UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Biotransformação da β -lapachona utilizando culturas microbianas:
uma alternativa para estudos de metabolismo *in vitro***

Camila Raquel Paludo

Ribeirão Preto

2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Biotransformação da β -lapachona utilizando culturas microbianas:
uma alternativa para estudos de metabolismo *in vitro***

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de
Mestre em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais
e Sintéticos

Orientada: Camila Raquel Paludo

Orientadora: Profa. Dra. Nieve Araçari
Jacometti Cardoso Furtado

Ribeirão Preto

2013

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.

Paludo, Camila Raquel

Biotransformação da β -lapachona utilizando culturas microbianas: uma alternativa para estudos de metabolismo *in vitro*. Ribeirão Preto, 2013.

200 p.; 30cm.

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

Orientadora: Furtado, Nígea Araújo Jacometti Cardoso.

1. Transformações microbianas. 2. β -lapachona. 3. Metabolismo *in vitro*

FOLHA DE APROVAÇÃO

Camila Raquel Paludo

Biotransformação da β -lapachona utilizando culturas microbianas: uma alternativa para estudos de metabolismo *in vitro*.

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de
Mestre 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: _____

Dedico,

A Deus por nunca me deixar cair e por estar ao meu lado me mostrando o caminho;

À Nossa Senhora por ser meu alento e luz nos momentos difíceis;

Ao meu pai Alucir Luiz Paludo, por seus ensinamentos de força, honra e perseverança;

À minha mãe Izaira Inês Paludo, por ser minha inspiração de educadora e mulher forte;

À minha irmã Keli Aparecida Paludo, por ser antes de tudo minha melhor amiga e conselheira;

Ao meu irmão Marcos Winícius Paludo, por torcer por mim e me incentivar;

Ao meu amor Eduardo Afonso da Silva Junior, por ser meu companheiro nessa caminhada.

Sem vocês não conseguiria! Amo infinitamente!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Profa. Dra. Niede A. J. C. Furtado por ter aceitado me orientar durante o mestrado e por sempre ser, acima de tudo, minha amiga. Agradeço pelos ensinamentos, conversas, incentivo ao crescimento, tanto pessoal como profissional.

Agradeço também a Profa. Dra. Mônica T. Pupo por indicar meu nome para Profa. Niede e também pela colaboração em muitas etapas deste trabalho.

Agradeço imensamente à minha família! Ao meu pai Alucir Luiz Paludo, minha mãe Izora Inês Paludo, minha irmã Keli Aparecida Paludo e meu irmão Marcos Vinícius Paludo, pelo imenso amor, carinho, compreensão, torcida durante todos os dias da minha vida!

Não poderia deixar de agradecer ao meu amor Eduardo Afonso da Silva Junior por estar comigo nessa árdua caminhada, sempre me auxiliando, ajudando e incentivando. Agradeço à família do Eduardo, Sr. Eduardo, Sra. Maria Aparecida, Srta. Érica e Sr. Rommel por todo incentivo.

Agradeço ao Prof. Dr. Flávio S. Emery por colaborar neste trabalho, auxiliando em várias etapas deste trabalho.

Agradeço ao Prof. Dr. Norberto P. Lopes pelo auxílio nos experimentos envolvendo espectrometria de massas.

Meus agradecimentos também se estendem a Profa. Dra. Raquel A. dos Santos pelos experimentos de avaliação da citotoxicidade de algumas estruturas desse trabalho.

Agradeço também os professores do Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP), Dr. Jairo K. Bastos e Fernando B. da Costa pelo convívio diário e auxílio.

Agradeço a todos os professores da FCFRP pelos ensinamentos durante meu mestrado, seja em palestras ou disciplinas, ou mesmo por conversas produtivas durante essa etapa de minha vida.

Agradeço ao Dr. Ricardo Vessecchi, pela paciência e auxílio no estudo das rotas fragmentação por espectrometria de massas dos derivados obtidos nessa dissertação.

Agradeço também ao Sr. Tomaz, Me. Jacqueline e Me. Dayana pela compreensão e auxílio na obtenção dos dados espectrométricos desse trabalho.

Também agradeço ao Sr. Vinícius pelas análises de Ressonância Magnética Nuclear e por sempre estar disposto a ajudar.

Agradeço ao Sr. Murilo, do Laboratório de Química de Heterociclos, pela ajuda durante o processo sintético para obtenção da β -lapachona.

Agradeço também aos técnicos do Laboratório de Farmacognosia, Sr. Mário, Sr. Valter e em especial a minha amiga Angélica, pelo convívio, paciência e colaboração.

Agradeço a Sra. Cláudia, técnica do Laboratório de Química de Micro-organismos, pela ajuda e amizade.

Não posso deixar de agradecer a todos os amigos do Laboratório de Farmacognosia, pelo convívio diário, conversas, ajuda e colaboração, em especial a Me. Eliane e Me. Juliana, pela amizade e atenção.

Agradeço também aos amigos feitos no Laboratório de Química de Micro-organismos, que sempre me ajudaram e apoiaram.

Agradeço aos funcionários da Secretaria da FCFRP, em especial à Sra. Eleni e Sr. Raphael.

Agradeço a todos os funcionários da FCFRP por ajudarem no andamento do trabalho, em especial ao Sr. Antônio, Sr. Clóvis, Sra. Teresinha e Sr. Donisete.

Agradeço o auxílio fundamental para a realização deste trabalho que foi concedido inicialmente pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e posteriormente pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) na forma de bolsa de estudos e também agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) que financiou anteriormente vários materiais e equipamentos utilizados nesse trabalho.

Por fim, agradeço a todos que auxiliaram nessa etapa tão importante de minha vida!

*“A mente que se abre a uma nova ideia
jamais voltará ao seu tamanho original”*

Albert Einstein

RESUMO

PALUDO, C. R. **Biotransformação da β -lapachona utilizando culturas microbianas: uma alternativa para estudos de metabolismo *in vitro***. 2013. 200f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

A β -lapachona é uma *orto*-naftoquinona consagrada por suas atividades farmacológicas, principalmente pela antitumoral, porém não há descrição de estudos de biotransformação microbiana da β -lapachona. Tais estudos podem propiciar a obtenção de novos derivados dessa naftoquinona, além de fornecerem informações importantes sobre seu metabolismo. Muitos trabalhos descrevem que micro-organismos podem catalisar reações mimetizando enzimas humanas. Para o desenvolvimento dessa pesquisa, a β -lapachona foi obtida por semissíntese a partir do lapachol. Nos processos de biotransformação foram utilizados os fungos filamentosos *Mucor rouxii*, *Cunninghamella elegans*, *Cunninghamella echinulata*, *Penicillium crustosum* e *Papulaspora immersa* e as bactérias gastrointestinais *Escherichia coli*, cultivada em aerobiose e anaerobiose, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* sp. e cultura mista composta por *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* sp. e *Streptococcus salivarius* subesp. *thermophilus*. Com o intuito de estabelecer uma comparação entre o metabolismo microbiano da β -lapachona com o do seu isômero α -lapachona, estudos de biotransformação utilizando o fungo *M. rouxii* foram também conduzidos com a α -lapachona. Sete derivados de biotransformação da β -lapachona com o fungo *M. rouxii* foram identificados, sendo um inédito, cinco já descritos na literatura em um trabalho de metabolismo dessa naftoquinona utilizando sangue de mamíferos e humanos e uma espirobenzolactona relatada em um trabalho de síntese. Outros dois derivados inéditos da β -lapachona, os quais são regioisômeros conjugados com glicose, foram produzidos após formação de hidroquinona no processo conduzido com o fungo *C. elegans*. O fungo *P. immersa* forneceu duas lactonas isoméricas também obtidas com a biotransformação com o fungo *M. rouxii*. Houve resultados positivos, com detecção de possíveis produtos de biotransformação da β -lapachona por CLAE-DAD, com as bactérias *E. coli* em aerobiose e *Bifidobacterium* sp. No entanto, esses processos apresentaram um baixo rendimento, sendo possível a identificação de apenas um derivado com a *E. coli*, que também foi obtido com a biotransformação com o fungo *M. rouxii*. Um derivado glicosilado da α -lapachona foi produzido após 24 horas de incubação no processo desenvolvido com o fungo *M. rouxii*, sendo posteriormente convertido em hidroxilapachol, que por sua vez originou a α -lapachona novamente e também a β -lapachona, a qual foi metabolizada também. O derivado glicosilado majoritário, obtido da biotransformação com a β -lapachona com o fungo *C. elegans*, foi submetido à avaliação da atividade citotóxica frente à linhagem de câncer de mama humano SKBR-3 apresentando IC_{50} igual a 312,5 μ M, sendo o IC_{50} da β -lapachona frente à mesma linhagem igual a 5,6 μ M. O derivado majoritário não apresentou citotoxicidade frente à linhagem de fibroblastos normais humanos GM07492-A, enquanto a β -lapachona foi altamente citotóxica (IC_{50} igual a 7,25 μ M). Esse mesmo derivado inédito foi também produzido em pequena quantidade no processo desenvolvido com o fungo *C. echinulata*. Na metabolização microbiana da β -lapachona ocorreram tanto reações de fase I como de fase II, havendo mimetização do metabolismo de mamíferos, inclusive de humanos, como relatado em trabalhos da literatura.

Palavras-chave: Transformações microbianas; β -lapachona; metabolismo *in vitro*; fungos filamentosos; bactérias intestinais.

ABSTRACT

PALUDO, C. R. **Biotransformation of β -lapachone using microbial cultures: an alternative to *in vitro* metabolism studies**. 2013. 200f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

β -lapachone is considered an important *ortho*-naphthoquinone by their pharmacological activities, mainly antitumor, but there is no description of microbial biotransformation studies of β -lapachone. These researches may furnish new derivatives and significant information on its metabolism. Many studies describe that microorganisms can catalyze reactions mimicking human enzymes. β -lapachone was obtained by semisynthetic procedure from lapachol. Biotransformation processes were carried out using the filamentous fungi *Mucor rouxii*, *Cunninghamella elegans*, *Cunninghamella echinulata*, *Penicillium crustosum* and *Papulaspora immersa* and the gastrointestinal bacteria *Escherichia coli* grown aerobically and anaerobically, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* sp. and mixed culture with *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* sp. and *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*. In order to establish a comparison between β -lapachone microbial transformation and those of its isomer α -lapachone, biotransformation studies of α -lapachone were also carried out using *M. rouxii*. Seven derivatives of β -lapachone were produced in the process performed by *M. rouxii*, including one unpublished, five already described in a study of metabolism by mammalian and human blood and one spirobenzolactone reported in a syntetic study. Other two unpublished derivatives of β -lapachone, which are regioisomers conjugated with glucose, were produced after formation of hydroquinone in the process carried out by *C. elegans*. *P. immersa* provided two isomeric lactones also obtained by biotransformation with *M. rouxii*. Possible biotransformation products were detected by using HPLC-DAD in the processes carried out by the bacteria *E. coli* under aerobic condition and *Bifidobacterium* sp. However, these processes exhibited a low yield, and it was possible to identify only one derivative produced by *E. coli*, which was also obtained in the process performed by *M. rouxii*. A glycosylated derivative of α -lapachone was produced by biotransformation with *M. rouxii* after 24 hours of incubation and subsequently was converted in hydroxylapachol, which in turn gave rise to α -lapachone again and also to β -lapachone, which was also metabolized. The major derivative produced in the process carried out by *C. elegans* was submitted to cytotoxic activity evaluation using human breast cancer cell line SKBR3 showing IC_{50} 312.5 μ M, being the β -lapachone IC_{50} 5.6 μ M against the same cell line. The major derivative did not show cytotoxicity to normal human fibroblast GM07492-A cell line, while β -lapachone was highly cytotoxic (IC_{50} 7.25 μ M). The same major derivative was also produced in smaller yield in the process performed by *C. echinulata*. In the β -lapachone microbial transformation studies occurred phase I and phase II reactions, mimicking the metabolism of mammals, including humans, as reported in literature.

Keywords: Microbial transformations; β -lapachone; *in vitro* metabolism; filamentous fungi; intestinal bacteria.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química da β -lapachona.....	06
Figura 2. Via de bioativação da β -lapachona pela enzima NQO1 (Adaptado de SIEGEL et al., 2012).....	08
Figura 3. Estrutura química do lapachol.....	09
Figura 4. Estrutura química do derivado do lapachol produzido por fungos filamentosos (Adaptado de OTTEN e ROSAZZA, 1978).....	09
Figura 5. Estrutura química da dehidro- α -lapachona produzida a partir do lapachol por biotransformação com o fungo <i>Curvularia lunata</i> (Adaptado de OTTEN e ROSAZZA, 1979).....	10
Figura 6. Estruturas químicas dos derivados do lapachol obtidos por biotransformação com o fungo <i>Cunninghamella echinulata</i> (Adaptado de OTTEN e ROSAZZA, 1981).....	10
Figura 7. Estrutura química da α -lapachona.....	11
Figura 8. Isolamento de metabólitos com a primeira biotransformação da β -lapachona em escala ampliada realizada com o fungo <i>M. rouxii</i> , após dois dias de incubação.....	26
Figura 9. Isolamento de metabólitos com o segundo e terceiro processos de biotransformação da β -lapachona em escala ampliada realizada com o fungo <i>M. rouxii</i> , após dois dias de incubação.....	28
Figura 10. Isolamento de metabólitos com a biotransformação da β -lapachona em escala ampliada realizada com o fungo <i>P. immersa</i> SS13, após 6 horas de incubação.....	28
Figura 11. Isolamento de metabólitos com a biotransformação da β -lapachona em escala ampliada realizada com o fungo <i>C. elegans</i> , após sete dias de incubação.....	29
Figura 12. Isolamento de metabólitos com a biotransformação da β -lapachona em escala ampliada realizada com a bactéria <i>Bifidobacterium</i> sp., após 24 horas de incubação.....	29
Figura 13. Isolamento de metabólitos com a biotransformação da α -lapachona em escala ampliada realizada com o fungo <i>M. rouxii</i> , após um e cinco dias de incubação.....	30
Figura 14. Cristais de β -lapachona.....	34
Figura 15. Cromatograma obtido por CLAE-DAD da β -lapachona, analisado em 256 nm.....	34
Figura 16. Espectro de massas em alta resolução da β -lapachona (IES-EM)	34

Figura 17. Estrutura química da β -lapachona, com dados de correlações no HMBC, fórmula molecular, m/z em alta resolução, tempo de retenção em minutos (CLAE-DAD) e nome químico.....	35
Figura 18. Espectro de RMN de ^1H da β -lapachona (CDCl_3 , 500 MHz).....	36
Figura 19. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD da biotransformação da β -lapachona com o fungo <i>Mucor rouxii</i> no segundo dia de biotransformação, analisados em 256 nm. A) Cromatograma da biotransformação com a β -lapachona; B) Cromatograma do controle fúngico; C) Cromatograma do controle de estabilidade da β -lapachona no meio de cultura.....	38
Figura 20. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD das frações de biotransformação com o fungo <i>M. rouxii</i> , analisados em 256 nm. A) Cromatograma da fração em 40% de acetonitrila; B) Cromatograma da fração em 60% de acetonitrila; C) Cromatograma da fração em 70% de acetonitrila.....	39
Figura 21. Estrutura química do derivado BLM01, obtido pela biotransformação da β -lapachona com o fungo <i>M. rouxii</i> . À direita estão a fórmula molecular, m/z em alta resolução, tempo de retenção em minutos (CLAE-DAD), e nome químico da respectiva substância.....	40
Figura 22. Espectro de RMN de ^1H do derivado da β -lapachona BLM01 (CD_3OD , 500 MHz).....	41
Figura 23. Estrutura química e espectro de EM/EM a 30 eV (CLUE-DAD-EM/EM) do derivado BLM-EM01.....	42
Figura 24. Proposta de rotas de fragmentação do derivado BLM-EM01.....	43
Figura 25. Estrutura química do derivado BLM02, obtido pela biotransformação da β -lapachona com o fungo <i>M. rouxii</i> . À direita estão a fórmula molecular, m/z em alta resolução, tempo de retenção em minutos (CLAE-DAD), nome químico e $[\alpha]_D$ da respectiva estrutura.....	44
Figura 26. Espectro de RMN de ^1H do derivado da β -lapachona BLM02 (CDCl_3 , 500 MHz).....	46
Figura 27. Estrutura química e espectro de EM/EM do derivado BLM02 (IES-EM, 20 eV).....	47
Figura 28. Proposta de rotas de fragmentação do derivado BLM02.....	48
Figura 29. Estrutura química do derivado BLM04, obtido pela biotransformação da β -lapachona com o fungo <i>M. rouxii</i> . À direita estão a fórmula molecular, m/z em alta resolução, tempo de retenção em minutos (CLAE-DAD) e nome químico da respectiva estrutura.....	49
Figura 30. Espectro de RMN de ^1H do derivado da β -lapachona BLM04 (CD_3OD , 500 MHz).....	50
Figura 31. Proposta de mecanismo de formação do derivado BLM04 a partir do metabólito BLM-EM01.....	51

Figura 32. Estrutura química do derivado BLM07, obtido pela biotransformação da β -lapachona com o fungo <i>M. rouxii</i> . À direita estão a fórmula molecular, m/z em alta resolução, tempo de retenção em minutos (CLAE-DAD) e nome químico da respectiva estrutura.....	51
Figura 33. Espectro de RMN de ^1H do derivado da β -lapachona BLM07 (CD_3OD , 500 MHz).....	52
Figura 34. Estrutura química do derivado BLM08, obtido pela biotransformação da β -lapachona com o fungo <i>M. rouxii</i> . À direita estão a fórmula molecular, m/z em alta resolução, tempo de retenção em minutos (CLAE-DAD) e nome químico da respectiva estrutura.....	53
Figura 35. Espectro de RMN de ^1H do derivado da β -lapachona BLM08 (CD_3OD , 500 MHz).....	54
Figura 36. Estrutura química e espectro de EM/EM a 30 eV (CLUE-DAD-EM/EM) do derivado BLM-EM02.....	55
Figura 37. Proposta de mecanismo de fragmentação do derivado BLM-EM02.....	56
Figura 38. Rotas sugeridas para a produção de derivados da β -lapachona no processo de biotransformação desenvolvido com o fungo <i>Mucor rouxii</i>	57
Figura 39. Estruturas químicas do ácido oleanólico (1) e lupeol (2).....	57
Figura 40. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD da biotransformação da β -lapachona com o fungo <i>C. elegans</i> no sétimo dia de biotransformação, analisados em 245 nm. A) Cromatograma da biotransformação com a β -lapachona; B) Cromatograma do controle fúngico; C) Cromatograma do controle da β -lapachona com o meio de cultura Czapek modificado 1.....	59
Figura 41. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD das frações de biotransformação com o fungo <i>C. elegans</i> , analisados em 245 nm. A) Cromatograma da fração em 40% de acetonitrila; B) Cromatograma da fração em 50% de acetonitrila.....	59
Figura 42. Estrutura química do derivado BLC01, obtido pela biotransformação da β -lapachona com o fungo <i>C. elegans</i> . À direita estão a fórmula molecular, m/z em alta resolução, tempo de retenção em minutos (CLAE-DAD), nome químico e $[\alpha]_D$ da respectiva estrutura.....	60
Figura 43. Espectro de RMN de ^1H do derivado da β -lapachona BLC01 (CD_3OD , 500 MHz).....	62
Figura 44. Estrutura química do derivado BLC02, obtido pela biotransformação da β -lapachona com o fungo <i>C. elegans</i> . À direita estão a fórmula molecular, m/z em alta resolução, tempo de retenção em minutos (CLAE-DAD), nome químico e $[\alpha]_D$ da respectiva estrutura.....	63
Figura 45. Espectro de RMN de ^1H do derivado da β -lapachona BLC02 (CD_3OD , 500 MHz).....	64

Figura 46. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD no comprimento de onda 245 nm. A) Cromatograma do extrato de biotransformação com o fungo <i>C. echinulata</i> . B) Cromatograma do extrato do controle fúngico.....	65
Figura 47. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD no comprimento de onda 245 nm. A) Cromatograma do extrato de biotransformação com o fungo <i>C. echinulata</i> . B) Cromatograma do extrato de biotransformação com o fungo <i>C. elegans</i> . C e D) Comparação do espectro de absorção no UV do composto produzido em A e o espectro do derivado BLC02.....	66
Figura 48. Cromatograma obtido em CLAE semi-preparativa durante o isolamento do pico produzido na biotransformação com o fungo <i>C. echinulata</i>	66
Figura 49. Espectros de EM/EM obtidos em alta resolução no modo positivo de análise a 20 eV (IES-EM/EM). A) Espectro do derivado BLC01. B) Espectro do derivado BLC02. C) Espectro do derivado produzido pelo fungo <i>C. echinulata</i>	67
Figura 50. Proposta de rota de fragmentação do derivado BLC01 no modo positivo de análise (IES-EM/EM, 20 eV).....	68
Figura 51. Proposta de rota de fragmentação do derivado BLC02 no modo positivo de análise (IES-EM/EM, 20 eV).....	69
Figura 52. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD no comprimento de onda 245 nm. A) Ampliação do cromatograma do extrato de biotransformação com o fungo <i>C. echinulata</i> . B) Ampliação do cromatograma do extrato de biotransformação com o fungo <i>C. elegans</i>	69
Figura 53. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD no comprimento de onda 225 nm. A) Cromatograma do extrato de biotransformação com o fungo <i>P. crustosum</i> VR4 no meio fermentatido Czapek modificado 1. B) Cromatograma do extrato do controle fúngico.....	70
Figura 54. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD no comprimento de onda 225 nm. A) Cromatograma do extrato de biotransformação com o fungo <i>P. crustosum</i> VR4 no meio fermentatido Czapek modificado 3. B) Cromatograma do extrato do controle fúngico.....	71
Figura 55. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD no comprimento de onda 280 nm. A) Cromatograma do extrato de biotransformação com o fungo <i>P. immersa</i> SS13 no sétimo dia. B) Cromatograma do extrato do controle fúngico após sete dias de incubação.....	72
Figura 56. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD de extratos de biotransformação com o fungo <i>P. immersa</i> SS13 no comprimento de onda 280 nm. A) Cromatograma do extrato de biotransformação após 24 horas de incubação. B) Cromatograma do extrato de biotransformação após 48 horas de incubação. C) Cromatograma do extrato de biotransformação após 72 horas de incubação.....	72

Figura 57. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD no comprimento de onda 280 nm. A) Cromatograma do extrato de biotransformação da β -lapachona com o fungo <i>P. immersa</i> SS13 após 6 horas de incubação. B) Cromatograma do extrato do controle fúngico após 6 horas de incubação.....	73
Figura 58. Cromatograma obtido por CLAE na modalidade semi-preparativa durante o isolamento de metabólitos da fração em 60% de acetonitrila do extrato de biotransformação em grande escala com o fungo <i>P. immersa</i> , tendo como substrato a β -lapachona, monitorado nos comprimentos de onda 235 e 280 nm.....	73
Figura 59. Estrutura química do derivado BLS01, obtido na biotransformação da β -lapachona com o fungo <i>P. immersa</i> SS13. À direita estão a fórmula molecular, m/z em alta resolução, tempo de retenção em minutos (CLAE-DAD) e nome químico da respectiva estrutura.....	74
Figura 60. Espectro de RMN de ^1H do derivado da β -lapachona BLS01 (CD_3OD , 500 MHz).....	75
Figura 61. Espectro de RMN de ^1H do derivado da β -lapachona BLS02 (CD_3OD , 500 MHz).....	76
Figura 62. Estrutura química do derivado BLS02, obtido pela biotransformação da β -lapachona com o fungo <i>P. immersa</i> SS13.....	76
Figura 63. Estrutura química da α -lapachona, com dados de correlações no HMBC, fórmula molecular, m/z em alta resolução e tempo de retenção em minutos (CLAE-DAD).....	78
Figura 64. Espectro de RMN de ^1H da α -lapachona (CDCl_3 , 500 MHz).....	79
Figura 65. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD no comprimento de onda 251 nm dos extratos de biotransformação da α -lapachona com o fungo <i>M. rouxii</i> no segundo dia de contato. A) Após um dia de incubação. B) Após dois dias de incubação. C) Após três dias de incubação. D) Após quatro dias de incubação. E) Após cinco dias de incubação. F) Após seis dias de incubação. G) Após sete dias de incubação. H) Cromatograma do controle de estabilidade da α -lapachona com o meio Koch's K1 no sétimo dia de incubação.	80
Figura 66. Estrutura química do derivado ALM01D1, obtido pela biotransformação da α -lapachona com o fungo <i>M. rouxii</i> . À direita estão a fórmula molecular, m/z em alta resolução, tempo de retenção em minutos (CLAE-DAD) e nome químico da respectiva estrutura.....	81
Figura 67. Espectro de RMN de ^1H do derivado ALM01D1 da α -lapachona (CD_3OD , 500 MHz).....	83
Figura 68. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD das frações obtidas em SPE do extrato de biotransformação da α -lapachona com o fungo <i>M. rouxii</i> obtido em escala ampliada, no comprimento de onda 251 nm. A) Cromatograma da fração em 30% de acetonitrila. B) Cromatograma da fração em 40% de acetonitrila.	84

Figura 69. Cromatograma obtido por CLAE na modalidade semi-preparativa durante o isolamento de metabólitos da fração em 40% de acetonitrila do extrato de biotransformação em escala ampliada com o fungo <i>M. rouxii</i> , tendo como substrato a α -lapachona, monitorado nos comprimentos de onda 230 e 251 nm.....	84
Figura 70. Estrutura química do derivado ALM01D5, obtido pela biotransformação da α -lapachona com o fungo <i>M. rouxii</i> . À direita estão a fórmula molecular, m/z em alta resolução, tempo de retenção em minutos (CLAE-DAD) e nome químico da respectiva estrutura.....	85
Figura 71. Espectro de RMN de ^1H do derivado ALM01D1 da α -lapachona (CD_3OD , 500 MHz).....	86
Figura 72. Espectro de EM/EM do derivado ALM01D5 (IES-EM/EM, 20 eV).	87
Figura 73. Estrutura química do derivado ALM02D5, obtido pela biotransformação da α -lapachona com o fungo <i>M. rouxii</i> . À direita estão a fórmula molecular, m/z em alta resolução, tempo de retenção em minutos (CLAE-DAD) e nome químico da respectiva estrutura.....	87
Figura 74. Espectro de RMN de ^1H do derivado ALM02D5 da α -lapachona (CD_3OD , 500 MHz).....	89
Figura 75. Estrutura química do derivado obtido pelo metabolismo <i>in vitro</i> da β -lapachona (Adaptado de MIAO et al., 2009 e CHENG et al., 2012).....	89
Figura 76. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD no comprimento de onda 256 nm. A) Cromatograma do derivado ALM03D5. B) Espectro de absorção no UV do derivado ALM03D5. C) Cromatograma da β -lapachona. D) Espectro de absorção no UV da β -lapachona.....	90
Figura 77. Espectro de RMN de ^1H do derivado ALM03D1 (CDCl_3 , 500 MHz).....	90
Figura 78. Rota sugerida para produção de derivados da α -lapachona no processo de biotransformação desenvolvido com o fungo <i>Mucor rouxii</i>	91
Figura 79. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD no comprimento de onda 256 nm. A) Cromatograma do extrato de biotransformação com a bactéria <i>L. acidophilus</i> na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ de β -lapachona. B) Cromatograma do extrato do controle da cultura.....	92
Figura 80. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD no comprimento de onda 225 nm. A) Cromatograma do extrato de biotransformação com a bactéria <i>Bifidobacterium</i> sp. na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ de β -lapachona. B) Cromatograma do extrato do controle da cultura.....	93
Figura 81. Cromatograma obtido por CLUE-DAD-EM/EM (modo positivo) do extrato de biotransformação da β -lapachona pela bactéria <i>Bifidobacterium</i> sp. na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ da naftoquinona.....	94

Figura 82. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD no comprimento de onda 256 nm. A) Cromatograma do extrato de biotransformação com a cultura mista na concentração de 100 µg/mL de β-lapachona. B) Cromatograma do extrato do controle da cultura.....	95
Figura 83. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD no comprimento de onda 256 nm. A) Cromatograma do extrato de biotransformação com a bactéria <i>E. coli</i> em anaerobiose na concentração de 25 µg/mL de β-lapachona. B) Cromatograma do extrato do controle da cultura.....	96
Figura 84. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD no comprimento de onda 245 nm. A) Cromatograma do extrato de biotransformação com a bactéria <i>E. coli</i> em aerobiose na concentração de 25 µg/mL de β-lapachona. B) Cromatograma do extrato do controle da cultura.....	96
Figura 85. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD no comprimento de onda 245 nm. A) Cromatograma do extrato de biotransformação da β-lapachona pelo fungo <i>M. rouxii</i> . B) Cromatograma do extrato de biotransformação da β-lapachona pela bactéria <i>E. coli</i> em aerobiose. C e D) Comparação do espectro de absorção no UV do derivado BLM07 e o espectro do metabólito obtido com a biotransformação com a <i>E. coli</i> em aerobiose.....	97
Figura 86. Espectros de EM/EM obtidos em alta resolução no modo positivo de análise (IES-EM/EM, 25 eV). A) Espectro do derivado BLM07, obtido com o processo de biotransformação da β-lapachona pelo fungo <i>M. rouxii</i> . B) Espectro do derivado BLE-EM01, obtido com o processo de biotransformação da β-lapachona com a bactéria <i>E. coli</i> em aerobiose.....	98
Figura 87. Proposta de rota de fragmentação do derivado BLM07 e BLE-EM01 no modo positivo de análise (IES-EM/EM, 25 eV).....	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da β -lapachona e respectivas comparações com a literatura.....	35
Tabela 2. Valores de concentração inibitória mínima da β -lapachona frente aos micro-organismos e as respectivas concentrações da naftoquinona utilizadas nos processos de biotransformação.....	37
Tabela 3. Variação de pH durante os processos de biotransformação com o fungo <i>M. rouxii</i>	38
Tabela 4. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do derivado BLM01 e respectivas comparações com a literatura.....	40
Tabela 5. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do derivado BLM02 e respectivas comparações com a literatura.....	45
Tabela 6. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do derivado BLM04.....	49
Tabela 7. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do derivado BLM07 e respectivas comparações com a literatura.....	52
Tabela 8. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do derivado BLM08 e respectivas comparações com a literatura.....	54
Tabela 9. Dados de ^1H e ^{13}C do derivado BLC01.....	61
Tabela 10. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do derivado BLC02.....	63
Tabela 11. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do derivado BLS01 e respectivas comparações com a literatura.....	75
Tabela 12. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da α -lapachona e respectivas comparações com a literatura.....	78
Tabela 13. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do derivado ALM01D1.....	82
Tabela 14. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do derivado ALM01D5 e respectivas comparações com a literatura.....	85
Tabela 15. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do derivado ALM02D5 e respectivas comparações com a literatura.....	88

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	- Acetonitrila
ATCC	- “American Type Culture Collection”
B.O.D	- Incubadora com ventilação (Demanda Bioquímica de Oxigênio)
CLAE-DAD	- Cromatografia Líquida de alta eficiência acoplada a um detector de arranjo de diodos
CLUE-DAD-EM/EM	- Cromatografia Líquida de ultra eficiência, acoplada a um detector de arranjo de diodos e detector de massas
<i>d</i>	- Duplete
<i>dd</i>	- Duplo duplete
<i>ddd</i>	- Duplo duplo duplete
<i>dl</i>	- Duplete largo
EM/EM	- Espectrometria de massas sequencial
HMBC	- “Heteronuclear multiple bond coherence”
HMQC	- “Heteronuclear multiple quantum coherence”
IES-EM	- Espectrometria de massas com ionização por eletrospray
<i>J</i>	- Constante de acoplamento (em Hz)
<i>m</i>	- Multiplete
<i>m/z</i>	- Relação massa carga
MH	- Meio de cultura Mueller Hinton
MRS	- Meio de cultura DeMan-Rogosa-Sharpe
NQO1	- NAD(P)H:quinona oxidoredutase
PDA	- Ágar dextrose batata
PDB	- Caldo dextrose batata
RDA	- Reação retro Diels-Alder
RMN	- Ressonância magnética nuclear
RMN ¹³ C	- Ressonância magnética nuclear de carbono
RMN ¹ H	- Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
rpm	- Rotações por minuto
<i>s</i>	- Simpleto
SPE	- Extração em fase sólida
<i>t</i>	- Tripleto
<i>tl</i>	- Tripleto largo
TSB	- Caldo triptona de soja

u	- Unidade de massa atômica unificada
UFC	- Unidades formadoras de colônia
UV	- Ultravioleta
UV-VIS	- Ultravioleta – Visível
$[\alpha]_D$	- Rotação óptica específica

LISTA DE SÍMBOLOS

α	- Alfa
β	- Beta
δ	- Deslocamento químico (ppm)
®	- Marca Registrada
™	- Trademark

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de figuras	iii
Lista de tabelas	x
Lista de abreviaturas e siglas	xi
Lista de símbolos	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Transformações microbianas	2
1.2 Micro-organismos	3
1.3 A β -lapachona	6
1.4 Biotransformação de naftoquinonas de interesse biológico	9
2. OBJETIVOS	12
2.1 Objetivo geral	13
2.2 Objetivos específicos	13
3. MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1 Meios de cultura utilizados	15
3.2 Obtenção da β -lapachona	16
3.3 Micro-organismos utilizados nos processos de biotransformação	16
3.4 Manutenção dos fungos e das bactérias do trato gastrointestinal	17
3.5 Verificação de efeitos inibitórios da β -lapachona sobre os micro-organismos utilizados	18
3.6 Processos de biotransformação com a β -lapachona	19
3.6.1 Biotransformação com o fungo <i>Mucor rouxii</i>	19
3.6.2 Triagem com outros fungos filamentosos	20
3.6.3 Procedimento de biotransformação com as bactérias probióticas	21
3.6.4 Procedimento de biotransformação com a bactéria <i>Escherichia coli</i> em anaerobiose e aerobiose	22
3.7 Biotransformação da α -lapachona com o fungo <i>M. rouxii</i>	23
3.8 Biotransformações em escala preparativa	23
3.9 Avaliação dos perfis químicos dos extratos das culturas	25
3.10 Isolamento de metabólitos	26
3.11 Determinação estrutural dos produtos de biotransformação	30
3.12 Ensaios citotóxicos	31

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1 β -lapachona	34
4.2 Efeitos inibitórios da β -lapachona frente aos micro-organismos	36
4.3 Biotransformação com o fungo <i>Mucor rouxii</i> NRRL 1894	37
4.4 Triagem com outros fungos.....	58
4.4.1 Biotransformação com o fungo <i>Cunninghamella elegans</i> ATCC 10028b....	58
4.4.2 Biotransformação com o fungo <i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC 8688a	65
4.4.3 Biotransformação com o fungo <i>Penicillium crustosum</i> VR4	70
4.4.4 Biotransformação com o fungo <i>Papulaspora immersa</i> SS13	72
4.5 Biotransformação da α -lapachona com o fungo <i>Mucor rouxii</i> NRRL 1894...	77
4.6 Biotransformação da β -lapachona com as bactérias	92
4.6.1 Biotransformação com a bactéria <i>Lactobacillus acidophilus</i>	92
4.6.2 Biotransformação com a bactéria <i>Bifidobacterium</i> sp.	93
4.6.3 Biotransformação com a cultura láctea mista.....	94
4.6.4 Biotransformação com a bactéria <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 em anaerobiose	95
4.6.5 Biotransformação com a bactéria <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 em aerobiose	96
4.7 Atividade citotóxica.....	99
 5. CONCLUSÕES	 101
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	104
ANEXOS	117

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Transformações microbianas

Biotransformações são definidas como o uso de sistemas biológicos para realizar transformações químicas em substâncias que não constituem os substratos naturais (HANSON, 1995). Processos de biotransformação microbiana vêm sendo utilizados pela humanidade por milhares de anos, um exemplo é o processo de conversão do etanol em ácido acético (vinagre) por ação de bactérias do gênero *Acetobacter* (LERESCHE e MEYER, 2006).

Estudos sobre a biotransformação de fármacos constituem um passo importante e necessário na avaliação da eficácia e segurança dos mesmos. Pesquisas envolvendo o metabolismo *in vivo* com animais e seres humanos apresentam inúmeras desvantagens, como questões éticas e alto custo. Com isso, o uso de modelos microbianos está se tornando uma ferramenta complementar em estudos de metabolismo. Os micro-organismos podem ser usados como uma alternativa robusta e eficiente para obtenção de quantidades consideráveis de uma série de derivados de fármacos (ASHAA e VIDYAVATHI, 2009).

A utilização de fungos como modelos para metabolização de xenobióticos segue o conceito de que os fungos são organismos eucariotos e o aparato enzimático se assemelha com o dos mamíferos (ABOURACHED et al., 1999). Várias espécies produzem os mesmos metabólitos observados em humanos, provendo informações importantes sobre a biotransformação de fármacos e o entendimento sobre a evolução toxicológica e farmacológica desses metabólitos (PUPO et al., 2008).

Os fungos também são considerados muito promissores como novos biocatalizadores, principalmente em reações envolvendo compostos quirais, pois muitos autores reportam reações estereosseletivas mediadas por esses micro-organismos. Processos quimio-, regio-, e estereosseletivos são muito importantes na síntese de vários produtos químicos e farmacêuticos (BORGES et al., 2009a).

Além da utilização de fungos para estudos de 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. Certas substâncias somente se tornam farmacologicamente interessantes a partir de biotransformações ocorridas no trato

1. INTRODUÇÃO

gastrointestinal. Um caso clássico é o das isoflavonas da dieta (JIN et al., 2008; PHAM e SHAH, 2008).

Alguns exemplos de fármacos biotransformados pela microbiota intestinal são o cloranfenicol, prontosil, digoxina e a imipramina. Estes compostos chegam ao intestino, onde são expostos a bactérias intestinais que podem catalisar uma grande variedade de reações metabólicas devido à produção de enzimas como β -glucosidases, β -glucuronidases, nitroredutases, sulfóxido-redutases, amida hidroxilases, desaminases, acetiltransferases, β -galactosidases, entre outras. Ao contrário do metabolismo predominantemente oxidativo e conjugativo que ocorre no fígado e na mucosa intestinal, o metabolismo bacteriano é composto, principalmente, por reações de hidrólise e redução com um grande potencial para a ativação metabólica e desintoxicação de xenobióticos (ILETT et al., 1990).

1.2 Micro-organismos

A vida na Terra não seria possível sem micro-organismos, os quais têm contribuído para a ciência industrial a mais de 100 anos. Ferramentas importantes como a genômica funcional, proteômica, e metabolômica estão sendo exploradas para a descoberta de novas moléculas para a medicina, enzimas para a catálise, entre outros (DEMAIN e ADRIANO, 2008).

O cólon é composto por um ecossistema altamente complexo de micro-organismos anaeróbios e anaeróbios facultativos, onde a colonização corresponde a um número aproximado de 10^{12} unidades formadoras de colônia (UFC) por grama de conteúdo intestinal (DING et al, 2009; DUNNE, 2001; RUBINSTEIN, 1990).

As bactérias do trato gastrointestinal são essenciais para o bom funcionamento do organismo. Atualmente, muito se fala sobre probióticos (micro-organismos viáveis e benéficos à saúde), pois esses suplementos microbianos aumentam de maneira significativa o valor nutritivo e terapêutico dos alimentos, contribuindo para a predominância de uma microbiota intestinal saudável. Dentre os diversos gêneros que integram o grupo dos probióticos, destacam-se o *Bifidobacterium* e o *Lactobacillus* (COPPOLA e TURNES, 2004; HELLER, 2001; GOMES e MALCATA, 1999).

1. INTRODUÇÃO

As bifidobactérias foram relatadas pela primeira vez no final do século XIX por Tissier. Cerca de 30 espécies pertencem ao gênero, das quais 10 são de origem humana (oral, intestinal e vaginal). São filogeneticamente agrupadas como actinomicetos Gram-positivos (SGORBATI et al., 1995), e representam até 25% das bactérias fecais cultiváveis em adultos e 80% em lactentes. 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 a *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 de 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 linhagens de *E. coli*, revelaram a capacidade metabólica dessa espécie frente às isoflavonas genistina e daidzina (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 à metabolização de fármacos.

Fungos filamentosos têm sido extremamente úteis em processos de biotransformação (ZELINSKI e HAUER, 2002). As habilidades destes micro-organismos para realizar hidroxilações regio e estereosseletivas em triterpenos esteroidais, por exemplo, é bem conhecida e consiste em um método de bioconversão bastante explorado industrialmente (LACROIX et al., 1999). Fungos filamentosos também são capazes de biotransformar monoterpenos (MIYAZAWA et al., 1997), diterpenos (HANSON, 1992), bem como triterpenos pentacíclicos (COLLINS et al., 2002; KOUZI et al., 2000) e naftoquinonas como o lapachol (ASHAA e VIDYAVATHI, 2009).

O fungo *Mucor rouxii* tem demonstrado habilidades para biotransformar diferentes moléculas, muitas vezes originando vários derivados da estrutura precursora (CAPEL et al., 2011; CARVALHO et al., 2010). Autores constataram que

1. INTRODUÇÃO

este fungo foi capaz de promover hidroxilações em cadeias carbônicas (SRISAILAM e VEERESHAM, 2010; CARVALHO et al., 2010; LACROIX et al., 1999). Pelos resultados já obtidos e descritos na literatura, este fungo pode vir a contribuir para a obtenção de novos derivados da β -lapachona.

Fungos do gênero *Cunninghamella* se destacam pela capacidade de mimetizar o metabolismo de mamíferos, sendo capazes de catalisar reações tanto de fase I como de fase II (ABOURASHED et al., 2012; ASHAA e VIDYAVATHI, 2009). A espécie *C. echinulata* foi capaz de catalisar glicosilações em moléculas de interesse farmacêutico (LUSTOSA et al., 2012; MIYAKOSHI et al., 2010). Essa espécie também catalisou hidroxilações em cadeias carbônicas (MAATOOQ et al., 2010; LAMM et al., 2009). A espécie *C. elegans* é também muito utilizada por produzir derivados iguais aos detectados em estudos *in vivo* utilizando animais e seres humanos (MOODY et al., 2002; MOODY et al., 1999) devido, principalmente, a produção de enzimas da superfamília do citocromo P-450 (ASHAA e VIDYAVATHI, 2009; ZANGH et al., 1996).

Os fungos endofíticos também vêm sendo utilizados em processos de biotransformação de fármacos, sendo evidenciadas, em muitos casos, reações semelhantes às de fase I catalisadas por mamíferos. Esses micro-organismos já são bem conhecidos como fonte promissora de moléculas bioativas, e podem ser explorados em processos de transformação microbiana (BORGES et al., 2009b).

Em um trabalho de biotransformação realizado com o fungo endofítico *Papulaspora immersa* SS13, isolado do yacon (GALLO et al., 2010), o fármaco alendazol foi biotransformado de forma estereosseletiva (HILÁRIO et al., 2012).

Por sua vez, o fungo endofítico *Penicillium crustosum* VR4, isolado da espécie *Viguiera robusta* (GUIMARÃES et al., 2010), biotransformou o fármaco propranolol introduzindo um grupo hidroxílico na mesma posição que é observada em mamíferos. Nesse trabalho de Borges e colaboradores (2011), outros fungos endofíticos também foram capazes de catalisar essa mesma reação, mostrando que esses micro-organismos podem ser utilizados em trabalhos complementares de metabolismo, inclusive fornecendo quantidades de derivados suficientes para serem utilizadas como padrões.

Não restam dúvidas sobre a importância dos micro-organismos para estudos complementares de metabolismo de fármacos e candidatos a fármacos. Essas

1. INTRODUÇÃO

pesquisas geram informações que ajudam no entendimento do metabolismo dessas estruturas *in vivo* utilizando mamíferos e humanos.

1.3 A β -lapachona

A β -lapachona (Figura 1) é uma naftoquinona encontrada como constituinte minoritário no cerne de espécies do gênero *Tabebuia* (SILVA et al., 2003), que apresenta diversas atividades farmacológicas como antibacteriana, anticâncer e tripanocida (CAVALCANTE et al., 2008). A β -lapachona também pode ser sintetizada em laboratório a partir de precursores como o lapachol (CLAESSENS et al., 2010), sendo sintetizada pela primeira vez por Paternò em 1882, porém foi descrita mais detalhadamente somente em 1892, por Hooker.

Figura 1. Estrutura química da β -lapachona

Mais de um século se passou desde a sua descrição e, por ser um agente antineoplásico promissor, a β -lapachona tem sido incluída em ensaios clínicos como monoterapia e em combinação com outros fármacos citotóxicos (MIAO et al., 2009). Muitos estudos demonstram a atividade farmacológica dessa molécula frente a diferentes células cancerígenas (D'ANNEO et al., 2010; MOON et al., 2010; DONG et al., 2010; PARK et al., 2011). As patentes concedidas envolvendo esta naftoquinona e seus derivados (PARDEE et al., 2005; PARDEE et al., 2000; FRYDMAN et al., 1997; BOOTHMAN et al., 1995) demonstram a importância e o grande interesse voltado ao uso comercial desta substância.

1. INTRODUÇÃO

Esta naftoquinona também apresentou-se ativa contra infecções causadas por *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (MEDEIROS et al., 2010); foi capaz de acelerar a cicatrização de feridas, através do aumento da proliferação celular (queratinócitos, fibroblastos e células endoteliais) e migração de células para o local da lesão (KUNG et al., 2008); demonstrou atividade contra *Giardia lamblia* (CORRÊA et al., 2009); inibiu a atividade da enzima cisteína-proteinase de *Trypanosoma cruzi* (BOURGUIGNON et al., 2011); e foi capaz de diminuir a replicação do vírus HIV-1 em células mononucleares periféricas do sangue, de forma dose dependente (LI et al., 1993a).

Em um trabalho realizado por D'Anneo et al. (2010) foi constatado que a combinação sinérgica do Paclitaxel e da β -lapachona induz potentes efeitos apoptóticos em células do retinoblastoma Y79 humano. Essa combinação causou sinais bioquímicos e morfológicos de apoptose em 48 horas de tratamento.

Dentre os mecanismos de ação anticancerígena da β -lapachona estão a inibição das topoisomerasas I (LI et al., 1993b) e II (KRISHNAN e BASTOW, 2000). Esta naftoquinona está sob investigação para o tratamento de cânceres específicos associados a elevados níveis citosólicos da flavoenzima NAD(P)H:quinona oxidoredutase (NQO1) (SIEGEL et al., 2012; REINICKE et al., 2005), como os de mama (TERAI et al., 2009; SIEGEL e ROSS, 2000), pulmão, cólon, ovário (SIEGEL e ROSS, 2000), pâncreas (OUGH et al., 2005) e próstata (PLANCHON et al., 2001).

As naftoquinonas apresentam estrutura química peculiar com capacidade de induzir o estresse oxidativo e essa capacidade de agir como agentes oxidantes pode explicar parte das atividades farmacológicas atribuídas a esses compostos (PINTO e CASTRO, 2009). Estudos mostram que a enzima NQO1 está envolvida na geração de espécies reativas de oxigênio das quinonas (SIEGEL et al., 2012). Essa flavoenzima catalisa duas reduções na β -lapachona, formando a hidroquinona correspondente, que por ser instável interage com oxigênio molecular para formação do núcleo quinonóide novamente, gerando espécies reativas de oxigênio que acabam levando à apoptose celular (Figura 2) (SIEGEL et al., 2012; PINTO e CASTRO, 2009).

1. INTRODUÇÃO

Figura 2. Via de bioativação da β-lapachona pela enzima NQO1 (Adaptado de SIEGEL et al., 2012).

Existem alguns trabalhos de metabolismo *in vitro* (CHENG et al., 2012; MIAO et al., 2009; MIAO et al., 2008) e *in vivo* (SAVAGE et al., 2008) da β-lapachona utilizando diferentes metodologias, porém em todos houveram rendimentos muito baixos, dificultando a caracterização estrutural dos derivados. Estudos de metabolização microbiana são mais baratos e possibilitam maiores rendimentos, quando comparados com ensaios *in vivo* ou *in vitro* utilizando animais, humanos, células ou enzimas isoladas. Portanto, processos de biotransformação empregando culturas microbianas podem facilitar o entendimento da metabolização de candidatos a fármacos, pois podem fornecer os mesmos derivados obtidos em estudos com humanos, além de possibilitar estudos biológicos e toxicológicos com os produtos formados.

A biotransformação microbiana da β-lapachona também pode dar origem a derivados ainda não relatados na literatura e que podem apresentar atividade biológica interessante. Diversos derivados sintéticos dessa naftoquinona mostraram-se ativos contra células cancerígenas (RÍOS-LUCI et al., 2012); *Trypanossoma cruzi* (SILVA JUNIOR et al., 2010; MENNA-BARRETO et al., 2007; FERREIRA et al., 2006); *Mycobacterium tuberculosis* (COELHO et al., 2010); e *Plasmodium falciparum* (ANDRADE-NETO et al., 2004). Esse fato mostra que pesquisas envolvendo a biotransformação da β-lapachona são muito promissoras e ajudarão a compreender melhor a metabolização microbiana dessa importante naftoquinona, com possibilidade de estudar os efeitos biológicos dos derivados formados.

1. INTRODUÇÃO

1.4 Biotransformação de naftoquinonas de interesse biológico

Existem trabalhos na literatura envolvendo a biotransformação microbiana do lapachol (Figura 3), um isômero natural da β -lapachona, que também apresenta diversas atividades biológicas interessantes, dentre elas a atividade anticancerígena (ALMEIDA, 2009).

Figura 3. Estrutura química do lapachol.

No trabalho de Otten e Rosazza (1978) foi realizada uma triagem com 48 fungos para verificação da biotransformação do lapachol. O fungo *Penicillium nonatum*, dentre outros fungos filamentosos, como *Cunninghamella echinulata* e *Mucor mucedo*, foi capaz de biotransformar a naftoquinona em uma estrutura polar, com formação de grupamento ácido carboxílico pela abertura oxidativa do anel B (Figura 4).

Figura 4. Estrutura química do derivado do lapachol produzido por fungos filamentosos (Adaptado de OTTEN e ROSAZZA, 1978).

A biotransformação do lapachol também deu origem a deidro- α -lapachona (Figura 5) pela ação do fungo *Curvularia lunata* (OTTEN e ROSAZZA, 1979).

1. INTRODUÇÃO

Figura 5. Estrutura química da dehidro- α -lapachona produzida a partir do lapachol por biotransformação com o fungo *Curvularia lunata* (Adaptado de OTTEN e ROSAZZA, 1979).

No trabalho de Otten e Rosazza (1981), esses autores avaliaram a capacidade do fungo *Cunninghamella echinulata* em biotransformar o lapachol. Foram identificados três metabólitos (Figura 6), sendo um deles glicosilado (**1**), reação bastante descrita para o gênero *Cunninghamella*.

Figura 6. Estruturas químicas dos derivados do lapachol obtidos por biotransformação com o fungo *Cunninghamella echinulata* (Adaptado de OTTEN e ROSAZZA, 1981).

Diversificando o gênero e a origem do micro-organismo, aumenta-se a possibilidade de se obter uma diversidade metabólica maior de um mesmo substrato. O estudo de biotransformação microbiana do lapachol confirma o interesse pelo estudo com seu isômero β -lapachona. Muito precisa ser feito para o entendimento da metabolização de naftoquinonas e a biotransformação de análogos

1. INTRODUÇÃO

da β -lapachona pode auxiliar no entendimento dos metabólitos formados durante transformações microbianas da mesma.

Outro isômero da β -lapachona é a α -lapachona (Figura 7), uma *para*-naftoquinona que também apresenta atividades biológicas interessantes, embora seja menos ativa que seu isômero *orto*-naftoquinona, como por exemplo, na ação contra linhagens tumorais (RÍOS-LUCI et al., 2012) e frente ao parasita *Trypanossoma cruzi* (BOURGUIGNON et al., 2011).

Figura 7. Estrutura química da α -lapachona.

A α -lapachona, assim como a β -lapachona, não foi estudada quanto ao seu metabolismo, e estudos com essa *para*-naftoquinona podem auxiliar no entendimento do metabolismo da β -lapachona, complementando o conhecimento sobre os possíveis derivados formados com a *orto*-naftoquinona utilizando micro-organismos.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver processos de transformação microbiana da β -lapachona utilizando fungos filamentosos e bactérias do trato gastrointestinal, bem como isolar e caracterizar estruturalmente os derivados de biotransformação majoritários, avaliando o potencial biológico destas substâncias frente à linhagem celular neoplásica e normal.

2.2 Objetivos específicos

- Obter a β -lapachona a partir do lapachol;
- Determinar a concentração de β -lapachona a ser utilizada nos processos de biotransformação, através de ensaio de inibição microbiana por microdiluição;
- Desenvolver processos de biotransformação da β -lapachona utilizando os fungos filamentosos *Mucor rouxii* NRRL 1894, *Papulaspora immersa* SS13, *Penicillium crustosum* VR4, *Cunninghamella elegans* ATCC 10028b e *Cunninghamella echinulata* ATCC 8688a;
- Realizar procedimentos de transformação microbiana da β -lapachona utilizando as bactérias da microbiota intestinal *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* sp. e *Escherichia coli* ATCC 25922, além de cultura láctica de cepas mistas contendo *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* sp. e *Streptococcus salivarius* subesp. *thermophilus*;
- Selecionar os processos mais promissores para desenvolvimento em escala ampliada visando o isolamento de metabólitos;
- Isolar e determinar as estruturas químicas de derivados majoritários obtidos nos processos selecionados;
- Realizar um estudo comparativo entre os processos de biotransformação da β -lapachona e da α -lapachona com o fungo *M. rouxii*;
- Analisar semelhanças entre o metabolismo microbiano e o metabolismo humano através de comparação com a literatura;
- Avaliar a atividade citotóxica dos derivados majoritários frente à linhagem de câncer de mama humano SKBR-3 e de fibroblastos normais humanos GM07492-A.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Meios de cultura utilizados

Meios sólidos:

- PDA: Ágar dextrose batata (Himedia);
- Malte: 2,0% de extrato de malte (Himedia), 2,0% de glicose (Synth), 0,1% de peptona (Himedia), 1,8% de ágar (Himedia);
- Ágar MRS: Caldo DeMan-Rogosa-Sharpe (Oxoid), 1,8% de ágar (Himedia);
- Ágar MH: Ágar Mueller Hinton (Himedia)

Meios líquidos:

- PDB: Caldo dextrose batata (Acumedia);
- TSB: Caldo triptona de soja (Himedia);
- Jackson (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 (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);
- Koch's K1: 0,18% de glicose (Synth), 0,06% de peptona (Himedia) e 0,04% de extrato de levedura (Himedia);
- Czapek modificado 1: 1,0% de glicose (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 e 0,001% de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Vetec), pH 7,0;
- Czapek modificado 2: 2,5% de glicose (Synth); 0,05% de extrato de levedura (Himedia); 0,25% KH_2PO_4 (Vetec), 0,1% de NaNO_3 (Vetec), 0,025% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Vetec), 0,0005% de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Vetec), pH 6,5-7;
- Czapek modificado 3: 0,05% de extrato de levedura (Himedia); 0,25% KH_2PO_4 (Vetec), 0,1% de NaNO_3 (Vetec), 0,025% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Vetec), 0,0005% de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Vetec), pH 6,5-7,0;
- Caldo MRS: Caldo DeMan-Rogosa-Sharpe (Oxoid);
- Caldo MH: Caldo Mueller Hinton (Himedia).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os meios de cultura foram preparados com água deionizada e esterilizados em autoclave (Phoenix) a 121 °C, por 20 minutos.

3.2 Obtenção da β -lapachona

A β -lapachona foi obtida a partir da heterociclização do lapachol em meio ácido, segundo procedimento semissintético clássico descrito por Hooker (1892). O lapachol utilizado foi adquirido comercialmente (Sigma-Aldrich®).

Para o processo de semissíntese, o lapachol foi colocado em um béquer e completamente dissolvido em ácido sulfúrico com auxílio de um bastão de vidro, na proporção de 1 g de lapachol para 5 mL de ácido. A solução vermelha formada instantaneamente foi vertida em outro béquer contendo água gelada, e o precipitado foi filtrado com auxílio de funil de Büchner e Kitassato acoplado em bomba a vácuo. Em seguida, o precipitado retido no papel de filtro foi recristalizado com hexano a quente e acetona (9:1). Todo o processo de semissíntese foi gentilmente orientado pelo Prof. Dr. Flávio da Silva Emery (FCFRP-USP).

Após a semissíntese, o produto reacional passou por um processo de purificação para eliminação do isômero α -lapachona. Tal procedimento foi feito utilizando-se cromatografia em coluna clássica, com sílica gel 60 (0,200-0,063 mm) (Merck), e sistema de eluição isocrático constituído por hexano e acetato de etila (8:2). Foram utilizadas 10 g de sílica gel em uma coluna de vidro de 1 cm de diâmetro por 60 cm de altura, totalizando cerca de 47 cm de fase estacionária. A quantidade de β -lapachona aplicada na coluna foi de 100 mg por eluição cromatográfica. O rendimento final de β -lapachona, após o procedimento de semissíntese e purificação em coluna, foi de 92 a 95%.

3.3 Micro-organismos utilizados nos processos de biotransformação

O fungo filamentoso *Mucor rouxii* NRRL 1894 foi cedido pelo Dr. C. W. Hesseltine (Northern Utilization Research and Development Division, ARS, USDA, Peoria, IL, USA), e pertence à coleção mantida no Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, sob responsabilidade da Profa. Dra. Maria de Lourdes Teixeira de Moraes Polizeli e Prof. Dr. João Atílio Jorge.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os micro-organismos endofíticos *Papulaspora immersa* SS13 isolado de *Smallanthus sonchifolius* (GALLO et al., 2010), e *Penicillium crustosum* VR4 isolado de *Viguiera robusta* (GUIMARÃES et al., 2010), ambos pertencentes à coleção de micro-organismos endofíticos do Laboratório de Química de Micro-organismos da FCFRP-USP, foram gentilmente disponibilizados pela Profa. Dra. Mônica Tallarico Pupo.

As culturas lácteas, incluindo cultura láctica contendo *Lactobacillus acidophilus* (FERM FD DVS LA-5[®] - Probio-TecTM), cultura láctica contendo *Bifidobacterium* sp. (FERM FD DVS BB 12[®] - Probio-TecTM) e cultura láctica de cepas mistas contendo *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* sp. e *Streptococcus salivarius* subesp. *thermophilus* (FERM F DVS ABT-4), foram adquiridas da CHR Hansen, a qual fornece às indústrias alimentícias culturas de micro-organismos para a produção de alimentos funcionais probióticos.

A bactéria *Escherichia coli* ATCC 25922 e os fungos *Cunninghamella echinulata* var. *elegans* ATCC 8688a e *Cunninghamella elegans* ATCC 10028b foram adquiridos comercialmente.

3.4 Manutenção dos fungos e das bactérias do trato gastrointestinal

Para confecção dos estoques das culturas fúngicas, todos os fungos utilizados nessa pesquisa foram cultivados separadamente em Placas de Petri contendo meio PDA, durante sete dias em incubadora com ventilação (B.O.D.) a 30 °C. Após esse período, três discos de micélio-ágar de aproximadamente 6 mm de diâmetro, obtidos com auxílio de um tubo de transferência (Sigma[®]) esterilizado, foram transferidos para criotubos esterilizados contendo 2 mL de água deionizada autoclavada. Os criotubos foram então vedados e mantidos sob refrigeração em geladeira (4 °C).

Adicionalmente, para o fungo *M. rouxii* que apresenta uma boa esporulação, também foram feitos estoques em meio de cultura PDA e extrato de Malte e em solução glicerizada 60%. Para isso, o fungo foi cultivado em tubos de ensaio médios contendo 30 mL de meio PDA ou Malte inclinados durante sete dias em B.O.D. a 30 °C. Após esse período, 5 mL de água deionizada esterilizada foram adicionados em um dos tubos, os esporos foram raspados e o estoque foi preparado em solução aquosa contendo 60% v/v de glicerol e armazenado em freezer (-20 °C). Ao restante

3. MATERIAL E MÉTODOS

dos tubos cultivados foram adicionados 3 mL de água deionizada autoclavada e, em seguida, os tubos foram vedados e armazenados à temperatura ambiente.

As culturas das bactérias probióticas foram mantidas congeladas (-20 °C) em caldo MRS, acrescido de L-cisteína/HCl (0,05%), contendo 20% v/v de glicerol e 50% v/v de sangue desfibrinado de carneiro (Ebefarma).

A linhagem de *Escherichia coli* foi mantida congelada (-20 °C) em caldo TSB contendo 40% v/v de glicerol.

3.5 Verificação de efeitos inibitórios da β -lapachona sobre os micro-organismos utilizados

Para determinar as concentrações de β -lapachona a serem utilizadas nos processos de biotransformação foi adotado o método de microdiluição em microplaca segundo a metodologia preconizada pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards, atualmente denominado Clinical and Laboratory Standards Institute, com adaptações (CLSI, 2008; CLSI, 2007; CLSI, 2006).

Os micro-organismos foram cultivados previamente em meio sólido, sendo tubos contendo meio Malte para o fungo *M. rouxii*, placas contendo meio PDA para os demais fungos, placas contendo ágar MRS para as bactérias probióticas e cultura mista e placas contendo ágar MH para a bactéria *E. coli*. As culturas desenvolvidas foram utilizadas para a preparação dos inóculos.

Para 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 e para *E. coli* foi o caldo MH, sendo o tamanho do inóculo de 10^6 UFC/mL em todos os casos. Para o fungo *M. rouxii* o meio de cultura utilizado foi o Koch's K1 e o inóculo preparado foi de 4×10^6 esporos/mL. No caso dos fungos endofíticos *P. crustosum* e *P. immersa* e dos comerciais *C. elegans* e *C. echinulata* foi utilizado o meio Czapek modificado 1 e o inóculo foi preparado adicionando 10 mL do respectivo caldo em placas contendo cada um dos fungos desenvolvidos, sendo feita a raspagem micelial.

As concentrações de β -lapachona testadas em todos os casos variaram de 400 a 0,195 $\mu\text{g/mL}$ por meio de diluição seriada. Para isso, 1 mg de β -lapachona foi

3. MATERIAL E MÉTODOS

dissolvido em 125 μL de dimetilsulfóxido (DMSO) 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 $\mu\text{g/mL}$). 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 $\mu\text{g/mL}$. Depois de proceder com a diluição seriada, foram adicionados em cada poço 80 μL 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 $\mu\text{g/mL}$.

Foram feitos controles de esterilidade dos meios de cultivo, de crescimento do inóculo na presença de 5 a 1% de DMSO, de esterilidade da β -lapachona, de viabilidade do inóculo e também controles positivos, utilizando miconazol para os fungos, penicilina para as bactérias probióticas e estreptomicina para a bactéria *E. coli*. Para facilitar a visualização de crescimento bacteriano, utilizou-se como indicador de viabilidade celular 40 μL de uma solução de resazurina a 0,02% em cada poço. Para os fungos não foi necessário o uso de indicadores de viabilidade celular.

3.6 Processos de biotransformação com a β -lapachona

3.6.1 Biotransformação com o fungo *Mucor rouxii*

O fungo filamentoso *Mucor rouxii* foi cultivado em tubos contendo 10 mL de meio extrato de Malte inclinado, por sete dias em B.O.D. a 30 °C. Após o término do período de incubação foram adicionados 5 mL de água esterilizada em cada tubo de ensaio, sendo feita a raspagem dos esporos que foram transferidos para um Erlenmeyer esterilizado. Em seguida, foi efetuada a contagem do número de esporos dessa suspensão em Câmara de Neubauer e um inóculo foi transferido para Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio pré-fermentativo descrito por Jackson et al. (1993), de modo que a concentração final de esporos fosse 4×10^6 esporos/mL. Após 48 horas de cultivo, sob agitação constante de 120 rpm e temperatura de 30 °C, o fungo atingia a fase estacionária e a produção de biomassa era satisfatória (CAPEL et al., 2011).

3. MATERIAL E MÉTODOS

As massas miceliais obtidas no meio pré-fermentativo foram filtradas assepticamente e transferidas para Erlenmeyers de 500 mL contendo 100 mL do meio fermentativo Koch's K1. Nesse momento, 1 mL de uma solução de 5 mg/mL de β -lapachona em DMSO foi adicionado em cada Erlenmeyer.

As culturas foram desenvolvidas a 30°C, sob agitação constante de 120 rpm, e monitoradas a cada 24 horas durante sete dias, conforme descrito no item 3.9 (página 25). Foram feitos controles diários da cultura fúngica contendo 1% de DMSO e também do meio fermentativo com a β -lapachona diluída em 1% de DMSO, também durante sete dias. Os extratos foram preparados após filtração da massa micelial, sendo feitas partições líquido-líquido com acetato de etila do caldo de cultivo por três vezes consecutivas. Após a partição, foi adicionado sulfato de sódio anidro ao extrato para retirada de água proveniente do caldo de cultivo, sendo o extrato filtrado e o solvente evaporado sob pressão reduzida, em temperaturas próximas de 40 °C, para obtenção do extrato seco. Todos os extratos foram protegidos da luz e armazenados sob refrigeração.

3.6.2 Triagem com outros fungos filamentosos

Os fungos endofíticos *Papulaspora immersa* SS13 e *Penicillium crustosum* VR4, e os fungos comerciais *Cunninghamella echinulata* var. *elegans* ATCC 8688a e *Cunninghamella elegans* ATCC 10028b também foram avaliados quanto ao potencial para biotransformar a β -lapachona.

Para isso, os fungos foram cultivados individualmente em Placas de Petri contendo ágar PDA, durante sete dias em B.O.D. a 30 °C. Após esse período, três discos de micélio-ágar de aproximadamente 6 mm de diâmetro, obtidos com auxílio de um tubo de transferência (Sigma®) esterilizado, foram transferidos para Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de caldo PDB. As culturas foram mantidas sob agitação constante de 120 rpm e temperatura de 30 °C, durante seis dias. Após esse período, as massas miceliais foram filtradas assepticamente e transferidas separadamente para Erlenmeyers de 500 mL contendo 100 mL de meio fermentativo Czapek modificado 1. Nesse momento a β -lapachona foi adicionada na concentração de 100 μ g/mL para os fungos *P. immersa* e *P. crustosum*, e na concentração de 50 μ g/mL para os fungos *C. echinulata* e *C. elegans*, estando a naftoquinona solubilizada em DMSO, sendo que a concentração final deste solvente

3. MATERIAL E MÉTODOS

foi de 1% no meio fermentativo. As culturas foram mantidas sob agitação constante de 120 rpm e temperatura de 30 °C, sendo as biotransformações avaliadas apenas no sétimo dia. Foram feitos controles das culturas fúngicas contendo 1% de DMSO e da β -lapachona no meio fermentativo. Os extratos foram preparados conforme descrito na seção 3.6.1 para o fungo *Mucor rouxii*.

O fungo *P. crustosum* também foi cultivado em 100 mL de meio pré-fermentativo Czapek modificado 2 em Erlenmeyers de 500 mL, durante sete dias, a 120 rpm e 30 °C. Em seguida, utilizou-se como meio fermentativo 100 mL de caldo Czapek modificado 3 em Erlenmeyers de 500 mL de capacidade (ALMEIDA, 2010; BORGES, 2010). O período de incubação desse fungo no meio pré-fermentativo também foi de seis dias, sendo a biotransformação também avaliada no sétimo dia de incubação. Foram feitos controles da cultura fúngica e da β -lapachona no meio fermentativo. Os procedimentos para preparação dos extratos foram os mesmos descritos para os demais processos de biotransformação fúngica.

3.6.3 Procedimento de biotransformação com as bactérias probióticas

Todos os procedimentos de cultivo e biotransformação com as bactérias probióticas foram feitos em câmara de anaerobiose, em atmosfera de 85% de nitrogênio, 10% de dióxido de carbono e 5% de gás hidrogênio, na temperatura controlada de 37 °C.

Antes da realização dos processos de biotransformação foram determinados os tempos de cultivo das culturas utilizadas, para que estas alcançassem a fase estacionária. Para a realização dos processos de biotransformação, as culturas estocadas foram inicialmente reativadas em caldo MRS, acrescido de L-cisteína/HCl (0,05%), sendo adicionados 33,3% de glicose no meio de cultivo destinado à cultura láctica contendo *Lactobacillus acidophilus* e à cultura láctica mista, para favorecimento do crescimento (GODERSKA et al., 2008). As culturas permaneceram no caldo durante 24 horas, sendo posteriormente inoculadas em Placas de Petri contendo ágar MRS e cultivadas por 72 horas a 37 °C.

Para a biotransformação, um inóculo final de 10^6 UFC/mL, foi transferido para Erlenmeyers de 125 mL contendo 30 mL de caldo MRS acrescido de L-cisteína/HCl (0,05%). O inóculo foi preparado por turbidimetria em espectrofotômetro a 625 nm. As bactérias foram cultivadas sob agitação, com auxílio de barra magnética, até

3. MATERIAL E MÉTODOS

atingirem a fase estacionária (36 horas para *Bifidobacterium* sp., 12 horas para *L. Acidophilus* e 18 horas para a mistura láctea), sendo então adicionada a β -lapachona solubilizada em DMSO nas concentrações de 100, 50, 25 e 12,5 $\mu\text{g/mL}$, sendo a concentração final de DMSO igual a 1% no meio de cultivo. Os processos de biotransformação foram avaliados após 24 horas de incubação.

Foram feitos controles da cultura bacteriana contendo 1% de DMSO e do meio de cultura contendo 100 $\mu\text{g/mL}$ de β -lapachona em DMSO (concentração final do DMSO no meio de cultura igual a 1%). Para obtenção dos extratos, as culturas foram inicialmente centrifugadas durante três minutos a 4000 rpm, sob refrigeração de 15 °C. Posteriormente, foi feita partição líquido-líquido dos sobrenadantes com acetato de etila, por três vezes consecutivas. Após a partição, foi adicionado sulfato de sódio anidro ao extrato para retirada de água proveniente do caldo de cultivo, sendo o extrato filtrado e o solvente evaporado sob pressão reduzida, a temperaturas próximas de 40 °C, para obtenção do extrato seco. Todos os extratos foram protegidos da luz e armazenados sob refrigeração.

3.6.4 Procedimento de biotransformação com a bactéria *Escherichia coli* em anaerobiose e aerobiose

Como a bactéria *Escherichia coli* é um micro-organismo facultativo, o tempo de cultivo da cultura para que esta alcançasse a fase estacionária foi determinado em condições anaeróbias e aeróbias.

No processo de biotransformação, a bactéria foi primeiramente reativada em caldo MH tanto em câmara de anaerobiose (em atmosfera de 85% de nitrogênio, 10% de dióxido de carbono e 5% de gás hidrogênio) como em condições aeróbias em estufa, ambos a 37 °C. Após 24 horas nessas condições, as culturas foram transferidas para placas de Petri contendo ágar MH e incubadas nas condições anaeróbia ou aeróbia, respectivamente, sendo cultivadas por 24 horas.

Após esse período, um inóculo final de 10^6 UFC/mL, estabelecido conforme a curva de crescimento, foi transferido para Erlenmeyers de 125 mL contendo 30 mL de caldo MH. O inóculo foi preparado por turbidimetria em espectrofotômetro a 625 nm. A bactéria cultivada em anaerobiose foi mantida sob agitação, com auxílio de barra magnética, e a *E. coli* cultivada em aerobiose foi mantida em mesa agitadora sob agitação constante de 120 rpm, ambas a 37 °C. Após 12 horas, quando as

3. MATERIAL E MÉTODOS

culturas atingiram a fase estacionária, a β -lapachona solubilizada em DMSO foi adicionada nas concentrações de 100, 50, 25 e 12,5 $\mu\text{g/mL}$, estando a concentração final de DMSO em 1% no caldo de cultivo. Os processos de biotransformação foram avaliados após 24 horas de incubação.

Foram feitos controles da cultura bacteriana contendo 1% de DMSO e do meio de cultura contendo 100 $\mu\text{g/mL}$ de β -lapachona solubilizada em DMSO (concentração final do DMSO no meio de cultura igual a 1%), tanto para a biotransformação em aerobiose como para a em anaerobiose. Os extratos foram preparados conforme descrito na seção 3.6.3 para as bactérias probióticas.

3.7 Biotransformação da α -lapachona com o fungo *M. rouxii*

Com o intuito de estabelecer uma comparação entre o metabolismo da β -lapachona com o do seu isômero α -lapachona pelo fungo *M. rouxii*, o procedimento em pequena escala, descrito no item 3.6.1, foi também realizado para essa naftoquinona. Esse micro-organismo foi escolhido por ter propiciado a obtenção de um perfil de biotransformação mais complexo com a β -lapachona. A α -lapachona foi gentilmente disponibilizada pelo Prof. Dr. Flávio da Silva Emery, sendo a biotransformação acompanhada diariamente através dos perfis químicos dos extratos, durante sete dias.

3.8 Biotransformações em escala preparativa

Os processos de biotransformação com os fungos *Mucor rouxii*, *Papulaspora immersa* e *Cunninghamella elegans* e com a bactéria *Bifidobacterium* sp. foram os selecionados para o desenvolvimento em escala ampliada, visando à obtenção de maior quantidade de extrato para o isolamento dos produtos de biotransformação da β -lapachona. Destaca-se que para esse processo houve o aumento do número de Erlenmeyers cultivados.

Para o fungo *M. rouxii*, o segundo dia de biotransformação foi selecionado para o aumento de escala. Como o extrato apresentou um perfil químico complexo, foram cultivados 56 Erlenmeyers, totalizando 280 mg de β -lapachona biotransformada e 355,8 mg de extrato bruto. Para a obtenção desta quantidade de extrato bruto, foram realizadas três biotransformações em escala ampliada:

3. MATERIAL E MÉTODOS

1^a) Biotransformou-se 80 mg de β -lapachona (16 Erlenmeyers) obtendo-se 103,2 mg de extrato; 2^a) foram biotransformados 60 mg da naftoquinona (12 Erlenmeyers) obtendo-se 77,1 mg de extrato; e 3^a) foram utilizados 140 mg de β -lapachona (28 Erlenmeyers) obtendo-se 175,5 mg de extrato.

Na triagem de biotransformação, descrita no item 3.6.2, os únicos fungos que produziram extratos cujos perfis químicos mostraram-se promissores foram o endofítico *Papulaspora immersa* e o comercial *Cunningamella elegans*. No entanto, para o fungo endofítico, houve o desaparecimento completo da β -lapachona e o aparecimento de picos com baixa intensidade por CLAE-DAD no sétimo dia. Então, foi feita a triagem com um, dois e três dias de biotransformação, sendo evidenciado, já nas primeiras 24 horas, esse perfil de picos com baixa intensidade e desaparecimento completo da β -lapachona. O procedimento foi realizado novamente e a biotransformação monitorada após 6 horas de contato da β -lapachona com o fungo *P. immersa*, e esse foi o tempo determinado para o aumento de escala.

Foram biotransformados 60 mg de β -lapachona (6 Erlenmeyers) com o fungo *P. immersa*, obtendo-se 64,7 mg de extrato. O procedimento em escala ampliada foi realizado apenas uma vez, pois no perfil químico do extrato analisado por CLAE-DAD foram detectados apenas dois derivados majoritários, quando comparado com o perfil químico do controle fúngico.

Com o fungo *C. elegans*, no perfil químico do extrato analisado por CLAE-DAD também foram detectados dois picos majoritários de possíveis produtos de biotransformação. O aumento de escala foi feito com 65 mg de β -lapachona (13 Erlenmeyers) obtendo-se 88,0 mg de extrato bruto, sendo o tempo de biotransformação sete dias.

Houve baixo rendimento nos processos de biotransformação realizados com as bactérias, e na tentativa de obter maior quantidade de extrato para o isolamento de derivados, aumentou-se a escala de biotransformação com a bactéria probiótica *Bifidobacterium* sp. Para isso foram biotransformados 15 mg de β -lapachona (5 Erlenmeyers) totalizando 109,6 mg de extrato bruto, após 24 horas de contato do micro-organismo com a naftoquinona. Destaca-se que se obteve grande quantidade de extrato devido ao meio de cultivo utilizado ser bastante complexo, quando comparado com os meios fermentativos utilizados para a biotransformação com os fungos filamentosos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O procedimento de aumento de escala com a α -lapachona foi realizado no primeiro dia de biotransformação e no quinto dia. Isso porque, foi evidenciado que no primeiro dia era produzido um derivado majoritário que diminuía de intensidade com o passar dos dias, por monitoramento em CLAE-DAD, até que no quinto dia era formado um derivado de biotransformação majoritário com tempo de retenção e espectro de absorção no UV diferentes. Para o processo de biotransformação no primeiro dia, foram biotransformados 60 mg de α -lapachona (12 Erlenmeyers), totalizando 77,0 mg de extrato bruto; e para a biotransformação em escala ampliada no quinto dia também foram biotransformados 60 mg de α -lapachona (12 Erlenmeyers) obtendo-se 76,5 mg de extrato bruto.

3.9 Avaliação dos perfis químicos dos extratos das culturas

Os extratos brutos foram analisados utilizando-se Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em cromatógrafo Shimadzu[®] acoplado a um detector de arranjo de diodos (DAD), com auxílio do software CLASS-VP. Inicialmente foi utilizada coluna de fase reversa C₁₈ (Varian, Kromasil[®] 100-5, 250x4,60 mm de diâmetro interno, tamanho de partícula de 5 μ m, acoplada a uma pré-coluna com a mesma fase estacionária) com gradiente composto de metanol e água modificada com 0,5% de ácido fórmico (iniciando com 55% de metanol, alcançando 100% de solvente orgânico em 30 minutos). Devido à necessidade de se usar um sistema eluente sem a adição de ácido, pois foi verificada a degradação de compostos durante o isolamento no primeiro processo de biotransformação em escala ampliada, foram testadas outras colunas e gradientes.

Foi evidenciada a impossibilidade do uso da coluna C₁₈ sem a adição de ácido na fase móvel. Então, foram avaliados outros sistemas de eluição com gradientes sem a adição de ácido e alterando-se metanol por acetonitrila nas colunas de fase reversa C₁₂ (Phenomenex[®], Synergi MAX-RP 80 Å, 150x4,60 mm d.i, tamanho de partícula 4 μ m, acoplada a uma pré-coluna com mesmo material de empacotamento), fenil (Phenomenex[®], Synergi Polar-RP 80 Å, 150x4,6 mm d.i., tamanho de partícula 4 μ m, acoplada a uma pré-coluna com mesma fase estacionária) e fusion (Phenomenex[®], Synergi Fusion-RP 80 Å, 150x4,6 mm d.i., tamanho de partícula 4 μ m, acoplada a uma pré-coluna com mesma fase estacionária).

3. MATERIAL E MÉTODOS

A coluna que propiciou a obtenção dos melhores perfis químicos dos extratos foi a fenil, e o gradiente utilizado em todos os cromatogramas apresentados neste trabalho (CLAE-DAD modo analítico) foi composto por acetonitrila e água (iniciando com 10% de acetonitrila e alcançando 100% do solvente orgânico em 33 minutos) em uma vazão de 0,8 mL/min. O volume de injeção foi de 20 μ L e as amostras injetadas foram preparadas na concentração de 1 mg/mL.

3.10 Isolamento de metabólitos

Para o isolamento de metabólitos da β -lapachona na primeira biotransformação em escala ampliada com o fungo *Mucor rouxii* (80 mg β -lapachona e 103,2 mg de extrato) optou-se pelo isolamento em CLAE semi-preparativa sem prévio preparo da amostra. Utilizou-se coluna cromatográfica C₁₂ semi-preparativa (Phenomenex®, Synergi MAX-RP 80 Å, 250x4,60 mm d.i, tamanho de partícula 4 μ m, acoplada a uma pré-coluna com mesmo material de empacotamento). Foi utilizado gradiente composto por metanol e água contendo 0,5% de ácido fórmico (iniciando com 70% de metanol, chegando a 100% de solvente orgânico em 30 minutos). Observou-se uma baixa resolução dos picos e degradação de metabólitos durante a secagem, devido à presença de ácido na fase móvel. Foi possível o isolamento e identificação de apenas três metabólitos sem a verificação de degradação (Figura 8).

Figura 8. Isolamento de metabólitos com a primeira biotransformação da β -lapachona em escala ampliada realizada com o fungo *M. rouxii*, após dois dias de incubação.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Para facilitar o isolamento de metabólitos nos processos de biotransformação posteriores, os extratos obtidos em escala ampliada foram pré-fracionados utilizando cartuchos de extração em fase sólida (SPE), contendo 500 mg de fase estacionária composta por sílica modificada C₁₈. Em cada cartucho foram adicionados cerca de 50 mg de extrato, o qual foi eluído com 2,5 mL de fase móvel composta por acetonitrila e água, iniciando com 100% água e chegando a 100% de acetonitrila com proporção crescente do solvente orgânico de 10 em 10%. Para auxiliar na eluição da fase móvel foi utilizado um sistema de extração em fase sólida (VISIPREP-SPE, SUPELCO®).

Para isolamento dos produtos de biotransformação da β -lapachona e da α -lapachona, as frações obtidas no fracionamento por SPE foram selecionadas através dos perfis analíticos em CLAE-DAD e, posteriormente, os analitos contidos nas mesmas foram isolados com auxílio de uma coluna fenil semi-preparativa (Phenomenex®, Synergi Polar-RP, 250x10 mm d.i., tamanho de partícula 4 μ m, acoplada a uma pré-coluna com mesmo material de empacotamento), em um sistema de CLAE preparativa (Shimadzu®) acoplada ao detector UV/VIS, com auxílio do software LCSolution versão 1.1. Os sistemas eluentes foram gradientes compostos por acetonitrila e água, em diferentes proporções, dependendo da fração, com uma vazão de 3 mL/min. O volume de injeção foi de 100 μ L e a quantidade injetada foi de 5 a 10 mg por injeção. As frações obtidas foram evaporadas em evaporador centrífugo (*Speed-vacuum* Savant SPD2010) a 45 °C durante 24 horas. Todas as substâncias isoladas foram protegidas da luz.

Os procedimentos de isolamento de metabólitos de cada biotransformação estão esquematizados nas figuras 9 a 13.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Figura 9. Isolamento de metabólitos com o segundo e terceiro processos de biotransformação da β-lapachona em escala ampliada realizada com o fungo *M. rouxii*, após dois dias de incubação.

Figura 10. Isolamento de metabólitos com a biotransformação da β-lapachona em escala ampliada realizada com o fungo *P. immersa* SS13, após 6 horas de incubação.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Figura 11. Isolamento de metabólitos com a biotransformação da β -lapachona em escala ampliada realizada com o fungo *C. elegans*, após sete dias de incubação.

Figura 12. Isolamento de metabólitos com a biotransformação da β -lapachona em escala ampliada realizada com a bactéria *Bifidobacterium* sp., após 24 horas de incubação.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Figura 13. Isolamento de metabólitos com a biotransformação da α-lapachona em escala ampliada realizada com o fungo *M. rouxii*, após um e cinco dias de incubação.

3.11 Determinação estrutural dos produtos de biotransformação

Para análise dos extratos brutos obtidos nos processos de biotransformação em escala preparativa com a β-lapachona, foi utilizada Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (CLUE) (ACQUITY UPLC-MS/MS, Waters®), acoplada a um detector de arrazo de diodos e triplo quadrupolo operado no modo positivo (TQ Detector, Waters®), com argônio como gás de colisão. A coluna empregada foi uma ACQUITY 1,7 μm BEH (Ethylene Bridged Hybrid) C₁₈, dimensões de 2,1x50 mm, equipada com pré-coluna de material equivalente. A fase móvel foi um gradiente composto de ACN:H₂O (iniciando com 10% de ACN e chegando a 100% em 5 minutos) modificada com 1% de ácido acético, com vazão de 0,3 mL/min., estando as amostras na concentração de 0,1 mg/mL, diluídas em ACN:H₂O na proporção de 1:1. O volume de injeção foi de 5 μL. A temperatura da fonte foi de 150 °C e a temperatura de dessolvatação foi de 350 °C, sendo a voltagem do capilar de 2.5 kV e a voltagem do cone de 30 eV. Destaca-se que houve supressão de ionização na análise do extrato obtido na biotransformação com a bactéria *Bifidobacterium* sp.,

3. MATERIAL E MÉTODOS

em que não foi possível o monitoramento de metabólitos utilizando essa ferramenta. Então, foi necessário o isolamento dos possíveis derivados da β -lapachona em CLAE semi-preparativa e análise por infusão direta em espectrômetro de alta resolução.

Para análises em alta resolução utilizou-se o espectrômetro de massas micrOTOF II-ESI-TOF (Bruker Daltonics®) operado no modo positivo para todas as amostras, com nitrogênio como gás de colisão, na temperatura de 200 °C. As amostras foram previamente diluídas em ACN:H₂O na proporção de 1:1, na concentração de 0,02 mg/mL, sendo feitas infusões diretas. Para calibração interna utilizou-se solução de Na-TFA (ácido trifluoroacético sodiado) a 10 mg/mL.

Os dados de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de todas as substâncias isoladas foram adquiridos em tubos Shigemi®, em espectrômetro Bruker DRX 500, operando a 500 MHz, utilizando como solventes metanol deuterado (CD₃OD) ou clorofórmio deuterado (CDCl₃), dependendo da solubilidade de cada amostra. Foram obtidos espectros em 1D e 2D para todos os derivados. Os processamentos dos espectros foram feitos com auxílio do software MestReNova 6.0.2.

Para os derivados da β -lapachona que apresentavam centro de assimetria (BML02, BLC01 e BLC02), foi medida a rotação óptica específica ($[\alpha]_D$), utilizando o polarímetro digital JASCO Dip-370.

3.12 Ensaios citotóxicos

Os ensaios citotóxicos foram feitos em parceria com a Profa. Dra. Raquel Alves dos Santos da Universidade de Franca (UNIFRAN). Foram avaliadas as atividades da β -lapachona e dos derivados majoritários desta naftoquinona identificados como BLM02, obtido na biotransformação realizada com o fungo *Mucor rouxii* e BLC02, o qual foi obtido na biotransformação realizada com o fungo *Cunninghamella elegans*. As linhagens testadas foram a de câncer de mama humano SKBR-3, obtida do banco de células do Rio de Janeiro, e a linhagem de fibroblastos normais humanos GM07492-A (Coriell Cell Repositories, USA). Para isso, as células foram tripsinizadas e semeadas em placa de 96 poços a uma concentração de 4×10^4 células/poço em meio DMEM com HAM-F10 (1:1, v/v) (Sigma-Aldrich®) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Life Technologies®). Após 24 horas de incubação a 37 °C (CO₂ 5%), as culturas de células foram tratadas

3. MATERIAL E MÉTODOS

com diferentes concentrações da β -lapachona e seus derivados, dissolvidos em DMSO (1%) em concentrações que variaram de 50 a 400 μ M, sendo a cultura novamente incubada por mais 24 horas. Em seguida, a viabilidade das células foi avaliada com o Kit de Proliferação Celular II (Roche) de acordo com as instruções do fabricante. A viabilidade celular foi expressa como a percentagem do controle negativo. Doxorrubicina a 4 μ M foi utilizada como o controle positivo. Os ensaios foram feitos em duplicata, sendo repetidos por três vezes. Os resultados foram analisados com auxílio do GraphPad Sigma (3.1).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 β -lapachona

A β -lapachona apresenta-se na forma de cristais vermelho-alaranjados (Figura 14)

Figura 14. Cristais de β -lapachona.

Sua pureza foi inicialmente verificada por CLAE-DAD (Figura 15) e posteriormente por espectrometria de massas (Figura 16).

Figura 15. Cromatograma obtido por CLAE-DAD da β -lapachona, analisado em 256 nm.

Figura 16. Espectro de massas em alta resolução da β -lapachona (IES-EM).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As informações detalhadas da β -lapachona estão apresentadas na figura 17. Para confirmação estrutural foram obtidos os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dessa naftoquinona (Tabela 1), bem como os mapas de contorno de HMQC e HMBC.

Figura 17. Estrutura química da β -lapachona, com dados de correlações no HMBC, fórmula molecular, m/z em alta resolução, tempo de retenção em minutos (CLAE-DAD) e nome químico.

Tabela 1. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da β -lapachona e respectivas comparações com a literatura.

Posição	β -lapachona (CDCl_3 , 500 MHz)		β -lapachona (CDCl_3 , 300 MHz) CLAESSENS et al., 2010	
	δ_{C} ppm 125 MHz	δ_{H} ppm, mult., (J Hz), int. 500 MHz	δ_{C} ppm	δ_{H} ppm, mult., (J Hz), int.
2	79,4		79,3	
2a e 2b	26,9	1,47 s 6H	26,8	1,47 s 6H
3	31,8	1,86 t (6,6) 2H	31,6	1,85 t (6,7) 2H
4	16,3	2,58 t (6,6) 2H	16,2	2,57 t (6,7) 2H
4a	112,9		112,7	
5	178,7		178,6	
6	180,0		179,9	
6a	132,8		132,6	
7	128,7	8,07 dd (7,6; 1,1) 1H	128,5	8,06 m 1H
8	134,9	7,65 ddd (7,6; 7,6; 1,1) 1H	134,8	7,64 m 1H
9	130,8	7,51 ddd (7,6; 7,6; 1,1) 1H	130,6	7,50 m 1H
10	124,2	7,82 dl (7,6) 1H	124,1	7,81 m 1H
10a	130,3		130,2	
10b	162,1		162,0	

No espectro de RMN de ^1H da β -lapachona (Figura 18) pode-se observar os sinais dos hidrogênios aromáticos entre δ_{H} 7,5 e 8,1. Os hidrogênios metilênicos do carbono 4 desdobram em um único tripleto em δ_{H} 2,58 por serem enantiotópicos, assim como os hidrogênio metilênicos do carbono 3, em δ_{H} 1,86. Os hidrogênios

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

metílicos aparecem como um simpleto em δ_H 1,47. Destaca-se também que os hidrogênios metilênicos ligados ao carbono 4 estão desblindados por serem alílicos, ou seja, estarem ligados ao carbono α à ligação entre os carbonos 4a e 10b. Os dados espectroscópicos completos da β -lapachona estão no anexo 1 (páginas 118 a 123).

Figura 18. Espectro de RMN de 1H da β -lapachona ($CDCl_3$, 500 MHz).

4.2 Efeitos inibitórios da β -lapachona frente aos micro-organismos

A β -lapachona apresentou maior toxicidade para os fungos do que para as bactérias, sendo que os fungos endofíticos, principalmente o *P. immersa* SS13, mostraram-se menos sensíveis à presença da naftoquinona que o fungo de solo *M. rouxii* e os comerciais *C. elegans* e *C. echinulata* (Tabela 2).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 2. Valores de concentração inibitória mínima da β -lapachona frente aos micro-organismos e as respectivas concentrações da naftoquinona utilizadas nos processos de biotransformação.

Micro-organismos	Concentração inibitória mínima da β -lapachona ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração utilizada na biotransformação ($\mu\text{g/mL}$)
<i>M. rouxii</i>	100	50
<i>C. elegans</i>	100	50
<i>C. echinulata</i>	100	50
<i>P. crustosum</i>	200	100
<i>P. immersa</i>	> 400	100
<i>L. acidophilus</i>	> 400	100; 50; 25; 12,5
<i>Bifidobacterium</i> sp.	> 400	100; 50; 25; 12,5
Cultura mista	> 400	100; 50; 25; 12,5
<i>E. coli</i> em aerobiose	> 400	100; 50; 25; 12,5
<i>E. coli</i> em anaerobiose	> 400	100; 50; 25; 12,5

Apesar de alguns micro-organismos não mostrarem inibição do crescimento até a maior concentração testada, que foi de 400 $\mu\text{g/mL}$, definiu-se que a maior concentração utilizada nos processos de biotransformação seria de 100 $\mu\text{g/mL}$. Essa concentração foi escolhida por ter sido utilizada anteriormente em trabalhos de biotransformação desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa que apresentaram bons resultados (CAPEL et al., 2011). Vale destacar também que é bem conhecido e estudado que quinonas apresentam a capacidade de gerar espécies reativas de oxigênio que são responsáveis por grande parte dos efeitos biológicos e tóxicos gerados por essas estruturas, e concentrações maiores de β -lapachona poderiam inibir a metabolização da mesma (PINTO e CASTRO, 2009). Foram utilizadas concentrações decrescentes de β -lapachona (100, 50, 25 e 12,5 $\mu\text{g/mL}$) nos procedimentos de biotransformação com as bactérias, na tentativa de estimular a transformação microbiana da naftoquinona.

4.3 Biotransformação com o fungo *Mucor rouxii* NRRL 1894

O fungo *Mucor rouxii* foi capaz de biotransformar a β -lapachona com formação de uma série de derivados. Os perfis químicos dos extratos de biotransformação, analisados por CLAE-DAD, mostraram-se bastante complexos, sendo definido o segundo dia de incubação para o aumento de escala de biotransformação (Figura 19).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Figura 19. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD da biotransformação da β -lapachona com o fungo *Mucor rouxii* no segundo dia de biotransformação, analisados em 256 nm. A) Cromatograma da biotransformação com a β -lapachona; B) Cromatograma do controle fúngico; C) Cromatograma do controle de estabilidade da β -lapachona no meio de cultura.

Durante os experimentos de biotransformação, verificou-se o pH com fita indicadora de pH (Merck) dos caldos de cultivo (Tabela 3). É importante destacar que o pH do meio Koch's K1 inicialmente é 6,0.

Tabela 3. Variação de pH durante os processos de biotransformação com o fungo *M. rouxii*.

pH	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7
Teste	4,0	6,0	6,0	6,0	7,0	7,0	7,0
Controle da cultura	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0
Controle da naftoquinona	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0

A acidificação do meio na presença do fungo e da β -lapachona, nas primeiras 24 horas, indicam um período de possível produção e liberação de enzimas com grupamentos ácidos na tentativa de metabolização da β -lapachona em derivados menos tóxicos para o micro-organismo. Do segundo dia de experimento em diante o pH não variou consideravelmente, e os perfis químicos dos extratos de biotransformação também não tiveram variações consideráveis nas análises por CLAE-DAD.

Para facilitar o isolamento de derivados da β -lapachona, fracionou-se os extratos do segundo e terceiro procedimentos de biotransformação (252,6 mg) utilizando cartuchos de SPE. As frações escolhidas para o isolamento foram as em 40% de acetonitrila, 60% de acetonitrila e 70% de acetonitrila, conforme descrito no

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

item 3.10 da metodologia (página 26). Os perfis químicos em CLAE-DAD apresentados por essas frações podem ser observados na figura 20.

Figura 20. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD das frações de biotransformação com o fungo *M. rouxii*, analisados em 256 nm. A) Cromatograma da fração em 40% de acetonitrila; B) Cromatograma da fração em 60% de acetonitrila; C) Cromatograma da fração em 70% de acetonitrila.

Com os procedimentos adotados para o isolamento e identificação dos derivados, foi possível a determinação estrutural de sete derivados de biotransformação da β -lapachona com o fungo *M. rouxii*, sendo cinco estruturas determinadas por análises de espectros de RMN e de massas e duas identificadas apenas por espectrometria de massas.

O primeiro produto de biotransformação da β -lapachona isolado do extrato da cultura do fungo *M. rouxii*, recebeu o código BLM01 (Figura 21). Esse derivado é resultante da abertura oxidativa do anel B da β -lapachona. Tal estrutura já foi descrita na literatura como produto da metabolização *in vitro* dessa naftoquinona utilizando sangue de humanos e outros mamíferos (MIAO et al., 2008). Nesse trabalho, os autores propuseram a estrutura química utilizando apenas técnicas espectrométricas. Para confirmação estrutural, o mesmo grupo de pesquisadores publicou um trabalho de síntese com os derivados obtidos no trabalho de metabolismo, além de outros derivados (YANG et al., 2008).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Figura 21. Estrutura química do derivado BLM01, obtido pela biotransformação da β -lapachona com o fungo *M. rouxii*. À direita estão a fórmula molecular, *m/z* em alta resolução, tempo de retenção em minutos (CLAE-DAD), e nome químico da respectiva substância.

As comparações com a literatura e os dados espectroscópicos desse derivado estão na tabela 4.

Tabela 4. Dados de RMN de ¹H e ¹³C do derivado BLM01 e respectivas comparações com a literatura.

Posição	BLM01 (CD ₃ OD, 500 MHz)		(CDCl ₃ , 400 MHz) YANG et al., 2008	
	δ_c ppm 125 MHz	δ_H ppm, mult., (J Hz), int. 500 MHz	δ_c ppm	δ_H ppm, mult., (J Hz), int.
2	80,5		79,6	
2a e 2b	26,8	1,38 s 6H	26,7	1,37 s 6H
3	32,5	1,83 t (6,4) 2H	31,9	1,79 t (6,4) 2H
4	16,9	2,37 t (6,4) 2H	16,1	2,43 t (6,8) 2H
5	114,9		114,0	
5a	192,8	9,08 s	191,6	9,20 s
6	174,9		172,5	
1'	134,1		132,6	
2'	135,3		135,1	
2'a	170,1		171,3	
3'	131,2	7,95 dd (7,1; 1,2) 1H	130,2	8,10 dd (8,0; 1,2) 1H
4'	132,2	7,60-7,57 m 2H	131,6	7,61 td (7,6; 1,2) 1H
5'	131,0	7,60-7,57 m 2H	130,1	7,56 td (7,6; 1,6) 1H
6'	132,9	7,40 dd (7,2; 1,2) 1H	132,5	7,40 dd (7,2; 1,2) 1H

No espectro de RMN de ¹H (Figura 22) a presença do simpleto com deslocamento característico em δ_H 9,08 confirma a presença do aldeído. O hidrogênio aromático ligado ao carbono 3' é o mais desblindado deste anel, em δ_H 7,95, devido ao efeito anisotrópico da carbonila do ácido carboxílico adjacente. Os demais sinais no espectro de RMN de ¹H se assemelham com o da β -lapachona.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Figura 22. Espectro de RMN de ^1H do derivado da β -lapachona BLM01 (CD_3OD , 500 MHz).

As correlações no HMBC possibilitaram a atribuição dos grupamentos ácido carboxílico na posição 2' e aldeído na posição 5. Os dados obtidos experimentalmente estão de acordo com os dados encontrados na literatura para esse derivado, conforme mostrado na tabela 4 (YANG et al., 2008).

O espectro de massas em alta resolução confirma a fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}_4$ e a fragmentação a 20 eV se assemelha com a obtida por Miao e colaboradores (2008). Os dados experimentais completos de RMN e massas podem ser observados no anexo 2 (páginas 124 a 128).

No artigo publicado por Miao et al. (2008), os autores relataram que o derivado BLM01, possivelmente, foi formado a partir de um derivado ácido dicarboxilado (posições 2' e 5), por ação da enzima ácido carboxílico redutase. Nesse trabalho, os pesquisadores também mencionaram que a enzima em questão é extremamente regioseletiva, uma vez que não evidenciaram o aparecimento do grupo aldeído na posição 2', apenas na posição 5.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No extrato da biotransformação realizada com o fungo *M. rouxii* foi possível a detecção do derivado ácido dicarboxilado através de análises em CLUE-DAD-EM/EM, o qual recebeu o código BLM-EM01. Seu nome químico é 6-(2-carboxifenil)-2,2-dimetil-3,4-diidro-5-carboxi-2*H*-pirano, e sua estrutura química e espectro de EM/EM são apresentados na figura 23. O espectro de EM/EM obtido foi muito semelhante ao relatado na literatura (MIAO et al., 2008).

Figura 23. Estrutura química e espectro de EM/EM a 30 eV (CLUE-DAD-EM/EM) do derivado BLM-EM01.

Duas possíveis rotas de fragmentação para o derivado BLM-EM01 foram propostas com o intuito de se explicar os principais íons formados, sendo as mesmas apresentadas na figura 24. Na rota 1, a protonação ocorreria na posição 5a, sendo proposta a formação dos íons de m/z 259, 203, 159 e 149, sendo este último o íon mais intenso no espectro de EM/EM na energia de 30 eV. Na rota 2, a protonação ocorreria na posição 2'a, em que os íons de m/z 259, 241, 203, 173 e 159 foram propostos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Figura 24. Proposta de rotas de fragmentação do derivado BLM-EM01.

As duas rotas de fragmentação foram propostas baseando-se no espectro de massas. Contudo, sugere-se que a rota 1 seja a via mais representativa para o

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

possível mecanismo de fragmentação desta substância, uma vez que o íon de m/z 149 é o pico base no espectro. É importante destacar que nas duas rotas sugeridas, a reação retro Diels-Alder (RDA) acontece, sendo esta reação bastante característica para a β -lapachona, α -lapachona e lapachol (VESSECCHI et al., 2013; VESSECCHI et al., 2010). Para dar maior subsídio às propostas de fragmentação, cálculos teóricos devem ser feitos.

No trabalho de Miao e colaboradores (2008) os autores propõem que a formação do derivado BLM-EM01 pode ocorrer pela inserção inicial de um oxigênio no anel B pela ação de monooxigenases (reação de Baeyer-Villiger), seguida de hidrólise. Outra via possível seria a redução do anel quinonóide com formação da hidroquinona correspondente seguida de clivagem oxidativa deste anel, com formação do ácido dicarboxílico.

A reação de Baeyer-Villiger é uma via interessante de metabolização pela ação de monooxigenases microbianas (MIHOVILOVIC et al., 2006). Por outro lado, já foi relatada a redução do anel B da β -lapachona em um trabalho de metabolismo *in vivo* com humanos, porém os metabólitos detectados estavam conjugados com ácido glicurônico, sulfato ou glicose e sulfato, este último um metabólito pouco comum em mamíferos. Para deixar a hidroquinona mais estável e polar, a conjugação do sítio reduzido parece ser requerida (SAVAGE et al., 2008).

Outro derivado isolado e identificado, que recebeu o código BLM02, foi uma espirobenzolactona (Figura 25) já relatada na literatura em um trabalho de síntese em que a β -lapachona foi o material de partida (SILVA JUNIOR et al., 2009).

Figura 25. Estrutura química do derivado BLM02, obtido pela biotransformação da β -lapachona com o fungo *M. rouxii*. À direita estão a fórmula molecular, m/z em alta resolução, tempo de retenção em minutos (CLAE-DAD), nome químico e [α]_D da respectiva estrutura.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesse trabalho de síntese, Silva Junior e colaboradores (2009) relataram que essa reação não era esperada, e propuseram uma rota sintética em que um dos intermediários é o derivado ácido dicarboxilado BLM-EM01. Desta forma, pode-se acreditar que o derivado BLM-EM01 deve ser o intermediário para formação da estrutura BLM02. As comparações com a literatura e os dados espectroscópicos do derivado BLM02 estão apresentados na tabela 5. Os espectros de RMN 1D e 2D bem como dados espectrométricos em alta resolução dessa espirolactona estão no anexo 3 (páginas 129 a 134).

Tabela 5. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do derivado BLM02 e respectivas comparações com a literatura.

Posição	BLM02 (CDCl_3 , 500 MHz)		(CDCl ₃ , 200 MHz) SILVA JUNIOR et al., 2009	
	δ_{C} ppm 125 MHz	δ_{H} ppm, mult., (J Hz), int. 500 MHz	δ_{C} ppm	δ_{H} ppm, mult., (J Hz), int.
1	107,6		107,4	
3	168,8		168,5	
3a	150,2		150,0	
4	125,4	7,85 <i>dl</i> (7,6) 1H	124,9	7,8 <i>dt</i> (0,8; 8,0) 1H
5	130,2	7,54 <i>dd</i> (8,0; 7,6) 1H	129,9	7,6 <i>m</i> 1H
6	134,3	7,67 <i>dd</i> (8,0; 7,6) 1H	134,0	7,7 <i>ddd</i> (2,0, 8,0; 7,9) 1H
7	122,2	7,50 <i>dl</i> (7,6) 1H	121,9	7,5 <i>m</i> 1H
7a	126,6		126,4	
3'	33,9	1,96 <i>ddd</i> (14,2; 13,6; 4,3) 1H; 1,87-1,78 <i>m</i> 3H	31,7	2,4-1,6 <i>m</i> 6H
4'	16,3	2,21 <i>m</i> 1H; 1,87-1,78 <i>m</i> 3H	16,0	2,4-1,6 <i>m</i> 6H
5'	35,4	1,87-1,78 <i>m</i> 3H; 1,69 <i>ddd</i> (14,2; 13,6; 4,3) 1H	35,1	2,4-1,6 <i>m</i> 6H
6'	76,1		75,7	
6'a	32,1	1,29 <i>s</i> 3H	33,6	1,3 <i>s</i> 3H
6'b	26,6	1,47 <i>s</i> 3H	26,3	1,5 <i>s</i> 3H

Na análise do espectro de RMN de ^1H (Figura 26) observam-se constantes de acoplamento geminais ($J = 14,2$ Hz) entre os hidrogênios ligados ao carbono 3' e ao carbono 5', por não serem magneticamente equivalentes devido à proximidade do centro assimétrico. No entanto, a maioria dos sinais atribuídos aos hidrogênios diastereotópicos ligados aos carbonos 3', 4' e 5' desdobraram em multipletos, gerando uma sobreposição de sinais na região do espectro compreendida entre δ_{H} 1,87-1,78 que impossibilitou a determinação das constantes de acoplamento.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Figura 26. Espectro de RMN de ^1H do derivado da β -lapachona BLM02 (CDCl_3 , 500 MHz).

O que chama maior atenção nessa espirobenzolactona é o carbono sp^2 3a, com δ_{C} 150,2. Apesar dos dados espectroscópicos estarem de acordo com os descritos pela literatura, a presença de um carbono sp^2 tão desblindado, sem que este esteja ligado a um heteroátomo, não é comum.

Talvez, esse fato possa ser explicado pela natureza da própria estrutura do derivado BLM02, em que o carbono aromático 3a encontra-se ligado a um grupamento éster de um anel tensionado de cinco membros, ligado por sua vez a um anel de seis membros através de um único carbono, formando um centro assimétrico e tensionando ainda mais a estrutura. Se o carbono 3a estivesse ligado ao oxigênio do éster ao invés da carbonila, o carbono 3a estaria, possivelmente, mais desblindado devido ao efeito indutivo retirador de elétrons do átomo de oxigênio, e o hidrogênio ligado ao carbono 4 seria o mais blindado e não o mais desblindado do anel aromático. No mapa de contornos de HMBC observam-se as correlações entre o hidrogênio ligado ao carbono 4 com δ_{H} 7,85 correlaciona fortemente com os carbonos δ_{C} 150,2 e 168,8, sendo que os hidrogênios do anel C ligados aos carbonos 3',4' e 5' não acoplam com o carbono do éster em δ_{C} 168,8.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Buscaram-se na literatura, estruturas semelhantes ao derivado BLM02 para analisar os deslocamentos químicos de carbonos nessa posição. No trabalho de Zhang e Pugh (2003), vários sistemas heterocíclicos foram sintetizados, dentre eles diversas espirobenzolactonas com estruturas semelhantes ao derivado BLM02, sendo sempre evidenciada a presença de carbonos com deslocamentos químicos próximos a δ_C 150,0.

Outro dado que confirma a estrutura química proposta para o derivado BLM02 é o estudo da fragmentação por espectrometria de massas. O espectro de EM/EM a 20 eV dessa espirobenzolactona pode ser observado na figura 27 e a proposta da rota de fragmentação para explicar os íons principais formados está na figura 28.

Figura 27. Estrutura química e espectro de EM/EM do derivado BLM02 (IES-EM, 20 eV).

No trabalho de Crotti e colaboradores (2004) os autores propõem mecanismos de fragmentação de lactonas com anéis de cinco membros utilizando ionização por eletrospray (IES-EM). Nos mecanismos propostos há abertura do anel lactônico, com formação de íon acílio e consequente perda de água com formação de ligação dupla, dependendo dos substituintes. No mecanismo proposto para o derivado BLM02 o mesmo tipo de fragmentação é evidenciado.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Figura 28. Proposta de rotas de fragmentação do derivado BLM02.

O íon mais intenso no espectro (EM/EM) é o de m/z 159 na energia de 20 eV. Sugere-se que a eliminação de 18 u a partir da molécula protonada (m/z 233), a qual indica a perda de uma molécula de água, com consequente formação de ligação dupla no anel C, seguida de uma RDA é a rota majoritária de fragmentação do derivado BLM02. A perda de 56 u , através de RDA, pelos derivados da β -lapachona, assim como para essa naftoquinona (VESSECCHI et al., 2013), é bastante característica quando há a presença da ligação dupla no anel C.

Outro derivado isolado que teve sua estrutura elucidada foi denominado BLM04 (Figura 29). Esse metabólito da β -lapachona ainda não foi descrito na literatura.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Figura 29. Estrutura química do derivado BLM04, obtido pela biotransformação da β-lapachona com o fungo *M. rouxii*. À direita estão a fórmula molecular, *m/z* em alta resolução, tempo de retenção em minutos (CLAE-DAD) e nome químico da respectiva estrutura.

Os dados espectroscópicos obtidos para o derivado BLM04 estão na tabela 6. Os espectros de RMN e massas completos desse derivado estão no anexo 4 (páginas 135 a 140).

Tabela 6. Dados de RMN de ¹H e ¹³C do derivado BLM04.

BLM04 (CD ₃ OD, 500 MHz)		
Posição	δ _c ppm 125 MHz	δ _H ppm, mult., (J Hz), int. 500 MHz
2	84,9	
2a e 2b	26,7	1,50 s 6H
3	33,3	1,90 t (6,4) 2H
4	14,8	2,35 t (6,4) 2H
4a	107,4	
5	195,9	
5a	139,5	
6	133,9	
6a	167,0	
7	133,7	7,84 dl (8,0) 1H
8	133,9	7,48 tl (8,0) 1H
9	122,2	7,32 dl (8,0) 1H
9a	127,6	
9b	177,5	

No espectro de RMN de ¹H do derivado codificado BLM04 (Figura 30) observa-se a presença de apenas três hidrogênios aromáticos, sendo a fórmula molecular C₁₅H₁₄O₄ com *m/z* [M+H]⁺ 259,0964 no espectro de massas em alta resolução. Isso levou a crer que se tratava de um derivado da β-lapachona hidroxilado no anel aromático. Porém, a análise dos espectros de RMN 1D e 2D,

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

com respectivas comparações com a literatura dos dados obtidos para a β -lapachona hidroxilada no anel aromático em todas as possíveis posições, não confirmou essa hipótese (RÍOS-LUCI et al., 2012; YANG et al., 2008).

Figura 30. Espectro de RMN de ^1H do derivado da β -lapachona BLM04 (CD_3OD , 500 MHz).

Após determinar que não se tratava de um derivado hidroxilado no anel aromático, a proposta para formação do derivado BLM04 seria a ciclização diferenciada do derivado ácido dicarboxilado BLM-EM01, em que o ácido carboxílico do anel aromático ficaria na posição contrária ao carbono da carbonila do anel B. No entanto, as correlações no HMBC mostraram que o ácido carboxílico estaria, na verdade, ao lado da carbonila do anel B, pois não há correlação entre os hidrogênios aromáticos e o carbono em δ_{C} 195,9, que está na posição 5 deste anel. Então, o mecanismo proposto para formação do derivado BLM04 está apresentado na figura 31, mas é importante ressaltar que se trata de uma sugestão, uma vez que por ser uma reação catalisada enzimaticamente, pode ser que a formação de tal derivado envolva maior ou menor número de etapas e de intermediários.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Figura 31. Proposta de mecanismo de formação do derivado BLM04 a partir do metabólito BLM-EM01.

Foi isolado e identificado outro derivado da β -lapachona também descrito por Miao et al. (2008), aqui chamado de BLM07 (Figura 32). Os autores relataram que esse derivado pode ter sido formado pela desidratação espontânea, seguida da ciclização enzimática do anel do derivado ácido dicarboxílico (BLM-EM01) ou então diretamente a partir da β -lapachona através da eliminação de um grupamento carbonila. A presença desse metabólito reforça a proposta de formação do derivado BLM04.

Figura 32. Estrutura química do derivado BLM07, obtido pela biotransformação da β -lapachona com o fungo *M. rouxii*. À direita estão a fórmula molecular, m/z em alta resolução, tempo de retenção em minutos (CLAE-DAD) e nome químico da respectiva estrutura.

Os dados de RMN de 1H do derivado BLM07, com as respectivas comparações com a literatura, são mostrados na tabela 7. Os espectros de RMN 1D e 2D, de massas de alta resolução e EM/EM, estão apresentados no anexo 5 (páginas 141 a 146).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 7. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do derivado BLM07 e respectivas comparações com a literatura.

Posição	BLM07 (CD_3OD , 500 MHz)		YANG et al., 2008	
	δ_{C} ppm 125 MHz	δ_{H} ppm, mult., (J Hz), int. 500 MHz	δ_{C} ppm (CDCl_3 , 400 MHz)	δ_{H} ppm, mult., (J Hz), int. (DMSO- d_6 , 400 MHz)
2	82,9		81,3	
2a e 2b	26,7	1,45 s 6H	26,8	1,41 s 6H
3	33,4	1,83 t (6,3) 2H	32,9	1,78 t (6,4) 2H
4	15,0	2,28 t (6,3) 2H	14,5	2,20 t (6,4) 2H
4a	107,3		106,5	
5	195,3		193,6	
5a	139,6		138,7	
6	121,6	7,33-7,27 m 3H	120,9	7,41-7,29 m 3H
7	133,3	7,33-7,27 m 3H	131,9	7,41-7,29 m 3H
8	131,0	7,33-7,27 m 3H	129,8	7,41-7,29 m 3H
9	118,6	7,09 dl (7,0) 1H	117,6	7,12 d (6,8) 1H
9a	134,8		134,0	
9b	175,8		174,0	

No espectro de RMN de ^1H (Figura 33) observa-se que houve um acoplamento forte entre os hidrogênios aromáticos, com presença de efeito de segunda ordem entre três deles, sendo evidenciado um sistema de spin ABCX.

Figura 33. Espectro de RMN de ^1H do derivado da β -lapachona BLM07 (CD_3OD , 500 MHz).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

É interessante destacar a proximidade dos valores de descolamento químico dos carbonos na 5 e 9b entre os derivados BLM04 (C-5 δ_c 195,9 e C-9b δ_c 177,5) e BLM07 (C-5 δ_c 195,3 e C-9b δ_c 175,8), confirmando a presença de mesmo tipo de esqueleto carbônico.

Também foi isolada e identificada uma das lactonas isoméricas descritas por Miao et al. (2008). Essa lactona foi chamada de BLM08 (Figura 34).

Figura 34. Estrutura química do derivado BLM08, obtido pela biotransformação da β -lapachona com o fungo *M. rouxii*. À direita estão a fórmula molecular, *m/z* em alta resolução, tempo de retenção em minutos (CLAE-DAD) e nome químico da respectiva estrutura.

Os dados de RMN de ¹H e ¹³C do derivado BLM08, com as respectivas comparações com a literatura, estão apresentados na tabela 8. Os espectros de RMN 1D e 2D bem como os de massas em alta resolução e EM/EM desta lactona, estão no anexo 6 (páginas 147 a 151).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 8. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do derivado BLM08 e respectivas comparações com a literatura.

Posição	BLM08 (CD_3OD , 500 MHz)		(CDCl ₃ , 400 MHz) YANG et al., 2008	
	δ_{C} ppm 125 MHz	δ_{H} ppm, mult., (J Hz), int. 500 MHz	δ_{C} ppm dado inexistente	δ_{H} ppm, mult., (J Hz), int.
2	76,5		-	
2a e 2b	26,0	1,40 s 6H	-	1,39 s 6H
3	33,1	1,95 t (6,7) 2H	-	1,90 t (6,6) 2H
4	21,9	2,66 t (6,7) 2H	-	2,65 t (6,6) 2H
4a	137,3		-	
6	164,2		-	
6a	137,0		-	
7	130,2	8,19 dl (8,0) 1H	-	8,24 d (7,8) 1H
8	135,9	7,82 ddd (8,5; 8,0; 1,1) 1H	-	7,74-7,72 m 2H
9	128,9	7,56 ddd (8,5; 8,0; 1,1) 1H	-	7,49-7,47 m 1H
10	121,2	7,74 dl (8,0) 1H	-	7,74-7,72 m 2H
10a	121,6		-	
10b	133,6		-	

Dentre as peculiaridades observadas na análise de RMN deste derivado, pode-se mencionar a blindagem do carbono 10b, que não participa mais do sistema β a carbonila e a desblindagem do hidrogênio ligado ao carbono 7 (δ_{H} 8,19), devido ao efeito anisotrópico da carbonila vizinha (Figura 35).

Figura 35. Espectro de RMN de ^1H do derivado da β -lapachona BLM08 (CD_3OD , 500 MHz).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A lactona regioisomérica da BLM08, relatada também por Miao et al. (2008), foi identificada no extrato de biotransformação fúngica da β -lapachona por espectrometria de massas, e recebeu o código BLM-EM02. O espectro de EM/EM obtido por CLUE-DAD-EM/EM da BLM-EM02 foi praticamente o mesmo relatado na literatura por esse grupo de pesquisa. Trata-se da substância 2,2-dimetil-3,4-diidropirano[3,4-c]cromen-5[2H]-ona, sendo sua estrutura química e espectro de EM/EM apresentados na figura 36.

Figura 36. Estrutura química e espectro de EM/EM a 30 eV (CLUE-DAD-EM/EM) do derivado BLM-EM02.

Para tentar explicar os principais íons formados no espectro de EM/EM do derivado BLM-EM02, foi proposto o mecanismo de fragmentação apresentado na figura 37.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Figura 37. Proposta de mecanismo de fragmentação do derivado BLM-EM02.

De acordo com o espectro (EM/EM), o pico base é o de m/z 175, resultante da perda de 56 u a partir da molécula protonada (m/z 231) através de uma RDA. Esta cumarina e o derivado BLM08 podem ter sido formados a partir de um intermediário de sete membros pela inserção de oxigênio (reação de Baeyer-Villiger) no anel B da β -lapachona devido a ação de monooxigenases, seguida da eliminação de um grupo carbonila, ou então, através do intermediário BLM-EM01 (MIAO et al., 2008).

Com o processo de biotransformação realizada com o fungo *M. rouxii* foi possível isolar e caracterizar estruturalmente diversos derivados. O derivado que possivelmente é precursor dos demais é o metabólito BLM-EM01, caracterizado através de dados espectrométricos. Comparando os resultados obtidos para esse fungo com a literatura, podemos concluir que o fungo foi capaz de mimetizar o metabolismo sanguíneo humano da β -lapachona (MIAO et al., 2008). Isso nos mostra a capacidade metabólica desse fungo de solo, que pode ser explorado em processos de biotransformação com outros candidatos a fármacos.

Um resumo dos dados obtidos com a biotransformação da β -lapachona com o fungo *M. rouxii* é mostrada na figura 38.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Figura 38. Rotas sugeridas para a produção de derivados da β -lapachona no processo de biotransformação desenvolvido com o fungo *Mucor rouxii*.

O fungo *M. rouxii* já foi utilizado anteriormente em outros processos de biotransformação. No trabalho de Capel e colaboradores (2011), esse fungo de solo foi utilizado em processos de biotransformação em que o substrato era o ácido oleanólico (1) (Figura 39). O fungo de solo foi capaz de biotransformar esse triterpeno pentacíclico, catalisando oxidações em diferentes pontos de sua estrutura, com inserção de oxigênio através de hidroxilações. Esse tipo de metabolismo também foi evidenciado quando o triterpeno pentacíclico lupeol (2) (Figura 39) foi utilizado como substrato (CARVALHO et al., 2010).

Figura 39. Estruturas químicas do ácido oleanólico (1) e lupeol (2).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A metabolização da β -lapachona envolveu, basicamente, reações para eliminação das carbonilas do anel B, que estão diretamente envolvidas com muitos dos efeitos biológicos e tóxicos dessa naftoquinona (PINTO e CASTRO, 2009).

Como essa *orto*-naftoquinona gera um estresse oxidativo importante, podendo causar peroxidação lipídica, destruição protéica, danificação do DNA, entre outros transtornos nas células desse micro-organismo, o mesmo tentou metabolizar justamente o núcleo quinonóide da β -lapachona (SILVA et al., 2003).

Todos os metabólitos identificados com a biotransformação dessa quinona pelo fungo *M. rouxii*, com excessão da espirobenzolactona BLM02 e do derivado BLM04, foram relatados no estudo de metabolismo sanguíneo da β -lapachona, realizado por Miao e colaboradores (2008).

A principal função das células vermelhas são as trocas gasosas, mas ao contrário do que se pensava, essas células podem participar da metabolização de diversos fármacos administrados. Isso se deve a presença de diversas enzimas nas células sanguíneas, como esterases, hemoglobina, N-acetil-transferases, glutational-transferases, e até enzimas da superfamília do citocromo P-450 (COSSUM, 1988).

Esse fungo mostrou-se capaz de mimetizar o metabolismo de mamíferos e humanos, fornecendo quantidades maiores dos derivados, permitindo que os mesmos sejam utilizados como padrões em estudos *in vivo*.

4.4 Triagem com outros fungos

4.4.1 Biotransformação com o fungo *Cunninghamella elegans* ATCC 10028b

A transformação microbiana da β -lapachona utilizando o fungo *Cunninghamella elegans* forneceu dois derivados majoritários, como pode ser observado na figura 40. Os perfis químicos do extrato do controle fúngico e de estabilidade da β -lapachona no meio de cultivo utilizado, também são mostrados na figura 40.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Figura 40. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD da biotransformação da β -lapachona com o fungo *C. elegans* no sétimo dia de biotransformação, analisados em 245 nm. A) Cromatograma da biotransformação com a β -lapachona; B) Cromatograma do controle fúngico; C) Cromatograma do controle da β -lapachona com o meio de cultura Czapek modificado 1.

No processo de biotransformação com esse fungo, o pH do meio de cultura não variou consideravelmente. O pH observado no sétimo dia de biotransformação foi 6,0 para o caldo de biotransformação e 7,0 para os caldos dos controles, tanto controle da cultura fúngica como de estabilidade da β -lapachona no meio Czapek modificado 1, que tem o pH acertado para 7,0 no momento de sua preparação.

Para facilitar o isolamento dos derivados majoritários fez-se o fracionamento do extrato bruto de biotransformação obtido em escala ampliada (88,0 mg) utilizando SPE conforme descrito na metodologia (item 3.10, página 26). As frações selecionadas para o isolamento em CLAE semi-preparativa foram as obtidas com 40% de acetonitrila e 50% de acetonitrila. Os perfis químicos obtidos em CLAE analítica dessas frações estão apresentados na figura 41.

Figura 41. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD das frações de biotransformação com o fungo *C. elegans*, analisados em 245 nm. A) Cromatograma da fração em 40% de acetonitrila; B) Cromatograma da fração em 50% de acetonitrila.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O derivado com tempo de retenção de 18,4 minutos foi chamado de BLC01 (Figura 42). A ligação de uma unidade de β -D-glicose ocorreu na posição 5 do anel B após a formação da hidroquinona, devido à redução das carbonilas originando um catecol, com subsequente ataque no sítio reduzido.

Figura 42. Estrutura química do derivado BLC01, obtido pela biotransformação da β -lapachona com o fungo *C. elegans*. À direita estão a fórmula molecular, m/z em alta resolução, tempo de retenção em minutos (CLAE-DAD), nome químico e $[\alpha]_D$ da respectiva estrutura.

O derivado BLC01 ainda não foi descrito na literatura e seus dados de RMN de 1H e ^{13}C estão apresentados na tabela 9. Os espectros de RMN 1D e 2D bem como os de massas em alta resolução e EM/EM deste derivado da β -lapachona estão no anexo 7 (páginas 152 a 156).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 9. Dados de ^1H e ^{13}C do derivado BLC01.

BLC01 (CD ₃ OD, 500 MHz)		
Posição	δ_{C} ppm 125 MHz	δ_{H} ppm, mult., (J Hz), int. 500 MHz
2	74,5	
2a e 2b	26,8	1,38 s 6H
3	33,6	1,85 m 2H
4	19,4	3,15 m 1H; 2,91 m 1H
4a	112,3	
5	139,7	
6	137,9	
6a	125,8	
7	122,0 ^b	8,02 dl (8,0) 1H ^b
8	125,2 ^a	7,36-7,33 m 2H ^a
9	125,6 ^a	7,36-7,33 m 2H ^a
10	122,3 ^b	8,07 dl (8,0) 1H ^b
10a	124,6	
10b	142,9	
1'	108,1	4,64 dl (8,0) 1H
2'	75,4	3,56 m 1H
3'	77,9	3,47-3,43 m 2H
4'	71,0	3,47-3,43 m 2H
5'	78,2	3,30 m 1H
6'	62,2	3,87 dl (11,8) 1H; 3,75 dd (11,8; 5,1) 1H

^{a-a} e ^{b-b} podem ser trocáveis

O espectro de RMN de ^1H do derivado BLC01 (Figura 43) é bastante característico, devido a presença de sinais entre 3,0 a 4,0 ppm, indicativo de carboidrato. A presença de uma unidade osídica na molécula também pôde ser sugerida pelo duplete em δ_{H} 4,64 com $J = 8,0$ Hz, típico de hidrogênio ligado ao carbono anomérico de glicose com configuração β (AGRAWAL, 1992). A desblindagem deste hidrogênio é bastante característica, devido ao efeito indutivo retirador de elétrons dos oxigênios ligados ao carbono anomérico, este também bastante desblindado para um carbono sp^3 (δ_{C} 108,1). A posição da ligação da molécula de glicose foi confirmada pela correlação entre o hidrogênio do carbono anomérico (C-1') δ_{H} 4,64 com o carbono 5 do anel B, (δ_{C} 139,7).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Figura 43. Espectro de RMN de ^1H do derivado da β -lapachona BLC01 (CD_3OD , 500 MHz).

É importante destacar também que os hidrogênios metilênicos ligados ao carbono 4, que antes eram enantiotópicos, aparecem em deslocamentos distintos, tornando-se diastereotópicos, devido à presença de centros assimétricos próximos.

O derivado com tempo de retenção de 18,6 minutos é regioisomérico do metabólito BLC01, e foi denominado BLC02 (Figura 44).

Da mesma forma que para o derivado BLC01, houve formação da hidroquinona com subsequente ligação de uma unidade de β -D-glicose no sítio reduzido, porém desta vez o ataque ocorreu na posição 6 do anel B. Essa posição parece ser favorável para a ligação da subunidade de glicose, uma vez que verificou-se um rendimento maior do derivado BLC02 (3,0 mg) em comparação com o derivado BLC01 (0,6 mg). A ligação da glicose na posição 6 foi confirmada pela análise do mapa de contornos de HMBC ($\text{H}-1'$ δ_{H} 4,58 correlacionando com $\text{C}-6$ δ_{C} 132,3).

Os dados de RMN de ^1H e ^{13}C do derivado BLC02 são apresentados na tabela 10. Assim como o derivado BLC01, este metabólito da β -lapachona também não foi descrito na literatura até o momento.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Figura 44. Estrutura química do derivado BLC02, obtido pela biotransformação da β -lapachona com o fungo *C. elegans*. À direita estão a fórmula molecular, m/z em alta resolução, tempo de retenção em minutos (CLAE-DAD), nome químico e $[\alpha]_D$ da respectiva estrutura.

Tabela 10. Dados de RMN de 1H e ^{13}C do derivado BLC02.

BLC02 (CD_3OD , 500 MHz)		
Posição	δ_C ppm 125 MHz	δ_H ppm, mult., (J Hz), int. 500 MHz
2	75,3	
2a e 2b	26,9	1,39 s 6H
3	33,3	1,88 t (6,6) 2H
4	18,8	2,81-2,78 m 2H
4a	108,5	
5	146,3	
6	132,3	
6a	121,8	
7	122,2 ^b	8,32 dl (8,5) 1H ^b
8	123,2 ^a	7,20 ddd (8,5; 7,6; 1,0) 1H ^a
9	126,8 ^a	7,36 ddd (8,5; 7,6; 1,0) 1H ^a
10	122,1 ^b	7,99 dl (8,5) 1H ^b
10a	129,2	
10b	147,8	
1'	108,4	4,58 dl (8,0) 1H
2'	75,6	3,62 m 1H
3'	78,1	3,43 m 1H
4'	71,1	3,52 m 1H
5'	78,3	3,25 m 1H
6'	62,3	3,85 dd (12,0; 2,1) 1H; 3,78 dd (12,0; 4,6) 1H

^{a-a} e ^{b-b} podem ser trocáveis

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No espectro de RMN de ^1H do derivado BLC02 (Figura 45) também observam-se sinais característicos da unidade de β -D-glicose na estrutura. Os espectros de RMN e de massas desse derivado estão no anexo 8 (páginas 157 a 162).

Figura 45. Espectro de RMN de ^1H do derivado da β -lapachona BLC02 (CD_3OD , 500 MHz).

As reações de glicosilação geralmente ocorrem para a estabilização da hidroquinona, impedindo que a mesma ocasionasse estresse oxidativo que pode trazer sérios danos celulares (PINTO e CASTRO, 2009). Como esse meio de cultivo foi preparado com 1% de glicose, houve disponibilidade desse carboidrato para que essa reação acontecesse.

A espécie *C. elegans* é bastante conhecida por catalisar reações semelhantes a do metabolismo de mamíferos (MOODY et al., 2002; MOODY et al., 1999). A formação da hidroquinona como subsequente conjugação com nucleófilos já foi relatada pela literatura em trabalhos de metabolismo da β -lapachona (CHENG et al., 2012; MIAO et al., 2009), inclusive em um trabalho clínico com humanos (SAVAGE

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

et al., 2008). Porém, essa é a primeira vez que derivados glicosilados da β -lapachona são relatados.

4.4.2 Biotransformação com o fungo *Cunninghamella echinulata* ATCC 8688a

Na triagem com o fungo *Cunninghamella echinulata* verificou-se a capacidade de transformação da naftoquinona após sete dias de incubação. O pH do meio após o cultivo foi medido, sendo igual a 5,0 para o caldo da biotransformação e igual a 9,0 no controle contendo apenas a cultura fúngica, verificando então uma acidificação do meio quando o fungo foi cultivado em conjunto com a β -lapachona e uma alcalinização quando a cultura foi desenvolvida sem a presença dessa naftoquinona. Isso pode ter acontecido devido à produção de enzimas pelo fungo na tentativa de metabolizar a estrutura da β -lapachona, o que pode ter acidificado o meio, lembrando que o meio Czapek modificado 1 tem o pH ajustado para 7,0 no momento do preparo.

O processo de biotransformação da β -lapachona utilizando esse fungo apresentou um baixo rendimento. Os perfis químicos obtidos dos extratos de biotransformação e controle estão apresentados na figura 46.

Figura 46. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD no comprimento de onda 245 nm. A) Cromatograma do extrato de biotransformação com o fungo *C. echinulata*. B) Cromatograma do extrato do controle fúngico.

No entanto, analisando o pico em aproximadamente 18,6 minutos, foi possível verificar que se tratava do derivado BLC02, obtido na biotransformação com o fungo *C. elegans* (item 4.4.1, página 58) através da comparação do tempo de retenção e dados de absorção no UV (Figura 47).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Figura 47. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD no comprimento de onda 245 nm. A) Cromatograma do extrato de biotransformação com o fungo *C. echinulata*. B) Cromatograma do extrato de biotransformação com o fungo *C. elegans*. C e D) Comparação do espectro de absorção no UV do composto produzido em A e o espectro do derivado BLC02.

Para confirmação de que se tratava realmente do derivado BLC02, foi realizado o isolamento do pico em aproximadamente 18,6 minutos, obtido em pequena escala com a biotransformação com o fungo *C. echinulata*, em CLAE semi-preparativa utilizando coluna fenil semi-preparativa e fase móvel iniciando com 10% de acetonitrila e 90% de água, chegando a 100% de acetonitrila em 33 minutos (Figura 48).

Figura 48. Cromatograma obtido em CLAE semi-preparativa durante o isolamento do pico produzido na biotransformação com o fungo *C. echinulata*.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O derivado isolado foi então submetido à análise em espectrômetro de massas de alta resolução e o perfil de fragmentação no modo positivo de análise foi comparado com o obtido com o derivado BLC02, confirmando que se tratava do mesmo metabólito. Foi possível a diferenciação do derivado BLC01, uma vez que sua fragmentação (IES-EM/EM) no modo positivo a 20 eV produz íons diferentes (Figura 49).

Figura 49. Espectros de EM/EM obtidos em alta resolução no modo positivo de análise a 20 eV (IES-EM/EM). A) Espectro do derivado BLC01. B) Espectro do derivado BLC02. C) Espectro do derivado produzido pelo fungo *C. echinulata*.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para tentar explicar porque há essa diferença na fragmentação entre os derivados BLC01 e BLC02, foram propostos os mecanismos de fragmentação do derivado glicosilado na posição 5 do anel B (Figura 50) e na posição 6 deste anel (Figura 51).

Figura 50. Proposta de rota de fragmentação do derivado BLC01 no modo positivo de análise (IES-EM/EM, 20 eV).

Na proposta de fragmentação do derivado BLC01, ocorreria a perda da molécula de glicose (162 u) a partir da molécula protonada (m/z 407), formando o pico base no espectro (m/z 245). Sugere-se que a protonação ocorra no oxigênio ligado ao açúcar, por ser um sítio bastante básico da molécula. Após a perda do carboidrato, duas vias são possíveis com o derivado BLC01, podendo ocorrer uma

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

RDA, com formação do íon de m/z 189, ou a perda de 18 u , possivelmente uma molécula de água, com consequente eliminação de 28 u , indicando a eliminação de CO. Com o derivado BLC02, a perda do carboidrato, com formação do pico base de m/z 245 também é visualizada no espectro (IES-EM/EM). No entanto, a eliminação de 18 u , com consequente perda de 28 u parece ser a rota preferencial.

Figura 51. Proposta de rota de fragmentação do derivado BLC02 no modo positivo de análise (IES-EM/EM, 20 eV).

Não foi possível a detecção do derivado BLC01 no extrato de biotransformação do fungo *C. echinulata* pelas técnicas analíticas utilizadas, como pode ser evidenciado na figura 52, que mostra a comparação dos cromatogramas obtidos com os extratos brutos da biotransformação com o fungo *C. echinulata* e *C. elegans* através da análise feita em CLAE-DAD.

Figura 52. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD no comprimento de onda 245 nm. A) Ampliação do cromatograma do extrato de biotransformação com o fungo *C. echinulata*. B) Ampliação do cromatograma do extrato de biotransformação com o fungo *C. elegans*.

O fungo *C. echinulata* é conhecido por catalisar reações de glicosilação (LUSTOSA et al., 2012; MIYAKOSHI et al., 2010). Esse fungo já foi utilizado em um processo de metabolização do lapachol, isômero da β -lapachona, em que conjugou

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

uma molécula de glicose na hidroxila livre dessa naftoquinona (OTTEN e ROSAZZA, 1981). Porém, com o procedimento de transformação microbiana da β -lapachona, esse fungo filamentoso não propiciou a obtenção de derivados com rendimento significativo, após sete dias de incubação.

4.4.3 Biotransformação com o fungo *Penicillium crustosum* VR4

O fungo endofítico *Penicillium crustosum* VR4 foi avaliado quanto a capacidade de biotransformar a β -lapachona, utilizando dois processos diferentes, conforme descrito no item 3.6.2 (página 20). Os perfis químicos obtidos por CLAE-DAD no modo analítico, tanto do extrato de biotransformação como do controle fúngico, quando a biotransformação foi realizada utilizando o meio Czapek modificado 1 estão apresentados na figura 53.

Figura 53. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD no comprimento de onda 225 nm. A) Cromatograma do extrato de biotransformação com o fungo *P. crustosum* VR4 no meio fermentatido Czapek modificado 1. B) Cromatograma do extrato do controle fúngico.

Pode-se notar que grande quantidade de β -lapachona restou no extrato de biotransformação (Figura 53 A), mostrando que houve baixa taxa de biotransformação após sete dias de incubação, tempo no qual o processo de biotransformação foi avaliado. Nota-se que o pico ao lado da naftoquinona, com tempo de retenção de aproximadamente 24 minutos, também aparece no controle, e possivelmente trata-se de um metabólito desse fungo. Dentre os compostos produzidos por esse fungo, estão algumas dicetopiperazinas (GUIMARÃES et al., 2010).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi medido o pH do caldo de cultivo no sétimo dia de contato do fungo com a β -lapachona, evidenciando-se uma acidificação do meio Czapek modificado 1 para pH 4,0. Já caldo de cultivo do controle fúngico estava alcalino, apresentando pH 8,0. É importante lembrar que no momento de preparo, o pH do meio Czapek 1 é acertado para 7,0. Isso indica que pode ter havido a liberação de enzimas com grupamentos ácidos na tentativa de metabolização da naftoquinona.

Os perfis químicos obtidos também em CLAE-DAD analítica do extrato de biotransformação e do controle fúngico com o meio Czapek modificado 3 estão apresentados na figura 54.

Figura 54. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD no comprimento de onda 225 nm.
A) Cromatograma do extrato de biotransformação com o fungo *P. crustosum* VR4 no meio fermentatido Czapek modificado 3. B) Cromatograma do extrato do controle fúngico.

Nota-se também um baixo rendimento de biotransformação, assim como ocorreu para o procedimento realizado com o meio Czapek modificado 1, não sendo interessante o aumento de escala. O pH verificado com o caldo de biotransformação foi igual a 6,0 e do controle fúngico 7,0. Isso mostra que não houve alteração significativa do pH, uma vez que no momento do preparo o pH do meio Czapek modificado 3 é acertado para 6,5 a 7,0.

Esse fungo já foi utilizado em diversos processos de biotransformação de fármacos, principalmente em processos com exigência enantiosseletiva (CARRÃO et al., 2011; BORGES et al., 2011). Porém não se obteve êxito na biotransformação da β -lapachona utilizando o fungo endofítico *P. crustosum* nas condições experimentais empregadas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.4.4 Biotransformação com o fungo *Papulaspora immersa* SS13

Com o fungo endofítico *Papulaspora immersa* SS13 verificou-se, na triagem inicial, o consumo total da β -lapachona e apenas picos com baixa intensidade após sete dias de incubação na análise do extrato bruto de biotransformação por CLAE-DAD (Figura 55).

Figura 55. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD no comprimento de onda 280 nm.
A) Cromatograma do extrato de biotransformação com o fungo *P. immersa* SS13 no sétimo dia.
B) Cromatograma do extrato do controle fúngico após sete dias de incubação.

Como esse fungo mostrou-se promissor na transformação microbiana da β -lapachona, optou-se por avaliar a biotransformação com 24, 48 e 72 horas de contato (Figura 56).

Figura 56. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD de extratos de biotransformação com o fungo *P. immersa* SS13 no comprimento de onda 280 nm. A) Cromatograma do extrato de biotransformação após 24 horas de incubação. B) Cromatograma do extrato de biotransformação após 48 horas de incubação. C) Cromatograma do extrato de biotransformação após 72 horas de incubação.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pode-se verificar que, já nas primeiras 24 horas de contato, houve o total consumo da naftoquinona no caldo de cultivo e o aparecimento de picos com baixa intensidade no comprimento de onda de 280 nm. Diante desse resultado, optou-se pelo acompanhamento da biotransformação com 6 horas de contato da β -lapachona com o fungo *P. immersa* (Figura 57).

Figura 57. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD no comprimento de onda 280 nm. A) Cromatograma do extrato de biotransformação da β -lapachona com o fungo *P. immersa* SS13 após 6 horas de incubação. B) Cromatograma do extrato do controle fúngico após 6 horas de incubação.

Com 6 horas de contato, verificou-se que a β -lapachona ainda não havia sido totalmente consumida, mas o perfil químico do extrato mostrava um rendimento interessante de dois derivados, que possivelmente eram resultantes da biotransformação dessa naftoquinona, uma vez que os mesmos não eram evidenciados no extrato do controle fúngico.

Realizou-se o aumento de escala em 6 horas de contato com 60 mg da naftoquinona visando o isolamento desses metabólitos. Para facilitar o isolamento, optou-se por realizar o fracionamento do extrato bruto de biotransformação conforme descrito no item 3.10 (página 26). O cromatograma do isolamento da fração em 60% de acetonitrila está na figura 58.

Figura 58. Cromatograma obtido por CLAE na modalidade semi-preparativa durante o isolamento de metabólitos da fração em 60% de acetonitrila do extrato de biotransformação em grande escala com o fungo *P. immersa*, tendo como substrato a β -lapachona, monitorado nos comprimentos de onda 235 e 280 nm.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O pH medido nos processos de biotransformação foi sempre 6,0, tanto nos controles fúngicos como nos caldos de biotransformação, em todos os tempos que foram monitorados.

Os metabólitos isolados passaram por análises espectrométricas e espectroscópicas para identificação estrutural. O derivado com tempo de retenção de 23,5 minutos (CLAE-DAD) foi codificado como BLS01 e o metabólito com tempo de retenção de 24,7 minutos (CLAE-DAD) foi codificado como BLS02. Analisando os dados gerados, verificou-se que o derivado BLS01 tratava-se, na verdade, da cumarina identificada no extrato de biotransformação com o fungo *M. rouxii* e codificada de BLM-EM02 (Figura 59).

Figura 59. Estrutura química do derivado BLS01, obtido na biotransformação da β -lapachona com o fungo *P. immersa* SS13. À direita estão a fórmula molecular, m/z em alta resolução, tempo de retenção em minutos (CLAE-DAD) e nome químico da respectiva estrutura.

Os dados de RMN de ¹H e ¹³C do derivado BLS01, com as respectivas comparações com a literatura, estão apresentados na tabela 11. Os dados completos de RMN e massas deste derivado estão no anexo 9 (páginas 163 a 168).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 11. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do derivado BLS01 e respectivas comparações com a literatura.

Posição	BLS01 (CD_3OD , 500 MHz)		YANG et al., 2008	
	δ_{C} ppm 125 MHz	δ_{H} ppm, mult., (J Hz), int. 500 MHz	δ_{C} ppm (CDCl_3 , 400 MHz)	δ_{H} ppm, mult., (J Hz), int. ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz)
2	79,9		78,3	
2a e 2b	26,7	1,47 s 6H	26,8	1,41 s 6H
3	32,6	1,93 t (6,6) 2H	32,1	1,87 t (6,4) 2H
4	18,3	2,55 t (6,6) 2H	17,6	2,45 t (6,4) 2H
4a	100,6		99,8	
5	165,3		163,5	
6a	153,7		152,7	
7	117,4	7,33 m 2H	116,7	7,39-7,33 m 2H
8	125,3	7,33 m 2H	123,8	7,39-7,33 m 2H
9	132,8	7,58 ddd (8,1; 7,5; 1,5) 1H	131,4	7,61 t (8,0) 1H
10	123,5	7,81 dd (8,1; 1,5) 1H	122,6	7,74 d (7,2) 1H
10a	117,4		116,4	
10b	161,0		159,4	

No espectro de RMN de ^1H do derivado BLS01 (Figura 60) observa-se que os hidrogênios ligados ao carbono 7 e 8 desdobram em um multipeto em δ_{H} 7,33, ou seja, estão em um sistema de spin do tipo AB, que está sendo blindado pelo efeito mesomérico do oxigênio do grupamento éster adjacente.

Figura 60. Espectro de RMN de ^1H do derivado da β -lapachona BLS01 (CD_3OD , 500 MHz).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Analisando espectro de RMN de ^1H do derivado BLS02 (Figura 61), verificou-se que se tratava da lactona 2,2-dimetil-3,4-diidropirano[3,4-*c*]isocromen-6[2*H*]-ona, também relatada no extrato de biotransformação com o fungo *M. rouxii* codificado de BLM08 (Figura 62). Os dados completos de RMN e massas em alta resolução do derivado BLS02, são encontrados no anexo 10 (páginas 169 a 174).

Figura 61. Espectro de RMN de ^1H do derivado da β -lapachona BLS02 (CD_3OD , 500 MHz).

Figura 62. Estrutura química do derivado BLS02, obtido pela biotransformação da β -lapachona com o fungo *P. immersa* SS13.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pode-se notar que o espectro de RMN de ^1H do derivado BLS02 é idêntico ao do derivado BLM08 mostrado na figura 35 (página 54), tratando-se do mesmo metabólito da β -lapachona. Não foi possível o isolamento do ácido dicarboxilado (BLM-EM01) ou do derivado de sete membros no anel B, o qual pode ter sido formado pela inserção de um oxigênio devido a ação de monooxigenases, porém esse fato não descarta a possibilidade da existência desses derivados no extrato de biotransformação, já que podem ser os intermediários para formação dos derivados BLS01 e BLS02.

A metabolização rápida da β -lapachona pelo fungo *P. immersa* foi um fato bastante interessante. Talvez este fungo esteja familiarizado com estruturas como essa naftoquinona, possuindo genes para expressão de enzimas para a metabolização rápida desse tipo de estrutura, ou até mesmo, produzindo enzimas de forma constante. No trabalho de Gallo e colaboradores (2010), foram isolados diversos compostos produzidos por esse fungo, sendo que a maioria deles apresentavam carbonilas em sua estrutura. Sabe-se que o yacon (*Smallanthus sonchifolius*), planta de onde esse micro-organismo foi isolado, produz uma série de lactonas sesquiterpênicas, compostos sabidamente tóxicos (OLIVEIRA et al., 2011), e que muitas vezes apresentam atividade antimicrobiana (LIN et al., 2003). A produção dessas enzimas que podem metabolizar compostos tóxicos pode ser um dos mecanismos de proteção utilizados por esse fungo.

4.5 Biotransformação da α -lapachona com o fungo *Mucor rouxii* NRRL 1894

A α -lapachona (Figura 63) é um isômero estrutural da β -lapachona, que não teve seu metabolismo estudado. Essa naftoquinona também apresenta atividades biológicas, embora seja menos ativa que a β -lapachona (RÍOS-LUCI et al., 2012; BOURGUIGNON et al., 2011).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Figura 63. Estrutura química da α -lapachona, com dados de correlações no HMBC, fórmula molecular, *m/z* em alta resolução e tempo de retenção em minutos (CLAE-DAD).

Seus dados de RMN de ^1H e ^{13}C estão descritos na tabela 12, e seus dados completos de RMN e massas estão no anexo 11 (páginas 175 a 179).

Tabela 12. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da α -lapachona e respectivas comparações com a literatura.
 α -lapachona (CDCl₃, 500 MHz) α -lapachona (CDCl₃, 200 e 400 MHz)
 SALAS et al., 2008

Posição	δ_{C} ppm 125 MHz	δ_{H} ppm, mult., (J Hz), int. 500 MHz	δ_{C} ppm	δ_{H} ppm, mult., (J Hz), int.
2	78,2		78,2	
2a e 2b	26,6	1,44 s 6H	26,5	1,44 s 6H
3	31,4	1,82 t (6,6) 2H	31,4	1,83 t (6,6) 2H
4	16,8	2,62 t (6,6) 2H	16,8	2,63 t (6,6) 2H
4a	120,1		120,2	
5	184,4		184,4	
5a	132,1		132,1	
6	126,2	8,08 m 2H	126,3 ^b	8,10 m 2H
7	133,0	7,70-7,66 m 2H	133,8 ^a	7,66 m 2H
8	133,0	7,70-7,66 m 2H	132,9 ^a	7,66 m 2H
9	126,2	8,08 m 2H	126,0 ^b	8,10 m 2H
9a	131,0		131,2	
10	180,1		180,0	
10a	154,6		154,6	

^{a-a} e ^{b-b} podem ser trocáveis

No espectro de RMN de ^1H da α -lapachona (Figura 64) observa-se que, apesar de não existir um plano de simetria perfeito na estrutura, os hidrogênios ligados aos carbonos 6 e 9 do anel aromático aparecem quase como isócronos (δ_{H} 8,08), uma vez que existe um plano de simetria no anel B.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Figura 64. Espectro de RMN de ^1H da α -lapachona (CDCl_3 , 500 MHz).

A biotransformação com o fungo *M. rouxii*, tendo como substrato a α -lapachona, foi realizada com o propósito de estabelecer uma comparação entre o metabolismo microbiano da β -lapachona com o do seu isômero.

Sabe-se que em termos de atividade biológica, a β -lapachona destaca-se sobre a α -lapachona por ser mais ativa e, uma das hipóteses de como o processo de biotransformação de um determinado substrato é estimulada e acontece, é justamente a toxicidade dessa substância frente ao micro-organismo utilizado. Quando o substrato entra em contato com o micro-organismo, o mesmo tenta deixá-lo menos tóxico, tanto no que diz respeito à desativação de grupamentos responsáveis pela atividade biológica, como para deixar a estrutura química mais polar, para que o substrato permaneça solúvel no meio de cultura, tendo um menor contato com as células microbianas.

A biotransformação da α -lapachona pelo fungo *M. rouxii* foi acompanhada diariamente durante sete dias. O procedimento foi realizado da mesma forma que para seu isômero β -lapachona, com relação aos meios de cultura utilizados, tamanho de inóculo e concentração da naftoquinona utilizada no processo de biotransformação.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores de pH dos caldos de biotransformação e controle fúngico foram medidos diariamente, sendo 6,0 tanto para o extrato de biotransformação como para o controle até o terceiro dia de biotransformação, e 7,0 do quarto ao sétimo dia para ambos. Lembrando que o pH inicial do meio Koch's K1 é 6,0. O pH do controle de estabilidade da α -lapachona com o meio fermentativo foi igual a 7,0 em todos os dias acompanhados. Os perfis químicos dos extratos de biotransformação analisados por CLAE-DAD podem ser vistos na figura 65.

Figura 65. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD no comprimento de onda 251 nm dos extratos de biotransformação da α -lapachona com o fungo *M. rouxii* no segundo dia de contato. A) Após um dia de incubação. B) Após dois dias de incubação. C) Após três dias de incubação. D) Após quatro dias de incubação. E) Após cinco dias de incubação. F) Após seis dias de incubação. G) Após sete dias de incubação. H) Cromatograma do controle de estabilidade da α -lapachona com o meio Koch's K1 no sétimo dia de incubação.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pode-se notar que no primeiro dia de contato do fungo *M. rouxii* com a α -lapachona (Figura 65 A) formou-se um único derivado (1) com tempo de retenção de 15,2 minutos, e que o mesmo foi diminuindo de intensidade com o passar dos dias, até não ser mais detectado. No quinto dia (Figura 65 E) ocorre a produção máxima de um segundo derivado (2) com tempo de retenção de 17,5 minutos, e outro derivado mais polar (3), com tempo de retenção em aproximadamente 15,0 minutos também é observado. Nota-se que no quinto dia de incubação aparecem pequenos sinais referentes ao tempo de retenção da β -lapachona e da α -lapachona. Diante dessas análises, optou-se por realizar a biotransformação em escala ampliada no primeiro e no quinto dia de incubação, para tentar recuperar e determinar as estruturas desses possíveis derivados da α -lapachona.

Analizando os dados experimentais do derivado isolado no primeiro dia de biotransformação (1), que foi codificado de ALM01D1, conclui-se que se tratava do derivado glicosilado na posição 5 do anel B da α -lapachona (Figura 66). Esse derivado é inédito na literatura.

Correlações selecionadas no HMBC (H $\rightarrow$ C)

Fórmula Molecular: C₂₁H₂₆O₈

***m/z* [M+Na]⁺ encontrada:** 429,1522

***m/z* [M+Na]⁺ calculada:** 429,1520

Tempo de retenção (CLAE-DAD): 15,2 min.

Nome químico: 10-hidroxi-2,2-dimetil-3,4-diidro-2H-nafto[2,3-*b*]piran-5-O- β -D-glicopiranosídeo

Figura 66. Estrutura química do derivado ALM01D1, obtido pela biotransformação da α -lapachona com o fungo *M. rouxii*. À direita estão a fórmula molecular, *m/z* em alta resolução, tempo de retenção em minutos (CLAE-DAD) e nome químico da respectiva estrutura.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados de RMN de ^1H e ^{13}C do derivado ALM01D1 estão descritos na tabela 13. Os dados experimentais completos de RMN e massas de alta resolução, obtidos para esse derivado, estão no anexo 12 (páginas 180 a 185).

Tabela 13. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do derivado ALM01D1.

ALM01D1 (CD ₃ OD, 500 MHz)		
Posição	δ_{C} ppm 125 MHz	δ_{H} ppm, mult., (J Hz), int. 500 MHz
2	75,8	
2a	26,7 ^b	1,40 s 3H ^b
2b	27,6 ^b	1,41 s 3H ^b
3	33,8	1,89-1,82 m 2H
4	20,1	3,45-3,38 m 3H; 3,01 m 1H
4a	119,1	
5	143,4	
5a	124,8	
6	123,2	8,32 d (8,3) 1H
7	125,1 ^a	7,29-7,24 m 2H ^a
8	124,1 ^a	7,29-7,24 m 2H ^a
9	121,9	8,02 d (8,3) 1H
9a	123,4	
10	137,0	
10a	138,2	
1'	106,7	4,79 d (8,0) 1H
2'	75,8	3,66-3,61 m 2H
3'	78,1	3,45-3,38 m 3H
4'	71,7	3,45-3,38 m 3H
5'	77,8	3,09 m 1H
6'	62,8	3,73 dd (11,6; 2,2) 1H; 3,66-3,61 m 2H

^{a-a} e ^{b-b} podem ser trocáveis

No espectro de RMN de ^1H do derivado ALM01D1 (Figura 67) observa-se sinais característicos de carboidrato, com deslocamentos entre 3,0 e 4,0 ppm.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Figura 67. Espectro de RMN de ^1H do derivado ALM01D1 da α -lapachona (CD_3OD , 500 MHz).

Os hidrogênios metilênicos ligados aos carbonos 3 e 4, que na α -lapachona eram enantiotópicos, agora aparecem desdobrando em multipletos, e as metilas se tornaram diastereotópicas pela proximidade dos centros assimétricos do açúcar.

Sugere-se que a formação desse derivado no primeiro dia de contato com o fungo, provavelmente, ocorreu pela disponibilidade da glicose, que com o passar dos dias foi ficando escassa, pois apenas 0,18% desse substrato são adicionados no meio Koch's K1. Com a escassez desse carboidrato, a glicose presente no derivado ALM01D1 pode ter sido utilizada para o metabolismo fúngico. Então, o fungo metabolizou novamente essa naftoquinona, e no quinto dia houve o ápice da formação de um derivado com tempo de retenção em 17,5 minutos (**2**) codificado de ALM02D5 e também detectou-se outro derivado mais polar com tempo de retenção de 15,0 minutos (**3**) chamado de ALM01D5 (Figura 65 E).

Para facilitar o isolamento desses metabólitos realizou-se também o fracionamento do extrato bruto utilizando SPE. As frações selecionadas para o isolamento foram as obtidas com 30% e 40% de acetonitrila (Figura 68).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Figura 68. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD das frações obtidas em SPE do extrato de biotransformação da α -lapachona com o fungo *M. rouxii* obtido em escala ampliada, no comprimento de onda 251 nm. A) Cromatograma da fração em 30% de acetonitrila. B) Cromatograma da fração em 40% de acetonitrila.

Porém, durante o isolamento dessas frações em CLAE semi-preparativa, detectou-se picos referentes ao tempo de retenção da β -lapachona e da α -lapachona (Figura 69).

Figura 69. Cromatograma obtido por CLAE na modalidade semi-preparativa durante o isolamento de metabólitos da fração em 40% de acetonitrila do extrato de biotransformação em escala ampliada com o fungo *M. rouxii*, tendo como substrato a α -lapachona, monitorado nos comprimentos de onda 230 e 251 nm.

Para compreender melhor esses resultados, os produtos isolados foram submetidos às análises de RMN e espectrometria de massas. Analisando os dados de RMN e massas de alta resolução e EM/EM do derivado mais polar, codificado de ALM01D5, concluiu-se que o mesmo se tratava do ácido dicarboxilado (BML-EM01) identificado no extrato de biotransformação com o fungo *M. rouxii* tendo como substrato a β -lapachona (Figura 70).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Correlações selecionadas no HMBC (H $\rightarrow$ C)

Fórmula Molecular: C₁₅H₁₆O₅

***m/z* [M+Na]⁺ encontrada:** 299,0889

***m/z* [M+Na]⁺ calculada:** 299,0889

Tempo de retenção (CLAE-DAD): 15,0 min.

Nome químico: 6-(2-carboxifenil)-2,2-dimetil-3,4-diidro-5-carboxi-2*H*-pirano

Figura 70. Estrutura química do derivado ALM01D5, obtido pela biotransformação da α -lapachona com o fungo *M. rouxii*. À direita estão a fórmula molecular, *m/z* em alta resolução, tempo de retenção em minutos (CLAE-DAD) e nome químico da respectiva estrutura.

Os dados de RMN desse derivado, com as respectivas comparações com a literatura, estão na tabela 14. Os dados espectroscópicos e espectrométricos completos obtidos com metabólito ALM01D5 estão no anexo 13 (páginas 186 a 191).

Tabela 14. Dados de RMN de ¹H e ¹³C do derivado ALM01D5 e respectivas comparações com a literatura.

Posição	ALM01D5 (CD ₃ OD, 500 MHz)		(DMSO- <i>d</i> ₆ , 400 MHz) YANG et al., 2008	
	δ_c ppm 125 MHz	δ_H ppm, mult., (J Hz), int. 500 MHz	δ_c ppm	δ_H ppm, mult., (J Hz), int.
2	82,5		76,8	
2a e 2b	27,6	1,38 s 6H	26,8	1,26 s 6H
3	33,8	1,73 <i>t</i> (6,5) 2H	32,3	1,69 <i>t</i> (6,4) 2H
4	21,2	2,17 <i>t</i> (6,5) 2H	20,3	2,33 <i>t</i> (6,4) 2H
5	94,5		101,0	
5a	174,6		168,0	
6	176,3		169,0	
1'	131,2		130,8	
2'	136,7		139,6	
2'a	169,2		162,8	
3'	131,6	8,02 <i>d</i> (7,3) 1H	131,0	7,79 <i>d</i> (7,2) 1H
4'	133,4	7,66 <i>t</i> (7,3) 1H	131,6	7,49 <i>t</i> (7,6) 1H
5'	130,8	7,56 <i>t</i> (7,3) 1H	129,9	7,40 <i>t</i> (7,6) 1H
6'	130,1	7,41 <i>d</i> (7,3) 1H	128,5	7,19 <i>d</i> (8,0) 1H

No espectro de RMN de ¹H do derivado ALM01D5 (Figura 71) observa-se o hidrogênio ligado ao carbono 3' desblindado (δ_H 8,02) devido ao efeito anisotrópico da carbonila do ácido carboxílico adjacente.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Figura 71. Espectro de RMN de ^1H do derivado ALM01D1 da α -lapachona (CD_3OD , 500 MHz).

Analisando o deslocamento químico obtido experimentalmente, com o relatado pela literatura, percebe-se uma variação significativa. Porém, os dados com o derivado ALM01D5 foram obtidos em CD_3OD em máquina operando a 500 MHz, enquanto que os valores descritos pela literatura foram gerados em $\text{DMSO}-d_6$ obtidos em espectrômetro operando a 400 MHz. Sabe-se que o solvente pode interagir com a amostra modificando os deslocamentos químicos de forma significativa (PAVIA et al., 2010).

Todavia, o espectro de EM/EM do derivado ALM01D5 (Figura 72) não deixou dúvidas que se tratava do ácido dicarboxilado, pois esse espectro foi idêntico ao relatado na literatura e obtido anteriormente para o derivado BLM-EM01 (MIAO et al., 2008).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Figura 72. Espectro de EM/EM do derivado ALM01D5 (IES-EM/EM, 20 eV).

O intrigante foi saber que um metabólito da β -lapachona estava sendo gerado, sugerindo a formação da β -lapachona no processo de biotransformação realizado com seu isômero α -lapachona. Quando o metabólito ALM02D5 teve sua estrutura determinada, parte da explicação de como este fato estava ocorrendo foi elucidada. O metabólito codificado como ALM02D5 trata-se da α -lapachona hidrolisada no anel C (Figura 73).

Figura 73. Estrutura química do derivado ALM02D5, obtido pela biotransformação da α -lapachona com o fungo *M. rouxii*. À direita estão a fórmula molecular, m/z em alta resolução, tempo de retenção em minutos (CLAE-DAD) e nome químico da respectiva estrutura.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados de RMN de ^1H e ^{13}C do derivado ALM02D5, assim como as correlações com a literatura, estão descritos na tabela 15. Os dados espectrométricos e espectroscópicos completos obtidos com esse derivado estão no anexo 14 (páginas 192 a 196).

Tabela 15. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do derivado ALM02D5 e respectivas comparações com a literatura.

Posição	ALM02D5 (CD ₃ OD, 500 MHz)		(CDCl ₃ , 300 MHz) CUNHA-FILHO et al., 2011	
	δ_{C} ppm 125 MHz	δ_{H} ppm, mult., (J Hz), int. 500 MHz	δ_{C} ppm	δ_{H} ppm, mult., (J Hz), int.
1	183,0		181,4	
2	158,5		153,1	
3	125,1		124,7	
4	186,1		184,7	
4a	134,2		132,8	
5	126,5	8,03 <i>m</i> 2H	126,6	8,05 <i>m</i> 2H
6	135,0	7,75 <i>ddd</i> (7,5; 7,5; 1,2) 1H	134,8	7,69 <i>m</i> 1H
7	133,2	7,70 <i>ddd</i> (7,5; 7,5; 1,2) 1H	132,8	7,63 <i>m</i> 1H
8	126,5	8,03 <i>m</i> 2H	126,1	8,05 <i>m</i> 2H
8a	131,5		129,5	
1'	19,0	2,64 <i>m</i> 2H	18,3	2,67 <i>m</i> 2H
2'	42,3	1,64 <i>m</i> 2H	41,5	1,68 <i>m</i> 2H
3'	71,3		71,0	
4' e 5'	28,7	1,26 <i>s</i> 6H	29,1	1,29 <i>s</i> 6H

O derivado ALM02D5 possivelmente originou a β -lapachona e a α -lapachona através da ciclização da cadeia lateral. Seu espectro de RMN de ^1H (Figura 74) revela que os hidrogênios ligados aos carbonos 1' e 2' desdobraram em multipletos, devido à presença da hidroxila ligada ao carbono 3'.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Figura 74. Espectro de RMN de ^1H do derivado ALM02D5 da α -lapachona (CD_3OD , 500 MHz).

Um derivado semelhante ao ALM02D5 foi relatado em trabalhos de metabolismo *in vitro* da β -lapachona utilizando hepatócitos humanos (MIAO et al., 2009; CHENG et al., 2012). Isso mostra que esse tipo de metabolização também pode ser vista utilizando sistemas enzimáticos humanos. Tal derivado apresenta o grupo hidroxílico na posição 5 do anel B (Figura 75).

Figura 75. Estrutura química do derivado obtido pelo metabolismo *in vitro* da β -lapachona (Adaptado de MIAO et al., 2009 e CHENG et al., 2012).

A confirmação de que o outro derivado detectado durante o processo de isolamento, codificado como ALM03D5, se tratava da β -lapachona, foi feita por comparação entre os dados de tempo de retenção (CLAE-DAD) e espectro de

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

absorção no UV da β -lapachona e desse isolado (Figura 76), e também pela análise do espectro de RMN de ^1H (Figura 77).

Figura 76. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD no comprimento de onda 256 nm. A) Cromatograma do derivado ALM03D5. B) Espectro de absorção no UV do derivado ALM03D5. C) Cromatograma da β -lapachona. D) Espectro de absorção no UV da β -lapachona.

Figura 77. Espectro de RMN de ^1H do derivado ALM03D1 (CDCl_3 , 500 MHz).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados de RMN completos da substância codificada como ALM03D5 estão no anexo 15 (páginas 197 a 200). Pode-se notar que o espectro de RMN de ^1H obtido é idêntico ao da β -lapachona, mostrado na figura 18 (página 36), confirmando que trata-se dessa naftoquinona.

Um resumo do que deve ter acontecido na biotransformação com a α -lapachona está apresentado na figura 78.

Figura 78. Rota sugerida para produção de derivados da α -lapachona no processo de biotransformação desenvolvido com o fungo *Mucor rouxii*.

Uma questão interessante foi a formação do derivado ácido dicarboxilado ALM01D5 sem a observação dos demais metabólitos da β -lapachona descritos no item 4.3 (página 37). Uma explicação pode ser a de que a formação de β -lapachona foi pequena e gradual, não havendo o estímulo para a síntese intensa de enzimas para metabolização dessa naftoquinona, o que foi evidenciado quando a mesma foi adicionada em grande quantidade (50 $\mu\text{g/mL}$) na biotransformação com o fungo *M. rouxii*. Neste caso, houve a necessidade do fungo diminuir a toxicidade causada pela β -lapachona, mas a sequência de reações enzimáticas não ocorreu, reforçando a hipótese de participação de várias enzimas na metabolização da β -lapachona por esse fungo de solo.

A biotransformação da α -lapachona com o fungo *M. rouxii* contribuiu para o entendimento do metabolismo de seu isômero β -lapachona. Isso reforça a importância do uso de modelos microbianos para estudos complementares de

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

metabolismo de candidatos a fármacos, mostrando também que a realização desses procedimentos é muito mais clara e completa quando se utilizam também análogos e até isômeros de tal estrutura para procedimentos de transformação microbiana. O fungo *M. rouxii* mostrou-se muito interessante para estudos de biotransformação, fornecendo um maior número de derivados, inclusive intermediários reacionais.

4.6 Biotransformação da β -lapachona com as bactérias

4.6.1 Biotransformação com a bactéria *Lactobacillus acidophilus*

No procedimento de biotransformação realizado com a bactéria *Lactobacillus acidophilus* não houve sucesso, não sendo detectados picos referentes a possíveis derivados, utilizando CLAE-DAD, em todas as concentrações testadas. Na figura 79 pode-se observar o cromatograma obtido para a concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ de β -lapachona.

Figura 79. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD no comprimento de onda 256 nm. A) Cromatograma do extrato de biotransformação com a bactéria *L. acidophilus* na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ de β -lapachona. B) Cromatograma do extrato do controle da cultura.

Destaca-se que foram utilizadas concentrações decrescentes de β -lapachona (100, 50, 25 e 12,5 $\mu\text{g/mL}$) mesmo sem esta naftoquinona ter apresentado efeitos inibitórios até a maior concentração testada no experimento de microdiluição em microplaca (item 4.2, página). Este procedimento foi realizado na tentativa de estimular a biotransformação, uma vez que está bem estabelecido que quinonas apresentam a capacidade de gerar espécies reativas de oxigênio que poderiam inibir a metabolização (PINTO e CASTRO, 2009).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores de pH dos caldos dos experimentos de biotransformação em todas as concentrações de β -lapachona testadas, e também para o controle bacteriano, foram reduzidos de 7,0, que é o valor inicial de pH do caldo de cultivo MRS, para 4,0. Apenas o controle de estabilidade da β -lapachona no caldo de cultivo permaneceu em pH 7,0.

4.6.2 Biotransformação com a bactéria *Bifidobacterium* sp.

Na biotransformação com a bactéria *Bifidobacterium* sp. foram detectados alguns picos que poderiam se tratar de derivados de biotransformação da β -lapachona, por comparação dos perfis cromatográficos do extrato de biotransformação e do controle, obtidos por CLAE-DAD (Figura 80).

Figura 80. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD no comprimento de onda 225 nm. A) Cromatograma do extrato de biotransformação com a bactéria *Bifidobacterium* sp. na concentração de 100 µg/mL de β -lapachona. B) Cromatograma do extrato do controle da cultura.

Assim como para o processo biotransformação com a bactéria *L. acidophilus*, o pH dos caldos de cultivo de biotransformação com a bactéria *Bifidobacterium* sp., em todas as concentrações de β -lapachona testadas, e o do controle bacteriano foram reduzidos para 4,0.

É interessante destacar que os metabólitos mais intensos, observados no cromatograma, apresentam tempo de retenção menor do que a naftoquinona, ou seja, são mais polares que a β -lapachona.

Para tentar determinar quais seriam os metabólitos formados nesse processo, optou-se pelo aumento de escala. O extrato bruto foi então analisado por CLUE-DAD-EM/EM. No entanto, houve supressão de ionização devido, provavelmente, à

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

grande quantidade de açúcares e outros interferentes extraídos do meio de cultivo (Figura 81).

Figura 81. Cromatograma obtido por CLUE-DAD-EM/EM (modo positivo) do extrato de biotransformação da β -lapachona pela bactéria *Bifidobacterium* sp. na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ da naftoquinona.

A supressão de ionização é comumente observada na ionização por eletrospray (IES). Esse fenômeno ocorre quando a ionização de um composto é diminuída pela presença de outro composto interferente (VESSECCI et al., 2011).

Para tentar solucionar esse problema, realizou-se o fracionamento do extrato por SPE e o isolamento de metabólitos das frações obtidas com 40%, 50% e 60% de acetonitrila utilizando CLAE na modalidade semi-preparativa. Como o rendimento de biotransformação foi baixo, não foi possível o isolamento de quantidades suficientes dos derivados para obtenção de dados de RMN. Então, alguns picos foram selecionados e analisados utilizando espectrometria de massas, sendo feitas infusões diretas. No entanto, não se obteve sucesso na determinação estrutural de nenhum derivado de biotransformação com essa bactéria, devido à presença de impurezas que atrapalharam as análises por essa técnica muito sensível. O baixo rendimento de biotransformação e o arraste de muitas impurezas durante o processo extrativo foram os principais motivos que impossibilitaram a determinação estrutural dos possíveis derivados da β -lapachona nesse processo.

4.6.3 Biotransformação com a cultura láctea mista

Com a cultura láctea mista, composta pela mistura das bactérias *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* sp. e *Streptococcus salivarius* subesp. *thermophilus*,

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

não foram detectados derivados nas análises dos extratos brutos por CLAE-DAD em nenhuma das concentrações de β -lapachona testadas. Na figura 82 pode-se observar o cromatograma obtido com o extrato de biotransformação na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ da naftoquinona e extrato do controle bacteriano.

Figura 82. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD no comprimento de onda 256 nm. A) Cromatograma do extrato de biotransformação com a cultura mista na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ de β -lapachona. B) Cromatograma do extrato do controle da cultura.

Os valores de pH dos caldos de cultivo de biotransformação também foram reduzidos para 4,0, em todas as concentrações de β -lapachona testadas, e no controle bacteriano.

Apesar de a bactéria *Bifidobacterium* sp. estar presente nessa cultura mista, a preparação do inóculo foi feita com as três bactérias em conjunto, totalizando 10^6 UFC. Com isso, pode ser que o número de células bacterianas não foi suficiente para que fossem detectados produtos de biotransformação da β -lapachona.

4.6.4 Biotransformação com a bactéria *Escherichia coli* ATCC 25922 em anaerobiose

No procedimento de biotransformação com a bactéria *Escherichia coli* em anaerobiose também não foram detectados produtos de biotransformação nas análises feitas por CLAE-DAD em todas as concentrações testadas. O pico que se observa no cromatograma do extrato de biotransformação como um possível derivado, também foi detectado no cromatograma do controle da cultura (Figura 83).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Figura 83. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD no comprimento de onda 256 nm. A) Cromatograma do extrato de biotransformação com a bactéria *E. coli* em anaerobiose na concentração de 25 µg/mL de β -lapachona. B) Cromatograma do extrato do controle da cultura.

Os valores de pH dos caldos de cultivo permaneceram em 7,5 para os de biotransformação, em todas as concentrações de β -lapachona testadas, e também para o controle bacteriano, e no controle de estabilidade da β -lapachona no caldo de cultivo. O pH inicial do caldo de cultivo MH foi de 7,5.

4.6.5 Biotransformação com a bactéria *Escherichia coli* ATCC 25922 em aerobiose

No processo de biotransformação realizado com a bactéria *Escherichia coli*, cultivada em aerobiose, foram detectados dois picos, um mais polar e outro mais apolar que a β -lapachona, na concentração de 25 µg/mL de naftoquinona (Figura 84).

Figura 84. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD no comprimento de onda 245 nm. A) Cromatograma do extrato de biotransformação com a bactéria *E. coli* em aerobiose na concentração de 25 µg/mL de β -lapachona. B) Cromatograma do extrato do controle da cultura.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores de pH dos caldos de cultivo foram alcalinizados para 9,0 nos caldos de biotransformação, em todas as concentrações de β -lapachona testadas, e também no controle bacteriano.

Analisando os espectros de absorção no UV desses possíveis derivados de biotransformação, foi verificado que o metabólito com tempo de retenção em 24 minutos, codificado de BLE-EM01, apresentava as mesmas características do derivado BLM07, descrito no processo de biotransformação com o fungo *M. rouxii*, tendo como substrato a β -lapachona (Figura 85).

Figura 85. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD no comprimento de onda 245 nm.
 A) Cromatograma do extrato de biotransformação da β -lapachona pelo fungo *M. rouxii*.
 B) Cromatograma do extrato de biotransformação da β -lapachona pela bactéria *E. coli* em aerobiose.
 C e D) Comparação do espectro de absorção no UV do derivado BLM07 e o espectro do metabólito obtido com a biotransformação com a *E. coli* em aerobiose.

Para confirmação de que se tratava do mesmo derivado, realizou-se o isolamento desse pico utilizando CLAE na modalidade semi-preparativa, com posterior análise por espectrometria de massas de alta resolução, comparando a fragmentação desse derivado, com o derivado BLM07 (Figura 86).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Figura 86. Espectros de EM/EM obtidos em alta resolução no modo positivo de análise (IES-EM/EM, 25 eV). A) Espectro do derivado BLM07, obtido com o processo de biotransformação da β -lapachona pelo fungo *M. rouxii*. B) Espectro do derivado BLE-EM01, obtido com o processo de biotransformação da β -lapachona com a bactéria *E. coli* em aerobiose.

O espectro de EM/EM desses dois derivados protonados confirmou que se tratam da mesma estrutura. Para tentar explicar os íons formados durante sua fragmentação, foi proposto o mecanismo mostrado na figura 87.

Figura 87. Proposta de rota de fragmentação do derivado BLM07 e BLE-EM01 no modo positivo de análise (IES-EM/EM, 25 eV).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O pico base no espectro (IES-EM/EM, 25 eV) é o de m/z 159, decorrente da perda de 56 u que é resultante de uma RDA no anel C. Por fim, ocorre a perda de 28 u , indicando eliminação de CO originando o íon de m/z 131.

A formação desse derivado na biotransformação da β -lapachona pela *E. coli* em aerobiose, pode ter ocorrido diretamente através da eliminação de uma carbonila da naftoquinona, uma vez que não foi detectado o derivado ácido dicarboxilado no extrato de biotransformação.

Essa bactéria já foi estudada quanto ao seu potencial de biotransformar as isoflavonas genistina e daidzina, catalisando hidrólise para eliminação da molécula de glicose, formando as agliconas correspondentes daidzeína e genisteína (HUR et al., 2000). No entanto, pouco se sabe sobre a capacidade de transformação microbiana da bactéria *E. coli*.

4.7 Atividade citotóxica

Os ensaios citotóxicos frente à linhagem cancerígena SKBR-3 e à de fibroblastos normais GM07492-A mostraram o que já era esperado para a β -lapachona, a qual foi bastante ativa na inibição de ambas, não apresentando boa seletividade, sendo os valores de IC_{50} iguais a 5,6 μM e 7,25 μM , respectivamente. Apesar de ser bastante tóxica, essa naftoquinona apresenta um grande potencial anticancerígeno e o desenvolvimento de derivados menos tóxicos a partir desse protótipo é bastante válido e interessante.

Dois derivados da β -lapachona, a espirobenzolactona codificada como BLM02 e o derivado conjugado com β -D-glicose na posição 6 do anel B, codificado como BLC02, foram também submetidos a avaliação.

A espirobenzolactona (BLM02) não apresentou atividade contra a linhagem SKBR-3, mostrando que perdeu partes estruturais importantes para a atividade biológica.

Já o derivado glicosilado (BLC02) mostrou-se ativo contra a linhagem de células cancerígenas de mama em concentrações maiores que a β -lapachona, com uma IC_{50} de 312,5 μM , porém não apresentou citotoxicidade considerável contra a linhagem de fibroblastos normais, o que é um avanço na seletividade. Isso mostra que as carbonilas tem papel fundamental na atividade anticâncer e também estão relacionadas com a toxicidade da β -lapachona em células normais.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Vários trabalhos mostram que a citotoxicidade da β -lapachona está relacionada com altos níveis celulares da flavoenzima NAD(P)H:quinona oxidoreductase 1 (NQO1), que catalisa a formação de espécies reativas de oxigênio por essa naftoquinona (SIEGEL et al., 2012). Essa capacidade de induzir estresse oxidativo está envolvida com várias atividades biológicas e tóxicas das quinonas (PINTO e CASTRO, 2009). Estudos mostram que a enzima NQO1 é superexpressada em tumores sólidos como o de mama (SIEGEL e ROSS, 2000), o que pode ajudar a entender os resultados obtidos neste trabalho.

5. CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

5. Conclusões

O processo semissintético utilizado para produção da β -lapachona a partir do lapachol propiciou a obtenção da naftoquinona de interesse com alto grau de pureza após etapa de purificação.

A realização dos ensaios de inibição em microplaca com a β -lapachona foram de extrema importância para se desenvolver processos de biotransformação com concentrações que não fossem letais para os micro-organismos.

O fungo *M. rouxii*, mostrou-se bastante interessante no que diz respeito à mimetização do metabolismo humano e à obtenção de grande variedade metabólica, inclusive fornecendo possíveis intermediários de reações para formação de derivados da β -lapachona, além de um derivado inédito.

Já o fungo *P. immersa* mostrou um potencial bastante rápido para biotransformar a β -lapachona, quando comparado aos demais fungos utilizados, fornecendo duas lactonas isoméricas.

Nos processos de biotransformação conduzidos com os fungos *C. elegans* e *C. echinulata* foram obtidos derivados glicosilados inéditos da β -lapachona, corroborando com o que já está descrito na literatura para o gênero *Cunninghamella*, o qual é capaz de mimetizar o metabolismo humano e também catalisar reações de conjugação.

Os procedimentos comparativos entre a biotransformação da β -lapachona e α -lapachona com o fungo *M. rouxii* mostraram que estudos de metabolismo *in vitro* utilizando fungos filamentosos são muito promissores, e que a utilização de análogos de candidatos a fármacos pode ajudar no entendimento da metabolização do mesmo, fornecendo informações complementares.

Nos processos de biotransformação da β -lapachona utilizando as bactérias da microbiota intestinal, o potencial das bactérias *E. coli* e *Bifidobacterium* sp. em biotransformar a β -lapachona tornou-se evidente nas condições experimentais utilizadas. No entanto, o baixo rendimento e extração de interferentes do meio de cultivo dificultaram o isolamento e identificação de metabólitos.

Com base nos resultados da avaliação da atividade citotóxica da espirobenzolactona (derivado BLM02 da β -lapachona) e do derivado glicosilado codificado BLC02 pode-se sugerir que, no protocolo utilizado, as carbonilas da

5. CONCLUSÕES

β -lapachona foram fundamentais para a atividade citotóxica e que a glicosilação ocasionou a redução desta atividade.

Estudos de transformação microbiana de candidatos a fármacos são extremamente válidos, fornecendo informações complementares de metabolismo, já que neste trabalho foram detectados os mesmos metabólitos da β -lapachona relatados em estudos realizados com sangue humano.

*REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS*

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

ABOURASHED, E. A.; MIKELL, J. R.; KHAN, I. A. Bioconversion of silybin to phase I and II microbial metabolites with retained antioxidant activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 20, p. 2784-2788, 2012.

AGRAWAL, P. K. NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. **Phytochemistry**, v. 31, p. 3307-3330, 1992.

ALMEIDA, E. R. Preclinical and clinical studies of lapachol and beta-lapachone. **The Open Natural Products Journal**, v. 2, p. 42-47, 2009.

ALMEIDA, M. O. **Obtenção de derivados dos terpenos enidrina e afidicolina por biotransformação e semi-síntese e avaliação da atividade leishmanicida**. 2010, 159f. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas– Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 2010.

ANDRADE-NETO, V. F.; GOULART, M. O. F.; SILVA FILHO, J. F.; SILVA, M. J.; PINTO, M. C. F. R.; PINTO, A. V.; ZALIS, M. G.; CARVALHO, L. H.; KRETTLIA, A. U. Antimalarial activity of phenazines from lapachol, β -lapachone and its derivatives against *Plasmodium falciparum* in vitro and *Plasmodium berghei* in vivo. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 14, p. 1145-1149, 2004.

ASHA, S.; VIDYAVATHI, M. *Cunninghamella* – A microbial model for drug metabolism studies - A review. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 16-29, 2009.

BORGES, K. B. **Análise estereosseletiva de fármacos com aplicação em estudos de biotransformação empregando fungos**. 2010, 212f. Tese de Doutorado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Toxicologia Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 2010.

BORGES, K. B.; BORGES, W. S.; DURÁN-PATRÓN, R.; PUPO, A. T.; BONATO, P. S.; COLLADO, I. G. Stereoselective biotransformations using fungi as biocatalysts. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 20, p. 385-397, 2009a.

BORGES, K. B.; PUPO, M. T.; BONATO, P. S. Enantioselective biotransformation of propranolol to the active metabolite 4-hydroxypropranolol by endophytic fungi. **Química Nova**, v. 34, p. 1354-1357, 2011.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BORGES, W. S.; BORGES, K. B.; BONATO, P. S.; SAID, S.; PUPO, M. T. Endophytic fungi: natural products, enzymes and biotransformation reactions. **Current Organic Chemistry**, v. 13, p. 1137-1163, 2009b.

BOURGUIGNON, S. C.; CAVALCANTI, D. F. B.; SOUZA, A. M. T.; CASTRO, H. C.; RODRIGUES, C. R.; ALBUQUERQUE, M. G.; SANTOS, D. O.; SILVA, G. G.; SILVA, F. C.; FERREIRA, V. F.; PINHO, R. T.; ALVES, C. R. *Trypanosoma cruzi*: insights into naphthoquinone effects on growth and proteinase activity. **Experimental Parasitology**, v. 127, p. 160-166, 2011.

CAPEL, C. S.; SOUZA, A. C. D.; CARVALHO, T. C.; SOUSA, J. P. B.; AMBRÓSIO, 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 and Biotechnology**, v. 38, p. 1493-1498, 2011.

CARRÃO, D. B.; BORGES, K. B.; BARTH, T.; PUPO, M. T.; BONATO, P. S.; OLIVEIRA, A. R. M. Capillary electrophoresis and hollow fiber liquid-phase microextraction for the enantioselective determination of albendazole sulfoxide after biotransformation of albendazole by an endophytic fungus. **Electrophoresis**, v. 32, p. 2746-2756, 2011.

CARVALHO, T. C.; POLIZELI, A. M.; TURATTI, I. C. C.; SEVERIANO, M. E.; CARVALHO, C. E.; AMBRÓSIO, S. R.; CROTTI, A. E. M.; FIGUEIREDO, U. S.; VIEIRA, P. C.; FURTADO, N. A. J. C. Screening of Filamentous Fungi to Identify Biocatalysts for Lupeol Biotransformation. **Molecules**, v. 15, p. 6140-6151, 2010.

CAVALCANTE, F. A.; SILVA, J. L. V.; CARVALHO, V. M. N.; CAMARA, C. A.; SILVA, T. M. S.; PINTO, Â. C.; VARGAS, M. D.; SILVA, B. A. Spasmolytic activity of lapachol and its derivatives, α and β -lapachone, on the guinea-pig ileum involves blockade of voltagegated calcium channels. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, p. 183-189, 2008.

CHENG, X.; LIU, F.; YAN, T.; ZHOU, X.; WU, L.; LIAO, K.; WANG, G.; HAO, H. Metabolic profile, enzyme kinetics, and reaction phenotyping of β -lapachone metabolism in human liver and intestine *in vitro*. **Molecular Pharmaceutics**, v. 9, p. 3476-3485, 2012.

CLAESSENS, S.; HABONIMANA, P.; KIMPE, N. Synthesis of naturally occurring naphthoquinone epoxides and application in the synthesis of β -lapachone. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 8, p. 3790-3795, 2010.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CLSI (2006) **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**; approved standard CLSI document M7–A7. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne.

CLSI (2007) **Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria**, approved standard CLSI document M11–A7. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne.

CLSI (2008) **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi**; approved standard CLSI document M38-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne.

COELHO, T. S.; SILVA, R. S. F.; PINTO, A. V.; PINTO, M. C.F.R.; SCAINI, C. J.; MOURA, K. C.G.; SILVA, P. A. Activity of β -lapachone derivatives against rifampicin-susceptible and -resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. **Tuberculosis**, v. 90, p. 293-297, 2010.

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.

COPPOLA, M. M.; TURNES, C. G. Probióticos e resposta imune. **Ciência Rural**, v.34, p.1297-1303, 2004.

CORRÊA, G.; VILELA, R.; MENNA-BARRETO, R. F. S.; MIDLEJ, V.; BENCHIMOL, M. Cell death induction in *Giardia lamblia*: effect of beta-lapachone and starvation. **Parasitology International**, v. 58, p. 424-437, 2009.

COSSUM, P.A. Role of the red blood cell in drug metabolism. **Biopharmaceutics & Drug Disposition**, v. 9, p. 321-336, 1988.

CROTTI, A. E. M.; FONSECA, T.; HONG, H.; STAUNTON, J.; GALEMBECK, S. E.; LOPES, N. P.; GATES, P. J. The fragmentation mechanism of five-membered lactones by electrospray ionisation tandem mass spectrometry. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 232, p. 271-276, 2004.

CUNHA-FILHO, M. S. S., ESTÉVEZ-BRAUN, A.; PÉREZ-SACAU, E.; ECHEZARRETA-LÓPEZ, M. M.; MARTÍNEZ-PACHECO, R.; LANDÍN, M. Light effect on the stability of β -lapachone in solution: pathways and kinetics of degradation. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 63, p. 1156-1160, 2011.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

D'ANNEO, A.; AUGELLO, G.; SANTULLI, A.; GIULIANO, M.; DI FIORE, R.; MESSINA, C.; TESORIERE, G.; VENTO, R. Paclitaxel and beta-lapachone synergistically induce apoptosis in human retinoblastoma Y79 cells by downregulating the levels of phospho-akt. **Journal of Cellular Physiology**, v. 222, p. 433-443, 2010.

DANA FARBER CANCER INSTITUTE, INC. Boston, MA (US). Arthur B. Pardee; Chiang J. Li; Youzhi Li. **Method and composition for the treatment of cancer**. Patent number: US 6,664,288 B1, 14 abr. 2000, 16 dez. 2003.

DANA FARBER CANCER INSTITUTE, INC. Boston, MA (US). Arthur B. Pardee; Chiang J. Li; Youzhi Li. **Method and composition for the treatment of cancer**. Patent number: US 2005/0171031 A1, 1 mar. 2005, 4 ago. 2005.

DEMAIN, A. L.; ADRIO, J.L. Contributions of microorganisms to industrial biology. **Molecular Biotechnology**, v. 38, p. 41-55, 2008.

DING, W. J.; DENG, Y.; FENG, H.; LIU, W. W.; HU, R.; LI, X.; GU, Z. M.; DONG, X. P. Biotransformation of aesculin by human gut bacteria and identification of its metabolites in rat urine. **World Journal of Gastroenterology**, v. 15, p. 1518-1523, 2009.

DONG, G. Z., OH. E. T., LEE, H.; PARK, M. T.; SONG, C. W.; PARK, H. J. β -lapachone suppresses radiation-induced activation of nuclear factor- κ B. **Experimental and Molecular Medicine**, v. 42, p. 327-334, 2010.

DUNNE, C. Adaptation of bacteria to the intestinal niche: probiotics and gut disorder. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 7, p. 136-145, 2001.

DURIEZ, P.; CLERMONT, O.; BONACORSI, S.; BINGEN, E.; CHAVENTRÉ, A.; ELION, J.; PICARD, B.; DENAMUR, E. Commensal *Escherichia coli* isolates are phylogenetically distributed among geographically distinct human populations. **Microbiology**, v. 147, p. 1671-1676, 2001.

FERREIRA, V. F.; JORQUEIRA, A.; SOUZA, A. M. T.; SILVA, M. N.; SOUZA, M. C. B. V.; GOUVÊA, R. M.; RODRIGUES, C. R.; PINTO, A. V.; CASTRO, H. C.; SANTOS, D. O.; ARAÚJO, H. P.; BOURGUIGNON, S. C. Trypanocidal agents with low cytotoxicity to mammalian cell line: a comparison of the theoretical and biological features of lapachone derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 5459-5466, 2006.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

GALLO, M. B. C.; CAVALCANTI, B. C.; BARROS, F. W. A.; MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V.; PESSOA, C.; BASTOS, J. K.; PUPO, M. T. Chemical constituents of *Papulaspora immersa*, an endophyte from *Smallanthus sonchifolius* (Asteraceae), and their cytotoxic activity. **Chemistry & Biodiversity**, v. 7, p. 2941-2950, 2010.

GODERSKA, K.; NOWAK, J.; CZARNECKI, Z. Comparison of the growth of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* species in media supplemented with selected saccharides including prebiotics. **ACTA Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria**, v. 7, p. 5-10, 2008.

GOMES, A. M. P.; MALCATA, F. X. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. **Trends in Food Science & Technology**, v. 10, p. 139-157, 1999.

GUIMARÃES, D. O.; BORGES, W. S.; VIEIRA, N. J.; OLIVEIRA, L. F.; SILVA, C. H. T. P.; LOPES, N. P.; DIAS, L. G.; DURÁN-PATRÓN, R.; COLLADO, I. G.; PUPO, M. T. Diketopiperazines produced by endophytic fungi found in association with two Asteraceae species. **Phytochemistry**, v. 71, p. 1423-1429, 2010.

HANSON, J. R. **An introduction to biotransformations in organic chemistry**. Oxford, W. H. Freeman Spektrum, 92p., 1995.

HANSON, J. R. The microbiological transformation of diterpenoids. **Natural Product Reports**, v. 9, p. 139-151, 1992.

HELLER, K. J. Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73(suppl.), p. 374S-379S, 2001.

HILÁRIO, V. C.; CARRÃO, D. B.; BARTH, T.; BORGES, K. B.; FURTADO, N. A. J. C.; PUPO, M. T.; OLIVEIRA, A. R. M. Assessment of the stereoselective fungal biotransformation of albendazole and its analysis by HPLC in polar organic mode. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 61, p. 100-107, 2012.

HOOKE, S. C. The constitution of "lapachic acid" and its derivatives. **Journal of the Chemical Society**, v. 61, p. 611-650, 1892.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

HUR, H. G.; LAY JR., J. O.; 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*. **The journal of Antibiotics**, v. 46, p. 34-38, 1993.

JIN, J. S.; NISHIHATA, T.; KAKIUCHI, N.; HATTORI, M. Biotransformation of C-glucosylisoflavone puerarin to estrogenic (3S)-equol in co-culture of two human intestinal bacteria. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, p. 1621-1625, 2008.

KOUZI, S. A.; CHATTERJEE, P.; PEZZUTO, J. M.; HAMANN, M. T. Microbial transformations of the antimelanoma agent betulinic acid. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1653-1657, 2000.

KRISHNAN, P.; BASTOW, K. F. Novel mechanisms of DNA topoisomerase II inhibition by pyranonaphthoquinone derivatives - eleutherin, α -lapachone, and β -lapachone. **Biochemical Pharmacology**, v. 60, p. 1367-1379, 2000.

KUNG, H. N.; YANG, M. J.; CHANG, C. F.; CHAU, Y. P.; LU, K. S. *In vitro* and *in vivo* wound healing-promoting activities of β -lapachone. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 295, p. C931-C943, 2008.

LACROIX, I.; BITON, J.; AZERAD, R. Microbial models of drug metabolism: microbial transformations of Trimegestone[®] (RU27987), a 3-Keto- $\Delta^{4,9(10)}$ -19-norsteroid drug. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 7, p. 2329-2341, 1999.

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.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

LI, C. J.; AVERBOUKH, L.; PARDEE, A. B. β -lapachone, a novel DNA topoisomerase I inhibitor with a mode of action different from camptothecin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 268, p. 22463-22468, 1993b.

LI, C. J.; ZHANG, L. J.; DEZUBE, B. J.; CRUMPACKER, C. S.; PARDEE, A. B. Three inhibitors of type 1 human immunodeficiency virus long terminal repeat-directed gene expression and virus replication. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, p. 1839-1842, 1993a.

LIN, F.; HASEGAWA, M.; KODAMA, O. Purification and identification of antimicrobial sesquiterpene lactones from yacon (*Smallanthus sonchifolius*) leaves. **Bioscience Biotechnology & Biochemistry**, v. 67, p. 2154-2159, 2003.

LUSTOSA, K. R. M. D.; MENEGATTI, R.; BRAGA, R. C.; LIÃO, L. M.; OLIVEIRA, V. Microbial β -glycosylation of entacapone by *Cunninghamella echinulata* ATCC 9245. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 113, p. 611-613, 2012.

MAATOOQ, G. T.; MARZOUK, A. M.; GRAY, A. I.; ROSAZZA, J. P. Bioactive microbial metabolites from glycyrrhetic acid. **Phytochemistry**, v. 71, p. 262-270, 2010.

MEDEIROS, C. S.; PONTES-FILHO, N. T.; CAMARA, C. A.; LIMA-FILHO, J. V.; OLIVEIRA, P. C.; LEMOS, S. A.; LEAL, A. F. G.; BRANDÃO, J. O. C.; NEVES, R. P. Antifungal activity of the naphthoquinone beta-lapachone against disseminated infection with *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in dexamethasone-immunosuppressed Swiss mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 43, p. 345-349, 2010.

MENNA-BARRETO, R. F. S.; CORRÊA, J. R.; PINTO, A. V.; SOARES, M. J.; CASTRO, S. L. Mitochondrial disruption and DNA fragmentation in *Trypanosoma cruzi* induced by naphthoimidazoles synthesized from β -lapachone. **Parasitology Research**, v. 101, p. 895-905, 2007.

MIAO, X. S.; ZHONG, C.; WANG, Y.; SAVAGE, R. E.; YANG, R. Y.; KIZER, D.; VOLCKOVA, E.; ASHWELL, M. A.; CHAN, T. C. K. *In vitro* metabolism of β -lapachone (ARQ 501) in mammalian hepatocytes and cultured human cells. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 23, p. 12-22, 2009.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

MIAO, X-S.; SONG, P.; SAVAGE, R. E.; ZHONG, C.; YANG, R-Y.; KIZER, D.; WU, H.; VOLCKOVA, R.; ASHWELL, M. A.; SUPKO, J. G.; HE, X.; CHAN, T. C. K. Identification of the *in vitro* metabolites of 3,4-dihydro-2,2-dimethyl-2H-naphthol[1,2-b]pyran-5,6-dione (ARQ 501; β -lapachone) in whole blood. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 36, p. 641–648, 2008.

MIHOVILOVIC, M. D.; RUDROFF, F.; WINNINGER, A.; SCHNEIDER, T.; SCHULZ, F.; REETZ, M. T. Microbial Baeyer-Villiger oxidation: stereopreference and substrate acceptance of cyclohexanone monooxygenase mutants prepared by directed evolution. **Organic Letters**, v. 8, p. 1221-1224, 2006.

MIYAKOSHI, S.; AZAMI, S.; KUZUYAMA, T. Microbial glucosylation of flavonols by *Cunninghamella echinulata*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 110, p. 320-321, 2010.

MIYAZAWA, M.; SUZUKI, Y.; KAMEOKA, H. Biotransformation of (-)-cis-myrtanol and (+)-trans-myrtanol by plant pathogenic fungus, *Glomerella cingulata*. **Phytochemistry**, v. 45, p. 935-943, 1997.

MOODY, J. D.; FREEMAN, J. P.; CERNIGLIA, C. E. Biotransformation of doxepin by *Cunninghamella elegans*. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 27, p. 1157-1164, 1999.

MOODY, J. D.; FREEMAN, J. P.; FU, P. P.; CERNIGLIA, C. E. Biotransformation of mirtazapine by *Cunninghamella elegans*. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 30, p. 1274-1279, 2002.

MOON, D. O.; KANG, C. H.; KIM, M. O.; JEON, Y. J.; LEE, J. D.; CHOI, Y. H.; KIM, G. Y. β -Lapachone (LAPA) decreases cell viability and telomerase activity in leukemia cells: suppression of telomerase activity by LAPA. **Journal of Medicinal Food**, v. 13, p. 481-488, 2010.

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.

OLIVEIRA, R. B.; CHAGAS DE PAULA, D. A.; ROCHA, B. A.; FRANCO, J. J.; GOBBO-NETO, L.; UYEMURA, S. A.; SANTOS, W. F.; COSTA, F. B. Renal toxicity caused by oral use of medicinal plants: the yacon example. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, p. 434-441, 2011.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

OTTEN, S. L.; ROSAZZA, J. P. Microbial transformations 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 echinulata*. **Journal of Natural Products**, v. 44, p. 562-568, 1981.

OUGH, M.; LEWIS, A.; BEY, E. A.; GAO, J.; RITCHIE, J. M.; BORNMANN, W.; BOOTHMAN, D. A.; OBERLEY, L. W.; CULLEN, J. J. Efficacy of β -lapachone in pancreatic cancer treatment. **Cancer Biology & Therapy**, v. 4, p. 95-102, 2005.

PARK, E. J.; CHOI, K. S.; KWON, T. K. β -Lapachone-induced reactive oxygen species (ROS) generation mediates autophagic cell death in glioma U87 MG cells. **Chemico-Biological Interactions**, v. 189, p. 37-44, 2011.

PATERNÒ, E. Ricerche sull'acido lapacico. **Gazzetta Chimica Italiana**, v. 12, p. 337-392, 1882.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução a espectroscopia**. 700p. 4ed. Norte Americana: Cengage, 2010.

PHAM, T. T.; SHAH, N. P. Effects of lactulose supplementation on the growth of Bifidobacteria and biotransformation of isoflavone glycosides to isoflavone aglycones in soymilk. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 4703-4709, 2008.

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

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

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

PLANCHON, S. M.; PINK, J. J.; TAGLIARINO, C.; BORNMANN, W. G.; VARNES, M. E.; BOOTHMAN, D. A. β -lapachone-induced apoptosis in human prostate cancer cells: involvement of NQO1/xip3. **Experimental Cell Research**, v. 267, p. 95-106, 2001.

PUPO, M. T.; BORGES, K. B.; BORGES, W. S.; BONATO, P. S. Fungal biotransformation: a powerful tool in drug metabolism studies. In SAIKIA, R.; BEZBARUAH, R. L.; BORA, T. C. **Microbial Biotechnology**. cap. 3, p. 47-66, New India Publishing Agency, New Delhi, 2008.

REINICKE, K. E.; BEY, E. A.; BENTLE, M. S.; PINK, J. J.; INGALLS, S. T.; HOPPEL, C. L.; MISICO, R. I.; ARZAC, G. M.; BURTON, G.; BORNMANN, W. G.; SUTTON, D.; GAO, J.; BOOTHMAN, D. A. Development of β -lapachone prodrugs for therapy against human cancer cells with elevated NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 levels. **Clinical Cancer Research**, v. 11, p. 3055-3064, 2005.

RÍOS-LUCI, C.; BONIFAZI, E. L.; LEÓN, L. G.; MONTERO, J. C.; BURTON, G.; PANDIELLA, A.; MISICO, R. I.; PADRÓN, J. M. β -lapachone analogs with enhanced antiproliferative activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, p. 264-274, 2012.

RUBINSTEIN, A. Microbially controlled drug delivery to the colon. **Biopharmaceutics & Drug Disposition**, v. 11, p. 465-475, 1990.

SALAS, C.; TAPIA, R. A.; CIUDAD, K.; ARMSTRONG, V.; ORELLANA, M.; KEMMERLING, U.; FERREIRA, J.; MAYAB, J. D.; MORELLO, A. *Trypanosoma cruzi*: activities of lapachol and α - and β -lapachone derivatives against epimastigote and trypomastigote forms. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 668-674, 2008.

SAVAGE, R. E.; TYLER, A. N.; MIAO, X-S.; CHAN, T. C. K. Identification of a Novel Glucosylsulfate Conjugate as a Metabolite of 3,4-Dihydro-2,2-dimethyl-2H-naphtho[1,2-b]pyran-5,6-dione (ARQ 501, β -Lapachone) in Mammals. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 36, p. 753-758, 2008.

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

SIEGEL, D.; ROSS, D. Immunodetection of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) in human tissues. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 29, p. 246-253, 2000.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

SIEGEL, D.; YAN, C.; ROSS, D. NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) in the sensitivity and resistance to antitumor quinones. **Biochemical Pharmacology**, v. 83, p. 1033-1040, 2012.

SILVA JÚNIOR, E. N.; GUIMARÃES, T. T.; MENNA-BARRETO, R. F. S.; PINTO, M. C. F. R.; SIMONE, C. A.; PESSOA, C.; CAVALCANTI, B. C.; SABINO, J. R.; ANDRADE, C. K. Z.; GOULART, M. O. F.; CASTRO, S. L.; PINTO, A. V. The evaluation of quinonoid compounds against *Trypanosoma cruzi*: Synthesis of imidazolic anthraquinones, nor- β -lapachone derivatives and β -lapachone-based 1,2,3-triazoles. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, p. 3224-3230, 2010.

SILVA JÚNIOR, E. N.; SIMONE, C. A.; SOUZA, A. C. C.; PINTO, C. N.; GUIMARÃES, T. T.; PINTO, M. C. F. R.; PINTO, A. V. Unexpected transformation of quinones to spirolactones and to naturally occurring naphthalenic compounds. **Tetrahedron Letters**, v. 50, p. 1550-1553, 2009.

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

SRISAILAM, K.; VEERESHAM, C. Biotransformation of celecoxib using microbial cultures. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, p. 2075-2089, 2010.

TERAI, K.; DONG, G. Z.; OH, E. T.; PARK, M. T.; GU, Y.; SONG, C. W.; PARK, H. J. Cisplatin enhances the anticancer effect of β -lapachone by upregulating NQO1. **Anti-Cancer Drugs**, v. 20, p. 901-909, 2009.

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.

VESSECCHI, R.; EMERY, F. S.; GALEMBECK, S. E.; LOPES, N. P. Fragmentation studies and electrospray ionization mass spectrometry of lapachol: protonated, deprotonated and cationized species. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 24, p. 2101-2108, 2010.

VESSECCHI, R.; LOPES, N. P.; GOZZO, F. C.; DÖRR, F. A.; MURGU, M.; LEBRE, D. T.; ABREU, R.; BUSTILLOS, O. G.; RIVEROS, J. M. Nomenclatura de espectrometria de massas em língua portuguesa. **Química Nova**, v. 34, p. 1875-1887, 2011.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VESSECCHI, R.; EMERY, F. S.; LOPES, N. P.; GALEMBECK, S. E. Electronic structure and gas-phase chemistry of protonated α - and β -quinonoid compounds: A mass spectrometry and computational study. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, 2013. In press.

WISCONSIN ALUMNI RESEARCH FOUNDATION, Madison, Wisconsin, USA. Benjamin J. Frydman; Donald T. Witiak; Jerry S. Sun; Andrew H. Geiser. **Ortho-quinone derivatives, novel synthesis therefor, and their use in the inhibition of neoplastic cell growth**. Patent number: 5,969,163, 9 out. 1997, 19 out. 1999.

WISCONSIN ALUMNI RESEARCH FOUNDATION, Madison, Wisconsin, USA. David A. Boothman; Benjamin J. Frydman; Donald T. Witiak. **Synthesis and use of β -lapachone analogs**. Patente number: 5,763,625, 25 abr. 1995, 9 jun. 1998.

YANG, R-Y.; KIZER, D.; WU, H.; VOLCKOVA, R.; MIAO, X-S.; ALI, S. M.; TANDON, M.; SAVAGE, R. E.; CHAN, T. C. K.; ASHWELL, M. A. Synthetic methods for the preparation of ARQ 501(β -lapachone) human blood metabolites. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 5635–5643, 2008.

ZELINSKI, T.; HAUER, B. Industrial biotransformations with fungi. **Mycota**, v. 10, p. 283-301, 2002.

ZHANG, D.; FREEMAN, J. P.; SUTHERLAND, J. B.; WALKER, A. E.; YANG, Y.; CERNIGLIA, C. E. Biotransformation of chlorpromazine and methdilazine by *Cunninghamella elegans*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 798-803, 1996.

ZHANG, W.; PUGH, G. Free radical reactions for heterocycle synthesis. Part 7: 2-Bromobenzoic acids as building blocks in the construction of spirobenzolactones and spirobenzolactams. **Tetrahedron**, v. 59, p. 4237-4247, 2003.

ANEXOS

Anexo 1. Espectro de RMN de ^1H (**Anexo 1.1**), de RMN de ^{13}C (**Anexo 1.2**), mapa de contorno de HMQC (**Anexo 1.3**), mapa de contorno de HMBC (**Anexo 1.4**) (CDCl_3 , 500 MHz), espectro de massas em alta resolução (IES-EM), no modo positivo de análise (**Anexo 1.5**) e espectro de fragmentação na energia de 20 eV (IES-EM/EM), no modo positivo de análise (**Anexo 1.6**) da β -lapachona.

Anexo 1.1. Espectro de RMN de ^1H da β -lapachona (CDCl_3 , 500 MHz).

Anexo 1.3. Mapa de contorno de HMQC da β -lapachona (CDCl_3 , 500 MHz).

Anexo 1.4. Mapa de contorno de HMBC da β -lapachona (CDCl₃, 500 MHz).

Anexo 1.5. Espectro de massas de alta resolução da β -lapachona (IES-EM).

Anexo 1.6. Espectro de EM/EM da β -lapachona (IES-EM/EM, 20 eV).

Anexo 2. Espectro de RMN de ^1H (**Anexo 2.1**), mapa de contorno de HMQC (**Anexo 2.2**), mapa de contorno de HMBC (**Anexo 2.3**) (CD_3OD , 500 MHz), espectro de massas em alta resolução, no modo positivo de análise (IES-EM) (**Anexo 2.4**) e espectro de fragmentação na energia de 20 eV (IES-EM/EM), no modo positivo de análise (**Anexo 2.5**) do derivado BLM01, obtido através da biotransformação da β -lapachona com o fungo *M. rouxii*.

Anexo 2.1. Espectro de RMN de ^1H do derivado BLM01 (CD_3OD , 500 MHz).

Anexo 2.2. Mapa de contorno de HBQC do derivado BLM01 (CD₃OD, 500 MHz).

Anexo 2.3. Mapa de contorno de HMBC do derivado BLM01 (CD₃OD, 500 MHz).

Anexo 2.4. Espectro de massas de alta resolução do derivado BLM01 (IES-EM).

Anexo 2.5. Espectro de EM/EM do derivado BLM01 (IES-EM/EM, 20 eV).

Anexo 3. Espectro de RMN de ^1H (**Anexo 3.1**), de RMN de ^{13}C (**Anexo 3.2**), mapa de contorno de HMQC (**Anexo 3.3**), mapa de contorno de HMBC (**Anexo 3.4**) (CDCl_3 , 500 MHz), espectro de massas em alta resolução (IES-EM), no modo positivo de análise (**Anexo 3.5**) e espectro de fragmentação na energia de 20 eV (IES-EM/EM), no modo positivo de análise (**Anexo 3.6**) do derivado BLM02, obtido através da biotransformação da β -lapachona com o fungo *M. rouxii*.

Anexo 3.1. Espectro de RMN de ^1H do derivado BLM02 (CDCl_3 , 500 MHz).

Anexo 3.2. Espectro de RMN de ¹³C do derivado BLM02 (CDCl₃, 125 MHz).

Anexo 3.3. Mapa de contornos de HMQC do derivado BLM02 (CDCl₃, 500 MHz).

Anexo 3.4. Mapa de contornos de HMBC do derivado BLM02 (CDCl₃, 500 MHz).

Anexo 3.5. Espectro de massas de alta resolução do derivado BLM02 (IES-EM).

Anexo 3.6. Espectro de EM/EM do derivado BLM02 (IES-EM/EM, 20 eV).

Anexo 4. Espectro de RMN de ^1H (**Anexo 4.1**), de RMN de ^{13}C (**Anexo 4.2**), mapa de contorno de HMQC (**Anexo 4.3**), mapa de contorno de HMBC (**Anexo 4.4**) (CD_3OD , 500 MHz), espectro de massas em alta resolução (IES-EM), no modo positivo de análise (**Anexo 4.5**) e espectro de fragmentação na energia de 20 eV (IES-EM/EM), no modo positivo de análise (**Anexo 4.6**) do derivado BLM04, obtido através da biotransformação da β -lapachona com o fungo *M. rouxii*.

Anexo 4.1.1. Espectro de RMN de ^1H do derivado BLM04 (CD_3OD , 500 MHz).

Anexo 4.2. Espectro de RMN de ^{13}C do derivado BLM04 (CD_3OD , 125 MHz).

Anexo 4.3. Mapa de contorno de HMQC do derivado BLM04 (CD₃OD, 500 MHz).

Anexo 4.4. Mapa de contorno de HMQC do derivado BLM04 (CD₃OD, 500 MHz).

Anexo 4.5. Espectro de massas de alta resolução do derivado BLM04 (IES-EM).

Anexo 4.6. Espectro de EM/EM do derivado BLM04 (IES-EM/EM, 20 eV).

Anexo 5. Espectro de RMN de ^1H (**Anexo 5.1**), de RMN de ^{13}C (**Anexo 5.2**), mapa de contorno de HMQC (**Anexo 5.3**), mapa de contorno de HMBC (**Anexo 5.4**) (CD_3OD , 500 MHz), espectro de massas em alta resolução (IES-EM), no modo positivo de análise (**Anexo 5.5**) e espectro de fragmentação na energia de 20 eV (IES-EM/EM), no modo positivo de análise (**Anexo 5.6**) do derivado BLM07, obtido através da biotransformação da β -lapachona com o fungo *M. rouxii*.

Anexo 5.1. Espectro de RMN de ^1H do derivado BLM07 (CD_3OD , 500 MHz).

Anexo 5.2. Espectro de RMN de ¹³C do derivado BLM07 (CD₃OD, 125 MHz).

Anexo 5.3. Mapa de contorno de HMQC do derivado BLM07 (CD₃OD, 500 MHz).

Anexo 5.4. Mapa de contorno de HMBC do derivado BLM07 (CD₃OD, 500 MHz).

Anexo 5.5. Espectro de massas de alta resolução do derivado BLM07 (IES-EM).

Anexo 5.6. Espectro de EM/EM do derivado BLM07 (IES-EM/EM, 20 eV).

Anexo 6. Espectro de RMN de ^1H (**Anexo 6.1**), mapa de contorno de HMQC (**Anexo 6.2**), mapa de contorno de HMBC (**Anexo 6.3**) (CD_3OD , 500 MHz), espectro de massas em alta resolução (IES-EM), no modo positivo de análise (**Anexo 6.4**) e espectro de fragmentação na energia de 20 eV (IES-EM/EM), no modo positivo de análise (**Anexo 6.5**) do derivado BLM08, obtido através da biotransformação da β -lapachona com o fungo *M. rouxii*.

Anexo 6.1. Espectro de RMN de ^1H do derivado BLM08 (CD_3OD , 500 MHz).

Anexo 6.2. Mapa de contorno de HMQC do derivado BLM08 (CD₃OD, 500 MHz).

Anexo 6.3. Mapa de contorno de HMBC do derivado BLM08 (CD_3OD , 500 MHz).

Anexo 6.4. Espectro de massas de alta resolução do derivado BLM08 (IES-EM).

Anexo 6.5. Espectro de EM/EM do derivado BLM08 (IES-EM/EM, 20 eV).

Anexo 7. Espectro de RMN de ^1H (**Anexo 7.1**), mapa de contorno de HMQC (**Anexo 7.2**), mapa de contorno de HMBC (**Anexo 7.3**) (CD_3OD , 500 MHz), espectro de massas em alta resolução (IES-EM), no modo positivo de análise (**Anexo 7.4**) e espectro de fragmentação na energia de 20 eV (IES-EM/EM), no modo positivo de análise (**Anexo 7.5**) do derivado BLC01, obtido através da biotransformação da β -lapachona com o fungo *C. elegans*.

Anexo 7.1. Espectro de RMN de ¹H do derivado BLC01 (CD₃OD, 500 MHz).

Anexo 7.2. Mapa de contorno de HMQC do derivado BLC01 (CD₃OD, 500 MHz).

Anexo 7.3. Mapa de contorno de HMBc do derivado BLC01 (CD_3OD , 500 MHz).

Anexo 7.4. Espectro de massas de alta resolução do derivado BLC01 (IES-EM).

Anexo 7.5. Espectro de EM/EM do derivado BLC01 (IES-EM/EM, 20 eV).

Anexo 8. Espectro de RMN de ^1H (**Anexo 8.1**), de RMN de ^{13}C (**Anexo 8.2**), mapa de contorno de HMQC (**Anexo 8.3**), mapa de contorno de HMBC (**Anexo 8.4**) (CD_3OD , 500 MHz), espectro de massas em alta resolução (IES-EM), no modo positivo de análise (**Anexo 8.5**) e espectro de fragmentação na energia de 20 eV (IES-EM/EM), no modo positivo de análise (**Anexo 8.6**) do derivado BLC02, obtido através da biotransformação da β -lapachona com o fungo *C. elegans*.

Anexo 8.1. Espectro de RMN de ¹H do derivado BLC02 (CD₃OD, 500 MHz).

Anexo 8.2. Espectro de RMN de ^{13}C do derivado BLC02 (CD_3OD , 125 MHz).

Anexo 8.3. Mapa de contorno de HMQC do derivado BLC02 (CD_3OD , 500 MHz).

Anexo 8.4. Mapa de contorno de HMBC do derivado BLC02 (CD₃OD, 500 MHz).

Anexo 8.5. Espectro de massas de alta resolução do derivado BLC02 (IES-EM).

Anexo 8.6. Espectro de EM/EM do derivado BLC02 (IES-EM/EM, 20 eV).

Anexo 9. Espectro de RMN de ^1H (**Anexo 9.1**), de RMN de ^{13}C (**Anexo 9.2**), mapa de contorno de HMQC (**Anexo 9.3**), mapa de contorno de HMBC (**Anexo 9.4**) (CD_3OD , 500 MHz), espectro de massas em alta resolução (IES-EM), no modo positivo de análise (**Anexo 9.5**) e espectro de fragmentação na energia de 30 eV (IES-EM/EM), no modo positivo de análise (**Anexo 9.6**) do derivado BLS01 (BLM-EM02), obtido através da biotransformação da β -lapachona com o fungo *P. immersa*.

Anexo 9.1. Espectro de RMN de ^1H do derivado BLS01 (CD_3OD , 500 MHz).

Anexo 9.2. Espectro de RMN de ¹³C do derivado BLS01 (CD₃OD, 125 MHz).

Anexo 9.3. Mapa de contorno de HMQC do derivado BLS01 (CD₃OD, 500 MHz).

Anexo 9.4. Mapa de contorno de HMBC do derivado BLS01 (CD₃OD, 500 MHz).

Anexo 9.5. Espectro de massas de alta resolução do derivado BLS01 (IES-EM).

Anexo 9.6. Espectro de EM/EM do derivado BLS01 (IES-EM/EM, 30 eV).

Anexo 10. Espectro de RMN de ^1H (**Anexo 10.1**), de RMN de ^{13}C (**Anexo 10.2**), mapa de contorno de HMQC (**Anexo 10.3**), mapa de contorno de HMBC (**Anexo 10.4**) (CD_3OD , 500 MHz), espectro de massas em alta resolução (IES-EM), no modo positivo de análise (**Anexo 10.5**) e espectro de fragmentação na energia de 20 eV (IES-EM/EM), no modo positivo de análise (**Anexo 10.6**) do derivado BLS02 (BLM08), obtido através da biotransformação da β -lapachona com o fungo *P. immersa*.

Anexo 10.1. Espectro de RMN de ^1H do derivado BLS02 (CD_3OD , 500 MHz).

Anexo 10.2. Espectro de RMN de ¹³C do derivado BLS02 (CD₃OD, 125 MHz).

Anexo 10.3. Mapa de contorno de HMQC do derivado BLS02 (CD₃OD, 500 MHz).

Anexo 10.4. Mapa de contorno de HMBC do derivado BLS02 (CD₃OD, 500 MHz).

Anexo 10.5. Espectro de massas de alta resolução do derivado BLS02 (IES-EM).

Anexo 10.6. Espectro de EM/EM do derivado BLS02 (IES-EM/EM, 20 eV).

Anexo 11. Espectro de RMN de ^1H (**Anexo 11.1**), mapa de contorno de HMQC (**Anexo 11.2**), mapa de contorno de HMBC (**Anexo 11.3**) (CDCl_3 , 500 MHz), espectro de massas em alta resolução (IES-EM), no modo positivo de análise (**Anexo 11.4**) e espectro de fragmentação na energia de 20 eV (IES-EM/EM), no modo positivo de análise (**Anexo 11.5**) da α -lapachona.

Anexo 11.1. Espectro de RMN de ^1H da α -lapachona (CDCl_3 , 500 MHz).

Anexo 11.2. Mapa de contorno de HMQC da α -lapachona (CDCl₃, 500 MHz).

Anexo 11.3. Mapa de contorno de HMBC da α -lapachona (CDCl₃, 500 MHz).

Anexo 11.4. Espectro de massas de alta resolução da α -lapachona (IES-EM).

Anexo 11.5. Espectro de EM/EM da α -lapachona (IES-EM/EM, 20 eV).

Anexo 12. Espectro de RMN de ^1H (**Anexo 12.1**), de RMN de ^{13}C (**Anexo 12.2**), mapa de contorno de HMQC (**Anexo 12.3**), mapa de contorno de HMBC (**Anexo 12.4**) (CD_3OD , 500 MHz), espectro de massas em alta resolução (IES-EM), no modo positivo de análise (**Anexo 12.5**) e espectro de fragmentação na energia de 20 eV (IES-EM/EM), no modo positivo de análise (**Anexo 12.6**) do derivado ALM01D1, obtido através da biotransformação da α -lapachona com o fungo *M. rouxii* no primeiro dia de contato.

Anexo 12.1. Espectro de RMN de ^1H do derivado ALM01D1 (CD_3OD , 500 MHz).

Anexo 12.2. Espectro de RMN de ^{13}C do derivado ALM01D1 (CD_3OD , 125 MHz).

Anexo 12.3. Mapa de contorno de HMQC do derivado ALM01D1 (CD₃OD, 500 MHz).

Anexo 12.4. Mapa de contorno de HMBC do derivado ALM01D1 (CD₃OD, 500 MHz).

Anexo 12.5. Espectro de massas de alta resolução do derivado ALM01D1 (IES-EM).

Anexo 12.6. Espectro de EM/EM do derivado ALM01D1 (IES-EM/EM, 20 eV).

Anexo 13. Espectro de RMN de ^1H (**Anexo 13.1**), de RMN de ^{13}C (**Anexo 13.2**), mapa de contorno de HMQC (**Anexo 13.3**), mapa de contorno de HMBC (**Anexo 13.4**) (CD_3OD , 500 MHz), espectro de massas em alta resolução (IES-EM), no modo positivo de análise (**Anexo 13.5**) e espectro de fragmentação na energia de 20 eV (IES-EM/EM), no modo positivo de análise (**Anexo 13.6**) do derivado ALM01D5 (BLM-EM01), obtido através da biotransformação da α -lapachona com o fungo *M. rouxii* no quinto dia de contato .

Anexo 13.1. Espectro de RMN de ^1H do derivado ALM01D5 (CD_3OD , 500 MHz).

Anexo 13.2. Espectro de RMN de ^{13}C do derivado ALM01D5 (CD_3OD , 125 MHz).

Anexo 13.3. Mapa de contorno de HMQC do derivado ALM01D5 (CD₃OD, 500 MHz).

Anexo 13.4. Mapa de contorno de HMBC do derivado ALM01D5 (CD₃OD, 500 MHz).

Anexo 13.5. Espectro de massas de alta resolução do derivado ALM01D5 (IES-EM).

Anexo 13.6. Espectro de EM/EM do derivado ALM01D5 (IES-EM/EM, 20 eV).

Anexo 14. Espectro de RMN de ^1H (**Anexo 14.1**), mapa de contorno de HMQC (**Anexo 14.2**), mapa de contorno de HMBC (**Anexo 14.3**) (CD_3OD , 500 MHz), espectro de massas em alta resolução (IES-EM), no modo positivo de análise (**Anexo 14.4**) e espectro de fragmentação na energia de 20 eV (IES-EM/EM), no modo positivo de análise (**Anexo 14.5**) do derivado ALM02D5, obtido através da biotransformação da α -lapachona com o fungo *M. rouxii* no quinto dia de contato.

Anexo 14.1. Espectro de RMN de ^1H do derivado ALM02D5 (CD_3OD , 500 MHz).

Anexo 14.2. Mapa de contorno de HMQC do derivado ALM02D5 (CD₃OD, 500 MHz).

Anexo 14.3. Mapa de contorno de HMBC do derivado ALM02D5 (CD₃OD, 500 MHz).

Anexo 14.4. Espectro de massas de alta resolução do derivado ALM02D5 (IES-EM).

Anexo 14.5. Espectro de EM/EM do derivado ALM02D5 (IES-EM/EM, 20 eV).

Anexo 15. Espectro de RMN de ^1H (**Anexo 15.1**), mapa de contorno de HMQC (**Anexo 15.2**), mapa de contorno de HMBC (**Anexo 15.3**) (CDCl_3 , 500 MHz), do derivado ALM03D5 (β -lapachona), obtido através da biotransformação da α -lapachona com o fungo *M. rouxii* no quinto dia de contato.

Anexo 15.1. Espectro de RMN de ^1H do derivado ALM03D5 (CDCl_3 , 500 MHz).

Anexo 15.2. Mapa de contorno de HMQC do derivado ALM03D5 (CDCl₃, 500 MHz).

Anexo 15.3. Mapa de contorno de HMQC do derivado ALM03D5 (CDCl₃, 500 MHz).