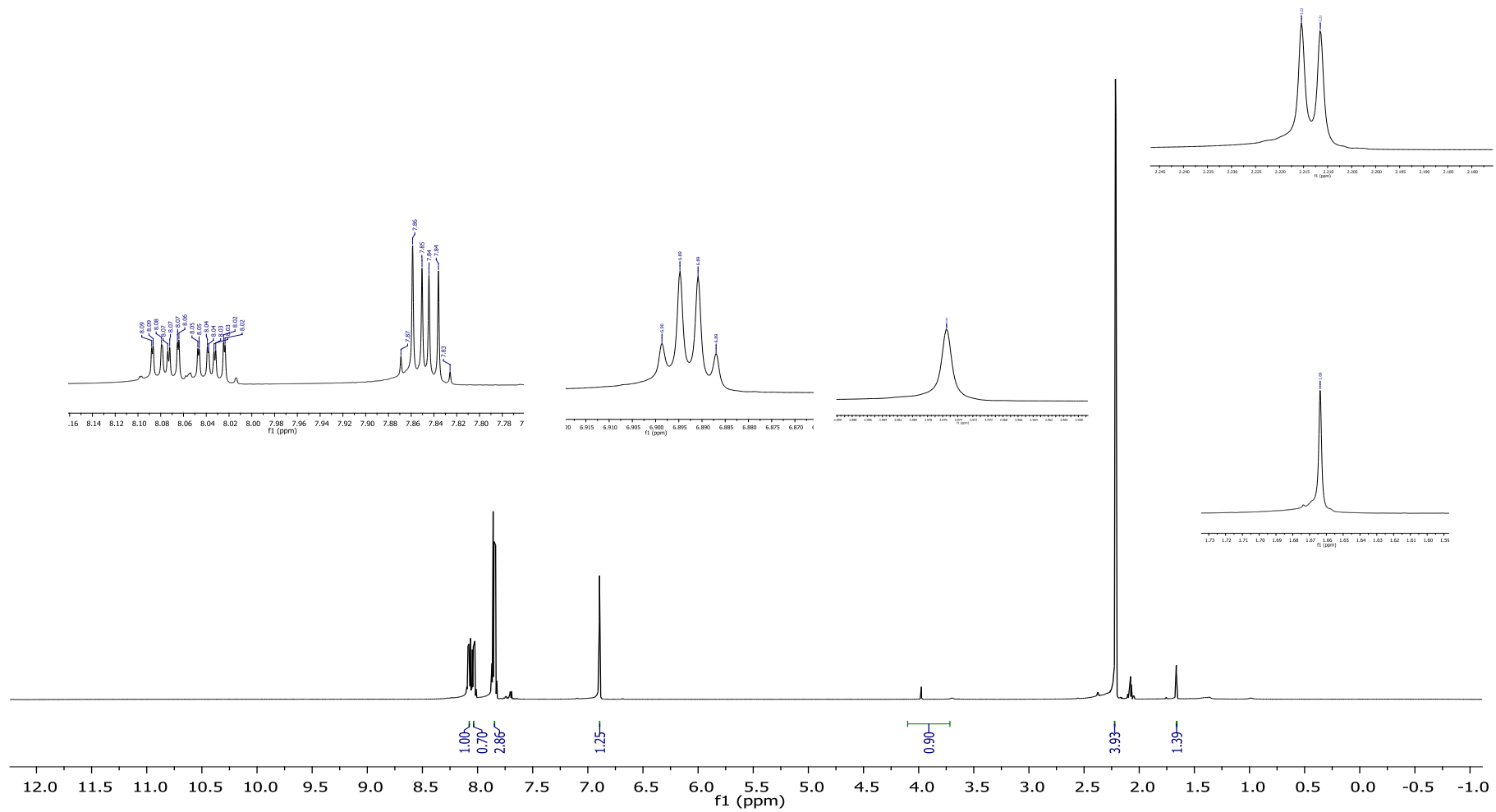
Apêndice 3. Espectro de massas e alta resolução da menadiona (ESI-TOF)



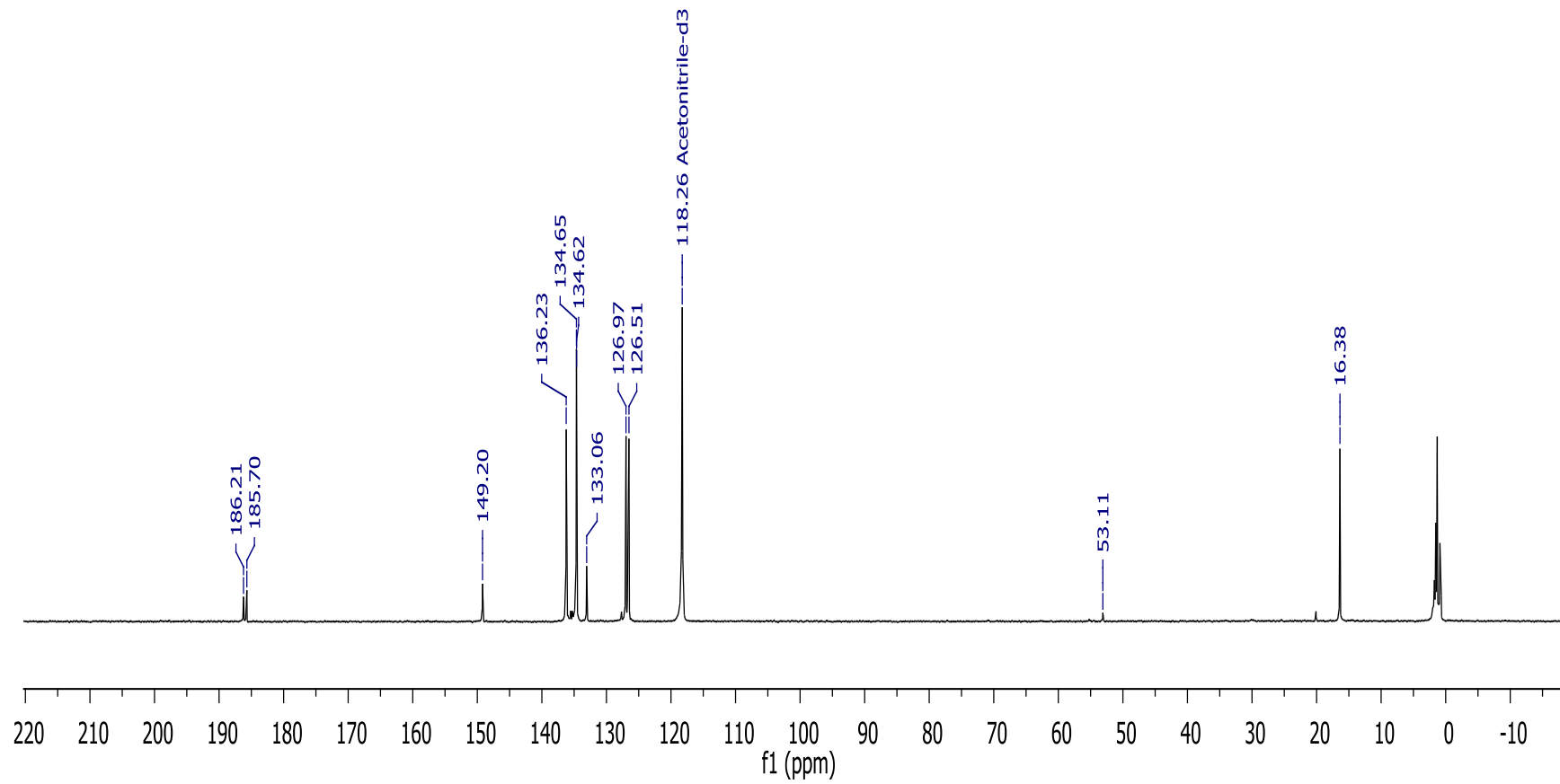
Apêndice 4. Espectro de RMN de ^1H do metabólito **BM1**



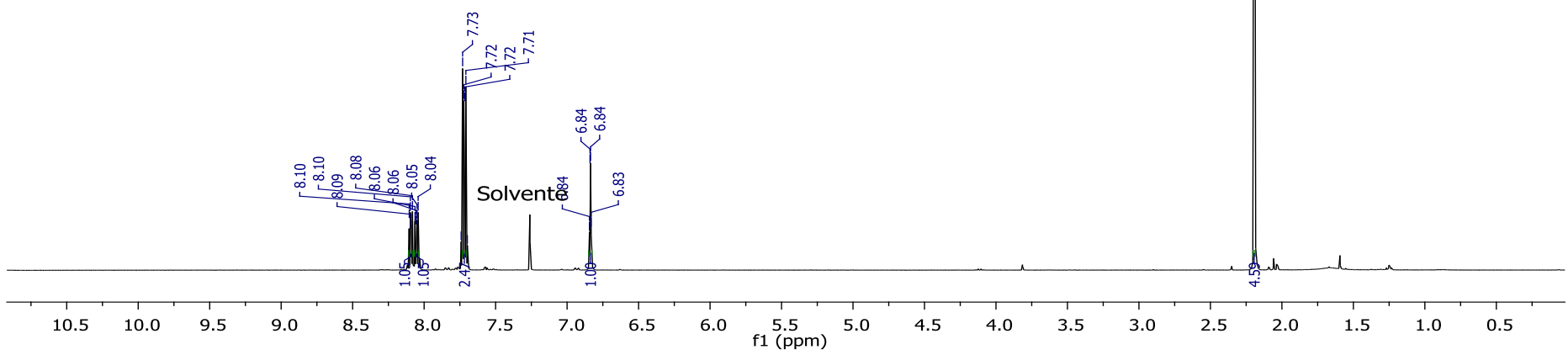
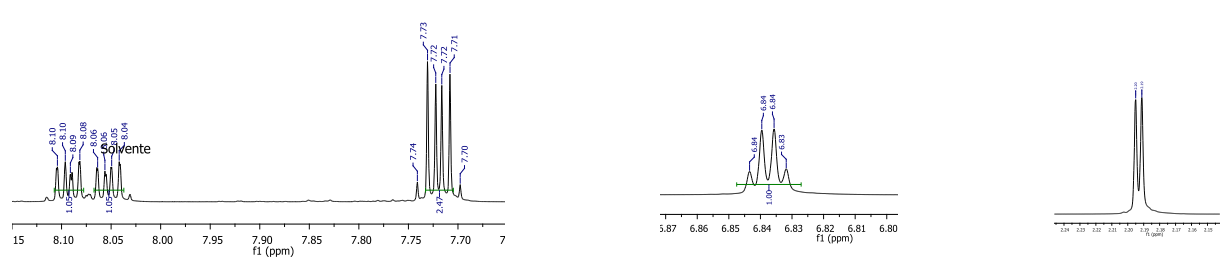
Apêndice 5. Espectro de RMN de ^{13}C do metabólito **BM1**



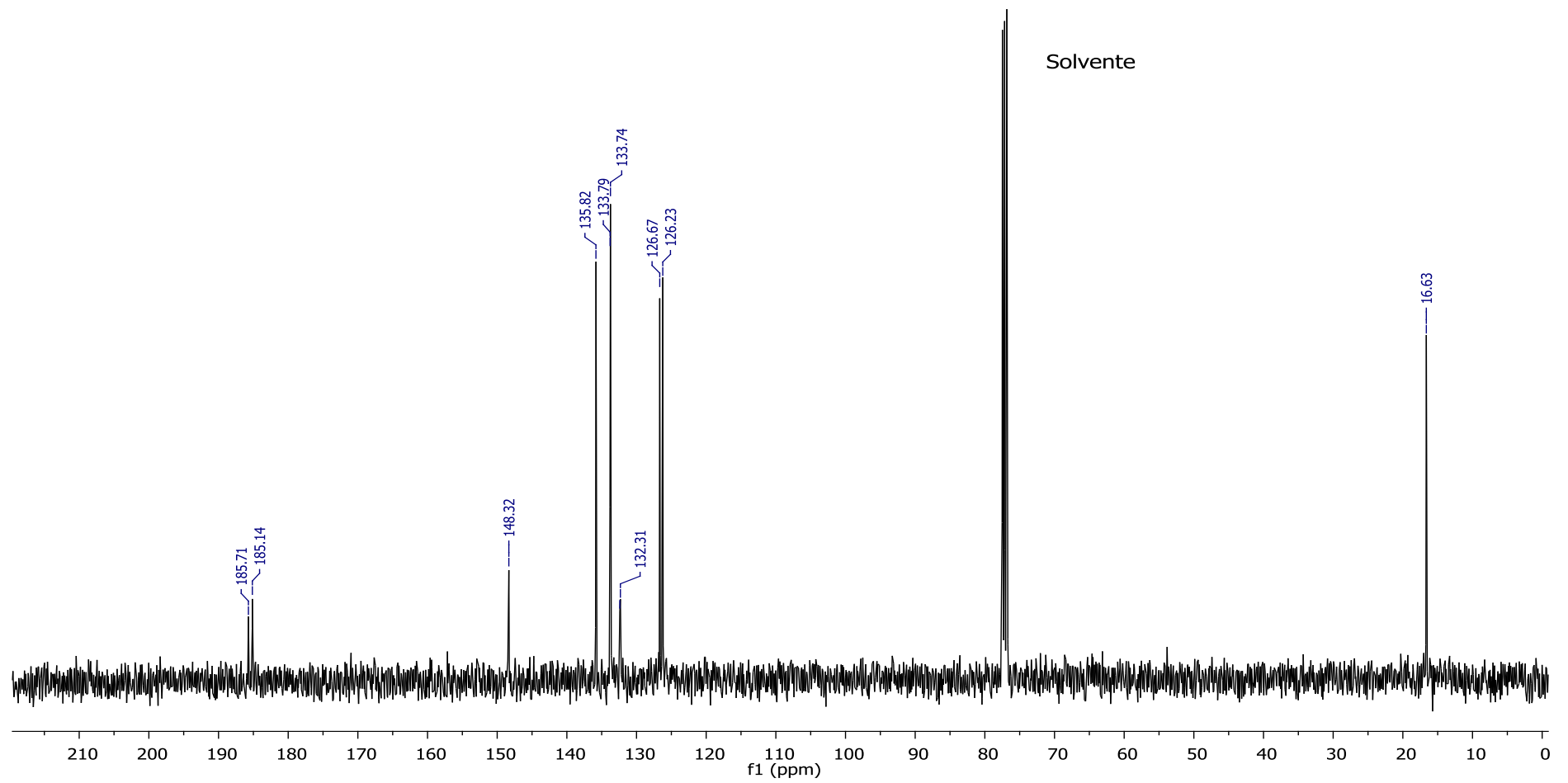
Apêndice 6. Espectro de RMN de ^1H do metabólito **BM2**



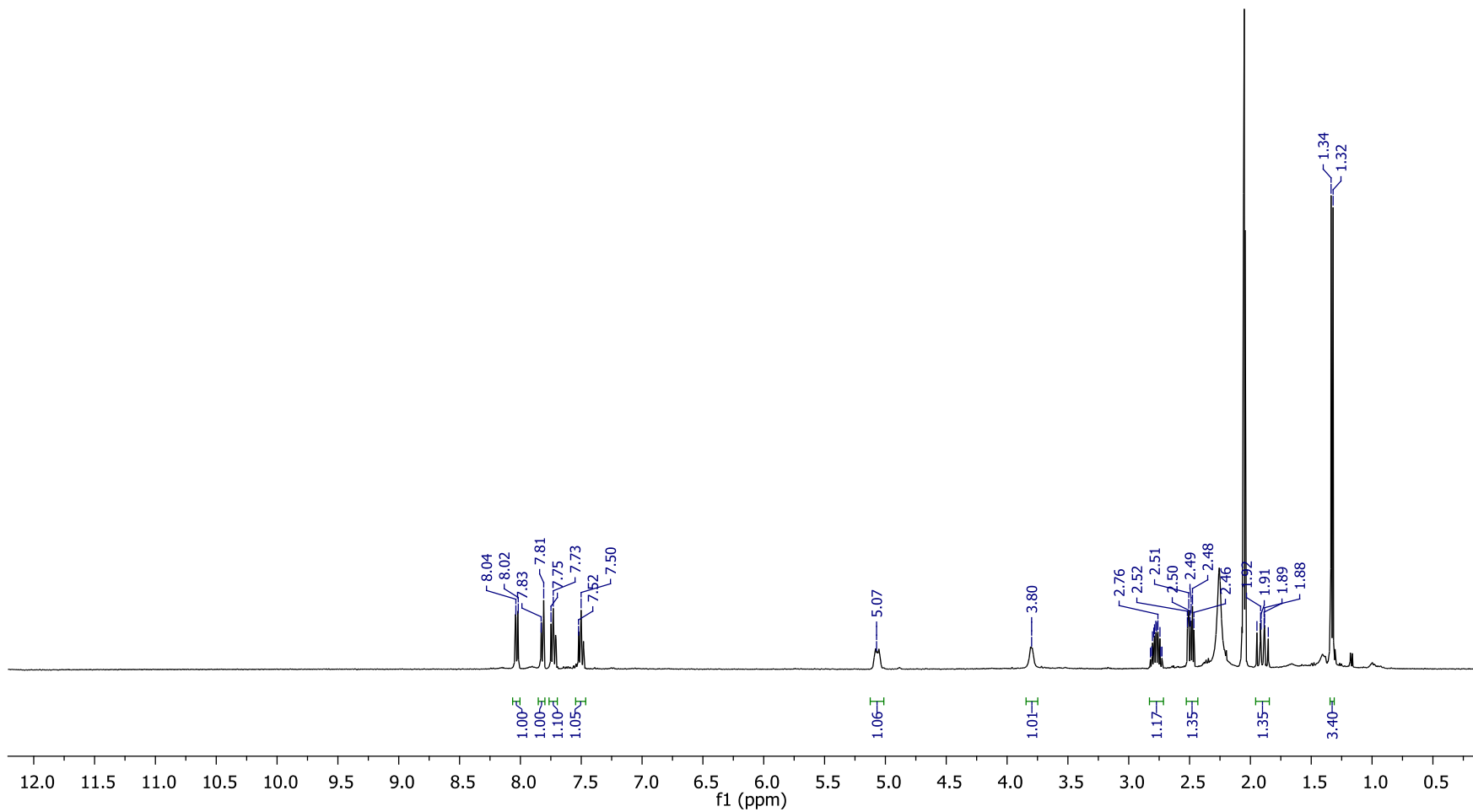
Apêndice 7. Espectro de RMN de ^{13}C do metabólito **BM2**



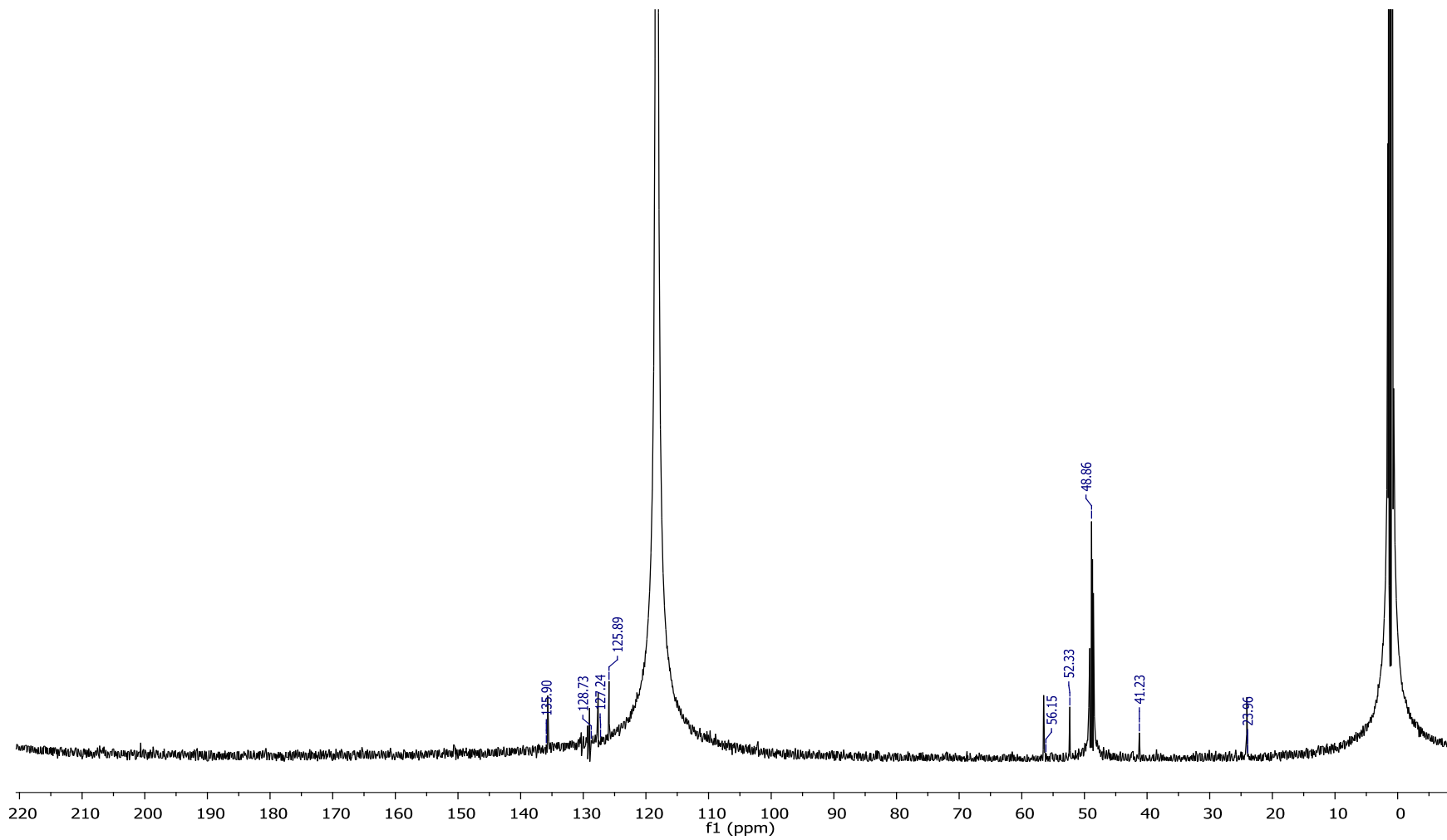
Apêndice 8. Espectro de RMN de ^1H do metabólito **BM3**



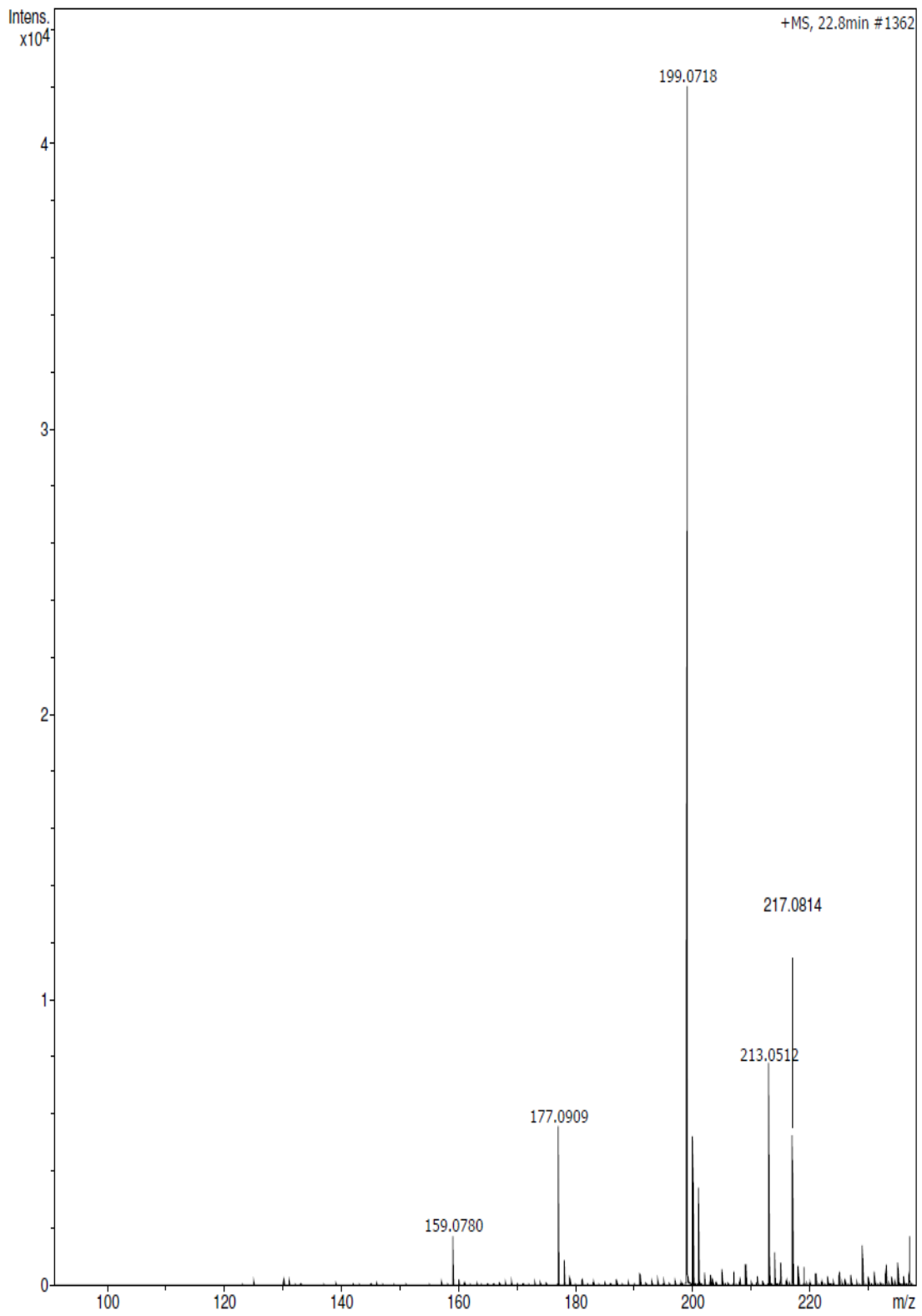
Apêndice 9. Espectro de RMN de ^{13}C do metabólito **BM3**



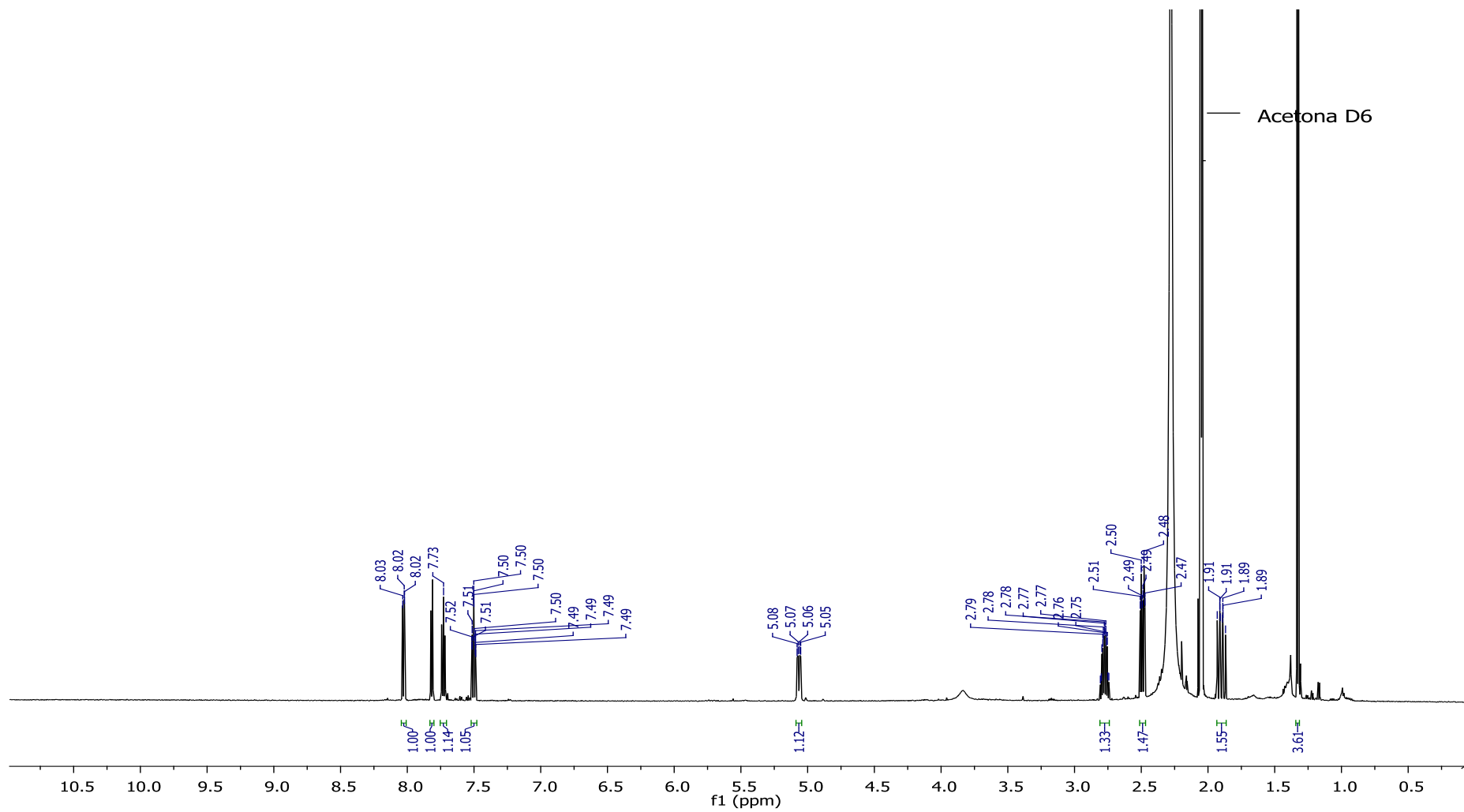
Apêndice 10. Espectro de RMN de ^1H do metabólito **BM4**



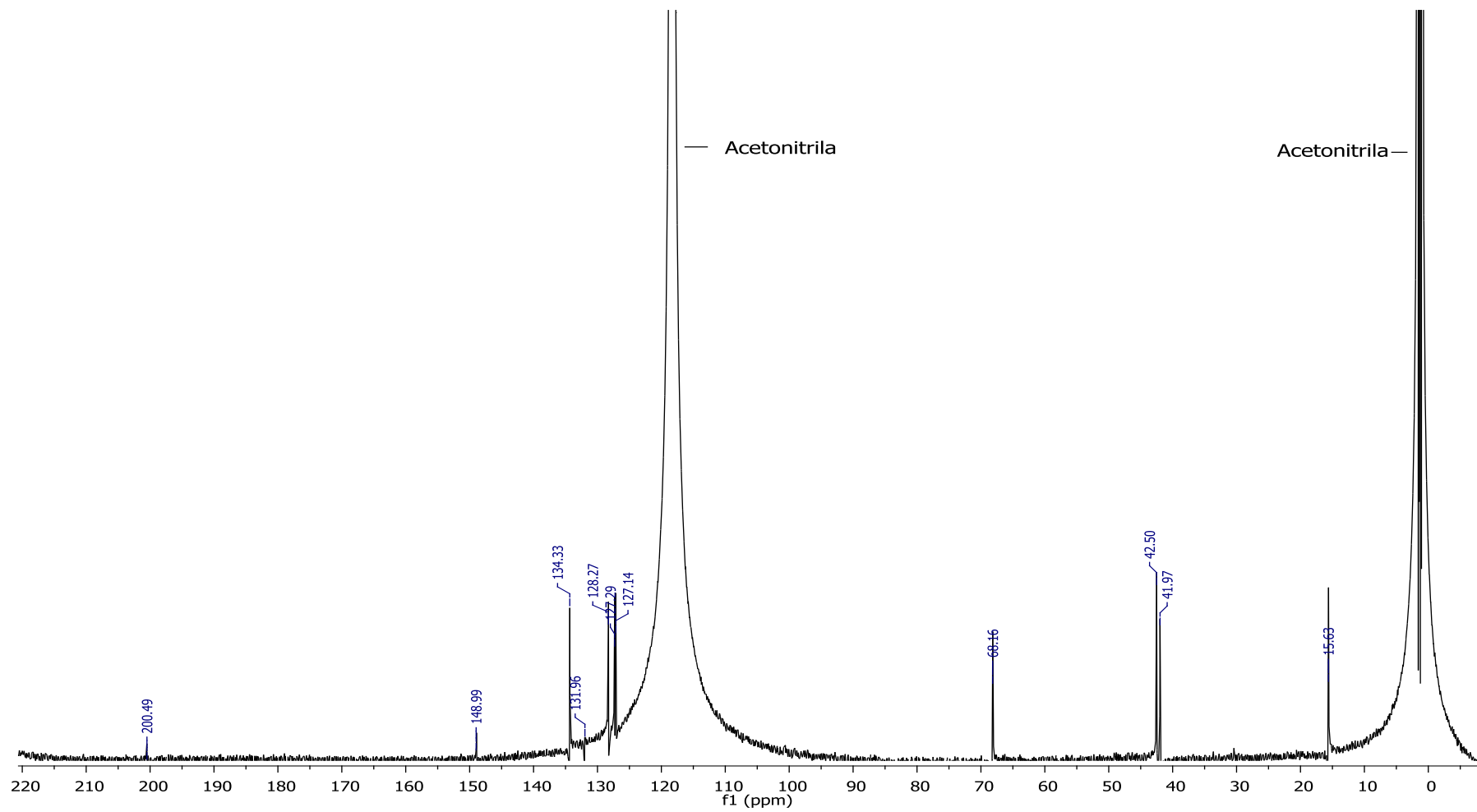
Apêndice 11. Espectro de RMN de ^{13}C do metabólito **BM4**



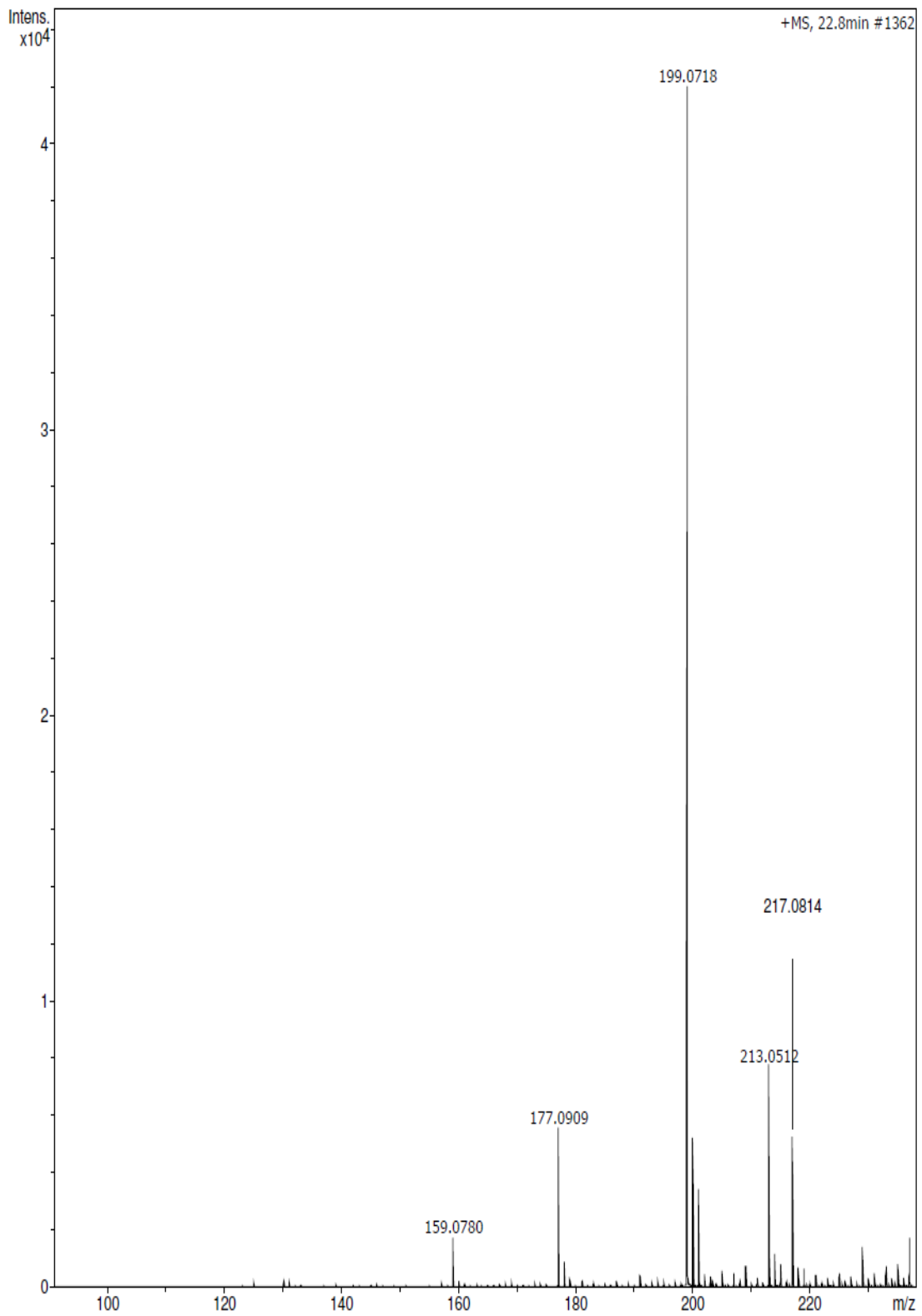
Apêndice 12. Espectro de massas em alta resolução da amostra **BM4**



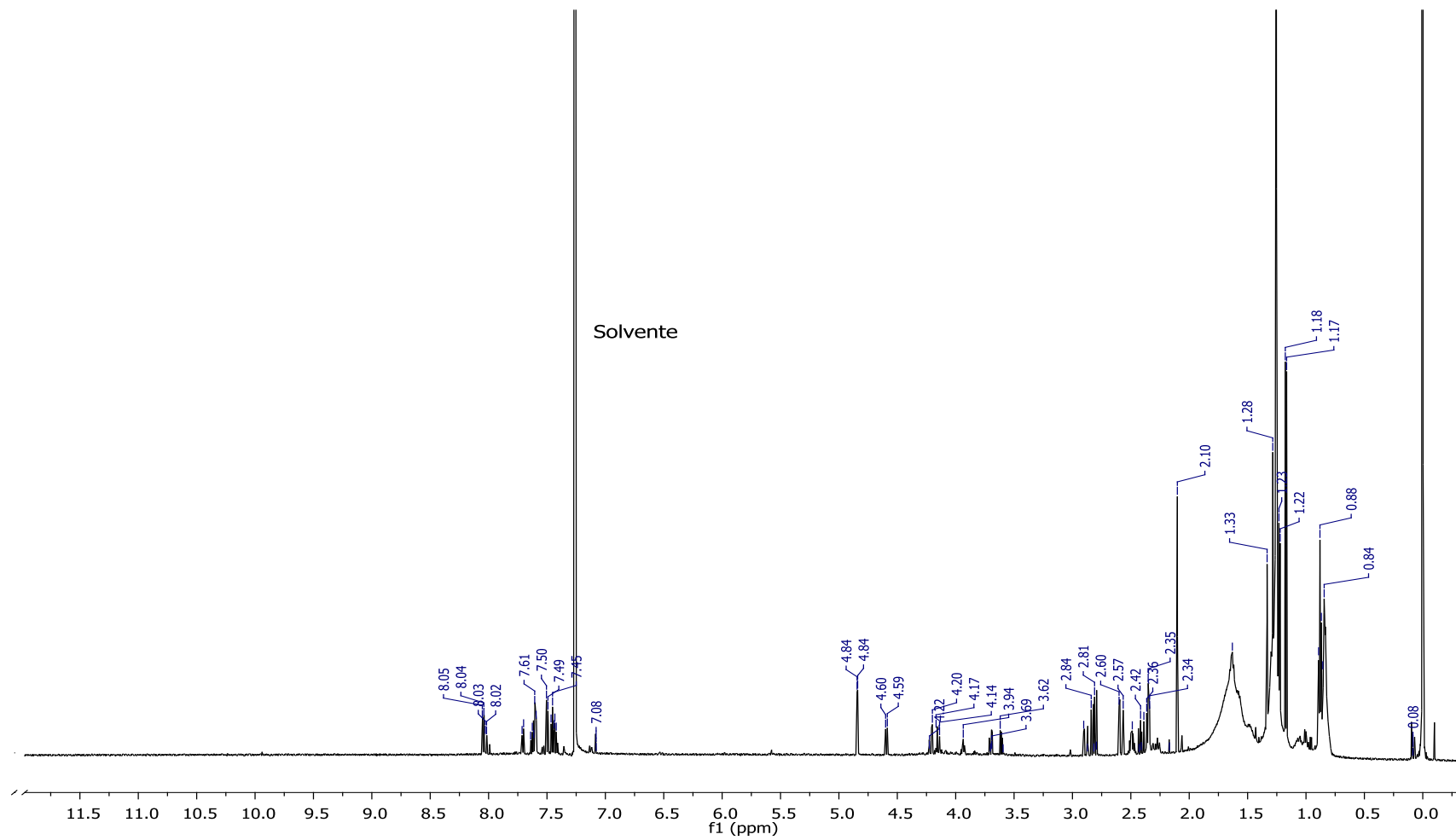
Apêndice 13. Espectro de RMN de ^1H do metabólito **BM5**



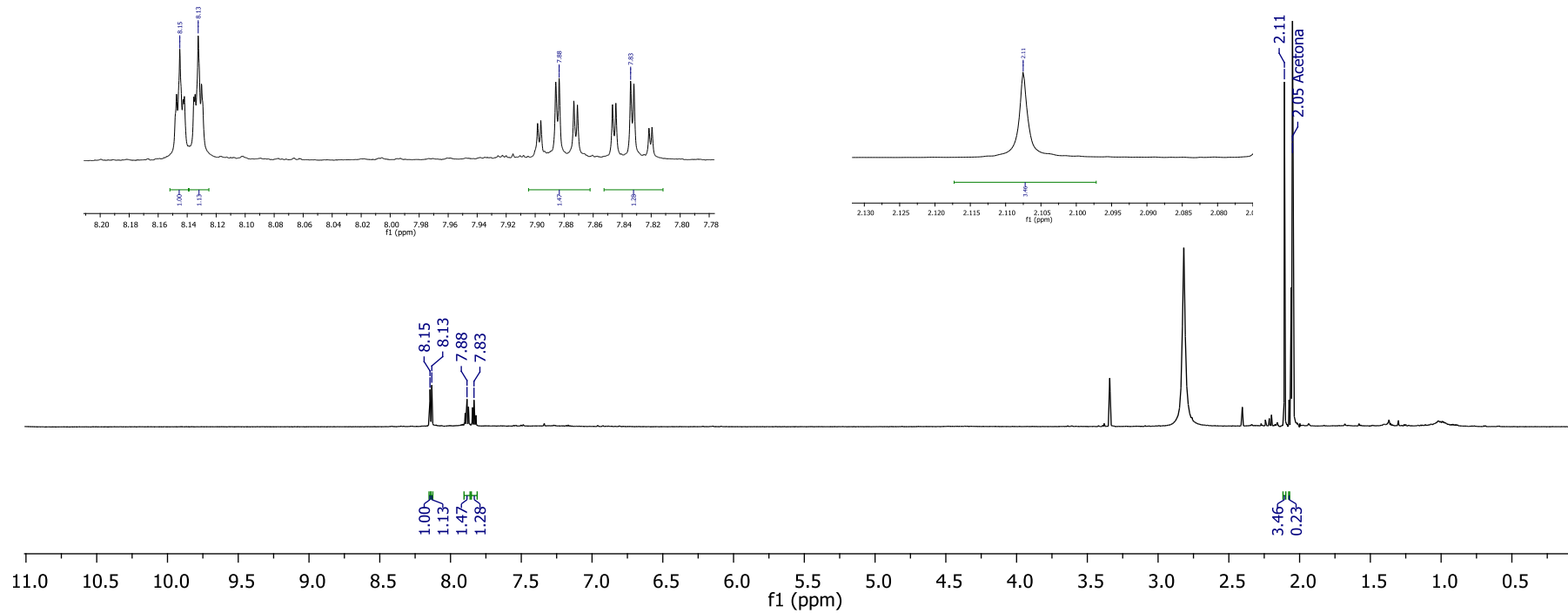
Apêndice 14. Espectro de RMN de ^{13}C do metabólito **BM5**



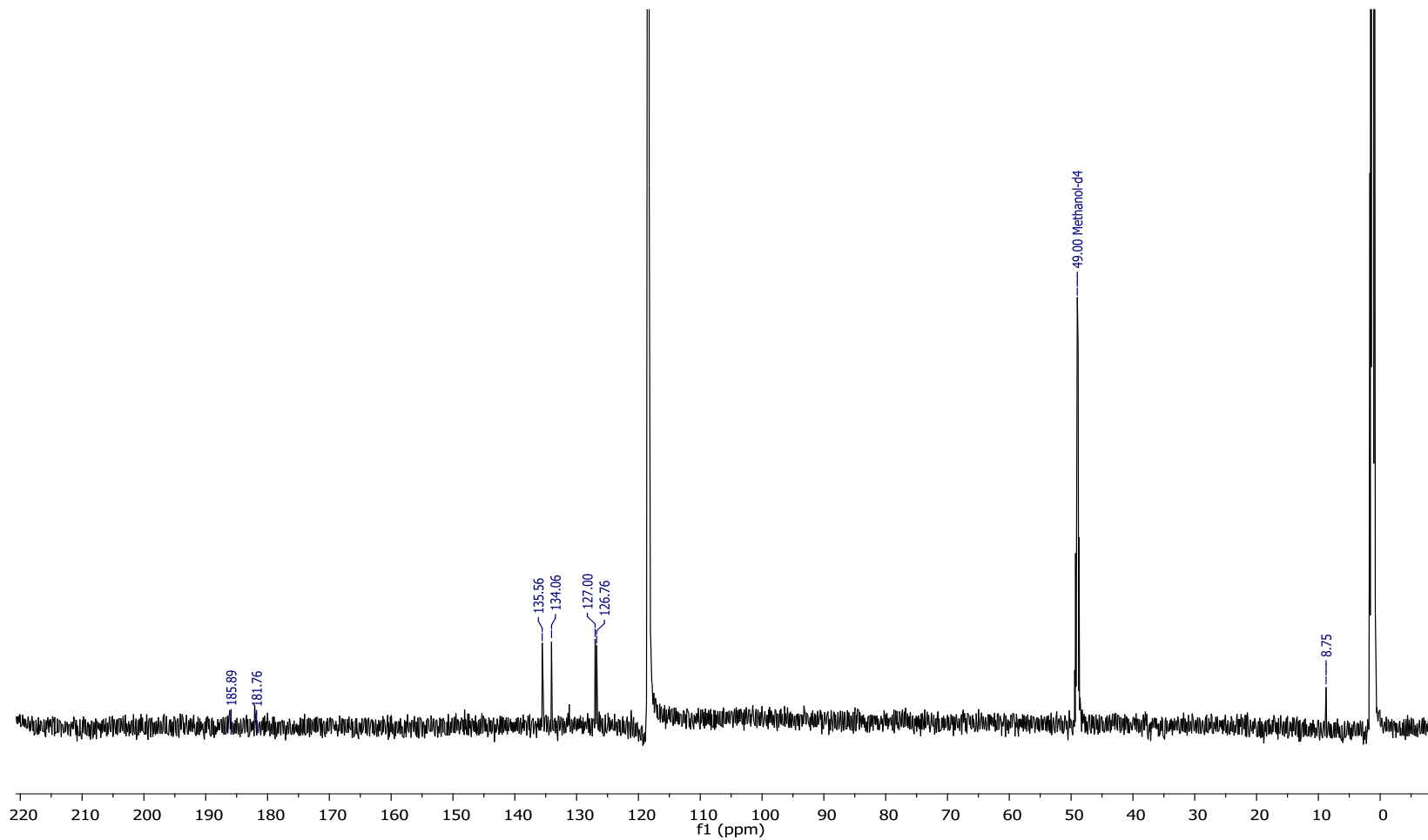
Apêndice 15. Espectro de massas em alta resolução da amostra **BM5**



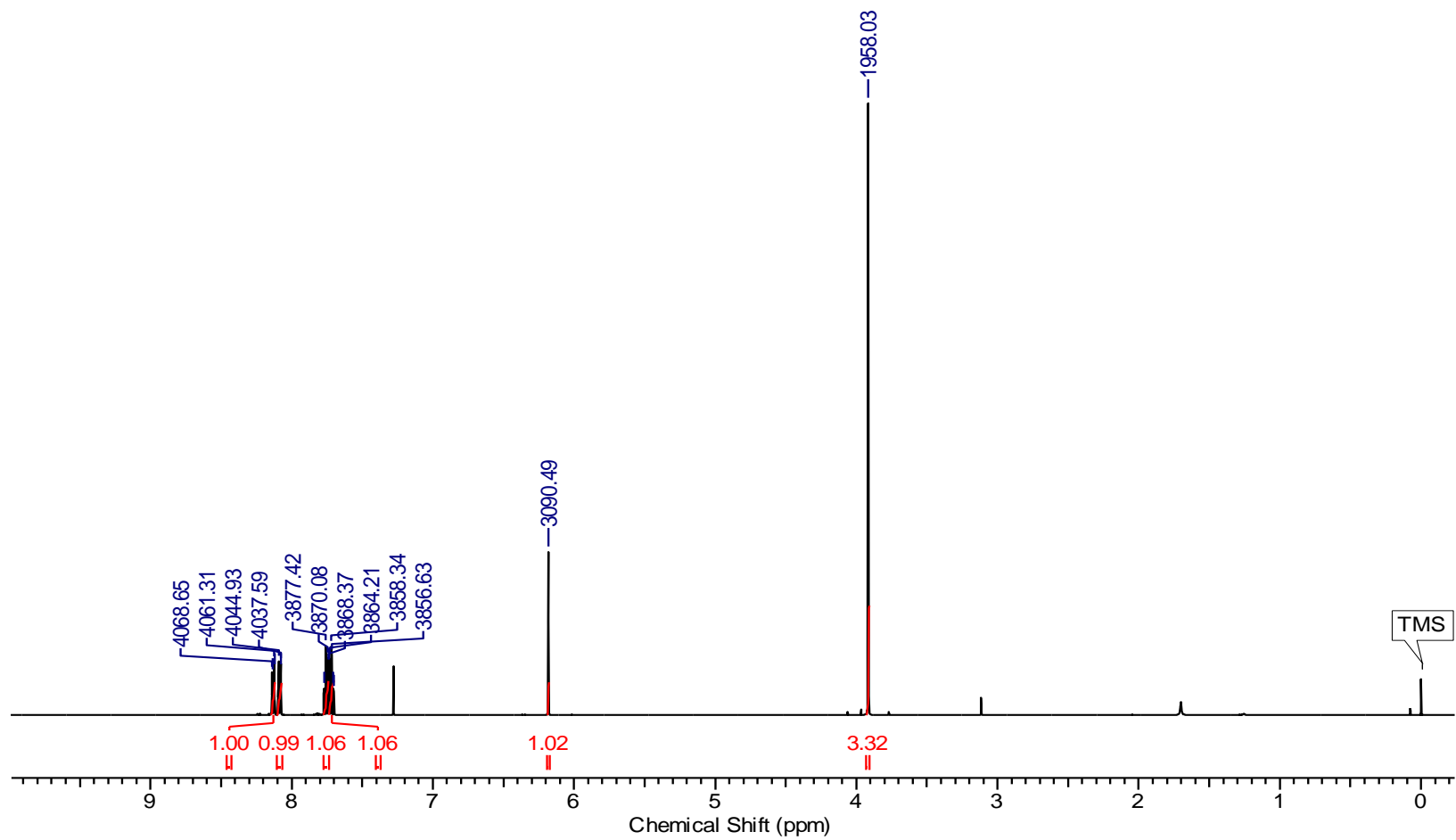
Apêndice 16. Espectro de RMN de ^1H do metabólito **BM6**



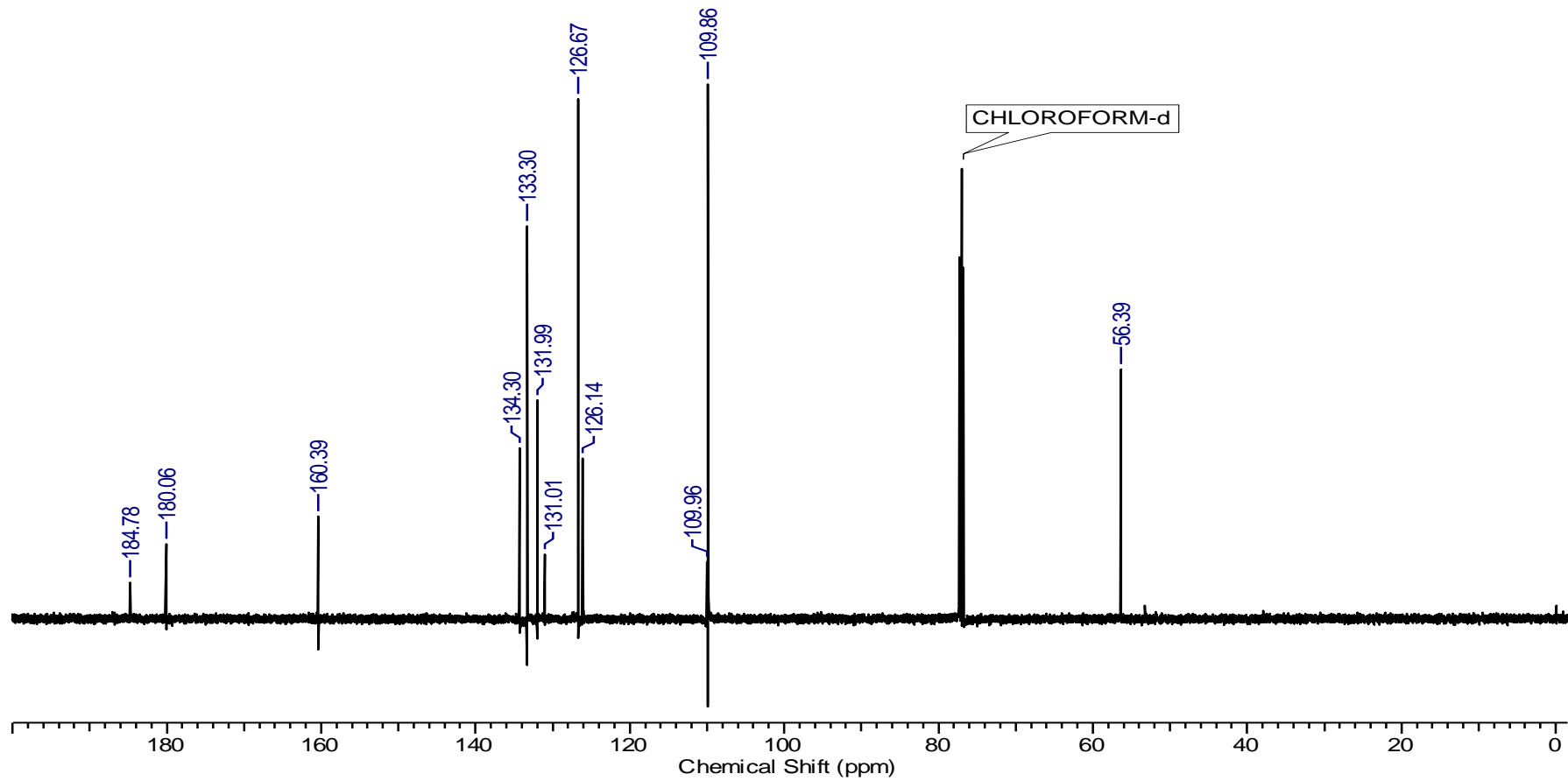
Apêndice 17. Espectro de RMN de ^1H do metabólito **BM7**



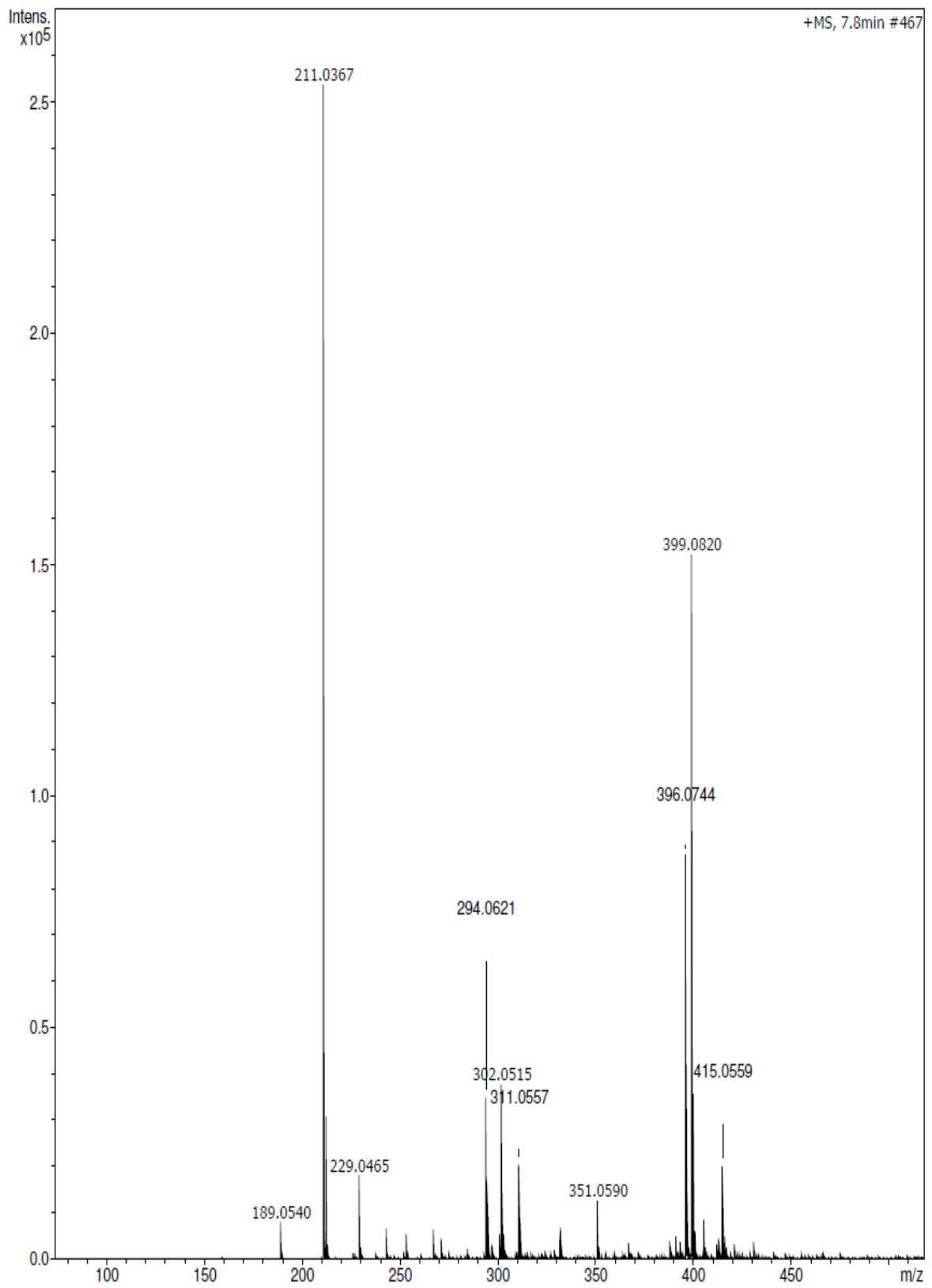
Apêndice 18. Espectro de RMN de ^{13}C do metabólito **BM7**



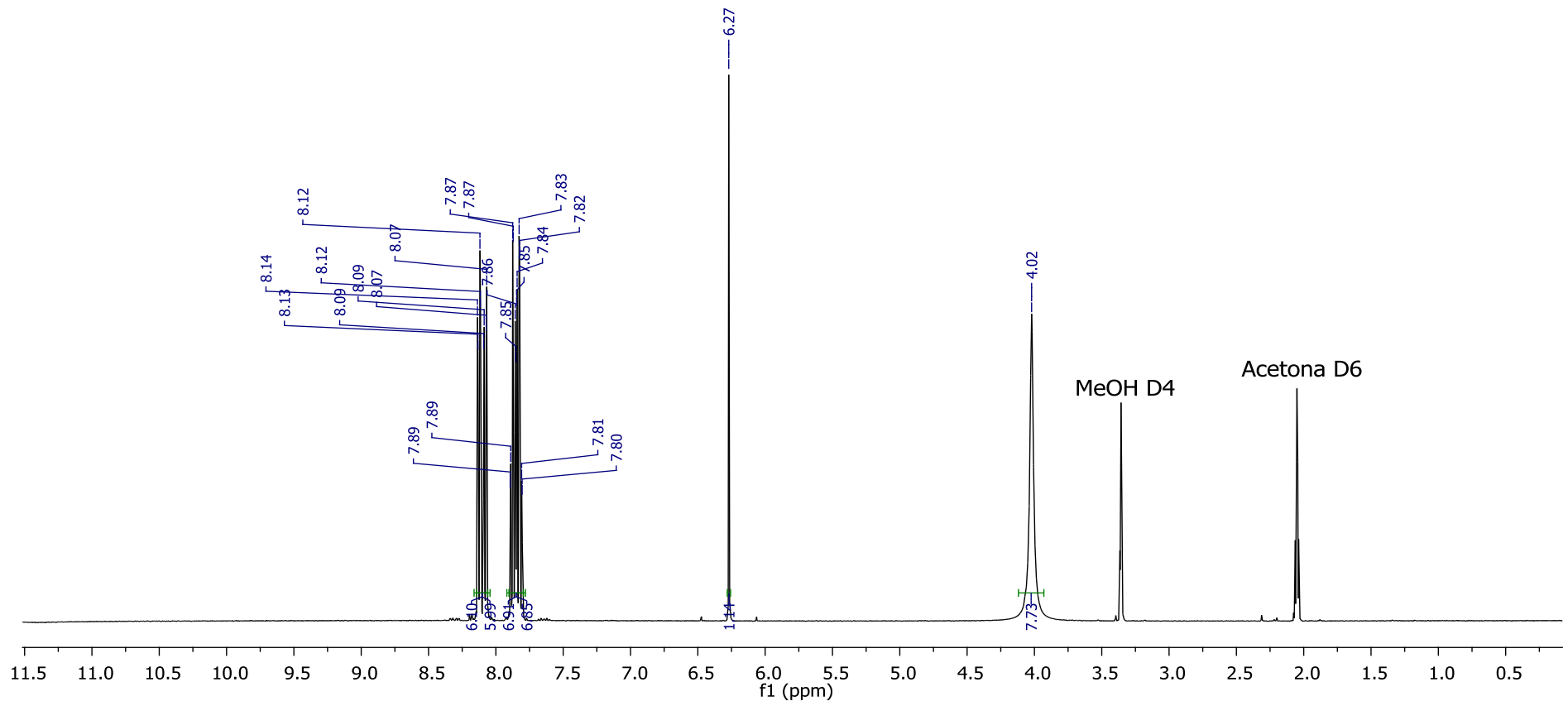
Apêndice 19. Espectro de RMN de ^1H da lausona metoxilada



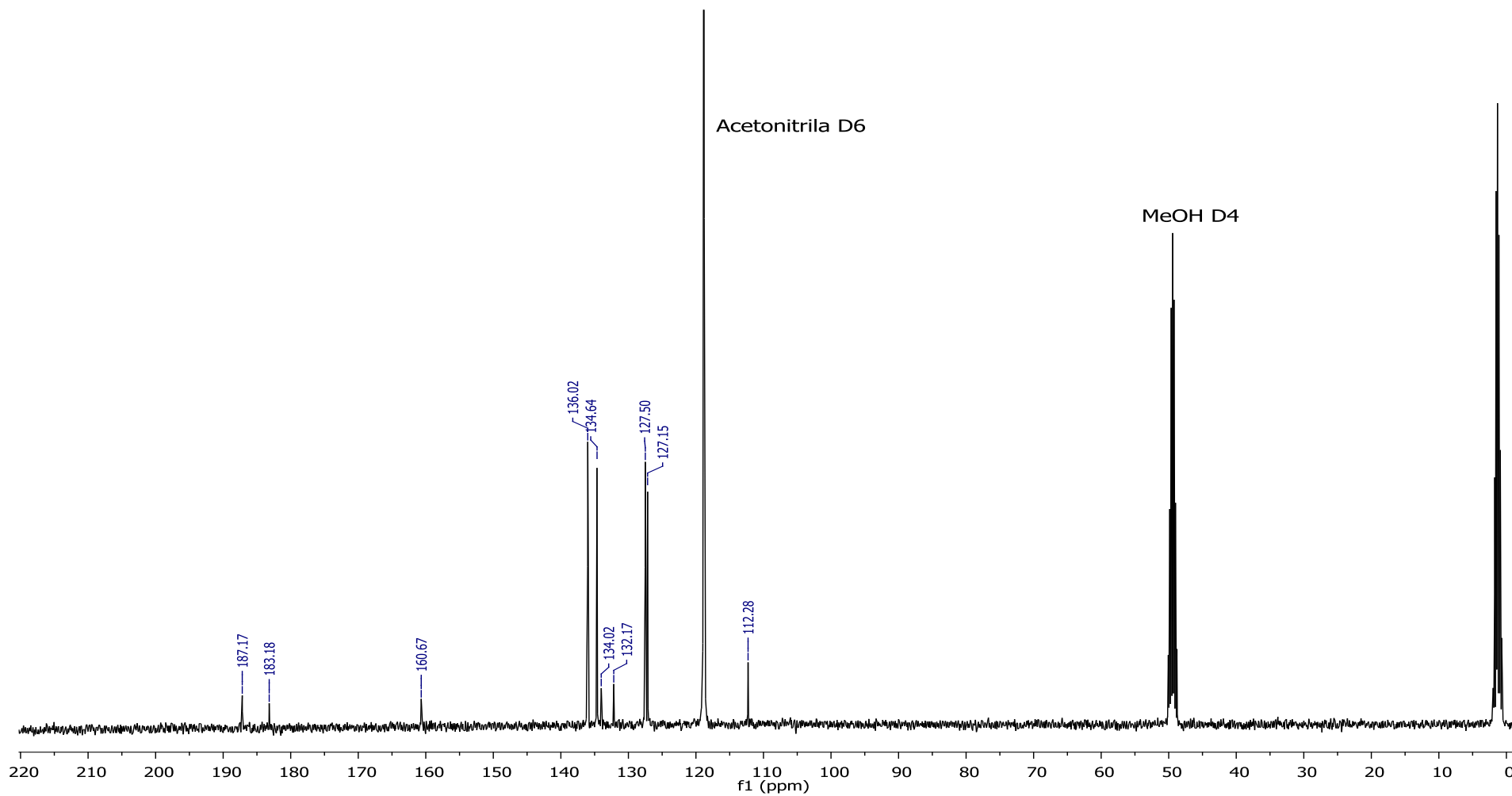
Apêndice 20. Espectro de RMN de ^{13}C da lausona metoxilada



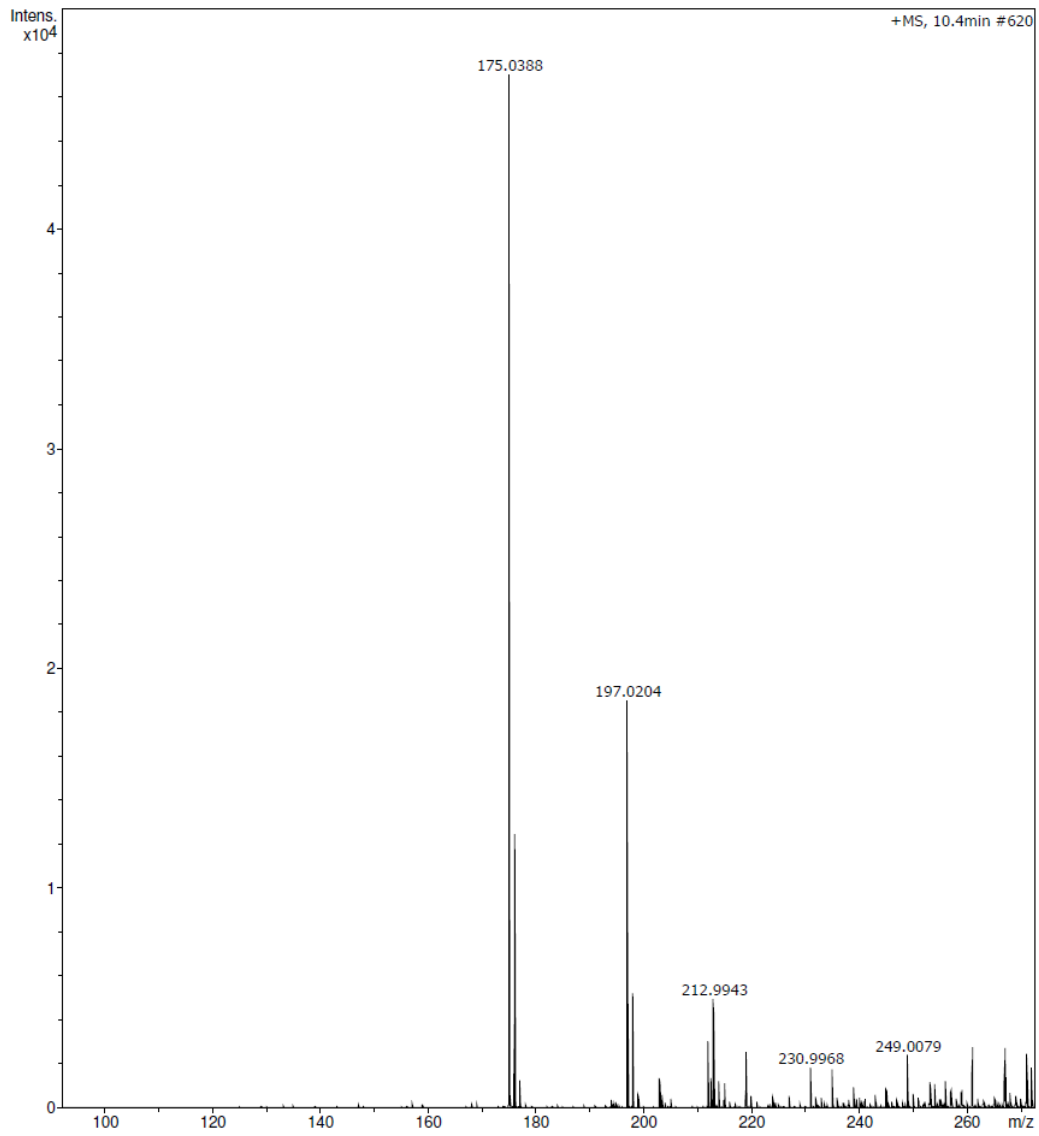
Apêndice 21. Espectro de massas de alta resolução da lausona metoxilada



Apêndice 22. Espectro de RMN de ^1H do metabólito **BLM 1**



Apêndice 23. Espectro de RMN de ^{13}C do metabólito **BLM 1**



Apêndice 24. Espectro de massas de alta resolução do metabólito **BLM**

