

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. Niede 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

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.

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**.

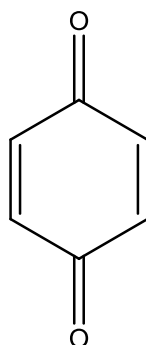


Figura 1. Estrutura básica das quinonas (núcleo quinonóide)

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).

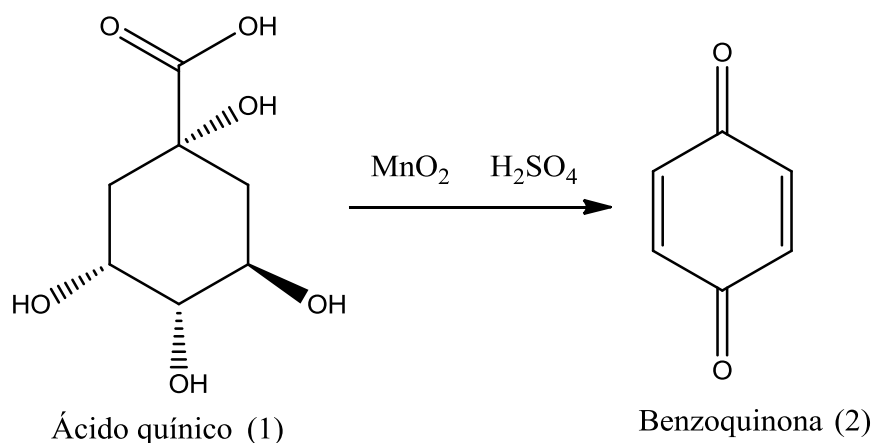


Figura 2. Formação da benzoquinona a partir do ácido quínico (Solomons & Fryhle, 2006).

Apesar de possuírem um esqueleto básico relativamente pequeno e simples, a variedade estrutural das quinonas é muito grande. Na **Figura 3** estão apresentados alguns exemplos de estruturas químicas de quinonas isoladas e descritas na literatura.

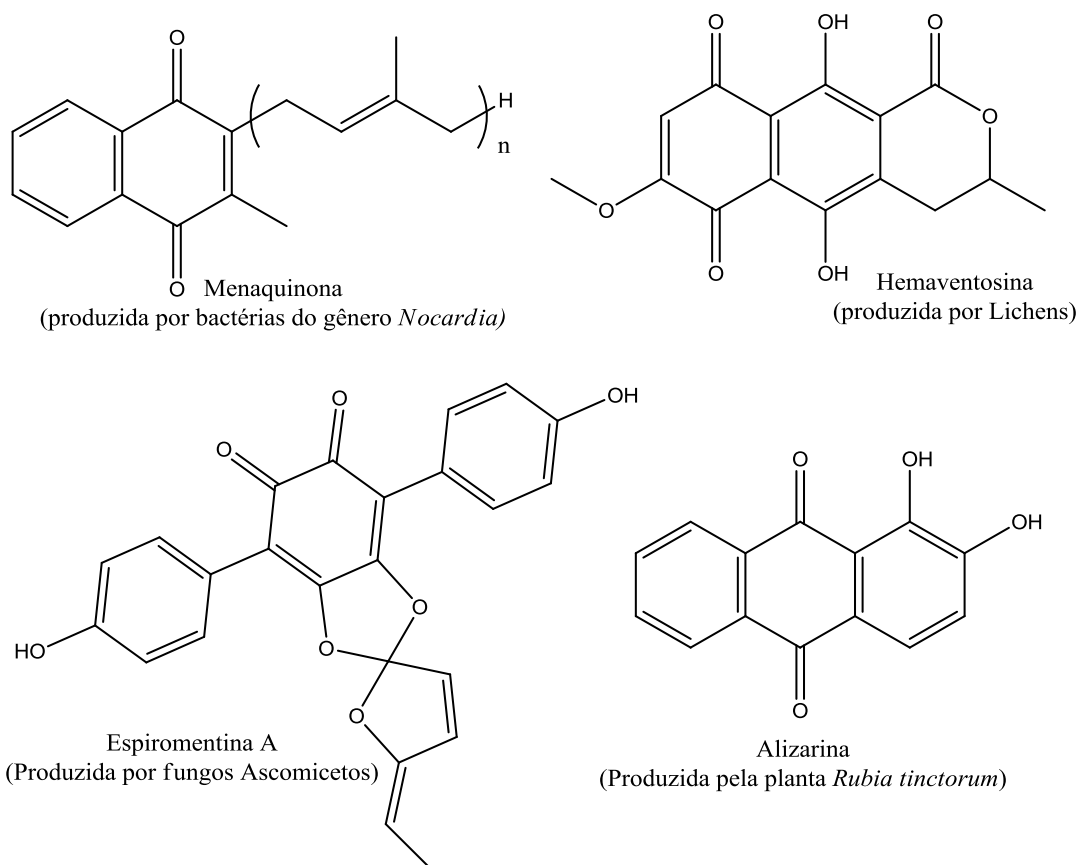


Figura 3. Estruturas químicas de quinonas já isoladas e descritas na literatura.

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**.

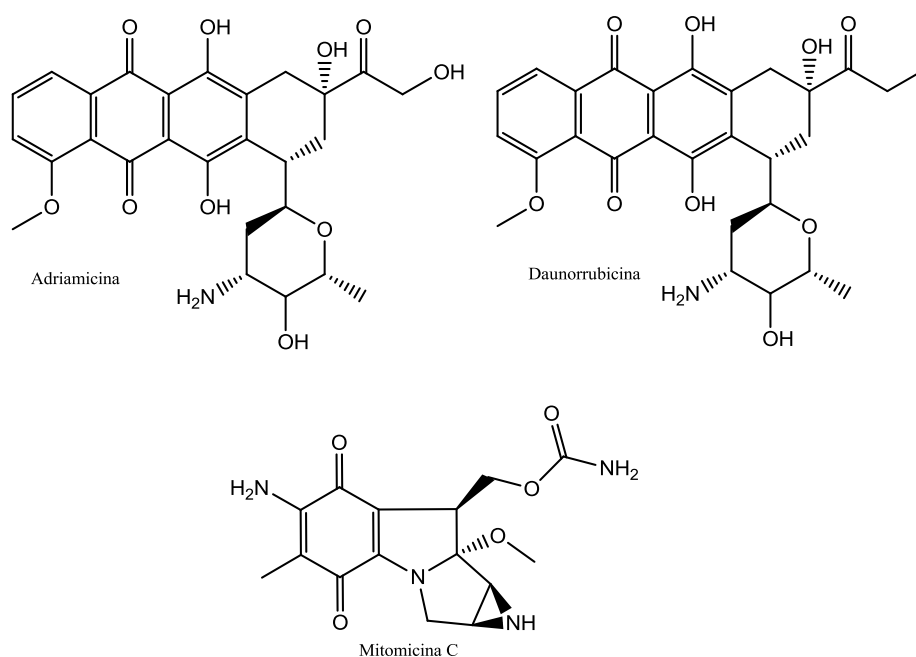


Figura 4. Estruturas químicas das naftoquinonas mitomicina C, adriamicina e daunorrubicina

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**.

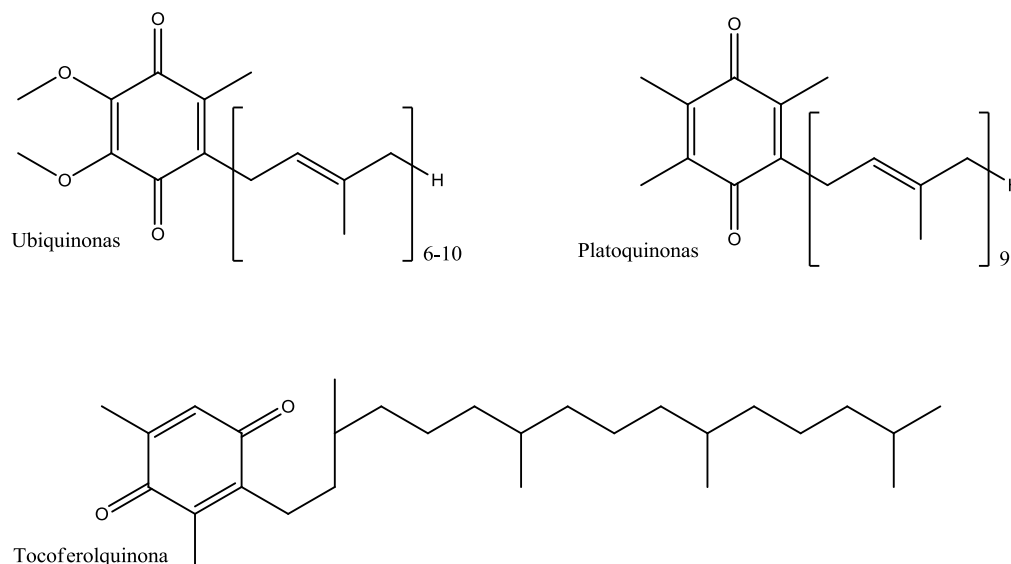


Figura 5. Quinonas de importância bioquímica

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).

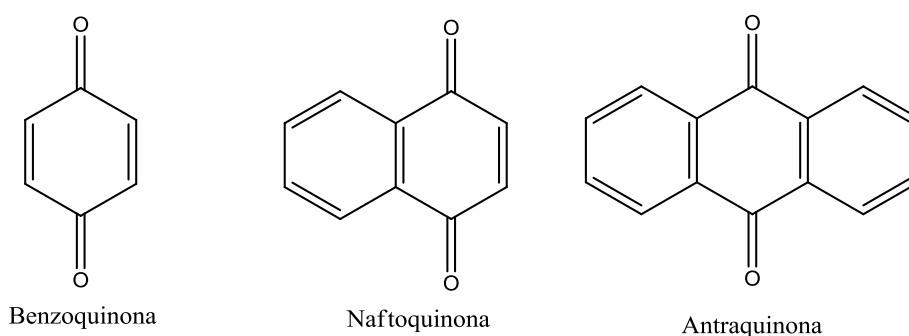


Figura 6. Estruturas químicas de diferentes tipos de quinonas

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.

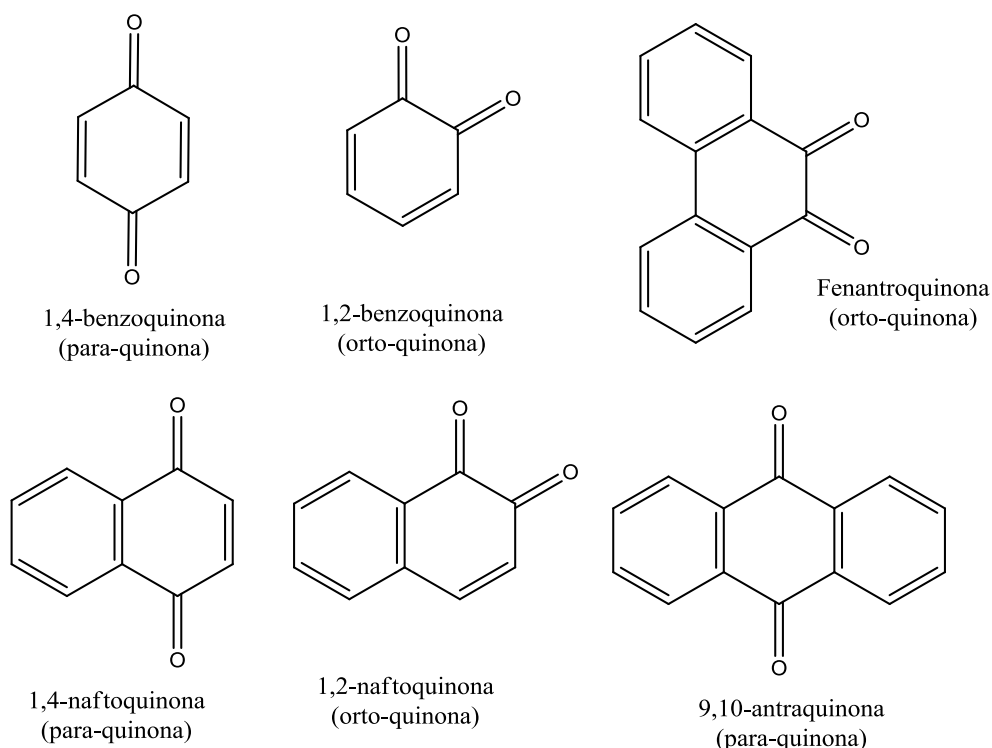


Figura 7. Estrutura química de *orto*- e *para*-quinonas

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).

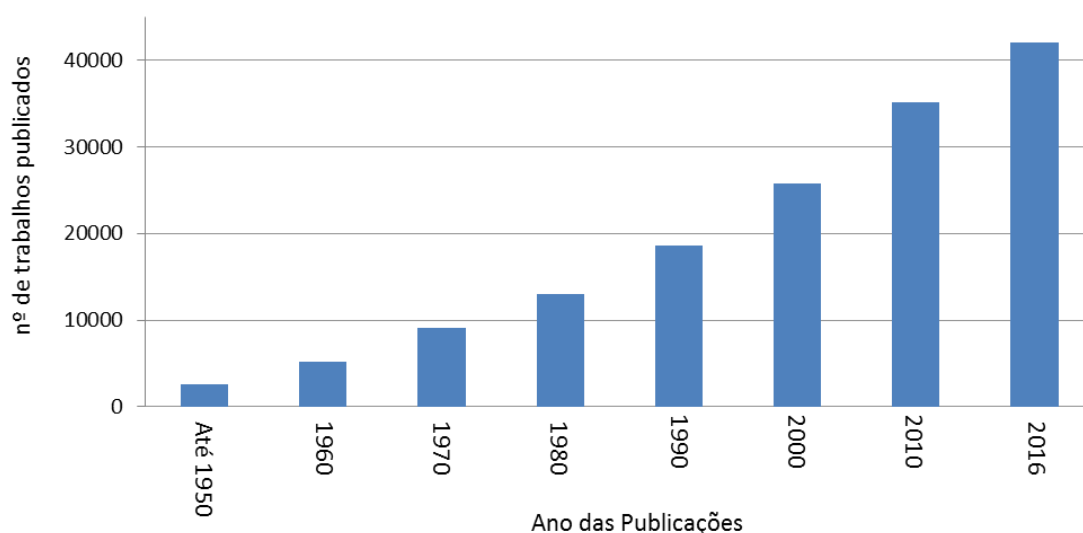


Figura 8. Gráfico do número de estudos sobre as naftoquinonas publicados na literatura entre 1900-2016. Fonte de Pesquisa: Base de Dados SciFinder (Acesso em 01/06/2016)

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:

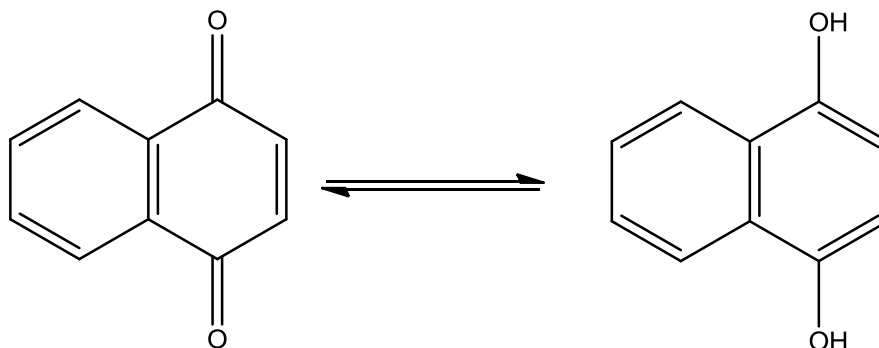


Figura 9. Formas tautoméricas resultantes do equilíbrio apresentado pelas quinonas

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):

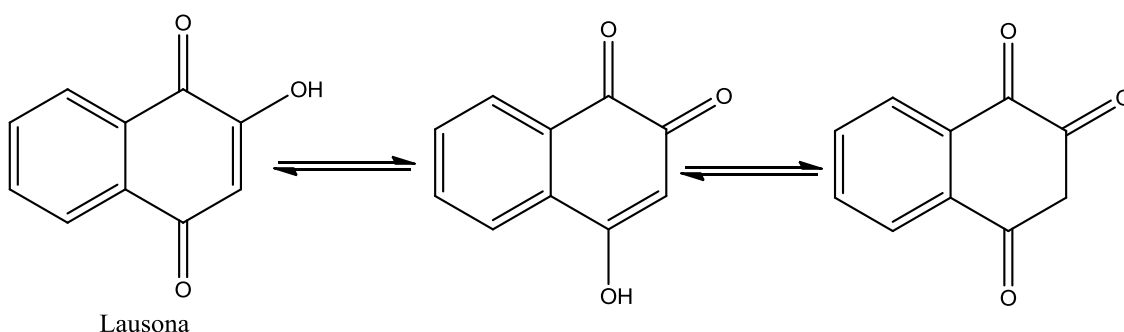


Figura 10. Formas da Lausona, uma hidroxinaftoquinona (Chaudhary & Khurana, 2016).

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**.

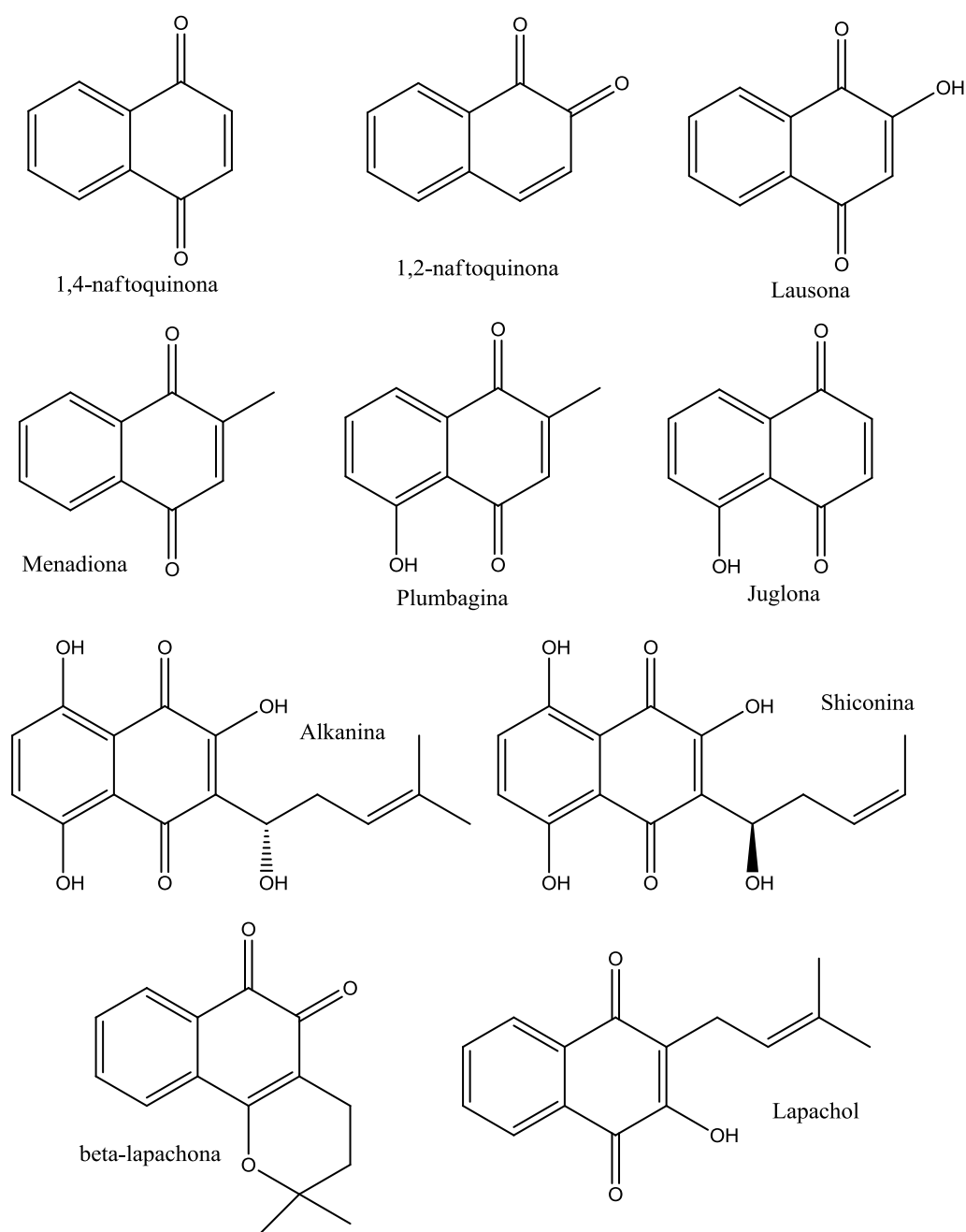


Figura 11. Estruturas químicas de naftoquinonas bioativas

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.

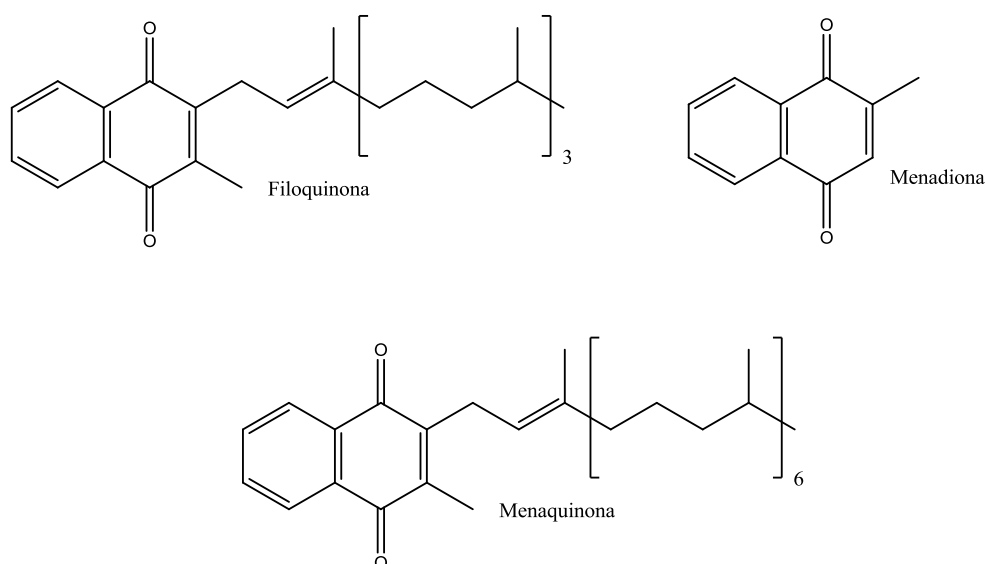


Figura 12. Estruturas químicas das vitaminas do grupo K

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).

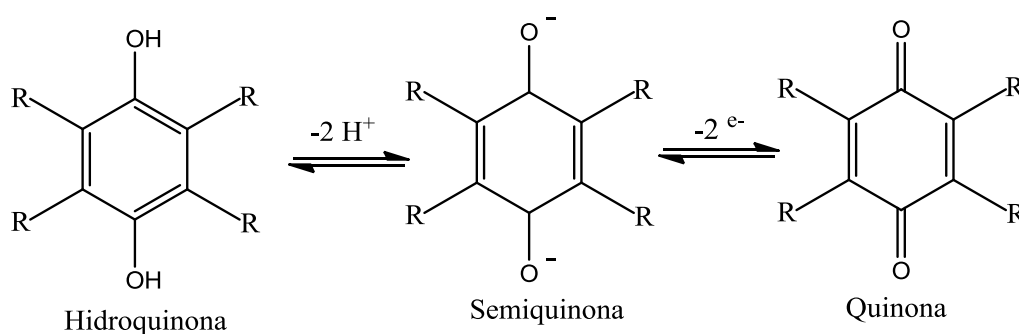


Figura 13. Ciclo redox das quinonas (Da Silva et al., 2003).

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**.

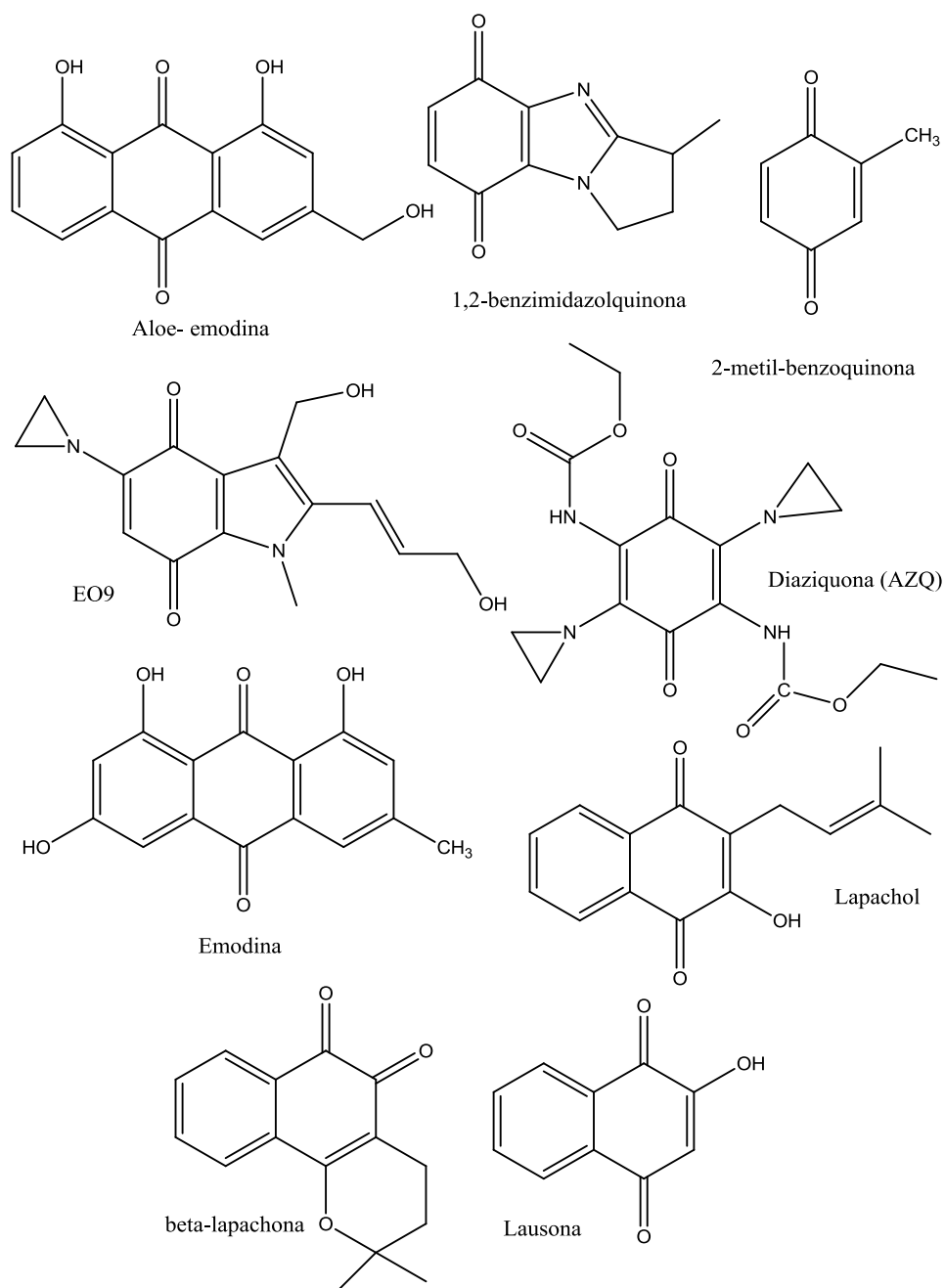


Figura 14. Estruturas químicas de quinonas com atividade citotóxica

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**.

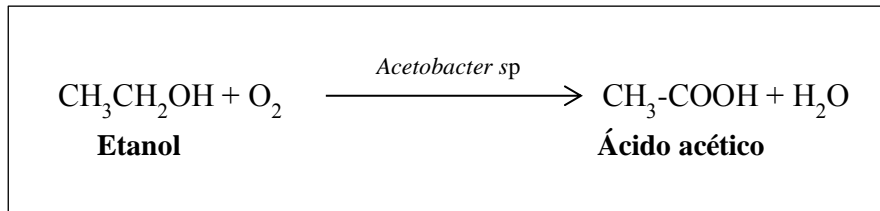


Figura 15. Biotransformação do etanol em ácido acético

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 oxidorreduções (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 (EMEA, 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**

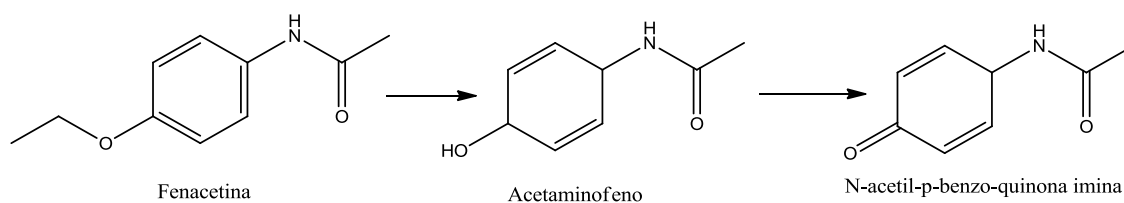


Figura 16. Biotransformação do acetaminofeno (Barreiro et al., 1996).

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).

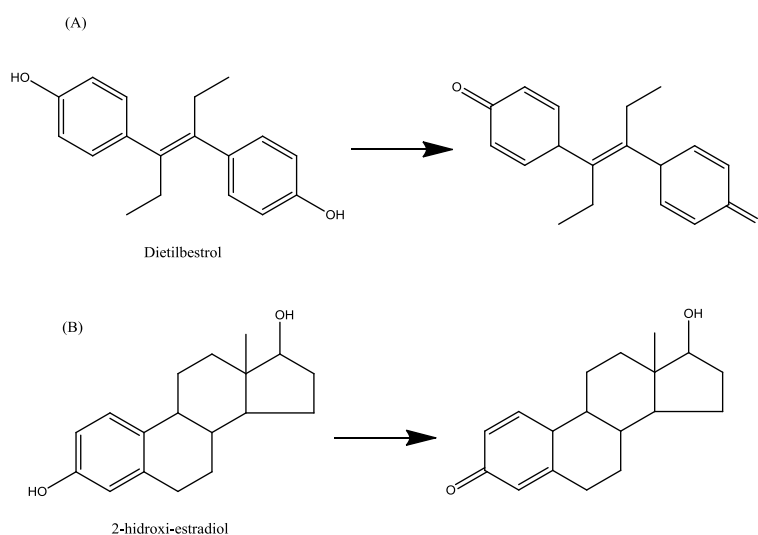


Figura 17. Biotransformações do dietilbestrol (A) e do 2-hidroxi-estradiol (B) em metabólitos contendo o núcleo quinonoide (Barreiro et al., 1996).

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 esteroideal), 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 saprofiticos, 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-redutases, 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**).

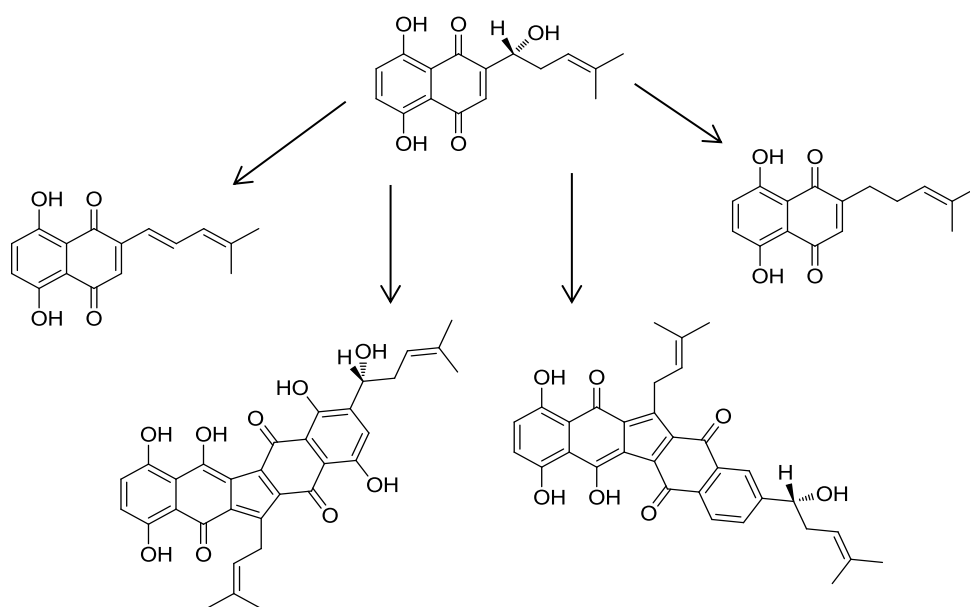


Figura 18. Biotransformação da chiconina por bactérias intestinais (Meselhy et al., 1994)

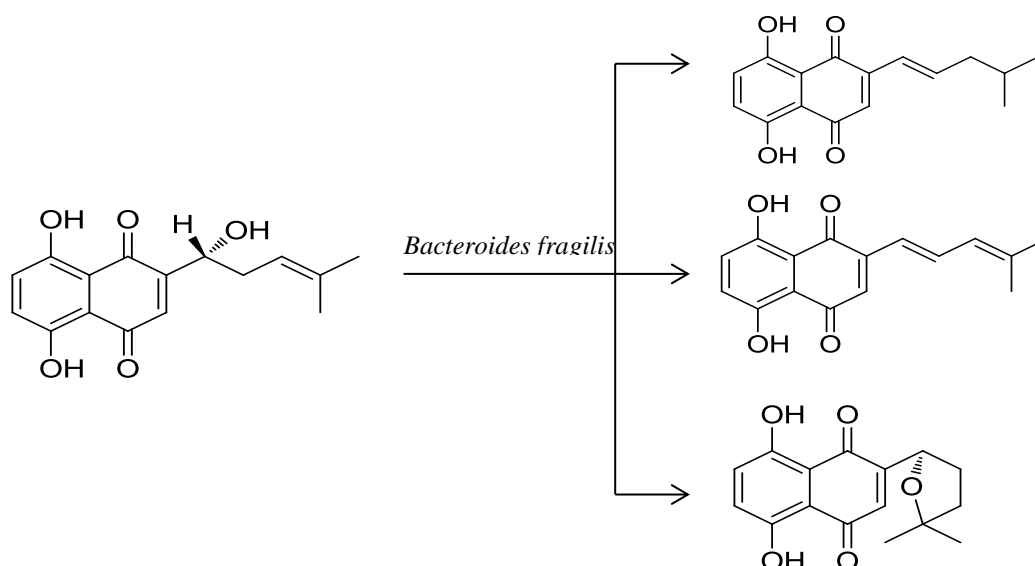


Figura 19. Biotransformação da chiconina por *Bacteroides fragilis* (Meselhy et al., 1994)

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).

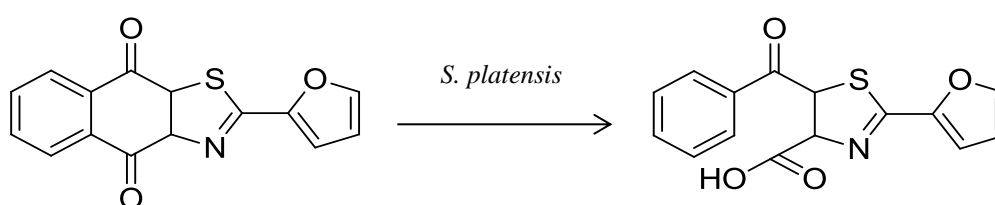


Figura 20. Clivagem oxidativa realizada por *S. platensis* (Le Texier et al., 2001).

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**).

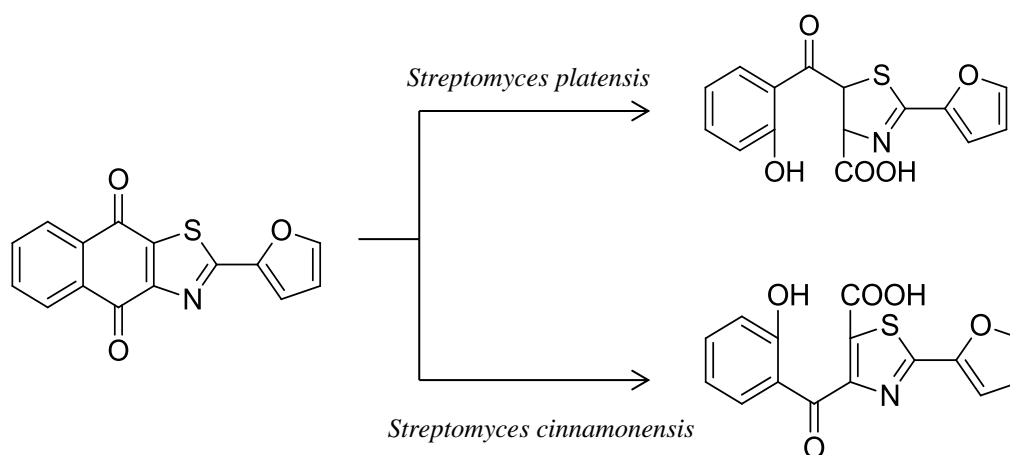


Figura 21. Biotransformação da naftoquinona INO 5042 (Fosse et al., 2004).

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.

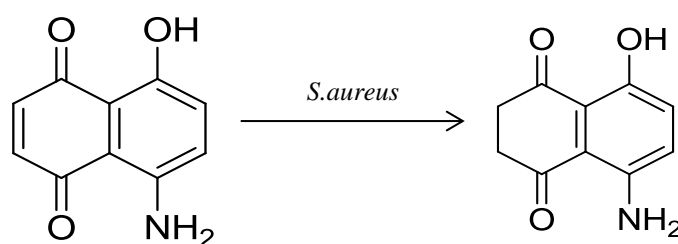


Figura 22. Biotransformação da 5-amino-8-hidroxi-1,4-naftoquinona (Medina et al., 2005).

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

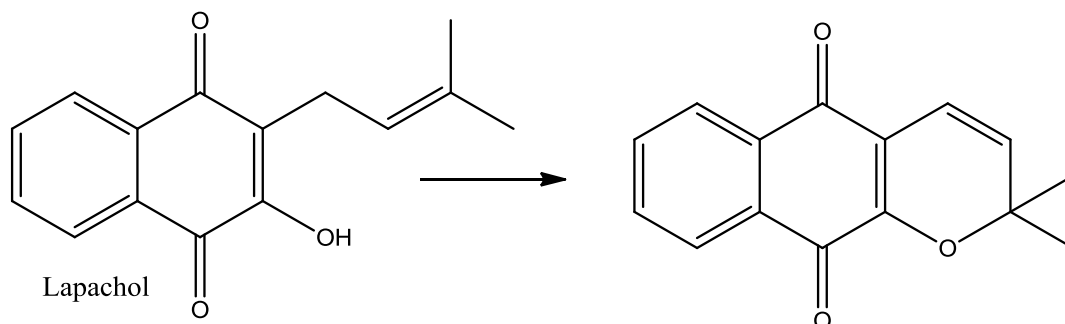


Figura 23. Biotransformação do lapachol por *C.lunata* (Otten & Rosazza, 1979).

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**)

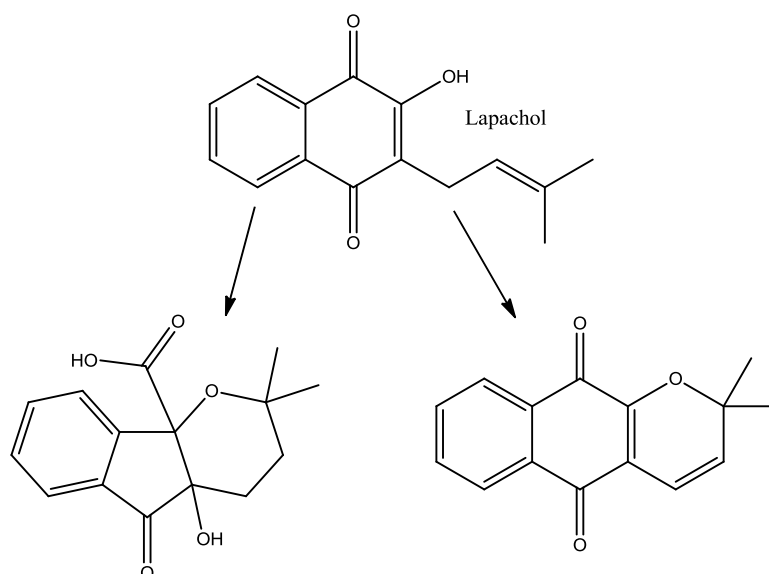


Figura 24. Produtos de biotransformação do lapachol descritos por Silva e colaboradores (2014).

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**.

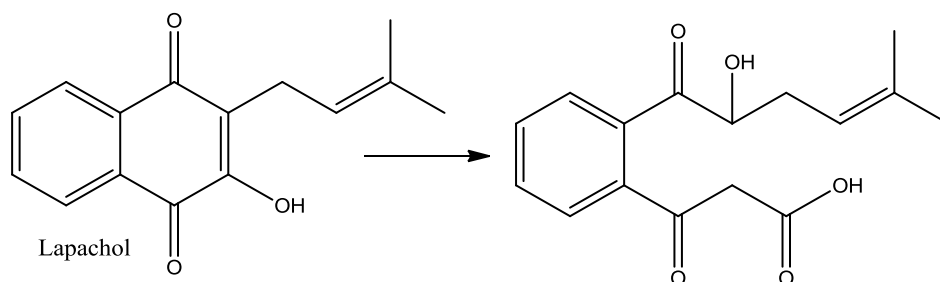


Figura 25. Biotransformação do lapachol descrita por Otten & Rosazza (1978).

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**.

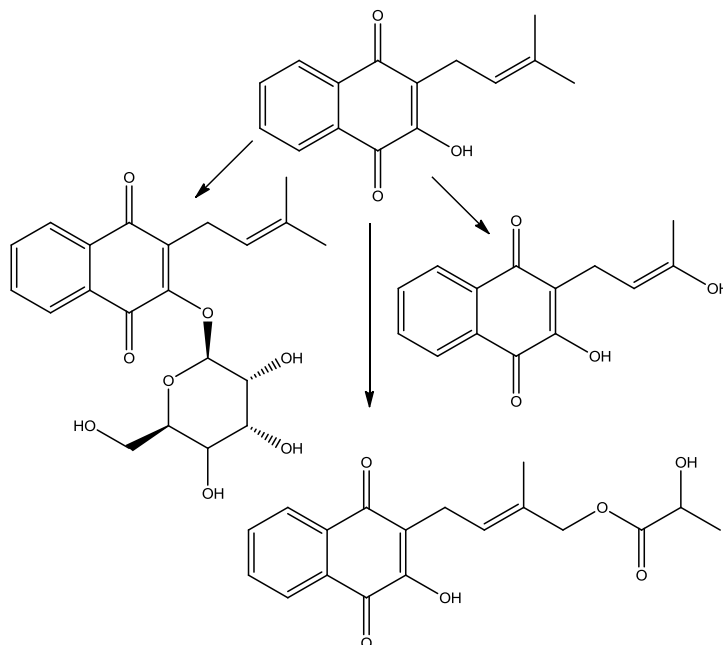


Figura 26. Biotransformação do lapachol por *C.echinulata* (Otten & Rosazza, 1979).

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**.

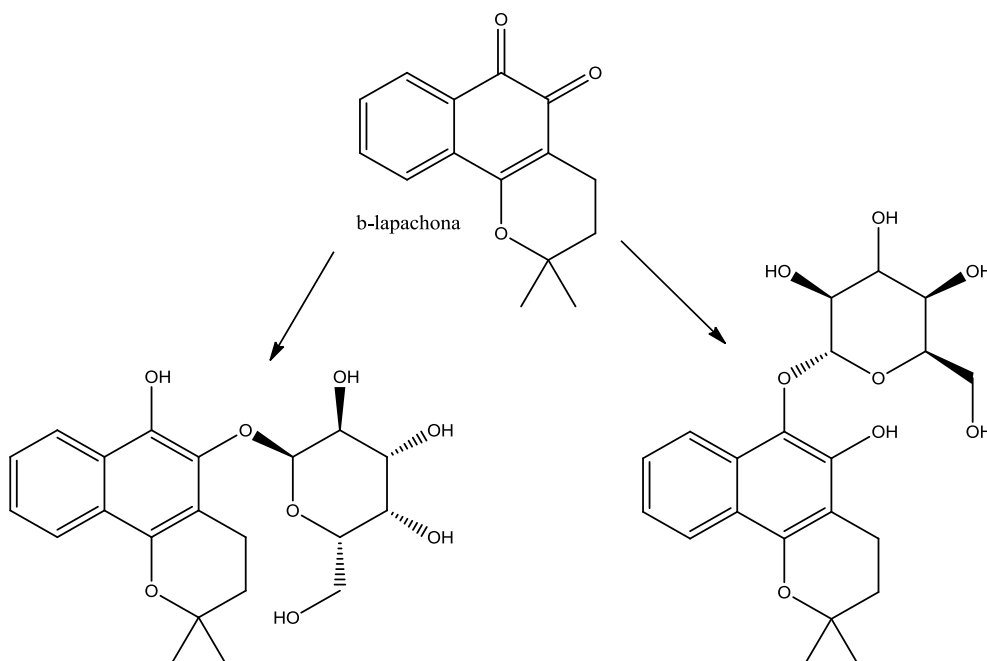


Figura 27. Produtos de biotransformação da β -lapachona descritos Paludo e colaboradores (2014).

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.

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.