



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Biotransformações dos ácidos *ent*-poliáltico e *ent*-diidroagático por
culturas microbianas e microssomas hepáticos**

Ingrid Pontes de Sousa

Ribeirão Preto

2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Biotransformações dos ácidos *ent*-poliáltico e *ent*-diidroagático por culturas microbianas e microssomas hepáticos

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

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientada: Ingrid Pontes de Sousa

Orientadora: Profa. Dra. Niege Araçari Jacometti Cardoso Furtado

Versão corrigida da tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas no dia 21/09/2018. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2018

FICHA CATALOGRÁFICA

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.

Sousa, Ingrid Pontes de

Biotransformações dos ácidos *ent*-poliáltico e *ent*-diidroagático por culturas microbianas e microsomas hepáticos, Ribeirão Preto, 2018.
248 p.; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.
Orientadora: Furtado, Nieve Araçari Jacometti Cardoso

1. Biotransformação.
2. Ácido *ent*-poliáltico
3. Ácido *ent*-diidroagático
4. Micro-organismos.
5. Microsomas hepáticos humanos.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Ingrid Pontes de Sousa

Biotransformações dos ácidos *ent*-poliáltico e *ent*-diidroagático por culturas microbianas e microssomas hepáticos

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

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientadora: Profa. Dra. Nieve Araçari Jacometti Cardoso Furtado

Aprovado em: ____/____/____.

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico este trabalho aos meus pais, meus progenitores Elza e Luiz, sem os quais esta existência não seria possível. Minha gratidão a vocês e a todos os meus ancestrais. Gratidão à Mãe Terra e a todas as manifestações de vida e consciência. Somos todos um.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Todo, por ser fonte infinita de energia criadora e inspiração.

Agradeço aos meus amados pais Luiz e Elza pelo amor, apoio e incentivo em todos os âmbitos da minha vida, o qual me foi propiciado desde os meus primeiros passos. Agradeço também à minha irmã Gabriela, com a qual pude e posso contar ao longo desta jornada. Amo vocês com todo meu coração!

À minha orientadora e amiga Profa. Dra. Nieve Furtado, que me concedeu a oportunidade de ser sua orientada ao longo desses anos. Sua postura em relação à pesquisa e ao ensino é um exemplo para todos nós. Obrigada pela forma profissional e humana de orientar seus alunos e por todo o conhecimento transmitido. Tenho muito orgulho de ter sido sua “filhota” durante o Mestrado e Doutorado.

Colegas alunos e ex-alunos do laboratório de Farmacognosia: Dra. Mariza Miranda, Dra. Marcela Etchebehere, Dra. Tatiane Carvalho, Dra. Rosana Casoti, Dr. Marcelo Claro de Sousa, Dra. Marivane Lemos, Dr. Ricardo Rodrigues, Me. Felipe Antunes, Dr. Lucas Chibli, Me. Federico Padilla-Gonzalez, Marina Corradin, Me. Victor Ribeiro, Ma. Jennyfer Mejía, Ma. Caroline Arruda, Marcela Serafim, Vinícius de Paula, Lívia Fernandes, Adriany Fonseca, Me. João Paulo Damasceno e Ma. Valdeline Teixeira. Em especial aos amigos Me. Mohamed Abd El-Salam, nosso “egípcio abasileirado”, Dr. Gari Ccana-Ccapatinta e Me. Jolindo Freitas pelo auxílio sempre que necessário, ao Dr. Jonas Mangabeira pela amizade e auxílio com a formatação da tese, Dra. Annylory Rosa, pela cumplicidade e valioso auxílio com questões analíticas e Ma. Débora Munhoz, amiga desde a graduação com a qual também tive a sorte de dividir muitos momentos da pós-graduação e filosofias de vida.

Aos técnicos do Laboratório de Farmacognosia Mário Ogasawara e Walter Lopes pelo auxílio laboratorial. Em especial, meus agradecimentos à técnica e amiga Maria Angélica Chellegatti por todo o auxílio principalmente no Laboratório de Microbiologia e por sua prestatividade. Seu apoio sempre transcendeu o âmbito acadêmico e se estende para a vida, muito obrigada por tudo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida no Brasil (Capes-PROEX) e no exterior durante o período de doutorado sanduíche (PDSE, Processo 88881.136003/2016-01).

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pelo ensino, pesquisa e extensão oferecidos e pelo auxílio financeiro concedido que viabilizou minha participação e apresentação oral no 65º Congresso Internacional e Encontro Anual da Sociedade de Plantas Medicinais e Pesquisa de Produtos Naturais (GA), em Basel na Suíça.

A todos os funcionários da pós-graduação, em especial aos do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas Eleni Passos e Rafael Poggi.

À doutoranda Thairz Rodrigues pelo auxílio com as leituras de rotação específica.

Aos professores Dr. Fernando Batista Da Costa, Dr. Luiz Alberto de Moraes e Dr. Noberto Peporine Lopes e seus respectivos técnicos de laboratório Dr. Luís Fernando da Silva, Dr. Eduardo Crevelin e José Carlos Tomaz pelas análises por espectrometria de massas. Ao técnico Vinícius Palaretti pelo auxílio com as análises de ressonância magnética nuclear (RMN) e ao Prof. Dr. Antônio Gilberto Ferreira da Universidade Federal de São Carlos pela colaboração e excelência na obtenção de espectros de RMN. Agradeço também ao Prof. Antônio Miller Crotti pela disponibilidade e valioso auxílio com as análises dos espectros de íons produtos. Acredito que ciência se faça com colaboração e não com competição, e sem essa abertura concedida pelos professores especialistas em diferentes áreas e auxílio dos técnicos de laboratório, a conclusão desse projeto não seria possível.

Aos meus co-orientadores durante o estágio sanduíche na Universidade de Regensburg na Alemanha, Prof. Dr. Jörg Heilmann e Profa. Dra. Birgit Kraus. Agradeço também ao Prof. Dr. Guido Jürgenliemk e aos técnicos de laboratório Gabriele Brunner e em especial ao técnico Joseph Kiemeier, o qual me propiciou excelente auxílio e momentos de descontração durante as incontáveis análises por espectrometria de massas. As funcionárias do Welcome Center, em especial à Irina Goß por toda sua prestatividade e auxílio com moradia e assuntos burocráticos.

Aos doutorandos e companheiros de laboratório no exterior: Vanja Ljolic Bilic, Nidhal Fahem, Bernhard Kram, Christian Zeh, Julianna Ziegler, Katrin Kuck, Katharina

Schiller, Sebastian Schwindl, Martina Tremmel, Stefan Wiesneth e Mirjam Abu Salah. Em especial ao pós-doutorando Dr. Filip Sibul, por toda sua atenção e disponibilidade em ajudar e à doutoranda Eva Lotter, a qual me prestou todo auxílio dentro e fora do laboratório e foi meu anjo da guarda na Alemanha. Aos amigos que fiz e deixei com o coração apertado: Kathrin Lechl, Andi Haxhiraj e Gaith Alchaar. A todos vocês: Danke schön!

A todos os professores e funcionários da FCFRP-USP, incluindo os funcionários da limpeza e da guarda da faculdade e de toda a USP de Ribeirão Preto, que viabilizam o funcionamento deste campus o qual frequento e usufruo de suas belezas, oportunidades acadêmicas, científicas e culturais desde o primeiro ano de graduação em 2006!

A todos aqueles que embora não citados contribuíram para a realização deste trabalho.

*“Na vida não existe nada a temer,
mas a entender”.*

Marie Curie

RESUMO

SOUSA, I. P. **Biotransformações dos ácidos *ent*-poliáltico e *ent*-diidroagático por culturas microbianas e microsomas hepáticos.** 2018. 236f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Os diterpenos labdanos ácidos *ent*-poliáltico (AP) e *ent*-diidroagático (ADA) são metabólitos secundários amplamente distribuídos em diversas espécies vegetais, sendo particularmente comuns nos exsudatos extraídos dos troncos das árvores do gênero *Copaifera* (Leguminosae-Caesalpinioideae). Estas oleorresinas apresentam diversas atividades biológicas e são utilizadas na medicina popular desde a época dos índios pré-colombianos. Apesar de sua ampla utilização, não há estudos acerca de seu metabolismo. Estudos de biotransformação com constituintes bioativos como o AP e ADA podem contribuir para o entendimento de reações metabólicas *in vivo* das oleorresinas. Além de indispensáveis na fase pré-clínica de desenvolvimento e otimização de fármacos, os estudos de biotransformação *in vitro* também podem propiciar a obtenção de novas estruturas químicas farmacologicamente ativas. Assim, os diterpenos AP e ADA foram submetidos a estudos de biotransformação com diferentes tipos de biocatalisadores: fungos filamentosos, micro-organismos do trato gastrointestinal e microsomas hepáticos humanos. Foram obtidos quinze metabólitos de biotransformação com os fungos *Cunninghamella elegans*, *Cunninghamella echinulata* e *Aspergillus brasiliensis*, sendo treze estruturas ainda não descritas na literatura. A reação enzimática mais comum promovida pelos fungos sobre os diterpenoides foi a hidroxilação, porém isomerização da ligação dupla e acetilação também foram identificadas. Apesar de terem sido detectadas diminuições acentuadas nas concentrações dos diterpenos nas culturas com os micro-organismos do trato gastrointestinal, os rendimentos dos processos de biotransformação na escala de produção desenvolvida não propiciaram metabólitos em concentrações satisfatórias para isolamento. Apesar dos baixos rendimentos, foi possível propor através de espectrometria de massas a estrutura de quatro derivados oxidados e/ou metilados do ADA após incubação com *Saccharomyces boulardii*, *Lactobacillus fermentum*, *Escherichia coli*, cultura mista com probióticos do gênero *Lactobacillus* e cultura mista com os probióticos do gênero *Bifidobacterium*. O ácido *ent*-agático foi identificado entre os metabólitos propostos, indicando a necessidade de mais estudos acerca do metabolismo dos constituintes das oleorresinas de *Copaifera*, uma vez que o ácido agático já foi reportado na literatura como abortivo em mamíferos. Para os metabólitos obtidos com microsomas hepáticos humanos foram propostas quatro estruturas oxidadas no metabolismo de fase I e quatro estruturas conjugadas com ácido glucurônico no metabolismo de fase II e fase I e II combinados. Os precursores e os derivados majoritários de biotransformação foram submetidos a ensaios de citotoxicidade com células tumorais das linhagens Caco-2, HeLa e MCF-7, além da linhagem normal MCF-10A. As mudanças químicas promovidas pelos fungos na estrutura do ADA não acarretaram mudanças significativas em sua atividade biológica, enquanto a maioria dos derivados do AP apresentou menor efeito citotóxico. Apenas o metabólito P06(AP) apresentou atividade cerca de quatro vezes maior ($IC_{50} = 62,6 \mu M$) que o precursor, sugerindo que a migração da dupla e a introdução de grupo acetato na estrutura do AP pode ser uma estratégia para obtenção de derivados mais ativos frente a linhagem HeLa. De modo geral, os resultados obtidos neste estudo reforçam a importância da biotransformação como estratégia para obtenção de novas estruturas químicas e contribuem para o entendimento do metabolismo de constituintes bioativos das oleorresinas medicinais de *Copaifera*.

Palavras-chave: biotransformação, ácido *ent*-poliáltico, ácido *ent*-diidroagático, micro-organismos, microsomas hepáticos.

ABSTRACT

SOUSA, I. P. **Biotransformations of *ent*-polyalthic acid and *ent*-dihydroagathic acid by microbial cultures and liver microsomes.** 2018. 236p. Thesis (Doctoral). School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto – University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

The labdane diterpenes *ent*-polyalthic (AP) and *ent*-dihydroagathic (ADA) acids are secondary metabolites widely spread in several plants. Both diterpenes are particularly common in the oleoresins extracted from the tree trunks of *Copaifera* sp. (Leguminosae-Caesalpinioideae). These oleoresins have several biological activities and have been used in folk medicine since the pre-Columbian Indians times. Despite their wide use, research on the metabolism of the oleoresins is lacking. Biotransformation studies with their bioactive constituents such as AP and ADA may contribute to the understanding of *in vivo* metabolic reactions. *In vitro* biotransformation studies are mandatory in the preclinical stage of drug development and optimization and can also provide new pharmacologically active derivatives. Given that, the diterpenes AP and ADA were submitted to biotransformation studies with different types of biocatalysts: filamentous fungi, microorganisms from the gastrointestinal tract and human liver microsomes. The biotransformation with the fungi *Cunninghamella elegans*, *Cunninghamella echinulata* and *Aspergillus brasiliensis* afforded two known structures and thirteen new metabolites. The most common enzymatic reaction by the fungi was hydroxylation, but isomerization of the double bond and acetylation were also detected. Although the microorganisms from the gut microbiota were able to reduce the concentration of the diterpenes in the cultures, the biotransformation yields of the processes were not enough for metabolite isolation. Despite the low yields, four oxygenated and/or methylated metabolites were proposed by mass spectrometry, after incubation of ADA with *Saccharomyces boulardii*, *Lactobacillus fermentum*, *Escherichia coli*, mixed culture with *Lactobacillus* sp. probiotics and mixed culture with *Bifidobacterium* sp. probiotics. The diterpene *ent*-agathic acid was identified among the metabolites, indicating the need for further studies on the metabolism of *Copaifera* oleoresin constituents, since agathic acid has already been reported as abortive in mammals. Four oxygenated structures and four metabolites conjugated with glucuronic acid were proposed for the phase I and phase II metabolism with human liver microsomes, respectively. The antiproliferative effects of the diterpenes and their major biotransformation derivatives were evaluated against the cancer cell lines Caco-2, HeLa and MCF-7 and the normal cell line MCF-10A. The chemical changes promoted by the fungi in the structure of ADA resulted in no significant changes in its biological activity. Most AP's derivatives displayed lower cytotoxic effects, except for the metabolite P06(AP), which showed to be four times more active ($IC_{50} = 62.6 \mu\text{M}$) than its precursor. The migration of the double bond and the introduction of the acetate group in AP's skeleton were associated with the greater biological activity. The results obtained herein reinforce the use of biotransformation as a strategy to obtain new chemical structures and contribute to the understanding of the metabolic pathways of bioactive constituents of *Copaifera* medicinal oleoresins.

Keywords: biotransformation, *ent*-polyalthic acid, *ent*-dihydroagathic acid, microorganisms, liver microsomes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Produção de vinagre a partir do etanol.....	2
Figura 2. Esquema geral para as reações de metabolismo de fase I e metabolismo de fase II em humanos.....	4
Figura 3. Evolução do número de patentes registradas entre os anos de 2010 e 2017 envolvendo processos de biotransformação	8
Figura 4. Estrutura química dos diterpenos labdanos A) ácido <i>ent</i> -poliáltico e B) ácido <i>ent</i> -diidroagático	11
Figura 5. Estrutura química do A) ácido isocuprêssico e B) ácido agático.....	13
Figura 6. Andrografolido e seus derivados obtidos através da biotransformação com <i>R. stolonifer</i>	14
Figura 7. Epoxidação e halogenação do esclareol pelo fungo <i>B. cinerea</i>	14
Figura 8. Derivados obtidos a partir da biotransformação do ácido (+)-(5 <i>S</i> , 8 <i>S</i> , 9 <i>R</i> , 10 <i>S</i>)-lab-13-en-8β-ol-15-óico com os fungos <i>M. verrucaria</i> e <i>F. oxysporum</i>	15
Figura 9. Biotransformação do diterpenoide derivado de sinexan A pela bactéria <i>S. griseus</i>	15
Figura 10. Vias metabólicas propostas para a biotransformação da tanshinona I com microssomas hepáticos humanos e frações S9.	16
Figura 11. Diterpenos A) teuchmaedrina A e B) teucrina A, isolados de <i>Teucrium chamaedrys</i> L.	18
Figura 12. Esquema geral das etapas desenvolvidas na pesquisa	37
Figura 13. Cromatogramas obtidos por CLAE-CAD e espectros de absorção no UV do A) ácido <i>ent</i> -poliáltico e B) ácido <i>ent</i> -diidroagático	39
Figura 14. Fragmentação proposta para a formação dos íons produtos de <i>m/z</i> 221, <i>m/z</i> 299 e <i>m/z</i> 205 derivados de [M-H] ⁻ <i>m/z</i> 315 (ácido <i>ent</i> -poliáltico)	45
Figura 15. Fragmentação proposta para a formação dos íons produtos de <i>m/z</i> 317, <i>m/z</i> 289, <i>m/z</i> 275, <i>m/z</i> 233, <i>m/z</i> 221 e <i>m/z</i> 205 derivados de [M-H] ⁻ <i>m/z</i> 335 (ácido <i>ent</i> -diidroagático).....	46
Figura 16. Controle de estabilidade do A) ácido <i>ent</i> -poliáltico e B) ácido <i>ent</i> -diidroagático após 5 dias de incubação em meio de cultura Koch's K1 a 30 °C, 120 rpm.....	49
Figura 17. Cromatogramas obtidos por CLAE-CAD dos extratos do caldo de cultura dos processos de biotransformação do ácido <i>ent</i> -poliáltico com os fungos filamentosos	50
Figura 18. Cromatogramas obtidos por CLAE-CAD dos extratos do caldo de cultura dos processos de biotransformação do ácido <i>ent</i> -diidroagático com os fungos filamentosos	51
Figura 19. Cromatogramas obtidos por CLAE-CAD dos extratos da massa micelial dos processos de biotransformação do ácido <i>ent</i> -poliáltico com os fungos filamentosos	52
Figura 20. Cromatogramas obtidos por CLAE-CAD dos extratos da massa micelial dos processos de biotransformação do ácido <i>ent</i> -diidroagático com os fungos filamentosos	53
Figura 21. Sobreposição dos cromatogramas obtidos por CLAE-CAD das biotransformações do A) ácido <i>ent</i> -poliáltico e B) ácido <i>ent</i> -diidroagático com os fungos filamentosos	55

Figura 22. Produtos isolados das frações A) 60% água e 40% acetonitrila e B) 50% água e 50% acetonitrila, obtidas a partir do extrato bruto de biotransformação do ácido <i>ent</i> -poliáltico com o fungo <i>A. brasiliensis</i> após 5 dias de incubação, a 30 °C, 120 rpm.....	57
Figura 23. Produtos isolados dos extratos de biotransformação do ácido <i>ent</i> -diidroagático com o fungo <i>C. echinulata</i> após 5 dias de incubação, a 30 °C, 120 rpm.	58
Figura 24. Representação dos ciclo-hexanos do núcleo diterpênico na conformação cadeira e respectivas projeções de Newman dos substituintes da posição 1, exemplificando os possíveis acoplamentos entre os hidrogênios vicinais quando Ha está na posição A) α e B) β	62
Figura 25. Rotas metabólicas sugeridas para a produção de derivados de biotransformação do ácido <i>ent</i> -poliáltico com o fungo <i>A. brasiliensis</i>	96
Figura 26. Mecanismo enzimático proposto para oxidação da ligação dupla exocíclica do ácido <i>ent</i> -poliáltico pelos fungos <i>A. brasiliensis</i> , <i>C. elegans</i> e <i>C. echinulata</i> para formação do derivado P04(AP)	96
Figura 27. Rotas metabólicas sugeridas para a produção de derivados de biotransformação do ácido <i>ent</i> -diidroagático com o fungo <i>C. echinulata</i>	97
Figura 28. Cromatogramas obtidos por CLAE-CAD dos controles A) micro-organismo com o solvente DMSO, B) ácido <i>ent</i> -poliáltico no meio de cultura MRS e C) ácido <i>ent</i> -diidroagático no meio de cultura MRS, após 24 h de incubação	99
Figura 29. Cromatogramas obtidos por CLAE-CAD dos extratos de biotransformação em meio líquido do ácido <i>ent</i> -poliáltico e <i>ent</i> -diidroagático com as bactérias probióticas anaeróbias	100
Figura 30. Cromatogramas obtidos por CLAE-CAD dos extratos de biotransformação em meio líquido do ácido <i>ent</i> -poliáltico e <i>ent</i> -diidroagático com os micro-organismos do trato gastrointestinal.....	102
Figura 31. Cromatogramas obtidos por CLAE-CAD dos extratos dos processos em meio sólido A) controle <i>E. coli</i> com o solvente DMSO e B) biotransformação do ácido <i>ent</i> -poliáltico com <i>E. coli</i> , após 48 h de incubação	103
Figura 32. Fragmentação proposta para a formação dos íons produtos de m/z 333, m/z 289 e m/z 307 derivados de $[M-H]^-$ m/z 351	105
Figura 33. Fragmentação proposta para a formação dos íons produtos de m/z 315, m/z 273, m/z 219, m/z 287, m/z 289, m/z 233 e m/z 205 derivados de $[M-H]^-$ m/z 333	105
Figura 34. Fragmentação proposta para a formação dos íons produtos de m/z 315, m/z 287, m/z 273, m/z 205, m/z 233 e m/z 205 derivados de $[M-H]^-$ m/z 347..	106
Figura 35. Fragmentação proposta para a formação dos íons produtos de m/z 317, m/z 233, m/z 275, m/z 205 e m/z 289 derivados de $[M-H]^-$ m/z 349	107
Figura 36. Estruturas químicas propostas para os metabólitos de biotransformações do ácido <i>ent</i> -diidroagático com os micro-organismos do trato gastrointestinal.....	108
Figura 37. Esquema do metabolismo da 7-etoxicumarina por microsossomas hepáticos humanos.....	110
Figura 38. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD (320 nm) dos extratos de biotransformação e controles da 7-etoxicumarina com microsossomas hepáticos humanos	111

- Figura 39.** Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD (200 nm) dos extratos de biotransformação e controles dos ácidos *ent*-poliáltico e *ent*-diidroagático com microsomas hepáticos humanos..... 113
- Figura 40.** Sobreposição dos cromatogramas obtidos por CLAE-ELSD do sistema de incubação sem os diterpenos (matriz), sistema de incubação dos diterpenos no tampão (controle de estabilidade) e dos sistemas de incubação de metabolismo de fase I, fase II e fase I+II do ácido *ent*-poliáltico e *ent*-diidroagático com microsomas hepáticos humanos..... 115
- Figura 41.** Mecanismo de fragmentação proposto para a os íons A) $[M-H]^-$ m/z 511 derivado da biotransformação do ácido *ent*-diidroagático e B) $[M-H]^-$ m/z 491 derivado da biotransformação do ácido *ent*-poliáltico com microsomas hepáticos humanos..... 119
- Figura 42.** Rotas metabólicas sugeridas para a produção de derivados de biotransformação do ácido *ent*-poliáltico com microsomas hepáticos humanos..... 120
- Figura 43.** Rotas metabólicas sugeridas para a produção de derivados de biotransformação do ácido *ent*-diidroagático com microsomas hepáticos humanos..... 120
- Figura 44.** Efeitos sobre a viabilidade de células de carcinoma cervical humano (HeLa) após 24 h de incubação com A) meio de cultura (DMEM), dimetilsulfóxido (DMSO 1%) e dodecilsulfato de sódio (SDS 2%), B) ácido *ent*-poliáltico e C) ácido *ent*-diidroagático, avaliados pelo método do MTT..... 122
- Figura 45.** Efeitos sobre a viabilidade de células de adenocarcinoma de cólon humano (Caco-2) após 24 h de incubação com A) meio de cultura (DMEM) e dimetilsulfóxido (DMSO 1%), B) ácido *ent*-poliáltico e C) ácido *ent*-diidroagático, avaliados pelo método do MTT..... 122
- Figura 46.** Comparação dos efeitos sobre a viabilidade de células de carcinoma cervical humano (HeLa) após 24 h de incubação com A) ácido *ent*-poliáltico e derivados de biotransformação e B) ácido *ent*-diidroagático e derivados de biotransformação, em concentração igual a 500 μ M..... 124
- Figura 47.** Estrutura química dos derivados de biotransformação do ácido *ent*-poliáltico com diferentes biocatalisadores e rendimento dos produtos isolados..... 128
- Figura 48.** Estrutura química dos derivados de biotransformação do ácido *ent*-diidroagático com diferentes biocatalisadores e rendimento dos produtos isolados..... 129

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados de RMN de ^{13}C do ácido <i>ent</i> -poliáltico e respectivas comparações com a literatura.....	41
Tabela 2. Dados de RMN de ^1H do ácido <i>ent</i> -poliáltico e respectivas comparações com a literatura.....	42
Tabela 3. Dados de RMN de ^{13}C do ácido <i>ent</i> -diidroagático e respectivas comparações com a literatura.....	43
Tabela 4. Dados de RMN de ^1H do ácido <i>ent</i> -diidroagático e respectivas comparações com a literatura.....	44
Tabela 5. Valores de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) dos diterpenos ácido <i>ent</i> -poliáltico (AP), ácido <i>ent</i> -diidroagático (ADA) e do controle miconazol sobre os fungos filamentosos	47
Tabela 6. Valores de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) dos diterpenos ácido <i>ent</i> -poliáltico (AP), ácido <i>ent</i> -diidroagático (ADA) e do controle positivo sobre os micro-organismos do trato gastrointestinal.	47
Tabela 7. Valores de pH do meio de cultura após 5 dias de incubação a 30 °C e 120 rpm dos controles e processos conduzidos com diferentes fungos.	56
Tabela 8. Código, tempo de retenção, massa obtida e rendimento dos produtos isolados do extrato de biotransformação do ácido <i>ent</i> -poliáltico com o fungo <i>A. brasiliensis</i>	58
Tabela 9. Código, tempo de retenção, massa obtida e rendimento dos produtos isolados do extrato de biotransformação do ácido <i>ent</i> -diidroagático com o fungo <i>C. echinulata</i>	59
Tabela 10. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do metabólito P01(AP).	61
Tabela 11. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do metabólito P02(AP).	64
Tabela 12. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do metabólito P03(AP).	67
Tabela 13. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do metabólito P04(AP).	69
Tabela 14. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do metabólito P05(AP).	71
Tabela 15. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do metabólito P06(AP).	74
Tabela 16. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do metabólito P07(AP).	76
Tabela 17. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do metabólito P08(AP).	78
Tabela 18. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do metabólito P09(AP).	80
Tabela 19. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do metabólito P10(AP).	82
Tabela 20. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do metabólito P01(ADA).....	84
Tabela 21. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do metabólito P02(ADA).....	86
Tabela 22. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do metabólito P03(ADA).....	88
Tabela 23. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do metabólito P05(ADA).....	90
Tabela 24. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do metabólito P06(ADA).....	92
Tabela 25. Valores de pH do meio de cultura com <i>B. pseudocatenuatum</i> após adição dos substratos na fase exponencial (T_0) e na fase estacionária (T_{36}).	98

Tabela 26. Íons (m/z) detectados por espectrometria de massas (-ESI) nos extratos de biotransformações do ácido <i>ent</i> -poliáltico com os micro-organismos do trato gastrointestinal.	104
Tabela 27. Íons (m/z) detectados por espectrometria de massas (-ESI) nos extratos de biotransformações do ácido <i>ent</i> -diidroagático com os micro-organismos do trato gastrointestinal.	104
Tabela 28. Íons (m/z) detectados por espectrometria de massas de alta resolução (+ESI) nos extratos de biotransformação da 7-etoxicumarina por microssomas hepáticos humanos.	112
Tabela 29. Íons (m/z) detectados por espectrometria de massas de alta resolução (-ESI) nos extratos de biotransformação do ácido <i>ent</i> -poliáltico com microssomas hepáticos humanos.	116
Tabela 30. Íons (m/z) detectados por espectrometria de massas de alta resolução (-ESI) nos extratos de biotransformação do ácido <i>ent</i> -diidroagático com microssomas hepáticos humanos.	116
Tabela 31. Valores de IC_{50} sobre a viabilidade de células de carcinoma cervical humano (HeLa) após 24 h de incubação com os diterpenos ácido <i>ent</i> -poliáltico (AP), ácido <i>ent</i> -diidroagático (ADA) e seus derivados de biotransformação.	123
Tabela 32. Valores de IC_{50} sobre a viabilidade de células de adenocarcinoma mamário humano (MCF-7) e células epiteliais de mama (MCF-10A), após 24 h de incubação com os diterpenos ácido <i>ent</i> -poliáltico (AP), ácido <i>ent</i> -diidroagático (ADA) e seus derivados de biotransformação.	125

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

$[\alpha]_D$	Rotação óptica específica
^{13}C	Carbono-13
^1H	Hidrogênio-1 (próton)
7-ETC	7-etoxicumarina
ADA	Ácido <i>ent</i> -diidroagático
AP	Ácido <i>ent</i> -poliáltico
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CAD	<i>Charged aerosol detector</i>
CIM	Concentração inibitória mínima
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLUE	Cromatografia líquida de ultra eficiência
CYP	Citocromo P450
<i>d</i>	Dupleto
DAD	<i>Diode array detector</i>
<i>dd</i>	Duplo dupleto
<i>ddd</i>	Duplo duplo dupleto
<i>ddt</i>	Duplo duplo tripleto
DEPT	<i>Distortionless enhancement by polarization transfer</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
<i>dt</i>	Duplo tripleto
ELSD	<i>Evaporative light scattering detector</i>
EM	Espectrometria de massas
EMAR	Espectrometria de massas de alta resolução
ESI	<i>Electrospray ionization</i>
FMO	Flavina monooxigenase
HMBC	<i>Heteronuclear multiple bond coherence</i>
HMQC	<i>Heteronuclear multiple quantum coherence</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC ₅₀	Concentração inibitória para 50 % da população
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
<i>J</i>	Constante de acoplamento
<i>m</i>	Multiplete
<i>m/z</i>	Razão massa carga
MH	Meio de cultura Mueller Hinton
MMA	Ministério do meio ambiente
MRS	Meio de cultura DeMan-Rogosa-Sharpe
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio
NADP	Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida
<i>nd</i>	Desdobramento de sinal não definido
NOESY	<i>Nuclear Overhauser effect spectroscopy</i>
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i>
PDA	<i>Potato dextrose agar</i>
ppm	Partes por milhão
RMN	Ressonância magnética nuclear
rpm	Rotações por minuto
<i>s</i>	Simpleto
SEM	<i>Standard error of the mean</i> (desvio padrão da média)

<i>sl</i>	simpleto largo
SPE	<i>Solid phase extraction</i>
<i>t</i>	Tripleto
<i>td</i>	Triplu dupleto
u	Unidade de massa atômica unificada
UDPGA	Ácido uridina 5-difosfato do ácido glucurônico
UFC	Unidades formadoras de colônia
UGT	UDP-glucuronosiltransferase
UV	Ultravioleta
XTT	2,3-Bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfo fenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida
δ	Deslocamento químico
λ	Comprimento de onda

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	viii
1 INTRODUÇÃO	2
1.1 Biotransformação.....	2
1.2 Oleorresinas de <i>Copaifera</i>	9
1.2.1 Ácido <i>ent</i> -poliáltico e ácido <i>ent</i> -diidroagático.....	10
1.3 Biotransformação de diterpenos	13
2 OBJETIVOS	20
2.1 Objetivo geral	20
2.2 Objetivos específicos.....	20
3 MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1 Diterpenos ácidos <i>ent</i> -poliáltico e <i>ent</i> -diidroagático	22
3.2 Autorização de acesso ao patrimônio genético nacional	22
3.3 Micro-organismos.....	22
3.3.1 Fungos filamentosos	22
3.3.2 Micro-organismos do trato gastrointestinal.....	23
3.4 Manutenção dos fungos filamentosos e dos micro-organismos do trato gastrointestinal	23
3.5 Determinação dos valores de concentração inibitória mínima (CIM) dos ácidos <i>ent</i> -poliáltico e <i>ent</i> -diidroagático	23
3.6 Processos realizados com os fungos filamentosos	24
3.6.1 Biotransformação em escala analítica	24
3.6.2 Biotransformação em escala ampliada	24
3.6.3 Obtenção dos extratos de biotransformação	25
3.6.4 Análise dos perfis químicos dos extratos de biotransformação	25
3.6.5 Isolamento dos produtos de biotransformação	25
3.6.6 Identificação estrutural dos produtos de biotransformação com os fungos filamentosos	26
3.6.6.1 Análise por ressonância magnética nuclear (RMN)	26
3.6.6.2 Análise por espectrometria de massas de alta resolução (EMAR)	26
3.7 Processos realizados com os micro-organismos do trato gastrointestinal.....	27
3.7.1 Biotransformação em escala analítica em meio de cultura líquido	27

3.7.1.1	Bactérias anaeróbias	27
3.7.1.2	Bactérias microaerófilas e aeróbias	28
3.7.1.3	Levedura <i>S. boulardii</i>	28
3.7.2	<i>Biotransformação em escala analítica em meio de cultura sólido</i>	29
3.7.3	<i>Obtenção dos extratos de biotransformação</i>	29
3.7.4	<i>Análise dos perfis químicos dos extratos de biotransformação</i>	29
3.7.5	<i>Identificação estrutural dos produtos de biotransformação com os microorganismos do trato gastrointestinal</i>	29
3.8	Biotransformações dos ácidos <i>ent</i> -poliáltico e <i>ent</i> -diidroagático por microsomas hepáticos	30
3.8.1	<i>Microsomas hepáticos humanos</i>	30
3.8.2	<i>Reagentes e soluções</i>	30
3.8.3	<i>Metabolismo microsomal em escala analítica</i>	31
3.8.4	<i>Análise dos extratos de biotransformação microsomais</i>	32
3.8.4.1	<i>Análise dos extratos de biotransformação da 7-etoxicumarina</i>	32
3.8.4.2	<i>Análise dos extratos de biotransformação dos diterpenos</i>	32
3.8.5	<i>Metabolismo microsomal em escala preparativa</i>	33
3.8.6	<i>Identificação estrutural dos produtos de biotransformação com microsomas hepáticos humanos</i>	33
3.8.6.1	<i>Análise por espectrometria de massas de alta resolução</i>	33
3.9	Análise da rotação específica dos precursores e metabólitos de biotransformação	33
3.10	Avaliação da atividade citotóxica dos precursores e dos metabólitos de biotransformação	34
3.10.1	<i>Avaliação da citotoxicidade pelo método do MTT</i>	34
3.10.1.1	<i>Linhagens celulares utilizadas</i>	34
3.10.1.2	<i>Condições de cultivo celular</i>	34
3.10.1.3	<i>Ensaio do MTT</i>	34
3.10.2	<i>Avaliação da citotoxicidade pelo método do XTT</i>	36
3.10.2.1	<i>Linhagens celulares utilizadas</i>	36
3.10.2.2	<i>Condições de cultivo celular</i>	36
3.10.2.3	<i>Ensaio do XTT</i>	36
3.11	Esquema geral das etapas do projeto	37
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1	Análises dos diterpenos precursores ácidos <i>ent</i> -poliáltico e <i>ent</i> -diidroagático	39
4.1.1	<i>Análise dos dados espectroscópicos do precursor AP</i>	40
4.1.2	<i>Análise dos dados espectroscópicos do precursor ADA</i>	42

4.1.3	<i>Análise dos dados espectrométricos dos precursores AP e ADA</i>	44
4.2	Determinação da concentração inibitória mínima dos ácidos <i>ent</i> -poliáltico e <i>ent</i> -diidroagático frente aos micro-organismos utilizados nos ensaios de biotransformação.....	47
4.3	Biotransformações em escala analítica com os fungos filamentosos	49
4.4	Biotransformações em escala ampliada com os fungos filamentosos.....	56
4.5	Isolamento dos produtos de biotransformação com os fungos filamentosos	57
4.6	Identificação dos produtos de biotransformação com os fungos filamentosos	59
4.6.1	<i>Identificação estrutural do produto P01(AP)</i>	59
4.6.2	<i>Identificação estrutural do produto P02(AP)</i>	62
4.6.3	<i>Identificação estrutural do produto P03(AP)</i>	64
4.6.4	<i>Identificação estrutural do produto P04(AP)</i>	67
4.6.5	<i>Identificação estrutural do produto P05(AP)</i>	70
4.6.6	<i>Identificação estrutural do produto P06(AP)</i>	72
4.6.7	<i>Identificação estrutural do produto P07(AP)</i>	74
4.6.8	<i>Identificação estrutural do produto P08(AP)</i>	76
4.6.9	<i>Identificação estrutural do produto P09(AP)</i>	78
4.6.10	<i>Identificação estrutural do produto P10(AP)</i>	80
4.6.11	<i>Identificação estrutural do produto P01(ADA)</i>	83
4.6.12	<i>Identificação estrutural do produto P02(ADA)</i>	84
4.6.13	<i>Identificação estrutural do produto P03(ADA)</i>	87
4.6.14	<i>Identificação estrutural do produto P05(ADA)</i>	89
4.6.15	<i>Identificação estrutural do produto P06(ADA)</i>	91
4.7	Comparação do metabolismo dos fungos e análise das possíveis rotas metabólicas ...	92
4.8	Biotransformação com os micro-organismos do trato gastrointestinal	97
4.8.1	<i>Biotransformações em meio de cultura líquido</i>	97
4.8.2	<i>Biotransformações em meio de cultura sólido</i>	102
4.8.3	<i>Identificação dos metabólitos de biotransformação com os micro-organismos do trato gastrointestinal</i>	103
4.9	Biotransformação com os microssomas hepáticos humanos.....	109
4.9.1	<i>Biotransformação microssomal com o controle 7-etoxicumarina</i>	109
4.9.2	<i>Biotransformação microssomal com o ácido ent-poliáltico e ent-diidroagático</i> 112	
4.9.3	<i>Identificação dos metabólitos de biotransformação com os microssomas hepáticos humanos</i>	115
4.10	Avaliação da citotoxicidade dos ácidos <i>ent</i> -poliáltico e <i>ent</i> -diidroagático e de seus derivados de biotransformação	121

4.10.1	<i>Avaliação do efeito dos precursores e dos metabólitos de biotransformação sobre a viabilidade celular pelo método do MTT</i>	121
4.10.2	<i>Avaliação do efeito dos precursores e dos metabólitos de biotransformação sobre a viabilidade celular pelo método do XTT</i>	124
4.10.3	<i>Relações estrutura-atividade dos derivados de biotransformação</i>	125
4.11	Esquema geral dos derivados de biotransformação obtidos.....	127
5	CONCLUSÕES	131
6	REFERÊNCIAS	134
	APÊNDICES	149

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 Biotransformação

*“Na natureza nada se cria, nada se perde, tudo se transforma”
Antoine Lavoisier*

A biotransformação está presente na humanidade há centenas de milhares de anos. Os primeiros registros da utilização de processos de biotransformação datam de 5.000 a.C., quando os babilônios utilizavam micro-organismos para a conversão do etanol em ácido acético (LERESCHE & MEYER, 2006).

Acredita-se que a produção de vinagre (Figura 1) surgiu concomitantemente com produção de etanol a partir da fermentação de carboidratos, técnicas também muito utilizadas no Antigo Egito. A hidrólise da caseína para a produção de queijo é outro processo de biotransformação utilizado por nossos antepassados e seu emprego data da época de 800 a.C. (LERESCHE & MEYER, 2006).

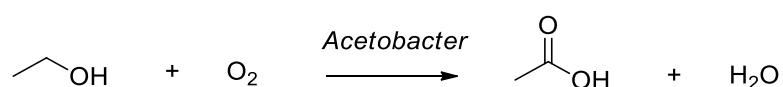


Figura 1. Produção de vinagre a partir do etanol, reportado como um dos primeiros processos de biotransformação utilizados pela humanidade (adaptado de VASIC-RACKI, 2006).

Os primeiros conceitos e definições de biotransformação, no entanto, surgiram apenas no século XX. Segundo Hanson, 1995, a biotransformação pode ser definida como o uso de sistemas biológicos para promover modificações químicas em substratos não naturais. De acordo com a IUPAC, a biotransformação é a conversão química de substâncias por organismos vivos ou preparações enzimáticas (WERMUTH et al., 2009).

É frequente observar certa confusão na utilização dos termos metabolismo e biotransformação. Ainda segundo a IUPAC, o metabolismo possui uma definição mais abrangente, englobando os processos de catabolismo e anabolismo para a manutenção da vida. No entanto, na área de farmacologia e química farmacêutica, o metabolismo geralmente refere-se à biotransformação de xenobióticos e esses termos podem ser utilizados como sinônimos (SILVERMAN & HOLLADAY, 2014). Outros autores da área, porém, consideram a biotransformação como uma etapa do metabolismo de fármacos, que seria o

conjunto dos processos de absorção, distribuição biotransformação e excreção (PARKINSON & OGILVIE, 2012).

A definição dada por Hanson (1995) supõe que metabolismo e biotransformação se diferenciariam pelas modificações enzimáticas promovidas em substratos naturais endógenos e xenobióticos, respectivamente. No entanto, de acordo com Parkinson e Ogilvie (2012), a biotransformação englobaria a conversão metabólica tanto de substratos endógenos quanto de xenobióticos.

Como é possível observar, há diferentes definições para o termo biotransformação na literatura, sendo algumas delas conflitantes e indicando a ausência de um acordo definitivo até então. Na área de química de produtos naturais, é comum o emprego dos termos biotransformação, metabolismo, bioconversão e biocatálise como equivalentes.

Vale ressaltar que alguns autores ainda diferenciam a biotransformação da biocatálise, sendo a última um termo empregado para conversões por enzimas isoladas livres ou imobilizadas, não utilizando sistemas vivos como na biotransformação (LERESCHE & MEYER, 2006).

A biotransformação de xenobióticos em organismos vivos é dividida em duas etapas conhecidas como metabolismo de fase I e metabolismo de fase II. Em humanos, estas etapas visam a conversão de substâncias hidrofóbicas em substâncias mais hidrofílicas de maior peso molecular, a fim de facilitar sua excreção através da urina, suor ou bile e evitar o acúmulo de xenobióticos no organismo (GONZALEZ, COUGHTRIE & TUKEY, 2011).

As enzimas metabólicas localizam-se na membrana intracelular e no citosol das células de órgãos do trato gastrointestinal e fígado principalmente, mas também podem ser encontradas nos rins, pulmões, mucosa ocular e cérebro (SILVERMAN & HOLLADAY, 2014; ARGIKAR et al., 2016). As enzimas de fase I catalisam oxidações, reduções e hidrólises e consistem em enzimas do citocromo P450 (CYP) e flavina monooxigenases (FMO). As enzimas de fase II em geral catalisam conjugações com substâncias endógenas polares como glutatona (glutationa-S-transferase), glutamina (glutamina-N-acetiltransferase), glicina (glicina N-aciltransferase), sulfato (sulfotransferase), ácido glucurônico (UDP-glucuroniltransferase) e acetil (acetil-transferase). Conjugações com grupos menos polares como ácidos graxos, colesterol e grupos metílicos (metil-transferase) também podem ocorrer no metabolismo de fase II.

Na Figura 2 está apresentado um esquema geral para a biotransformação de xenobióticos em humanos.

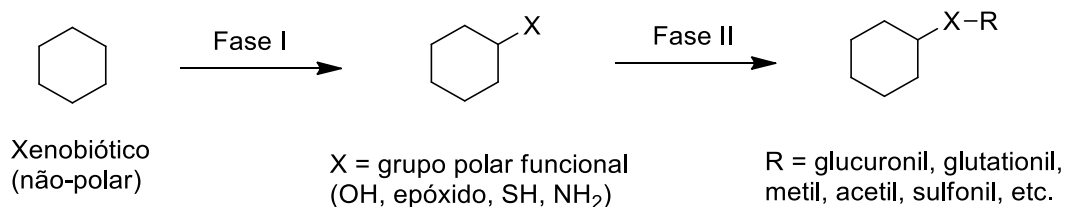


Figura 2. Esquema geral para as reações de metabolismo de fase I e metabolismo de fase II em humanos (adaptado de KOPPEL, REKDAL & BALSUS, 2017).

O entendimento das vias metabólicas de xenobióticos tem um papel crucial no desenvolvimento e otimização de fármacos e é considerado fundamental para a avaliação da eficácia e segurança de substâncias bioativas (ASHA & VIDYAVATHI, 2009). Os estudos de biotransformação fazem parte das análises de fase pré-clínica e de pesquisa clínica de novos candidatos a fármacos.

A pesquisa clínica especificamente direciona-se aos estudos *in vivo* em humanos (HUSSER et al., 2018). Este modelo de biotransformação é o que mais se aproxima das condições reais *in vivo*, no entanto, há diversas implicações éticas, regulatórias e de segurança a serem consideradas (FASINU, BOUIC & ROSENKRANZ, 2012).

Os estudos *in vivo* também podem ser realizados em animais como peixes (LE FOL et al., 2017), ratos, aves, cabras, bovinos, entre outros (SUN et al., 2017). Há uma série de pesquisas questionando a relevância dos resultados obtidos em animais, não apenas pelos conflitos morais e éticos da utilização de animais na ciência, mas também devido às diferenças reportadas de metabolismo interespecies (TRÉZ, 2015; NEVES, 2016). Sabe-se, por exemplo, que camundongos são mais sensíveis à exposição de tóxicos em relação aos humanos, enquanto os ratos são menos sensíveis (ORBACH et al., 2017). Essas diferenças de metabolismo se estendem inclusive para os modelos *in vitro*. Por exemplo, modelos derivados de fígado provenientes de diferentes espécies podem apresentar diferenças metabólicas que dificultam a extrapolação dos resultados para humanos.

Outra desvantagem dos modelos *in vivo* em geral é seu baixo rendimento, dificultando a obtenção de metabólitos em quantidades suficientes para isolamento e análises toxicológicas com os derivados de biotransformação. Considerando este aspecto, alguns modelos de

sistemas *in vitro* oferecem essa vantagem, como por exemplo a utilização de biocatalisadores microbianos.

Os fungos filamentosos são modelos clássicos para estudos de biotransformação e contam com aparato enzimático semelhante ao dos mamíferos, sendo muitas vezes úteis para a predição de vias metabólicas em humanos (VENISETTY & CIDDEN, 2003; PALUDO et al., 2017).

As enzimas fúngicas são capazes de catalisar uma variedade de reações químicas como hidroxilação, oxidação, redução, epoxidação, O-desmetilação, O-desalquilação, O-metilação, glicosilação, entre outras, contribuindo para a diversidade de produtos de biotransformação com estes micro-organismos (SRISILAM & VEERESHAM, 2003).

Revisões publicadas por nosso grupo de pesquisa apontam a grande capacidade metabólica dos fungos do gênero *Mucor* para catalisar reações em diferentes substratos naturais como esteroides, cumarinas, flavonoides, terpenoides e substratos sintéticos como fármacos e pesticidas (SILVA et al., 2013; SILVA et al., 2015). Algumas espécies de *Mucor* apresentam enzimas com alta atividade proteolítica e lipolítica, sendo de grande interesse biotecnológico (MA et al., 2011).

Fungos do gênero *Cunninghamella* são amplamente empregados em estudos de biotransformação e apresentam um repertório de enzimas pertencentes ao citocromo P450 (ASHA & VIDYAVATHI, 2009). Esta característica lhes confere não apenas a habilidade de mimetizar reações enzimáticas em mamíferos, mas também grande potencial na descoberta de novas moléculas, dada a versatilidade das enzimas microbianas desta superfamília, algumas das quais ainda com funções desconhecidas (BHATTACHARYA & YADAV, 2018). Adicionalmente, como as CYPs são capazes de catalisar reações de detoxificação, estes fungos também podem ser importantes em processos de biorremediação, incluindo de poluentes orgânicos persistentes.

Outro gênero bastante explorado em processos biotecnológicos é o gênero *Aspergillus*. Estes fungos são capazes de promover uma atrativa variedade de reações enzimáticas tais como hidroxilações, oxidação de vários grupos funcionais, clivagem de anéis, redução de ligações duplas, desmetilação, sulfatação, hidrólise de epóxidos e conjugação sobre uma gama de substratos, incluindo compostos aromáticos e diterpenoides (HE et al., 2011; PARSHIKOV, WOODLING & SUTHERLAND, 2015; SURA, ANKIREDDY & PONNAPALLI, 2015).

O co-cultivo de fungos filamentosos com bactérias pode ser um recurso interessante para a obtenção de novos derivados. O fungo *Aspergillus niger* foi co-cultivado com a actinobactéria *Streptomyces coelicolor*, levando a produção de novos metabólitos secundários e obtenção de derivados inéditos de biotransformação do ácido *o*-cumárico e ácido cafeico (WU et al., 2015).

Os micro-organismos do trato gastrointestinal possuem um papel central na modificação de substâncias ingeridas, incluindo xenobióticos, componentes da dieta e poluentes químicos (KOPPEL, REKDAL & BALSUS, 2017). Os primeiros estudos relatando a importância da microbiota gastrointestinal no metabolismo datam da década de 50 e demonstravam as diferenças metabólicas em animais normais, animais livres de micro-organismos (*germ-free*) e animais tratados com antibióticos ou dieta condicionada (DANIELSSON & GUSTAFSSON, 1959; SOUSA et al., 2008).

Enquanto as enzimas do fígado e intestino caracterizam-se predominantemente por seu metabolismo oxidativo e conjugativo, as enzimas da microbiota intestinal caracterizam-se pela predominância de reações hidrolíticas e redutoras, expandindo o repertório de reações enzimáticas do corpo humano (ILETT et al., 1990; KOPPEL, REKDAL & BALSUS, 2017).

Assim, a utilização de bactérias e leveduras do trato gastrointestinal como biocatalisadores é uma abordagem importante a se considerar no desenvolvimento de novos fármacos, uma vez que as mesmas podem interferir na atividade, biodisponibilidade e toxicidade dos xenobióticos (SOUSA et al., 2008).

Nas últimas décadas, a microbiota intestinal ganhou papel de destaque nas pesquisas científicas, visto sua capacidade de interferir não apenas no metabolismo de xenobióticos, mas também em processos fisiológicos relacionados à inflamação, obesidade e até mesmo comunicar-se com o sistema nervoso central, modulando comportamentos de depressão e ansiedade (CRYAN & DINAN, 2012).

Adicionalmente, a popularização do uso de probióticos em alimentos funcionais e produtos farmacêuticos incentivou a inclusão das bactérias lácticas em estudos de biotransformação (SILVA et al., 2014; LIU, YANG & FANG, 2018). Os probióticos podem ser definidos como micro-organismos vivos capazes de promover efeitos benéficos à saúde do hospedeiro quando administrado em quantidades adequadas (BINNS, 2014). Entre os tipos mais comuns estão as bactérias lácticas do gênero *Lactobacillus*, bactérias do gênero

Bifidobacterium e as leveduras do gênero *Saccharomyces*. Os micro-organismos probióticos também podem interferir no metabolismo de fármacos e xenobióticos e estar associados a processos de detoxificação (YANG, CHU & FIX, 2002; MECA, RITIENI & MAÑES, 2012).

Diferentemente de alguns fungos filamentosos, as bactérias lácticas apresentam quantidades reduzidas de CYP, enquanto a bactéria *Escherichia coli*, por exemplo, são desprovidas das mesmas. As diferenças do arsenal enzimático desses micro-organismos podem ser interessantes para obtenção de diferentes metabólitos de biotransformação.

Outros tipos de biocatalisadores amplamente difundidos são os modelos derivados de fígado e intestino. Alguns exemplos são a utilização de células imortalizadas como Caco-2 e HT-29, hepatócitos humanos, organoides intestinais, fígado perfundido, preparações enzimáticas como microssomas, frações S9 e citosólicas e biochip de fígado (FASINU, BOUIC & ROSENKRANZ, 2012; ORBACH et al., 2017; GRÖGER et al., 2017). O desenvolvimento de modelos *in vitro* mais recentes levam em consideração a arquitetura dos órgãos *in vivo* e a integração do trato gastrointestinal com o fígado, a fim de se obter sistemas mais próximos possíveis das condições reais.

Os microssomas hepáticos são os modelos mais populares para *screening* metabólico, estudos de interação e otimização de fármacos e consistem em vesículas do retículo endoplasmático liso dos hepatócitos preparadas por centrifugação diferencial. Os microssomas propiciam uma estimativa qualitativa do metabolismo *in vivo* e são ricos principalmente em enzimas CYP450 e glucuroniltransferases. Apesar de apresentarem um repertório enzimático mais limitado que as frações S9, por exemplo, sua atividade enzimática pode ser considerada maior (FASINU, BOUIC & ROSENKRANZ, 2012).

Os microssomas são modelos de fácil utilização e também podem ser úteis na pesquisa do metabolismo de produtos naturais bioativos (ZENGER et al., 2015; BENDIKOV et al., 2016, JIA et al., 2016). Sua utilização também permite a análise de variações metabólicas interindividuais e populacionais, apesar da extrapolação quantitativa da formação de metabólitos nesses modelos serem consideradas limitadas (FASINU, BOUIC & ROSENKRANZ, 2012).

O metabolismo dos microssomas provenientes de ratos e humanos podem diferir quanto suas capacidades de glucuronidação e quanto às isoformas das CYPs, sendo o modelo derivado de fígado humano capaz de simular mais fielmente o metabolismo *in vivo* (EAGLING, TJIA & BACK, 1998; ELSBY et al., 2001; ASHA & VIDYAVATHI, 2009).

Outros biocatalisadores utilizados em estudos de biotransformação são as células vegetais e microalgas (CARVALHO & FONSECA, 2006), além da possibilidade de estudos *in silico*, os quais utilizam ferramentas computacionais a fim de prever o metabolismo de fármacos ou outras substâncias baseados em princípios físico-químicos e afinidade enzimática (ALQAHTANI, 2017). Uma abordagem mais recente consiste na combinação de células íntegras com metaloenzimas capazes de promover reações enzimáticas inéditas, contribuindo assim para a obtenção de maior diversidade de estruturas químicas nos processos de biotransformação (JESCHEK, PANKE & WARD, 2018).

Muitas vezes, as reações de biotransformação aumentam a funcionalidade dos substratos, levando a formação de derivados oxidados com maior potencial biológico que o material de partida (SOUSA, TEIXEIRA & FURTADO, 2018). A regio e estereoseletividade apresentada por muitas enzimas pode levar a formação de produtos que seriam difíceis ou até impossíveis de se obter por síntese química convencional (VENISETTY & CIDDI, 2003). A estabilidade enzimática dos sistemas vivos e regeneração natural de cofatores também apresenta uma grande vantagem, visto a maior eficiência e economia dos processos (FABER, 1997).

Por fim, o conjunto de vantagens da biotransformação tais como a possibilidade de obtenção de derivados inéditos, biologicamente ativos e enantiomericamente puros sob condições brandas e estáveis reflete o aumento do número de patentes envolvendo processos de biotransformação registradas ao longo dos últimos anos (Figura 3).

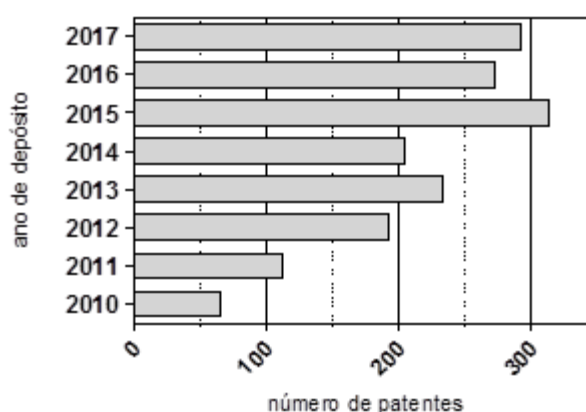


Figura 3. Evolução do número de patentes registradas entre os anos de 2010 e 2017 envolvendo processos de biotransformação (adaptado da base de dados SCIFINDER, 2018).

1.2 Oleorresinas de *Copaifera*

“A natureza não faz nada em vão”
Aristóteles

As árvores do gênero *Copaifera* L. da família Leguminosae Juss. e subfamília Caesalpinioideae Kunth são amplamente distribuídas pela região tropical da América Latina, podendo também ser encontradas na África Ocidental (VEIGA JUNIOR & PINTO, 2002). No Brasil, estão distribuídas ao longo de todo o território nacional, sendo particularmente abundantes na região Amazônica. Dentre as espécies mais comuns estão *C. multijuga* Hayne, *C. reticulata* Ducke e *C. langsdorffii* Desf. (TRINDADE, SILVA & SETZER, 2018).

Dos troncos das árvores do gênero *Copaifera* é extraído um bálsamo através de processos artesanais, o qual possui consistência oleosa e coloração amarelo-pálida a alaranjada ou esverdeada, podendo variar de acordo com a espécie e composição química da oleorresina (ROMERO, 2007). Este exsudato é popularmente conhecido como óleo de copaíba e tem função de defesa da planta contra animais, fungos e bactérias (VENEZIANI et al., 2017).

Há registros da utilização destes bálsamos na medicina popular brasileira desde o período pré-colombiano, quando eram utilizados pelos índios nativos como repelente e para tratar doenças da pele (LORENZI & MATOS, 2008).

Posteriormente, as oleorresinas de *Copaifera* passaram a ter indicação nas farmacopeias para tratamento da blenorragia e seu uso estendeu-se na medicina popular como cicatrizante, anti-inflamatório, diurético, expectorante, antimicrobiano das afecções urinárias e da garganta (LORENZI & MATOS, 2008). Entre outras indicações etnofarmacológicas, estão sua utilização como estimulante, afrodisíaco, expectorante, antitumoral, no combate à incontinência urinária, cefaleia, sífilis, asma, bronquite, hemoptise, psoríase, eczema, dermatite, sinusite, pneumonia, tétano, reumatismo, herpes, leishmaniose e picada de cobra (VEIGA JUNIOR & PINTO, 2002).

Segundo o levantamento mais recente do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2016), são extraídas cerca de 170 toneladas de oleorresina por ano, a qual é comercializada em farmácias, feiras, lojas de produtos naturais e também exportada para diversos outros países. As oleorresinas são comercializadas não apenas na forma de óleo bruto, mas também veiculadas em produtos cosméticos, sabonetes, shampoos, cremes,

pomadas, entre outros, sendo alguns sabonetes indicados para o tratamento de acne (RIOS & PASTORE JUNIOR, 2011).

No estado do Pará, a copaíba é considerada um dos remédios naturais mais importantes provenientes da região Amazônica, sendo utilizada por pessoas de diferentes idades e classes sociais (TRINDADE, SILVA & SETZER, 2018). O óleo de copaíba pode ser aplicado topicamente ou utilizado via oral através da ingestão de cápsulas, gotas na água ou misturado a mel e limão. Nos EUA, estes bálsamos são utilizados como aromatizante em alimentos e bebidas (TAYLOR, 2005).

Alguns fazendeiros do estado do Pará utilizam o óleo de copaíba a fim de prevenir a febre aftosa em bovinos, despejando o óleo no chão próximo aos cochos de sal (SHANLEY et al., 2005).

O histórico de uso e a popularização da oleorresina de *Copaifera* levou a comunidade científica a se aprofundar no estudo de suas composições químicas e propriedades farmacológicas. Sabe-se que as oleorresinas são constituídas majoritariamente de sesquiterpenos na fração volátil e diterpenos do tipo clerodano e labdano, tanto da série normal como da série enantio na fração fixa (VEIGA JUNIOR et al., 2007, DA SILVA et al., 2017).

Diversos estudos têm comprovado as propriedades anti-inflamatória (SANTIAGO et al., 2015; GUSHIKEN et al., 2017; RIBEIRO et al., 2018), antimicrobiana (ABRÃO et al., 2015; BARDAJÍ et al., 2016, LEANDRO et al., 2016), cicatrizante (PAIVA et al., 2002), antitumoral (GOMES et al., 2008; ALVES et al., 2017), gastroprotetora (PAIVA et al., 1998), esquistossomicida (BORGES et al., 2016) e leishmanicida (SANTOS et al., 2008) das oleorresinas e seus constituintes isolados, confirmando muitas das indicações populares do óleo de copaíba.

1.2.1 Ácido ent-poliáltico e ácido ent-diidroagático

Dentre os exsudatos de *Copaifera* estudados pelos pesquisadores do projeto temático ao qual este estudo esteve vinculado (processo FAPESP 2011/13630-7), a oleorresina proveniente de *Copaifera duckei* destacou-se devido a suas promissoras atividades antimicrobiana (VIEIRA et al., 2018; ABRÃO et al., 2018), antiparasitária (BORGES et al., 2016), analgésica e gastroprotetora (resultados ainda não publicados).

Através da análise fitoquímica da fração não volátil deste bálsamo, os metabólitos secundários ácido *ent*-poliáltico (AP) e ácido *ent*-diidroagático (ADA) foram identificados entre os constituintes químicos majoritários (CASCON & GILBERT, 2000; BORGES et al., 2016, CARNEIRO et al., 2018).

O AP e ADA são metabólitos secundários da classe dos diterpenos, originando-se assim a partir da condensação de quatro unidades de isopreno (C_5H_8) pela via do metileritritol fosfato ou do mevalonato (SOUSA, TEIXEIRA & FURTADO, 2018).

O esqueleto carbônico dos diterpenoides pode variar de acordo com sua biossíntese. Entre os tipos mais comuns de diterpenos acíclicos estão os fitanos, enquanto os diterpenos policíclicos podem apresentar uma variedade de núcleos do tipo labdano, clerodano, pimarano, abietano, taxano, traquilobano, beierano, caurano, entre outros (VENEZIANI et al., 2017). Na natureza, os diterpenos ácidos tem função de proteger a planta contra ataques de herbívoros e patógenos (KEELING & BOHLMANN, 2006).

Os diterpenos AP e ADA utilizados neste estudo possuem esqueletos característicos de labdanos e são pertencentes à série enantiomérica, ou seja, possuem estruturas que são imagens especulares da série normal, para a qual a fusão entre os anéis A e B ocorre da mesma forma que nos esteroides (GARCIA, OLIVEIRA & BATISTA, 2007). Suas estruturas químicas estão apresentadas na Figura 4.

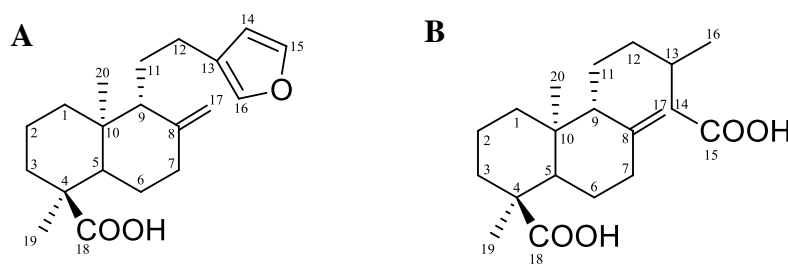


Figura 4. Estrutura química dos diterpenos labdanos **A)** ácido *ent*-poliáltico e **B)** ácido *ent*-diidroagático

O diterpeno furânico AP também pode ser encontrado em outras espécies de *Copaifera* como *C. multijuga*, *C. multianesis* e *C. reticulata* (CASCON & GILBERT, 2000), além de outras espécies vegetais tais como *Eupatorium buniifolium* (CARRERAS, ROSSOMANDO & GIORDANO, 1998) e *Croton reflexifolius* (REYES-TREJO et al.; 2008).

O AP já foi reportado como antimicrobiano (TINCUSI et al., 2002; ABRÃO et al., 2018), gastroprotetor (REYES-TREJO et al., 2008), tripanocida (IZUMI et al., 2012), leishmanicida (DOS SANTOS et al., 2013; MIZUNO et al., 2015) e esquistossomicida (BORGES et al., 2016). O AP da série normal apresentou atividade anti-mutagênica (MIYAZAWA et al., 1995) e induziu a glicação de proteínas do plasma (ATOLANI & OLATUNJI, 2014), indicando a necessidade de maior conhecimento sobre as possíveis propriedades tóxicas dos diterpenos.

Não há muitos estudos de atividade biológica com o ADA isoladamente, porém importantes pesquisas com moléculas químicas semelhantes foram reportadas.

A aplicação intravenosa do diterpeno ácido labd-8(17)-en-15-óico em ratos normotensos induziu efeitos dose-dependentes de hipotensão e taquicardia através da redução da resistência vascular e da ativação do impulso simpático para o coração, respectivamente (LAHLOU et al., 2007). O ácido junicédrico, o qual se diferencia do ADA apenas pela estereoquímica do grupo metílico da posição 20, apresentou efeito neuroprotetor contra alterações degenerativas induzidas por oligômeros relacionados à doença de Alzheimer (ZOLEZZI et al., 2018).

O diterpeno ácido isocuprêssico (Figura 5A) foi associado à indução de aborto em ruminantes após o consumo de agulha do pinheiro de determinadas espécies de coníferas contendo este diterpeno (LEE et al., 2003). O diagnóstico deste quadro é sugerido através da detecção do ácido isocuprêssico no plasma bovino, além de seus derivados estáveis ácido agático, ácido diidroagático e ácido tetraidroagático, os quais podem ser detectados mesmo após alguns dias depois do consumo da planta pelos ruminantes (SNIDER et al., 2015).

O ácido diidroagático foi identificado como um produto derivado do metabolismo do ácido isocuprêssico pelas bactérias presentes no rúmen bovino (LIN et al., 1998). No entanto, outros estudos apontam o ácido agático (Figura 5B) como responsável pelo efeito abortivo, visto que o ácido isocuprêssico pode ser rapidamente convertido em ácido agático, elevando suas concentrações no plasma (GARDNER, PANTER & STEGELMEIER, 2010; WELCH et al., 2012). Dada a semelhança das estruturas químicas do ácido agático e do ácido isocuprêssico com os diterpenoides identificados nas oleorresinas de *Copaifera*, ressalta-se a importância dos estudos de segurança com produtos naturais utilizados na medicina popular.

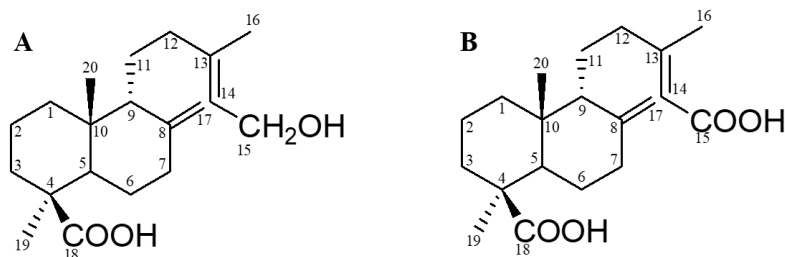


Figura 5. Estrutura química do **A)** ácido isocuprêssico e **B)** ácido agático, os quais foram associados à indução de aborto em bovinos (SNIDER et al., 2015; GARDNER, PANTER & STEGELMEIER, 2010).

1.3 Biotransformação de diterpenos

“Eu também quero a volta à natureza. Mas essa volta não significa ir para trás, e sim para a frente”.
Friedrich Nietzsche

Na literatura, há diversos artigos de revisão de estudos de biotransformação com diterpenos (GARCÍA-GRANADOS et al., 2007; FRIJA, FRADE & AFONSO, 2011; BHATTI & KERA, 2014; RICO-MARTÍNEZ et al., 2014; SOUSA, TEIXEIRA & FURTADO, 2018), porém não há estudos com o AP e ADA especificamente.

A literatura demonstra que diversos carbonos do núcleo terpenoide são suscetíveis a uma série de modificações químicas por biotransformação, incluindo hidroxilações, redução, hidrólise, epoxidação, redução de grupos carboxílicos, metilação, conjugação com ácido glucurônico, sulfato e aminoácidos (SULTANA & SAIFY, 2013; GARCÍA-GRANADOS et al., 2007; BHATTI & KERA, 2014; WANG et al., 2010; ZHANG et al., 2011).

O labdano andrografolido isolado de *Andrographis paniculata* foi submetido à biotransformação com o fungo *Rhizopus stolonifer*, levando a formação de metabólitos principalmente via oxidação e desidratação (HE et al., 2010) (Figura 6).

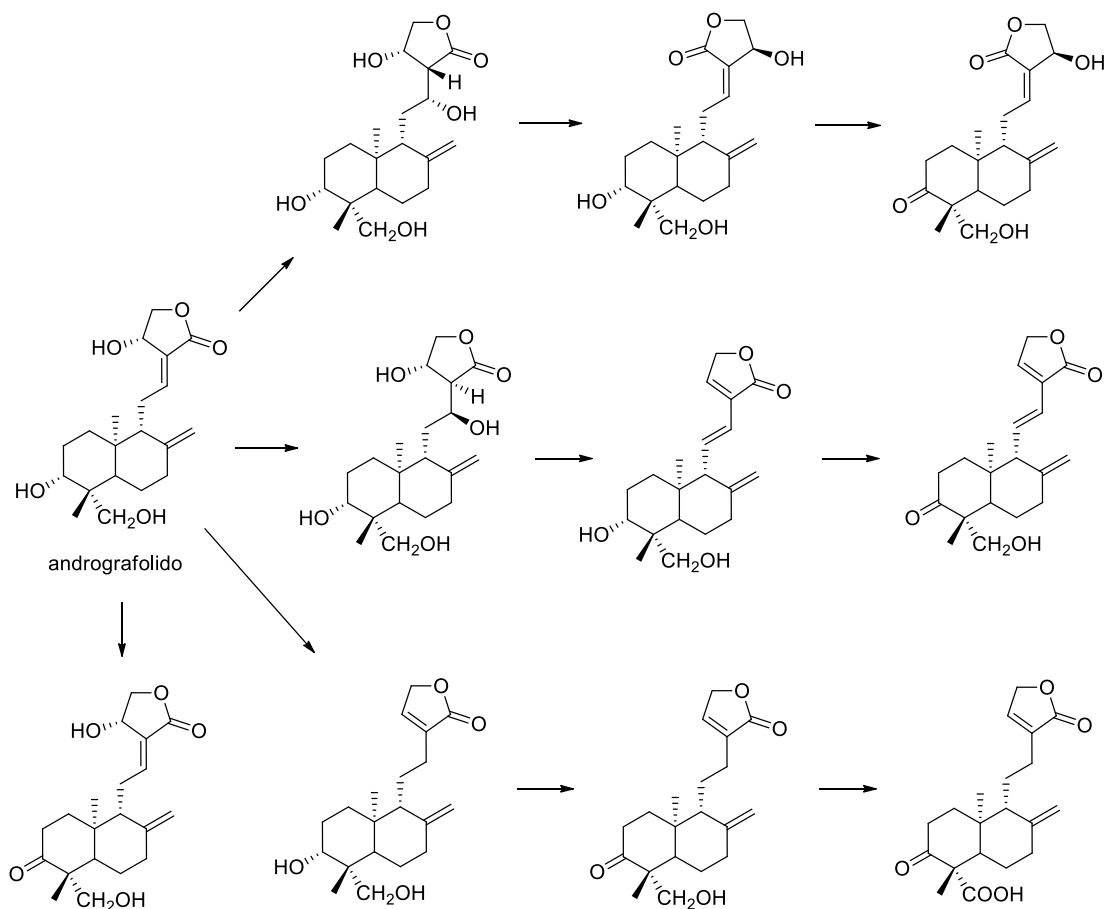


Figura 6. Andrografolido e seus derivados obtidos através da biotransformação com *R. stolonifer* (HE et al., 2010).

O esclareol é um diterpeno labdano extensivamente estudado em processos de biotransformação. Entre as reações mais comuns com diferentes micro-organismos estão a 3β , 6α e 18-hidroxilação (MARTINS et al., 2015; MENDOZA et al., 2015). No entanto, um exemplo raro de halogenação foi obtido através da incubação do esclareol com *Botrytis cinerea*, como apresentado na Figura 7 (FAROOQ & TAHARA, 2000).

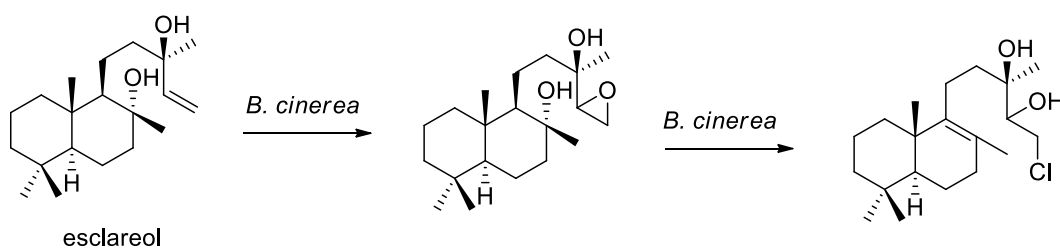


Figura 7. Epoxidação e halogenação do esclareol pelo fungo *B. cinerea* (FAROOQ & TAHARA, 2000).

A biotransformação de um diterpeno labdano semelhante ao ADA foi investigada com os fungos *Fusarium oxysporum* e *Myrothecium verrucaria* (MONTEIRO et al., 2017). Dois metabólitos hidroxilados nas posições 3 e 7 foram obtidos. Como é possível observar na Figura 8, *M. verrucaria* foi capaz de hidroxilar o anel A do precursor, enquanto *F. oxysporum* demonstrou preferência pelo anel B.

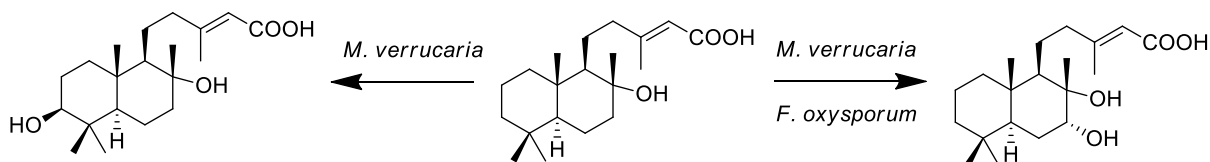


Figura 8. Derivados obtidos a partir da biotransformação do ácido (+)-(5*S*, 8*S*, 9*R*, 10*S*)-lab-13-en-8β-ol-15-óico com os fungos *M. verrucaria* e *F. oxysporum* (MONTEIRO et al., 2017).

Os tipos de biocatalisadores mais empregados para o estudo de biotransformação de diterpenoides são os fungos, sendo as bactérias e modelos derivados do fígado utilizados com menor frequência. A bactéria *Streptomyces griseus* foi utilizada para o estudo de metabolismo de um derivado do taxano sinexan A (LIU et al., 2012). Foram identificados dois metabólitos hidroxilados e um derivado furanotaxano com um sistema de anel 6/8/6/5 incomum, formado pela oxidação e arranjo intramolecular de um dos metabólitos hidroxilados, conforme apresentado na Figura 9.

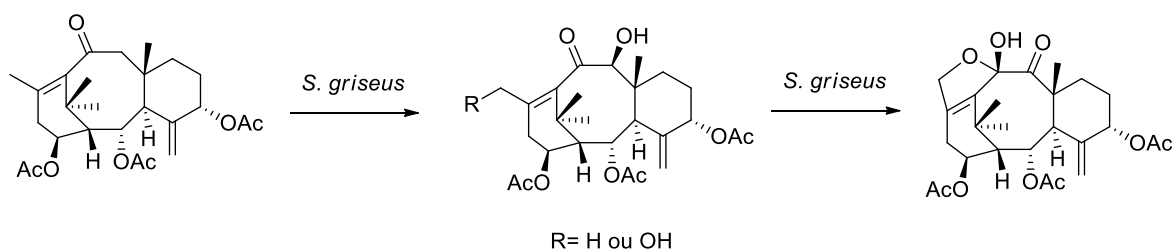


Figura 9. Biotransformação do diterpenoide derivado de sinexan A pela bactéria *S. griseus* (LIU et al., 2012).

A tanshinona I é um diterpeno quinona do tipo abietano e está presente na composição da planta medicinal *Salvia miltiorrhiza*. Seu metabolismo foi investigado através da incubação com microsomas hepáticos humanos e frações S9, levando a formação de metabólitos de fase I e fase II (LI et al., 2018). As reações enzimáticas mais comuns foram

hidroxilação, redução e glucuronidação. As vias metabólicas propostas e as isoformas enzimáticas envolvidas estão apresentadas na Figura 10.

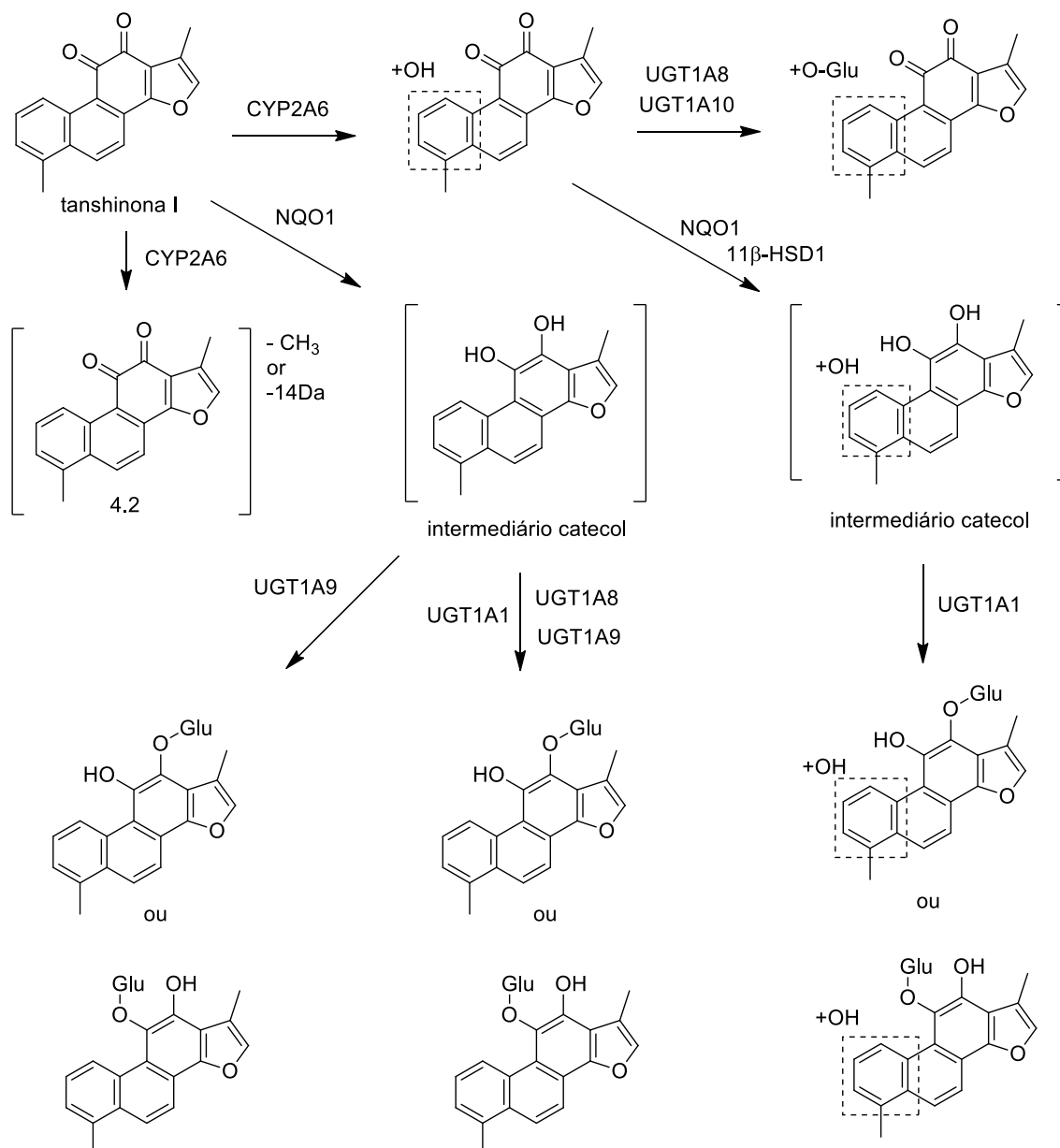


Figura 10. Vias metabólicas propostas para a biotransformação da tanshinona I com microsomas hepáticos humanos e frações S9 (LI et al., 2018).

Apesar da ampla distribuição dos diterpenos em fontes vegetais, muitas das quais são utilizadas via oral na medicina popular assim como o óleo de copaíba (GONZÁLEZ-BURGOS, CARRETERO & GÓMEZ-SERRANILLOS, 2011; HUA et al., 2017, UENO et al., 2018), a maioria dos estudos com biotransformação de diterpenos é direcionada à

obtenção de novos derivados ativos, sendo menor o enfoque na investigação de suas vias metabólicas para estudos de segurança.

Sabe-se que o efeito das biotransformações sobre a atividade biológica dos precursores pode variar, e derivados farmacologicamente ativos, inativos ou tóxicos podem ser obtidos. Considerando-se o potencial de detoxificação de sistemas biológicos, as modificações químicas ocorridas nos substratos podem diminuir sua atividade farmacológica. O metabolismo do ácido pseudolárico B pelo fungo *Chaetomium globosum* inativou o potencial antifúngico do substrato, principalmente através da conjugação com aminoácidos (ZHANG et al., 2011). A indução da produção de óxido nítrico promovida pelo deoxiandrografolido foi reduzida após a maioria das alterações químicas promovidas pelo fungo *Cunninghamella blakesleana* em sua estrutura (DENG et al., 2012).

Por outro lado, a modificação química de substratos diterpenoides por biotransformação já foi associada ao aumento das atividades antimicrobiana, gastroprotetora, alelopática, anticolinesterásica e citotóxica frente a células tumorais (SOUSA, TEIXEIRA & FURTADO, 2018). Um derivado carboxilado obtido a partir da biotransformação do ácido traquiloban-19-óico com *Syncephalastrum racemosum*, por exemplo, apresentou atividade anticolinesterásica maior não apenas que seu precursor, mas também foi seis vezes mais ativo que o controle positivo galantamina (DOS SANTOS et al., 2018).

Um exemplo clássico de toxicidade ativada após metabolização de substâncias naturais refere-se a um quadro epidêmico de hepatite tóxica na França. O metabolismo hepático de diterpenos *neo-clerodanos* presentes em *Teucrium chamaedrys* L., cujo extrato era consumido em cápsulas para fins de emagrecimento, levou a formação de metabólitos hepatotóxicos em humanos (VEIGA JUNIOR, PINTO & MACIEL, 2005). O efeito tóxico foi relacionado provavelmente à conversão dos diterpenoides (Figura 11) em metabólitos eletrofilicos pelas enzimas CYP3A, sendo a presença do anel furano determinante para a toxicidade (LEKEHAL et al., 1996).

Dada a importância dos estudos de biotransformação com diterpenoides, os estudos com os diterpenos AP e ADA especificamente podem corroborar para a utilização mais eficaz e segura das oleorresinas de *Copaifera* e também de outras fontes vegetais que contêm os diterpenos estudados. O emprego de diferentes abordagens de biotransformação podem contribuir para o entendimento do metabolismo destas substâncias *in vivo*.

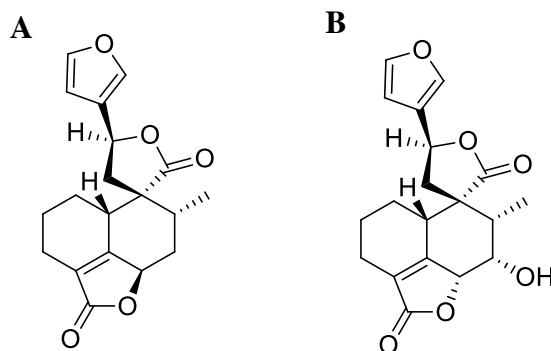


Figura 11. Diterpenos A) teuchmaedrina A e B) teucrinal A, isolados de *Teucrium chamaedrys* L. e relacionados aos efeitos hepatotóxicos após metabolização pelas enzimas P450 (LEKEHAL et al., 1996).

A biotransformação dos diterpenos AP e ADA é importante não apenas para estudos de segurança, mas também é uma etapa necessária caso haja interesse em utilizá-los como protótipos de novos fármacos ou fitomedicamentos, além de propiciar informações importantes do ponto de vista biotecnológico para estratégias de obtenção de metabólitos de interesse.

Por fim, os estudos de biotransformação também podem resultar em metabólitos inéditos e farmacologicamente ativos, o que pode ser atrativo para companhias farmacêuticas interessadas em explorar substâncias bioativas oriundas da biodiversidade brasileira e agregar valor à comercialização e exportação das oleorresinas de *Copaifera*.

Há diversas patentes registradas envolvendo biotransformação de diterpenoides (SCIFINDER, 2018; United States Patent and Trademark Office – USPTO, 2018). Alguns exemplos são a utilização de micro-organismos recombinantes para a produção de glicosídeos de esteviol com elevado grau de pureza para serem utilizados como adoçantes naturais em alimentos e bebidas, utilização de leveduras para a produção de derivados a serem utilizados como fragrâncias a partir da biotransformação do larixol e manool e utilização de biotransformação para a produção de reguladores de crescimento de plantas. Processos de biotransformação com diterpenos taxanos também são patenteados para a produção de intermediários do paclitaxel, o qual é utilizado como agente antitumoral. Tais patentes indicam a importância da biotransformação de diterpenoides na indústria alimentícia, farmacêutica e agrícola.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver processos de biotransformação dos ácidos *ent*-poliáltico (AP) e *ent*-diidroagático (ADA) utilizando diferentes biocatalisadores (fungos filamentosos, micro-organismos do trato gastrointestinal e microsomas hepáticos) a fim de investigar o metabolismo *in vitro* de constituintes das oleorresinas de *Copaifera*. Adicionalmente, propõe-se isolar e caracterizar estruturalmente os derivados majoritários de biotransformação e avaliar sua citotoxicidade *in vitro*, a fim de compará-la com a atividade do material de partida e contribuir para estudos de segurança.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar os valores de concentração inibitória mínima (CIM) do AP e ADA frente aos micro-organismos a serem utilizados nos estudos de biotransformação;
- Desenvolver processos de biotransformação dos diterpenos AP e ADA utilizando os fungos filamentosos e bactérias do trato gastrointestinal em culturas isoladas e mistas;
- Selecionar um ou dois processos de biotransformação mais promissores para o desenvolvimento em escala ampliada;
- Desenvolver os processos selecionados em escala ampliada;
- Isolar, identificar e/ou elucidar as estruturas químicas dos derivados majoritários de biotransformação microbiana;
- Desenvolver processos de biotransformação do AP e ADA empregando microsomas hepáticos humanos;
- Identificar os derivados majoritários de biotransformação microsomal;
- Avaliar a citotoxicidade dos diterpenos precursores e dos derivados majoritários de biotransformação frente a linhagens celulares *in vitro*.

Material e métodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Diterpenos ácidos *ent*-poliáltico e *ent*-diidroagático

Os diterpenos AP e ADA foram previamente isolados a partir da oleorresina de *C. duckei* por cromatografia líquida sob pressão reduzida e gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Sérgio Ricardo Ambrósio da Universidade de Franca (UNIFRAN), pertencente à equipe de pesquisa do projeto temático.

3.2 Autorização de acesso ao patrimônio genético nacional

O projeto de doutorado “Biotransformações dos ácidos *ent*-poliáltico e *ent*-diidroagático por culturas microbianas e microssomas hepáticos” esteve vinculado ao projeto temático intitulado “Validação química-farmacológica de extratos e princípios ativos de espécies de *Copaifera*” (processo FAPESP 2011/13630-7), para o qual foi concedida autorização de acesso ao patrimônio genético para pesquisa científica pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e pelo Ministério do Meio Ambiente MMA-SISBIO-ICMBio-IBAMA (autorizações 010225/2014-5 e 35143-3).

3.3 Micro-organismos

Foram utilizados micro-organismos provenientes dos estoques mantidos na seção de Microbiologia do laboratório de Farmacognosia da FCFRP-USP, sob supervisão da Profa. Dra. Nieve Furtado.

3.3.1 Fungos filamentosos

Foram utilizados os seguintes fungos filamentosos: *Mucor rouxii* NRRL 1894, gentilmente cedido pelo Prof. Dr. João Atilio Jorge da FFCLRP-USP, *Cunninghamella elegans* (ATCC 10028b), *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404) e *Cunninghamella echinulata* var. *elegans* (ATCC 8688a) adquiridos da *American Type Culture Collection* (ATCC).

3.3.2 Micro-organismos do trato gastrointestinal

Foram utilizadas culturas probióticas de *Bifidobacterium sp.* (FERM FD DVS BB 12®-Probio-Tec™), *Bifidobacterium longum* (ATCC 55814), *Bifidobacterium pseudocatenulatum* (ATCC 27919), *Bifidobacterium bifidum* (ATCC 29521), *Lactobacillus acidophilus* (ATCC 53544), *Lactobacillus fermentum* (ATCC 11976) e a levedura *Saccharomyces boulardii* (Floratil®, Merck, França). A bactéria *Escherichia coli* (ATCC 25922) também foi utilizada nos experimentos de biotransformação. Foram realizados ensaios com culturas mistas contendo 1) *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium pseudocatenulatum* e *Bifidobacterium bifidum*; 2) *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus johnsonii* (ATCC 33200), *Lactobacillus rhamnosus* (ATCC 21052) e *Lactobacillus delbrueckii* (ATCC 15808) e 3) *Escherichia coli*, *Saccharomyces boulardii*, *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus fermentum*.

3.4 Manutenção dos fungos filamentosos e dos micro-organismos do trato gastrointestinal

A manutenção das culturas puras dos fungos filamentosos foi feita pelo método de Castellani (CASTELLANI, 1964). As culturas das bactérias probióticas foram mantidas congeladas em solução contendo 10 % (p/v) de leite reconstituído em pó desnatado (Glória, Brasil), 0,5 % (p/v) de extrato de levedura (Himedia, Índia) e 10 % (v/v) de glicerol (Synth, Brasil). A levedura *S. boulardii* foi adquirida e mantida liofilizada em cápsulas (Floratil®, Merck, França) e a linhagem de *E. coli* foi mantida congelada em caldo triptona de soja (Himedia, Índia) contendo 40 % (v/v) de glicerol.

3.5 Determinação dos valores de concentração inibitória mínima (CIM) dos ácidos *ent*-poliáltico e *ent*-diidroagático

A fim de estabelecer uma concentração do material de partida a ser biotransformado que não interferisse na viabilidade dos micro-organismos utilizados, foi realizado um ensaio antimicrobiano para determinação dos valores de CIM. Os ensaios foram realizados segundo o método de microdiluição em microplaca (CLSI, 2008; CLSI, 2012a; CLSI, 2012b), empregando a resazurina como revelador. Os experimentos foram conduzidos em capela de fluxo laminar sob condições assépticas. Foram utilizados os seguintes antimicrobianos como controles positivos: penicilina G (Sigma, EUA), miconazol (Sigma, EUA) e sulfato de

estreptomicina (Sigma, EUA). As condições dos ensaios de microdiluição foram as mesmas condições dos estudos de biotransformação, que serão descritas a seguir.

3.6 Processos realizados com os fungos filamentosos

3.6.1 Biotransformação em escala analítica

Os fungos filamentosos foram cultivados em tubos de ensaio contendo meio *Potato Dextrose Agar* (PDA, Acumedia, EUA) por 7 dias a 30°C. Após o término do período de incubação, foi adicionada água esterilizada nos tubos a fim de realizar a contagem do número de esporos em câmara de *Neubauer*. Aliquotas da suspensão de esporos em água foram transferidas para meio pré-fermentativo (JACKSON et al., 1993), a fim de se obter uma concentração final de 1×10^6 esporos/mL. As culturas foram mantidas sob agitação constante de 120 rpm, a 30 °C durante 48 h.

Posteriormente, as massas miceliais crescidas em meio pré-fermentativo foram transferidas para Erlenmeyers contendo meio fermentativo Koch's K1 preparado com 0,18 % (p/v) de glucose anidra (Vetec, Brasil), 0,06 % (p/v) de peptona bacteriológica (Himedia, Índia) e 0,04 % (p/v) de extrato de levedura (Himedia, Índia). Os diterpenos foram adicionados aos Erlenmeyers correspondentes aos processos de biotransformação na concentração final de 0,1 mg/mL. As culturas foram mantidas a 30 °C, sob agitação constante de 120 rpm, durante 5 dias. Os controles apropriados do meio de cultura, do solvente dimetilsulfóxido (DMSO, Synth, Brasil) e da estabilidade dos diterpenos no meio de cultura também foram realizados. O pH dos meios de cultura foi verificado ao término dos períodos de incubação através de fitas indicadoras de pH (Macherey-Nagel, Alemanha).

3.6.2 Biotransformação em escala ampliada

As biotransformações com fungos filamentosos selecionadas como mais promissoras foram realizadas em escala ampliada sob as mesmas condições dos processos em escala analítica, aumentando-se apenas o número de Erlenmeyers. Foram preparados 40 e 50 Erlenmeyers para o fungo *A. brasiliensis* e *C. echinulata*, respectivamente, a fim de se obter produtos em quantidades satisfatórias para isolamento.

3.6.3 Obtenção dos extratos de biotransformação

Após o período de biotransformação com os fungos filamentosos, os meios fermentativos foram filtrados a vácuo. Os filtrados obtidos foram submetidos à partição líquido-líquido com acetato de etila destilado, por três vezes consecutivas. Foram também obtidos extratos dos micélios das culturas, os quais foram submetidos à extração exaustiva com acetato de etila destilado. As frações orgânicas foram coletadas e concentradas em evaporador rotativo a vácuo (Fisatom, Brasil), a 40 °C.

3.6.4 Análise dos perfis químicos dos extratos de biotransformação

Os extratos das biotransformações foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em cromatógrafo Waters[®] com *Diode Array Detector* (DAD) acoplado ao detector *Charged Aerosol Detector* (Corona CAD, Thermo Fisher Scientific[®]). As injeções e condições cromatográficas foram monitoradas através do *software* Empower 3 (Waters[®]). Foi utilizada uma coluna de fase reversa C-18 Kromasil[®], AkzoNobel (250 x 4,6 mm, tamanho de partícula 5 µm) acoplada à coluna de guarda com mesma fase estacionária, com vazão de 1 mL/min a temperatura ambiente. A fase móvel foi constituída por gradiente de acetonitrila e 0,1 % de ácido acético em água (gradiente iniciando com 20 % de acetonitrila, atingindo 70 % de acetonitrila em 30 min, alcançando 100 % de solvente orgânico em 50 min, permanecendo até 60 min com 100 % de acetonitrila e retornando a 20 % de acetonitrila em 65 min, finalizando em 70 min nas condições iniciais).

3.6.5 Isolamento dos produtos de biotransformação

Dependendo da complexidade do perfil cromatográfico obtido para os extratos de biotransformação com fungos, os mesmos foram pré-fracionados através de um sistema a vácuo de extração em fase sólida (Visiprep-SPE, Supelco, EUA). Foi utilizado um cartucho contendo 1 g de sílica modificada C18 como fase estacionária. A fase móvel foi constituída por acetonitrila e água, variando-se de 100 % de água até 100 % de acetonitrila com proporção crescente de solvente orgânico de 10 em 10 %. O isolamento dos metabólitos das frações obtidas por SPE e dos extratos brutos foi realizado em cromatógrafo Waters[®] acoplado a bomba LC-6AD, sistema de controle CBM-20A, sistema de detecção UV com 2 comprimentos fixos SPD-20^a e *software* LC-Solutions (Waters[®]). Foram injetados de 3 a 10 mg das frações obtidas por SPE ou dos extratos brutos em coluna Kromasil[®] C18 semi-

preparativa (250 x 10 mm, tamanho de partícula 5 µm), acoplada à coluna de guarda com mesma fase estacionária. Os gradientes de eluição foram compostos por acetonitrila e 0,1 % de ácido acético em água, em diferentes proporções dependendo da amostra e com vazão de 3,7 mL/min, a temperatura ambiente. O solvente presente na fração das substâncias isoladas foi evaporado em aparelho evaporador centrífugo (*Speed-vacuum* Savant SPD2010), a 45 °C por 24 h ou mais, dependendo da amostra.

3.6.6 Identificação estrutural dos produtos de biotransformação com os fungos filamentosos

3.6.6.1 Análise por ressonância magnética nuclear (RMN)

Os dados de RMN dos diterpenos precursores e dos produtos isolados foram obtidos em espectrômetro Bruker® 400 ou 500 MHz, pertencentes à Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP-USP). Também foi utilizado um espectrômetro Bruker® 600 MHz, pertencente ao Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do Prof. Dr. Antônio Gilberto Ferreira do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). As amostras foram solubilizadas em solventes deuterados (CD₃OD ou CDCl₃) e preparadas em tubos 5 mm de diâmetro x 180 mm de comprimento, tubos Shigemi® específicos para CD₃OD ou tubos de 3 mm de diâmetro x 100 mm de comprimento, dependendo da quantidade de amostra que variou de 0,5 a 20 mg.

Foram obtidos os espectros de RMN de ¹H, bidimensionais, RMN de ¹³C quando possível e NOESY 1D, os quais foram processados em *software* MestReNova 11.0.1 (Mestrelab Research®).

3.6.6.2 Análise por espectrometria de massas de alta resolução (EMAR)

Para obtenção dos espectros de massas de alta resolução, os produtos isolados foram analisados por CLUE-EM em cromatógrafo modelo Accela 1250 acoplado a um espectrômetro de massas com analisador do tipo *Orbitrap* e ionização por eletrospray (Thermo Fisher Scientific®), pertencente ao laboratório do grupo de pesquisa AsterBioChem do Prof. Dr. Fernando Batista Da Costa. Foi utilizada uma coluna Phenomenex XB-C18, Kinetex® (150 x 2,1 mm, 1,7 µm) e fase móvel constituída por acetonitrila e água acidificadas com 0,1 % de ácido fórmico e vazão de 0,4 mL/min (gradiente iniciando com 30 % de

acetonitrila, atingindo 55 % de acetonitrila em 6 min, permanecendo até 9 min com 55 % de acetonitrila e atingindo 100 % de solvente orgânico em 15 min).

No modo positivo, a voltagem do *spray* utilizada foi igual a 3,6 kV e a solução calibrante constituída de cafeína (2 µg/mL), MRFA (1 µg/mL), mistura Ultramark 1621 (0,001 %) e *n*-butilamina (0,0005 %) em solução aquosa de acetonitrila (50 %), metanol (25 %) e ácido acético (1 %). No modo negativo, foi utilizada voltagem do *spray* igual a 3,2 kV e solução calibrante constituída de dodecilsulfato de sódio (2,9 µg/mL), taurocolato de sódio (5,4 µg/mL) e mistura Ultramark 1621 (0,001 %) em solução aquosa de acetonitrila (50 %), metanol (25 %) e ácido acético (1 %).

A energia de colisão selecionada foi 35 e 45 kV e as análises foram realizadas em triplicata. Os espectros de massas de alta resolução foram processados em software Thermo Xcalibur 2.2 (Thermo Fisher Scientific[®], EUA).

3.7 Processos realizados com os micro-organismos do trato gastrointestinal

3.7.1 Biotransformação em escala analítica em meio de cultura líquido

3.7.1.1 Bactérias anaeróbias

As culturas probióticas anaeróbias foram ativadas em caldo DeMan-Rogosa-Sharpe (MRS, Acumedia, EUA) suplementado com L- cisteína/HCl 0,05 % (v/v, Synth, Brasil) sendo posteriormente incubadas a 37°C em câmara de anaerobiose (Don Whitley Scientific, Inglaterra) com atmosfera de 85 % de nitrogênio, 10 % de dióxido de carbono e 5 % de gás hidrogênio. As bactérias reativadas em caldo foram semeadas em placas de ágar MRS e incubadas sob as mesmas condições durante 48 ou 72 h. Posteriormente, as colônias crescidas no ágar foram utilizadas para obtenção de um inóculo aproximado de $1,2 \times 10^9$ UFC/mL, o qual foi transferido para 30 mL de caldo MRS suplementado com L- cisteína/HCl 0,05 % (v/v) e 2 % (p/v) de inulina (Siba Ingredientes, Brasil). As culturas foram incubadas em câmara de anaerobiose, a 37°C durante 36 h para atingirem a fase estacionária. Após este período, os substratos foram adicionados em concentração final de 0,1 mg/mL para as biotransformações, que foram conduzidas por períodos de 12 e 24 h. Os valores de pH dos meios de cultura foram verificados ao término dos períodos de incubação através de fitas indicadoras de pH (Macherey-Nagel, Alemanha) ou através de pHmetro digital (Digimed, Brasil).

Alternativamente, também foram realizadas biotransformações em meio de cultura Gifu Anaerobic Broth (GAM, Himedia, Índia) com inóculo aproximado de 3×10^9 UFC/mL e concentração final dos diterpenos igual a 0,2 mg/mL.

3.7.1.2 *Bactérias microaerófilas e aeróbias*

As culturas probióticas foram ativadas em caldo MRS e as culturas de *E. coli* em caldo Mueller Hinton (MH, Himedia, Índia). As bactérias foram incubadas em estufa bacteriológica (Fanem, Brasil) ou em jarras de microaerofilia por 24 h a 37 °C. Após este período, os microorganismos foram semeados em placas de ágar MRS ou MH e incubados sob as mesmas condições durante 48 h. Posteriormente, as colônias crescidas no ágar foram utilizadas para obtenção de um inóculo aproximado de 3×10^9 UFC/mL, o qual foi transferido para 30 mL de caldo MRS suplementado com inulina 2 % (p/v) para as bactérias probióticas e caldo MH suplementado com solução de microelementos para a bactéria *E.coli*. As culturas foram incubadas em estufa a 37 °C durante 12 h para atingirem a fase estacionária. Após este período, os substratos foram adicionados em concentração final de 0,1 mg/mL para as biotransformações, as quais foram conduzidas por períodos de 24, 48 e 72 h. Os valores de pH dos meios de cultura foram verificados ao término dos períodos de incubação através de fitas indicadoras de pH (Macherey-Nagel, Alemanha).

3.7.1.3 *Levedura S. boulardii*

Para a levedura *S. boulardii*, um inóculo liofilizado de $0,5 \times 10^9$ células foi transferido a 100 mL de meio de cultura de reativação (Muller et al., 2007). A mistura foi incubada a 30°C sob agitação de 200 rpm. Após 12 h de incubação, 3 mL do inóculo do meio de reativação foram transferidos para Erlenmeyers contendo 30 mL de meio líquido Yeast Extract Peptone Dextrose (YPD) preparado com 1 % (p/v) de extrato de levedura (Himedia, Índia), 2 % (p/v) de peptona bacteriológica (Himedia, Índia) e 2 % (p/v) de glucose (Vetec, Brasil). Os substratos foram adicionados na concentração final de 1 mg/mL para as biotransformações, as quais foram conduzidas por períodos de 24, 48 e 72 h a 30°C. Os valores de pH dos meios de cultura foram verificados ao término dos períodos de incubação através de fitas indicadoras de pH (Macherey-Nagel, Alemanha).

3.7.2 Biotransformação em escala analítica em meio de cultura sólido

A fim de aumentar o rendimento das biotransformações em meio líquido, os micro-organismos *E. coli* e *S. boulardii* foram selecionados para uma triagem de biotransformações em meio sólido. Para tal, os micro-organismos foram reativados conforme método previamente descrito. O inóculo padronizado sob as mesmas condições das biotransformações em meio de cultura líquido foi adicionado a Erlenmeyers contendo 30 mL de meio MH ou YPD ágar para *E. coli* e *S. boulardii*, respectivamente. A mistura foi homogeneizada e vertida sob uma placa de Petri (90 x 15 mm) contendo os substratos para as biotransformações em concentração final 0,1 mg/mL. As placas foram homogeneizadas e, após a solidificação do ágar, incubadas a 30 ou 37 °C por períodos de 24, 48 e 72 h.

3.7.3 Obtenção dos extratos de biotransformação

Após o período de incubação das biotransformações em meio líquido, o conteúdo dos Erlenmeyers foi centrifugado (3.000 g, 5min, 15 °C) e os sobrenadantes obtidos foram submetidos à partição líquido-líquido com acetato de etila destilado. O procedimento de partição foi realizado por três vezes consecutivas para obtenção dos extratos. Após o término dos períodos de biotransformação em meio sólido, o ágar foi picotado com o auxílio de uma espátula e transferido para Erlenmeyers contendo acetato de etila. A mistura foi sonicada em ultrassom durante 15 min. O processo de extração foi realizado três vezes com renovação de solvente e posteriormente o mesmo procedimento foi realizado com metanol. As frações orgânicas em acetato de etila e metanol foram concentradas em evaporador rotativo à vácuo (Fisatom, Brasil), a temperatura aproximada de ± 40 °C.

3.7.4 Análise dos perfis químicos dos extratos de biotransformação

Os extratos das biotransformações com os micro-organismos do trato gastrointestinal foram analisados conforme descrito previamente na seção 3.6.4.

3.7.5 Identificação estrutural dos produtos de biotransformação com os micro-organismos do trato gastrointestinal

Os extratos foram analisados por CLUE-EM em equipamento Acquity UPLC H-Class (Waters[®], EUA) acoplado a um espectrômetro de massas tandem quadrupolo Xevo TQ-S

(Waters[®], EUA) com fonte de ionização por eletrospray, pertencente ao Laboratório de Espectrometria de Massas do Prof. Dr. Luiz Alberto Beraldo de Moraes do Departamento de Química da FFCLRP-USP.

A separação cromatográfica foi realizada em coluna Ascentis Express C18, Supelco[®] (100 x 4,6 mm, 2,7 μ m). A fase móvel foi constituída de 30 % de água contendo 0,1 % de acetato de amônio e 70 % de acetonitrila (eluição isocrática, vazão de 0,5 mL/min, 30 min). Os espectros de massa foram processados em software MassLynx V.4.1 (Waters[®], EUA).

As análises foram realizadas em modo negativo e inicialmente monitoradas em modo *full scan* para comparação dos íons presentes nos controles com os íons presentes nos extratos de biotransformação. Os sinais desejados foram selecionados para dissociação induzida por colisão (CID) com gás argônio, no modo *product ion scan*. As energias de colisão foram otimizadas para cada íon precursor de interesse ($[M - H]^-$), variando de 10 a 50 eV. As estruturas químicas dos produtos de biotransformação foram propostas através da massa nominal obtida e da comparação dos espectros de íons produtos dos precursores com os espectros de íons produtos dos metabólitos.

3.8 Biotransformações dos ácidos *ent*-poliáltico e *ent*-diidroagático por microsomas hepáticos

Os estudos de metabolismo *in vitro* dos diterpenos por microsomas hepáticos foi realizado no Instituto de Química e Farmácia da Universidade de Regensburg, na Alemanha, sob supervisão do Prof. Dr. Jörg Heilmann e da Profa. Dra. Birgit Kraus.

3.8.1 *Microsomas hepáticos humanos*

Foi utilizado um *pool* de microsomas hepáticos humanos 20 mg/mL (Gibco[®]) proveniente de 50 adultos doadores do sexo masculino e feminino.

3.8.2 *Reagentes e soluções*

Os estudos de metabolismo foram realizados em tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 7,4 ou tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7,4. Foram mantidas soluções estoque em tampão fosfato de potássio de 110 mM de glucose-6-fosfato (G-6-P, Sigma, EUA), 110 mM de cloreto de

magnésio hexaidratado (MgCl_2 , Merck, Alemanha), 43 mM de fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NADP, Sigma, EUA) e 40 mM de ácido uridina 5-difosfato do ácido glucurônico (UDPGA, Sigma, EUA). A enzima glucose-6-fosfato desidrogenase (G-6-P-DH, Sigma, EUA) foi dissolvida em solução aquosa de citrato de sódio 5 mM a uma concentração de 40 U/mL. O peptídeo alameticina (Sigma, Israel) foi utilizado como formador de poro e estocado em concentração de 0,5 mg/mL em metanol 2 % (v/v) em água. Soluções estoque de 100 mM de 7-etoxicumarina (7-ETC, utilizada como controle positivo) foram preparadas em metanol e estocadas a 4 °C. Os demais reagentes bioquímicos descritos foram estocados em alíquotas a -20 °C.

3.8.3 *Metabolismo microsomal em escala analítica*

Os sistemas de incubação microsomal foram estabelecidos de acordo com método padronizado (ZENGER et al., 2015). Para as reações metabólicas de fase I, foi utilizado um sistema de regeneração do NADPH consistindo em 3,3 mM de MgCl_2 , 3,3 mM de G-6-P, 0,4 U/mL de G-6-P-DH e 1,3 mM de NADP. Para as reações metabólicas de fase II, foram adicionados 2 mM de UDPGA para ativação das enzimas UDP-glucuroniltransferases (UGTs), juntamente com a adição de 25 $\mu\text{g/mL}$ de alameticina para facilitar o acesso do substrato ao sítio ativo das UGTs. Os reagentes foram mantidos em banho de gelo durante todo o experimento e as quantidades necessárias para cada sistema de incubação foram pipetadas em um tubo *Eppendorf*[®]. Os microsomas foram adicionados aos sistemas, os quais foram cuidadosamente homogeneizados e mantidos em banho-maria a 37 °C por 5 min.

Posteriormente, foram adicionados os diterpenos ou o controle positivo 7-ETC em concentração final de 10 μM . As reações foram iniciadas com a adição de NADP e/ou UDPGA e os tubos foram mantidos em banho-maria a 37 °C. As reações metabólicas foram interrompidas após 1, 2, 3 ou 24 h com a adição de ácido clorídrico gelado 5 % em água (v/v). As amostras foram homogeneizadas vigorosamente por 5 min e centrifugadas a 2.700 g por 10 min. O sobrenadante foi coletado para as análises do perfil químico e o precipitado descartado. Os controles negativos apropriados foram realizados sem os microsomas e sem os cofatores a fim de se evitar falsas conclusões devido a reações inespecíficas. Adicionalmente, também foi realizado o teste de estabilidade dos diterpenos e do controle positivo 7-ETC no sistema tampão sem os microsomas.

3.8.4 Análise dos extratos de biotransformação microssomais

3.8.4.1 Análise dos extratos de biotransformação da 7-etoxicumarina

Os extratos das biotransformações com o controle positivo foram analisados em cromatógrafo Waters[®] acoplado ao detector DAD. Foi utilizada uma coluna de fase reversa C-18 Hibar[®] (250 x 4,0 mm, 5 µm, Purosphere) com vazão de 0,8 mL/min a 40°C. A fase móvel orgânica foi constituída por 95 % de acetonitrila em água e a fase aquosa por 0,1 % de ácido fórmico em água (gradiente iniciando com 10 % de fase orgânica, atingindo 60 % de fase orgânica em 20 min, permanecendo até 22 min com 60 % de fase orgânica, retornando para 10 % de solvente orgânico em 25 min e permanecendo nessas condições até 30 min). Os cromatogramas foram obtidos em comprimento de onda 320 nm.

3.8.4.2 Análise dos extratos de biotransformação dos diterpenos

Inicialmente, os extratos das biotransformações com os diterpenos foram analisados por CLAE em cromatógrafo Waters[®] acoplado ao detector DAD. Foi utilizada uma coluna de fase reversa C-18 Hibar[®] (250 x 4,0 mm, 5 µm, Purosphere) com vazão de 0,8 mL/min a 40°C. A fase móvel foi constituída por acetonitrila e 0,1 % de ácido acético em água (gradiente iniciando com 20 % de acetonitrila, atingindo 70 % de acetonitrila em 30 min, atingindo 100 % de solvente orgânico em 35 min, permanecendo até 37 min com 100 % de acetonitrila, retornando para 20 % de solvente orgânico em 40 min e permanecendo nas condições iniciais até 45 min). Os cromatogramas foram obtidos em comprimento de onda 200 nm.

Devido à baixa concentração e detecção dos diterpenoides na amostra, algumas adaptações foram empregadas. Assim, realizou-se a limpeza e concentração dos extratos em solvente orgânico. Para tal, as amostras foram preparadas em um sistema a vácuo de extração em fase sólida, utilizando-se cartuchos Oasis HLB 200 mg e 30 µm (Waters[®]). As amostras foram aplicadas e em seguidas lavadas com água 100 %, seguido por água 80 % e acetonitrila 20 %. A eluição das amostras foi realizada com 3 mL de metanol, sendo posteriormente concentradas sob fluxo de nitrogênio.

A fim de melhorar a detecção dos diterpenoides, os perfis dos extratos concentrados foram analisados por CLAE em cromatógrafo VWR/Hitachi[®] acoplado ao detector *Evaporating Light Scattering Dectector* (VWR ELSD 85). Os parâmetros do detector foram ajustados para: temperatura igual a 40 °C, ganho e filtro iguais a 6 e pressão igual a 3,5 bar.

Foi utilizada uma coluna de fase reversa C-18 Hibar[®] (250 x 4,0 mm, 5 µm, Purosphere) com vazão de 0,8 mL/min a 25°C. O gradiente utilizado foi o mesmo descrito na seção 3.6.4.

3.8.5 *Metabolismo microsomal em escala preparativa*

A fim de concentrar as amostras, os experimentos com microsomas hepáticos humanos foram realizados sob as mesmas condições dos experimentos em escala analítica. No entanto, sete tubos *Eppendorf* foram incubados por 24 h e posteriormente reunidos em um único tubo *Eppendorf* para o metabolismo de fase I e fase II

3.8.6 *Identificação estrutural dos produtos de biotransformação com microsomas hepáticos humanos*

3.8.6.1 *Análise por espectrometria de massas de alta resolução*

Os extratos microsomais foram analisados por CLUE-EMAR em cromatógrafo Agilent[®] 1290 Infinity acoplado a um espectrômetro de massas MS Agilent[®] 6540 UHD, com analisador Q-TOF e ionização por eletrospray nos modos positivo e negativo. Foi utilizada uma coluna C18 Phenomenex Luna Omega (50 x 2,1 mm, 1,6 µm) e fase móvel constituída por acetonitrila e água, ambas acidificadas com 0,1 % de ácido fórmico. A vazão empregada foi de 0,4 mL/min. O gradiente utilizado variou de 20 a 70 % de acetonitrila de 0 a 8 min, atingindo 98 % de acetonitrila em 9 min, permanecendo nesta proporção até 10 min e retornando a 20 % de acetonitrila em 10,10 min e permanecendo nas condições iniciais até 11,5 min.

3.9 *Análise da rotação específica dos precursores e metabólitos de biotransformação*

A rotação específica $[\alpha]_D$ do AP, ADA e de seus derivados de biotransformação foram determinadas em polarímetro (Jasco P-2000, número de série A104161232, Japão), a temperatura de 25 °C e comprimento de onda 589 nm. As amostras foram solubilizadas em metanol e as medidas foram realizadas em triplicata.

3.10 Avaliação da atividade citotóxica dos precursores e dos metabólitos de biotransformação

3.10.1 Avaliação da citotoxicidade pelo método do MTT

A atividade citotóxica *in vitro* dos diterpenos e seus derivados foi avaliada através do ensaio colorimétrico do sal de tetrazólio MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio). O MTT é um composto amarelo solúvel em água que pode ser convertido pelas enzimas oxirredutases dependentes de NAD(P)H das células viáveis, originando o sal de formazan azul, que é insolúvel em água. Assim, a quantidade de formazan formada é proporcional ao número de células viáveis e pode ser indicativa da proliferação celular.

3.10.1.1 Linhagens celulares utilizadas

Foram utilizadas as linhagens celulares de adenocarcinoma de cólon humano (Caco-2) e células isoladas de carcinoma cervical humano (HeLa), cedidas pela Universidade de Munique, Alemanha.

3.10.1.2 Condições de cultivo celular

A manipulação das linhagens celulares foi realizada em capela de fluxo laminar (Thermo Fisher Scientific). As células foram cultivadas em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, Gibco, Inglaterra) suplementado com 10% de soro bovino fetal (Gibco, Inglaterra) e mantidas em incubadora (Integra Biosciences) a 37°C, com fluxo de 95% de oxigênio e 5% de gás carbônico. Para as células da linhagem Caco-2, o meio de cultura também foi suplementado com 1 % de solução de aminoácidos essenciais (Biochrom, Alemanha).

3.10.1.3 Ensaio do MTT

Após as células atingirem de 80 a 90 % de confluência, o meio de cultura foi cuidadosamente aspirado com auxílio de uma pipeta de vidro esterilizada e foi adicionada solução salina *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline Modified* (PBS, Sigma, Inglaterra). A solução foi aspirada com auxílio de pipeta seguida pela adição de solução de tripsina 0,05%

em PBS. As células foram mantidas em contato com a tripsina durante 3 min em incubadora a 37°C.

Após esse procedimento, as células inicialmente aderidas às paredes das garrafas de cultura foram liberadas na solução de tripsina. Foi adicionado o mesmo volume de meio DMEM e a suspensão foi centrifugada por 5 min, a 2000g e 21 °C. O sobrenadante foi removido e foi adicionado meio DMEM ao precipitado celular, o qual foi utilizado para a padronização do inóculo.

Uma alíquota da suspensão celular foi retirada e diluída 1:1 em meio DMEM, no qual foi acrescentado 10 µL de *Tripan Blue* (Sigma, EUA). As células foram contadas em microscópio óptico (Olympus) com o auxílio de câmera de Neubauer.

Um inóculo preparado em meio de cultura correspondente a 8×10^4 células/mL para a linhagem HepG2 e 3×10^5 células/mL para a linhagem Caco-2 foi transferido às microplacas de 96 cavidades. As células foram incubadas por 24 h a 37°C, em atmosfera de 95 % de oxigênio e 5 % de gás carbônico.

Após este período, os diterpenos precursores e seus derivados de biotransformação foram adicionados na faixa de concentrações de 2 a 2.000 µM. Os controles apropriados do solvente DMSO (Fisher Chemical, Inglaterra) utilizado para solubilizar os diterpenoides e o controle do crescimento celular (controle negativo) também foram realizados. As células foram incubadas por 24 h em contato com as amostras.

Posteriormente, o meio de cultura foi cuidadosamente removido de cada cavidade e uma solução de MTT (Sigma, EUA) 4 mg/mL preparada em PBS foi diluída 1:10 no meio de cultura e adicionada às microplacas. Após 3 h em incubadora a 37°C, o sobrenadante foi removido e 100 µL de SDS 10% em água foram adicionados.

As microplacas foram protegidas da luz e incubadas *overnight* a temperatura ambiente. A absorvância foi determinada em espectrofotômetro de microplacas (Spectra Fluor Plus, Crailsheim, Alemanha), em comprimento de onda igual a 560 nm.

Os ensaios foram realizados em triplicatas independentes e os cálculos de IC₅₀ e elaboração dos gráficos de viabilidade celular foram realizados com o auxílio do *software* GraphPad Prism (5.01).

3.10.2 Avaliação da citotoxicidade pelo método do XTT

Os ensaios de XTT foram feitos em parceria com a Profa. Dra. Raquel Alves dos Santos do Laboratório de Genética e Biologia Molecular da Universidade de Franca (UNIFRAN).

O XTT (2,3-Bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida) é um corante tetrazólio de segunda geração de coloração ligeiramente amarela a incolor. Quando reduzido pelas enzimas das células metabolicamente ativas, forma-se um produto formazan alaranjado solúvel em água, que é proporcional ao número de células viáveis. O ensaio do XTT é um método efetivo para avaliar o crescimento celular.

3.10.2.1 Linhagens celulares utilizadas

Foram utilizadas linhagens de células humanas tumorais de adenocarcinoma mamário (MCF-7) e células normais de epitélio mamário (MCF-10A), provenientes do Banco de Células do Rio de Janeiro.

3.10.2.2 Condições de cultivo celular

As células foram cultivadas em meio de cultura composto por meio Ham's F10 e DMEM (1:1, v/v, Sigma, EUA) suplementado com 10 % de soro bovino fetal (Gibco). As células foram mantidas em incubadora a 37°C, com fluxo de 95 % de oxigênio e 5 % de gás carbônico.

3.10.2.3 Ensaio do XTT

Inicialmente, um inóculo de 1×10^4 células foi transferido a placas de 96 cavidades e mantido em incubadora de CO₂ a 37°C por 24 h. Após esse período, foram adicionados os diterpenos precursores e os derivados de biotransformação na faixa de concentrações de 20 a 2.000 μ M. Os controles do solvente DMSO 0,1 % utilizado para solubilizar as amostras e o controle positivo (10 % de DMSO) foram devidamente realizados. Após 24 horas de exposição, as células foram lavadas com solução PBS (Sigma, EUA) e posteriormente adicionou-se meio DMEM sem vermelho de fenol (Sigma, EUA) acrescido da solução XTT/elétron segundo as instruções do *Cell Proliferation Kit* (Roche). Após 4 h de incubação,

foi realizada a leitura colorimétrica em espectrofotômetro (ASYS, Áustria), em comprimento de onda igual a 450 nm e 620 nm de referência. Os ensaios foram realizados em triplicata e a proporção de células viáveis foi determinada em relação ao controle negativo considerado como 100 % de proliferação celular. O cálculo da IC_{50} foi realizado com auxílio do *software* GraphPad Prism 5.0.

3.11 Esquema geral das etapas do projeto

A seguir (Figura 12) está apresentado um fluxograma resumido das etapas desenvolvidas neste estudo.

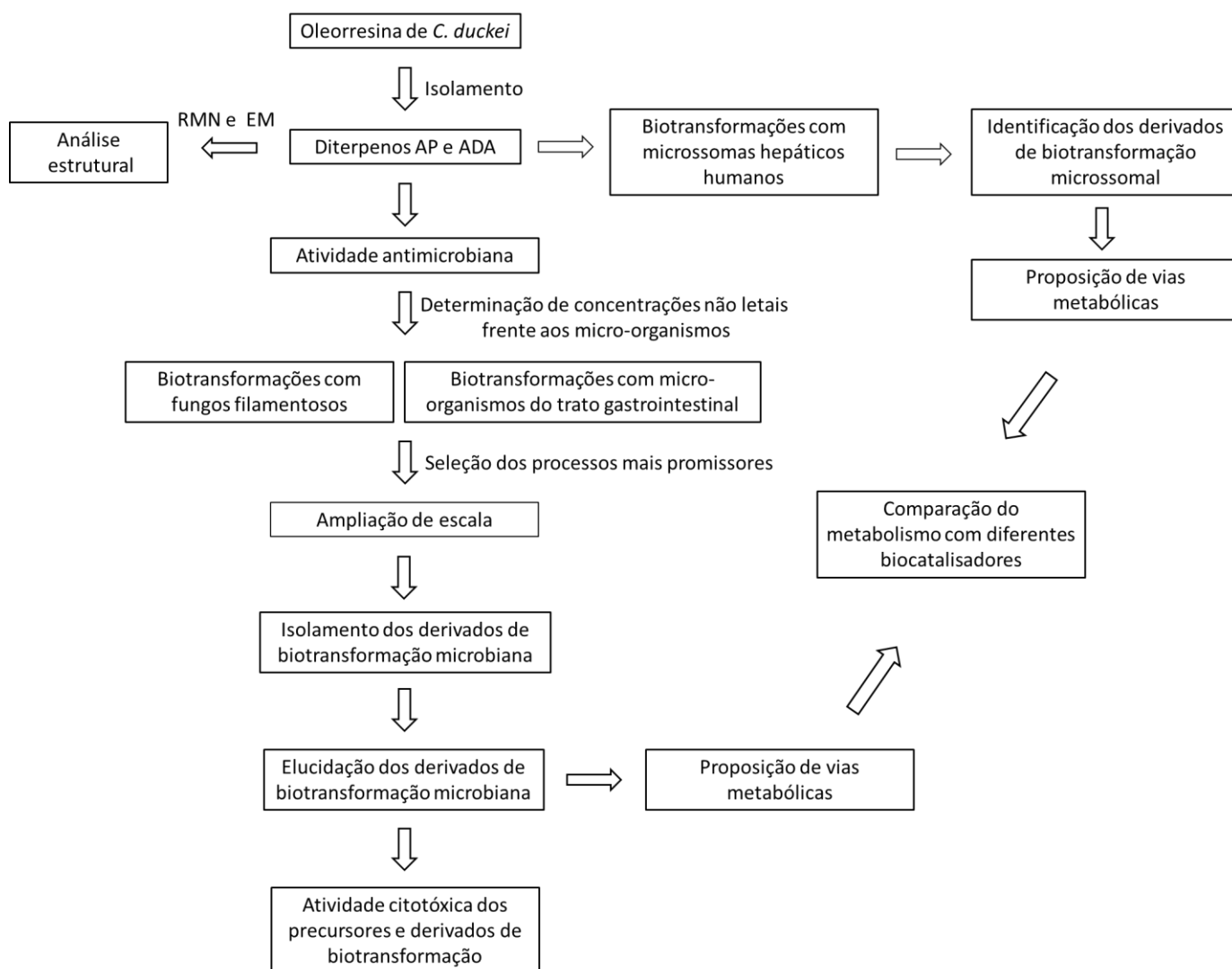


Figura 12. Esquema geral das etapas desenvolvidas na pesquisa.

Resultados e discussão

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análises dos diterpenos precursores ácidos *ent*-poliáltico e *ent*-diidroagático

Os diterpenos apresentam-se na forma de cristais brancos e inodoros a temperatura ambiente. As substâncias isoladas da oleorresina de *C. duckei* foram analisadas por CLAE-DAD-CAD. Os cromatogramas obtidos e os espectros de absorção no ultravioleta dos diterpenos estão apresentados na Figura 13.

O tempo de retenção do AP no gradiente utilizado foi de 39,7 min e o mesmo apresentou máximo de absorção no UV em comprimento de onda próximo a 210 nm. Por sua vez, o ADA apresentou tempo de retenção de 30,8 min e máximo de absorção no UV em comprimento de onda próximo a 204 nm.

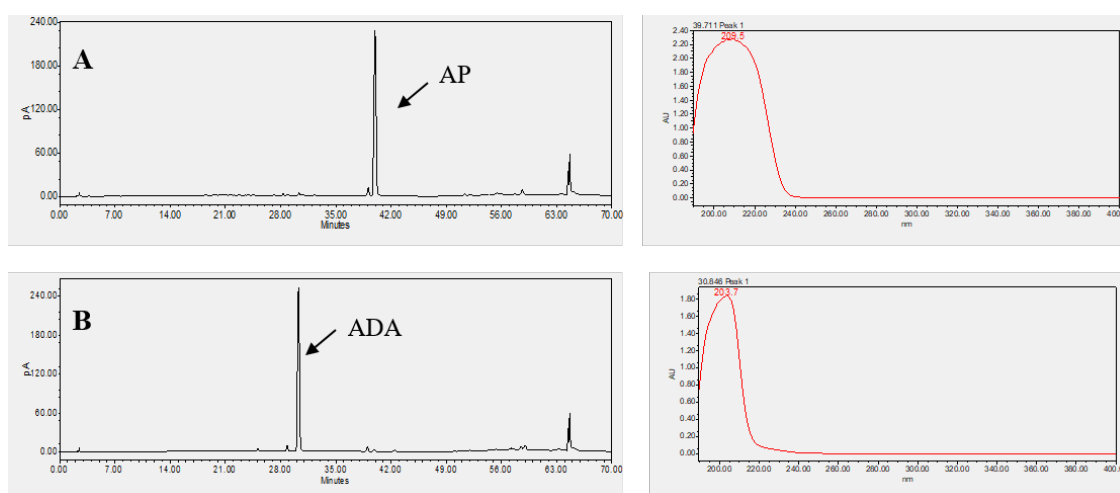


Figura 13. Cromatogramas obtidos por CLAE-CAD e espectros de absorção no UV do **A)** ácido *ent*-poliáltico (UV $\lambda_{\max} = 210$ nm) e **B)** ácido *ent*-diidroagático (UV $\lambda_{\max} 203$ nm) isolados da oleorresina de *C. duckei*. Condições cromatográficas: Cromatógrafo Waters, Coluna de fase reversa C-18 Kromasil[®], fase móvel constituída por gradiente de acetonitrila e 0,1% de ácido acético em água (20-100% fase orgânica em 60 min), vazão de 1 mL/min, volume de injeção 30 μ L, análise à temperatura ambiente.

Os valores de rotação específica determinados para o AP e o ADA foram iguais a $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$: - 40,41 (c 1,00; CH₃OH) e $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$: - 33,32 (c 1,04; CH₃OH), respectivamente.

Foram obtidos os espectros de RMN de ¹H, ¹³C e bidimensionais e os espectros de massas e íons produtos (Apêndices 1 e 2) de ambos os diterpenos. O estudo dos dados espectroscópicos e espectrométricos dos precursores é de grande importância para o entendimento das possíveis modificações que venham ocorrer no material de partida através das biotransformações e será detalhado a seguir.

4.1.1 Análise dos dados espectroscópicos do precursor AP

O espectro de RMN de ^1H do AP (Apêndice 1.1) apresenta dois sinais tipo simpleto (s) em δ_{H} 0,72 e 1,15, correspondentes aos hidrogênios metílicos ligados aos carbonos C-20 (δ_{C} 14,9) e C-19 (δ_{C} 16,4), respectivamente, sendo o último sinal mais desblindado devido à maior proximidade ao grupo carboxílico da posição 18.

Os simpletos largos em δ_{H} 4,59 e 4,88 podem ser atribuídos aos hidrogênios vinílicos exocíclicos da posição 17, os quais estão ligados ao mesmo carbono em δ_{C} 107,2, que faz uma ligação dupla com C-8 (δ_{C} 147,8).

Outros sinais em evidência no espectro de RMN de ^1H do AP são os hidrogênios em δ_{H} 7,20 (H-16) e 7,35 (H-15) (correspondentes aos hidrogênios em α do anel furano) e δ_{H} 6,26 (H-14) (correspondente ao hidrogênio em β do mesmo anel).

A região do espectro entre 1,30 e 2,60 ppm apresenta grande quantidade de sinais correspondentes aos demais hidrogênios do núcleo diterpênico e da cadeia lateral, sendo que muitos dos sinais apresentam deslocamentos próximos ou sobrepostos no espectro, dificultando a determinação dos mesmos. Os sinais em δ_{H} 2,25 e em 2,56 correspondentes aos hidrogênios diastereotópicos ligados à C-12 (δ_{C} 24,1) foram atribuídos através dos dados do espectro de RMN de ^1H e também através da observação do mapa de contornos HMQC. O mesmo ocorreu para o sinal em δ_{H} 2,06, correspondente ao hidrogênio ligado à C-7 (δ_{C} 37,9) e para o sinal em δ_{H} 1,94, correspondente ao hidrogênio ligado à C-5 (δ_{C} 49,6). Por outro lado, devido à sobreposição de sinais observada no espectro de RMN de ^1H , para outros sinais foi possível atribuir apenas os deslocamentos químicos utilizando o mapa de contornos HMQC. Assim, em δ_{H} 1,73 foi possível observar o sinal correspondente ao hidrogênio do grupo metínico em C-9 (δ_{C} 56,1) e em δ_{H} 1,56 o sinal correspondente aos hidrogênios ligados à C-2 (δ_{C} 18,5).

No espectro de RMN de ^{13}C do AP (Apêndice 1.2), o sinal mais desblindado em δ_{C} 185,6 corresponde ao carbono carboxílico C-18, enquanto os sinais em δ_{C} 107,2 (C-17) e 147,8 (C-8) correspondem aos carbonos da ligação dupla exocíclica e os carbonos em 111,1 (C-14), 125,6 (C-13); 138,8 (C-16) e 142,8 (C-15) ppm correspondem aos quatro carbonos olefínicos do anel furano.

Os deslocamentos de carbono e as correlações encontradas no mapa de contornos HMBC, bem como as comparações dos dados obtidos com os dados da literatura para o AP

estão apresentados na Tabela 1. Os dados de hidrogênio e comparação com a literatura estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 1. Dados de RMN de ^{13}C do ácido *ent*-poliáltico e respectivas comparações com a literatura.

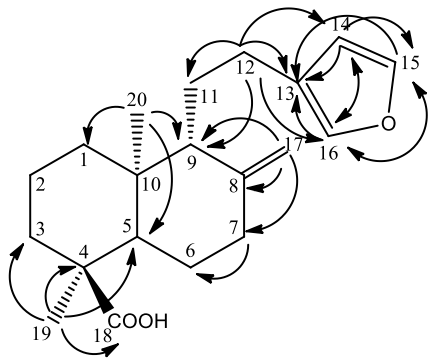
Estrutura química e correlações no HMBC		
 <p>Correlações selecionadas no HMBC (H → C)</p> <p>Fórmula molecular: $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_3$ m/z [M-H]⁻ acurada: 315,1959 m/z [M-H]⁻ exata: 315,1960 Δm: -0,32 ppm</p>		
Dados obtidos (CDCl_3)		CARRERAS, ROSSOMANDO & GIORDANO, 1998 (CDCl_3)
Posição	δ_{C} ppm 100 MHz	δ_{C} ppm 50,3 MHz
1	38,1	37,7
2	18,5	18,2
3	37,2	36,9
4	47,7	47,3
5	49,6	49,3
6	27,0	26,6
7	37,9	37,6
8	147,8	147,5
9	56,1	55,9
10	39,0	38,6
11	23,6	23,3
12	24,1	23,8
13	125,6	125,2
14	111,1	110,7
15	142,8	142,4
16	138,8	138,4
17	107,2	106,8
18	185,6	185,5
19	16,4	16,1
20	14,9	14,5

Tabela 2. Dados de RMN de ^1H do ácido *ent*-poliáltico e respectivas comparações com a literatura.

Posição	Dados obtidos (CDCl_3)	CARRERAS, ROSSOMANDO & GIORDANO, 1998 (CDCl_3)
	δ_{H} ppm, <i>mult.</i> , (<i>J</i> Hz), int. 400 MHz	δ_{H} ppm, <i>mult.</i> , (<i>J</i> Hz) 200,13 MHz
2	1,56 <i>nd</i> *	
5	1,94 <i>dd</i> (12,3; 2,9) 1H	
7	2,06 <i>td</i> (12,9; 5,3) 1H	
9	1,73 <i>nd</i> *	
12	2,25 <i>dt</i> (14,7; 8,3) 1H; 2,56 <i>m</i> 1H	
14	6,26 <i>sl</i> 1H	6,25 <i>dd</i> (1,6; 0,9)
15	7,35 <i>t</i> (1,6) 1H	7,34 <i>t</i> (1,6)
16	7,20 <i>sl</i> 1H	7,19 <i>sl</i>
17	4,59 <i>sl</i> 1H; 4,88 <i>sl</i> 1H	4,59 <i>sl</i> ; 4,87 <i>sl</i>
19	1,15 <i>s</i> 3H	1,15 <i>s</i>
20	0,72 <i>s</i> 3H	0,72 <i>s</i>

**nd*: desdobramento de sinal não definido devido à sobreposição de sinais, δ_{H} determinado pelo HMQC.

4.1.2 Análise dos dados espectroscópicos do precursor ADA

No espectro de RMN de ^1H do ADA (Apêndice 2.1) é possível observar dois sinais simples (*s*) em δ_{H} 0,70 e 1,14, os quais correspondem aos hidrogênios metílicos ligados à C-20 (δ_{C} 14,8) e C-19 (δ_{C} 16,4), respectivamente. O sinal em δ_{H} 0,98 é correspondente ao grupo metílico da posição 16 (δ_{C} 19,8), o qual se desdobra em um duplete (*d*) devido ao seu acoplamento com o hidrogênio em δ_{H} 1,92 ligado à C-13 (δ_{C} 30,8).

Os hidrogênios vinílicos da dupla exocíclica apresentam sinais em δ_{H} 4,50 e 4,82 (H-17a e H-17b). O sinal duplo duplete (*dd*) em δ_{H} 1,78 corresponde aos hidrogênios geminais ligados à C-3 (δ_{C} 37,2), enquanto os sinais em δ_{H} 2,04 e 2,34 correspondem aos hidrogênios ligados à C-7 (δ_{C} 38,0) e os sinais em δ_{H} 2,18 e 2,28 correspondem aos hidrogênios da posição 14 (δ_{C} 42,0).

Assim como para o AP, a região do espectro de ^1H do ADA entre aproximadamente 1,30 e 2,40 ppm apresenta grande número de sinais correspondentes aos demais hidrogênios da molécula, alguns dos quais estão discriminados na Tabela 4. Como esta região do espectro apresenta grande sobreposição de sinais, o desdobramento e integral de alguns hidrogênios não puderam ser atribuídos, no entanto, alguns deslocamentos foram confirmados através do mapa de contornos HMQC. Os sinais em δ_{H} 1,95, 1,67 e 1,92 correspondem aos hidrogênios dos grupos metílicos em C-5 (δ_{C} 49,6), C-9 (δ_{C} 56,9) e C-13 (δ_{C} 30,8), respectivamente. Os hidrogênios em δ_{H} 1,16 e 1,35 ligados à C-12 (δ_{C} 35,6) também foram identificados através do mapa de contornos HMQC.

No espectro de RMN de ^{13}C do ADA (Apêndice 2.2) podem ser observados os sinais mais desblindados em δ_{C} 180,1 e 185,8, os quais correspondem aos dois carbonos carboxílicos da molécula em C-15 e C-18 respectivamente. Os carbonos em δ_{C} 107,1 (C-17) e 148,1 (C-8) correspondem aos carbonos sp^2 da ligação dupla.

Os deslocamentos de carbono, as correlações encontradas no mapa de contornos HMBC, bem como as comparações dos dados obtidos com os dados da literatura para o ADA estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Dados de RMN de ^{13}C do ácido *ent*-diidroagático e respectivas comparações com a literatura.

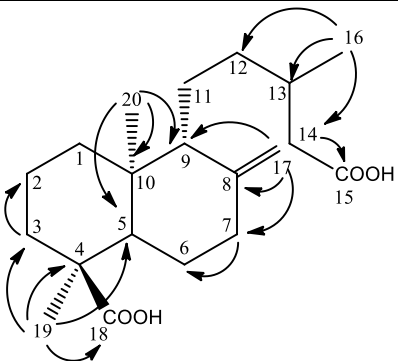
Estrutura química e correlações no HMBC		
 <p>Correlações selecionadas no HMBC (H → C)</p> <p>Fórmula molecular: $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}_4$ m/z $[\text{M}-\text{H}]^-$ acurada: 335,2220 m/z $[\text{M}-\text{H}]^-$ exata: 335,2222 Δm: -0,60 ppm</p>		
Dados obtidos (CDCl_3)		TENG et al., 2010 (CDCl_3)
Posição	δ_{C} ppm 100 MHz	δ_{C} ppm 75 MHz
1	38,1	37,9
2	18,6	18,5
3	37,2	37,1
4	47,7	47,5
5	49,6	49,5
6	27,0	26,8
7	38,0	37,8
8	148,1	148,0
9	56,9	57,0
10	39,0	39,0
11	20,8	20,8
12	35,6	35,6
13	30,8	31,1
14	42,0	41,2
15	180,1	179,2
16	19,8	19,9
17	107,1	107,0
18	185,8	185,1
19	16,4	16,3
20	14,8	14,7

Tabela 4. Dados de RMN de ^1H do ácido *ent*-diidroagático e respectivas comparações com a literatura.

Posição	Dados obtidos (CDCl_3)	TENG et al., 2010 (CDCl_3)
	δ_{H} ppm, mult., (J Hz), int. 400 MHz	δ_{H} ppm, mult., (J Hz) 300 MHz
3	1,78 <i>dd</i> (12,4; 5,4) 2H	
5	1,95 <i>nd*</i>	
7	2,04 <i>td</i> (12,8; 5,2) 1H; 2,34 <i>m</i> 1H	2,04 <i>m</i> 1H; 2,35 <i>m</i> 1H
9	1,67 <i>nd*</i>	
12	1,16 <i>nd*</i> ; 1,35 <i>nd*</i>	
13	1,92 <i>nd*</i>	
14	2,18 <i>m</i> 1H; 2,28 <i>m</i> 1H	
16	0,98 <i>d</i> (6,6) 3H	0,88 <i>d</i> (6,6) 3H
17	4,50 <i>s</i> 1H; 4,82 <i>s</i> 1H	4,52 <i>sl</i> 1H; 4,82 <i>sl</i> 1H
19	1,14 <i>s</i> 3H	1,15 <i>s</i> 3H
20	0,70 <i>s</i> 3H	0,71 <i>s</i> 3H

**nd*: desdobramento de sinal não definido devido à sobreposição de sinais, δ_{H} determinado pelo HMQC.

4.1.3 Análise dos dados espectrométricos dos precursores AP e ADA

Os diterpenos isolados também foram analisados por EMAR. A fim de confirmar a massa molecular dos precursores, seus espectros de massas de alta resolução foram analisados no modo positivo e negativo. Para ambos os diterpenos, a formação dos íons por ESI se deu através de reações de ácido-base (protonação e desprotonação). Para o AP, foram detectados os íons $[\text{M}-\text{H}]^-$ m/z 315,1959 no modo negativo (Apêndice 1.5A) e m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 317,2096 no modo positivo. Para o ADA, foram detectados os íons $[\text{M}-\text{H}]^-$ m/z 335,2220 (Apêndice 2.5A) e $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 337,2363 nos modos negativo e positivo, respectivamente. Assim, as massas moleculares do AP e ADA foram determinadas em 316,2039 u e 336,2300 u, respectivamente.

Também foram analisados os espectros de íons produtos dos precursores (Apêndices 1.5B e 2.5B). Ambos os diterpenos apresentaram baixa intensidade de fragmentação no espectro de íons produtos no modo negativo, mesmo com altas energias de colisão. No entanto, devido à alta fragmentação e complexidade dos espectros de íons produtos no modo positivo, foram selecionados os espectros no modo negativo para o estudo das vias de fragmentação.

Adicionalmente, há um estudo feito pelos pesquisadores do projeto temático sobre fragmentação de diterpenos do tipo labdano por ESI no modo negativo, incluindo o ácido *ent*-agático com estrutura semelhante ao ADA (AGUIAR et al., 2018). Os resultados deste estudo foram utilizados para a proposição de formação dos principais íons produtos encontrados nos espectros, conforme apresentado nas Figuras 14 e 15.

O sítio mais ácido para desprotonação das moléculas foi atribuído ao grupo carboxílico, pela melhor acomodação da carga negativa no átomo de oxigênio e possibilidade de deslocalização da mesma. O AP apresenta apenas um grupo ácido na posição 18, enquanto o ADA apresenta dois grupos carboxílicos e, portanto, a desprotonação pode ocorrer tanto no grupo carboxílico da posição 18 ou 15. No entanto, o sítio de ionização foi atribuído no grupo ácido da posição 18, conforme apresentado na Figura 15. Como no espectro de íons produtos do ADA (Apêndice 2.5) há o íon m/z 317, o qual é formado pela perda de água do precursor m/z 335 (Figura 15), concluiu-se que caso a ionização ocorresse no grupo carboxílico da posição 15, esta desidratação e consequente formação do íon m/z 317 não ocorreria, uma vez que não há hidrogênio vizinho nesta posição para a perda da molécula de água.

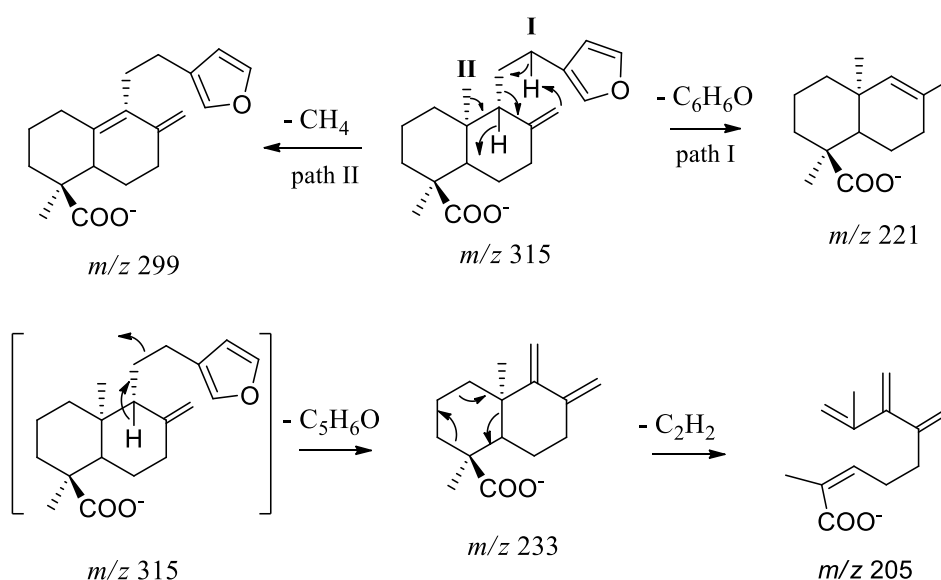


Figura 14. Fragmentação proposta para a formação dos íons produtos de m/z 221, m/z 299 e m/z 205 derivados de $[M-H]^-$ m/z 315 (ácido *ent*-poliáltico).

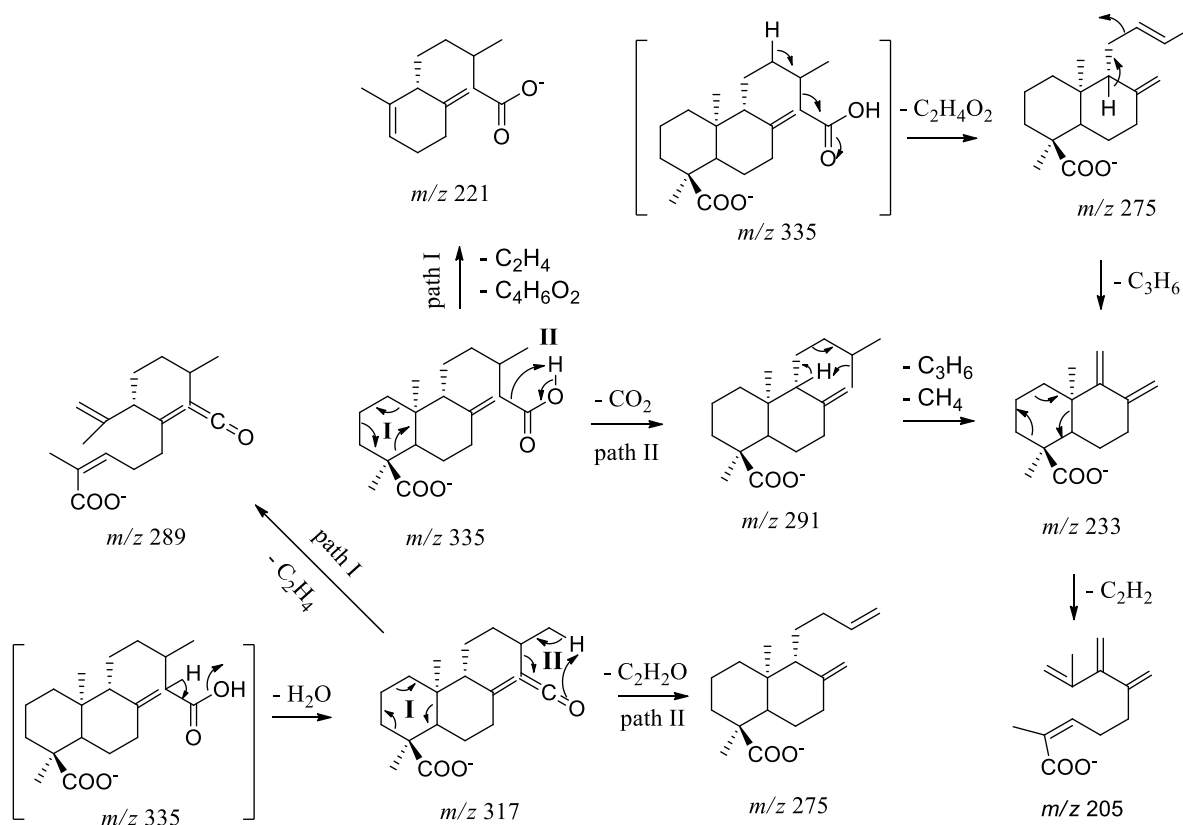


Figura 15. Fragmentação proposta para a formação dos íons produtos de m/z 317, m/z 289, m/z 275, m/z 233, m/z 221 e m/z 205 derivados de $[M-H]^-$ m/z 335 (ácido *ent*-diidroagático).

O íon de m/z 205 é o pico base tanto no espectro do AP quanto do ADA (Apêndices 1.5 e 2.5). Como pode ser observado nas Figuras 14 e 15, foi proposta a mesma estrutura deste íon fragmento para ambos os diterpenos.

Os mecanismos propostos para a formação da maioria dos íons envolvem fragmentações com retenção de carga, como rearranjos de hidrogênio remoto, ciclorreversões e retro-heteroeno, as quais são reações comuns em íons elétron-pares (DEMARQUE et al., 2016).

O estudo dos pesquisadores do projeto temático apontou os íons de m/z 287, m/z 273 e m/z 233 como íons diagnósticos para o ácido *ent*-agático, o qual difere do ADA apenas pela ausência da insaturação entre os carbonos C-13 e C-14. O íon de m/z 233 também aparece no espectro do ADA, e sugere-se que os íons de m/z 287 e 273 do espectro do *ent*-ácido agático são correspondentes aos íons de m/z 289 e 275 do espectro do ADA, sendo formados pelas mesmas vias.

A análise dos dados espectroscópicos e espectrométricos obtidos confirmam a pureza e identidade dos diterpenos AP e ADA isolados da oleorresina de *C. duckei*.

4.2 Determinação da concentração inibitória mínima dos ácidos *ent*-poliáltico e *ent*-diidroagático frente aos micro-organismos utilizados nos ensaios de biotransformação

O ensaio de microdiluição em microplacas para determinação dos valores de CIM foi realizado a fim de investigar os possíveis efeitos inibitórios dos diterpenos sobre os micro-organismos utilizados nos processos de biotransformação.

Nas Tabelas 5 e 6 estão apresentados os resultados obtidos para os fungos filamentosos e os micro-organismos do trato gastrointestinal, respectivamente.

Tabela 5. Valores de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) dos diterpenos ácido *ent*-poliáltico (AP), ácido *ent*-diidroagático (ADA) e do controle miconazol sobre os fungos filamentosos.

<i>Micro-organismo</i>	<i>AP</i>		<i>ADA</i>		<i>Controle positivo*</i>	
	CIM (µg/mL)	CFM (µg/mL)	CIM (µg/mL)	CFM (µg/mL)	CIM (µg/mL)	CFM (µg/mL)
<i>M. rouxii</i>	>400	>400	>400	>400	1,56	1,56
<i>C. elegans</i>	>400	>400	>400	>400	12,5	50
<i>C. echinulata</i>	>400	>400	>400	>400	12,5	50
<i>A. brasiliensis</i>	>400	>400	>400	>400	6,25	50

*: controle positivo = miconazol.

Tabela 6. Valores de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) dos diterpenos ácido *ent*-poliáltico (AP), ácido *ent*-diidroagático (ADA) e do controle positivo sobre os micro-organismos do trato gastrointestinal.

<i>Micro-organismo</i>	<i>AP</i>		<i>ADA</i>		<i>Controle positivo*</i>	
	CIM (µg/mL)	CBM (µg/mL)	CIM (µg/mL)	CBM (µg/mL)	CIM (µg/mL)	CBM (µg/mL)
<i>B. pseudocatenulatum</i>	400	400	400	400	<0,01	0,74
<i>B. bifidum</i>	200	400	200	400	<0,01	0,05
<i>B. longum</i>	200	400	200	400	0,37	0,74
<i>L. acidophilus</i>	400	400	>400	>400	>3,13	>3,13
<i>L. fermentum</i>	400	400	>400	>400	>3,13	>3,13
<i>S. boulardii</i>	>400	>400	>400	>400	12,5	12,5
<i>E. coli</i>	>400	>400	>400	>400	6,25	6,25

*: *Bifidobacterium sp.* e *Lactobacillus sp.*: Penicilina G; *S. boulardii*: Miconazol; *E. coli*: Estreptomicina

Dentre os micro-organismos avaliados, os fungos apresentaram-se menos suscetíveis à ação dos diterpenos, sendo que os valores de CIM para todos os fungos foram acima de 400 µg/mL.

Para os micro-organismos do trato gastrointestinal, apenas a levedura *S. boulardii* e a bactéria *E. coli* apresentaram CIM acima de 400 µg/mL, sendo que os demais micro-organismos foram menos resistentes à ação das substâncias.

Ambos AP e ADA apresentaram os mesmos valores de CIM, exceto para *L. acidophilus* e *L. fermentum*, para os quais o AP apresentou maior efeito bacteriostático e bactericida.

Diterpenoides já foram relatados como potenciais antimicrobianos contra bactérias (PORTO et al., 2013; FONSECA et al., 2013; SOUZA et al., 2011), fungos (KUMAR, SAHA & SAHA, 2016; ZHANG et al., 2011) e vírus (HE et al., 2017). Alguns estudos sobre o mecanismo de ação de diterpenos relatam a inibição da enzima NADH oxidase (HARAGUCHI et al., 1996) e da cadeia respiratória (TAPIA et al., 2004) em bactérias e inibição da transcriptase reversa viral (PEREIRA et al., 2004). O diterpeno labdano ácido acetilsálvico foi capaz de interagir com a membrana citoplasmática do fungo *Botrytis cinerea* e alterar sua permeabilidade, inibindo seu crescimento micelial (MENDOZA et al., 2009).

Resultados obtidos pela equipe do projeto temático indicaram promissora atividade antimicrobiana do AP frente a biofilmes e micro-organismos planctônicos causadores da cárie dental e de infecções endodônticas. Os valores de CIM para bactérias como *L. casei*, *P. gingivalis* e *P. micros* foram próximos a 10 µg/mL. Oleorresinas ricas em AP também apresentaram atividade antimicrobiana promissora contra patógenos orais (BARDAJÍ et al., 2016).

Para as bactérias testadas neste estudo, o AP não se apresentou tão ativo. No entanto, foi utilizado um inóculo maior de $1,2 \times 10^9$ UFC/mL em relação ao inóculo de 5×10^5 UFC/mL utilizado nos outros ensaios antimicrobianos. Adicionalmente, a ação dos diterpenos foi avaliada após os micro-organismos atingirem a fase estacionária (para simular as mesmas condições dos experimentos de biotransformação) e não na fase exponencial de crescimento como padronizado nos ensaios antimicrobianos. Tais fatores podem estar relacionados às diferenças das atividades encontradas neste e nos outros estudos mencionados.

A concentração escolhida para os ensaios de biotransformação foi 100 µg/mL, a qual não interferiu no crescimento dos micro-organismos avaliados para ambos os diterpenos.

4.3 Biotransformações em escala analítica com os fungos filamentosos

Os estudos de biotransformação realizados com os fungos filamentosos foram inicialmente conduzidos por 5 e 10 dias de incubação. No entanto, após 10 dias de incubação, os produtos de biotransformação foram detectados em menor intensidade nos cromatogramas, provavelmente devido a sua degradação ou consumo. Assim, padronizou-se a obtenção dos extratos do meio de cultura fermentativo e da massa micelial após 5 dias de incubação.

As massas dos extratos obtidos em acetato de etila variaram ao redor de 1 a 20 mg. Os processos foram realizados em triplicata de maneira independente, a fim de confirmar os resultados obtidos.

Foi realizado o controle de estabilidade dos diterpenos no meio de cultura sob as mesmas condições de temperatura, agitação e tempo de incubação. Os cromatogramas apresentados na Figura 16 indicam que não houve degradação dos precursores ou formação de subprodutos durante o período de incubação e durante o processo de extração.

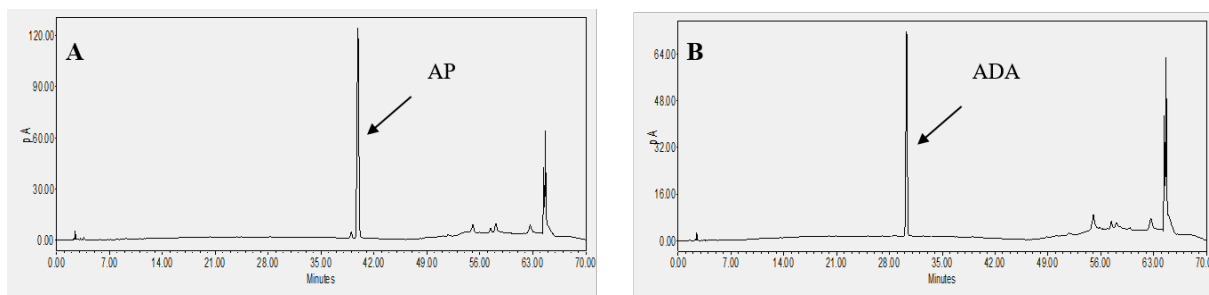


Figura 16. Controle de estabilidade do A) ácido *ent*-poliáltico e B) ácido *ent*-diidroagático após 5 dias de incubação em meio de cultura Koch's K1 a 30 °C, 120 rpm. Condições cromatográficas: Cromatógrafo Waters, coluna de fase reversa C-18 Kromasil, fase móvel constituída por gradiente de acetonitrila e 0,1% de ácido acético em água (20-100% fase orgânica em 60 min), vazão de 1 mL/min, volume de injeção 30µL, análise à temperatura ambiente.

Os cromatogramas dos extratos dos caldos das culturas dos processos realizados com os fungos *M. rouxii*, *C. echiulata*, *C. elegans* e *A. brasiliensis* estão apresentados nas Figuras 17 e 18. Os cromatogramas dos extratos das massas miceliais estão apresentados nas Figuras 19 e 20.

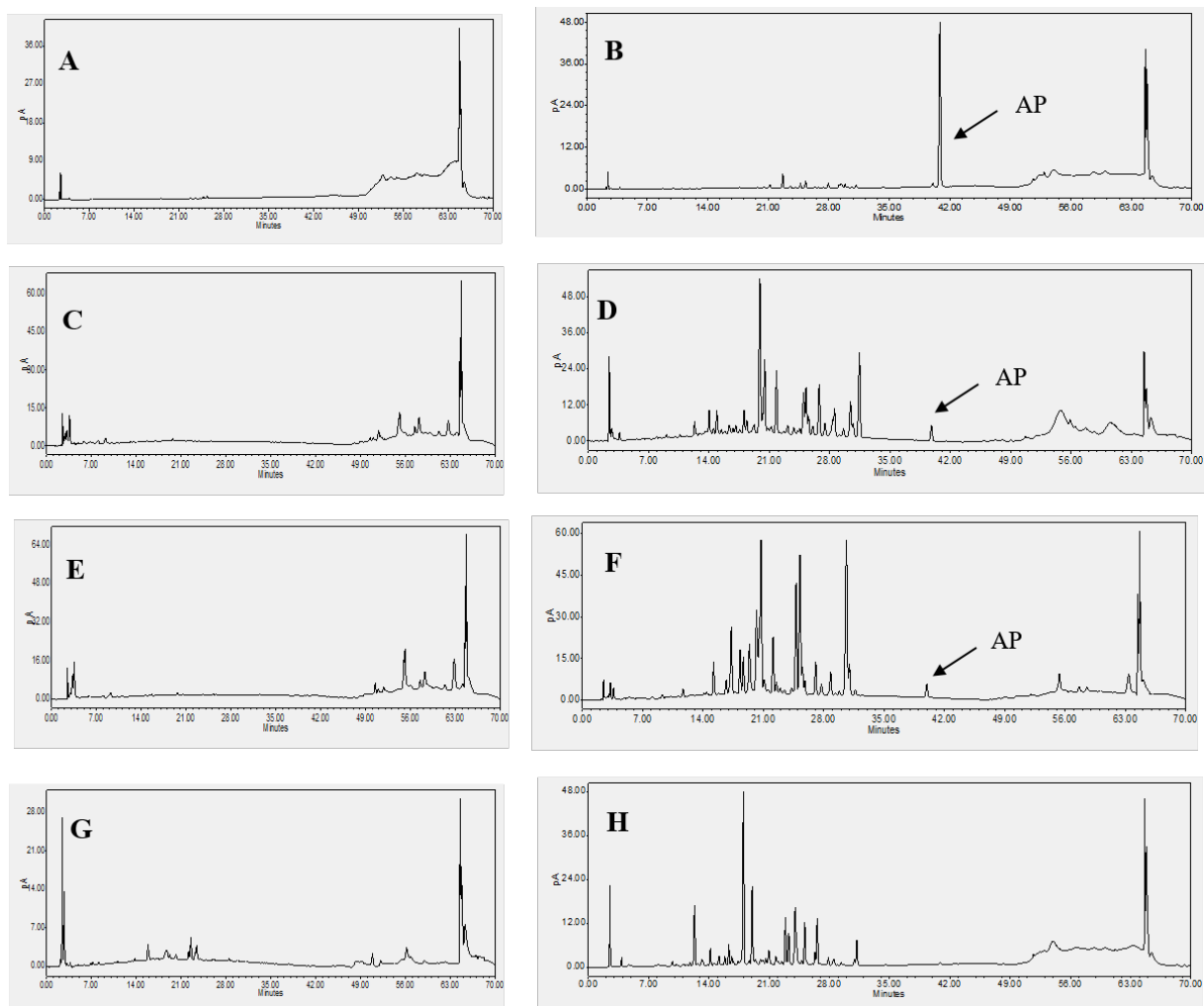


Figura 17. Cromatogramas obtidos por CLAE-CAD dos extratos do caldo de cultura de **A)** controle* *M. rouxii*; **B)** biotransformação do ácido *ent*-poliáltico com *M. rouxii*; **C)** controle* *C. elegans*; **D)** biotransformação do ácido *ent*-poliáltico com *C. elegans*; **E)** controle* *C. echinulata*; **F)** biotransformação do ácido *ent*-poliáltico com *C. echinulata*; **G)** controle* *A. brasiliensis*; **H)** biotransformação do ácido *ent*-poliáltico com *A. brasiliensis*, após 5 dias de incubação em meio Koch's K1 a 30 °C, 120 rpm.

Condições cromatográficas: Cromatógrafo Waters, coluna de fase reversa C-18 Kromasil®, fase móvel constituída por gradiente de acetonitrila e 0,1% de ácido acético em água (20-100% fase orgânica em 60 min), vazão de 1 mL/min, volume de injeção 30µL, análise à temperatura ambiente.

* controle do micro-organismo no meio de cultura com o solvente DMSO.

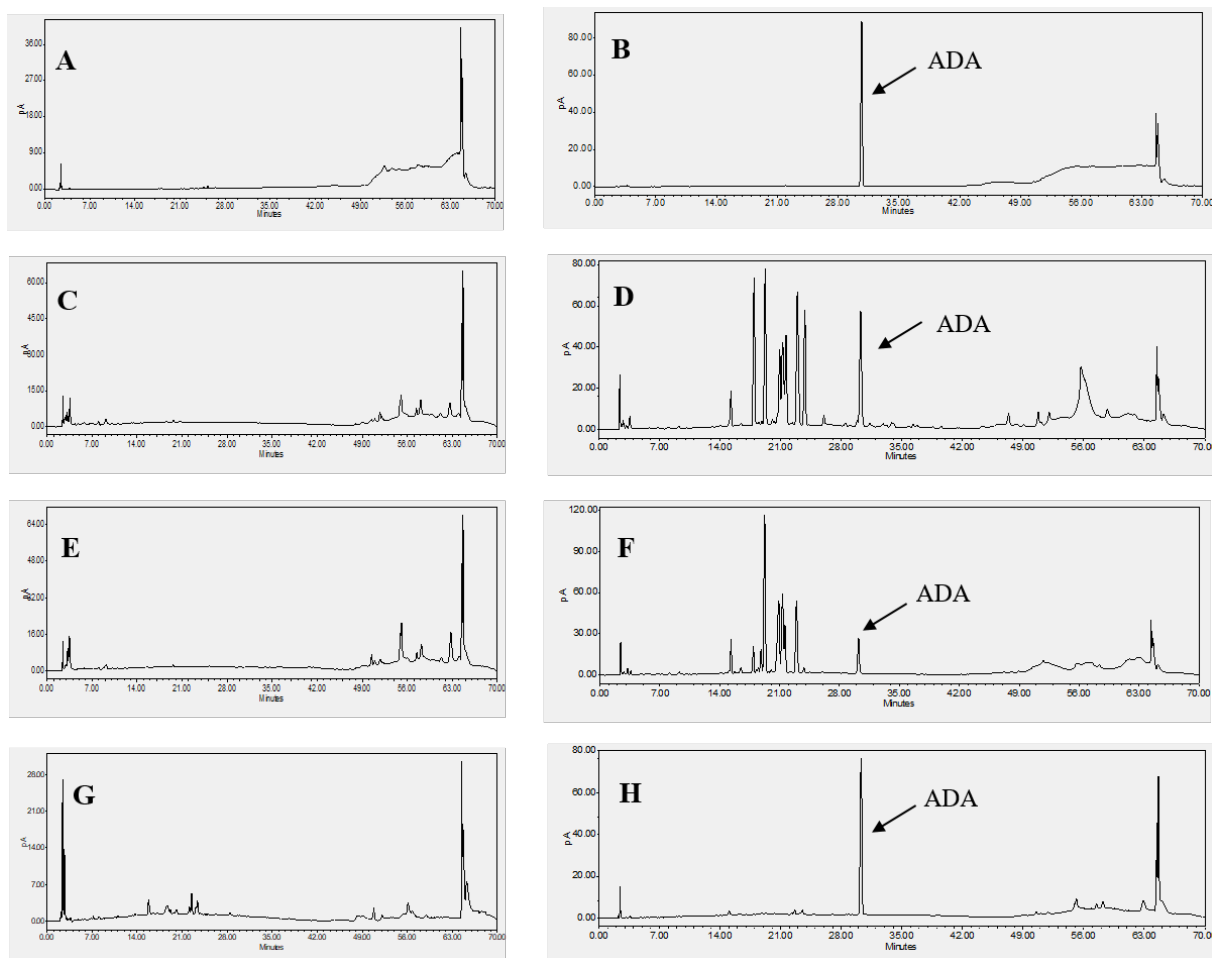


Figura 18. Cromatogramas obtidos por CLAE-CAD dos extratos do caldo de cultura de **A)** controle* *M. rouxii*; **B)** biotransformação do ácido *ent*-diidroagático com *M. rouxii*; **C)** controle* *C. elegans*; **D)** biotransformação do ácido *ent*-diidroagático com *C. elegans*; **E)** controle* *C. echinulata*; **F)** biotransformação do ácido *ent*-diidroagático com *C. echinulata*; **G)** controle* *A. brasiliensis*; **H)** biotransformação do ácido *ent*-diidroagático com *A. brasiliensis*, após 5 dias de incubação em meio Koch's K1 a 30 °C, 120 rpm. Condições cromatográficas: Cromatógrafo Waters, coluna de fase reversa C-18 Kromasil®, fase móvel constituída por gradiente de acetonitrila e 0,1% de ácido acético em água (20-100% fase orgânica em 60 min), vazão de 1 mL/min, volume de injeção 30µL, análise à temperatura ambiente.

* controle do micro-organismo no meio de cultura com o solvente DMSO.

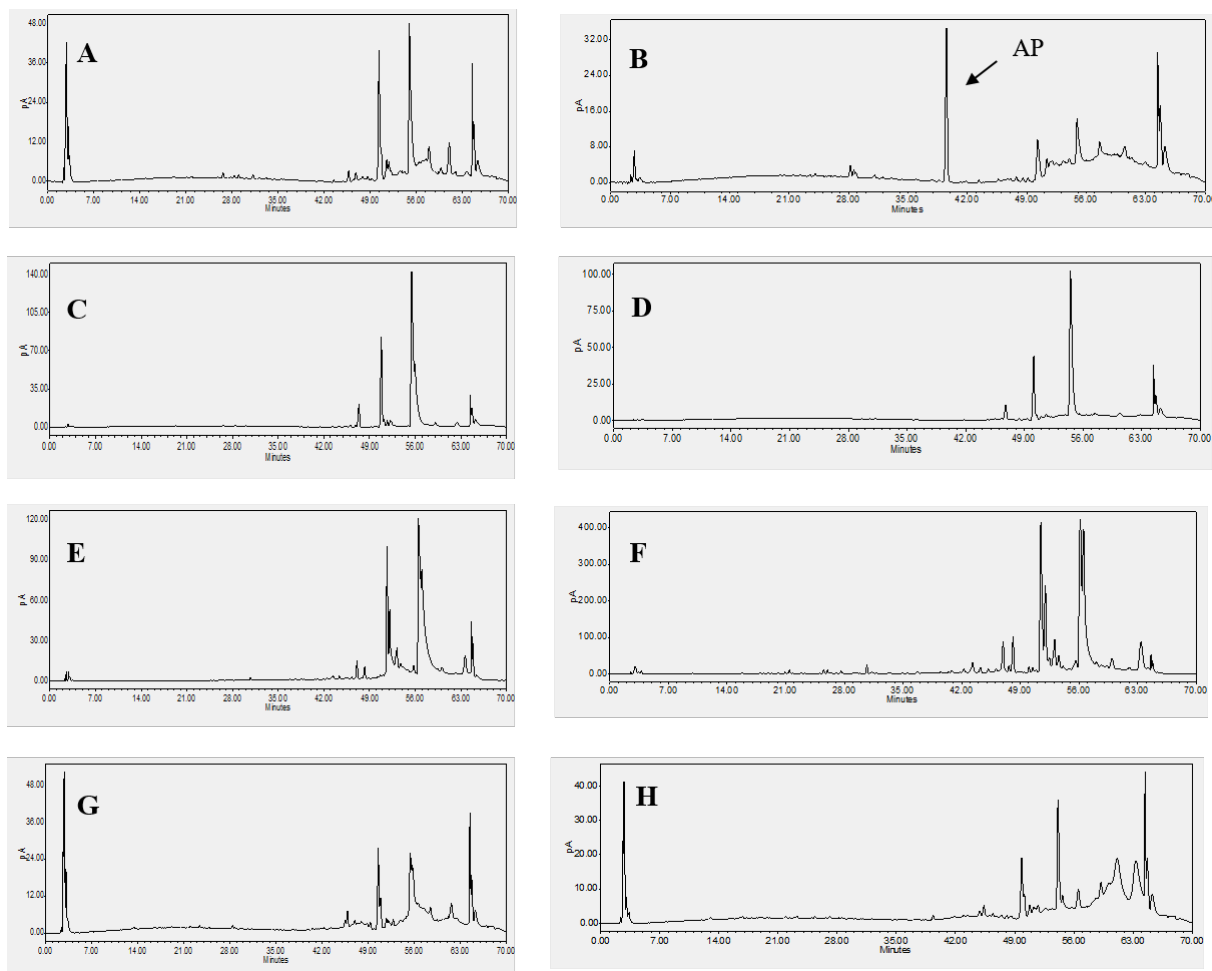


Figura 19. Cromatogramas obtidos por CLAE-CAD dos extratos da massa micelial de **A)** controle * *M. rouxii*; **B)** biotransformação do ácido *ent*-poliáltico com *M. rouxii*; **C)** controle * *C. elegans*; **D)** biotransformação do ácido *ent*-poliáltico com *C. elegans*; **E)** controle * *C. echinulata*; **F)** biotransformação do ácido *ent*-poliáltico com *C. echinulata*; **G)** controle * *A. brasiliensis*; **H)** biotransformação do ácido *ent*-poliáltico com *A. brasiliensis*, após 5 dias de incubação em meio Koch's K1 a 30 °C, 120 rpm.

Condições cromatográficas: Cromatógrafo Waters, coluna de fase reversa C-18 Kromasil®, fase móvel constituída por gradiente de acetonitrila e 0,1% de ácido acético em água (20-100% fase orgânica em 60 min), vazão de 1 mL/min, volume de injeção 30µL, análise à temperatura ambiente.

* controle do micro-organismo no meio de cultura com o solvente DMSO.

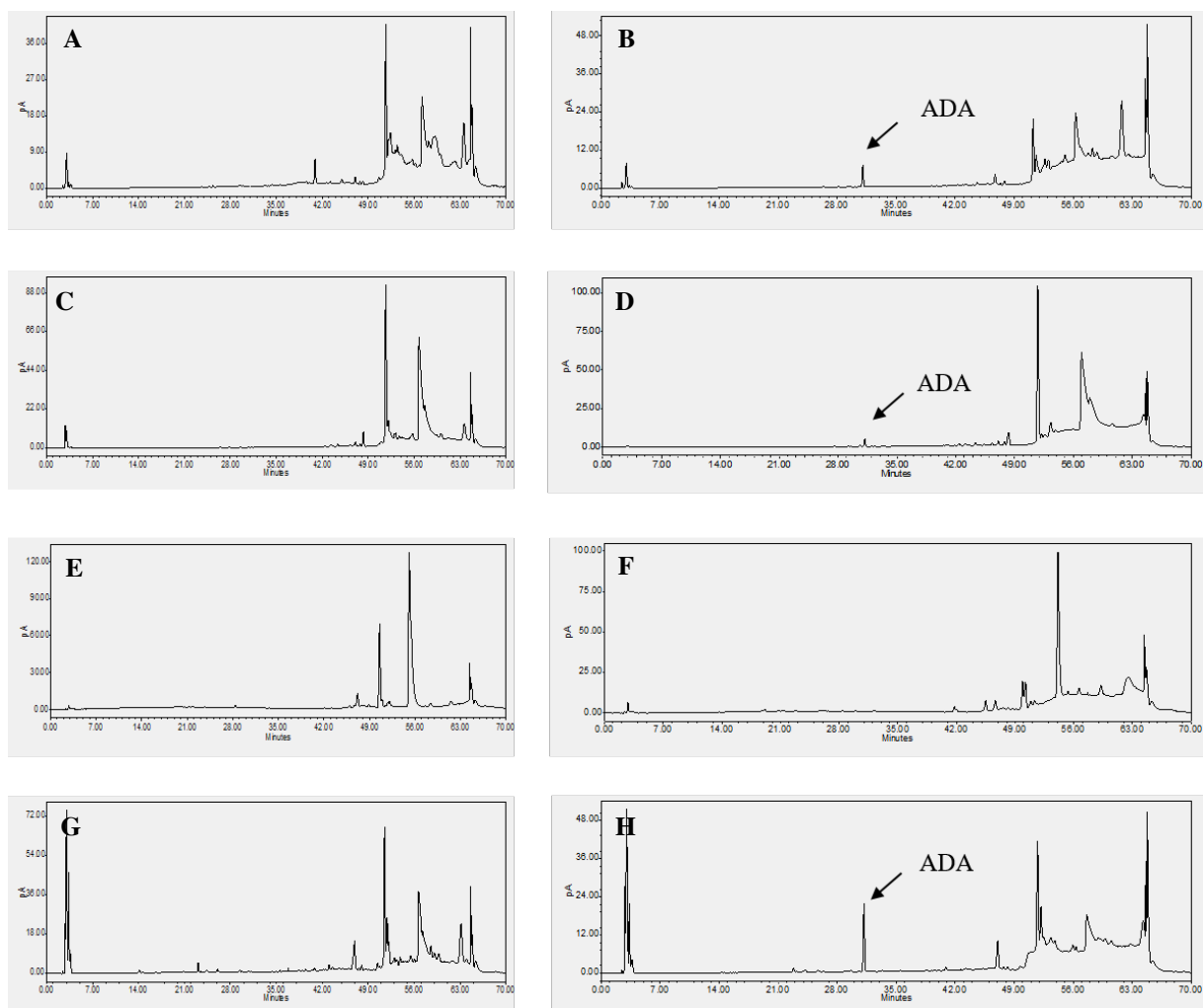


Figura 20. Cromatogramas obtidos por CLAE-CAD dos extratos da massa micelial de **A)** controle* *M. rouxii*; **B)** biotransformação do ácido *ent*-diidroagático com *M. rouxii*; **C)** controle* *C. elegans*; **D)** biotransformação do ácido *ent*-diidroagático com *C. elegans*; **E)** controle* *C. echinulata*; **F)** biotransformação do ácido *ent*-diidroagático com *C. echinulata*; **G)** controle* *A. brasiliensis*; **H)** biotransformação do ácido *ent*-diidroagático com *A. brasiliensis*, após 5 dias de incubação em meio Koch's K1 a 30 °C, 120 rpm.

Condições cromatográficas: Cromatógrafo Waters, coluna de fase reversa C-18 Kromasil®, fase móvel constituída por gradiente de acetonitrila e 0,1% de ácido acético em água (20-100% fase orgânica em 60 min), vazão de 1 mL/min, volume de injeção 30µL, análise à temperatura ambiente.

* controle do micro-organismo no meio de cultura com o solvente DMSO.

Os cromatogramas apresentados nas Figuras 17D, 17F, 18D e 18F sugerem que os fungos *C. elegans* e *C. echinulata* foram capazes de biotransformar os dois diterpenos analisados. Não foram detectados possíveis produtos de biotransformação do AP e ADA em concentrações significativas nos extratos dos processos conduzidos com *M. rouxii* (Figuras 17B e 18B).

O fungo *A. brasiliensis* utilizado neste estudo foi capaz de metabolizar o AP (Figura 17H), mas não o ADA (Figura 18H). Este resultado sugere que as diferenças estruturais entre

os dois diterpenos, como por exemplo, a presença de um grupo ácido em C-15 e a ausência do anel furano no ADA podem ser decisivas para a seletividade das enzimas deste fungo.

Os perfis cromatográficos dos extratos das massas miceliais de todos os fungos analisados (Figuras 19 e 20) não apresentaram possíveis produtos de biotransformação e foram semelhantes aos controles, indicando ausência de metabólitos no meio intracelular em concentrações significativas.

É possível observar que uma fração do AP ficou internalizada na massa micelial do *M. rouxii* (Figura 19B) e uma menor quantidade do ADA foi aprisionada na massa micelial do *A. brasiliensis* (Figura 20H), porém, sem apresentar possíveis produtos de biotransformação tanto na massa quanto no caldo de cultura.

De maneira geral, como podemos observar nas sobreposições da Figura 21, os extratos dos caldos de cultura dos processos desenvolvidos com o AP geraram cromatogramas mais complexos, com maior número de possíveis produtos de biotransformação em relação ao ADA. Além disso, os produtos de biotransformação eluem antes que os substratos, em proporções menores de acetonitrila que variam de 20 a 80 %, indicando um aumento de polaridade em relação aos precursores.

Muitos fungos apresentam aparato enzimático semelhante aos mamíferos e são capazes de catalisar reações de fase I e fase II aumentando a polaridade de moléculas lipofílicas através de reações de oxidação, redução, hidrólise e conjugação (ASHA & VIDYAVATHI, 2009).

Alguns fungos como os do gênero *Cunninghamella* produziram metabólitos com o mesmo tempo de retenção, conforme apresentado na Figura 21.

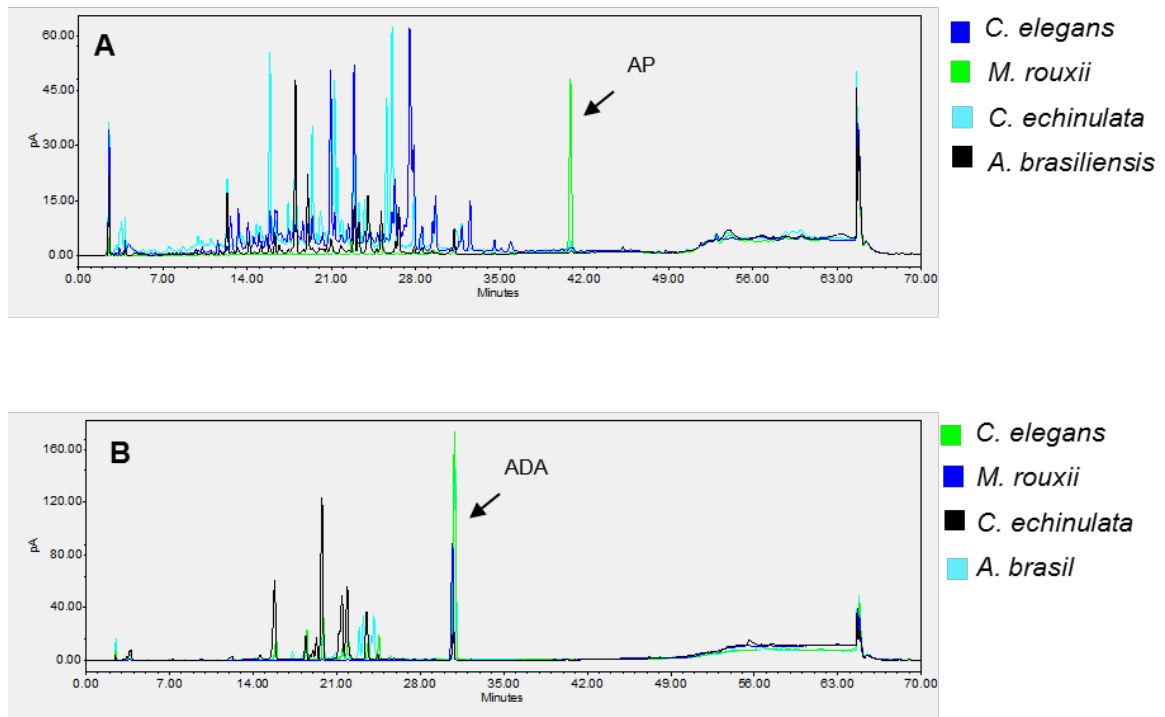


Figura 21. Sobreposição dos cromatogramas obtidos por CLAE-CAD das biotransformações do A) ácido *ent*-polilático e B) ácido *ent*-diidroagático com os fungos filamentosos.

O pH do meio de cultura foi verificado ao final dos processos de biotransformação (Tabela 7). O meio de cultura Koch's K1 apresentou pH inicial igual a 6,7. Todos os processos sem micro-organismos e os processos conduzidos com o fungo *A. brasiliensis* mantiveram o pH final próximo ao pH inicial. Ao final dos processos conduzidos com os fungos do gênero *Cunninghamella*, foram registradas medidas de pH próximas a 8, e ao final dos processos conduzidos com o fungo *M. rouxii*, próximas a 9.

A alcalinização do meio extracelular por fungos é um processo que pode ser mediado através da produção de amônia intracelular como subproduto do catabolismo de proteínas e aminoácidos (VYLKOVA et al., 2011). O excesso de amônia é transportado para o meio extracelular na forma de ureia, que posteriormente é convertida em íons amônio, causando o aumento de pH (VYLKOVA, 2017).

Os diferentes valores de pH indicam as peculiaridades metabólicas de cada fungo e que apesar dos fungos do gênero *Cunninghamella* e *Aspergillus* terem sido capazes de biotransformar os precursores, nenhum apresentou acentuada produção de ácidos orgânicos neste meio de cultura e condições utilizadas.

Como o pKa tanto do AP como do ADA é próximo a 4,7, conclui-se que o equilíbrio iônico dos substratos estava deslocado para a forma ionizada no início e fim dos processos de biotransformação, com a desprotonação do grupo ácido.

Tabela 7. Valores de pH do meio de cultura após 5 dias de incubação a 30 °C e 120 rpm dos controles e processos conduzidos com diferentes fungos.

Amostra	pH
Meio Koch's K1	6,7
Controle AP (meio + diterpeno)	6,5
Controle ADA (meio + diterpeno)	6,3
<i>M. rouxii</i> + DMSO	8,7
<i>M. rouxii</i> + AP	8,9
<i>M. rouxii</i> + ADA	8,8
<i>C.echinulata</i> + DMSO	8,2
<i>C.echinulata</i> + AP	8,2
<i>C.echinulata</i> + ADA	8,2
<i>C.elegans</i> + DMSO	8,1
<i>C.elegans</i> + AP	7,1
<i>C.elegans</i> + ADA	8,1
<i>A.brasiliensis</i> + DMSO	6,6
<i>A.brasiliensis</i> + AP	6,7
<i>A.brasiliensis</i> + ADA	6,3

4.4 Biotransformações em escala ampliada com os fungos filamentosos

Através da análise dos cromatogramas dos extratos, foi possível eleger os processos mais promissores conduzidos com os fungos. O processo de biotransformação do AP com o fungo *A. brasiliensis* foi selecionado para ser realizado em escala ampliada por apresentar um perfil cromatográfico menos complexo do que os perfis dos extratos com os fungos do gênero *Cunningamella*.

Em relação ao ADA, apenas os processos conduzidos com *C. echinulata* e *C. elegans* apresentaram possíveis produtos de biotransformação em concentrações satisfatórias.

Apesar dos perfis cromatográficos de ambos os processos serem muito similares, a análise através do detector Corona CAD indicou maior intensidade relativa dos picos presentes nos cromatogramas dos extratos obtidos com *C. echinulata* e por esta razão, este processo foi selecionado para ampliação de escala.

Ao final dos processos em escala ampliada, foram obtidos 161 mg de extrato das biotransformações do AP com o fungo *A. brasiliensis* e 244 mg de extrato das biotransformações do ADA com *C. echinulata*, os quais foram utilizados como material de

partida para os subsequentes isolamentos. Os perfis cromatográficos dos extratos obtidos em escala ampliada foram semelhantes aos obtidos nos processos em escala analítica.

4.5 Isolamento dos produtos de biotransformação com os fungos filamentosos

O extrato de biotransformação do AP com *A. brasiliensis* foi pré-fracionado antes de ser submetido ao isolamento. Foram obtidas 12 frações iniciando-se com 100 % de água e aumentando de 10 em 10 % a proporção de acetonitrila. A última fração foi obtida com 100 % de metanol. As frações com 10, 20 e 30 % de acetonitrila apresentaram perfis cromatográficos semelhantes e, portanto, foram reunidas em uma nova fração com massa igual a 55 mg, a qual foi submetida ao processo de isolamento. As frações com 40, 50 e 60 % de acetonitrila (massas iguais a 19,7; 38,5 e 12,9 mg, respectivamente) também foram selecionadas para obtenção de componentes isolados.

De maneira geral, os perfis cromatográficos das frações obtidas por SPE continuaram complexos, provavelmente devido aos tempos de retenção muito próximos dos componentes do extrato. O precursor AP foi o único componente a sair praticamente isolado, nas frações com 70 e 80% de acetonitrila.

O extrato da biotransformação em escala ampliada do ADA não foi submetido ao método de extração em fase sólida e o isolamento por CLAE foi realizado diretamente a partir do extrato bruto, devido ao seu perfil menos complexo. Os componentes isolados das frações e do extrato bruto estão apresentados nas Figuras 22 e 23.

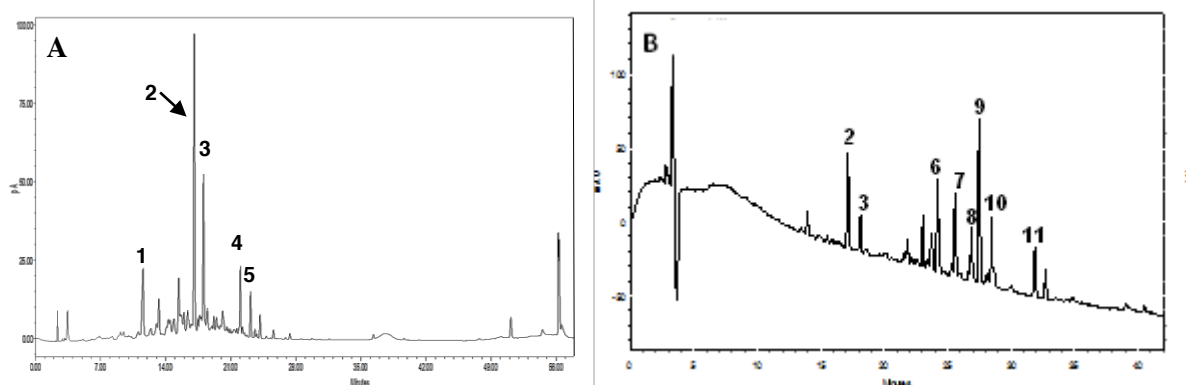


Figura 22. Produtos isolados das frações **A)** 60% água e 40% acetonitrila e **B)** 50% água e 50% acetonitrila, obtidas a partir do extrato bruto de biotransformação do ácido *ent*-poliáltico com o fungo *A. brasiliensis* após 5 dias de incubação, a 30 °C, 120 rpm.

Condições cromatográficas: **A)** cromatógrafo Waters e **B)** cromatógrafo Shimadzu ($\lambda = 200$ nm). Coluna de fase reversa C-18 Kromasil[®], fase móvel constituída por gradiente de acetonitrila e 0,1% de ácido acético em água (20-100% fase orgânica em 60 min), vazão de 1 mL/min, volume de injeção 20 μ L, análise à temperatura ambiente.

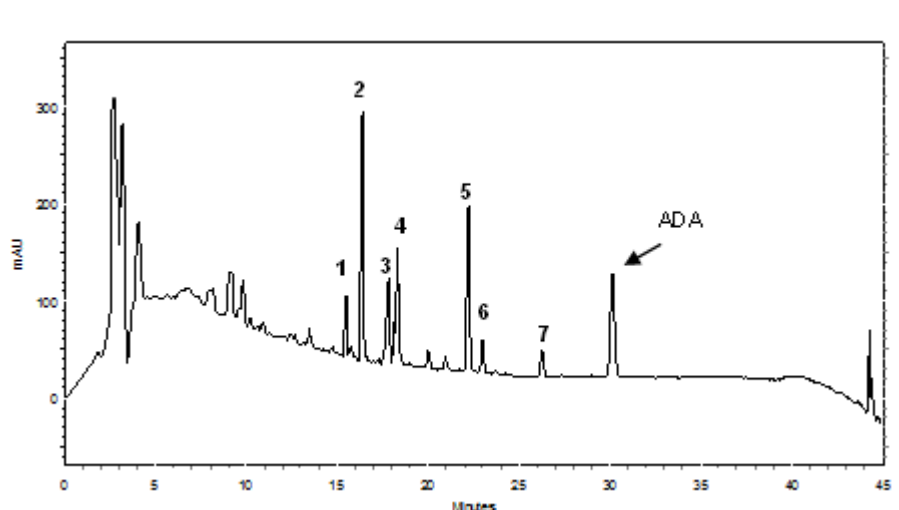


Figura 23. Produtos isolados dos extratos de biotransformação do ácido *ent*-diidroagático com o fungo *C. echinulata* após 5 dias de incubação, a 30 °C, 120 rpm. Condições cromatográficas: Cromatógrafo Shimadzu, $\lambda = 200$ nm, coluna de fase reversa C-18 Kromasil®, fase móvel constituída por gradiente de acetonitrila e 0,1% de ácido acético em água (20-100% fase orgânica em 40 min), vazão de 1 mL/min, volume de injeção 10 μ L, análise à temperatura ambiente.

Os rendimentos foram calculados a partir de 120 mg de AP e 150 mg de ADA como material de partida. As massas obtidas e os respectivos rendimentos de cada produto de biotransformação estão apresentados nas Tabelas 8 e 9. Os rendimentos acima de 1% estão de acordo com os rendimentos encontrados na literatura para metabólitos provenientes de biotransformações de diterpenos labdanos com diferentes fungos (FRIJA, FRADE & AFONSO, 2011). Os rendimentos dos produtos do ADA foram superiores aos rendimentos dos produtos do AP em geral, o que pode ser explicado devido à maior complexidade do extrato de biotransformação do AP, pois neste processo houve a formação de um número maior de produtos.

Tabela 8. Código, tempo de retenção, massa obtida e rendimento dos produtos isolados do extrato de biotransformação do ácido *ent*-poliáltico com o fungo *A. brasiliensis*.

Pico	Código	Tempo de retenção (min)	Massa obtida (mg)	Rendimento (%)
1	P01(AP)	11,1	0,5	0,4
2	P02(AP)	15,1	6,5	5,4
3	P03(AP)	15,8	1,0	0,8
4	P04(AP)	19,2	0,3	0,3
5	P05(AP)	20,4	0,3	0,3
6	P06(AP)	21,7	1,1	0,9
7	P07(AP)	23,3	0,5	0,4
8	P08(AP)	25,0	0,2	0,2
9	P09(AP)	25,7	1,9	1,6
10	P10(AP)	27,4	0,2	0,2
11	P11(AP)	38,9	0,7	0,6

Tabela 9. Código, tempo de retenção, massa obtida e rendimento dos produtos isolados do extrato de biotransformação do ácido *ent*-diidroagático com o fungo *C. echinulata*.

Pico	Código	Tempo de retenção (min)	Massa obtida (mg)	Rendimento (%)
1	P01(ADA)	15,6	2,1	1,4
2	P02(ADA)	16,5	21,4	14,3
3	P03(ADA)	17,9	6,8	4,5
4	P04(ADA)	18,4	5,2	3,5
5	P05(ADA)	22,4	5,1	3,4
6	P06(ADA)	23,2	1,9	1,3
7	P07(ADA)	26,4	1,1	0,7

4.6 Identificação dos produtos de biotransformação com os fungos filamentosos

Os metabólitos isolados foram elucidados através da comparação de seus espectros de RMN com os espectros dos precursores (descritos detalhadamente na seção 4.1), aliada às análises por EMAR. Os espectros de massas e RMN de todos os metabólitos isolados se encontram na seção de Apêndices 3 a 17 e 29 a 36.

4.6.1 Identificação estrutural do produto P01(AP)

Através da análise por EMAR do metabólito P01(AP) foi obtida a m/z $[M-H]^-$ igual a 365,1966 (Apêndice 3.5), consistente com a fórmula molecular proposta $C_{20}H_{30}O_6$ (366,2046 u). A fórmula obtida sugere a introdução de três átomos de oxigênio e dois hidrogênios na estrutura do AP pelo fungo *A. brasiliensis*.

Nos espectros de RMN de 1H (Apêndice 3.1) e de ^{13}C (Apêndice 3.2) do metabólito P01(AP) é possível observar que os sinais correspondentes aos carbonos e hidrogênios do anel furano e das duas metilas estão presentes, sugerindo que não houve mudanças nestas regiões da molécula. Os sinais correspondentes aos hidrogênios vinílicos da dupla exocíclica estão ausentes, sugerindo uma alteração no carbono C-17.

No espectro de RMN de 1H aparecem novos sinais dupletos (d) em δ_H 3,58 e 3,42, ambos com $J = 11,4$ Hz e integrados para um hidrogênio cada. Através do mapa de contornos HMQC (Apêndice 3.3) é possível observar que ambos os hidrogênios estão ligados a um mesmo carbono em δ_C 63,4. A constante 11,4 Hz é próxima ao valor típico para acoplamento de hidrogênios geminais em alcanos, confirmando a ausência da ligação dupla entre C8-C17.

A ausência de dois sinais na região característica de deslocamento de carbonos sp^2 no espectro de RMN de ^{13}C e a adição de dois átomos de hidrogênio na estrutura do metabólito

também confirmam a redução da ligação dupla do núcleo diterpênico. Os novos sinais em δ_{H} / δ_{C} 3,58 e 3,42 / 63,4 sugerem a presença de um carbono hidroximetilênico na estrutura.

Outro novo sinal em δ_{C} 76,8, compatível com o deslocamento de carbono carbinólico, aparece no espectro de ^{13}C do metabólito. No entanto, este carbono não se apresenta ligado a nenhum hidrogênio no mapa de contornos HMQC, sugerindo a presença de um carbono tetrassubstituído. Assim, as únicas posições possíveis para hidroxilação seriam em carbonos terciários da estrutura (C-5 ou C-8). Através da análise do mapa de contornos HMBC (Apêndice 3.4), verificou-se que o sinal em δ_{C} 76,8 correlaciona-se com os hidrogênios das posições δ_{H} 1,49 (H-9), 1,25 e 2,17 (H-7a e H-7b) e 3,58 e 3,42 (H-17a e H-17b), sendo, portanto, a introdução do grupo hidroxílico estabelecida na posição C-8. A proposição de hidroxilação em C-17 foi confirmada através das correlações dos sinais em δ_{H} 3,58 e 3,42 com os sinais em δ_{C} 37,8 (C-7), 76,8 (C-8) e 62,9 (C-9).

As estereoquímicas relativas dos grupos hidroxílico e hidroximetilênico ligados a C-8 foram determinadas através dos espectros de NOESY 1D (Apêndice 29), nos quais os hidrogênios em δ_{H} 3,42 e 3,58 da posição 17 apresentaram correlação espacial com os hidrogênios em δ_{H} 0,88 da posição 20, que por sua vez apresentou correlação espacial com o hidrogênio em δ_{H} 3,58 ligado à C-17 e os hidrogênios em δ_{H} 1,11 da posição 19. Assim, a estereoquímica relativa do grupo hidroximetilênico da posição 17 foi estabelecida na orientação α , enquanto a estereoquímica relativa do grupo hidroxílico ligado à C-8 foi estabelecida na configuração β .

Por fim, a presença de um novo sinal duplo duplete (*dd*) no espectro de RMN de ^1H em δ_{H} 3,53, correspondente a um hidrogênio ligado a um carbono em δ_{C} 80,0 indicam a presença de outra hidroxilação na estrutura. A posição do grupo hidroxílico em C-1 foi definida através da análise dos sinais no mapa de contornos HMBC, no qual o hidrogênio em δ_{H} 3,53 correlaciona-se com os carbonos em δ_{C} 13,4 (C-20), 62,9 (C-9) e 44,3 (C-10). Adicionalmente, os sinais em δ_{H} 0,88 (H-20) e 1,50 e 1,93 (H-3a e H-3b) correlacionam-se com o carbono em $\delta_{\text{C}} = 80,0$ (C-1).

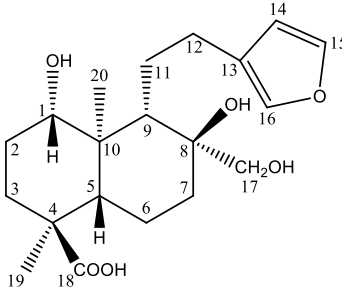
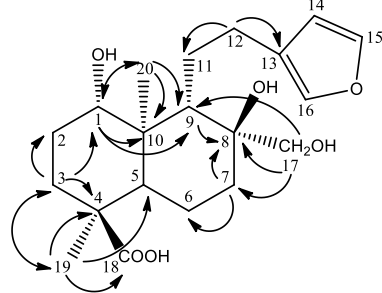
As constantes de acoplamento para hidrogênios em ciclo-hexanos são bem definidas na literatura (PAVIA et al., 2009). Assim, através das constantes de H-1 foi possível identificar o acoplamento de hidrogênios nas posições axial-equatorial (4,9 Hz) e axial-axial (11,0 Hz). Assumindo-se a conformação em cadeira como a conformação mais estável para ciclo-hexanos, determinou-se a configuração relativa do grupo hidroxílico em C-1 a partir das

constantes de acoplamento de H-1 com os hidrogênios vicinais em C-2, conforme as projeções de Newman na Figura 24. Assim, como H-1 apresenta duas constantes com valores distantes entre si, sua posição foi estabelecida em β . Consequentemente, inferiu-se a estereoquímica relativa do grupo hidroxílico em C-1 em α , a qual foi confirmada através das correlações espaciais encontradas nos espectros de NOESY 1D (Apêndice 29).

O valor de rotação específica determinado para o metabólito P01(AP) foi igual a $[\alpha]_D^{25}$: + 64,80 (c 0,05; CH₃OH).

Os dados espectroscópicos (sinais de hidrogênio, carbono, HMQC e HMBC) e estrutura química do metabólito P01(AP) estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10. Dados de RMN de ¹H e ¹³C do metabólito P01(AP).

P01(AP) (CD ₃ OD)		
Estrutura química	HMBC	
 <p>P01(AP)</p>	 <p>Correlações selecionadas no HMBC (H → C)</p>	<p>Fórmula molecular: C₂₀H₃₀O₆ m/z [M-H]⁻ acurada: 365,1966 m/z [M-H]⁻ exata: 365,1964 Δm: 0,55 ppm</p>
Posição	δ_C ppm 151 MHz	δ_H ppm, mult., (J Hz) int. 600 MHz
1	80,0	3,53 <i>dd</i> (4,9; 11,0) 1H
2	29,6	**
3	36,4	1,50 <i>nd</i> *; 1,93 <i>nd</i> *
4	48,6	-
5	51,1	1,83 <i>dd</i> (1,7; 12,1) 1H
6	23,6	**
7	37,8	1,25 <i>nd</i> *; 2,17 <i>nd</i> *
8	76,8	-
9	62,9	1,49 <i>nd</i> *
10	44,3	-
11	28,4	**
12	29,3	2,57 <i>m</i> 1H; 2,64 <i>m</i> 1H
13	127,9	-
14	112,3	6,32 <i>dd</i> (0,8; 1,7) 1H
15	143,3	7,32 <i>t</i> (1,7) 1H
16	139,7	7,23 <i>dd</i> (0,8; 1,5) 1H
17	63,4	3,42 <i>d</i> (11,4) 1H; 3,58 <i>d</i> (11,4) 1H
18	183,3	-
19	16,8	1,11 <i>s</i> 3H
20	13,4	0,88 <i>s</i> 3H

**nd*: desdobramento de sinal não definido devido à sobreposição de sinais, δ_H determinado pelo HMQC.

***s*: sinal não determinado devido à sobreposição de sinais no espectro de RMN de ¹H.

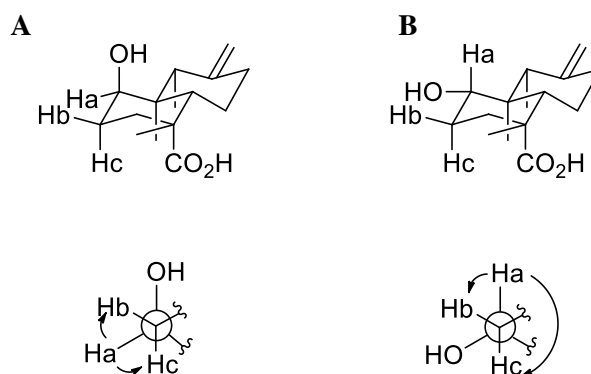


Figura 24. Representação dos ciclo-hexanos do núcleo diterpênico na conformação cadeira e respectivas projeções de Newman dos substituintes da posição 1, exemplificando os possíveis acoplamentos entre os hidrogênios vicinais quando Ha está na posição **A)** α e **B)** β .

4.6.2 Identificação estrutural do produto P02(AP)

A fórmula molecular $C_{20}H_{28}O_5$ obtida por EMAR para o metabólito P02(AP) indica a introdução de dois átomos de oxigênio na estrutura do precursor AP pelo fungo *A. brasiliensis*.

No espectro de RMN de 1H do metabólito P02(AP) (Apêndice 4.1) é possível observar que os sinais em δ_H 4,59 e 4,88 correspondentes aos hidrogênios vinílicos da dupla exocíclica estão ausentes e há o aparecimento de novos sinais mais blindados em δ_H 4,17 e 3,90. No espectro de RMN de ^{13}C (Apêndice 4.2) do metabólito, o sinal em δ_C 107,2 correspondente ao carbono ao qual os hidrogênios vinílicos estavam ligados no precursor AP, também se apresenta mais blindado (δ_C 63,0).

Através do mapa de contornos HMQC (Apêndice 4.3), foi possível confirmar que os dois hidrogênios com deslocamentos em δ_H 4,17 e 3,90 estão ligados ao mesmo carbono com deslocamento em δ_C 63,0, sugerindo que o carbono sp^2 C-17 do precursor AP foi hidroxilado e passou a ter hibridização sp^3 no metabólito P02(AP). Os sinais δ_H 4,17 e 3,90 desdobram-se em dupletos (*d*) e ambos apresentam a mesma constante de acoplamento $J = 11,8$ Hz, compatível com acoplamento de hidrogênios geminais em alcanos.

Os sinais desblindados em δ_C 132,4 e 145,3 no espectro de RMN de ^{13}C do metabólito indicam a presença de dois carbonos sp^2 na estrutura (com exceção dos carbonos do anel furano), sugerindo a migração da ligação dupla entre C-8 e C-17 do precursor. A nova posição da ligação dupla foi atribuída entre C-8 e C-9 através das correlações a longa distância encontradas no mapa de contornos HMBC (Apêndice 4.4), no qual os hidrogênios

δ_{H} 4,17 e 3,90 da posição 17 se correlacionam com os carbonos sp^2 em 132,4 e 145,3 ppm, bem como os hidrogênios δ_{H} 2,45 e 2,92 da posição 11 também se correlacionam com ambos os carbonos δ_{C} 132,4 e 145,3. Adicionalmente, a ausência de novos sinais desblindados correspondentes a hidrogênios ligados a carbonos sp^2 no espectro de RMN de ^1H do metabólito indica que os carbonos da ligação dupla não estão diretamente ligados a hidrogênios.

Por fim, há também o aparecimento de um novo duplo duplete (*dd*) no espectro de RMN de ^1H do metabólito, com deslocamento em δ_{H} 3,69 e integrado para um hidrogênio. No mapa de contornos HSQC, pode-se observar que este hidrogênio está ligado a um carbono em δ_{C} 76,5. O sinal $\delta_{\text{C}} / \delta_{\text{H}}$ 76,5 / 3,69 sugere a presença de um carbono hidroximetínico.

A posição do segundo grupo hidroxílico na molécula foi atribuída em C-1 através da análise do mapa de contornos de HMBC, no qual o hidrogênio em δ_{H} 3,69 se correlaciona com os carbonos em δ_{C} 16,5 (C-20), 45,1 (C-10) e 145,3 (C-9).

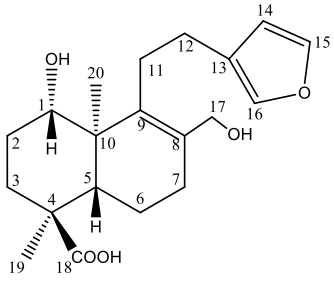
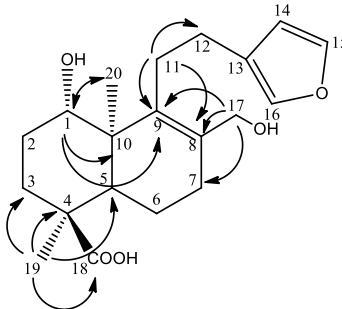
As constantes de acoplamento do sinal duplo duplete (*dd*) são condizentes com acoplamentos entre hidrogênios nas posições axial-axial ($J = 10,9$ Hz) e entre hidrogênios nas posições axial-equatorial ($J = 4,6$ Hz) em ciclo-hexanos, correspondente ao acoplamento de H-1 com os hidrogênios diastereotópicos H-2a e H-2b. Os dados de NOESY 1D (Apêndice 30) indicaram que há uma correlação espacial entre o hidrogênio em δ_{H} 3,69 da posição 1 com o hidrogênio em δ_{H} 2,01 da posição 5, o qual se encontra na orientação β em labdanos da série enantiomérica. Assim, através das constantes de acoplamento e dos dados obtidos por NOESY, a estereoquímica relativa do grupo hidroxílico da posição 1 foi definida na orientação α , como apresentado na estrutura química da Tabela 11.

O valor de rotação específica determinado para este derivado foi igual a $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$: - 3.82 (c 0,55; CH_3OH).

O metabólito P02(AP) foi o componente majoritário do extrato de biotransformação do AP, indicando a afinidade das enzimas microbianas para promover hidroxilações no carbono da posição 1 e no carbono olefínico da posição 17.

Os dados espectroscópicos, estrutura química e as correlações do mapa de contornos HMBC de P02(AP) estão dispostos na Tabela 11.

Tabela 11. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do metabólito P02(AP).

P02(AP) (CD_3OD)		
Estrutura química	HMBC	
		<p>Correlações selecionadas no HMBC ($\text{H} \rightarrow \text{C}$)</p> <p>Fórmula molecular: $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_5$ m/z $[\text{M}-\text{H}]^-$ acurada: 347,1857 m/z $[\text{M}-\text{H}]^-$ exata: 347,1859 Δm: -0,58 ppm</p>
Posição	δ_{C} ppm 151 MHz	δ_{H} ppm, mult., (J Hz) int. 600 MHz
1	76,5	3,69 <i>dd</i> (4,6; 10,9) 1H
2	22,4	1,35 <i>nd</i> *; 1,74 <i>m</i> 1H
3	36,1	1,56 <i>nd</i> *; 1,92 <i>nd</i> *
4	48,7	-
5	46,8	2,01 <i>nd</i> *
6	30,2	1,78 <i>nd</i> *
7	29,5	**
8	132,4	-
9	145,3	-
10	45,1	-
11	31,1	2,44 <i>nd</i> *; 2,91 <i>td</i> (12,7; 12,1; 4,7) 1H
12	27,9	2,44 <i>nd</i> *; 2,62 <i>td</i> (14,3; 13,8; 4,7) 1H
13	127,2	-
14	112,1	6,34 <i>sl</i> 1H
15	143,6	7,34 <i>t</i> (1,6) 1H
16	139,8	7,26 <i>sl</i> 1H
17	63,0	4,17 <i>d</i> (11,8) 1H; 3,90 <i>d</i> (11,8) 1H
18	182,8	-
19	16,9	1,18 <i>s</i> 3H
20	16,5	1,10 <i>s</i> 3H

**nd*: desdobramento de sinal não definido devido à sobreposição de sinais, δ_{H} determinado pelo HMQC.

** : sinal não determinado devido à sobreposição de sinais no espectro de RMN de ^1H .

4.6.3 Identificação estrutural do produto P03(AP)

A análise por EMAR indicou que o metabólito P03(AP) é um isômero de P02(AP), com fórmula molecular igual a $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_5$. Este metabólito foi detectado nos extratos de biotransformação do AP com os fungos *C. echinulata* e *A. brasiliensis*.

No espectro de RMN de ^1H do metabólito P03(AP) (Apêndice 5.1) é possível observar o aparecimento de quatro novos sinais em relação ao espectro do precursor AP. Os sinais em 4,14 e 3,93 ppm, ambos desdobrados em um duplete (*d*) e integrados para um hidrogênio cada, correspondem a dois hidrogênios ligados a um carbono em δ_{C} 65,8. A constante de

acoplamento $J = 12,1$ Hz é compatível com o acoplamento de hidrogênios geminais em alcanos.

Da mesma forma que no espectro de P02(AP), os sinais em 4,59 e 4,88 ppm correspondentes aos hidrogênios vinílicos da dupla exocíclica estão ausentes, bem como o sinal do C-17 olefinico (δ_C 107,2) no espectro de RMN de ^{13}C (Apêndice 5.2). Assim, este conjunto de informações sugerem uma mudança estrutural nessa região da molécula. A presença dos sinais explicados anteriormente (δ_C 65,8 ligado a δ_H 4,14 e 3,93) sugerem uma hidroxilação em C-17 e perda da ligação dupla entre C8-C17.

A presença dos sinais δ_C 125,0 e 141,2 no espectro de ^{13}C indica que ainda há uma ligação dupla na estrutura, além das existentes no anel furano. A posição desta ligação dupla é sugerida entre os carbonos C-7 e C-8 pelas correlações do mapa de contornos HMBC (Apêndice 5.4), no qual os hidrogênios em δ_H 4,14 e 3,93 (posição 17) se correlacionam com os carbonos em δ_C 53,3 (C-9), 125,0 e 141,2, os quais podem ser atribuídos somente aos carbonos da posição 7 e 8.

A presença de um sinal duplete (d) em δ_H 5,73 no espectro de RMN de 1H do metabólito, correspondente a um hidrogênio ligado ao carbono em δ_C 125,0 sugere que este último sinal é correspondente à C-7 e o sinal em δ_C 141,2 é correspondente à C-8. Além disso, o hidrogênio em δ_H 5,73 correlaciona-se com os carbonos em δ_C 65,8 (C-17), 53,3 (C-9), 46,4 (C-5) e 26,1 (C-6), confirmando sua presença na posição 7 e corroborando com a proposta de mudança da ligação dupla entre C-7 e C-8.

Por fim, o último sinal diferente no espectro de RMN de 1H do metabólito P03(AP) em relação ao precursor é o duplo duplete (dd) em δ_H 3,52, integrado para um hidrogênio. No mapa de contornos HSQC (Apêndice 5.3), observa-se que este hidrogênio está ligado a um carbono em δ_C 81,4. Os sinais δ_C / δ_H 81,4 / 3,52 sugerem a presença de um carbono hidroximetínico na estrutura.

O mapa de contornos HMBC indica que o hidrogênio em δ_H 3,52 correlaciona-se com os carbonos em δ_C 9,6 (C-20), 42,6 (C-10), 53,3 (C-9), 29,8 (C-2) e 36,7 (C3) sendo, portanto, a posição do grupo hidroxílico atribuída em C-1.

O sinal duplo duplete (dd) em δ_H 3,52 é desdobrado a partir do acoplamento vicinal do hidrogênio da posição 1 com os hidrogênios diastereotópicos da posição 2, e apresentam valores característicos de acoplamento de hidrogênios vicinais em ciclo-hexanos nas posições axial-axial ($J = 11,5$ Hz) e nas posições axial-equatorial ($J = 4,1$ Hz). Os dados obtidos por NOESY (Apêndice 31) indicam uma correlação espacial do hidrogênio da posição 1 ($\delta_H =$

3,52) com os hidrogênios da posição 5 ($\delta_{\text{H}} = 2,04$) e posição 9 ($\delta_{\text{H}} = 2,24$), ambos na orientação β . Assim, a estereoquímica do hidrogênio da posição 1 foi atribuída na orientação β , enquanto a estereoquímica do grupo hidroxílico da mesma posição foi definida em α . Além das constantes de acoplamento e dos dados de NOESY, um possível efeito γ -gauche observado através de uma acentuada blindagem sobre o deslocamento do carbono 20 ($\delta_{\text{C}} = 9,6$ para P03(AP) e $\delta_{\text{C}} = 14,9$ para AP) também contribui para a proposição do grupo α -OH.

O valor de rotação específica determinado para o derivado P03(AP) foi igual a $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$: - 12,60 (c 0,05; CH₃OH).

Como é possível observar, os isômeros P02(AP) e P03(AP) diferem apenas na posição da ligação dupla no núcleo diterpênico. Os dados espectroscópicos e estrutura química de P03(AP) estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do metabólito P03(AP).

Estrutura química		HMBC
P03(AP) (CD_3OD)		
		<p>Correlações selecionadas no HMBC (H→C)</p> <p>Fórmula molecular: $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_5$ m/z $[\text{M}-\text{H}]^-$ acurada: 347,1859 m/z $[\text{M}-\text{H}]^-$ exata: 347,1859 Δm: 0,00 ppm</p>
P03(AP)		
Posição	δ_{C} ppm 151 MHz	δ_{H} ppm, mult., (J Hz) int. 600 MHz
1	81,4	3,52 <i>dd</i> (4,1; 11,5) 1H
2	29,8	**
3	36,7	1,58 <i>nd</i> *, 1,95 <i>nd</i> *
4	47,8	-
5	46,4	2,04 <i>dd</i> 1 H
6	26,1	**
7	125,0	5,73 <i>d</i> (5,8) 1H
8	141,2	-
9	53,3	2,24 <i>m</i> 1H
10	42,6	-
11	30,4	**
12	26,9	2,49 <i>nd</i> *, 2,67 <i>nd</i> *
13	127,4	-
14	112,1	6,32 <i>dd</i> (0,8; 1,7) 1H
15	143,6	7,35 <i>t</i> (1,6) 1H
16	139,8	7,25 <i>sl</i> 1H
17	65,8	4,14 <i>d</i> (12,1) 1H; 3,93 <i>d</i> (12,1) 1H
18	183,0	-
19	17,8	1,22 <i>s</i> 3H
20	9,6	0,93 <i>s</i> 3H

**nd*: desdobramento de sinal não definido devido à sobreposição de sinais, δ_{H} determinado pelo HMQC.

** : sinal não determinado devido à sobreposição de sinais no espectro de RMN de ^1H .

4.6.4 Identificação estrutural do produto P04(AP)

O metabólito P04(AP) foi detectado nos extratos de biotransformação dos fungos *C. elegans*, *C. echinulata* e *A. brasiliensis*. Para este metabólito, foram encontrados dados espectroscópicos semelhantes aos dados de P01(AP). No entanto, a fórmula molecular encontrada igual a $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_5$ indica um átomo de oxigênio a menos na estrutura de P04(AP) em relação à P01(AP).

Nos espectros de RMN do metabólito é possível observar que o anel furano e as duas metilas estão preservados, no entanto os sinais correspondentes aos carbonos e hidrogênios da dupla exocíclica entre C-8 e C-17 estão ausentes.

No espectro de RMN de ^1H (Apêndice 6.1) aparecem novos sinais dupletos (d) em δ_{H} 3,61 e 3,46, ambos com $J = 11,5$ Hz e integrados para um hidrogênio cada. Através do mapa de correlações HMQC (Apêndice 6.3), é possível observar que ambos os hidrogênios estão ligados a um mesmo carbono em δ_{C} 63,6. Os novos sinais em $\delta_{\text{H}} / \delta_{\text{C}}$ 3,61 e 3,46 / 63,6 sugerem a presença de um carbono hidroximetilênico na estrutura.

A constante 11,5 Hz é próxima do valor típico para acoplamento de hidrogênios geminais em alcanos, confirmando a ausência da ligação dupla entre C8-C17. A ausência de dois sinais na região característica de deslocamento de carbonos sp^2 e a introdução de dois hidrogênios na molécula também confirmam que a ligação dupla do núcleo diterpênico foi reduzida.

Outro novo sinal em δ_{C} 76,5, compatível com o deslocamento de carbono carbinólico, aparece no espectro de ^{13}C do metabólito. No entanto, este carbono não se apresenta ligado a nenhum hidrogênio no mapa de contornos HMQC, indicando a presença de um carbono tetrassubstituído. Através da análise do mapa de contornos HMBC (Apêndice 6.4), verificou-se que o sinal em δ_{C} 76,5 correlaciona-se com os hidrogênios em δ_{H} 1,40 (H-9), 3,61 e 3,46 (H-17a e H-17b) e 2,18 e 1,85 (H-7a e H-7b) sendo, portanto, a introdução do grupo hidroxílico estabelecida em C-8.

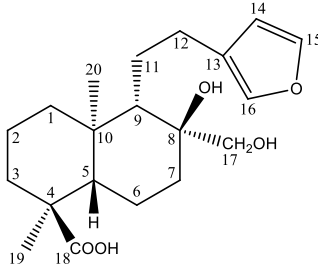
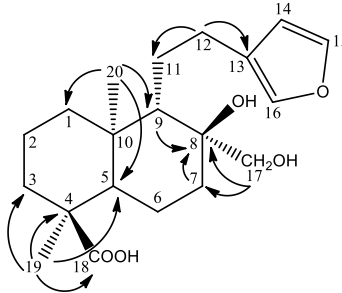
A proposição de hidroxilação em C-17 foi confirmada através das correlações dos sinais em δ_{H} 3,61 e 3,46 com os sinais em δ_{C} 38,1 (C-7) e 76,5 (C-8). As estereoquímicas relativas dos grupos hidroxílico e hidroximetilênico ligados a C-8 foram atribuídas através das correlações encontradas nos espectros de NOESY (Apêndice 32). Foi possível observar uma correlação espacial entre os hidrogênios da posição 17 ($\delta_{\text{H}} = 3,46$ e 3,61) com os hidrogênios da metila 20 em α ($\delta_{\text{H}} = 0,82$). Assim, o grupo hidroximetilênico em C-8 foi atribuído em α , enquanto o grupo hidroxílico foi atribuído em β .

O valor de rotação específica determinado para o metabólito P04(AP) foi igual a $[\alpha]_{\text{D}}^{25} + 130,89$ (c 0,03; CH_3OH).

Um isômero de P04(AP) foi obtido por semi-síntese a partir da hidroxilação do ácido lambertianico com permanganato de potássio em meio básico a 5 °C, formando o diterpeno 8 α ,17-diidroxi-poliáltico como produto majoritário (CHERNOV et al., 2006). Este isômero,

no entanto, apresenta a metila da posição 20 na orientação β e os grupos hidroxílico e hidroximetilênico ligados à C-8 nas orientações α e β , respectivamente. Apesar da estereoquímica diferente, os dados espectroscópicos da estrutura química obtida por Chernov e colaboradores estão apresentados na Tabela 13 a fim de comparação, bem como a estrutura química e os dados espectroscópicos de P04(AP).

Tabela 13. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do metabólito P04(AP).

Estrutura química			HMBC	
				
P04(AP)			Correlações selecionadas no HMBC (H \rightarrow C) Fórmula molecular: $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_5$ m/z [M-H]$^-$ acurada: 349,2011 m/z [M-H]$^-$ exata: 349,2015 Δm: -1,15 ppm	
Dados obtidos (CD_3OD)			CHERNOV et al., 2006 (CD_3OD)	
Posição	δ_{C} ppm 151 MHz	δ_{H} ppm, mult., (J Hz) int. 600 MHz	δ_{C} ppm 125,76 MHz	δ_{H} ppm, mult., (J Hz) 500,13 MHz
1	40,5	**	40,5	**
2	18,7	**	19,6	**
3	38,2	**	38,1	2,13 <i>m</i> 1H
4	49,0	-	44,0	-
5	52,0	1,85 <i>nd</i> *	56,0	**
6	23,8	-	21,9	**
7	38,1	2,18 <i>m</i> 1H; 1,85 <i>nd</i> *	38,4	2,21 <i>m</i> 1H; 1,20 <i>m</i> 1H
8	76,5	-	75,6	-
9	62,2	1,40 <i>nd</i> *	60,1	**
10	39,4	-	41,2	-
11	27,0	**	26,4	**
12	29,3	2,45 <i>m</i> 1H; 2,59 <i>m</i> 1H	28,7	2,43 <i>m</i> 1H; 2,60 <i>m</i> 1H
13	127,1	-	126,2	-
14	112,0	6,31 <i>m</i> 1H	111,4	6,28 <i>dd</i> (2,6; 1,0) 1H
15	143,7	7,36 <i>t</i> (1,6) 1H	143,0	7,32 <i>d</i> (2,6) 1H
16	139,8	7,27 <i>m</i> 1H	139,0	7,22 <i>d</i> (1,0) 1H
17	63,6	3,46 <i>d</i> (11,5) 1H; 3,61 <i>d</i> (11,5) 1H	62,7	3,48 <i>d</i> (7,1) 1H ; 3,69 <i>d</i> (7,1) 1H
18	183,6	-	180,8	-
19	17,1	1,11 <i>s</i> 3H	29,2	1,14 <i>s</i> 3H
20	16,7	0,82 <i>s</i> 3H	13,9	0,75 <i>s</i> 3H

**nd*: desdobramento de sinal não definido devido à sobreposição de sinais, δ_{H} determinado pelo HMQC.

** : sinal não determinado devido à sobreposição de sinais no espectro de RMN de ^1H .

4.6.5 Identificação estrutural do produto P05(AP)

A fórmula molecular $C_{20}H_{28}O_5$ obtida para o metabólito P05(AP) através da EMAR indica a introdução de dois átomos de oxigênio na estrutura do precursor AP. Este metabólito foi produzido pelo fungo *A. brasiliensis*.

É possível observar um novo sinal no espectro de RMN de 1H (Apêndice 7.1) em δ_H 3,25, correspondente a um hidrogênio ligado a um carbono em δ_C 83,3 (sinal também inexistente no espectro de RMN de ^{13}C do precursor AP).

Outro novo sinal no espectro de RMN de 1H pode ser observado em δ_H 3,59, o qual corresponde a um hidrogênio ligado a um carbono em δ_C 70,5. Os sinais δ_H / δ_C 3,25 / 83,3 e 3,59 / 70,5 sugerem a conversão de dois carbonos metileno em carbonos hidroximetínicos.

A posição das hidroxilações foi definida através da análise das correlações encontradas no mapa de contornos HMBC (Apêndice 7.3). É possível observar que o sinal em δ_H 3,25 correlaciona-se com o sinal em δ_C 70,5 e o sinal em δ_H 3,59 também se correlaciona com o carbono em δ_C 83,3. Assim, inferiu-se que os carbonos hidroximetínicos estão localizados próximos na estrutura.

Também se observou que o sinal em δ_H 3,25 correlaciona-se com os carbonos em δ_C 12,1 (C-20), 46,0 (C-10) e 58,4 (C-9), estabelecendo-se, portanto, sua ligação com o carbono da posição 1. Como o sinal em δ_H 3,59 também se correlaciona com C-1 e os hidrogênios da posição 3 (δ_H 1,77 e 1,87) correlacionam-se com o carbono ao qual o hidrogênio em δ_H 3,59 está ligado (δ_C 70,5), a posição da outra hidroxilação foi estabelecida em C-2.

A análise dos desdobramentos de sinal e das constantes de acoplamento também contribuiu para a determinação das posições de hidroxilação. O hidrogênio em δ_H 3,25 (H-1) desdobra-se em um duplete (*d*) com $J = 9,0$ Hz, devido ao seu acoplamento axial-axial com o hidrogênio em C-2 (δ_H 3,59). O hidrogênio em δ_H 3,59, por sua vez, desdobra-se em *ddd* devido ao seu acoplamento axial-axial com δ_H 3,25 em C-1 ($J = 9,0$ Hz), axial-equatorial com δ_H 1,77 ($J = 4,6$ Hz) e axial-axial com δ_H 1,87 ($J = 12,1$ Hz), ambos ligados à C-3.

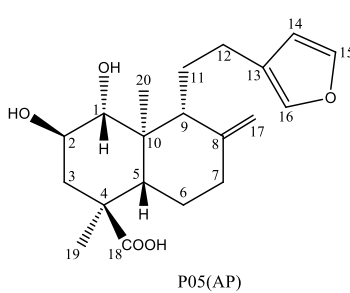
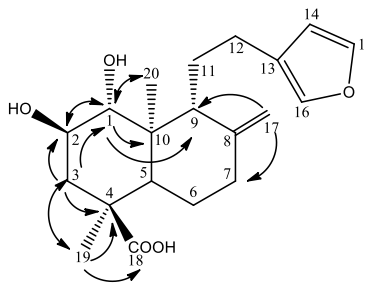
Quando irradiado o hidrogênio da posição 2 (δ_H 3,59), é possível observar uma correlação espacial com os hidrogênios das metilas em α das posições 20 (δ_H 0,81) e 19 (δ_H 1,12, Apêndice 33). A partir das constantes de acoplamento apresentadas por este hidrogênio em δ_H 3,59 com os vizinhos em C-3 e das correlações obtidas por NOESY, foi possível estabelecer a configuração relativa do mesmo em α . Logo, definiu-se a configuração do grupo OH em C-2 em β . Não foi observada correlação espacial do hidrogênio em C-1 (δ_H 3,25) com

nenhuma das metilas, mas houve correlação com o hidrogênio em C-5 (δ_H 2,06) na orientação β . Assim, foi possível estabelecer a posição do grupo hidroxílico em C-1 na configuração α .

Hidroxilações nas posições 1 e 2 de diterpenoides já foram obtidas com a biotransformação do jhanidiol com *Gibberella fujikuroi*, porém nas orientações 1β e 2α (FRAGA et al., 1998).

O valor de rotação específica determinado para o metabólito P05(AP) foi igual a $[\alpha]_D^{25}$: - 31,00 (c 0,03; CH₃OH). A estrutura química deste metabólito e suas correlações no HMBC, bem como seus dados espectroscópicos estão apresentados na Tabela 14.

Tabela 14. Dados de RMN de ¹H e ¹³C do metabólito P05(AP).

P05(AP) (CD ₃ OD)		
Estrutura química	HMBC	
 <p>P05(AP)</p>	 <p>Correlações selecionadas no HMBC (H→C)</p>	<p>Fórmula molecular: C₂₀H₂₈O₅ m/z [M-H]⁻ acurada: 347,1859 m/z [M-H]⁻ exata: 347,1859 Δm: 0,00 ppm</p>
Posição	δ_C ppm 151 MHz	δ_H ppm, mult., (J Hz) 600 MHz
1	83,3	3,25 d (9,0) 1H
2	70,5	3,59 ddd (12,1; 9,0; 4,6) 1H
3	44,2	1,77 dd (12,6; 4,6) 1H; 1,87 t (12,3) 1H
4	49,2	-
5	51,2	2,06 dd (12,6; 2,7) 1H
6	27,7	**
7	39,0	2,00 nd*; 2,34 ddd (12,4; 4,5; 2,3) 1H
8	148,9	-
9	58,4	1,98 m 1H
10	46,0	-
11	27,5	**
12	24,5	2,29 m 1H; 2,51 ddd (14,0; 9,1, 4,3) 1H
13	127,1	-
14	112,0	6,31 dd (1,7; 0,8) 1H
15	143,8	7,37 t (1,7) 1H
16	139,9	7,23 m 1H
17	108,1	4,63 sl 1H; 4,92 m 1H
18	183,1	-
19	18,1	1,12 s 3H
20	12,1	0,81 s 3H

*nd: desdobramento de sinal não definido devido à sobreposição de sinais, δ_H determinado pelo HMQC.

** : sinal não determinado devido à sobreposição de sinais no espectro de RMN de ¹H.

4.6.6 Identificação estrutural do produto P06(AP)

A análise da fórmula molecular obtida por EMAR ($C_{22}H_{30}O_6$) indica a introdução de dois novos átomos de carbonos, três novos átomos de oxigênio e dois hidrogênios na estrutura do AP pelo fungo *A. brasiliensis*.

No espectro de RMN de 1H do metabólito P06(AP) (Apêndice 8.1) é possível observar o aparecimento de quatro novos sinais em δ_H 2,04, 3,69, 4,49 e 4,67.

O sinal em δ_H 3,69 apresenta-se como um duplo duplete (*dd*) correspondente a um hidrogênio ligado a um carbono em δ_C 76,2. Tais sinais aliados à análise da massa acurada sugerem a introdução de um grupo hidroxílico pelo fungo. A posição da hidroxilação foi definida em C-1 com base no mapa de contornos HMBC (Apêndice 8.4), no qual o hidrogênio em δ_H 3,69 correlaciona-se com os carbonos em δ_C 16,5 (C-20), 45,3 (C-10), 36,1 (C-3) e 30,1 (C-2).

As constantes de acoplamento calculadas para o sinal em δ_H 3,69 indicam o acoplamento axial-axial (10,8 Hz) e axial-equatorial (4,6 Hz) do hidrogênio em C-1 com os dois hidrogênios diastereotópicos em C-2. Através destas constantes e dos dados de NOESY (Apêndice 34), a estereoquímica relativa do grupo hidroxílico em C-1 foi definida na configuração α .

O espectro de RMN de ^{13}C (Apêndice 8.2) e os bidimensionais (Apêndices 8.3 e 8.4) indicam que os dois novos carbonos introduzidos na molécula apresentam deslocamentos em δ_C 20,9 e 173,2. O carbono em 20,9 ppm está ligado a três hidrogênios correspondentes ao novo sinal em δ_H 2,04 (*s*), o qual se correlaciona com o novo carbono em δ_C 173,2. Por sua vez, o deslocamento em 173,2 ppm é característico de carbonila de ácido carboxílico ou éster.

Há também novos sinais dupletos (*d*) em δ_H 4,49 e 4,67 no espectro de RMN de 1H , ambos com constante de acoplamento igual a 11,9 Hz e ligados a um mesmo carbono em δ_C 66,2. Apesar do deslocamento do carbono ser compatível com o deslocamento de um carbono carbinólico, os deslocamentos dos hidrogênios estão mais desblindados do que o esperado para um grupo hidroximetilênico (como por exemplo nos metabólitos P02(AP) e P03(AP), que possuem grupo hidroximetilênico na posição 17 e deslocamentos ao redor de 3,9 e 4,1 ppm para H-17a e H-17b). No mapa de contornos HMBC, é possível observar que os hidrogênios em δ_H 4,49 e 4,67 também se correlacionam com a carbonila em δ_C 173,2, que por sua vez se correlaciona com os hidrogênios da nova metila introduzida (δ_H 2,04). Assim, o

conjunto de informações dos espectros de RMN aliado à fórmula molecular obtida sugere a introdução de um grupo acetato no precursor AP.

A posição de acetilação foi definida em C-17 com base no desaparecimento dos sinais em δ_{H} 4,59 e 4,88 (correspondentes aos hidrogênios vinílicos na posição 17 do AP) e nas correlações encontradas no mapa de contornos HMBC. Os hidrogênios em δ_{H} 4,49 e 4,67 correlacionam-se com os carbonos em δ_{C} 173,2 (C-21), 29,9 (C-7), 128,2 (C-8) e 148,4 (C-9).

A nova posição da ligação dupla foi proposta entre C-8 e C-9 também através das correlações do HMBC, no qual os hidrogênios metílicos da posição 20 (δ_{H} 1,11) e os hidrogênios metilênicos da posição 11 (δ_{H} 2,95) correlacionam-se com o carbono em δ_{C} 148,4 (C-9). Como citado anteriormente, os hidrogênios em δ_{H} 4,49 e 4,67 da posição 17 também se correlacionam com os carbonos em δ_{C} 128,2 (C-8) e 148,4 (C-9).

O valor de rotação específica determinado para o metabólito P06(AP) foi igual a $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$: + 71,00 (*c* 0,06; CH₃OH).

Biossinteticamente, propõe-se que o metabólito P06(AP), o qual é um metabólito hidroxilado e acetilado de fase I e II, tenha se originado a partir do metabólito de fase I P02(AP). Os dados espectroscópicos de P06(AP), sua estrutura química e correlações no HMBC estão apresentados na Tabela 15.

Tabela 15. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do metabólito P06(AP).

Estrutura química		HMBC
P06(AP) (CD_3OD)		
<p>↷ Correlações selecionadas no HMBC (H→C) Fórmula molecular: $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{O}_6$ m/z $[\text{M}-\text{H}]^-$ acurada: 389,1962 m/z $[\text{M}-\text{H}]^-$ exata: 389,1964 Δm: -0,51 ppm</p>		
Posição	δ_{C} ppm 151 MHz	δ_{H} ppm, mult., (J Hz) int. 600 MHz
1	76,2	3,69 <i>dd</i> (10,8; 4,6) 1 H
2	30,1	**
3	36,1	1,58 <i>nd</i> *; 1,92 <i>nd</i> *
4	48,4	-
5	46,6	2,00 <i>d</i> (2,0) 1H
6	22,2	**
7	29,9	**
8	128,2	-
9	148,4	-
10	45,3	-
11	31,4	2,95 <i>nd</i> *
12	27,7	2,45 <i>nd</i> *; 2,62 <i>nd</i> *
13	126,9	-
14	112,1	6,34 <i>dd</i> (0,6; 1,6) 1H
15	143,7	7,35 <i>t</i> (1,7) 1H
16	139,9	7,26 <i>m</i> 1 H
17	66,2	4,49 <i>d</i> (11,9) 1H; 4,67 <i>d</i> (11,9) 1H
18	182,7	-
19	16,8	1,19 <i>s</i> 3H
20	16,5	1,11 <i>s</i> 3H
21	173,2	-
22	20,9	2,04 <i>s</i> 3 H

**nd*: desdobramento de sinal não definido devido à sobreposição de sinais, δ_{H} determinado pelo HMQC.

** : sinal não determinado devido à sobreposição de sinais no espectro de RMN de ^1H .

4.6.7 Identificação estrutural do produto P07(AP)

A fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_5$ obtida por EMAR indica que o metabólito P07(AP) produzido pelo fungo *A. brasiliensis* apresenta dois átomos de oxigênio a mais que o precursor AP.

No espectro de RMN de ^1H do metabólito (Apêndice 9.1) é possível observar o aparecimento de dois novos sinais em 3,51 e 4,03 ppm, com integral correspondente a 1 H

cada. Através da análise do mapa de contornos HMQC (Apêndice 9.3), foi possível determinar que o hidrogênio em $\delta_{\text{H}} 3,51$ está ligado a um carbono em $\delta_{\text{C}} 77,2$ e o hidrogênio em $\delta_{\text{H}} 4,03$ está ligado a um carbono em $\delta_{\text{C}} 70,3$. O aparecimento destes novos sinais sugerem que dois carbonos metileno do precursor AP foram hidroxilados em P07(AP).

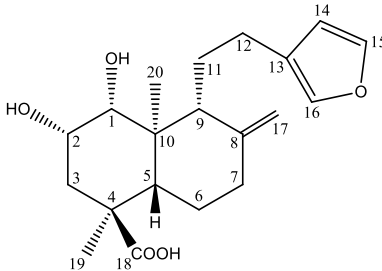
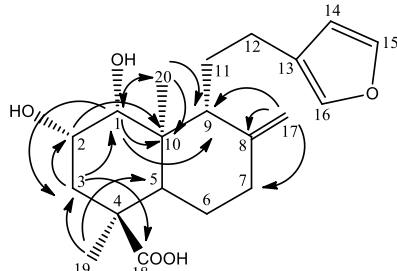
A posição dos grupos hidroxílicos foi definida através da análise do mapa de contornos HMBC (Apêndice 9.4). O hidrogênio $\delta_{\text{H}} 3,51$ do grupo oximetínico correlaciona-se com os carbonos em $\delta_{\text{C}} 12,3$ (C-20), 40,1 (C-3), 45,9 (C-10) e 58,2 (C-9), sendo, portanto, atribuído na posição 1. O hidrogênio $\delta_{\text{H}} 4,03$ do outro grupo oximetínico apresenta correlação a longa distância com o carbono em $\delta_{\text{C}} 45,9$ (C-10) e os hidrogênios diastereotópicos $\delta_{\text{H}} 1,80$ e 1,93 da posição 3 correlacionam-se com o carbono $\delta_{\text{C}} 70,3$, o qual está diretamente ligado ao hidrogênio em $\delta_{\text{H}} 4,03$. Estas correlações sugerem a outra hidroxilação em C-2.

A análise das constantes de acoplamento também contribui para a proposição das hidroxilações em C-1 e C2. O sinal do hidrogênio do grupo oximetínico em $\delta_{\text{H}} 3,51$ na posição 1 é desdobrado em um duplete (d , $J = 4,6$ Hz) devido seu acoplamento com o outro hidrogênio do grupo oximetínico em $\delta_{\text{H}} 4,03$, proposto na posição 2. A constante $J = 4,6$ Hz é compatível com acoplamento de hidrogênios nas posições equatorial-axial em ciclo-hexanos. O hidrogênio ligado a C-2 desdobra-se em um duplo duplo duplete (ddd) uma vez que o mesmo acopla com o hidrogênio ligado a C-1 ($J = 4,6$ Hz) e também com os dois hidrogênios diastereotópicos ligados a C-3 ($J = 3,5$ e 7,9 Hz).

No experimento de NOESY com P07(AP) (Apêndice 35), quando irradiados os hidrogênios em $\delta_{\text{H}} 3,51$ e 4,03, não é possível observar correlação espacial com os hidrogênios das metilas 19 e 20. No entanto, observa-se correlação espacial entre os próprios hidrogênios em $\delta_{\text{H}} 3,51$ e 4,03 e também entre os mesmos e o hidrogênio da posição 5 ($\delta_{\text{H}} 2,09$), atribuído na orientação β . Assim, a estereoquímica dos hidrogênios em C-1 ($\delta_{\text{H}} 3,51$) e C-2 ($\delta_{\text{H}} 4,03$) foram atribuídas em β e as estereoquímicas dos grupos hidroxílicos das mesmas posições foram atribuídas em α .

O valor de rotação específica determinado para o metabólito P07(AP) foi igual a $[\alpha]_{\text{D}}^{25} + 65,6$ (c 0,05; CH_3OH). Os dados espectroscópicos e estrutura química deste derivado estão dispostos na Tabela 16.

Tabela 16. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do metabólito P07(AP).

P07(AP) (CD_3OD)	
Estrutura química	HMBC
 <p>P07(AP)</p>	 <p>Correlações selecionadas no HMBC (H → C)</p> <p>Fórmula molecular: $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_5$ m/z $[\text{M}-\text{H}]^-$ acurada: 347,1858 m/z $[\text{M}-\text{H}]^-$ exata: 347,1859 Δm: -0,29 ppm</p>

Posição	δ_{C} ppm 151 MHz	δ_{H} ppm, mult., (J Hz) int. 600 MHz
1	77,2	3,51 <i>d</i> (4,6) 1H
2	70,3	4,03 <i>ddd</i> (7,9; 4,3; 3,5) 1H
3	40,1	1,80 <i>dd</i> (7,6; 13,8) 1H; 1,93 <i>nd</i> *
4	49,9	-
5	47,8	2,09 <i>dd</i> (12,5; 3,0) 1H
6	27,8	**
7	39,0	**
8	148,9	-
9	58,2	1,85 <i>nd</i> *
10	45,9	-
11	27,0	**
12	24,6	**
13	126,9	-
14	112,0	6,32 <i>dd</i> (0,8; 1,8) 1H
15	143,9	7,37 <i>t</i> (1,7) 1H
16	140,0	7,23 <i>dd</i> (0,8; 1,4) 1 H
17	107,9	4,63 <i>sl</i> 1H; 4,87 <i>s</i> 1H
18	183,3	-
19	20,3	1,22 <i>s</i> 3H
20	12,3	0,91 <i>s</i> 3H

**nd*: desdobramento de sinal não definido devido à sobreposição de sinais, δ_{H} determinado pelo HMQC.

** : sinal não determinado devido à sobreposição de sinais no espectro de RMN de ^1H .

4.6.8 Identificação estrutural do produto P08(AP)

A fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_4$ obtida por EMAR para metabólito P08(AP) indica a introdução de um átomo de oxigênio na estrutura do precursor AP. Os sinais correspondentes aos carbonos e hidrogênios da dupla exocíclica do AP estão ausentes nos espectros, sugerindo uma alteração nessa região da molécula.

Dois novos sinais dupletos (*d*) podem ser observados no espectro de RMN de ^1H (Apêndice 10.1) do metabólito, em δ_{H} 3,89 e 4,15. Como verificado no HMQC (Apêndice

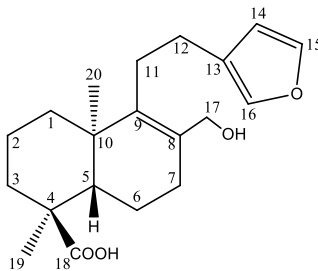
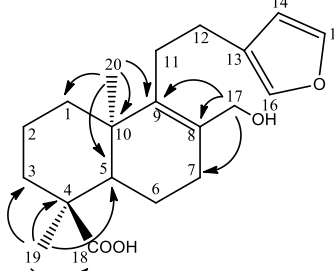
10.2), ambos os sinais se encontram ligados a um mesmo carbono em δ_C 63,0. Considerando que os grupos metílicos estão preservados e que a dupla exocíclica está ausente, propôs-se a conversão do carbono C-17 olefínico em um carbono hidroximetilênico.

A presença de dois novos sinais desblindados (δ_C 131,4 e 144,5) na região característica de carbonos sp^2 nos espectros bidimensionais (Apêndices 10.2 e 10.3) indica que a ligação dupla ainda está presente no núcleo diterpênico, porém em outra posição.

Nas correlações encontradas no mapa de contornos HMBC, podemos observar que os hidrogênios em δ_H 3,89 e 4,15 (posição 17) se correlacionam com os carbonos em δ_C 29,4 (C-7) e os carbonos sp^2 131,4 e 144,5. Logo, a posição dos últimos fica restrita aos carbonos C-8 e C-9. Como os hidrogênios metílicos da posição 20 se correlacionam com o carbono em 144,5 ppm, este deslocamento foi atribuído à C-9, enquanto o deslocamento em 132,4 ppm foi atribuído à C-8.

O valor de rotação específica determinado para o metabólito P08(AP) foi igual a $[\alpha]_D^{25}$: - 19,00 (*c* 0,02; CH₃OH). Sua estrutura química, dados de RMN e correlações no HMBC estão apresentados na Tabela 17.

Tabela 17. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do metabólito P08(AP).

P08(AP) (CD_3OD)		
Estrutura química	HMBC	
 <p>P08(AP)</p>	 <p>Correlações selecionadas no HMBC (H → C)</p>	<p>Fórmula molecular: $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_4$ m/z $[\text{M}-\text{H}]^-$ acurada: 331,1909 m/z $[\text{M}-\text{H}]^-$ experimental: 331,1909 Δm: 0,00 ppm</p>
Posição	δ_{C} ppm 151 MHz	δ_{H} ppm, mult., (J Hz) 600 MHz
1	37,1	**
2	19,3	1,62 <i>nd</i> *; 1,70 <i>m</i> 1H
3	38,0	1,57 <i>nd</i> *; 1,81 <i>td</i> (13,1; 4,3) 1H
4	49,1	-
5	47,5	2,06 <i>dd</i> (12,4; 2,1) 1H
6	22,3	1,39 <i>nd</i> *; 1,60 <i>nd</i> *
7	29,4	2,17 <i>nd</i> *; 2,24 <i>dd</i> (17,9; 6,6) 1H
8	131,4	-
9	144,5	-
10	39,8	-
11	30,4	**
12	28,3	2,40 <i>ddd</i> (17,2; 11,9; 5,9) 1H; 2,55 <i>m</i> 1H
13	126,4	-
14	111,5	6,33 <i>m</i> 1H
15	143,6	7,39 <i>t</i> (1,5) 1H
16	139,5	7,30 <i>sl</i> 1H
17	63,0	3,89 <i>d</i> (11,8) 1H; 4,15 <i>d</i> (11,8) 1H
18	183,9	-
19	17,3	1,18 <i>s</i> 3H
20	20,6	1,05 <i>s</i> 3H

**nd*: desdobramento de sinal não definido devido à sobreposição de sinais, δ_{H} determinado pelo HMQC.

** : sinal não determinado devido à sobreposição de sinais no espectro de RMN de ^1H .

4.6.9 Identificação estrutural do produto P09(AP)

A fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_4$ encontrada para o metabólito P09(AP) indica a introdução de um novo átomo de oxigênio no AP pelos fungos *C. elegans* e *A. brasiliensis*.

No espectro de RMN de ^1H do metabólito (Apêndice 11.1) é possível observar um novo sinal em δ_{H} 3,51 em relação ao espectro do precursor, desdobrado em um duplo duplete (*dd*) e integrado para um hidrogênio. No mapa de contornos HSQC (Apêndice 11.3), podemos observar que este hidrogênio está ligado a um carbono em δ_{C} 78,0, sugerindo a presença de

um carbono hidroximetínico. Assim, os novos sinais δ_C / δ_H 78,0 / 3,51 sugerem que um carbono metileno do AP foi hidroxilado.

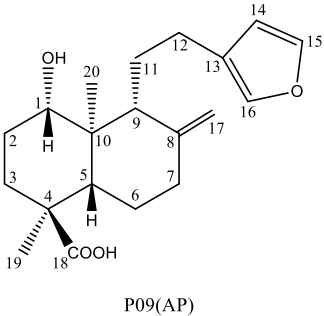
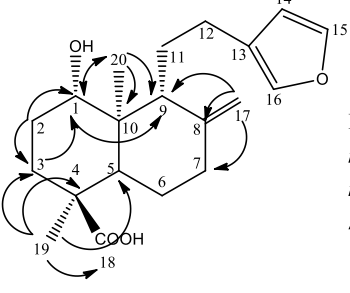
A posição do grupo hidroxílico foi atribuída em C-1 através da análise do mapa de contornos de HMBC (Apêndice 11.4), no qual o hidrogênio em δ_H 3,51 correlaciona-se com os carbonos em δ_C 10,9 (C-20) e 58,2 (C-9). Além disso, os hidrogênios da posição 2 (δ_H 1,68) e posição 3 (δ_H 1,90 e 1,53) também correlacionam-se com o carbono em δ_C 78,0 (C-1).

Nos espectros de NOESY 1D (Apêndice 36) não é possível observar correlações espaciais entre os hidrogênios metílicos das posições 19 (δ_H 1,10) e 20 (δ_H 0,78) com o hidrogênio da posição 1 (δ_H 3,51), no entanto, observa-se correlação com o hidrogênio da posição 5 (δ_H 1,94). Assim, a estereoquímica relativa do grupo hidroxílico em C-1 foi atribuída na orientação α .

O valor de rotação específica determinado para o metabólito P09(AP) foi igual a $[\alpha]_D^{25}$: + 16,67 (*c* 0,11; CH₃OH).

Um isômero do metabólito P09(AP) já foi descrito na literatura, correspondente ao ácido poliáltico hidroxilado na posição 3α , o qual foi isolado das partes aéreas de *Gutierrezia sarothrae* (BOHLMANN et al., 1984). Os dados espectroscópicos de P09(AP), sua estrutura química e correlações no HMBC estão apresentados na Tabela 18.

Tabela 18. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do metabólito P09(AP).

P09(AP) (CD_3OD)		HMBC
Estrutura química		
 <p>P09(AP)</p>	 <p>Correlações selecionadas no HMBC ($\text{H} \rightarrow \text{C}$)</p> <p>Fórmula molecular: $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_4$ m/z $[\text{M}-\text{H}]^-$ acurada: 331,1909 m/z $[\text{M}-\text{H}]^-$ exata: 331,1909 Δm: 0,00 ppm</p>	
Posição	δ_{C} ppm 151 MHz	δ_{H} ppm, mult., (J Hz) int. 600 MHz
1	78,0	3,51 <i>dd</i> (9,2; 6,6) 1H
2	30,0	1,68 <i>nd</i> *
3	36,4	1,90 <i>nd</i> *; 1,53 <i>nd</i> *
4	49,9	-
5	50,9	1,94 <i>nd</i> *
6	27,6	**
7	39,1	1,98 <i>nd</i> *; 2,34 <i>ddd</i> (12,5; 4,6; 2,3) 1H
8	149,3	-
9	58,2	1,92 <i>nd</i> *
10	45,9	-
11	28,0	1,37 <i>ddt</i> (12,9; 5,3; 2,6) 1H; 1,54 <i>nd</i> *
12	24,5	2,28 <i>dt</i> (14,6; 8,3) 1H; 2,50 <i>m</i> 1H
13	127,0	-
14	112,0	6,30 <i>dd</i> (0,8; 1,7) 1 H
15	143,8	7,37 <i>t</i> (1,7) 1H
16	139,9	7,22 <i>sl</i> 1H
17	107,8	4,62 <i>sl</i> 1H; 4,87 1H
18	183,3	-
19	16,0	1,10 <i>s</i> 3H
20	10,9	0,78 <i>s</i> 3H

**nd*: desdobramento de sinal não definido devido à sobreposição de sinais, δ_{H} determinado pelo HMQC.

** : sinal não determinado devido à sobreposição de sinais no espectro de RMN de ^1H .

4.6.10 Identificação estrutural do produto P10(AP)

O metabólito P10(AP) apresentou fórmula molecular igual a $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_4$, sendo, portanto, isômero dos metabólitos P08(AP) e P09(AP), com um átomo de oxigênio a mais na estrutura em relação ao seu precursor AP. O metabólito P10(AP) foi encontrado nos extratos de biotransformação dos fungos *C. echinulata*, *C. elegans* e *A. brasiliensis*.

Alterações semelhantes foram encontradas em seu espectro de RMN de ^1H (Apêndice 12.1) em relação ao espectro do metabólito P08(AP). Os sinais referentes à dupla exocíclica

estão ausentes e novos sinais dupletos (*d*) em δ_{H} 3,95 e 4,14, ambos ligados a um carbono em δ_{C} 64,7 surgem nos espectros de RMN de ^1H e bidimensionais. Tais alterações sugerem mais uma vez a conversão do carbono olefínico C-17 do AP em um grupo hidroximetilênico.

No entanto, a presença de um novo sinal duplete (*d*) em δ_{H} 5,72, correspondente a um hidrogênio ligado a um carbono em δ_{C} 124,7, indica que a ligação dupla está localizada entre carbonos diferentes de C-8 e C-9 como em P08(AP).

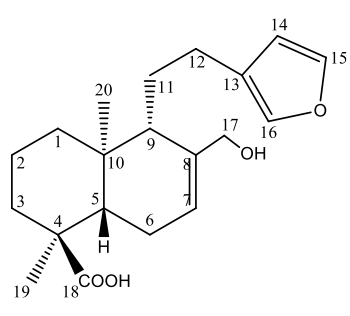
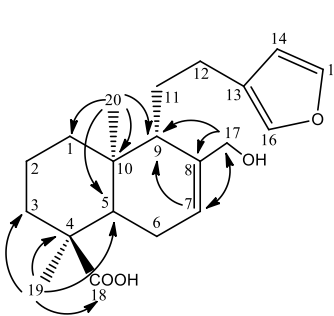
No mapa de contornos HMBC (Apêndice 12.3), é possível observar que os sinais em δ_{H} 3,95 e 4,14 (posição 17) se correlacionam com os sinais em δ_{C} 51,2 (C-9), 124,7 e 139,1. Assim, a posição dos carbonos sp^2 da dupla ligação está restrita aos carbonos C-7 e C-8.

Como o carbono em 124,1 ppm faz ligação com o hidrogênio em δ_{H} 5,72, este deslocamento foi atribuído à C-7, enquanto o carbono δ_{C} 139,1, que não faz ligações com hidrogênio, foi atribuído à C-8. Adicionalmente, o hidrogênio em δ_{H} 5,72 correlaciona-se com os carbonos em δ_{C} 64,7 (C-17) e 51,2 (C-9).

É possível observar que P10(AP) é um isômero de P08(AP) diferindo apenas na posição da ligação dupla no núcleo diterpênico. Supõe-se que o metabólito P03(AP) se origine da oxidação de P10(AP). A rotação específica determinada para este derivado foi igual a $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$: - 37,67 (*c* 0,02; CH_3OH).

O metabólito P10(AP) da série normal (ácido 17-hidroxi-lambertianico) foi isolado das partes aéreas de *Gutierrezia dracunculoides* e descrito pela primeira vez por Bohlmann e colaboradores (1981). A estrutura química e os dados espectroscópicos deste metabólito estão dispostos na Tabela 19, bem como as respectivas comparações com a literatura, na qual foram encontrados apenas os dados de RMN de ^1H .

Tabela 19. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do metabólito P10(AP).

Estrutura química		P10(AP)		HMBC
				<p>Correlações selecionadas no HMBC (H → C)</p> <p>Fórmula molecular: $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_4$</p> <p>$m/z$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ acurada: 331,1908</p> <p>m/z $[\text{M}-\text{H}]^-$ exata: 331,1909</p> <p>Δm: -0,30 ppm</p>
Dados obtidos (CD_3OD)		BOHLMANN et al., 1981 (CDCl_3)		
Posição	δ_{C} ppm 151 MHz	δ_{H} ppm, mult., (J Hz) int. 600 MHz	δ_{H} ppm, mult., (J Hz) 270 MHz	
1	38,1	**		
2	18,0	**		
3	37,2	1,59 <i>nd</i> *; 1,77 <i>nd</i> *		
4	46,5	-	-	
5	44,7	2,05 <i>nd</i> *		
6	25,0	1,78 <i>m</i> 1H; 2,04 <i>nd</i> *		
7	124,7	5,72 <i>d</i> (5,6) 1H	5,75 <i>d</i> (br) (4)	
8	139,1	-	-	
9	51,2	2,00 <i>m</i> 1H		
10	36,0	-	-	
11	27,3	**		
12	25,6	2,46 <i>dt</i> (14,5; 8,5) 1H; 2,72 <i>ddd</i> (14,7; 10,0, 4,7) 1H	2,47 <i>m</i> 2,73 <i>ddd</i> (15; 11; 5)	
13	125,5	-	-	
14	110,6	6,33 <i>m</i> 1H	6,30 <i>sl</i>	
15	142,3	7,38 <i>t</i> (1,6) 1H	7,36 <i>sl</i>	
16	138,6	7,29 <i>sl</i> 1H	7,25 <i>sl</i>	
17	64,7	3,95 <i>d</i> (12,1) 1H; 4,14 <i>d</i> (12,1) 1H	4,03 <i>d</i> (12); 4,20 <i>d</i> (12)	
18	182,0	-	-	
19	16,3	1,20 <i>s</i> 3H	1,24 <i>s</i>	
20	13,1	0,81 <i>s</i> 3H	0,80 <i>s</i>	

**nd*: desdobramento de sinal não definido devido à sobreposição de sinais, δ_{H} determinado pelo HMQC.

** : sinal não determinado devido à sobreposição de sinais no espectro de RMN de ^1H .

4.6.11 Identificação estrutural do produto P01(ADA)

No espectro de RMN de ^1H e ^{13}C do metabólito P01(ADA) (Apêndices 13.1 e 13.2, respectivamente), os sinais em δ_{H} 0,70 e δ_{C} 14,8 correspondentes ao grupo metílico da posição 20 do precursor ADA estão ausentes. Dois novos sinais dupletos (*d*) em δ_{H} 3,63 (1 H) e em δ_{H} 3,74 (1 H), ambos com constante de acoplamento igual 11,7 Hz, aparecem no espectro de RMN de ^1H .

É possível observar no mapa de correlações heteronucleares HMQC (Apêndice 13.3) que ambos os hidrogênios se apresentam ligados a um mesmo carbono em δ_{C} 61,1, o qual também é um sinal ausente no espectro de ^{13}C do precursor.

Tais dados aliados a fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{31}\text{O}_5$ obtida por EMAR sugerem a adição de um átomo de oxigênio na estrutura do metabólito. O deslocamento em δ_{C} 61,1 é compatível com o deslocamento de carbono carbinólico e os deslocamentos em δ_{H} 3,63 e 3,74 são compatíveis com deslocamentos esperados para hidrogênios de um grupo hidroximetilênico. O valor de $J = 11,7$ Hz é próximo ao valor típico de acoplamento de hidrogênios geminais em alcanos.

Como citado anteriormente, os sinais correspondentes ao grupo metílico da posição 20 estão ausentes, sugerindo-se a introdução do grupo hidroxílico nesta região da molécula, o que foi confirmado através das correlações encontradas no mapa de contornos HMBC (Apêndice 13.4), no qual os hidrogênios em δ_{H} 3,63 e 3,74 correlacionam-se com os carbonos em δ_{C} 33,4 (C-1), 59,1 (C-9) e 44,4 (C-10). Adicionalmente, C-20 está ligado a um centro estereogênico (C-10), o que explicaria os diferentes deslocamentos dos hidrogênios δ_{H} 3,63 e 3,74 da posição 20 (hidrogênios diastereotópicos).

O valor de rotação específica determinado para o metabólito P01(ADA) foi igual a $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$: + 36,67 (*c* 0,11; CH_3OH). Este derivado foi encontrado nos extratos de biotransformação dos fungos *C. echinulata* e *C. elegans*. Seus dados de RMN e sua estrutura química estão apresentados na Tabela 20.

Tabela 20. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do metabólito P01(ADA).

Estrutura química		HMBC
P01(ADA) (CD_3OD)		
P01(ADA)		<p>↷ Correlações selecionadas no HMBC (H→C)</p> <p>Fórmula molecular: $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}_5$</p> <p>$m/z$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ acurada: 351,2171</p> <p>m/z $[\text{M}-\text{H}]^-$ exata: 351,2172</p> <p>Δm: -0,28 ppm</p>
Posição	δ_{C} ppm 151 MHz	δ_{H} ppm, mult., (J Hz) 600 MHz
1	33,4	
2	19,7	1,59 <i>m</i> 1 H; 1,68 <i>m</i> 1H
3	38,3	1,60 <i>nd</i> * 1 H; 1,83 <i>td</i> (14,0; 13,3; 4,6) 1H
4	48,6	-
5	51,4	2,11 <i>dd</i> (2,9; 13,0) 1H
6	27,5	1,29 <i>m</i> 1H; 1,43 <i>qd</i> (12,9; 4,4) 1 H
7	39,1	2,06 <i>nd</i> 1H; 2,38 <i>nd</i> 1H
8	149,6	-
9	59,1	1,72 <i>nd</i> 1 H
10	44,4	-
11	23,8	
12	37,8	1,35 <i>m</i> 1H; 1,08 <i>m</i> 1H
13	32,1	1,90 <i>td</i> (8,1; 5,8; 1,7) 1H
14	43,6	2,06 <i>nd</i> 1H; 2,25 <i>dd</i> (14,5; 6,2) 1H
15	178,0	-
16	20,1	0,96 <i>d</i> (6,6) 3H
17	108,2	4,71 <i>br s</i> 1H; 4,90 <i>br s</i> 1H
18	182,8	-
19	17,5	1,16 <i>s</i> 3H
20	61,1	3,63 <i>d</i> (11,7) 1H; 3,74 <i>d</i> (11,7) 1H

**nd*: desdobramento de sinal não definido devido à sobreposição de sinais, δ_{H} determinado pelo HMQC.

***s*: sinal não determinado devido à sobreposição de sinais no espectro de RMN de ^1H .

4.6.12 Identificação estrutural do produto P02(ADA)

A fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}_5$ obtida para o metabólito P02(ADA) indica que o mesmo é um isômero de P01(ADA) e também é um derivado oxigenado de biotransformação.

No espectro de RMN de ^1H do metabólito (Apêndice 14.1), os sinais referentes aos hidrogênios vinílicos da dupla exocíclica em δ_{H} 4,50 e 4,82 do precursor estão ausentes, bem como os sinais em δ_{C} 148,1 e 107,1. Dois novos sinais dupletos podem ser observados em δ_{H} 3,88 e 4,12, correspondentes a dois hidrogênios ligados a um mesmo carbono em δ_{C} 63,1.

Os novos sinais sugerem a conversão do carbono olefínico C-17 do precursor em um carbono hidroximetilênico. A constante de acoplamento igual a 11,7 Hz para os dois novos

dupletos são compatíveis com acoplamento de hidrogênios geminais em alcanos, reforçando a ausência da dupla ligação entre C-8 e C-17.

No entanto, o espectro de RMN de ^{13}C (Apêndice 14.2) do metabólito apresenta dois novos sinais característicos de carbonos sp^2 em 130,7 e 144,9 ppm, indicando que a ligação dupla está presente em outra região da molécula.

Através da análise do mapa de contornos HMBC (Apêndice 14.4), os carbonos sp^2 foram atribuídos em C-8 e C-9, uma vez que os hidrogênios em δ_{H} 2,0 (H-5) e 1,03 (H-20) se correlacionam com o sinal em δ_{C} 144,9 (C-9), além dos sinais em δ_{H} 2,11 e 2,22 (H-7a e H-7b) também se correlacionarem com os sinais em δ_{C} 130,7 (C-8) e 144,9 (C-9). A hidroxilação na posição 17 foi confirmada através das correlações dos sinais em δ_{H} 3,88 e 4,12 com os sinais em δ_{C} 29,3 (C-7), 130,7 (C-8) e 144,9 (C-9).

Uma estrutura semelhante ao metabólito P02(ADA) foi obtida através do tratamento do ADA da série normal com ácido acético e ácido bromídrico, levando à isomerização da ligação dupla originalmente entre C-8 e C-17 para a posição entre C-8 e C-9 (PERTINO et al., 2011). O derivado obtido denominado ácido $\Delta 8(9)$ junicedrico, no entanto, não apresenta o grupo hidroxílico da posição 17.

O valor de rotação específica determinado para o metabólito P02(ADA) foi igual a $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$: + 2,24 (*c* 1,71; CH_3OH). Este derivado foi o componente majoritário dos extratos de biotransformação com os fungos *C. echinulata* e *C. elegans*. Seus dados espectroscópicos e estrutura química estão dispostos na Tabela 21.

Tabela 21. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do metabólito P02(ADA).

P02(ADA) (CD_3OD)		
Estrutura química	HMBC	
<p>P02(ADA)</p>	<p>↪ Correlações selecionadas no HMBC (H→C)</p> <p>Fórmula molecular: $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}_5$ m/z $[\text{M}-\text{H}]^-$ acurada: 351,2175 m/z $[\text{M}-\text{H}]^-$ exata: 351,2172 Δm: 0,85 ppm</p>	
Posição	δ_{C} ppm 125 MHz	δ_{H} ppm, mult., (J Hz) 500 MHz
1	37,2	**
2	19,3	**
3	38,0	1,59 <i>nd</i> *; 1,77 <i>nd</i> *
4	48,6	-
5	47,5	2,00 <i>dd</i> (12,6; 2,0) 1H
6	22,6	**
7	29,3	2,11 <i>nd</i> *; 2,22 <i>nd</i> *
8	130,7	-
9	144,9	-
10	39,6	-
11	25,8	**
12	39,9	**
13	32,6	1,91 <i>m</i> 1H
14	42,5	2,13 <i>nd</i> *; 2,27 <i>nd</i> *
15	177,2	-
16	20,0	1,01 <i>d</i> (6,7) 3H
17	63,1	3,88 <i>d</i> (11,7) 1H, 4,12 <i>d</i> (11,7) 1H
18	182,7	-
19	17,1	1,18 <i>s</i> 3H
20	20,8	1,03 <i>s</i> 3H

**nd*: desdobramento de sinal não definido devido à sobreposição de sinais, δ_{H} determinado pelo HMQC.

** : sinal não determinado devido à sobreposição de sinais no espectro de RMN de ^1H .

4.6.13 Identificação estrutural do produto P03(ADA)

Através da análise por EMAR, verificou-se que o metabólito P03(ADA) é um isômero de P01(ADA) e P02(ADA). Seus espectros de RMN (Apêndice 15) apresentam mudanças semelhantes às mudanças encontradas nos espectros de P02(ADA).

Os novos sinais em δ_H 3,92 e 4,07, ligados a um carbono em δ_C 64,2, correspondem aos dois hidrogênios do novo carbono hidroximetilênico, assim como ocorrido em P02(ADA).

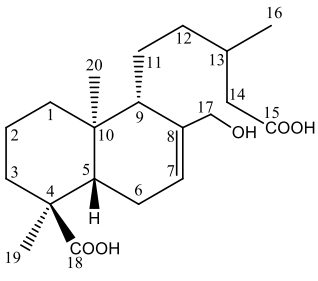
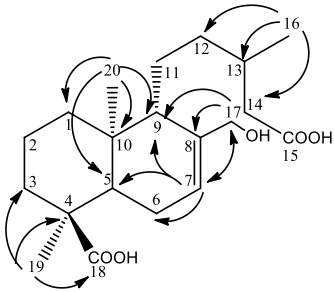
No entanto, outro sinal no espectro de RMN de 1H (Apêndice 15.1) em δ_H 5,70, correspondente a um hidrogênio ligado a um carbono em δ_C 123,4, indica que a ligação dupla está em posição diferente no anel em relação à P02(ADA).

A análise do mapa de contornos HMBC (Apêndice 15.3) indicou que o sinal em δ_H 5,70 se correlaciona com os sinais em δ_C 44,7 (C-5), 25,0 (C-6), 52,6 (C-9) e 64,2 (C-17). Assim, os sinais δ_H/δ_C 5,70 / 123,4 foram atribuídos na posição 7.

Os hidrogênios em δ_H 3,92 e 4,07 se correlacionam com os carbonos em δ_C 52,6 (C-9), 123,4 (C-7) e 139,2, o qual foi atribuído à C-8. As correlações encontradas confirmam a posição de hidroxilação em C-17 e a posição da ligação dupla entre os carbonos C-7-C-8.

O valor de rotação específica determinado para o metabólito P03(ADA) foi igual a $[\alpha]_D^{25}$: - 10,08 (*c* 0,58; CH₃OH). Este derivado foi detectado no extrato de biotransformação do fungo *C. echinulata*. Sua estrutura química, correlações no HMBC e dados de RMN de 1H e ^{13}C estão apresentados na Tabela 22.

Tabela 22. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do metabólito P03(ADA).

Estrutura química		HMBC
P03(ADA) (CD_3OD)		
		
P03(ADA)		<p>↪ Correlações selecionadas no HMBC (H→C)</p> <p>Fórmula molecular: $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}_5$</p> <p>$m/z$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ acurada: 351,2172</p> <p>m/z $[\text{M}-\text{H}]^-$ exata: 351,2172</p> <p>Δm: 0,00 ppm</p>
Posição	δ_{C} ppm 125 MHz	δ_{H} ppm, mult., (J Hz) 500 MHz
1	35,6	**
2	17,8	**
3	37,0	**
4	45,6	-
5	44,7	2,05 <i>m</i> 1H
6	25,0	**
7	123,4	5,70 <i>sl</i> 1H
8	139,2	-
9	52,6	1,89 <i>nd</i> *
10	38,1	-
11	26,7	**
12	38,6	**
13	30,8	1,90 <i>m</i> 1H
14	41,6	2,11 <i>m</i> 1H; 2,28 <i>m</i> 1H
15	176,0	-
16	18,7	0,99 <i>d</i> (6,6) 3H
17	64,2	3,92 <i>d</i> (12,3) 1H, 4,07 <i>d</i> (12,3) 1H
18	181,1	-
19	16,2	1,22 <i>s</i> 3H
20	13,1	0,84 <i>s</i> 3H

**nd*: desdobramento de sinal não definido devido à sobreposição de sinais, δ_{H} determinado pelo HMQC.

** : sinal não determinado devido à sobreposição de sinais no espectro de RMN de ^1H .

4.6.14 Identificação estrutural do produto P05(ADA)

Para o metabólito P05(ADA) foi obtida a fórmula molecular $C_{22}H_{34}O_6$, indicando a inserção pelo fungo *C. echinulata* de dois novos átomos de carbono, dois novos átomos de oxigênio e dois hidrogênios na estrutura do precursor ADA.

No espectro de RMN de 1H (Apêndice 16.1), os sinais referentes aos hidrogênios da dupla exocíclica estão ausentes, sugerindo uma alteração no grupo da posição 17.

Os novos sinais dupletos (*d*) em δ_H 4,42 e 4,61, correspondentes a dois hidrogênios ligados a um carbono em δ_C 66,2, indica a conversão do carbono olefínico C-17 em um carbono hidroximetilênico.

A presença dos sinais em δ_C 126,6 e 148,3 no espectro de RMN de ^{13}C (Apêndice 16.2) indica a presença de uma ligação dupla, antes entre C-8 e C-17 no precursor ADA. No mapa de contornos HMBC (Apêndice 16.4) é possível observar que os hidrogênios em δ_H 4,42 e 4,61 (posição 17) e δ_H 1,95 e 2,25 (posição 11) se correlacionam com os carbonos da ligação dupla (δ_C 126,6 e 148,3). Os hidrogênios metílicos da posição 20 (δ_H 1,01) se correlacionam com o sinal em δ_C 148,3, sendo este deslocamento portanto atribuído à C-9 e o deslocamento em 126,6 ppm atribuído à C-8.

No espectro de RMN de ^{13}C do metabólito, verificou-se que os dois novos carbonos da estrutura apresentam deslocamentos em 20,9 e 173,1 ppm. O novo sinal simpleto em δ_H 2,02, correspondente a três hidrogênios, correlaciona-se com o carbono em δ_C 20,9 no HSQC (Apêndice 16.3), indicando a introdução de um grupo metílico na estrutura.

O outro novo sinal em δ_C 173,1 indica a introdução de um carbono com deslocamento na região característica de carbonila de ácido carboxílico e éster (155-185 ppm).

É possível observar no mapa de contornos HMBC que o sinal em δ_H 2,02 está correlacionado com o carbono em δ_C 173,1. Os sinais em δ_H 4,42 e 4,61 (posição 17) também se correlacionam com o sinal em δ_C 173,1, sugerindo a inserção de um grupo éster (acetato) na estrutura do ADA.

O valor de rotação específica determinado para o derivado P05(ADA) foi igual a $[\alpha]_D^{25}$: - 45,51 (*c* 0,41; CH_3OH). Sugere-se que este metabólito de fase II tenha se originado do metabólito de fase I P02(ADA), também encontrado no extrato de biotransformação do fungo *C. echinulata*.

Os dados espectroscópicos e a estrutura química com os dados de correlações no HMBC de P05(ADA) estão apresentados na Tabela 23.

Tabela 23. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do metabólito P05(ADA).

Estrutura química		HMBC
P05(ADA) (CD_3OD)		
<p style="text-align: center;">P05(ADA)</p>		<p style="text-align: center;">↪ Correlações selecionadas no HMBC (H→C)</p> <p>Fórmula molecular: $\text{C}_{22}\text{H}_{34}\text{O}_6$ m/z $[\text{M}-\text{H}]^-$ acurada: 393,2279 m/z $[\text{M}-\text{H}]^-$ exata: 393,2277 Δm: 0,51 ppm</p>
Posição	δ_{C} ppm 125 MHz	δ_{H} ppm, mult., (J Hz) 500 MHz
1	37,1	1,28 <i>nd</i> *; 1,90 <i>nd</i> *
2	19,3	**
3	38,0	1,57 <i>nd</i> *; 1,75 <i>nd</i> *
4	48,5	-
5	47,3	1,97 <i>dd</i> (1,9; 12,5) 1H
6	22,4	1,32 <i>nd</i> *; 1,58 <i>nd</i> *
7	29,7	**
8	126,6	-
9	148,3	-
10	39,8	-
11	26,0	1,95 <i>nd</i> *; 2,25 <i>nd</i> *
12	39,7	1,22 <i>m</i> 1H; 1,49 <i>m</i> 1H
13	32,6	1,90 <i>m</i> 1H
14	42,5	2,11 <i>nd</i> *; 2,27 <i>nd</i> *
15	177,1	-
16	19,9	0,98 <i>d</i> (6,7) 3H
17	66,2	4,42 <i>d</i> (11,8) 1H; 4,61 <i>d</i> (11,8) 1H
18	182,6	-
19	17,1	1,16 <i>s</i> 3H
20	20,7	1,01 <i>s</i> 3H
21	173,1	-
22	20,9	2,02 <i>s</i> 3H

**nd*: desdobramento de sinal não definido devido à sobreposição de sinais, δ_{H} determinado pelo HMQC.

** : sinal não determinado devido à sobreposição de sinais no espectro de RMN de ^1H .

4.6.15 Identificação estrutural do produto P06(ADA)

O metabólito P06(ADA) é um isômero de P05(ADA). Alterações semelhantes foram encontradas no espectro de RMN de ^1H e ^{13}C (Apêndices 17.1 e 17.2, respectivamente), sugerindo a adição do mesmo grupo acetato (novos sinais correspondentes ao grupo metílico em $\delta_{\text{H}} / \delta_{\text{C}}$ 2,04 / 21,0 e novo sinal em δ_{C} 172,8, o qual se correlaciona com os hidrogênios em δ_{H} 2,04).

No espectro de RMN de ^1H , os sinais correspondentes aos hidrogênios vinílicos da dupla exocíclica do precursor ADA também estão ausentes. Pode-se observar novos sinais dupletos (*d*) em δ_{H} 4,42 e 4,57, ambos integrados para 1 H e com as mesmas constantes de acoplamento ($J = 12,2$ Hz, próxima ao valor típico de acoplamento de hidrogênios geminais em alcanos). Ambos hidrogênios em δ_{H} 4,42 e 4,57 estão ligados a um mesmo carbono em δ_{C} 68,7 e se correlacionam com o carbono em δ_{C} 172,8 e 54,1 (C-9). Tais modificações sugerem a adição do grupo acetato na posição 17, assim como em P05(ADA).

No entanto, a presença de um sinal adicional no espectro de RMN de ^1H em δ_{H} 5,77 sugere diferente posição da ligação dupla no núcleo diterpênico em relação à P05(ADA). No mapa de contornos HMQC (Apêndice 17.3) é possível observar que o hidrogênio em δ_{H} 5,77 está ligado a um carbono em δ_{C} 129,5. O sinal em δ_{H} 5,77 correlaciona-se com os carbonos em δ_{C} 45,9 (C-5), 26,5 (C-6), 54,1 (C-9) e 68,7 (C-17) no HMBC (Apêndice 17.4). Logo, os sinais em $\delta_{\text{H}} / \delta_{\text{C}}$ 5,77 / 129,5 foram atribuídos na posição 7.

O outro carbono sp^2 em δ_{C} 135,8 correlaciona-se com os hidrogênios em δ_{H} 1,79 e 2,05 (posição 6), 1,31 e 1,49 (posição 11) e 4,42 e 4,57 (posição 17) no HMBC, sendo portanto atribuído na posição 8. Assim, a dupla ligação em P06(ADA) foi atribuída entre C7-C-8, sendo a única diferença estrutural em relação ao seu isômero P05(ADA).

O valor de rotação específica determinado para o derivado P06(ADA) foi igual a $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$: - 30,04 (*c* 0,08; CH_3OH). Sugere-se que este metabólito de fase II seja proveniente da acetilação do metabólito oxigenado de fase I P03(ADA). A estrutura química e os dados de RMN do derivado P06(ADA) estão apresentados na Tabela 24.

Tabela 24. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do metabólito P06(ADA).

P06(ADA) (CD_3OD)		HMBC
Estrutura química		
<p>P06(ADA)</p>		<p>↷ Correlações selecionadas no HMBC (H → C)</p> <p>Fórmula molecular: $\text{C}_{22}\text{H}_{34}\text{O}_6$ m/z $[\text{M}-\text{H}]^-$ acurada: 393,2279 m/z $[\text{M}-\text{H}]^-$ exata: 393,2277 Δm: 0,51 ppm</p>
Posição	δ_{C} ppm 151 MHz	δ_{H} ppm, mult., (J Hz) 600 MHz
1	39,4	**
2	19,1	1,57 <i>m</i> 2H
3	38,5	1,61 <i>nd</i> *; 1,76 <i>dd</i> (13,3; 3,6) 1H
4	47,4	-
5	45,9	2,05 <i>nd</i> *
6	26,5	1,79 <i>nd</i> *; 2,05 <i>nd</i> *
7	129,5	5,77 <i>dd</i> (3,2; 2,0) 1H
8	135,8	-
9	54,1	1,86 <i>nd</i> *
10	37,4	-
11	25,1	1,31 <i>nd</i> *; 1,49 <i>nd</i> *
12	39,6	**
13	32,3	1,90 <i>q</i> (6,8) 1H
14	43,3	2,12 <i>m</i> 1H; 2,24 <i>dd</i> (14,7; 6,6) 1H
15	177,6	-
16	20,1	0,96 <i>d</i> (6,7) 3H
17	68,7	4,42 <i>d</i> (12,2) 1H; 4,57 <i>d</i> (12,2) 1H
18	182,5	-
19	17,4	1,22 <i>s</i> 3H
20	14,3	0,83 <i>s</i> 3H
21	172,8	-
22	21,0	2,04 <i>s</i> 3H

**nd*: desdobramento de sinal não definido devido à sobreposição de sinais, δ_{H} determinado pelo HMQC.

** : sinal não determinado devido à sobreposição de sinais no espectro de RMN de ^1H .

4.7 Comparação do metabolismo dos fungos e análise das possíveis rotas metabólicas

Os fungos utilizados apresentaram diferenças quanto a sua capacidade de metabolizar os diterpenos AP e ADA, conforme apresentado na Figura 21.

Os fungos do gênero *Mucor* já foram reportados como bons catalisadores de reações em terpenoides (SILVA et al., 2013), e o fungo *M. rouxii* especificamente foi capaz de promover hidroxilações em diterpenos do tipo labdano (SILVA, 2013) e isomerização da ligação dupla endocíclica em diterpenos do tipo primarano (SEVERIANO et al., 2010).

Apesar das evidências do potencial desta linhagem em catalisar reações em diterpenos, não foram encontrados produtos de biotransformação em quantidades satisfatórias nos extratos com *M. rouxii*.

Os fungos do gênero *Cunninghamella* são modelos clássicos para estudos de biotransformação e há trabalhos que indicam sua capacidade de promover diferentes tipos de reações em diterpenoides (BHATTI & KHERA, 2014; MAFEZOLI et al., 2014; DENG et al., 2012; CANO, RAMÍREZ-APAN & DELGADO, 2011). Os resultados obtidos neste trabalho corroboram com os dados da literatura, uma vez que ambos os fungos *C. echinulata* e *C. elegans* foram capazes de metabolizar os precursores AP e ADA.

Diferentes espécies do gênero *Aspergillus* também foram reportadas como eficientes biocatalisadores de diterpenoides, incluindo *A. ochraceus* (PORTO et al., 2013; HE et al., 2011), *A. flavus* (SURA et al., 2015), *A. alliaceus* (FRIJA, FRADE & AFONSO, 2011) e *A. niger* (CANO, RAMÍREZ-APAN & DELGADO, 2011). Como citado anteriormente, o fungo *A. brasiliensis* foi capaz de metabolizar o AP, mas não o ADA.

De maneira geral, as reações mais comuns realizadas pelos fungos foram oxidações, porém reduções e isomerização da ligação dupla também foram detectadas no metabolismo de fase I. Todos os metabólitos de biotransformação identificados foram oxidados em maior ou menor grau.

Diterpenos possuem poucos sítios reativos para modificações químicas por semi-síntese (TAKAHASHI et al., 2014), no entanto, diferentes carbonos dos diterpenos utilizados foram suscetíveis às enzimas microbianas. Como esperado, o sítio mais reativo para as modificações enzimáticas foi o carbono da posição 17 da ligação dupla exocíclica. O C-1 foi o segundo carbono mais reativo no AP, enquanto no ADA não houveram modificações em C-1, mas no carbono do grupo metílico em C-20. No AP também ocorreram hidroxilações em C-2.

As hidroxilações em diterpenoides estão entre as reações enzimáticas mais comuns reportadas na literatura. Especificamente em labdanos, estudos indicam que o tipo de hidroxilação mais frequente promovida por micro-organismos é a 3β -hidroxilação (FRIJA, FRADE & AFONSO, 2011; SILVA et al., 2013; MENDOZA et al., 2015; MARTINS et al., 2015; MONTEIRO et al., 2017), porém as posições 1β , 1α , 2α , 6α , 7α , 18 e 19 de labdanos também demonstraram-se suscetíveis (FRIJA, FRADE & AFONSO, 2011; SILVA et al., 2013; MONTEIRO et al., 2017).

Em especial fungos do gênero *Aspergillus* foram capazes de introduzir grupos hidroxílicos em diferentes diterpenoides (MARQUINA et al., 2009, HE et al., 2011, PORTO et al., 2013). Assim, as reações de fase I do fungo *A. brasiliensis* sobre o AP corroboram com os dados da literatura.

Em relação ao metabolismo de fase II, os fungos *C. echinulata* e *A. brasiliensis* foram capazes de introduzir grupos acetato em ambos os precursores. Há estudos na literatura relatando acetilação de diterpenos estemodanos por *Mucor plumbeus* (FRAGA et al., 2004) e *Beauveria bassiana* (FRIJA, FRADE & AFONSO, 2011). A introdução de grupos acetato em esqueletos diterpenoides também já foi relatada com o uso de lipases isoladas de *Candida cylindracea* (GARCÍA-GRANADOS et al., 2004) e *Candida antarctica* B (CHEN et al., 2011).

Apesar da produção de metabólitos de fase I com hidroxilas passíveis de acetilação em diferentes posições no núcleo diterpênico, a introdução do grupo acetato ocorreu somente na posição 17 dos metabólitos elucidados.

Os extratos de biotransformação do ADA com os fungos *C. echinulata* e *C. elegans* apresentaram um perfil cromatográfico semelhante e houve coincidência de alguns produtos, incluindo o majoritário P02(ADA) em ambos os extratos.

No entanto, os fungos do gênero *Cunninghamella* produziram diferentes produtos majoritários de biotransformação do AP, os quais não foram isolados, porém foram detectados por EMAR. O componente majoritário produzido por *C. echinulata* apresentou fórmula molecular igual a $C_{20}H_{30}O_6$, assim como P01(AP), porém com diferente tempo de retenção. O produto majoritário do extrato de biotransformação com *C. elegans* apresentou fórmula molecular igual a $C_{20}H_{28}O_5$, assim como o majoritário P02(AP) do extrato de biotransformação com *A. brasiliensis*, porém com diferente tempo de retenção.

Os micro-organismos são considerados eficientes biocatalisadores de reações estereoseletivas. As enzimas do fungo *A. brasiliensis* apresentaram estereoseletividade na introdução de grupos hidroxílicos na configuração α em C-1, como pode ser observado nos metabólitos P01(AP), P02(AP), P03(AP), P05(AP), P06(AP), P07(AP) e P09(AP). No entanto, a mesma estereoseletividade não foi observada em C-2, posição na qual o fungo *A. brasiliensis* introduziu grupos α -OH e β -OH, como pode ser observado em P07(AP) e P05(AP), respectivamente.

Não foram encontradas referências na literatura para a maioria dos produtos de biotransformação descritos na seção 4.6, com exceção de P04(AP) e P10(AP). Todos os derivados obtidos a partir do ADA são estruturas ainda não descritas na literatura. Assim, reforça-se a utilização da biotransformação como ferramenta para obtenção de novas estruturas químicas.

A seguir, é proposta uma possível rota metabólica com os fungos para a produção dos derivados de biotransformação do AP e ADA nas Figuras 25 e 27, respectivamente. Como pode ser observado na Figura 26, é sugerida a formação de um intermediário com anel epóxido para a produção do derivado P04(AP). Este intermediário sofreria uma protonação no oxigênio do anel epóxido seguido por uma hidratação para a formação simultânea do grupo hidroximetilênico e do grupo hidroxílico ligados à C-8 (Figura 26). Vale ressaltar que a primeira etapa de formação do anel epóxido ocorreria por um ataque enzimático por cima, seguido da segunda etapa de abertura do anel por baixo. Assim, pela proposta desta rota de biossíntese de P04(AP), reforça-se a proposição da estereoquímica do grupo hidroximetilênico na orientação α e do grupo hidroxílico na orientação β em C-8.

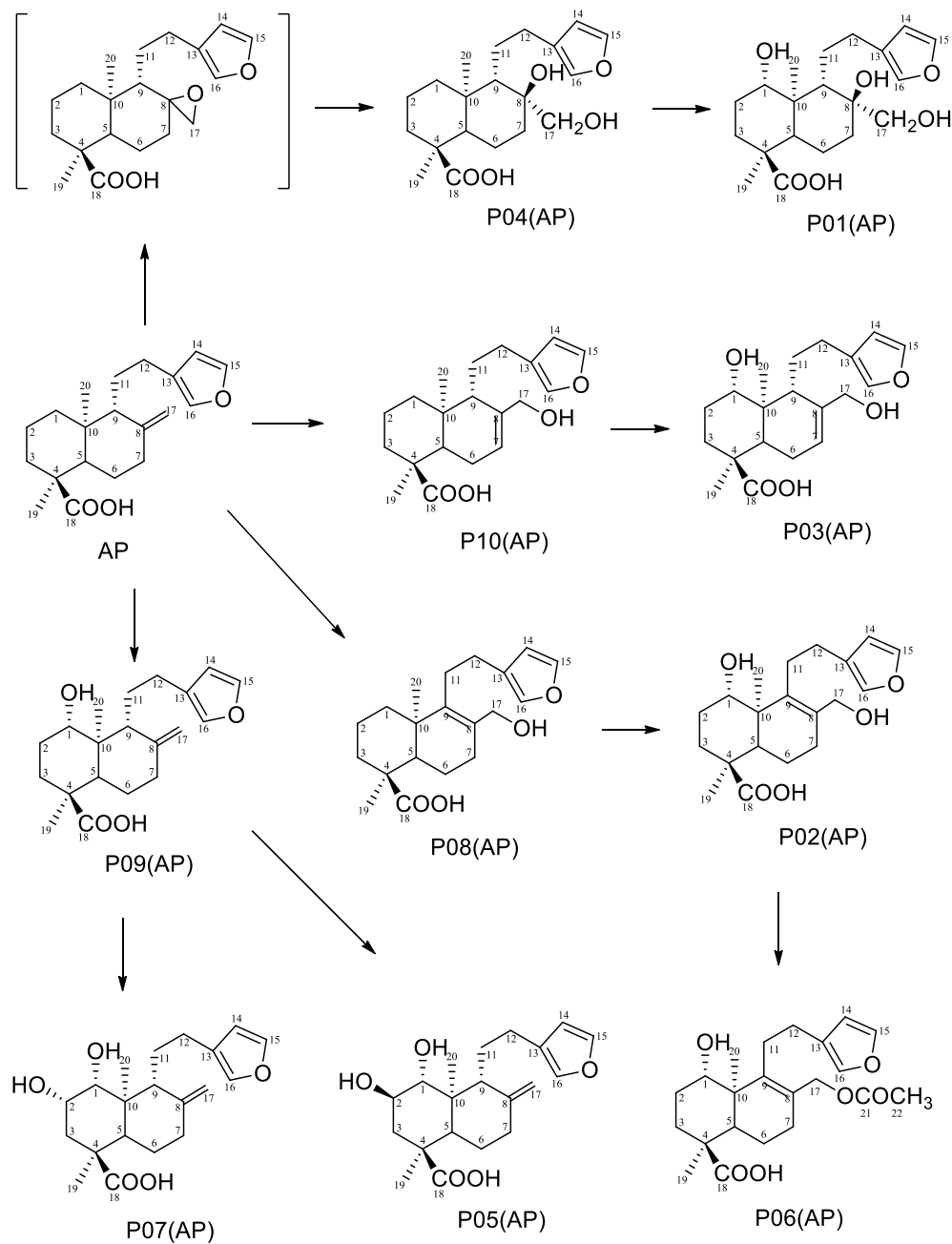


Figura 25. Rotas metabólicas sugeridas para a produção de derivados de biotransformação do ácido *ent*-poliáltico com o fungo *A. brasiliensis*.

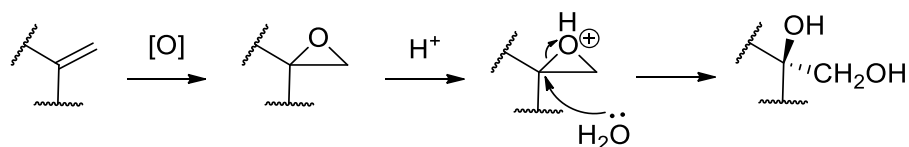


Figura 26. Mecanismo enzimático proposto para oxidação da ligação dupla exocíclica do ácido *ent*-poliáltico pelos fungos *A. brasiliensis*, *C. elegans* e *C. echinulata* para formação do derivado P04(AP).

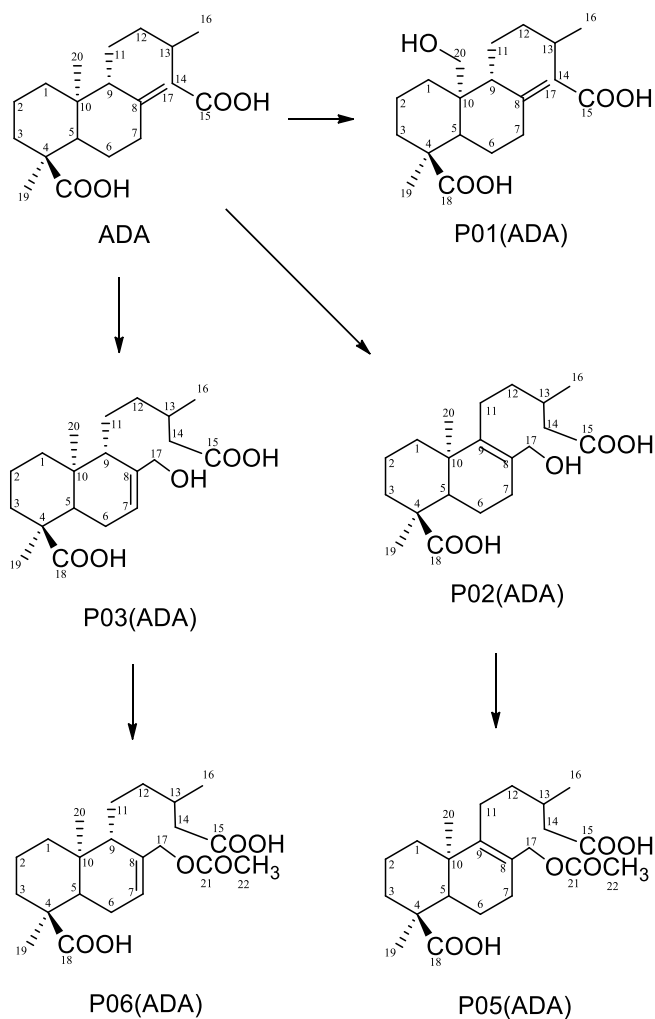


Figura 27. Rotas metabólicas sugeridas para a produção de derivados de biotransformação do ácido *ent*-diidroagático com o fungo *C. echinulata*.

4.8 Biotransformação com os micro-organismos do trato gastrointestinal

4.8.1 Biotransformações em meio de cultura líquido

Foram realizadas biotransformações com as bactérias *B. longum*, *B. pseudocatenulatum*, *Bifidobacterium sp.*, *L. acidophilus*, *L. fermentum*, *E.coli*, levedura *S. boulardii*, cultura mista com *B. longum*, *B. pseudocatenulatum* e *B. bifidum*, cultura mista com *L. acidophilus*, *L. fermentum*, *L. johnsonii*, *L. rhamnosus* e *L. delbrueckii* e cultura mista com *E. coli*, *S. boulardii*, *L. fermentum* e *L. acidophilus*.

De acordo com resultados prévios obtidos por nosso grupo de pesquisa, determinou-se o alcance da fase estacionária após 12 h de incubação para as bactérias do gênero *Lactobacillus* e bactéria *E. coli* e após 36 h para as bactérias do gênero *Bifidobacterium*.

Foi analisada a influência da adição dos diterpenos em diferentes fases do crescimento bacteriano. Sabe-se que o metabolismo do micro-organismo pode ser afetado diretamente de acordo com sua fase de desenvolvimento, uma vez que a transdução de sinais, síntese e secreção de proteínas são diferentes nas fases exponencial e estacionária, promovendo mudanças na maquinaria celular (ISHIHAMA, 1999).

Assim, para as bactérias do gênero *Bifidobacterium*, as substâncias foram adicionadas juntamente com o inóculo no caldo de cultura (T_0 – fase exponencial) ou após 36 h de crescimento bacteriano (T_{36} – fase estacionária). Os processos de biotransformação foram conduzidos por 24 e 48 h.

A análise dos cromatogramas indicou que a concentração de substrato nas biotransformações iniciadas na fase estacionária foi menor do que na fase exponencial. A adição dos diterpenos na fase exponencial também promoveu maior taxa de morte celular, que foi monitorada através do crescimento de colônias no ágar.

Os valores de pH dos processos também foram verificados e estão apresentados na Tabela 25.

Tabela 25. Valores de pH do meio de cultura com *B. pseudocatenulatum* após adição dos substratos na fase exponencial (T_0) e na fase estacionária (T_{36}).

Amostra	pH
Meio MRS	6,0
Controle AP (meio + diterpeno)	6,0
Controle ADA (meio + diterpeno)	6,0
<i>B. pseudocatenulatum</i> + DMSO	5,0
<i>B. pseudocatenulatum</i> + AP T_0 24 h	6,0
<i>B. pseudocatenulatum</i> + AP T_0 48 h	6,0
<i>B. pseudocatenulatum</i> + ADA T_0 24 h	6,0
<i>B. pseudocatenulatum</i> + ADA T_0 48 h	6,0
<i>B. pseudocatenulatum</i> + AP T_{36} 24 h	5,5
<i>B. pseudocatenulatum</i> + AP T_{36} 48 h	5,0
<i>B. pseudocatenulatum</i> + ADA T_{36} 24 h	5,5
<i>B. pseudocatenulatum</i> + ADA T_{36} 48 h	5,0

O ácido láctico é um dos principais produtos do metabolismo de *B. pseudocatenulatum*, assim, uma queda no pH do meio de cultura indica que a mesma está metabolicamente ativa, como observado no controle com DMSO e nos processos conduzidos na fase estacionária (T_{36}). Diferentemente, quando o substrato foi adicionado na fase exponencial (T_0), o valor de pH ao final do processo foi o mesmo valor do pH inicial (6,0), indicando ausência de atividade metabólica.

O maior consumo dos diterpenos na fase estacionária pode estar associado tanto ao maior número de células bacterianas viáveis para consumir o substrato quanto à maior disponibilidade das enzimas nesta fase, uma vez que as bactérias já não se encontram em intenso processo de multiplicação devido a menor disponibilidade de nutrientes no meio. Assim, optou-se pela adição dos substratos no início da fase estacionária.

Para os micro-organismos anaeróbios, os processos de biotransformação foram conduzidos inicialmente por períodos de 12 h. Como não foi detectado nenhum possível produto de biotransformação nos extratos das culturas, optou-se por aumentar o tempo de exposição aos substratos para 24 h.

Os perfis cromatográficos obtidos por CLAE-CAD dos extratos referentes aos controles do micro-organismo incubado apenas com o solvente DMSO e dos diterpenos no meio de cultura estão apresentados na Figura 28.

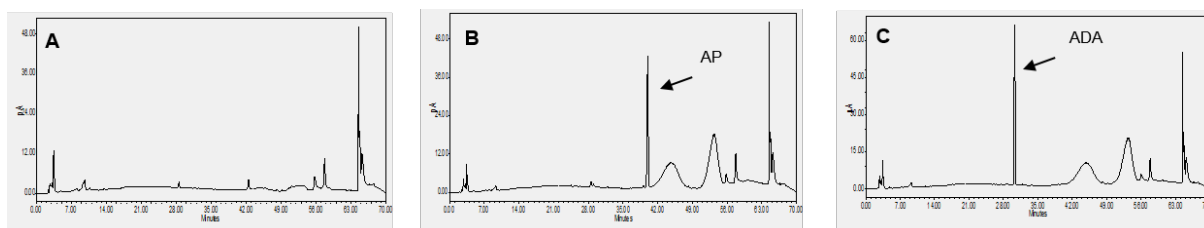


Figura 28. Cromatogramas obtidos por CLAE-CAD dos controles **A)** micro-organismo com o solvente DMSO, **B)** ácido *ent*-poliáctico no meio de cultura MRS e **C)** ácido *ent*-diidroagático no meio de cultura MRS, após 24 h de incubação.

Condições cromatográficas: Cromatógrafo Waters, Coluna de fase reversa C-18 Kromasil[®], fase móvel constituída por gradiente de acetonitrila e 0,1% de ácido acético em água (20-100% fase orgânica em 60 min), vazão de 1 mL/min, volume de injeção 30 μ L, análise à temperatura ambiente.

Foi apresentado apenas o controle da bactéria *B. pseudocatenulatum*, porém todos os micro-organismos analisados apresentaram perfis de controle semelhante, sem nenhuma produção significativa de metabólitos quando incubados com DMSO.

A análise da estabilidade dos diterpenos no meio de cultura MRS indicou que os precursores foram estáveis ao longo de todo o período de incubação.

Os cromatogramas dos extratos de biotransformação para os micro-organismos anaeróbios estão apresentados na Figura 29. Como é possível observar, nenhum processo levou a formação de derivados em quantidades detectáveis por CLAE-CAD. Também foi realizada uma varredura em diferentes comprimentos de onda no UV (de 190 a 400 nm) e nenhum novo pico foi detectado em relação aos controles.

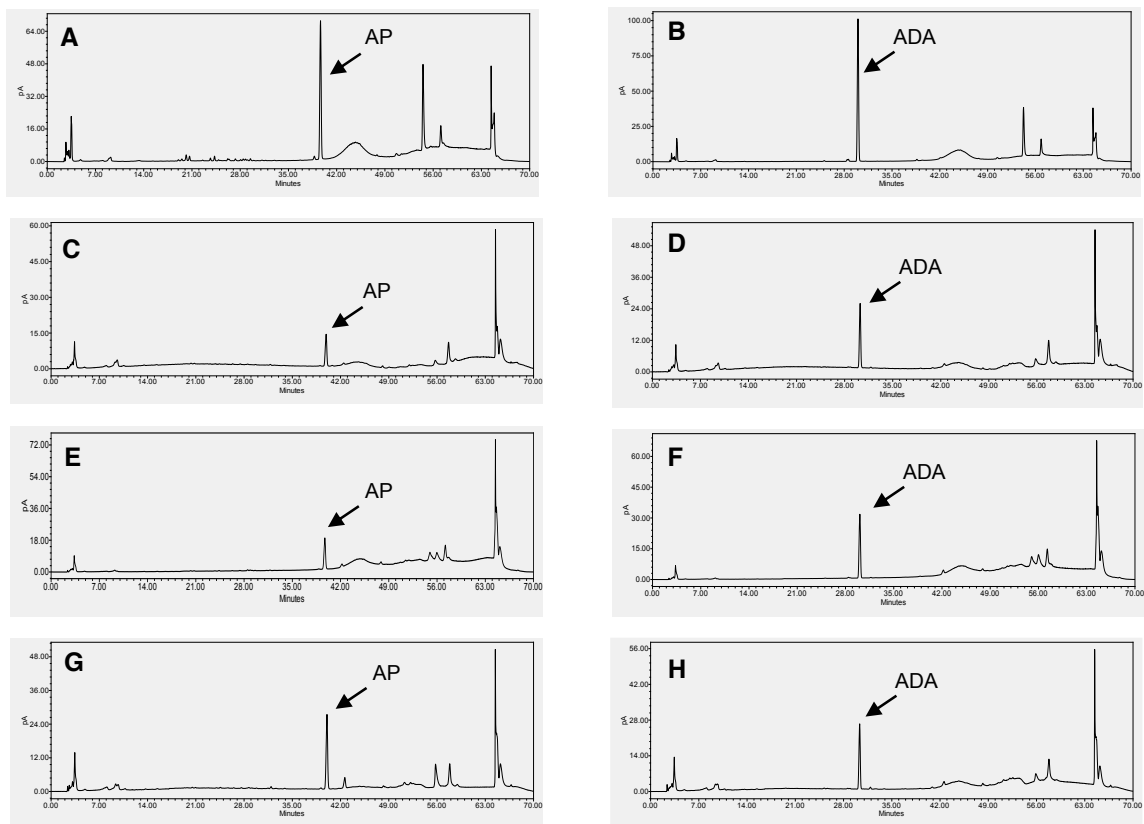


Figura 29. Cromatogramas obtidos por CLAE-CAD dos extratos de biotransformação em meio líquido do ácido *ent*-poliáltico e *ent*-diidroagático com as bactérias probióticas anaeróbias **A-B)** *B. pseudocatenulatum*, **C-D)** *B. longum*, **E-F)** *Bifidobacterium sp.* e **G-H)** cultura mista com *B. longum*, *B. pseudocatenulatum* e *B. bifidum*, após 24 h de incubação.

Condições cromatográficas: Cromatógrafo Waters, Coluna de fase reversa C-18 Kromasil[®], fase móvel constituída por gradiente de acetonitrila e 0,1% de ácido acético em água (20-100% fase orgânica em 60 min), vazão de 1 mL/min, volume de injeção 30 μ L, análise à temperatura ambiente.

A fim de aumentar o rendimento dos processos, foi realizada a otimização da biotransformação em meio líquido. A quantidade de substância foi aumentada de 100 para 200 μ g/mL e o inóculo aumentado de $1,2 \times 10^9$ para 3×10^9 UFC/mL (escala 4 para escala 10 Mc Farlland).

Esse teste foi realizado com a bactéria *B. pseudocatenulatum*, uma vez que esta apresentou maior resistência aos efeitos inibitórios dos diterpenos. Também foi avaliada a influência do meio de cultura no rendimento das biotransformações através de testes comparativos com os meios MRS e GAM Gifu para anaeróbios.

A viabilidade bacteriana nos diferentes caldos de cultura foi monitorada por diferentes tempos de incubação através da análise do crescimento de colônias no ágar e constatou-se que o meio GAM Gifu permitiu maior proliferação microbiana.

No entanto, o aumento da concentração de substrato e do inóculo e a mudança para um meio de cultura mais favorável ao crescimento dos anaeróbios ainda não possibilitaram a produção de metabólitos em concentrações satisfatórias.

Apesar de não serem observados produtos de biotransformação nos cromatogramas, ocorreu a diminuição da intensidade dos picos correspondentes aos diterpenos, indicando um possível consumo do material de partida. O controle de estabilidade dos precursores conduzido durante os processos descartou a possibilidade de degradação.

Os processos de biotransformação com os micro-organismos microaerófilos e aeróbios foram conduzidos inicialmente por períodos de 24 h. Como não foram detectados possíveis produtos nos extratos, realizou-se o monitoramento com diferentes tempos de 1, 8, 12, 24, 48 e 72 h de exposição aos substratos. Os cromatogramas obtidos para os processos de biotransformação com 48 h de incubação estão apresentados na Figura 30.

Da mesma forma que as bactérias anaeróbias, os micro-organismos microaerófilos e aeróbios (com exceção da bactéria *E. coli*) consumiram parcialmente os substratos precursores, no entanto, não foi possível detectar produtos de biotransformação em concentrações significativas em nenhuma das condições testadas. No caso específico da levedura probiótica *S. boulardii*, os diterpenos foram consumidos quase totalmente.

Os valores de pH ao final dos processos de biotransformação com os *Lactobacillus* foram próximos a 4,0, enquanto os controles de estabilidade permaneceram com valor igual a 6,0.

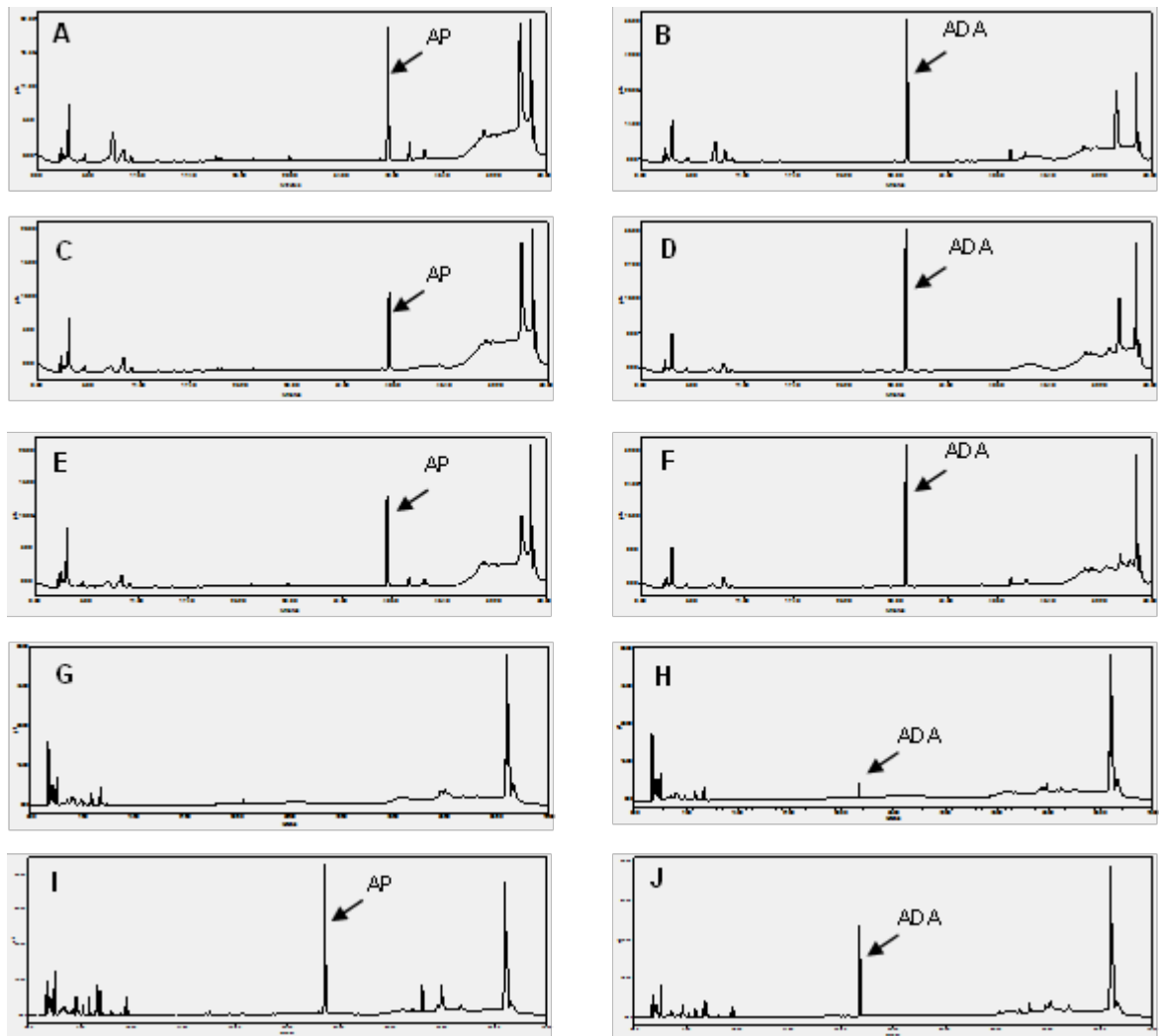


Figura 30. Cromatogramas obtidos por CLAE-CAD dos extratos de biotransformação em meio líquido do ácido *ent*-poliáltico e *ent*-diidroagático com os micro-organismos do trato gastrointestinal **A-B)** *L. acidophilus*, **C-D)** *L. fermentum*, **E-F)** cultura mista de *L. acidophilus*, *L. fermentum*, *L. johnsonii*, *L. rhamnosus* e *L. delbrueckii*, **G-H)** *S. boulardii* e **I-J)** *E. coli*, após 48 h de incubação.

Condições cromatográficas: Cromatógrafo Waters, Coluna de fase reversa C-18 Kromasil[®], fase móvel constituída por gradiente de acetonitrila e 0,1% de ácido acético em água (20-100% fase orgânica em 60 min), vazão de 1 mL/min, volume de injeção 30µL, análise à temperatura ambiente.

4.8.2 Biotransformações em meio de cultura sólido

Há estudos que sugerem que a fermentação em estado sólido pode ser mais eficiente para produção de diversas enzimas microbianas quando comparada à fermentação submersa (MATEOS DIAZ et al., 2006; SUBRAMANIAM & VIMALA, 2012), sendo que alguns tipos de metabólitos secundários e enzimas são produzidos apenas através do cultivo em meio sólido (BARRIOS-GONZÁLEZ, 2012).

Assim, alternativamente foi realizada a biotransformação em ágar na tentativa de aumentar o rendimento dos processos. Os extratos foram obtidos em acetato de etila e

metanol após 24, 48 e 72 h de incubação. Os extratos obtidos em metanol apresentaram características semelhantes ao ágar após a extração, inviabilizando sua análise por CLAE.

O único processo em meio sólido que originou possíveis derivados de biotransformação foi o da bactéria *E. coli* com o AP. Como pode ser observado na Figura 31, o cromatograma deste extrato apresentou dois pequenos picos cromatográficos com tempos de retenção próximos a 23 e 24 min, os quais não foram detectados no mesmo processo em meio líquido.

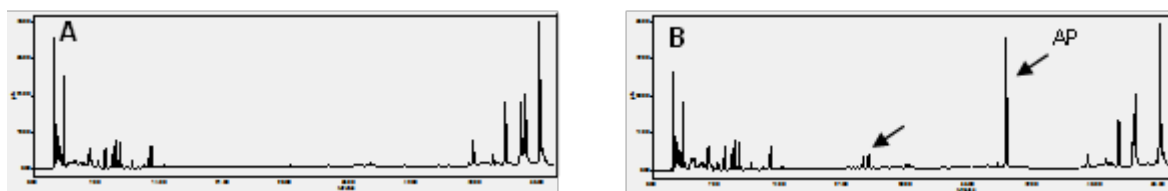


Figura 31. Cromatogramas obtidos por CLAE-CAD dos extratos dos processos em meio sólido **A)** controle *E. coli* com o solvente DMSO e **B)** biotransformação do ácido *ent*-poliáltico com *E. coli*, após 48 h de incubação. Condições cromatográficas: Cromatógrafo Waters, Coluna de fase reversa C-18 Kromasil®, fase móvel constituída por gradiente de acetonitrila e 0,1% de ácido acético em água (20-100% fase orgânica em 60 min), vazão de 1 mL/min, volume de injeção 30µL, análise à temperatura ambiente.

Através da comparação dos resultados em meios de cultura líquido e ágar, não podemos concluir que o emprego de meio sólido levou ao aumento significativo de rendimento dos processos. Como ainda assim foi detectada uma diminuição do material de partida nos extratos de biotransformação, os mesmos foram submetidos à análise por EM.

4.8.3 Identificação dos metabólitos de biotransformação com os micro-organismos do trato gastrointestinal

Foram obtidos os espectros no modo *full scan* em espectrômetro de massas com analisador quadrupolo dos extratos dos controles das culturas (micro-organismos no meio de cultura contendo solvente), dos controles de extração (apenas os diterpenos no meio de cultura submetidos aos mesmos processos de extração) e dos extratos de biotransformação.

Os íons presentes nos extratos de biotransformação que não foram detectados nos controles foram selecionados para fragmentação (varredura de íons produtos). As energias de colisão foram ajustadas para cada íon selecionado, no entanto, foi possível obter uma fragmentação satisfatória de apenas alguns íons detectados, devido à baixa

concentração dos mesmos. Os íons detectados por EM nos extratos de biotransformação estão apresentados nas Tabelas 26 e 27.

Tabela 26. Íons (m/z) detectados por espectrometria de massas (-ESI, analisador triplo quadrupolo) nos extratos de biotransformações do ácido *ent*-poliáltico com os micro-organismos do trato gastrointestinal.

Íon [M-H] ⁻ (m/z)	331a	331b	347	365	422	321	363	393	450
Micro-organismo									
<i>S. boulardii</i> (meio sólido)	✓		✓	✓	✓				✓
<i>S. boulardii</i> (meio líquido)			✓				✓		
<i>L. fermentum</i>			✓			✓		✓	✓
<i>E. coli</i> (meio sólido)									
<i>E. coli</i> (meio líquido)	✓								✓
Cultura mista de <i>Lactobacillus</i>	✓								
Cultura mista de <i>Bifidobacterium</i>		✓	✓		✓				✓

Tabela 27. Íons (m/z) detectados por espectrometria de massas (-ESI, analisador triplo quadrupolo) nos extratos de biotransformações do ácido *ent*-diidroagático com os micro-organismos do trato gastrointestinal.

Íon [M-H] ⁻ (m/z)	347	349	333	351	395
Micro-organismo					
<i>S. boulardii</i> (meio sólido)				✓	
<i>L. fermentum</i> (meio líquido)				✓	✓
<i>E. coli</i> (meio sólido)		✓			
Cultura mista de <i>Lactobacillus</i> (meio líquido)		✓	✓		
Cultura mista de <i>Bifidobacterium</i> (meio líquido)		✓			

A partir da análise das massas nominais e dos espectros de íons-produtos foi possível propor estruturas para os íons de m/z 347, 349, 333 e 351 derivados do ADA.

Para o produto de m/z 351 foi proposta a introdução de um grupo hidroxílico na molécula. Em função da massa nominal apresentada, a introdução de um grupo metoxílico na posição C-18 ou a introdução de um grupo epóxido também poderiam ter sido propostas (SCHMEDA-HIRSCHMANN et al., 2007). Todavia, o único íon fragmento coincidente no espectro deste metabólito com o espectro de íons produtos do precursor é o íon de m/z 289 (Apêndice 18), restringindo assim as possíveis modificações na molécula à introdução de um grupo hidroxílico nas posições C-2 ou C-3 do anel.

Foram propostas duas vias de formação para os íons fragmentos de m/z 289 e 333, o que explicaria a predominância desses íons no espectro (Figura 32).

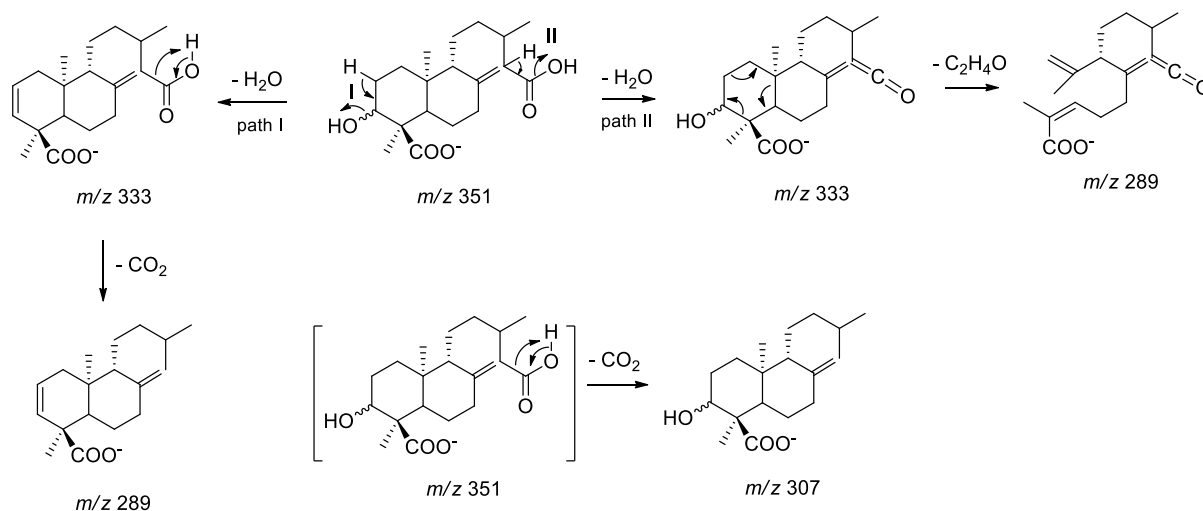


Figura 32. Fragmentação proposta para a formação dos íons produtos de m/z 333, m/z 289 e m/z 307 derivados de [M-H]⁻ m/z 351.

A estrutura do produto de m/z 333 foi proposta em função da sua massa nominal e espectro de íons produtos idêntico ao espectro do ácido *ent*-agático (Apêndice 19), apresentando os íons diagnóstico de m/z 287, 289, 273 (pico base) e 233, conforme apresentado na Figura 33 (AGUIAR et al., 2018).

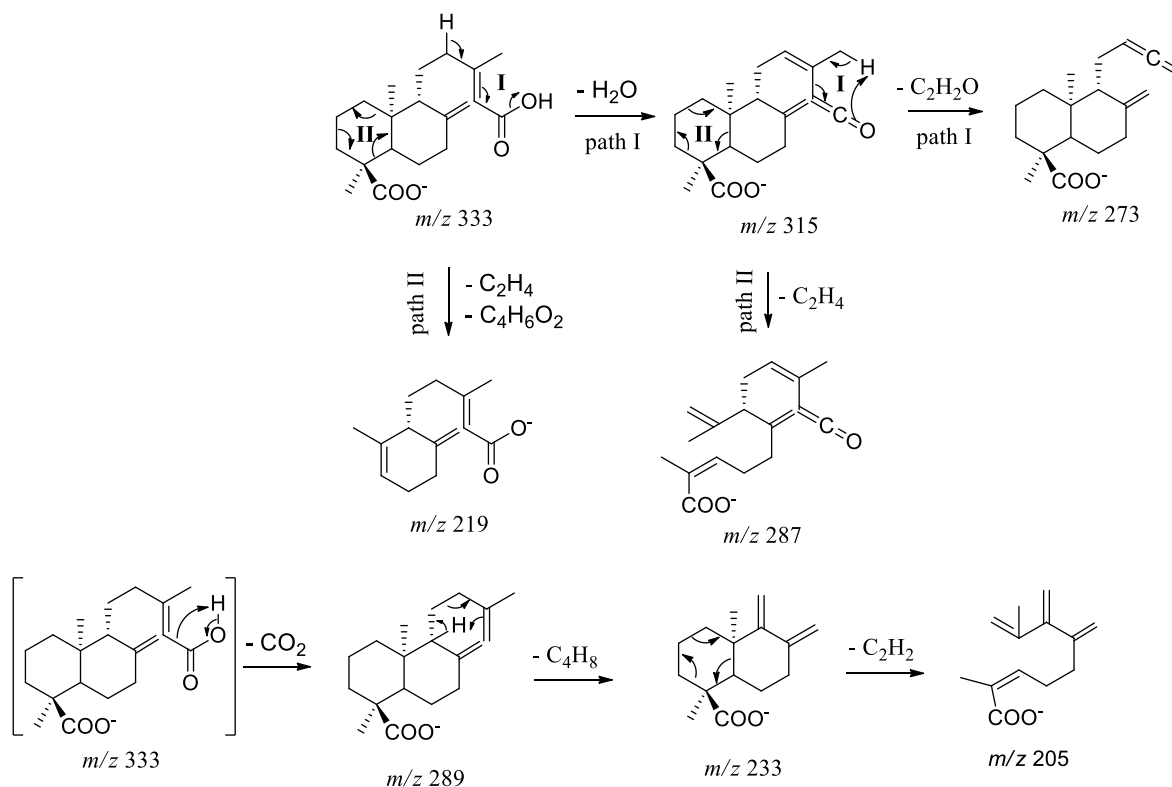


Figura 33. Fragmentação proposta para a formação dos íons produtos de m/z 315, m/z 273, m/z 219, m/z 287, m/z 289, m/z 233 e m/z 205 derivados de [M-H]⁻ m/z 333.

Para os produtos de m/z 347 e 349 foram propostas estruturas semelhantes, diferindo apenas de uma insaturação na posição entre os carbonos 13 e 14 da molécula. Ambos produtos apresentaram uma perda – 32 u em seu espectro de fragmentação (Apêndices 20 e 21), que foi atribuída à eliminação de um grupo metanol (CH_3OH). Tal perda não é comum em modo negativo de análise, porém é frequente no modo positivo para moléculas que apresentam o grupo metoxila (STÉVIGNY et al, 2004). Assim, propôs-se a introdução de um grupo metílico na hidroxila de um dos dois grupos ácidos da molécula pelos micro-organismos.

No entanto, sugere-se a posição do grupo metoxila ligado a C-15 e não a C-18, pois o metabólito de m/z 347 apresentou íons-fragmento como m/z 273 e 233 (os quais também aparecem no espectro do ácido *ent*-agático, Apêndice 19), indicando que os dois anéis do núcleo diterpênico (e consequentemente C-18) não sofreram modificações. Outro indício da posição do grupo metoxílico em C-15 é a ausência do íon de m/z 99 no espectro (Apêndice 20), o qual é um íon-fragmento do grupo carboxílico em C-15 comumente encontrado nos espectros de íon-produtos de labdanos com a ligação dupla entre C13 e C14 (AGUIAR et al., 2018).

O produto de m/z 349, por sua vez, apresentou os íons-fragmento de m/z 275, 233 e 205 (Apêndice 21) da mesma forma que o precursor ADA, também indicando a preservação do núcleo diterpênico, porém sem a ligação dupla entre C-13 e C-14 como apresentado pelo metabólito análogo de m/z 347. Os mecanismos de fragmentação propostos para estes derivados estão apresentados nas Figuras 34 e 35.

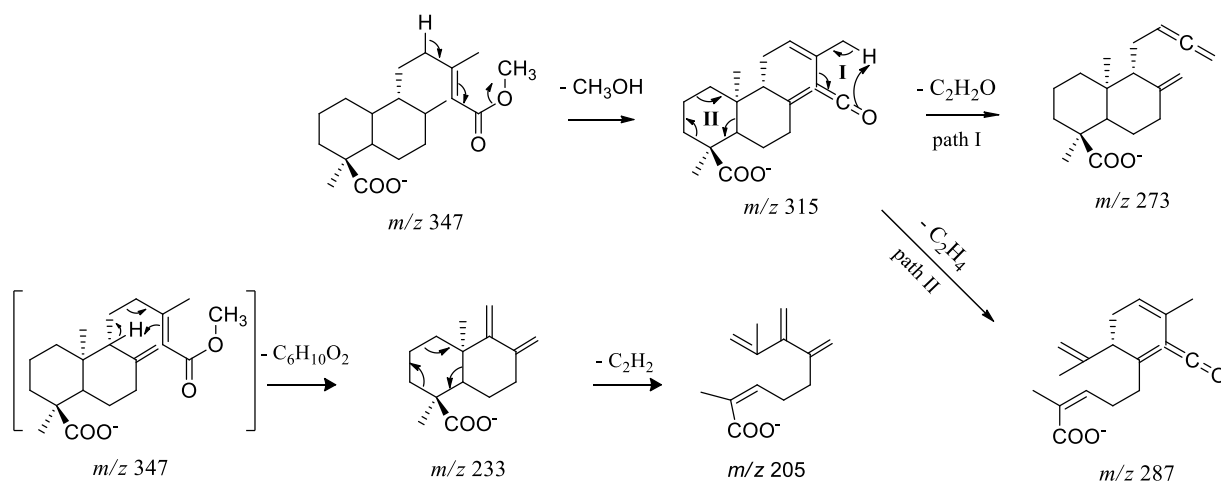


Figura 34. Fragmentação proposta para a formação dos íons produtos de m/z 315, m/z 287, m/z 273, m/z 205, m/z 233 e m/z 205 derivados de $[\text{M}-\text{H}]^-$ m/z 347.

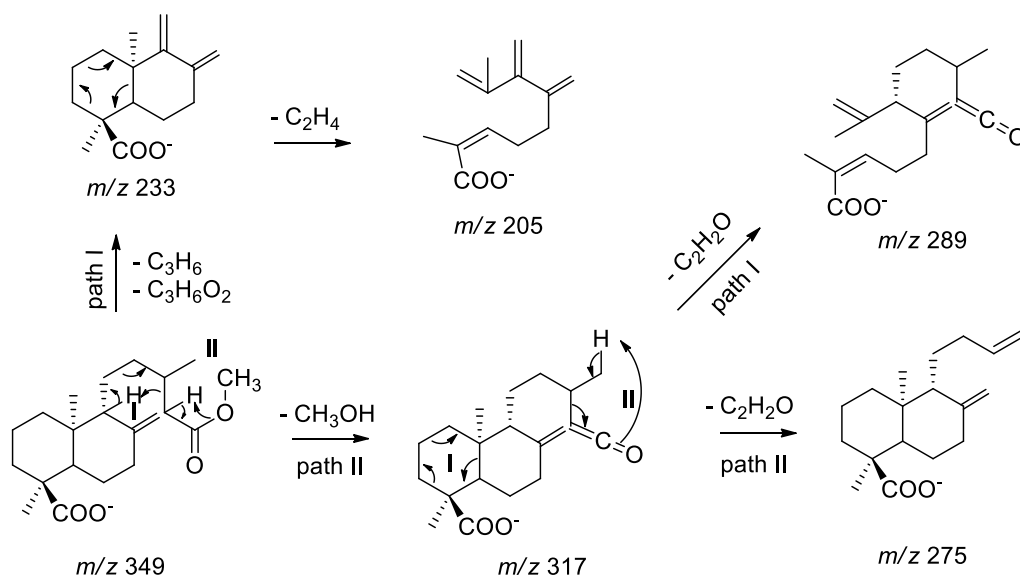


Figura 35. Fragmentação proposta para a formação dos íons produtos de m/z 317, m/z 233, m/z 275, m/z 205 e m/z 289 derivados de $[\text{M}-\text{H}]^-$ m/z 349.

O metabólito de m/z 347 foi identificado em resina fóssil do Báltico e nas folhas de *Araucaria* por Kimura e colaboradores (2012). O metabólito cuja estrutura apresenta m/z 349 foi obtido por síntese química através do refluxo do ADA com metanol e ácido sulfúrico (CALDERÓN et al., 1987).

Não foi possível propor uma estrutura química para o produto de m/z 395 até então, mas de acordo com sua massa nominal e com os metabólitos identificados previamente com os fungos filamentosos, sugere-se que pode ter ocorrido acetilação e redução do precursor ADA.

As estruturas químicas propostas para os derivados de biotransformações do ADA com os micro-organismos do trato gastrointestinal estão apresentadas na Figura 36.

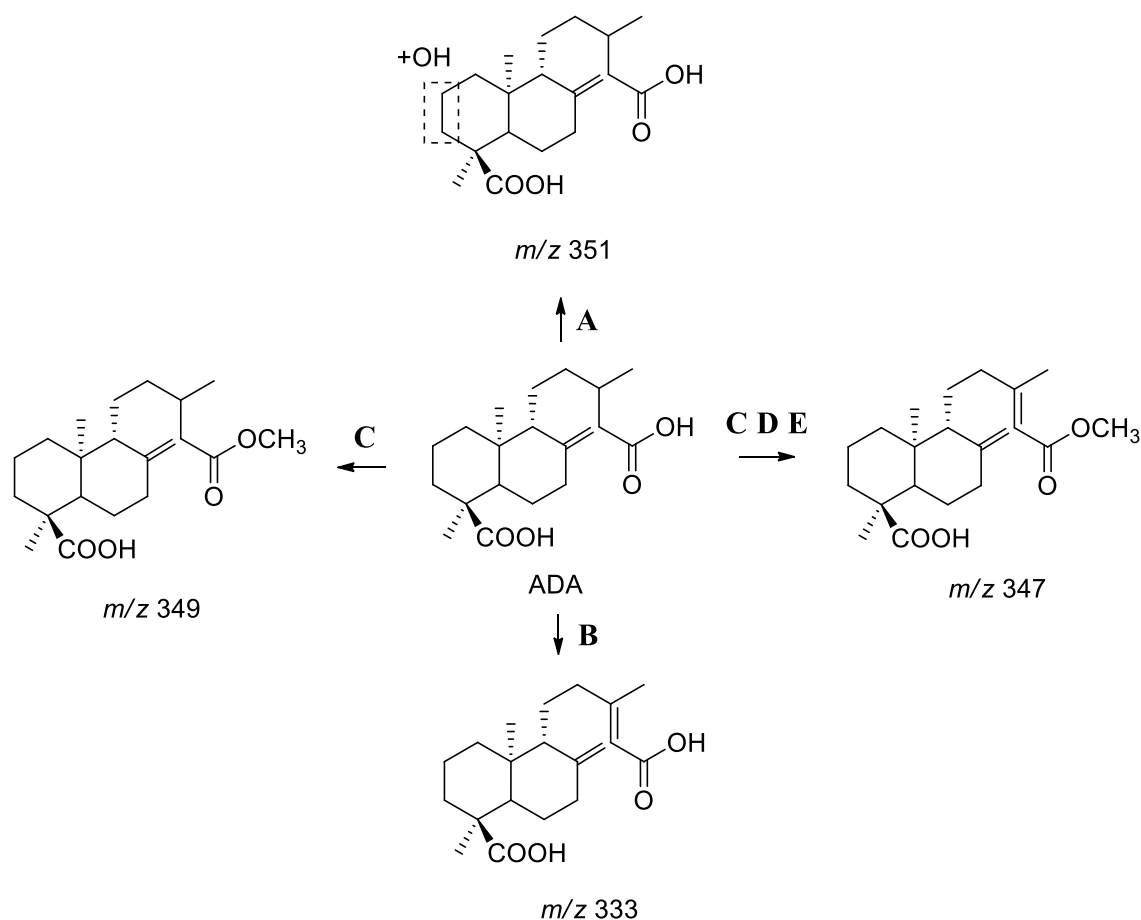


Figura 36. Estruturas químicas propostas para os metabólitos de biotransformações do ácido *ent*-diidroagático com **A)** *S. boulardii* em meio sólido, **B)** *L. fermentum* em meio líquido, **C)** cultura mista de *Lactobacillus* em meio líquido, **D)** cultura mista de *Bifidobacterium* em meio líquido e **E)** *E. coli* em meio sólido.

É possível observar que os micro-organismos *S. boulardii* e *L. fermentum* foram capazes de oxidar o precursor ADA, enquanto as culturas mistas e a bactéria *E. coli* promoveram oxidação da ligação dupla entre os carbonos 13 e 14 e metilação de um dos grupos ácidos da molécula. O metabólito de m/z 347 foi encontrado nos extratos das culturas mistas de probióticos e da bactéria *E. coli*, sendo a introdução de grupos metílicos a reação de maior incidência entre os micro-organismos gastrointestinais utilizados.

A oxidação de diterpenoides pelas bactérias *Streptomyces spheroids* e *Streptomyces griseus* (PENG et al., 2006; LIU et al., 2012) já foram reportadas na literatura, porém não foram encontradas reações de biotransformação de diterpenos com probióticos.

Através da análise das Tabelas 26 e 27, é possível observar maior variedade de produtos de biotransformação do AP em relação ao ADA, assim como ocorrido com os

fungos filamentosos. A análise das massas nominais obtidas para os derivados do AP sugere que ocorreram principalmente oxidações em diferentes graus (introdução de um a três átomos de oxigênio na molécula), enquanto as massas moleculares maiores podem ser provenientes da conjugação do substrato com moléculas endógenas. O estudo detalhado de fragmentação do AP, assim como foi feito para o ácido *ent*-agático pelos pesquisadores do projeto temático, ainda não foi concluído. Logo, estruturas químicas mais precisas dos derivados do AP ainda não foram propostas.

4.9 Biotransformação com os microsomas hepáticos humanos

4.9.1 Biotransformação microsomal com o controle 7-etoxicumarina

A viabilidade das enzimas microsomais e dos sistemas de incubação tanto para reações de fase I quanto para reações de fase II foi avaliada em experimentos preliminares com o controle 7-etoxicumarina (7-ETC). A 7-ETC é um controle comumente usado por seu baixo custo e seu metabolismo bem descrito na literatura (YAMAZAKI et al., 1996; FISHER et al., 2002).

Sabe-se que as enzimas CYP1A2 e CYP2E1 são capazes de promover a O-desalquilação da 7-ETC levando a formação de 7-hidroxicumarina (M3, Figura 37). Esta, por sua vez, pode ser biotransformada pelas isoformas da UGT em 7-hidroxicumarinaglicuronideo (M4, Figura 37). O substrato 7-ETC também pode ser hidroxilado na posição 3 por uma isoforma desconhecida da CYP, formando o metabólito M1 (Figura 37). Este derivado é posteriormente metabolizado pelas isoformas da UGT, formando o metabólito glucuronidado M2 (Figura 37).

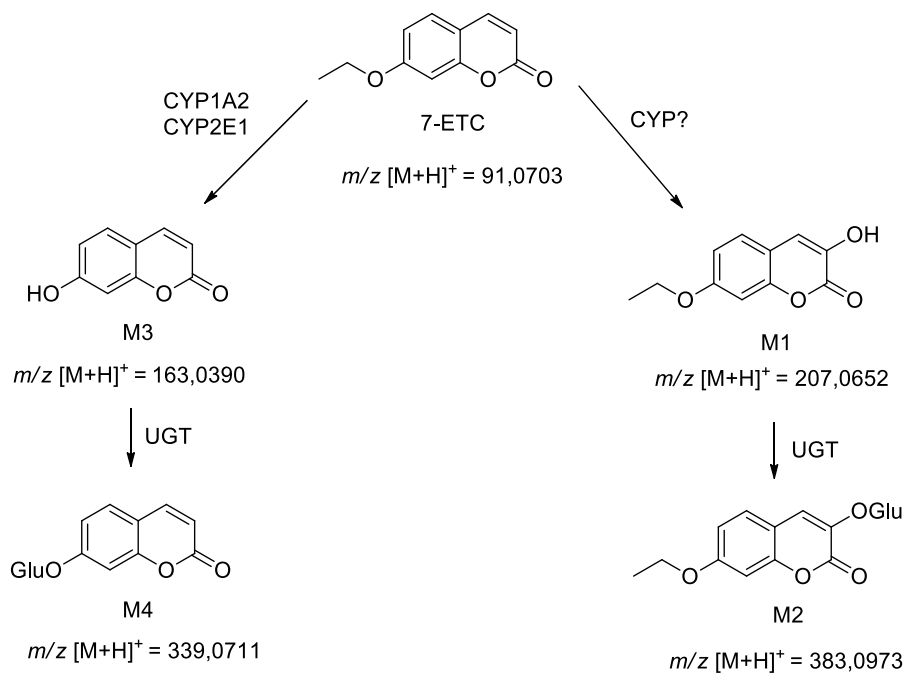


Figura 37. Esquema do metabolismo da 7-etoxicumarina por microsossomas hepáticos humanos, adaptado de Fisher e coautores (2002).

Os cromatogramas dos extratos de biotransformação microsossomal obtidos com o controle positivo estão apresentados na Figura 38. Na Tabela 28, estão apresentados os íons detectados por EMAR. Os íons foram identificados a partir da comparação da m/z e da fórmula molecular obtidas com os dados da literatura.

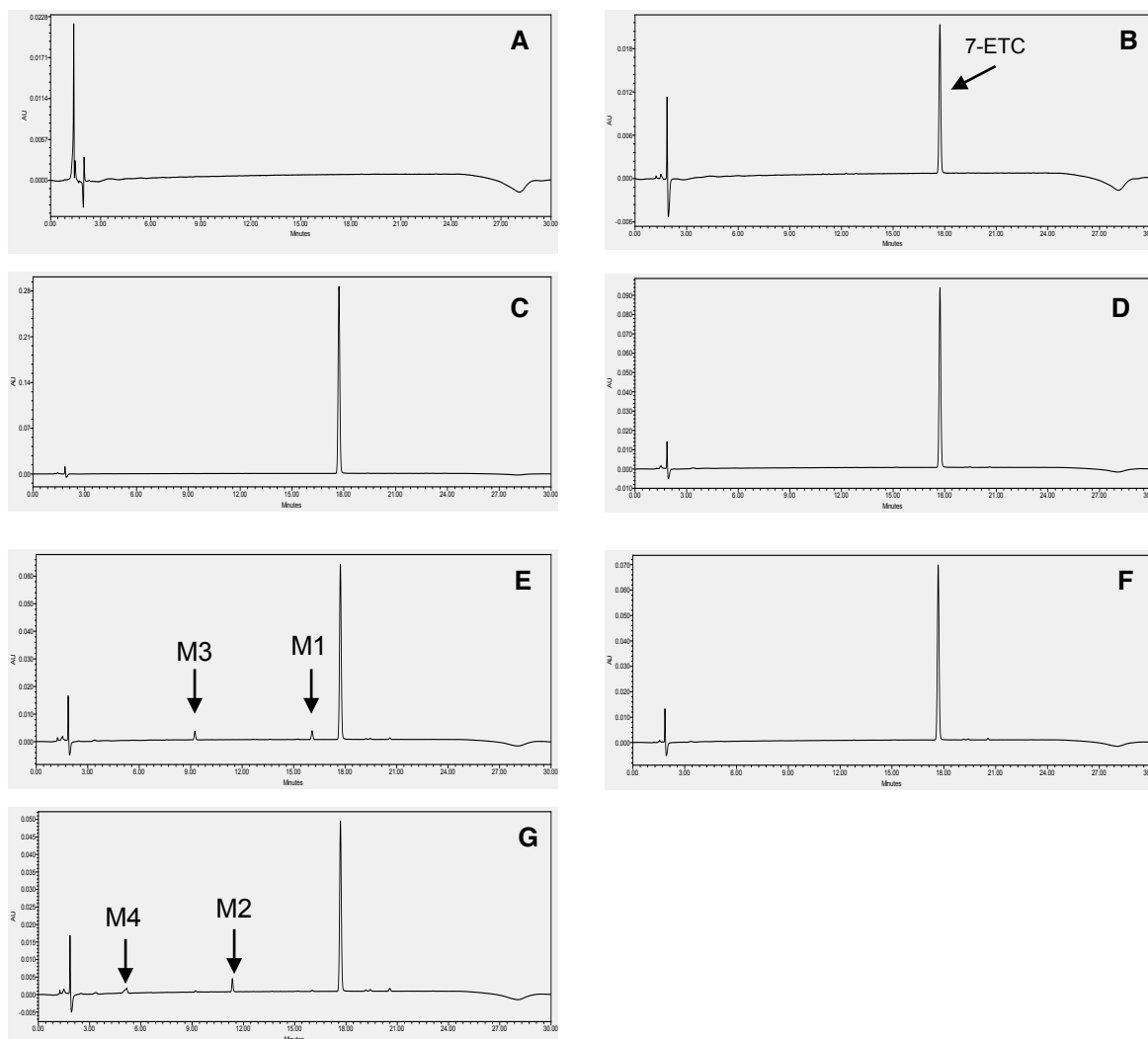


Figura 38. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD (320 nm) dos extratos de **A)** apenas tampão e enzimas (sistema de incubação); **B)** apenas 7-etoxicumarina no tampão (controle de estabilidade) **C)** controle da 7-etoxicumarina sem microsomas com cofatores; **D)** controle da 7-etoxicumarina sem cofatores com microsomas; **E)** metabolismo de fase I; **F)** metabolismo de fase II; **G)** metabolismo de fase I e II. Condições cromatográficas: Cromatógrafo Waters, coluna de fase reversa C-18 Hibar[®], fase móvel constituída por gradiente de acetonitrila e 0,1% de ácido fórmico em água (10-60% fase orgânica em 20 min), vazão de 0,8 mL/min, volume de injeção 10 μ L, temperatura 40°C.

Tabela 28. Íons (m/z) detectados por espectrometria de massas de alta resolução (+ESI, analisador Q-TOF) nos extratos de biotransformação da 7-etoxicumarina por microssomas hepáticos humanos.

	Tempo de retenção (min)	m/z [M+H] ⁺ acurada	m/z [M+H] ⁺ exata	Δm (ppm)	Fórmula molecular	Metabólito
7-ETC	3,39	191,0706	191,0708	-1,05	C ₁₁ H ₁₀ O ₃	substrato
Fase I	2,06	163,0392	163,0395	-1,84	C ₉ H ₆ O ₃	M3
	3,11	207,0652	207,0657	-2,41	C ₁₁ H ₁₀ O ₄	M1
Fase II	-	-	-	-	-	-
Fase I + II	1,34	339,0711	339,0716	-1,47	C ₁₅ H ₁₄ O ₉	M4
	2,25	383,0976	383,0978	-0,52	C ₁₇ H ₁₈ O ₁₀	M2

Os metabólitos de biotransformação da 7-ETC foram identificados por EMAR. Conforme apresentado na Tabela 28, no metabolismo de fase I foram identificados os metabólitos 7-hidroxycumarina e 3-hidroxycumarina (M1 e M3 respectivamente, Figura 37).

Como esperado, nenhum metabólito foi detectado apenas com a adição de UDPGA no sistema de incubação (fase II), devido à ausência de grupos reativos na 7-ETC para reações de glucuronidação pelas enzimas UGTs.

No metabolismo de fase I e fase II combinados, houve a formação de dois metabólitos conjugados com ácido glucurônico M2 e M4 (Figura 37), provenientes da glucuronidação dos derivados hidroxilados de fase I M1 e M3, respectivamente. Sugere-se que os metabólitos de fase I foram totalmente convertidos em seus derivados glucuronidados, uma vez que não foram detectados nos extratos de biotransformação de fase I e II combinados.

Os resultados com o controle positivo foram compatíveis com os dados da literatura e permitiram avaliar a atividade metabólica das enzimas microssomais. Assim, os sistemas de incubação de fase I, fase II e fase I e II combinados foram considerados adequados para a triagem de perfil metabólico.

4.9.2 Biotransformação microssomal com o ácido ent-poliáltico e ent-diidroagático

Os ensaios de metabolismo com os diterpenos foram inicialmente conduzidos durante 1 h de incubação. No entanto, houve problemas na análise do perfil químico dos extratos por CLAE-DAD, devido à baixa concentração dos metabólitos no extrato e à baixa absorção dos diterpenos no UV.

Na tentativa de aumentar a concentração e consequente detecção dos produtos de metabolismo, recorreu-se a algumas modificações. O tampão fosfato de potássio 0,1 M foi substituído pelo tampão Tris-HCl 0,1 M, visto que a atividade das enzimas P450 pode variar de acordo com as condições e composição do tampão utilizado (KUDO et al., 2017). Os extratos aquosos de biotransformação também foram liofilizados a fim de concentrar as amostras. No entanto, a detecção dos possíveis produtos de biotransformação e dos diterpenos precursores ainda não foi possível por CLAE-DAD, conforme pode ser observado na Figura 39.

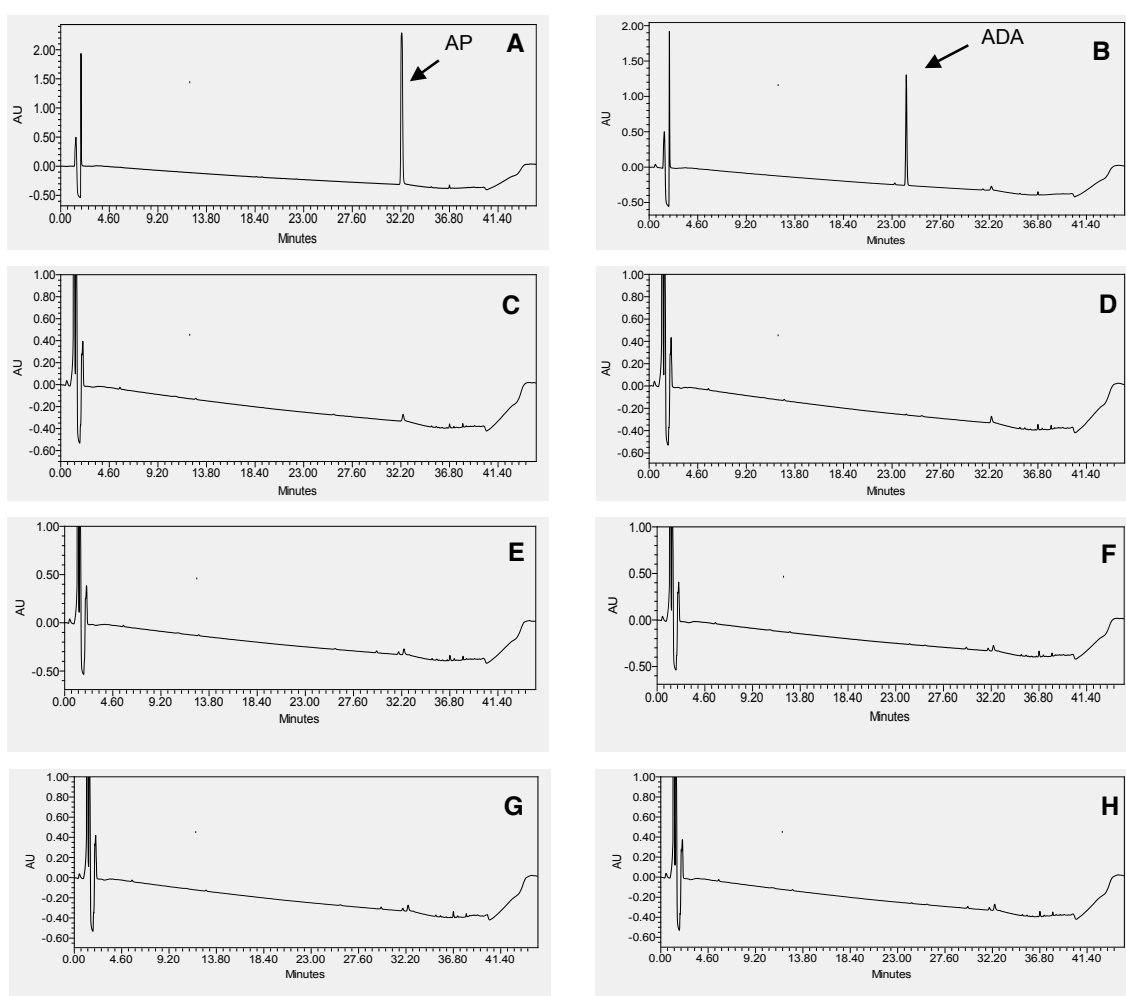


Figura 39. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD (200 nm) das amostras **A)** padrão ácido *ent*-poliáltico (AP); **B)** padrão ácido *ent*-diidroagático (ADA) **C)** metabolismo de fase I AP; **D)** metabolismo de fase I ADA; **E)** metabolismo de fase II AP; **F)** metabolismo de fase II ADA; **G)** metabolismo de fase I e II AP; **H)** metabolismo de fase I e II ADA.

Condições cromatográficas: Cromatógrafo Waters, coluna de fase reversa C-18 Hibar[®], fase móvel constituída por gradiente de acetonitrila e 0,1% de ácido acético em água (10-100% fase orgânica em 35 min), vazão de 0,8 mL/min, volume de injeção 25 μ L, temperatura 40°C.

O detector Corona-CAD foi adquirido em nosso laboratório de pesquisa no Brasil especialmente para a análise de terpenos, uma vez que esta classe de substâncias não possui grupos cromóforos com grande absorção na região do UV-Vis. O emprego do CAD permite a detecção de compostos baseado no fluxo de partículas carregadas independente da estrutura química, não dependendo apenas das propriedades espectroscópicas do analito (VEHOVEC & OBREZA, 2010).

No laboratório da Alemanha, como não havia detector CAD, uma alternativa disponível foi o detector ELSD, o qual também é considerado um detector pseudouniversal e amplamente utilizado na análise de produtos naturais (URANO, RODRIGUES & BERLINCK, 2012), incluindo diterpenos (LEVERRIER et al., 2010).

Um teste preliminar com os padrões dos diterpenos precursores demonstrou uma boa detecção através da CLAE-ELSD. No entanto, quando injetados os extratos das amostras de biotransformação, um pico de grande intensidade logo no início do cromatograma encobria os sinais da amostra. Tal pico foi atribuído aos componentes do tampão devido sua alta concentração e polaridade.

Assim, como alternativa, procedeu-se à extração em fase sólida das amostras, a fim de reduzir os interferentes do tampão e concentrar as mesmas em solvente orgânico. Os tempos de incubação também foram alterados e aumentados de 1 h para 2 h e 3 h de incubação. Como em nenhum dos casos ainda foram detectados produtos de biotransformação, optou-se por aumentar para 24 h o tempo de incubação total. Os cromatogramas obtidos nessas condições estão apresentados na Figura 40.

Após 24 h de incubação com os microsomas, possíveis metabólitos de biotransformação foram detectados nos extratos. Vale ressaltar que os diterpenos precursores permaneceram estáveis no sistema de incubação durante este período. Não foram detectados picos pronunciados no metabolismo de fase I para ambos os diterpenos. Picos maiores correspondentes a possíveis produtos de biotransformação nos sistemas de fase II do AP, fase II e fase I e II do ADA apareceram nos cromatogramas. Assim, procedeu-se a identificação dos produtos de biotransformação por EMAR.

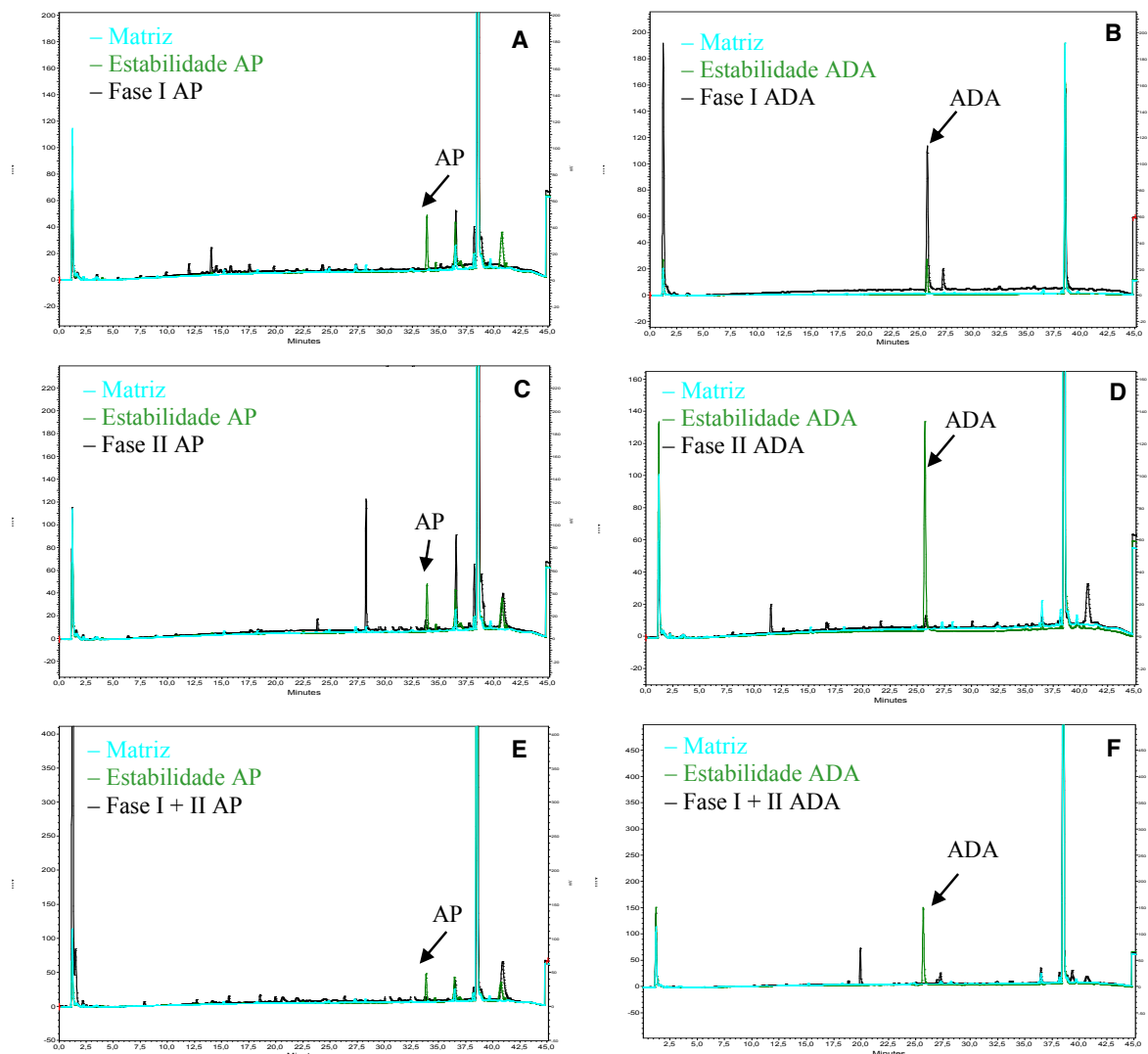


Figura 40. Sobreposição dos cromatogramas obtidos por CLAE-ELSD do sistema de incubação sem os diterpenos (matriz), sistema de incubação dos diterpenos no tampão (controle de estabilidade) e dos sistemas de incubação de metabolismo de fase I, fase II e fase I+II do ácido *ent*-poliáltico e *ent*-diidroagático com microsomas hepáticos humanos por 24 h.

Condições cromatográficas: Cromatógrafo VWR/Hitachi, coluna de fase reversa C-18 Hibar[®], fase móvel constituída por gradiente de acetonitrila e 0,1% de ácido acético em água (10-100% fase orgânica em 35 min), vazão de 0,8 mL/min, volume de injeção 25 μ L, temperatura ambiente.

4.9.3 Identificação dos metabólitos de biotransformação com os microsomas hepáticos humanos

Os íons detectados nos extratos de biotransformação microsossomais que não foram detectados nos controles foram selecionados para dissociação induzida por colisão para obtenção de seus espectros de íons produtos. Assim, os produtos de biotransformação foram identificados através de suas fórmulas moleculares obtidas por EMAR e com o

auxílio da análise de seus padrões de fragmentação, quando possível. Os íons detectados nos extratos de biotransformação microsossomal estão apresentados nas Tabelas 29 e 30.

Tabela 29. Íons (m/z) detectados por espectrometria de massas de alta resolução (-ESI, analisador Q-TOF) nos extratos de biotransformação do ácido *ent*-poliáltico com microsossomas hepáticos humanos.

	Tempo de retenção (min)	m/z [M-H] ⁻ acurada	m/z [M-H] ⁻ exata	Δm (ppm)	Fórmula molecular
ÁP	7,81	315,1965	315,1960	1,59	C ₂₀ H ₂₈ O ₃
Fase I	4,62	347,1862	347,1859	0,86	C ₂₀ H ₂₈ O ₅
	5,20	331,1914	331,1909	1,51	C ₂₀ H ₂₈ O ₄
	5,43	331,1916	331,1909	2,11	C ₂₀ H ₂₈ O ₄
Fase II	5,57	491,2298	491,2281	3,46	C ₂₆ H ₃₆ O ₉
Fase I + II	2,89	507,2234	507,2230	0,79	C ₂₆ H ₃₆ O ₁₀
	3,60	507,2232	507,2230	0,39	C ₂₆ H ₃₆ O ₁₀
	3,78	507,2231	507,2230	0,20	C ₂₆ H ₃₆ O ₁₀
	5,56	491,2280	491,2281	-0,20	C ₂₆ H ₃₆ O ₉

Tabela 30. Íons (m/z) detectados por espectrometria de massas de alta resolução (-ESI, analisador Q-TOF) nos extratos de biotransformação do ácido *ent*-diidroagático com microsossomas hepáticos humanos.

	Tempo de retenção (min)	m/z [M-H] ⁻ acurada	m/z [M-H] ⁻ exata	Δm (ppm)	Fórmula molecular
ÁDA	5,92	335,2224	335,2222	0,60	C ₂₀ H ₃₂ O ₄
Fase I	3,37	367,2122	367,2121	0,27	C ₂₀ H ₃₂ O ₆
	3,59	351,2172	351,2172	0,00	C ₂₀ H ₃₂ O ₅
Fase II	4,32	511,2539	511,2543	-0,78	C ₂₆ H ₄₀ O ₁₀
Fase I + II	2,70	543,2438	543,2442	-0,74	C ₂₆ H ₄₀ O ₁₂
	4,34	511,2547	511,2543	0,78	C ₂₆ H ₄₀ O ₁₀

Através da análise das fórmulas moleculares obtidas, podemos observar a formação de derivados oxigenados no metabolismo de fase I tanto para o AP como o ADA. Detectou-se a introdução de um a dois átomos de oxigênio em ambos os substratos.

Para o AP, foram detectados dois isômeros com fórmula molecular igual a C₂₀H₂₈O₄ (m/z 331), indicando introdução do átomo de oxigênio em diferentes posições da molécula. Apesar do espectro de íons produtos de apenas um dos isômeros de m/z 331 apresentar um pico base de m/z 207 (Apêndice 22), as posições específicas de introdução

do oxigênio não puderam ser definidas com base nas fragmentações. No entanto, não foi encontrado o íon de m/z 233 entre os íons fragmentos de ambos os espectros, sugerindo uma oxidação no núcleo diterpênico.

Outro íon detectado no extrato de metabolismo de fase I do AP foi o íon de m/z 347. Sua fórmula molecular $C_{20}H_{28}O_5$ indica a introdução de dois átomos de oxigênio na molécula. O espectro de íons produtos deste metabólito (Apêndice 23) apresenta uma perda de 14 Da, assim como o precursor AP, que foi atribuída à perda de CH_4 . Há também uma perda de 44 Da, formando o pico base do espectro m/z 303. O íon m/z 233 presente no espectro do precursor AP também aparece no espectro do metabólito m/z 347, indicando que as hidroxilações podem ter ocorrido na cadeia lateral.

No metabolismo de fase I do ADA, foi detectado o metabólito m/z 351 correspondente ao derivado oxigenado de fórmula molecular igual a $C_{20}H_{32}O_5$. A presença dos íons m/z 333 e m/z 289 no espectro de íons produtos deste metabólito (Apêndice 26), sugere uma hidroxilação na posição 2 ou 3 do precursor ADA, como explicado anteriormente na seção 4.9.3.

Outro metabólito de fase I do ADA foi detectado no extrato de biotransformação, correspondente ao íon de m/z 367. A fórmula molecular $C_{20}H_{32}O_6$ sugere a introdução de dois átomos de oxigênio no precursor. Não foi possível obter o espectro de íons produtos através da colisão do íon m/z 367 devido à sua baixa concentração no extrato.

No sistema de incubação suplementado apenas com UDPGA (fase II), foi detectado um único metabólito para o AP e ADA, correspondentes aos íons m/z 491 e m/z 511, respectivamente. As fórmulas moleculares $C_{26}H_{36}O_9$ do metabólito do AP e $C_{26}H_{40}O_{10}$ do metabólito do ADA sugerem a conjugação com ácido glucurônico. Diferentemente da 7-ETC que não apresenta sítios reativos para conjugação, os diterpenos AP e ADA apresentam grupamentos carboxílicos que podem ser glucuronidados diretamente pela ação das enzimas UGT.

No caso específico do AP, podemos inferir que a conjugação ocorreu no grupo carboxílico da posição 18, uma vez que este apresenta apenas um sítio para a reação, diferentemente do ADA, que apresenta dois grupamentos ácidos na molécula. Conforme explicado anteriormente na seção 4.1, a presença no espectro de íons produtos de um íon proveniente da desidratação do íon precursor (m/z 335) sugere que a ionização ocorra no grupo carboxílico da posição 18. Como no espectro de íons produtos do metabólito m/z 511

(Apêndice 27) não há a presença de um íon decorrente da perda de 18 u a partir do íon precursor (m/z 335), assume-se que a ionização ocorra no grupo carboxílico da posição 15. Assim, o sítio de conjugação com o ácido glucurônico foi estabelecido no grupo carboxílico da posição 18 do precursor ADA, conforme apresentado na Figura 41A.

No espectro de íons produto dos metabólitos de m/z 491 e m/z 511 (Apêndices 24 e 27, respectivamente), pode ser observada uma perda de 176 u a partir dos íons precursores, originando o íon m/z 315 correspondente ao precursor AP e o íon m/z 335 correspondente ao precursor ADA, respectivamente. A perda de 176 Da é característica em espectros de íons produtos de metabólitos glucuronidados (CHEN, DUGAS & COLE, 2008) e corresponde à perda do ácido glucurônico anidro ($C_6H_8O_6$). O mecanismo de fragmentação proposto está apresentado na Figura 41.

O grupo ácido do AP foi atribuído como sítio de ionização para formação dos íons $[M-H]^-$ detectados por EM. Como no metabólito m/z 491 o grupo carboxílico está indisponível para ionização, sugere-se um novo sítio de desprotonação na posição 7 (Figura 41B), por ser a segunda posição mais ácida da molécula.

No sistema de incubação suplementado com NADP e UDPGA (fase I + II), os mesmos metabólitos conjugados com o ácido glucurônico no grupo carboxílico do AP (m/z 491) e ADA (m/z 511) foram detectados. Para o AP, também foram encontrados três isômeros de m/z 507 com fórmula molecular igual a $C_{26}H_{36}O_{10}$, correspondentes à forma glucuronidada a partir dos metabólitos hidroxilados de fase I de m/z 331, e não a partir diretamente do precursor. Apesar dos três isômeros apresentarem diferentes tempos de retenção, seus espectros de íons produtos não apresentaram diferenças (Apêndice 25).

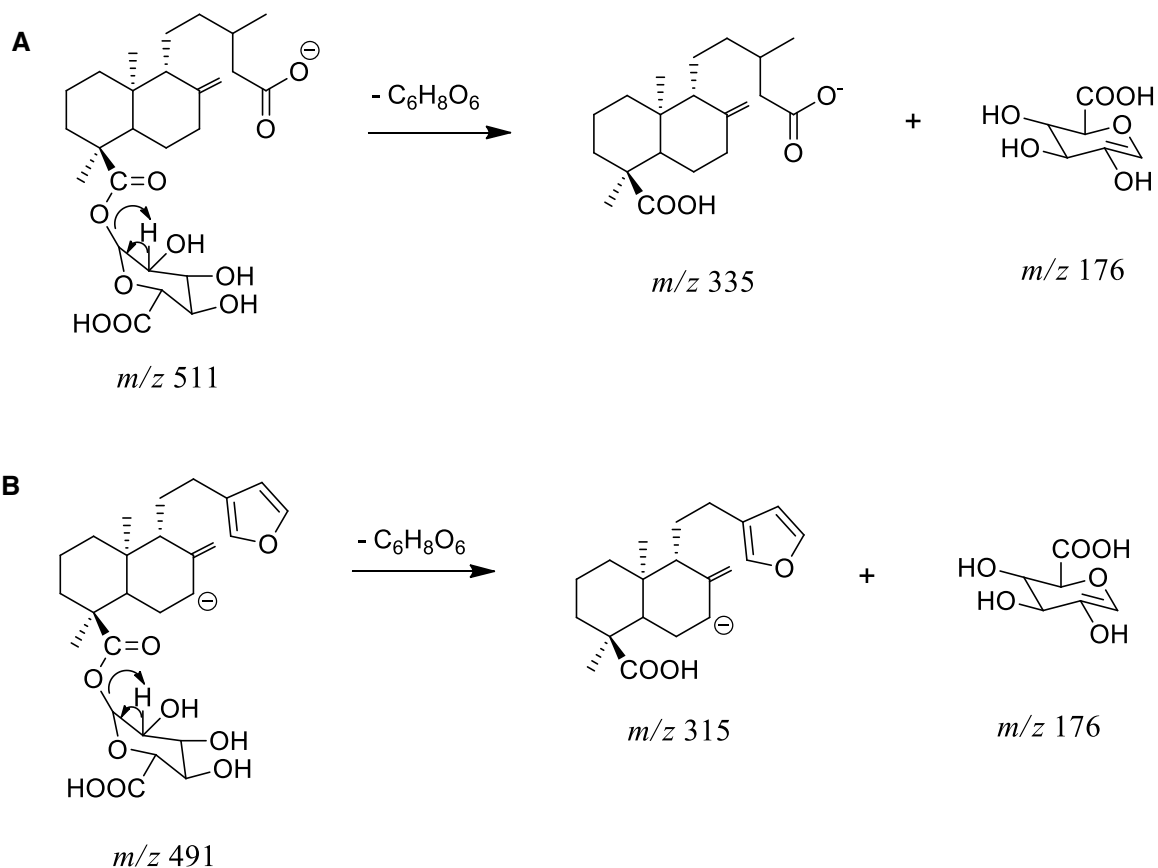


Figura 41. Mecanismo de fragmentação proposto para a os íons **A**) $[M-H]^-$ m/z 511 derivado da biotransformação do ácido *ent*-diidroagático e **B**) $[M-H]^-$ m/z 491 derivado da biotransformação do ácido *ent*-poliáltico com microsomas hepáticos humanos.

Para o ADA, foi detectado o metabólito de m/z 543 de fórmula molecular igual a $C_{26}H_{40}O_{12}$. Este metabólito é possivelmente formado a partir da conjugação do metabólito de fase I de m/z 367 com o ácido glucurônico. Os espectros de íons produtos dos metabólitos m/z 507 e m/z 543 (Apêndices 25 e 28, respectivamente) também apresentam a perda característica de 176 u, correspondente à perda do ácido glucurônico na forma anidra.

As vias metabólicas propostas para a formação dos derivados identificados nos extratos de biotransformação do AP e ADA com microsomas hepáticos estão apresentadas nas Figuras 42 e 43.

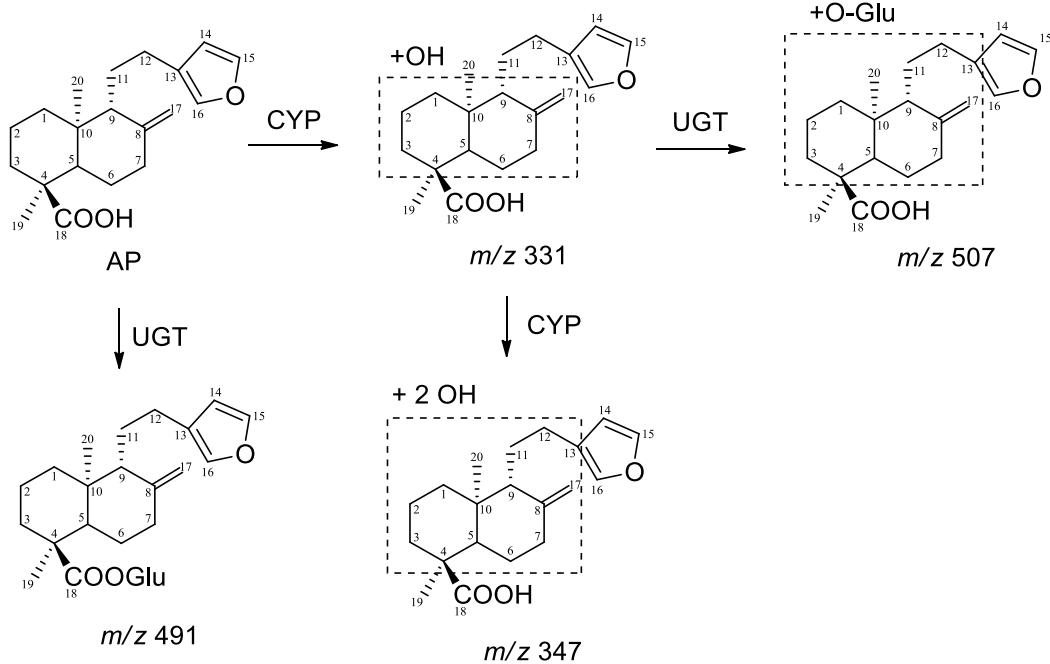


Figura 42. Rotas metabólicas sugeridas para a produção de derivados de biotransformação do ácido *ent*-poliáltico com microsomas hepáticos humanos.

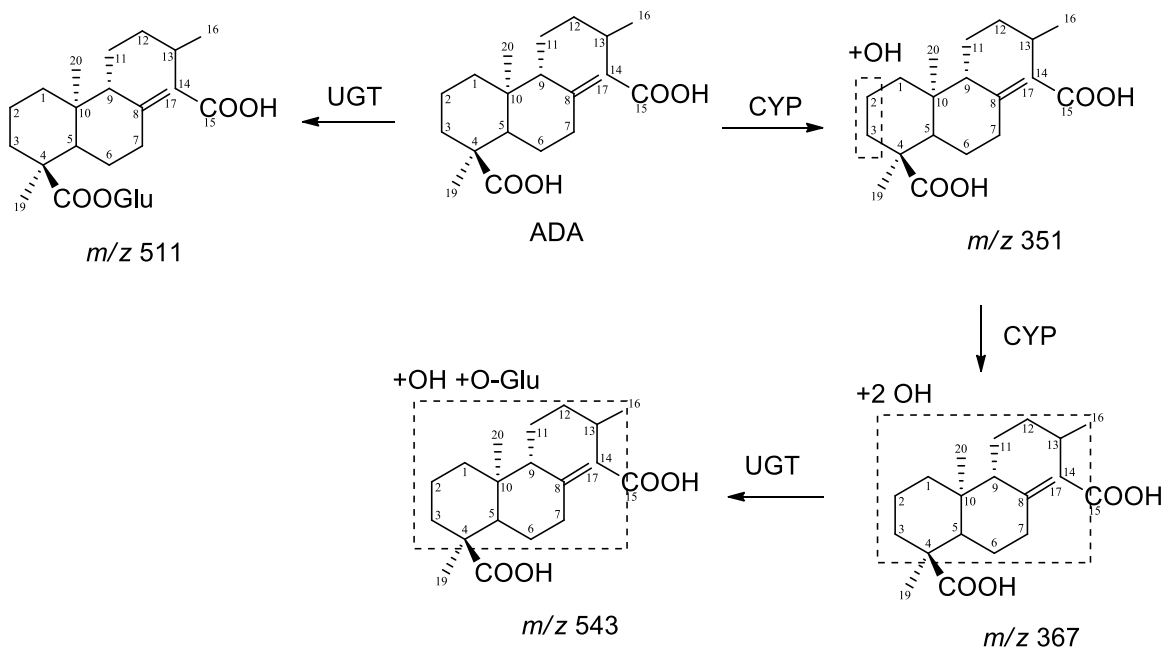


Figura 43. Rotas metabólicas sugeridas para a produção de derivados de biotransformação do ácido *ent*-dihidroagático com microsomas hepáticos humanos.

As reações de hidroxilação e glucuronidação detectadas neste estudo já foram reportadas após a incubação de diterpenoides com microsomas hepáticos humanos (LI et al., 2018). Por outro lado, em estudos de metabolização de diterpenos utilizando

microsomas hepáticos de ratos (LIU et al., 2007) e cabras (SUN et al., 2017) não foram detectados metabólitos de fase II, o que pode ser explicado devido às diferenças estruturais dos precursores e/ou às diferenças de metabolismo interespecies. Derivados oxidados e conjugados com ácido glucurônico também já foram reportados após a metabolização de diterpenoides em ratos *in vivo* (TIAN et al., 2015). Metabólitos de fase II conjugados com cisteína (CHEN et al., 2015) e sulfato (WANG et al., 2010) também já foram identificados após administração oral de diterpenoides em ratos. Vale ressaltar, no entanto, que os microsomas hepáticos carecem de enzimas do tipo cisteína e sulfotransferases.

As estruturas do ADA e do AP glucuronidados não foram encontradas na literatura, porém diterpenoides semelhantes já foram reportados. A estrutura do ácido agático glucuronidado na posição 18, assim como proposto para o ADA, foi identificada em um material conhecido como *mumiyo*, o qual pode ser encontrado entre rochas na região da Ásia Central e é utilizado na medicina popular na Índia e no Tibete (KIREN et al., 2014). O *mumiyo* também é utilizado em outros países como suplemento alimentar. Um diterpenoide análogo ao AP glucuronidado foi isolado da planta aquática *Potamogeton lucens*, diferindo apenas na presença de um anel lactônico no lugar do anel furânico (WARIDEL et al., 2004).

O metabolismo dos diterpenos foi escalonado após os ensaios em escala analítica, a fim de se obter amostras mais concentradas para análise por CLAE-RMN. No entanto, os sinais das amostras não foram satisfatórios, não sendo possível a obtenção dos espectros de RMN dos metabólitos.

4.10 Avaliação da citotoxicidade dos ácidos *ent*-poliático e *ent*-diidroagático e de seus derivados de biotransformação

4.10.1 Avaliação do efeito dos precursores e dos metabólitos de biotransformação sobre a viabilidade celular pelo método do MTT

Foram avaliados os efeitos dos diterpenos precursores AP e ADA sobre a proliferação das células Caco-2 e HeLa após 24 h de exposição. Inicialmente, tentou-se a solubilização dos diterpenos no meio de cultura com no máximo 0,1 % de DMSO. No entanto, não foi possível solubilizar os precursores em meio aquoso com esta quantidade de solvente. Foram realizados testes com concentrações crescentes de solvente e com 1 %

de DMSO foi possível solubilizar os diterpenos sem interferir significativamente na proliferação celular, sendo, portanto, adotada esta concentração final.

Os resultados da incubação das células HeLa e Caco-2 com o meio de cultura (controle negativo), SDS 2% (controle positivo), DMSO 1% (controle do solvente) e com os diterpenos precursores estão apresentados nas Figuras 44 e 45.

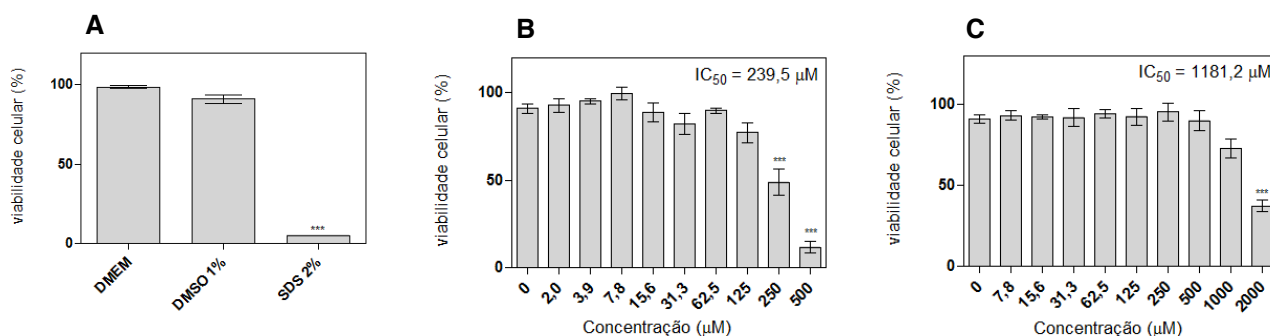


Figura 44. Efeitos sobre a viabilidade de células de carcinoma cervical humano (HeLa) após 24 h de incubação com **A**) meio de cultura (DMEM), dimetilsulfóxido (DMSO 1%) e dodecilsulfato de sódio (SDS 2%), **B**) ácido *ent*-poliáltico e **C**) ácido *ent*-diidroagático, avaliados pelo método do MTT. Os valores representam a média±SEM (n = 3).

***p<0,0001 quando comparado ao grupo controle (DMEM). One-way ANOVA, teste de Dunnett.

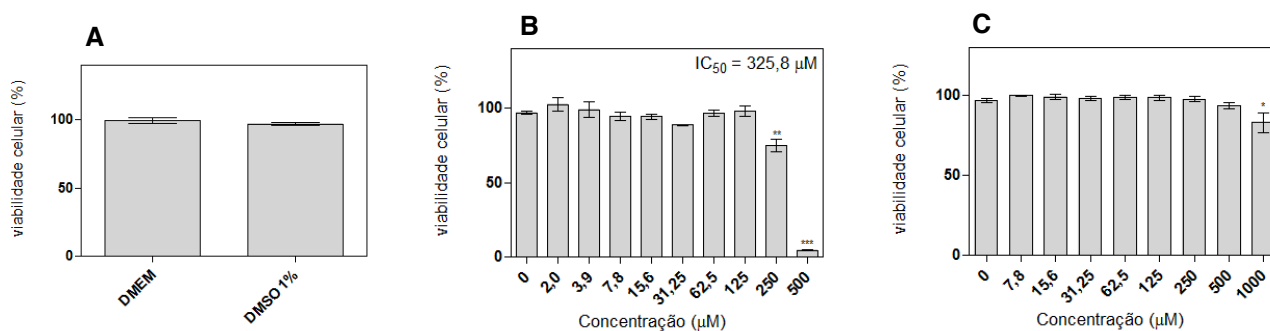


Figura 45. Efeitos sobre a viabilidade de células de adenocarcinoma de cólon humano (Caco-2) após 24 h de incubação com **A**) meio de cultura (DMEM) e dimetilsulfóxido (DMSO 1%), **B**) ácido *ent*-poliáltico e **C**) ácido *ent*-diidroagático, avaliados pelo método do MTT. Os valores representam a média±SEM (n = 3).

***p<0,0001, **p<0,006 e *p<0,05 quando comparado ao grupo controle (DMEM). One-way ANOVA, teste de Dunnett.

Foram calculadas as concentrações inibitórias capazes de inibir 50 % da proliferação celular (IC_{50}). O AP apresentou IC_{50} igual a 239,5 μ M e 325,8 μ M para as linhagens HeLa e Caco-2, respectivamente. O ADA não afetou a viabilidade das células HeLa em concentrações até 1.000 μ M (p>0,05), apresentando IC_{50} igual a 1.181,2 μ M. Para a linhagem

Caco-2, não foi possível calcular a IC_{50} do ADA, visto que nenhuma das concentrações testadas inibiu em até 50% a proliferação celular.

O AP apresentou maior atividade antiproliferativa em relação ao ADA, porém nenhum dos precursores apresentou potencial citotóxico frente às linhagens testadas, considerando como inativas substâncias com IC_{50} acima de 100 μM (CANO, RAMÍREZ-APAN & DELGADO, 2011).

Os resultados obtidos com alguns derivados de biotransformação estão apresentados na Tabela 31. Os metabólitos avaliados derivados do AP apresentaram menor citotoxicidade frente à linhagem HeLa, com exceção do metabólito P06(AP), o qual foi cerca de 4 vezes mais tóxico que seu precursor ($IC_{50} = 62,6 \mu\text{M}$). As mudanças químicas ocorridas nos derivados de biotransformação do ADA não afetaram significativamente o potencial citotóxico do precursor, visto que todos seus metabólitos também foram inativos.

Como a quantidade de amostra disponível não era suficiente para realizar todos os testes no laboratório da Alemanha, os efeitos dos metabólitos de biotransformação sobre a viabilidade celular foram testados apenas com a linhagem HeLa.

Tabela 31. Valores de IC_{50} sobre a viabilidade de células de carcinoma cervical humano (HeLa) após 24 h de incubação com os diterpenos ácido *ent*-poliáltico (AP), ácido *ent*-diidroagático (ADA) e seus derivados de biotransformação.

Amostra	$IC_{50} (\mu\text{M})^*$
	HeLa
AP	$239,5 \pm 5,2$
P02(AP)	> 500
P06(AP)	$62,6 \pm 4,7$
P09(AP)	> 500
ADA	$1.181,2 \pm 3,9$
P01(ADA)	> 500
P02(ADA)	> 500
P03(ADA)	> 500
P05(ADA)	> 500

*Os valores representam a média \pm SEM (n = 3).

O efeito dos precursores e de seus derivados sobre a viabilidade celular foi comparado em concentração igual a 500 μM (Figura 46). O ADA e seus derivados nesta concentração não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) em seu potencial citotóxico, não interferindo na proliferação celular. O AP a 500 μM foi significativamente ($p < 0,0001$) mais citotóxico que os metabólitos P02(AP) e P09(AP) na mesma concentração, conforme apresentado na Figura 46.

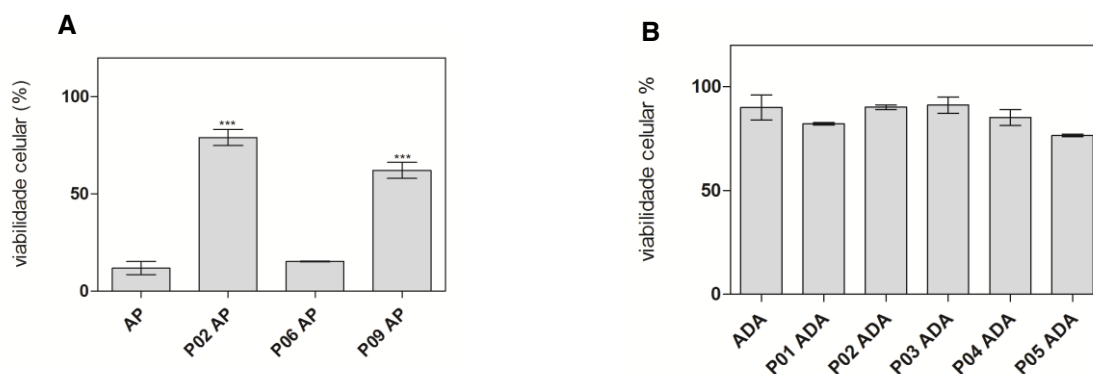


Figura 46. Comparação dos efeitos sobre a viabilidade de células de carcinoma cervical humano (HeLa) após 24 h de incubação com **A)** ácido *ent*-poliático e derivados de biotransformação e **B)** ácido *ent*-diidroagático e derivados de biotransformação, em concentração igual a 500 μM . Os valores representam a média \pm SEM ($n = 3$). *** $p < 0,0001$ quando comparado ao precursor AP. One-way ANOVA, teste de Dunnett.

4.10.2 Avaliação do efeito dos precursores e dos metabólitos de biotransformação sobre a viabilidade celular pelo método do XTT

Foram realizados estudos *in vitro* do potencial antiproliferativo dos diterpenoides sobre linhagem de adenocarcinoma mamário (MCF-7) e sua contraparte normal (MCF-10A).

Os resultados da Tabela 32 indicam que os precursores AP e ADA apresentaram potencial antiproliferativo semelhante, sendo o AP ligeiramente mais citotóxico para ambas as linhagens do que o ADA. Nenhum dos diterpenos precursores apresentou efeito antiproliferativo seletivo frente às células tumorais ou normais. Os metabólitos de biotransformação apresentaram menor citotoxicidade que seus precursores, com exceção de P05(ADA), o qual apresentou maior efeito citotóxico seletivo frente às células normais (MCF-10A), com IC_{50} igual a 191,5 μM .

Tabela 32. Valores de IC₅₀ sobre a viabilidade de células de adenocarcinoma mamário humano (MCF-7) e células epiteliais de mama (MCF-10A), após 24 h de incubação com os diterpenos ácido *ent*-poliáltico (AP), ácido *ent*-diidroagático (ADA) e seus derivados de biotransformação.

Amostra	IC ₅₀ * (µM)	
	MCF-7	MCF-10A
AP	270,6 ± 2,7	261,1 ± 3,1
P02(AP)	> 280	> 280
P03(AP)	> 280	> 280
P06(AP)	> 250	> 250
P09(AP)	> 280	> 280
ADA	279,5 ± 4,3	284,6 ± 2,3
P01(ADA)	> 280	> 280
P02(ADA)	> 280	> 280
P03(ADA)	> 280	> 280
P05(ADA)	> 250	191,5 ± 1,8
P06(ADA)	> 250	> 250

*Os valores representam a média±SEM (n = 3).

Na literatura, o AP isolado de *Croton reflexifolius* apresentou promissora atividade antiproliferativa frente a diferentes células tumorais, incluindo as linhagens MCF-7 e HeLa utilizadas neste estudo (GARCÍA-TAPIA et al., 2017). Os valores de IC₅₀ foram iguais a 21,9 µg/mL (69,5 µM) para a linhagem MCF-7 e 35,7 µg/mL (113,3 µM) para a linhagem HeLa. No entanto, a discrepância dos resultados obtidos neste estudo com os resultados da literatura pode também estar associada aos diferentes tempos de exposição das células ao diterpeno (72 h de exposição na literatura e 24 h de exposição neste estudo).

4.10.3 Relações estrutura-atividade dos derivados de biotransformação

De maneira geral, as hidroxilações e di-hidroxilações ocorridas no AP levaram a diminuição de sua atividade citotóxica *in vitro*. Os metabólitos hidroxilados de fase I do ADA apresentaram-se inativos assim como seu precursor, indicando nenhum efeito significativo das hidroxilações sobre a atividade biológica do ADA.

Sabe-se que a produção de derivados oxigenados de diterpenoides por biotransformação pode tanto aumentar quanto diminuir a atividade biológica do material de partida.

Por exemplo, o metabólito 3 α ,6 β -diidroxiesclareolido produzido a partir da biotransformação do diterpeno esclareolido por fungos filamentosos apresentou maior atividade citotóxica que o precursor frente a células tumorais, incluindo a linhagem MCF-7 utilizada neste estudo (CANO, RAMÍREZ-APAN & DELGADO, 2011). Hidroxilações também foram relacionadas ao aumento da atividade alelopática (ROCHA et al., 2017), antibacteriana (PORTO et al., 2013), antifúngica (KUMAR, SAHA & SAHA, 2016), gastroprotetora (SEPÚLVEDA et al., 2016) e anticolinesterásica (MONTEIRO et al., 2017) de diterpenoides.

Por outro lado, a hidroxilação de diterpenos como ingenol-3-angelato por culturas celulares de plantas (TENG, et al., 2009) e do 13-oxigenol dodecanoato (WU et al., 2016) e ácido *ent*-traquiloban-18-óico (LEVERRIER et al., 2010) por fungos promoveu a diminuição da atividade citotóxica *in vitro*. A hidroxilação do diterpeno deoxiandrografolido por fungos também acarretou diminuição da atividade inibitória sobre a produção de óxido nítrico em macrófagos RAW 264.7 (DENG et al., 2012), enquanto a hidroxilação de 20-deoxigenol não alterou seu potencial citotóxico frente a células Caco-2, MCF-7 e MCF-7/ADM (WU et al., 2016).

Os metabólitos de fase II P06(AP) e P05(ADA), ambos acetilados na posição 17 e com ligação dupla entre C-8 e C-9 no núcleo diterpênico, apresentaram as maiores atividades. O metabólito P06(AP) também apresenta um grupo hidroxílico adicional na posição 1.

Como o metabólito P02(AP) (o qual difere de P06(AP) pela ausência do grupo acetato na posição 17) não apresentou atividade citotóxica frente às células HeLa, inferiu-se que a presença do grupo acetato seja determinante para a atividade citotóxica de P06(AP).

Estruturalmente, o metabólito P05(ADA) difere de seu precursor pela presença do grupo acetato na posição 17 e pela migração da ligação dupla, mudanças as quais poderiam ser atribuídas ao aumento da atividade frente à linhagem MCF-10A. Como P06(ADA), que é isômero de P05(ADA), não apresentou atividade aumentada frente a esta linhagem, podemos inferir que a posição da ligação dupla entre C-8 e C-9 também seja importante para a atividade biológica, e não apenas a presença do grupo acetato em C-17.

A migração de ligação dupla promovida pela biotransformação do ácido pseudolárico B foi associada à diminuição do potencial antifúngico do mesmo (ZHANG et al., 2011), da mesma forma que a acetilação por síntese química dos grupos hidroxílicos do diterpeno ácido

mulin-11,13-dieno-20-óico foi associada à diminuição da atividade gastroproterora (SEPÚLVEDA et al., 2016).

Tais dados indicam que os efeitos da acetilação e migração da dupla em diterpenoides sobre a atividade biológica podem variar assim como os efeitos das hidroxilações. Vale ressaltar que a atividade biológica avaliada, estrutura química dos precursores, posição e estereoquímica das modificações catalisadas na biotransformação podem contribuir para os diferentes efeitos sobre as atividades, considerando a alta especificidade enzimática e possíveis diferentes mecanismos de ação.

4.11 Esquema geral dos derivados de biotransformação obtidos

A seguir estão apresentados dois esquemas gerais para o AP e ADA (Figuras 47 e 48, respectivamente) e seus derivados de biotransformação obtidos com os diferentes biocatalisadores empregados neste estudo.

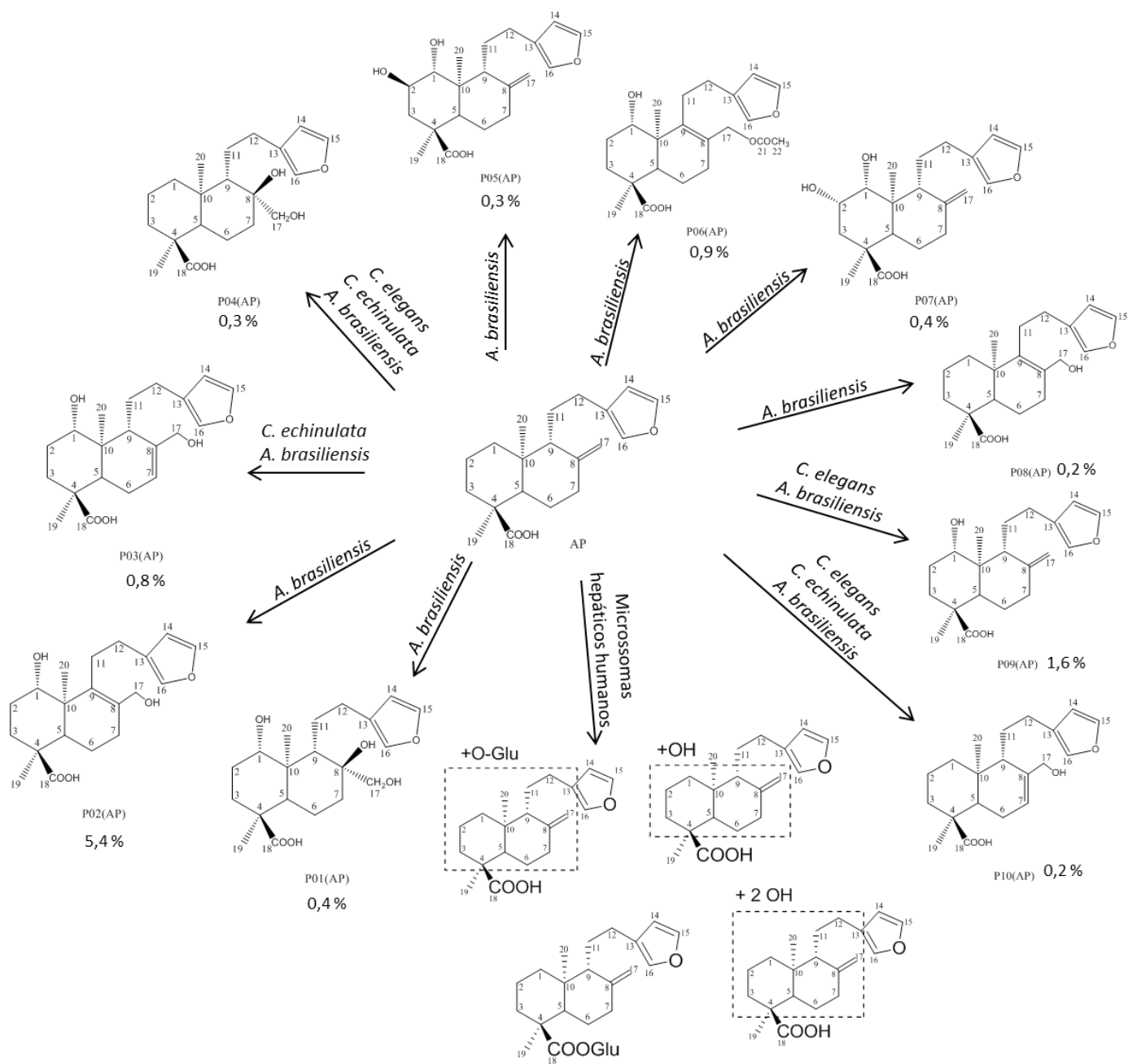


Figura 47. Estrutura química dos derivados de biotransformação do ácido *ent*-poliáltico com diferentes biocatalisadores e rendimento dos produtos isolados.

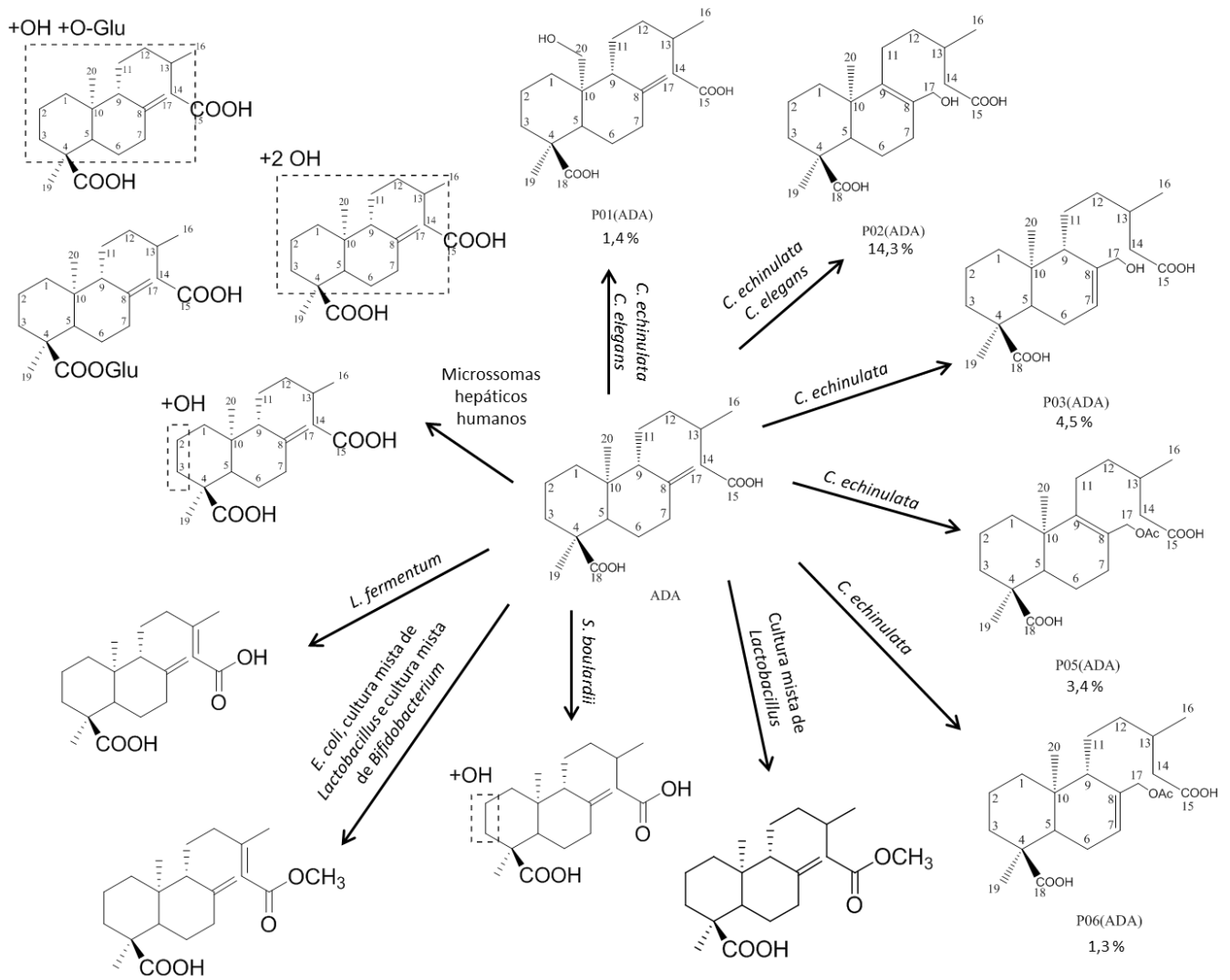


Figura 48. Estrutura química dos derivados de biotransformação do ácido *ent*-diidroagático com diferentes biocatalisadores e rendimento dos produtos isolados.

Conclusões

5 CONCLUSÕES

As investigações realizadas neste trabalho permitiram concluir que:

♣ Reações de fase I e II foram detectadas com os fungos filamentosos, micro-organismos do trato gastrointestinal e microsomas hepáticos humanos. O metabolismo oxidativo foi predominante nos três modelos de biotransformação utilizados. No entanto, cada biocatalisador apresentou reações exclusivas como a acetilação pelas enzimas dos fungos filamentosos, a metilação pelos micro-organismos do trato gastrointestinal e a glucuronidação pelas enzimas microsomais.

♣ Comparativamente, o modelo de biotransformação com os fungos filamentosos possibilitou maiores rendimentos. As enzimas fúngicas também promoveram maior diversidade de reações sobre os substratos quando comparado às enzimas bacterianas e microsomais.

♣ Os estudos *in vitro* realizados neste trabalho contribuem para o entendimento de possíveis vias metabólicas dos diterpenos *in vivo*. Através da extrapolação para o sistema *in vivo*, baseado nos resultados obtidos nestas condições experimentais, sugere-se que no organismo humano os diterpenos AP e ADA convertam-se majoritariamente em metabólitos oxidados pelas enzimas P450 e sejam pouco metabolizados pela microbiota intestinal.

♣ Os estudos de citotoxicidade permitiram concluir que a maioria das modificações químicas promovidas pelos fungos sobre o precursor AP levou a diminuição do potencial citotóxico, enquanto a maioria das reações químicas sobre o ADA não afetou significativamente sua atividade biológica, contribuindo para os estudos de segurança das oleorresinas de *Copaifera*.

♣ No entanto, o derivado P05(ADA) obtido com o fungo *C. echinulata* apresentou maior potencial citotóxico ($IC_{50} = 191,5 \mu M$) que seu precursor ADA ($IC_{50} = 284,6 \mu M$) frente a células normais de epitélio mamário. Adicionalmente, a produção do ácido *ent*-agático a partir da transformação do ADA pela bactéria *L. fermentum* indica a necessidade de estudos mais aprofundados acerca do metabolismo dos constituintes das oleorresinas de *Copaifera*, uma vez que o ácido agático já foi reportado na literatura como abortivo em mamíferos.

♣ O aumento da atividade citotóxica contra células tumorais foi verificado apenas para o derivado P06(AP) ($IC_{50} = 62,6 \mu M$), sugerindo que a isomerização da dupla e introdução de

grupo acetato na estrutura do precursor AP ($IC_{50} = 239,5 \mu M$) pode ser uma estratégia para obtenção de derivados mais ativos frente à linhagem tumoral HeLa.

♣ De modo geral, os resultados obtidos neste estudo reforçam a importância da biotransformação como estratégia para obtenção de novas estruturas químicas e como uma valiosa ferramenta para o entendimento de vias metabólicas e relações estrutura-atividade de substâncias naturais bioativas.

Referências

6 REFERÊNCIAS

ABRÃO, F.; ALVES, J.A.; ANDRADE, G.; DE OLIVEIRA, P.F.; AMBRÓSIO, S.R.; VENEZIANI, R.C.S.; TAVARES, D.C.; BASTOS, J.K.; MARTINS, C.H.G. Antibacterial effect of *Copaifera duckei* Dwyer oleoresin and its main diterpenes against oral pathogens and their cytotoxic effect. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1, 2018.

ABRÃO, F.; COSTA, L.D.A.; ALVES, J.M.; SENEDESE, J.M.; DE CASTRO, P.T.; AMBRÓSIO, S.R.; VENEZIANI, R.C.S.; BASTOS, J.K.; TAVARES, D.C.; MARTINS, C.H.G. *Copaifera langsdorffii* oleoresin and its isolated compounds: antibacterial effect and antiproliferative activity in cancer cell lines. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, n. 443, 2015.

AGUIAR, G.P.; CREVELIN, E.J.; DIAS, H.J.; AMBRÓSIO, S.R.; BASTOS, J.K.; HELENO, V.C.G.; VESSECCHI, R.; CROTTI, A.E.M. Electrospray ionization tandem mass spectrometry of labdane-type acid diterpenes. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 53, p. 1086-1096, 2018.

ALQAHTANI, S. *In silico* ADME-Tox modeling: progress and prospects. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v. 13, p. 1147–1158, 2017.

ALVES, J.M.; SENEDESE, J.M.; LEANDRO, L.F.; CASTRO, P.T.; PEREIRA, D.E.; CARNEIRO, L.J.; AMBRÓSIO, S.R.; BASTOS, J.K.; TAVARES, D.C. *Copaifera multijuga* oleoresin and its constituent diterpene (–)-copalic acid: genotoxicity and chemoprevention study. **Mutation Research-genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 819, p. 26-30, 2017.

ARGIKAR, U.A.; DUMOUCHEL, J.L.; DUNNE, C.E.; SARAN, C.; CIRELLO, A.L.; GUNDUZ, M. Ocular metabolism of levobunolol; historic and emerging metabolic pathways. **Drug Metabolism & Disposition**, v. 44, p. 1304–1312, 2016.

ASHA, S.; VIDYAVATHI, M. *Cunninghamella* – a microbial model for drug metabolism studies – a review. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 1, p. 16-29, 2009.

ATOLANI, O.; OLATUNJI, G.A. Isolation and evaluation of antiglycation potential of polyalthic acid (furanoterpene) from *Daniella oliveri*. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 4, n. 6, p. 407-411, 2014.

BARDAJÍ, D.K.R.; SILVA, J.J.M.; BIANCHI, T.C.; EUGENIO D.S.; OLIVEIRA, P.F.; LEANDRO L.F.; ROGEZ, H.L.G.; VENEZIANNI, R.C.S.; AMBROSIO S.R.; TAVARES D.C.; BASTOS J.K.; MARTINS, C.H.G. *Copaifera reticulata* oleoresin: chemical characterization and antibacterial properties against oral pathogens. **Anaerobe**, v. 40, p. 18-27, 2016.

BARRIOS-GONZÁLEZ J. Solid-state fermentation: physiology of solid medium, its molecular basis and applications. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 175-185, 2012.

BENDIKOV, M.Y.; MINERS, J.O.; SIMPSON, B.S.; ELLIOT, D.J.; SEMPLE, S.J.; CLAUDIE, D.J.; MCKINNON, R.A.; GILLAM, E.M.; SYKES, M.J. *In vitro* metabolism of the anti-inflammatory clerodane diterpenoid polyandric acid A and its hydrolysis product by human liver microsomes and recombinant cytochrome P450 and UDP-glucuronosyltransferase enzymes. **Xenobiotica**, v. 14, p.1-9, 2016.

BHATTACHARYA, S.; YADAV, J.S. Microbial P450 enzymes in bioremediation and drug discovery: emerging potentials and challenges. **Current Protein and Peptide Science**, v. 19, p. 75-86, 2018.

- BHATTI, H.N.; KHERA, R. A. Biotransformations of diterpenoids and triterpenoids: a review. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 16, p. 70-104, 2014.
- BINNS, N. Probióticos, prebióticos e a microbiota intestinal. In: **Monografias Concisas ILSI Europe**. São Paulo: ILSI Brasil, 2014. p. 1-36.
- BOHLMANN, F.; GRENZ, M.; DAHR, A.K.; GOODMAN M. Labdane derivatives and flavones from *Gutierrezia dracunculoides*. **Phytochemistry**, v. 20, p. 105-107, 1981.
- BOHLMANN, F.; ZDERO, C.; KING, R.M.; ROBINSON, H. Gutierrezial and further diterpenes from *Gutierrezia sarothrae*. **Phytochemistry**, v. 23, n. 9, p. 2007-2012, 1984.
- BORGES, C.H.G.; CRUZ, M.G.; CARNEIRO, L.J.; TAVARES, D.C.; DE OLIVEIRA, P.F.; VENEZIANI, R.C.S.; PARREIRA, R.L.T.; MAGALHAES, L.G.; AMBROSIO, S.R., DA SILVA, J.J.M.; BASTOS, J.K.; RODRIGUES, V.; CARAMORI, G.F.; NAGURNIAK, G.R. *Copaifera duckei* oleoresin and its main non-volatile terpenes: *in vitro* schistosomicidal properties. **Chemistry & Biodiversity**, v. 13, n. 10, p. 1348-1356, 2016.
- CALDERÓN, J.S.; QUIJANO, L.; GÓMEZ-GARIBAY, F.; MORÁN, M.; RÍOS, T. Labdane diterpenes from *Brickellia glomerata*. **Phytochemistry**, v. 26, n. 9, p. 2639-2641, 1987.
- CANO, A.; RAMÍREZ-APAN, M.T.; DELGADO, G. Biotransformation of sclareolide by filamentous fungi: cytotoxic evaluation of the derivatives. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, p. 1177-1182, 2011.
- CARNEIRO, L.J.; BIANCHI, T.C.; DA SILVA, J.J.M.; OLIVEIRA, L.C.; BORGES, C.H.G.; LEMES, D.C.; BASTOS, J.K.; VENEZIANI, R.C.S.; AMBRÓSIO, S.R. Development and validation of a rapid and reliable RP-HPLC-PDA method for the quantification of six diterpenes in *Copaifera duckei*, *Copaifera reticulata* and *Copaifera multijuga* oleoresins. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 29, p. 729-737, 2018.
- CARRERAS, C.R.; ROSSOMANDO, P.C.; GIORDANO, O.S. *ent*-Labdanes in *Eupatorium buniifolium*. **Phytochemistry**, v. 48, p. 1031-1034, 1998.
- CARVALHO, C.C.C.R.; FONSECA, M.M.R. Biotransformation of terpenes. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 134-142, 2006.
- CASCON, V.; GILBERT, B. Characterization of the chemical composition of oleoresins of *Copaifera guianensis* Desf., *Copaifera duckei* Dwyer and *Copaifera multijuga* Hayne. **Phytochemistry**, v.55, n.7, p.773-778, 2000.
- CASTELLANI, A. The water cultivation of pathogenic fungi. **Annales de la Société Belge de Médecine Tropicale**, v. 44, n. 2, p. 217-220, 1964.
- CHEN, K.; DUGAS, T.R.; COLE, R.B. Liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry investigations of fragmentation pathways of biliary 4,4'-methylenedianiline conjugates produced in rats. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 391, p. 271-278, 2008.

CHEN, Y.; GUO, J.; TANG, Y.; WU, L.; TAO, W.; QIAN, Y.; DUAN, J. Pharmacokinetic profile and metabolite identification of yuanhuapine, a bioactive component in *Daphne genkwa* by ultra-high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 112, p. 60-69, 2015.

CHEN, Z.; ZHU, Q.; ZONG, M.; GU, Z.; HAN, Y. Enzymatic synthesis and antibacterial activity of andrographolide derivatives. **Process Biochemistry**, v. 46, 1649-1653, 2011.

CHERNOV, S.V.; SHUL'TS E.E.; SHAKIROV, M.M.; TOLSTIKOV, G.A. Synthetic transformations of higher terpenoids: XII. Transformation of lambertianic acid into 14,16-epoxyabietane diterpenoids. **Russian Journal of Organic Chemistry**, v. 42, n. 1, p. 36-41, 2006.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; 2nd ed. Approved standard M38-A2, **Clinical and Laboratory Standards Institute**, v. 28, n. 16, 2008.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSIa). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; 9th ed. Approved standard M07-A9, **Clinical and Laboratory Standards Institute**, v. 32, n. 2, 2012.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSIb). Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria; 8th ed. Approved standard M11-A8, **Clinical and Laboratory Standards Institute**, v. 32, n. 5, 2012.

CRYAN, J.F.; DINAN, T.G. Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behavior. **Nature Reviews**, v. 13, p. 701-712, 2012.

DA SILVA, J.J.M.; CREVELIN, E.J.; CARNEIRO, L.J.; ROGEZ, H.; VENEZIANI, R.C.S.; AMBRÓSIO, S.R.; BERALDO, M.L.A.; BASTOS, J.K. Development of a validated ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry method for determination of acid diterpenes in *Copaifera* oleoresins. **Journal of Chromatography A**, v. 1515, p. 81-90, 2017.

DANIELSSON, H.; GUSTAFSSON, B. On serum-cholesterol levels and neutral fecal sterols in germ-free rats; bile acids and steroids 59. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 83, p. 482-485, 1959.

DEMARQUE, D.P.; CROTTI, A.E.M.; VESSECCHI, R.; LOPES, J.L.C.; LOPES, N.P. Fragmentation reactions using electrospray ionization mass spectrometry: an important tool for the structural elucidation and characterization of synthetic and natural products. **Natural Products Reports**, v. 33, p. 432-455, 2016.

DENG, S.; ZHANG, B.J.; WANG, C.Y.; TIAN, Y.; YAO, J.H.; AN, L.; HUANG, S.S.; PENG, J.Y.; LIU, K.X.; MA, X.C. Microbial transformation of deoxyandrographolide and their inhibitory activity on LPS-induced NO production in RAW 264.7 macrophages. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, p. 1615-1618, 2012.

DOS SANTOS, A.O.; IZUMI, E.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS-FILHO, B.P.; VEIGA JUNIOR, V.F.; NAKAMURA, C.V. Antileishmanial activity of diterpene acids in copaiba oil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, p. 59-64, 2013.

DOS SANTOS, G.F.; LIMA, G.S.; OLIVEIRA, G.P.; SOUZA FILHO, J.D.; AMARAL, L.S.; RODRIGUES-FILHO, E.; TAKAHASHI, J.A. New AChE inhibitors from microbial transformation of trachyloban-19-oic acid by *Syncephalastrum racemosum*. **Bioorganic Chemistry**, v. 79, p. 60–63, 2018.

EAGLING, V.A.; TJIA, J.F.; BACK, D.J. Differential selectivity of cytochrome P450 inhibitors against probe substrates in human and rat liver microsomes. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 45, p. 107-114, 1998.

ELSBY, R.; MAGGS, J.L.; ASHBY, J.; PARK, B.K. Comparison of the modulatory effects of human and rat liver microsomal metabolism on the estrogenicity of bisphenol A: implications for extrapolation to humans. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 297, p. 103-113, 2001.

FABER, K. **Biotransformations in organic chemistry**. 3a ed. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1997.

FAROOQ, A.; TAHARA, S. Biotransformation of two cytotoxic terpenes, α -santonin and sclareol by *Botrytis cinerea*. **Zeitschrift Naturforschung C**, v. 55c, p. 713–717, 2000.

FASINU, P.; BOUIC, P.J.; ROSENKRANZ, B. Liver-based *in vitro* technologies for drug biotransformation studies—A review. **Current Drug Metabolism**, v. 13, p. 215-224, 2012.

FISHER, M.B.; JACKSON, D.; KAERNER, A.; WRIGHTON, S.A.; BOREL, A.G. Characterization by liquid chromatography-nuclear magnetic resonance spectroscopy and liquid chromatography-mass spectrometry of two coupled oxidative conjugative metabolic pathways for 7-ethoxycoumarin in human liver microsomes treated with alamethicin. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 30, p. 270-275, 2002.

FONSECA, A.P.; ESTRELA, F.T.; MORAES, T.S.; CARNEIRO, L.J.; BASTOS, J.K.; SANTOS, R.A.; AMBRÓSIO, S.R.; MARTINS, C.H.; VENEZIANI, R.C. *In vitro* antimicrobial activity of plant-derived diterpenes against bovine mastitis bacteria. **Molecules**, v. 18, n. 7, p. 7865-7862, 2013.

FRAGA, B.M.; GONZÁLEZ, P.; GUILLERMO, R.; MELCHOR, G.H. The biotransformation of manoyl oxide derivatives by *Gibberella fujikuroi*: the fungal epimerization of an alcohol group. **Tetrahedron**, v. 54, p. 6159-6168, 1998.

FRAGA, B.M.; GUILLERMO, R.; HERNANDEZ, M.G.; CHAMY, M.C.; GARBARINO, J.A. Biotransformation of two stemodane diterpenes by *Mucor plumbeus*. **Tetrahedron**, v. 60, p. 7921-7932, 2004.

FRIJA, L.M.T; FRADE, R.F.M.; AFONSO, C.A.M. Isolation, chemical, and biotransformation routes of labdane-type diterpenes. **Chemical Reviews**, v. 111, n. 8, p. 4418-4452, 2011.

GARCÍA-GRANADOS, A.; FERNANDEZ, A.; GUTIÉRREZ, M.C.; MARTÍNEZ, A.; QUIRÓS, R.; RIVAS, F.; ARIAS, J.M. Biotransformation of *ent*-13-*epi*-manoyl oxides difunctionalized at C-3 and C-12 by filamentous fungi. **Phytochemistry**, v. 65, p. 107-115, 2004.

GARCÍA-GRANADOS, A.; MARTÍNEZ, A.; PARRA, A.; RIVAS, F. Manoyl-oxide biotransformations with filamentous fungi. **Current Organic Chemistry**, v. 11, p. 679-692, 2007.

GARCÍA-TAPIA, M.; SÁNCHEZ, J.R.G; ARRIETA, J.; OLIVARES-CORICHI, I.M.; SANTIAGO-CRUZ, J.A.; AHUMADA-ANAYA, A.K.; SÁNCHEZ-MENDOZA, M.E. Effects of polyalthic acid from *Croton reflexifolius* on viability of cancerous cells. **International Journal of Pharmacology**, v. 13, n. 3, p. 286-291, 2017.

GARCIA, P.A.; OLIVEIRA, A.B.; BATISTA, R. Occurrence, biological activities and synthesis of kaurane diterpenes and their glycosides. **Molecules**, v. 12, p. 455-483, 2007.

GARDNER, D.R.; PANTER, K.E.; STEGELMEIER, B.L. Implication of agathic acid from *Utah juniper* bark as an abortifacient compound in cattle. **Journal of Applied Toxicology**, v. 30, n. 2, p.115-119, 2010.

GOMES, N.D.M.; REZENDE, C.D.M.; FONTES, S.P.; HOVELL, A.M.C.; LANDGRAF, R.G.; MATHEUS, M.E. Antineoplastic activity of *Copaifera multijuga* oil and fractions against ascitic and solid Ehrlich tumor. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 119, n. 1, p. 179-184, 2008.

GONZÁLEZ-BURGOS, E.; CARRETERO, M.E.; GÓMEZ-SERRANILLOS, M.P. *Sideritis* spp.: Uses, chemical composition and pharmacological activities - A review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 135, p. 209-225, 2011.

GONZALEZ, F.J.; COUGHTRIE, M.; TUKEY, R.H. Drug Metabolism. In: BRUNTON, L.L.; CHABNER, B.A.; KNOLLMANN, B.C. (Ed.) **Goodman and Gilman's - The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 12a ed. New York: McGraw Hill, 2011. p. 123-143.

GRÖGER, M.; DINGER, J.; KIEHNTOPF, M.; PETERS, F.T.; RAUEN, U.; MOSIG, A.S. Preservation of cell structure, metabolism, and biotransformation activity of liver-on-chip organ models by hypothermic storage. **Advanced Healthcare Materials**, v. 7, e1700616, 2017.

GUSHIKEN, L.F.S.; HUSSNI, C.A.; BASTOS, J.K.; ROZZA, A.L.; BESERRA, F.P.; VIEIRA, A.J.; PADOVANI, C.R.; LEMOS, M.; POLIZELLO JUNIOR, M.; SILVA, J.J.M.; NÓBREGA, R.H.; MARTINEZ, E.R.M.; PELLIZZON, C.H. Skin wound healing potential and mechanisms of the hydroalcoholic extract of leaves and oleoresin of *Copaifera langsdorffii* Desf. Kuntze in rats. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, p. 1-16, 2017.

HANSON, J.R. **An Introduction to Biotransformations in Organic Chemistry**. 1a ed. Oxford: W.H. Freeman Spektrum, 1995

HARAGUCHI, H.; OIKE, S.; MUROI, H.; KUBO, I. Mode of antibacterial action of totarol, a diterpene from *Podocarpus nagi*. **Planta Medica**, v. 62, n. 2, p. 122-125, 1996.

HE, W.; LI, Y.; QIN, Y.; TONG, X.; SONG, Z.; ZHAO, Y.; WEI, R.; LI, L.; DAI, H.; WANG, W.; LUO, H.; YE, X.; ZHANG, L.; LIU, X. New cryptotanshinone derivatives with anti-influenza A virus activities obtained via biotransformation by *Mucor rouxii*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, p. 6365-6374, 2017.

HE, X.; WANG, Y.; HU, H.; WU, Y.; ZENG, X. Novel bioconversion products of andrographolide by *Aspergillus ochraceus* and their cytotoxic activities against human tumor cell lines. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 68, p. 89-93, 2011.

- HE, X.; ZENG, X.; HU, H.; WU, Y. Cytotoxic biotransformed products from andrographolide by *Rhizopus stolonifer* ATCC 12939. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 62, p. 242–247, 2010.
- HUA, J.; LUO, S.; LIU, Y.; LIU, Y.; TAN, Y.; FENG, L.; XIAO, C.; ZHANG, K.; LI, S.; NIU, X. New bioactive macrocyclic diterpenoids from *Euphorbia helioscopia*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 14, e1700327, 2017.
- HUSSER, C.; PÄHLER, A.; SEYMOUR, M.; KUHLMANN, O.; SCHADT, S.; ZELL, M. Profiling of dalcetrapib metabolites in human plasma by accelerator mass spectrometry and investigation of the free phenothiol by derivatisation with methylacrylate. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 152, p. 143-154, 2018.
- 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 and Therapeutics**, v. 46, n. 1, p. 67-93, 1990.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Produção da extração vegetal e da Silvicultura 2016 [Acesso em 13 jul. 2018]. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/economicas/agricultura-e-pecuaria/9105-producao-da-extracao-vegetal-e-da-silvicultura.html>
- ISHIHAMA, A. Modulation of the nucleoid, the transcription apparatus and the translation machinery in bacteria for stationary phase survival. **Genes to Cells**, v. 4, n. 3, p. 135-143, 1999.
- IZUMI, E.; UEDA-NAKAMURA, T.; VEIGA JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C. Terpenes from *Copaifera* demonstrated *in vitro* antiparasitic and synergic activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, p. 2994-3001, 2012.
- 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.
- JESCHEK, M.; PANKE, S.; WARD, T.R. Artificial metalloenzymes on the verge of new-to-nature metabolism. **Trends in Biotechnology**, v. 36, p. 60–72, 2018.
- JIA, Y.W.; ZENG, Z.Q.; SHI, H.L.; LIANG, J.; LIU, Y.M.; TANG, Y.X.; LIAO, X. Characterization of *in vitro* metabolites of irisfloreantin by rat liver microsomes using high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. **Biomedical Chromatography**, v. 30, p. 1363-70, 2016.
- KEELING, C.I.; BOHLMANN, J. Diterpene resin acids in conifers. **Phytochemistry**, v. 67, p. 2415-2423, 2006.
- KIMURA, K.; MINAMIKAWA, Y.; OGASAWARA, Y.; YOSHIDA, J.; SAITOH, K.; SHINDEN, H.; YE, Y.Q.; TAKAHASHI, S.; MIYAKAWA, T.; KOSHINO, H. Kujigamberol, a new dinorlabdane diterpenoid isolated from 85 million years old Kuji amber using a biotechnological assay. **Fitoterapia**, v. 83, n. 5, p. 907-912, 2012.
- KIREN, Y.; NUGROHO, A.E.; HIRASAWA, Y.; SHIROTA, O.; BEKENOVA, M.; NARBEEKOVICH, N.O.; SHAPILOVA, M.; MAENO, H.; MORITA, H. Mumiic acids A-E: new diterpenoids from mumiyo. **Journal of Natural Medicines**, v. 68, n. 1, p. 199-205, 2014.

- KOPPEL, N.; REKDAL, V.M.; BALSUS, E.P. Chemical transformation of xenobiotics by the human gut microbiota. **Science**, v. 356, n. 6344, 2017.
- KUDO, T.; GODA, H.; YOKOSUKA, Y.; TANAKA, R.; KOMATSU, S.; ITO, K. Estimation of the contribution of CYP2C8 and CYP3A4 in repaglinide metabolism by human liver microsomes under various buffer conditions. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 106, n. 9, p. 2847-2852, 2017.
- KUMAR, R.; SAHA, A.; SAHA, D. Biotransformation of 16-oxacleroda-3,13(14)E-dien-15-oic acid isolated from *Polyalthia longifolia* by *Rhizopus stolonifera* increases its antifungal activity. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 34, p. 212-218, 2016.
- LAHLOU, S.; CORREIA JUNIOR, C.A.B.; DOS SANTOS, M.V.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P.; DUARTE, G.P.; MAGALHÃES, P.J.C. Mechanisms underlying the cardiovascular effects of a labdenic diterpene isolated from *Moldenhawera nutans* in normotensive rats. **Vascular Pharmacology**, v. 46, p. 60-66, 2007.
- LE FOL, V.; BRION, F.; HILLENWECK, A.; PERDU, E.; BRUEL, S.; AÏT-AÏSSA, S.; CRAVEDI, J.P.; ZALCO, D. Comparison of the *in vivo* biotransformation of two emerging estrogenic contaminants, BP2 and BPS, in zebrafish embryos and adults. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 4, 704, 2017.
- LEANDRO, L.F.; MARTINS, C.H.G.; MORAES, T.S.; VARANDA, E.A.; BASTOS, J.K.; TAVARES, D.C.; DE GRANDIS, R.A.; RESENDE, F.A.; SENEDESE, J.M.; OLIVEIRA, P.F.; OZELIN, S.D.; ALVES, J.M. Assessment of the antibacterial, cytotoxic and mutagenic potential of the phenolic-rich hydroalcoholic extract from *Copaifera trapezifolia* Hayne leaves. **Journal of Medical Microbiology**, v. 65, p. 937-950, 2016.
- LEE, S.T.; GARDNER, D.R.; GARROSIAN, M.; PANTER, K.E.; SERREQUI, A.N.; SCHOCH, T.K.; STEGELMEIER, B.L. Development of enzyme-linked immunosorbent assays for isocupressic acid and serum metabolites of isocupressic acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 11, p. 3228-3233, 2003.
- LEKEHAL, M.; PESSAYRE, D.; LEREAU, J.M.; MOULIS, C.; FOURASTE, I.; FAU D. Hepatotoxicity of the herbal medicine germander: metabolic activation of its furano diterpenoids by cytochrome P450 3A depletes cytoskeleton-associated protein thiols and forms plasma membrane blebs in rat hepatocytes. **Hepatology**, v. 24, n. 1, p. 212-218, 1996.
- LERESCHE, J.; MEYER, H. Chemocatalysis and biocatalysis (biotransformation): some thoughts of a chemist and of a biotechnologist. **Organic Process Research & Development**, v. 10, p. 572-580, 2006.
- LEVERRIER, A.; MARTIN, M.T.; SERVY, C.; OUAZZANI, J.; RETAILLEAU, P.; AWANG, K.; MUKHTAR, M.R.; GUERITTE, F.; LITAUDON, M. Rearranged diterpenoids from the biotransformation of *ent-trachyloban-18-oic acid* by *Rhizopus arrhizus*. **Journal of Natural Products**, v. 73, p. 1121-1125, 2010.
- LI, Y.; FAN, Y.; SU, H.; WANG, Q.; LI, G.; HU, Y.; JIANG, J.; TAN, B.; QIU, F. Metabolic characteristics of tanshinone I in human liver microsomes and S9 subcellular fractions. **Xenobiotica**, 2018.
- LIN, S. J.; SHORT, R. E.; FORD, S. P.; GRINGS, E. E.; ROSAZZA, J. P. N. *In vitro* biotransformations of isocupressic acid by cow rumen preparations: formation of agathic and dihydroagathic acids. **Journal of Natural Products**, v. 61, n. 1, p. 51-56, 1998.

- LIU, J.; WU, J.; WANG, X.; CAI, Z. Study of the phase I and phase II metabolism of a mixture containing multiple tanshinones using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 21, p. 2992-2998, 2007.
- LIU, W.S.; YANG, C.Y.; FANG, T.J. Strategic ultrasound-induced stress response of lactic acid bacteria on enhancement of β -glucosidase activity for bioconversion of isoflavones in soymilk. **Journal of Microbiological Methods**, v. 148, p. 145-150, 2018.
- LIU, X.; XIE, D.; CHEN, R.; MEI, M.; ZOU, J.; CHEN, X.; DAI, J. A furantaxane with an unusual 6/8/6/5 ring system and potent tumor MDR reversal activity obtained via microbial transformation. **Organic Letters**, v. 14, p. 4106-4109, 2012.
- LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil nativas e exóticas**. 2a ed. Santo André: IPSIS, 2008.
- MA, L.; LIU, X.; LIANG, J.; ZHANG, Z. Biotransformations of cinnamaldehyde, cinnamic acid and acetophenone with *Mucor*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 27, n. 9, p. 2133 - 2137, 2011.
- MAFEZOLI, J.; OLIVEIRA, M.C.F.; PAIVA, J.R.; SOUSA, A.H.; LIMA, M.A.S.; SILVA JÚNIOR, J.N.; BARBOSA, F.G.; WIJERATNE, K.; GUNATILAKA, A.A.L. Stereo and regioselective microbial reduction of the clerodane diterpene 3,12-dioxo-15,16-epoxy-4-hydroxycleroda-13(16),14-diene. **Natural Product Communications**, v. 9, p. 759-762, 2014.
- MARQUINA, S.; PARRA, J.L.; GONZALEZ, M.; ZAMILPA, A.; ESCALANTE, J.; TREJO-HERNÁNDEZ, M.R.; ALVAREZ, L. Hydroxylation of the diterpenes *ent*-kaur-16-en-19-oic and *ent*-beyer-15-en-19-oic acids by the fungus *Aspergillus niger*. **Phytochemistry**, v. 70, p. 2017-2022, 2009.
- MARTINS, M.P.; OUZZANI, J.; ARCILE, G.; JELLER, A.H.; LIMA, J.P.F.; SELEGHIM, M.H.R.; OLIVEIRA, A.L.L.; DEBONSI, H.M.; VENÂNCIO, T.; YOKOYA, N.S.; FUJII, M.T.; PORTO, A.L.M. Biohydroxylation of (-)-Ambrox®, (-)-sclareol, and (+)-sclareolide by whole cells of Brazilian marine-derived fungi. **Marine Biotechnology**, v. 17, p. 211-218, 2015.
- MATEOS DIAZ, J.C.; RODRÍGUEZ, J.A.; ROUSSOS, S.; CODOVA, J.; ABOUSALHAM, A.; CARRIERE, F.; BARATTI, J. Lipase from the thermotolerant fungus *Rhizopus homothallicus* is more thermostable when produced using solid state fermentation than liquid fermentation procedures. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 5, p. 1042-1050, 2006.
- MECA, G.; RITIENI, A.; MAÑES, J. Reduction in vitro of the minor *Fusarium mycotoxin beauvericin* employing different strains of probiotic bacteria. **Food Control**, v. 28, n. 2, p. 435-440, 2012.
- MENDOZA, L.; ESPINOZA, P.; URZUA, A.; VIVANCO, M.; COTORAS, M. *In vitro* antifungal activity of the diterpenoid 7 α -hydroxy-8(17)-labden-15-oic acid and its derivatives against *Botrytis cinerea*. **Molecules**, v. 14, p. 1966-1979, 2009.
- MENDOZA, L.; SEPÚLVEDA, C.; MELO, R.; COTORAS, M. Characterization of the antifungal activity against *Botrytis cinerea* of sclareol and 13-epi-sclareol, two labdane-type diterpenoids. **Journal of the Chilean Chemical Society**, v. 60, p. 3024-3028, 2015.

- MIYAZAWA, M.; SHIMAMURA, H.; NAKAMURA, S.; KAMEOKA, H. Antimutagenic activity of (+)-polyalthic acid from *Vitex rotundifolia*. **Journal of Agriculture Food Chemistry**, v. 43, p. 3012-3015, 1995.
- MIZUNO, C.S.; SOUZA A.B.; AMBROSIO, S.R.; TEKWANI, B.L.; VENEZIANI, R.C.S. Synthesis and biological evaluation of polyalthic acid derivatives for the treatment of neglected diseases. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 25, n. 23, p. 5529-5531, 2015.
- MONTEIRO, A.F.; SEIDL, C.; SEVERINO, V.G.P.; CARDOSO, C.L.; CASTRO-GAMBOA, I. Biotransformation of labdane and halimane diterpenoids by two filamentous fungi strains. **Royal Society Open Science**, v. 4, n. 11, 170854, 2017.
- MULLER, J.L.; PROTTI, K.L.; MACHADO, M.S.; LACERDA, L.L.V.; BRESOLIN, T.M.B.; PODLECH, P.S. Comparison of *Saccharomyces boulardii* growth in an air-lift fermentor and in a shaker. **Food Science and Technology**, v. 27, n. 4, p. 688-693, 2007.
- NEVES, A.L.C. **As controvérsias em torno da experimentação animal: contribuições para divulgação científica por meio de uma análise dialética** [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Educação, Instituto de Física, Instituto de Química e Instituto de Biociências, 2016.
- ORBACH, S.M.; LESS, R.R.; KOTHARI, A.; RAJAGOPALAN, P. *In vitro* intestinal and liver models for toxicity testing. **ACS Biomaterials Science & Engineering**, v. 3, p. 1898–1910, 2017.
- PAIVA, L.A.F.; CUNHA K.M.D.; SANTOS, F.A.; GRAMOSA, N.V.; SILVEIRA, E.R.; RAO, V.S.N. Investigation on the wound healing activity of oleo-resin from *Copaifera langsdorffii* in rats. **Phytotherapy Research**, v. 16, n. 8, p. 737-739, 2002.
- PAIVA, L.A.F.; RAO, V.S.N.; GRAMOSA, N.V.; SILVEIRA, E.R. Gastroprotective effect of *Copaifera langsdorffii* oleoresin on experimental gastric ulcer models in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 62, p. 73–78, 1998.
- PALUDO, C.R.; SILVA-JUNIOR, E.A.; SILVA, E.O.; VESSECCHI, R.; LOPES, N.P.; PUPO, M.T.; EMERY, F.S.; GONÇALVES, N.S.; SANTOS, R.A.; FURTADO, N.A.J.C. Inactivation of β -lapachol cytotoxicity by filamentous fungi that mimic the human blood metabolism. **European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 42, p. 213-220, 2017.
- PARKINSON, A.; OGILVIE, B.W. Biotransformação de xenobióticos. In: KLAASSEN, C.D.; WATKINS, J.B. (Ed.) **Fundamentos em Toxicologia de Casarett & Doull**. 2a ed. Porto Alegre: AMGH, 2012; p. 72.
- PARSHIKOV, I.A.; WOODLING, K.A.; SUTHERLAND, J.B. Biotransformations of organic compounds mediated by cultures of *Aspergillus niger*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 17, p. 6971-6986, 2015.
- PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G.S.; VYVYAN, J.R. **Introduction to spectroscopy**. 4a ed. Belmont: Cengage Learning, 2009.
- PENG, J.; KASANA, N.; STANLEY, C.E.; CHADWICK, J.; FRONCZEK, F.R.; HAMANN, M.T. Microbial metabolism studies of cyanthiwigin B and synergic antibiotic effects. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 5, p. 727–730, 2006.

PEREIRA, H.S.; LEÃO-FERREIRA, L.R.; MOUSSATCHÉ, N.; TEIXEIRA, V.L.; CAVALCANTI, D.N.; COSTA, L.J.; DIAZ, R.; FRUGULHETTI, I.C. Antiviral activity of diterpenes isolated from the Brazilian marine alga *Dictyota menstrualis* against human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). **Antiviral Research**, v. 64, p. 69-76, 2004.

PERTINO, M.W.; THEODULOZ, C.; PALENZUELA, J.A.; AFONSO, M.M.; YESILADA, E.; MONSALVE, F.; GONZÁLEZ, P.; DROGUETT, D.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Synthesis and pharmacological activity of diterpenyl-naphthoquinone derivatives. **Molecules**, v. 16, p. 8614-8628, 2011.

PORTO, T.S.; SIMÃO, M.R.; CARLOS, L.Z.; MARTINS, C.H.G.; FURTADO, N.A.J.C.; SAID, S.; ARAKAWA, N.S.; SANTOS, R.A.; VENEZIANI, R.C.S.; AMBRÓSIO, S.R. Pimarane-type diterpenes obtained by biotransformation: antimicrobial properties against clinically isolated Gram-positive multidrug-resistant bacteria. **Phytotherapy Research**, v. 27, p. 1502-1507, 2013.

REYES-TREJO, B.; SÁNCHEZ-MENDOZA, M.E.; BECERRA-GARCÍA, A.A.; CEDILLO-PORTUGAL, E.; CASTILLO-HENKEL, C.; ARRIETA, J. Bioassay-guided isolation of an anti-ulcer diterpenoid from *Croton reflexifolius*: role of nitric oxide, prostaglandins and sulfhydryls. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 60, n. 7, p. 931-936, 2008.

RIBEIRO, V.P.; ARRUDA, C.; EL-SALAM, M.A.; BASTOS, J.K. Brazilian medicinal plants with corroborated anti-inflammatory activities: a review. **Pharmaceutical Biology**, v. 56, n. 1, p. 253-268, 2018.

RICO-MARTÍNEZ, M.; MEDINA, F.G.; MARRERO, J.G.; OSEGUEDA-ROBLES, S. Biotransformation of diterpenes. **RSC Advances**, v. 4, p. 10627-10647, 2014.

RIOS, M.N.D.S.; PASTORE JUNIOR, F. **Plantas da Amazônia: 450 Espécies de Uso Geral**. Brasília: Universidade de Brasília, 2011.

ROCHA, A.D.; VIEIRA, H.S.; TAKAHASHI, J.A.; BOAVENTURA, M.A.D. Synthesis of a new allelopathic agent from the biotransformation of *ent*-15 α -hydroxy-16-kauren-19-oic acid with *Fusarium proliferatum*. **Natural Product Research**, v. 31, p. 2647-2653, 2017.

ROMERO, A.L. **Contribuição ao conhecimento químico do óleo-resina de copaíba: configuração absoluta de terpenos** [dissertação]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, 2007.

SANTIAGO, K.B.; CONTI, B.J.; TELES ANDRADE, B.F.; SILVA, J.J.M.; ROGEZ, H.L.G.; CREVELIN, J.E.; MORAES, L.A.B.; VENEZIANI, R.C.S.; AMBRÓSIO, S.R.; BASTOS, J.K.; SFORCIN, J.M. Immunomodulatory action of *Copaifera* spp oleoresins on cytokine production by human monocytes. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 70, p. 12-18, 2015.

SANTOS, A.O.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS, B.P.; VEIGA JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C.; NAKAMURA, C.V. Effect of Brazilian copaiba oils on *Leishmania amazonensis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, n. 2, p. 204-208, 2008.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; ARANDA, C.; KURINA, M.; RODRÍGUEZ, J.A.; THEODULOZ, C. Biotransformations of imbricatolic acid by *Aspergillus niger* and *Rhizopus nigricans* cultures. **Molecules**, v. 12, n. 5, p.1092-1100, 2007.

SCIFINDER [acesso em 15 mai. 2018]. Disponível em: <https://scifinder.cas.org/>

SEPÚLVEDA, B.; QUISPE, C.; SIMIRGIOTIS, M.; GARCÍA-BELTRÁN, O.; ARECHE, C. Gastroprotective effects of new diterpenoid derivatives from *Azorella cuatrecasasii* Mathias & Constance obtained using a β -cyclodextrin complex with microbial and chemical transformations. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, p. 3220-3222, 2016.

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

SHANLEY, P.; LEITE, A.; ALECHANDRE, A.; AZEVEDO, C. Copaíba: *Copaifera* spp. In: SHANLEY, P.; MEDINA, G. (Ed.) **Frutíferas e plantas úteis na vida Amazônica**. Belém: CIFOR and IMAZON, 2005. p. 85–94.

SILVA, E.O.; CARVALHO, T.C.; PARSHIKOV, I.A.; SANTOS, R.A.; EMERY, F.S.; FURTADO, N.A.J.C. Cytotoxicity of lapachol metabolites produced by probiotics. **Letters in Applied Microbiology**, v. 59, n. 1, p. 108-114, 2014.

SILVA, E.O.; FURTADO, N.A.J.C.; ALEU, J.; COLLADO, I.G. Non-terpenoid biotransformations by *Mucor* species. **Phytochemistry Reviews**, v. 14, n. 5, p. 745-764, 2015.

SILVA, E.O.; FURTADO, N.A.J.C.; ALEU, J.; COLLADO, I.G. Terpenoid biotransformations by *Mucor* species. **Phytochemistry Reviews**, v. 12, p. 857–876, 2013.

SILVA, J.L.E. **Utilização de modelos microbianos para estudos de metabolismo *in vitro* do ácido copálico** [dissertação]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, 2013.

SILVERMAN, R.B.; HOLLADAY, M.W. Drug Metabolism. In: **The organic chemistry of drug design and drug action**. 3a ed. San Diego: Academic Press, 2014. p. 357-422.

SNIDER, D.B.; GARDNER, D.R.; JANKE, B.H.; ENSLEY, S.M. Pine needle abortion biomarker detected in bovine fetal fluids. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 27, n. 1, p. 74-79, 2015.

SOUSA, I.P.; TEIXEIRA, M.V.S.; FURTADO, N.A.J.C. An overview of biotransformation and toxicity of diterpenes. **Molecules**, v. 23, n. 6, e1387, 2018.

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

SOUZA, A.B.; MARTINS, C.H.G.; SOUZA, M.G.M.; FURTADO, N.A.J.C.; HELENO, V.C.G.; SOUSA, J.P.B.; ROCHA, E.M.P.; BASTOS, J.K.; CUNHA, W.R.; VENEZIANI, R.C.S.; AMBRÓSIO, S.R. Antimicrobial activity of terpenoids from *Copaifera langsdorffii* Desf. against cariogenic bacteria. **Phytotherapy Research**, v. 25, p. 215-220, 2011.

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

STÉVIGNY, C.; JIWAN, J.H.; ROZENBERG, R.; HOFFMANN, E.; QUETIN-LECLERCQ J. Key fragmentation patterns of aporphine alkaloids by electrospray ionization with multistage mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 18, p. 523-528, 2004.

SUBRAMANIYAM, R.; VIMALA, R. Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: a comparative study. **International Journal of Science and Nature**, v. 3, n. 3, p. 480-486, 2012.

SULTANA, N.; SAIFY, Z.S. Enzymatic biotransformation of terpenes as bioactive agents. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 28, p. 1113–1128, 2013.

SUN, F.; YANG, S.; ZHANG, H.; ZHOU, J.; LI, Y.; ZHANG, J.; JIN, Y.; WANG, Z.; LI, Y.; SHEN, J.; ZHANG, S.; CAO, X. Comprehensive analysis of tiamulin metabolites in various species of farm animals using ultra-high-performance liquid chromatography coupled to quadrupole/time-of-flight. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, p. 199-207, 2017.

SURA, M.B.; ANKIREDDY, M.; PONNAPALLI, M.G. Biotransformation of agalochaexcoerin A by *Aspergillus flavus*. **Natural Product Research**, v. 29, p. 838-841, 2015.

TAKAHASHI, J.A.; GOMES, D.C.; LYRA, F.H.; SANTOS, G.F.; MARTINS, L.R. The remarkable structural diversity achieved in *ent*-kaurane diterpenes by fungal biotransformations. **Molecules**, v. 19, p. 1856-1886, 2014.

TAPIA, L.; TORRES, J.; MENDOZA, L.; URZÚA, A.; FERREIRA, J.; PAVANI, M.; WILKENS, M. Effect of 13-*epi*-sclareol on the bacterial respiratory chain. **Planta Medica**, v. 70, p. 1058-1063, 2004.

TAYLOR, L. **The healing power of rainforest herbs: a guide to understanding and using herbal medicinals**. 1a ed. New York: Square One Publishers, 2005.

TENG J.; ZHANG, R.; ZHANG, Y.; DUAN, H.; TAKAISHI, Y. A new labdanic norditerpene from *Pinus sylvestris*. **Natural Product Research**, v. 24, n. 17, p. 1587–1591, 2010.

TENG, R.; MCMANUS, D.; AYLWARD, J.; OGBOURNE, S.; ARMSTRONG, D.; MAU, S.; JOHNS, J.; BACIC, A. Biotransformation of ingenol-3-angelate in four plant cell suspension cultures. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 27, p. 186-194, 2009.

TIAN, T.; JIN, Y.; MA, Y.; XIE, W.; XU, H.; ZHANG, K.; ZHANG, L.; DU, Y. Identification of metabolites of oridonin in rats with a single run on UPLC-Triple-TOF-MS/MS system based on multiple mass defect filter data acquisition and multiple data processing techniques. **Journal of Chromatography B**, v. 1006, p. 80-92, 2015.

TINCUSI, B.M.; JIMÉNEZ, I.A.; BAZZOCCHI, I.L.; MOUJIR, L.M.; MAMANI, Z.A.; BARROSO, J.P.; RAVELO, A.G.; HERNÁNDEZ, B.V. Antimicrobial terpenoids from the oleoresin of the Peruvian medicinal plant *Copaifera paupera*. **Planta Medica**, v. 68, p. 808–812, 2002.

TRÉZ, T. Experimentação Animal: um obstáculo ao avanço científico. 1a ed. Porto Alegre: Tomo Editorial, 2015.

TRINDADE, R.; SILVA, J.K.; SETZER, W.N. *Copaifera* of the Neotropics: a review of the phytochemistry and pharmacology. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, 1511, 2018.

UENO, A.K.; BARCELLOS, A.F.; COSTA-SILVA, T.A.; MESQUITA, J.T.; FERREIRA, D.D.; TEMPONE, A.G.; ROMOFF, P.; ANTAR, G.M.; LAGO, J.H.G. Antitrypanosomal activity and evaluation of the mechanism of action of diterpenes from aerial parts of *Baccharis retusa* (Asteraceae). **Fitoterapia**, v. 125, p. 55-58, 2018.

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE (USPTO) [acesso em 15 mai. 2018]. Disponível em: <https://www.uspto.gov/patent>.

URANO, R.P.M.; RODRIGUES, F.T.; BERLINCK, R.G.S. Utilização de detecção por espalhamento de luz evaporativo para a análise de produtos naturais. **Química Nova**, v. 35, n. 6, p. 1198-1208, 2012.

VASIC-RACKI, D. History of industrial biotransformations – dreams and realities. In: LIESE, A.; SEELBACH, K.; WANDREY, C. (Ed.) **Industrial Biotransformations**. Weinheim: Wiley, 2006. p. 1-36.

VEHOVEC, T.; OBREZA, A. Review of operating principle and applications of the charged aerosol detector. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p.1549-1556, 2010.

VEIGA JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A.M. Plantas medicinais: Cura segura? **Química Nova**, v. 3, p. 519-528, 2005.

VEIGA JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C. O gênero *Copaifera* L. **Química Nova**, v. 25, n. 2, p. 273-286, 2002.

VEIGA JUNIOR, V.F.; ROSAS, E.C.; CARVALHO, M.V.; HENRIQUES, M.G.M.O.; PINTO, A.C. Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne – a comparative study. **Journal of Ethnopharmacology**, v.112, n. 2, p. 248-254, 2007.

VENEZIANI, R.C.S.; AMBRÓSIO, S.R.; MARTINS, C.H.G.; CROTTI, A.E.M.; TIRAPELLI, C.R. Diterpenos: aspectos químicos e biológicos. In: FURTADO, N.A.J.C.; VENEZIANI, R.C.S.; AMBRÓSIO, S.R.; EMERY, F.S.; MARCHETTI, J.M. (Ed.) **Farmacognosia**. 1a ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2017. p. 293-313.

VENISETTY, R. K.; CIDDI, V. Application of microbial biotransformation for the new drug discovery using natural drugs as substrates. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 4, p. 153-167, 2003.

VIEIRA, R.G.L.; MORAES, T.S.; SILVA, L.O.; BIANCHI, T.C.; VENEZIANI, R.C.S.; AMBRÓSIO, S.R.; BASTOS, J.K.; PIRES, R.H.; MARTINS, C.H.G. *In vitro* studies of the antibacterial activity of *Copaifera* spp. oleoresins, sodium hypochlorite, and peracetic acid against clinical and environmental isolates recovered from a hemodialysis unit. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, v. 7, n. 14, p. 1-13, 2018.

VYLKOVA, S. Environmental pH modulation by pathogenic fungi as a strategy to conquer the host. **PLoS Pathogens**, v. 13, n. 2, e1006149, 2017.

VYLKOVA, S.; CARMAN, A.J.; DANHOF, H.A.; COLLETTE, J.R.; ZHOU, H.; LORENZ, M.C. The fungal pathogen *Candida albicans* autoinduces hyphal morphogenesis by raising extracellular pH. **MBio**, v. 2, n. 3, e00055-11, 2011.

WANG, M.; DAI, H.; LI, X.; LI, Y.; WANG, L.; XUE, M. Structural elucidation of metabolites of tanshinone I and its analogue dihydrotanshinone I in rats by HPLC-ESI-MSⁿ. **Journal of Chromatography B**, v. 878, p. 915-924, 2010.

WARIDEL, P.; WOLFENDER, J.; LACHAVANNE, J.; HOSTETTMANN, K. *ent*-Labdane glycosides from the aquatic plant *Potamogeton lucens* and analytical evaluation of the lipophilic extract constituents of various *Potamogeton* species. **Phytochemistry**, v. 65, n. 7, p. 945-954, 2004.

WELCH, K.D.; GARDNER, D.R.; PFISTER, J.A.; PANTER, K.E.; ZIEGLAR J.; HALL, J.O. A comparison of the metabolism of the abortifacient compounds from *Ponderosa pine* needles in conditioned versus naive cattle. **Journal of Animal Science**, v. 90, n. 12, p. 4611-1617, 2012.

WERMUTH, C.G.; GANELLIN, C.R.; LINDBERG, P.; MITSCHER, L.A. Glossary of terms used in medicinal chemistry (IUPAC Recommendations 1998 - online). **Pure and Applied Chemistry**, v. 70, p. 1129-1143, 2009.

WU, C.; ZACCHETTI, B.; RAM, A.F.J.; WEZEL, G.P.; CLAESSEN, D.; CHOI, Y.H. Expanding the chemical space for natural products by *Aspergillus-Streptomyces* co-cultivation and biotransformation. **Scientific Reports**, v. 5, 10868, 2015.

WU, Y.; CAO, Y.; LIU, X.; CHENG, Z.H. Regio- and stereo-selective hydroxylations of ingenane diterpenoids by *Mortierella ramanniana* and *Gibberella fujikuroi*. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 14, p. 939-945, 2016.

YAMAZAKI, H.; INOUE, K.; MIMURA, M.; ODA, Y.; GUENGERICH, F.P.; SHIMADA, T. 7-ethoxycoumarin O-deethylation catalyzed by cytochromes P450 1A2 and 2E1 in human liver microsomes. **Biochemical Pharmacology**, v. 51, p. 313-319, 1996.

YANG, L.; CHU, J. S.; FIX, J. A. Colon-specific drug delivery: new approaches and *in vitro/in vivo* evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 235, n. 1 - 2, p. 1 - 15, 2002.

ZENGER, K.; AGNOLET, S.; SCHNEIDER, B.; KRAUS, B. Biotransformation of flavokawains A, B and C, chalcones from Kava (*Piper methysticum*) by human liver microsomes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 28, p. 6376-6385, 2015.

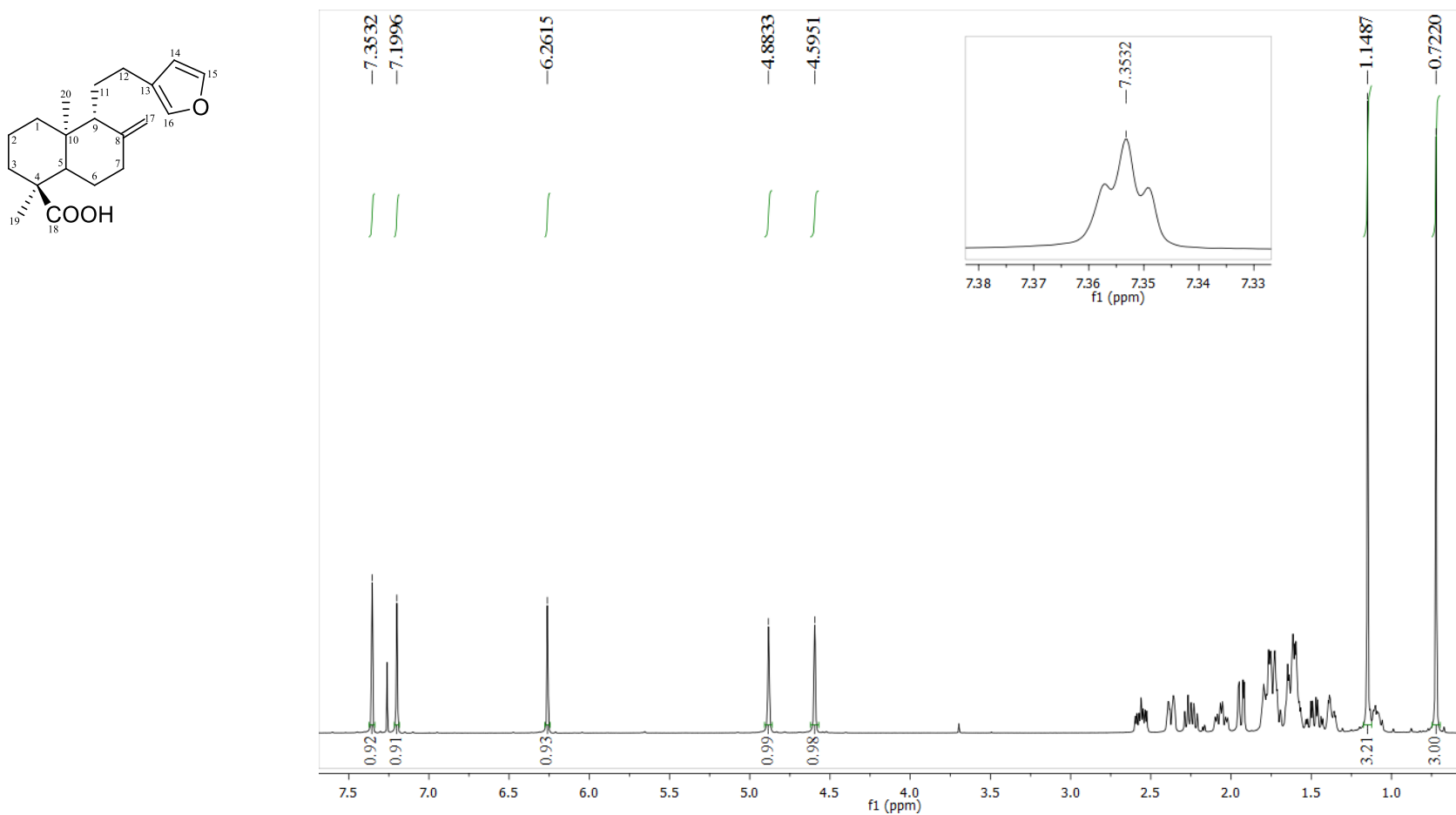
ZHANG, X.; YE, M.; GONG, Y.; FENG, L.; TAO, S.; YIN, J.; GUO, D. Biotransformation of pseudolaric acid B by *Chaetomium globosum*. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 2064-2067, 2011.

ZOLEZZI, J. M.; LINDSAY, C.B.; SERRANO, F.G.; URETA, R.C.; THEODULOZ, C.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; INESTROSA, N.C. Neuroprotective effects of ferruginol, jatrophone, and junicedric acid against amyloid- β injury in hippocampal neurons. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 63, n. 2, p. 705-723, 2018.

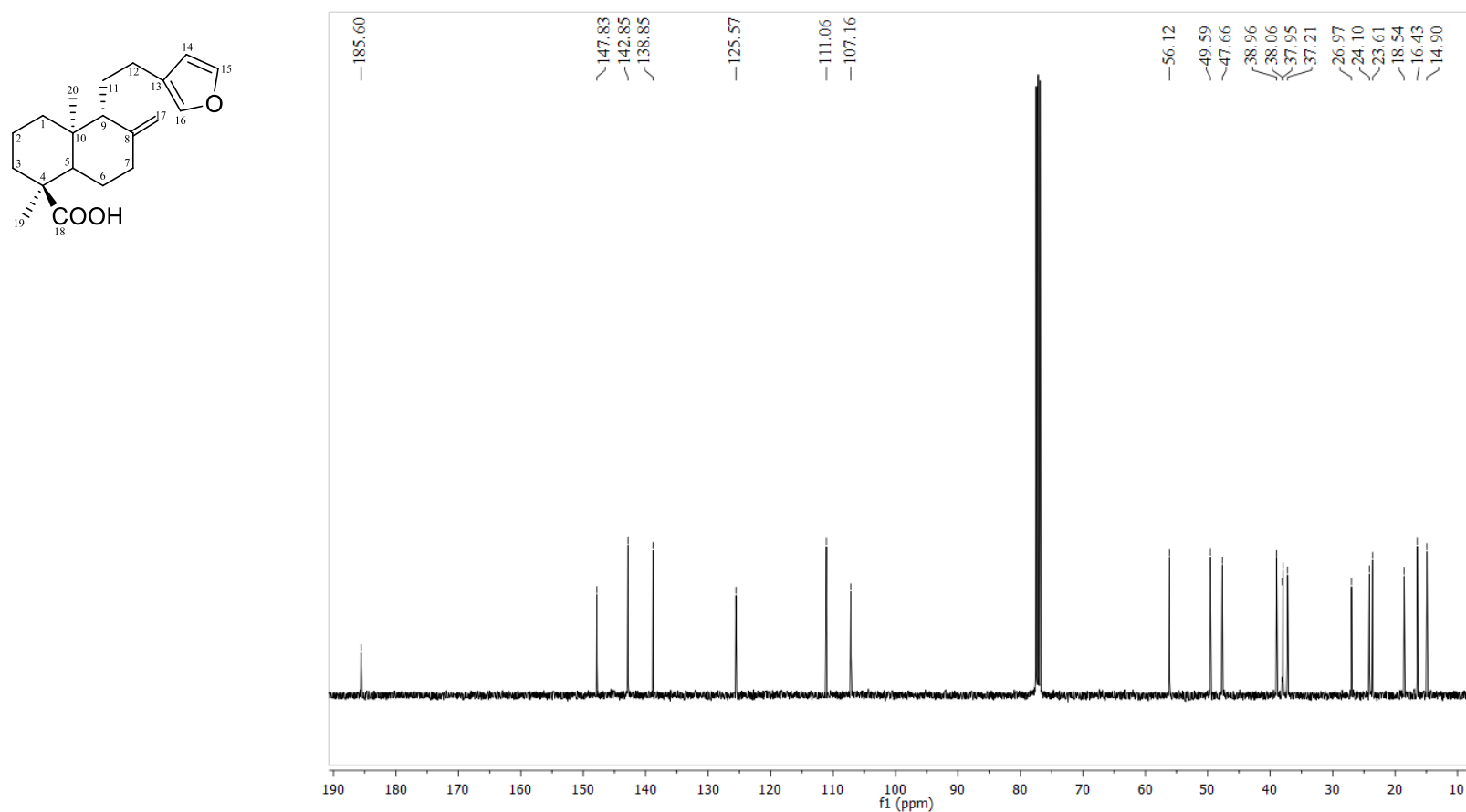
Apéndices

APÊNDICES

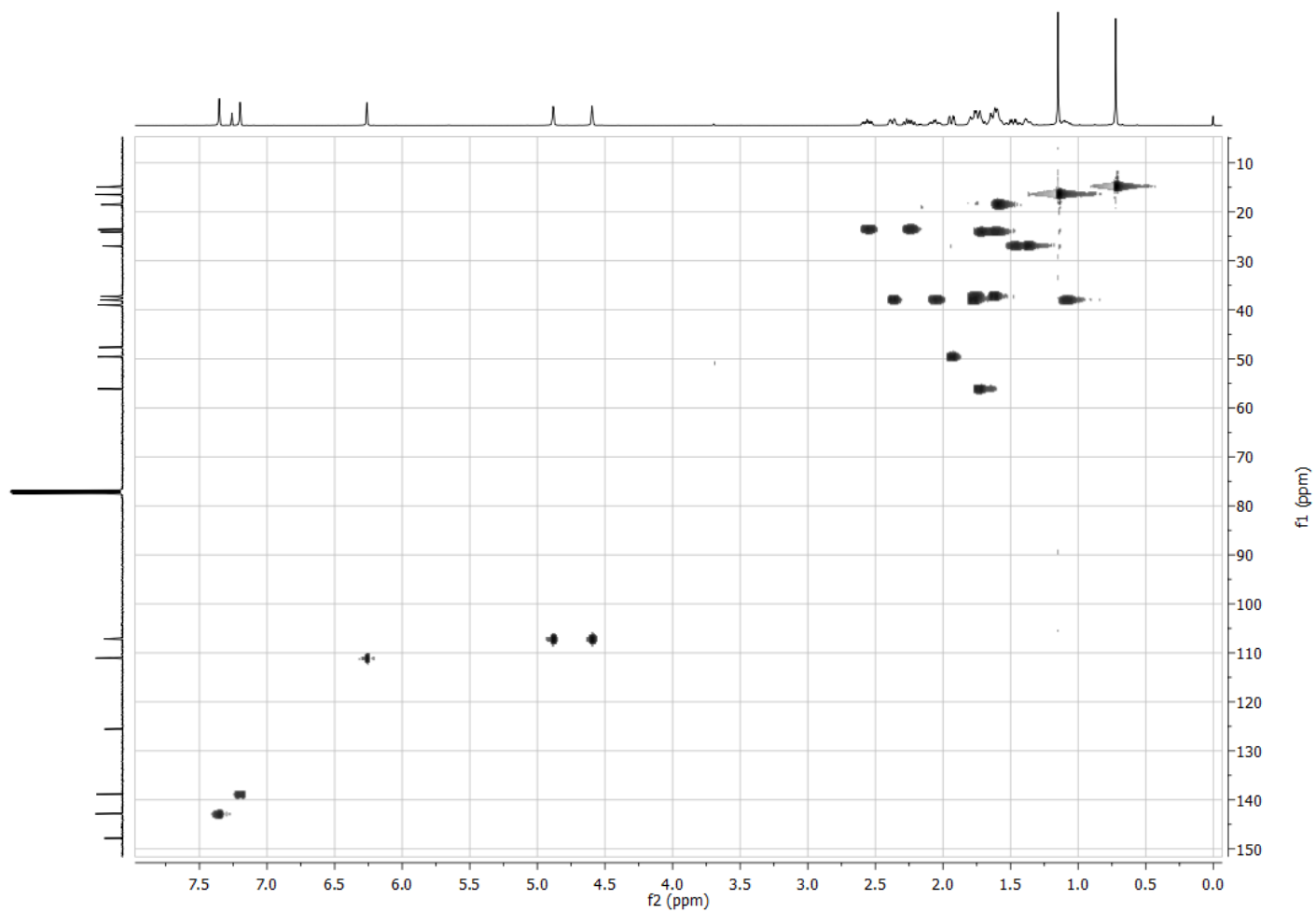
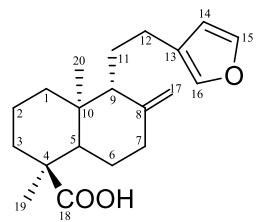
APÊNDICE 1. Espectros do ácido *ent*-poliáltico (AP)



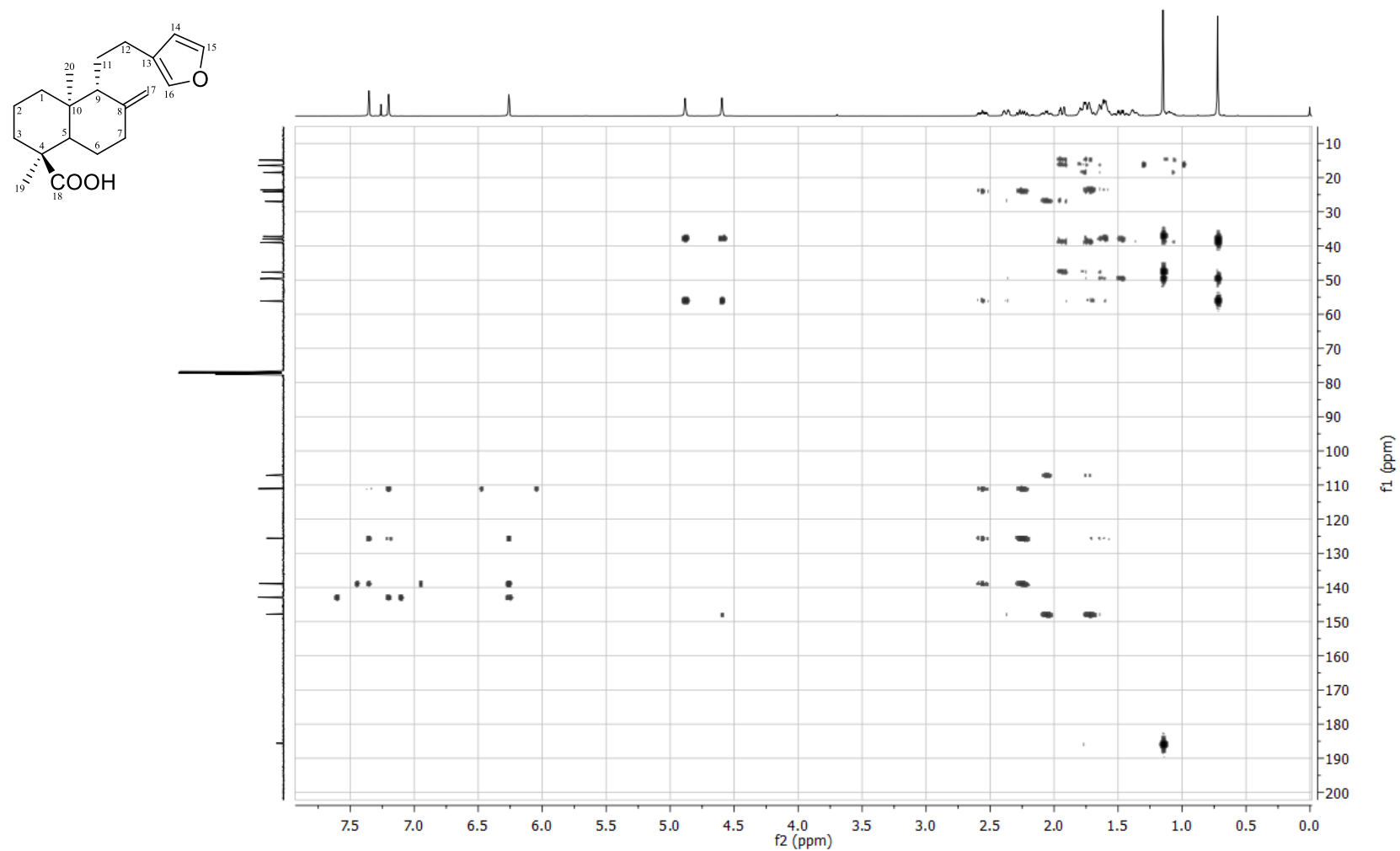
Apêndice 1.1. Espectro de RMN de ¹H do ácido *ent*-poliáltico (CDCl₃, 400 MHz).



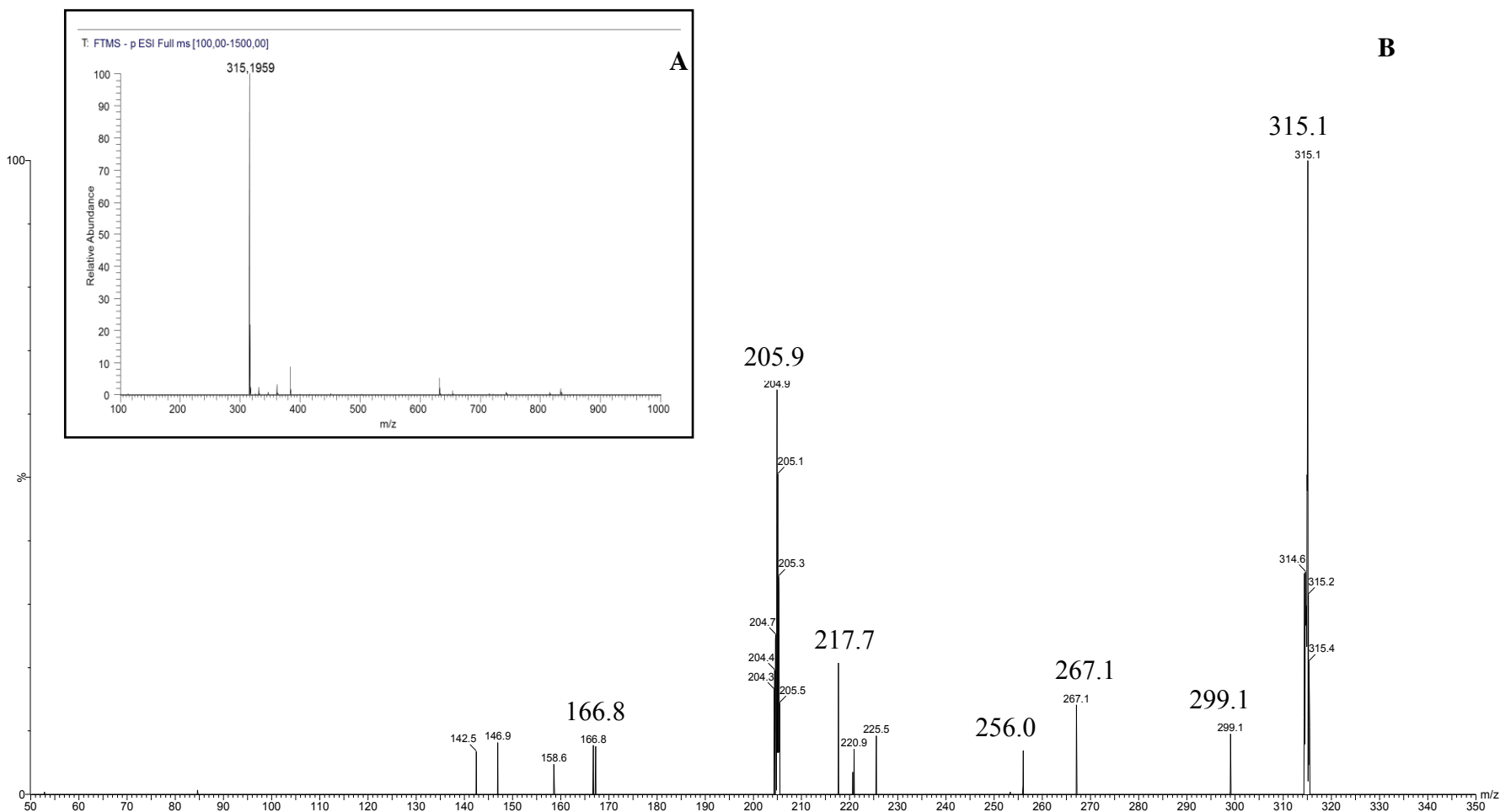
Apêndice 1.2. Espectro de RMN de ¹³C do ácido *ent*-poliáltico (CDCl₃, 100 MHz).



Apêndice 1.3. Mapa de contornos de HMQC do ácido *ent*-poliáltico (CDCl₃, 400 MHz).

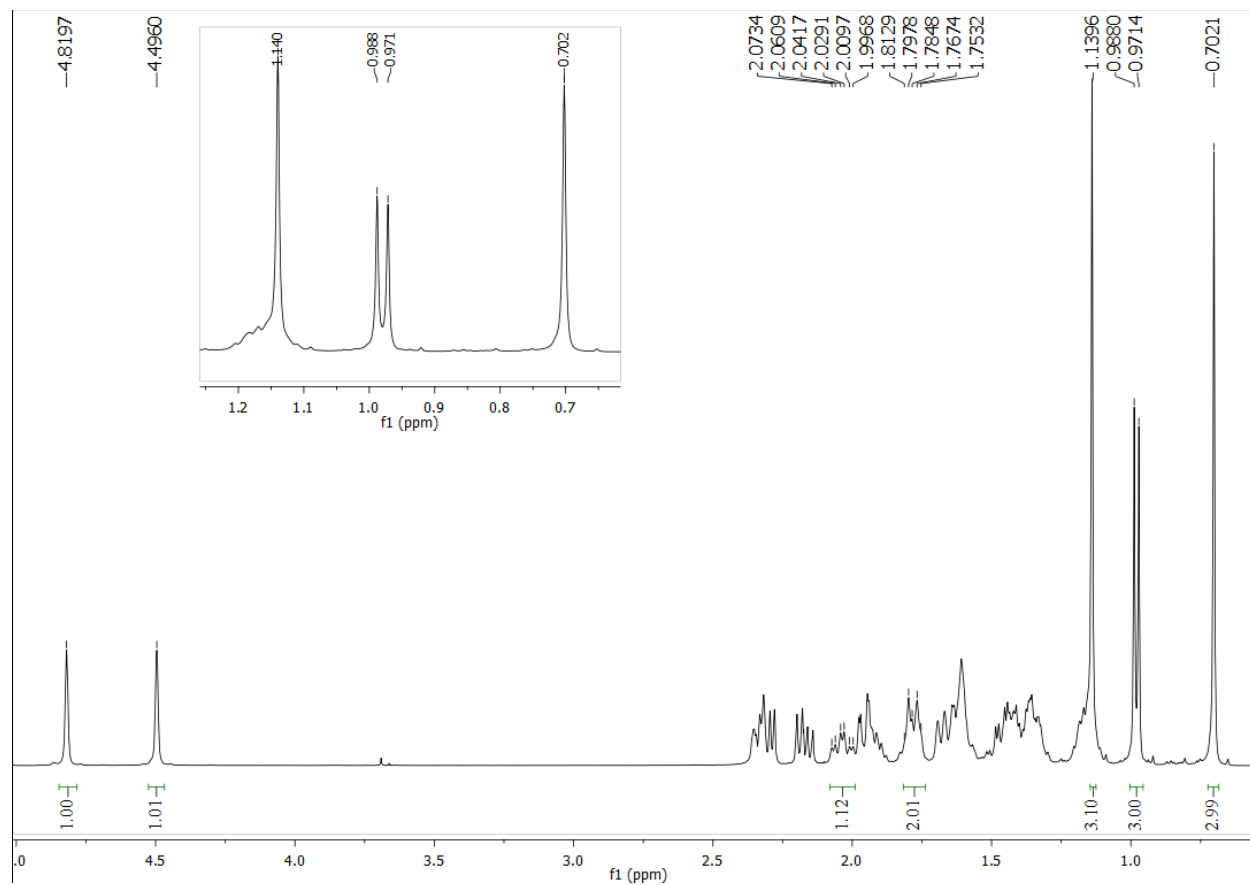
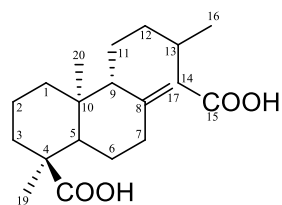


Apêndice 1.4. Mapa de contornos de HMBC do ácido *ent*-poliáltico (CDCl₃, 400 MHz).

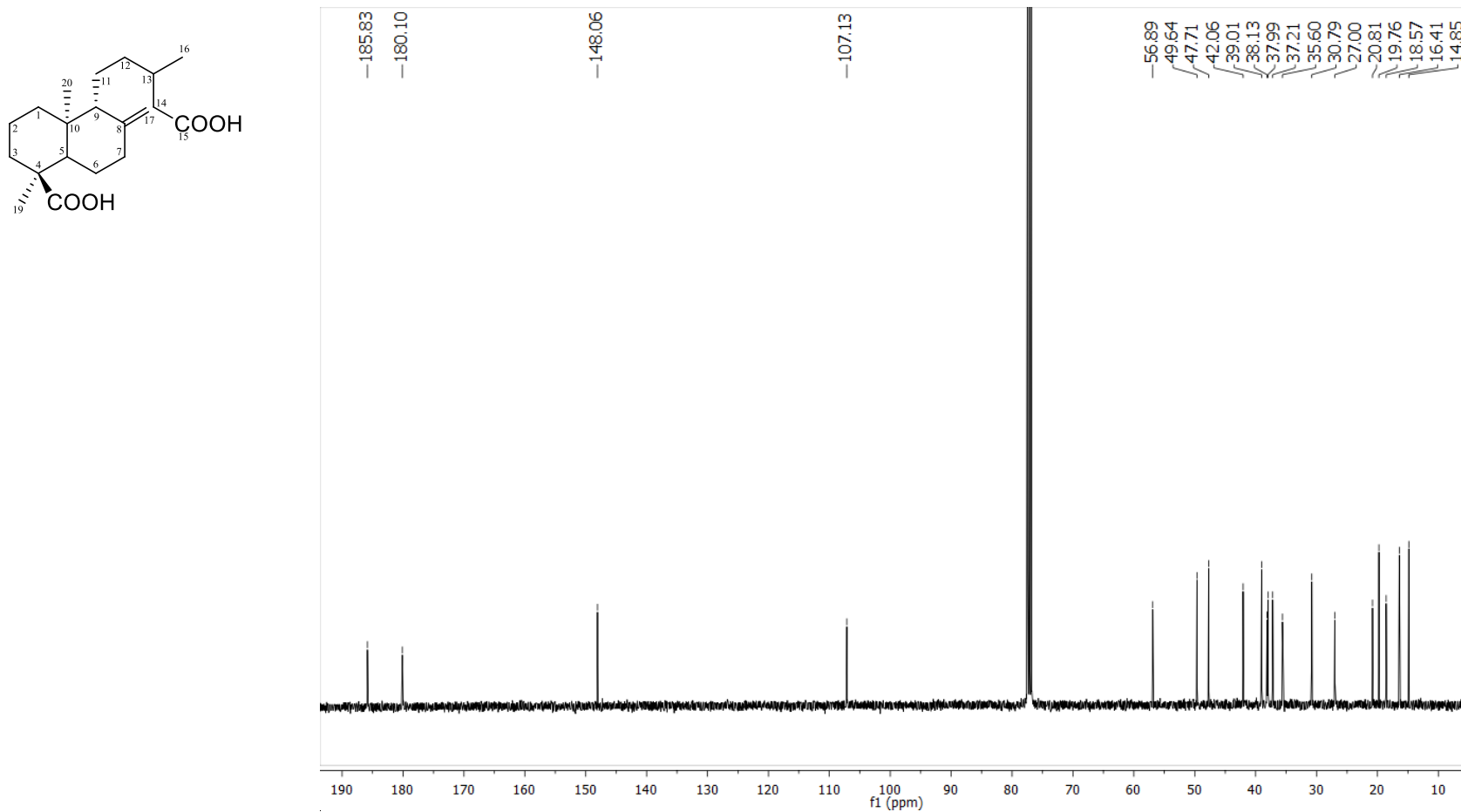


Apêndice 1.5. (A) Espectro de massas em alta resolução no modo negativo (analisador Orbitrap) obtido por ionização por eletrospray do ácido *ent*-poliáltico e (B) espectro de íons produtos gerado através da dissociação induzida por colisão do íon $[M-H]^-$ $m/z = 315$ (50 eV, analisador triplo quadrupolo).

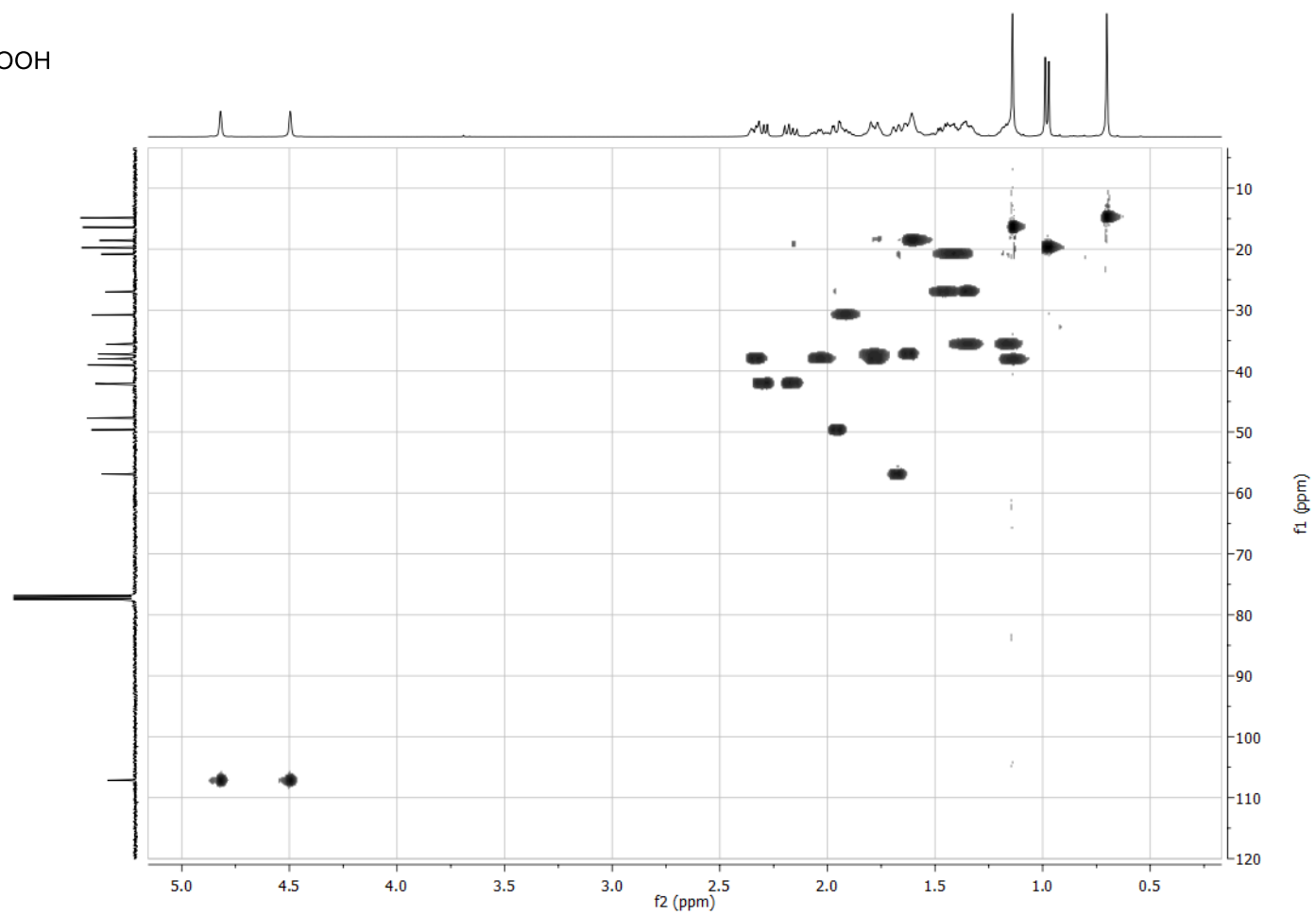
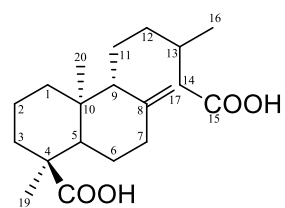
APÊNDICE 2. Espectros do ácido *ent*-diidroagático (ADA)



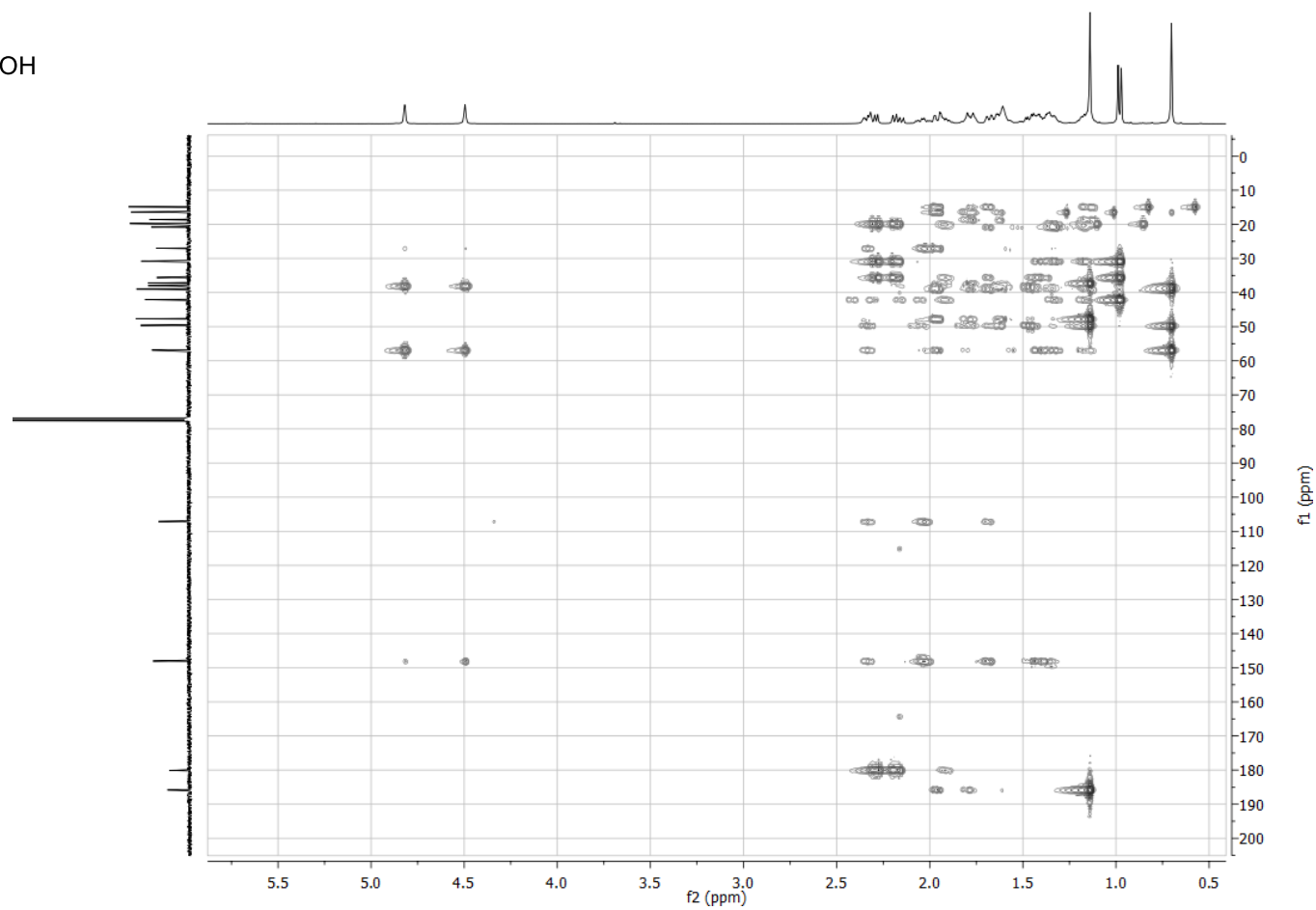
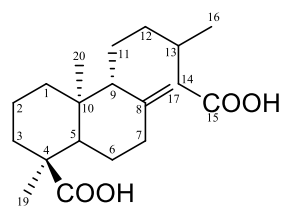
Apêndice 2.1. Espectro de RMN de ^1H do ácido *ent*-diidroagático (CDCl_3 , 400 MHz).



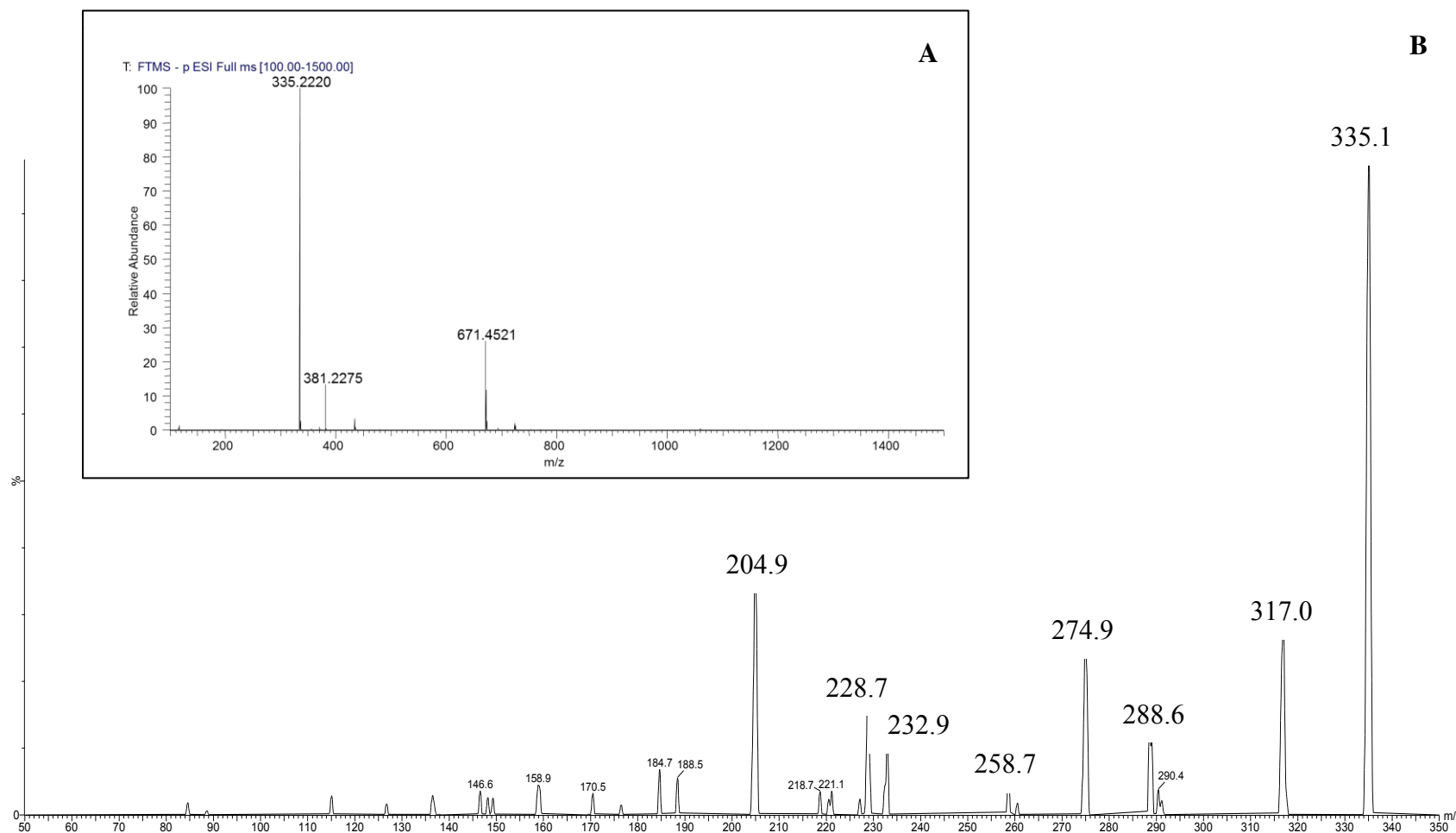
Apêndice 2.2. Espectro de RMN de ^{13}C do ácido *ent*-diidroagático (CDCl₃, 100 MHz).



Apêndice 2.3. Mapa de contornos de HMQC do ácido *ent*-dihidroagático (CDCl₃, 400 MHz).

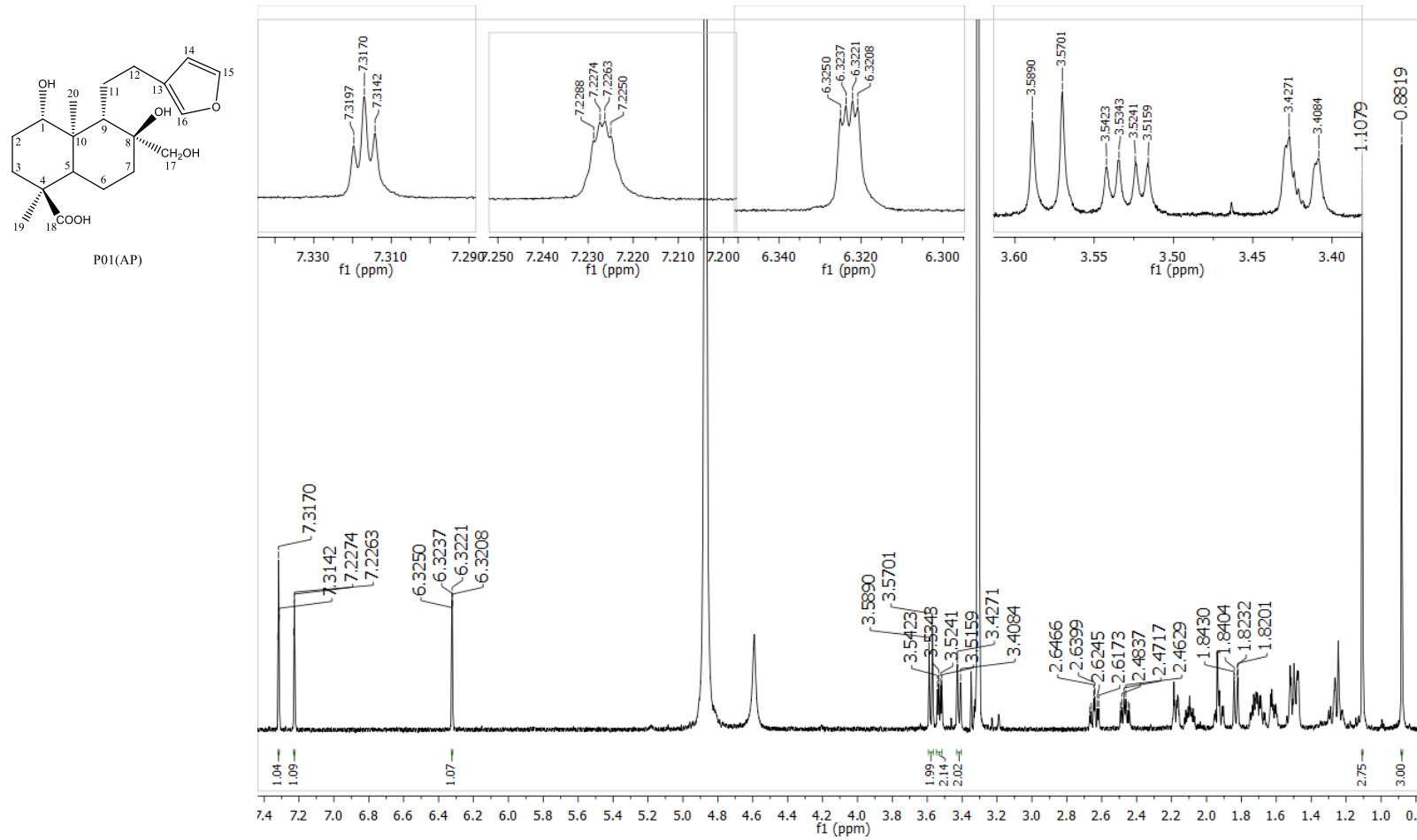


Apêndice 2.4. Mapa de contornos de HMBC do ácido *ent*-diidroagáico (CDCl₃, 400 MHz).

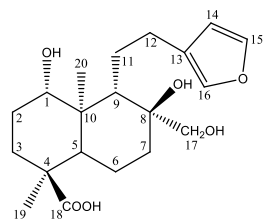


Apêndice 2.5. (A) Espectro de massas em alta resolução no modo negativo (analisador Orbitrap) obtido por ionização por eletrospray do ácido *ent*-dihidroagático e (B) espectro de íons produtos gerado através da dissociação induzida por colisão do íon $[M-H]^-$ $m/z = 335$ (50 eV, analisador triplo quadrupolo).

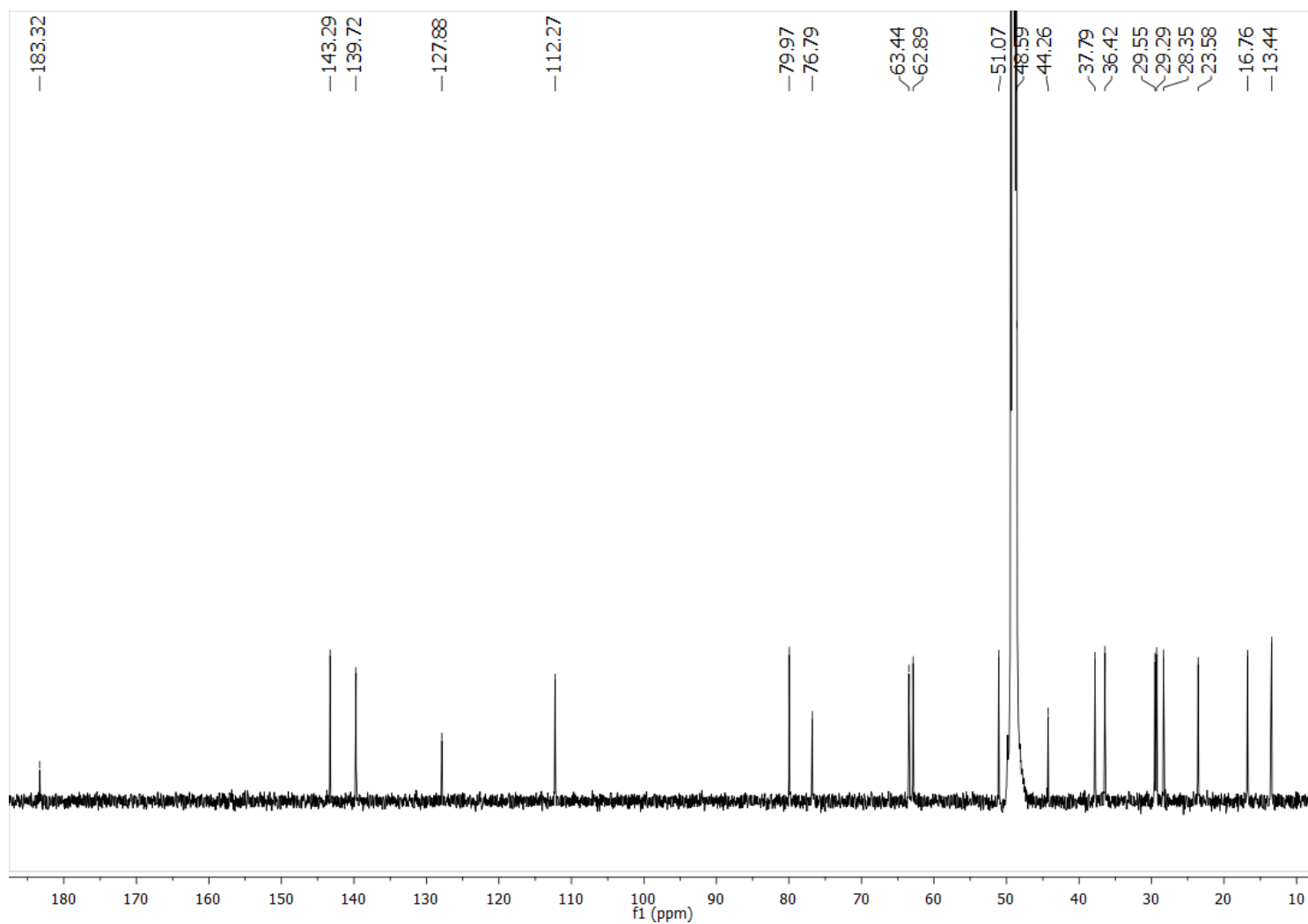
APÊNDICE 3. Espectros do metabólito P01(AP).



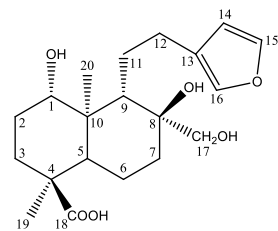
Apêndice 3.1. Espectro de RMN de ¹H do metabólito P01(AP) (CD₃OD, 600 MHz).



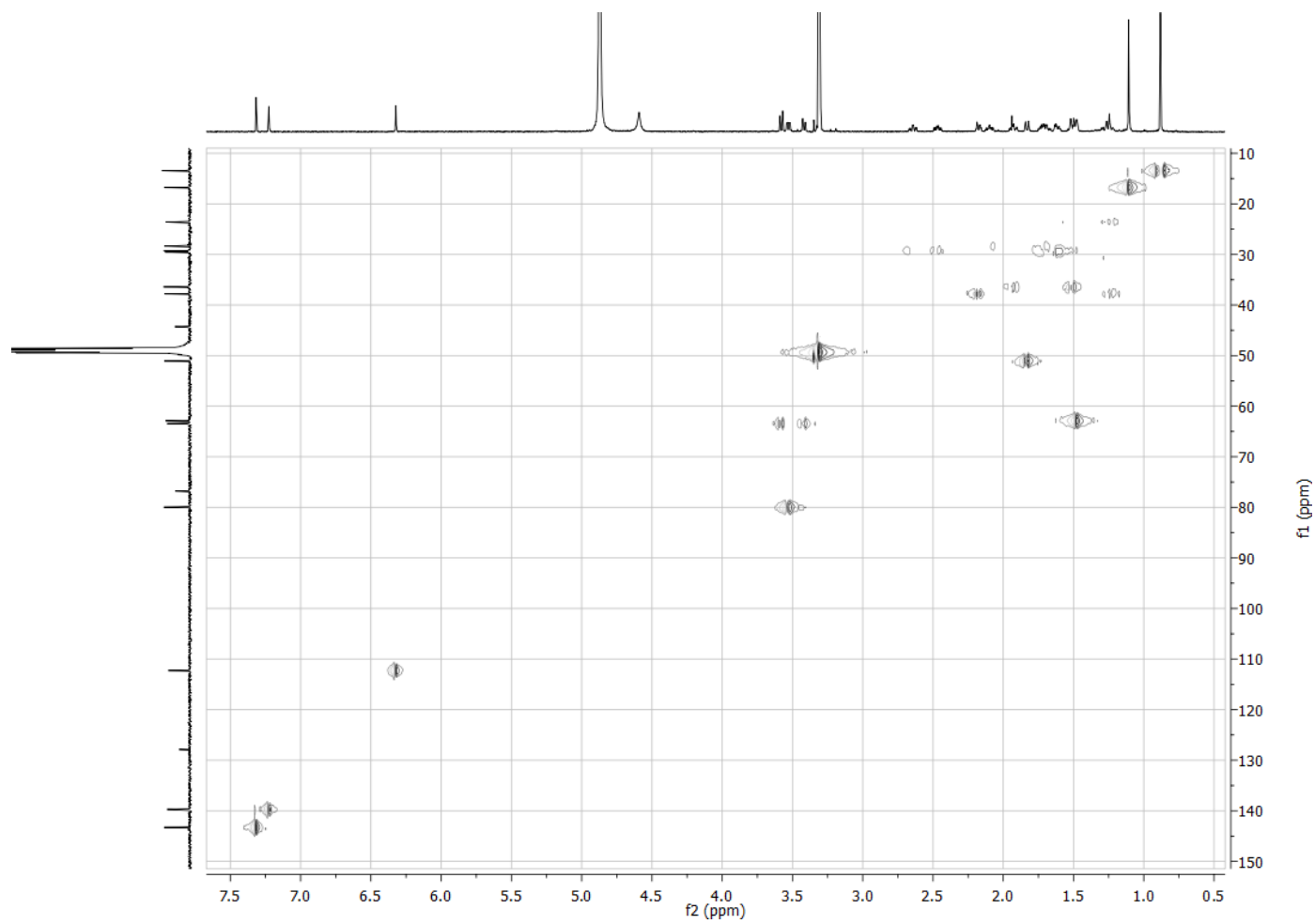
P01(AP)



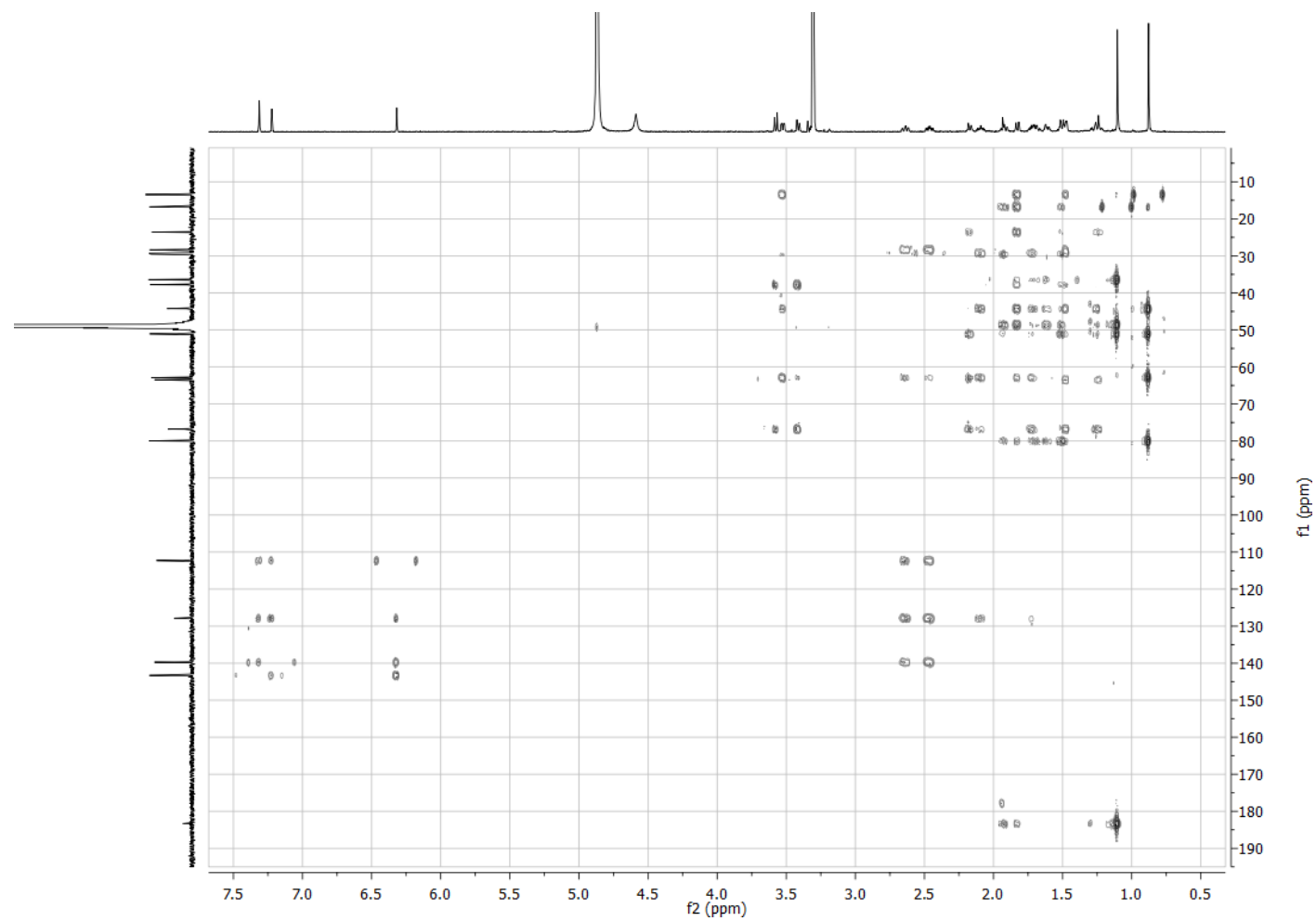
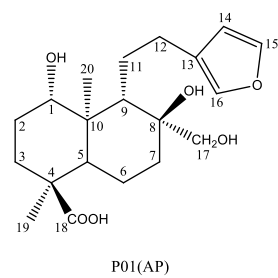
Apêndice 3.2. Espectro de RMN de ^{13}C do metabólito P01(AP) (CD_3OD , 151 MHz).



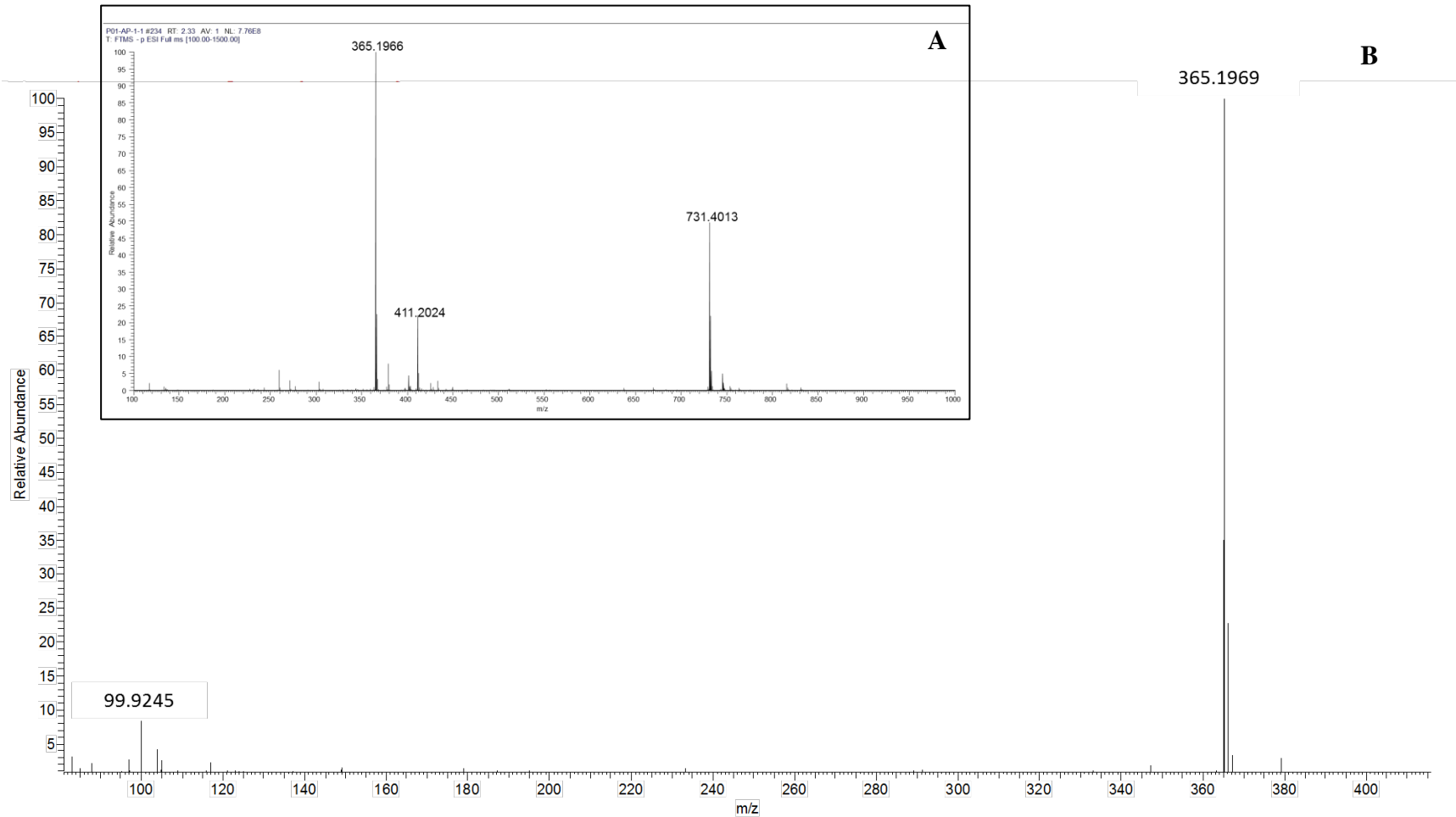
P01(AP)



Apêndice 3.3. Mapa de contornos de HMQC do metabólito P01(AP) (CD₃OD, 600 MHz).

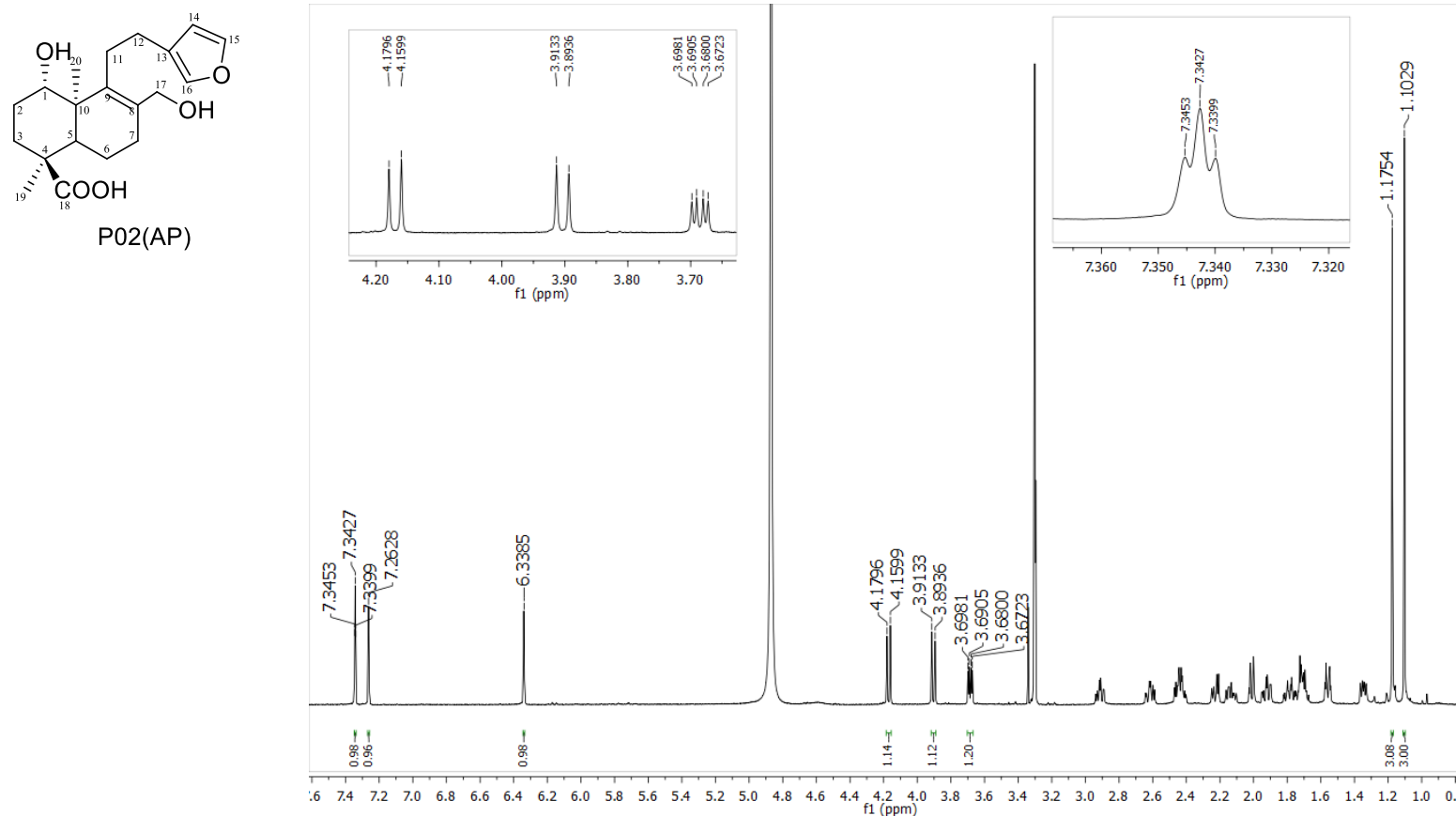


Apêndice 3.4. Mapa de contornos de HMBC do metabólito P01(AP) (CD₃OD, 600 MHz).

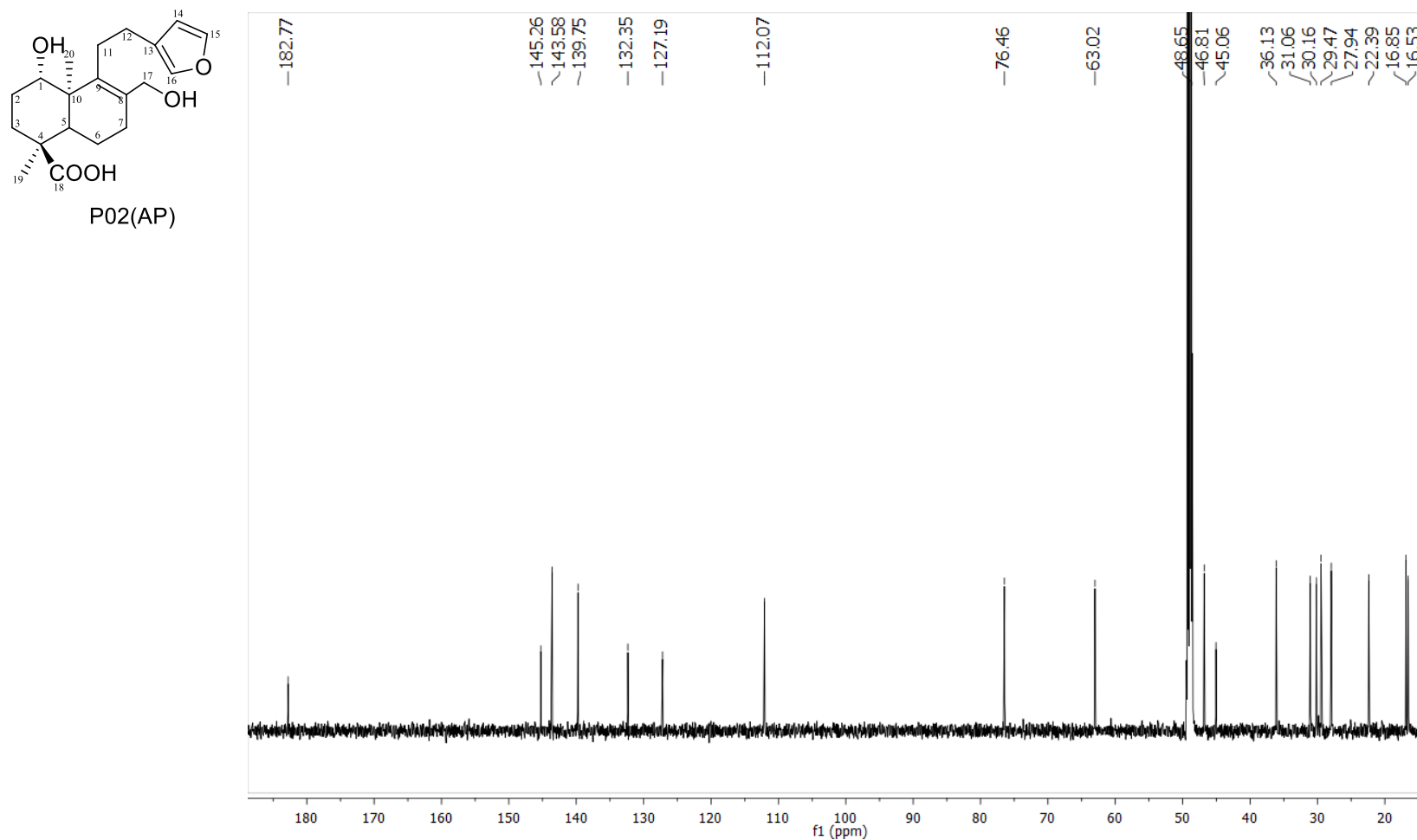


Apêndice 3.5. (A) Espectro de massas em alta resolução no modo negativo obtido por ionização por eletrospray do metabólito P01(AP) e (B) espectro de íons produtos gerado através da dissociação induzida por colisão do íon $[M-H]^-$ $m/z = 365,1966$ (45 kV) - analisador Orbitrap.

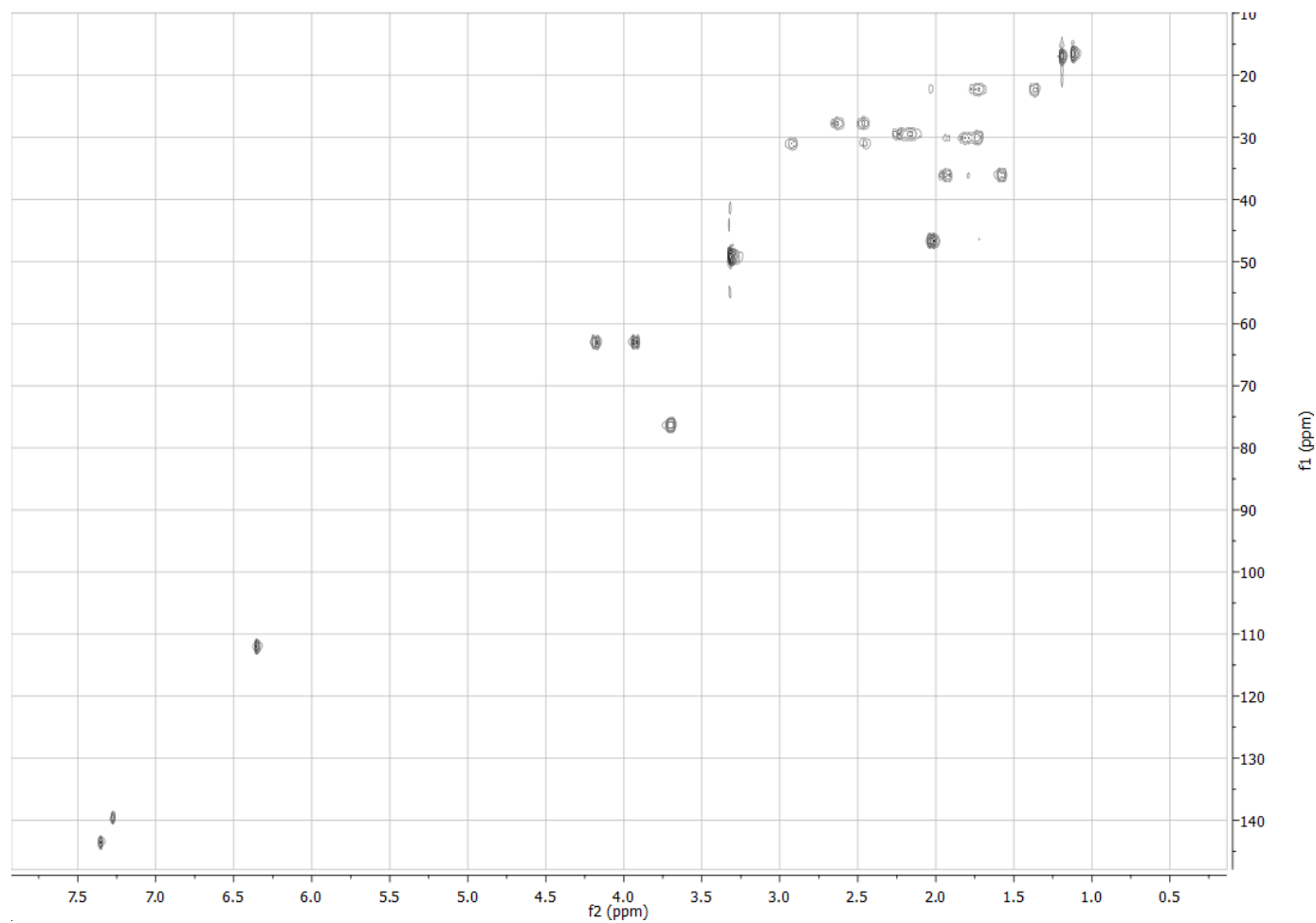
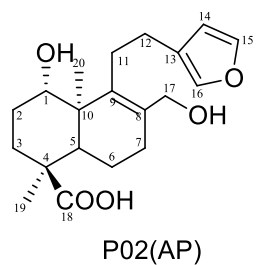
APÊNDICE 4. Espectros do metabólito P02(AP).



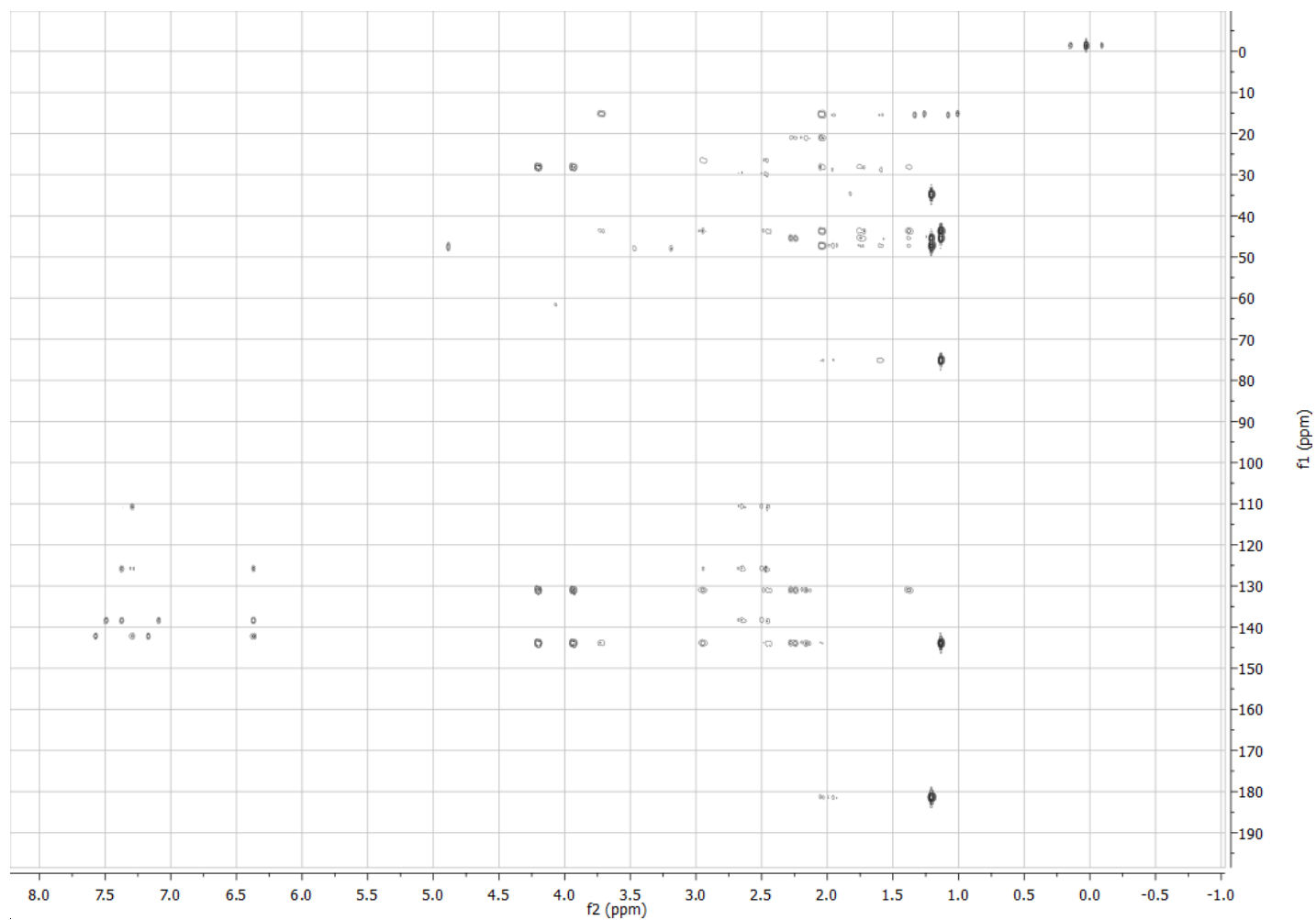
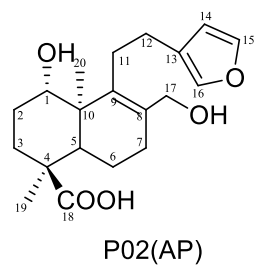
Apêndice 4.1. Espectro de RMN de ^1H do metabólito P02(AP) (CD_3OD , 600 MHz).



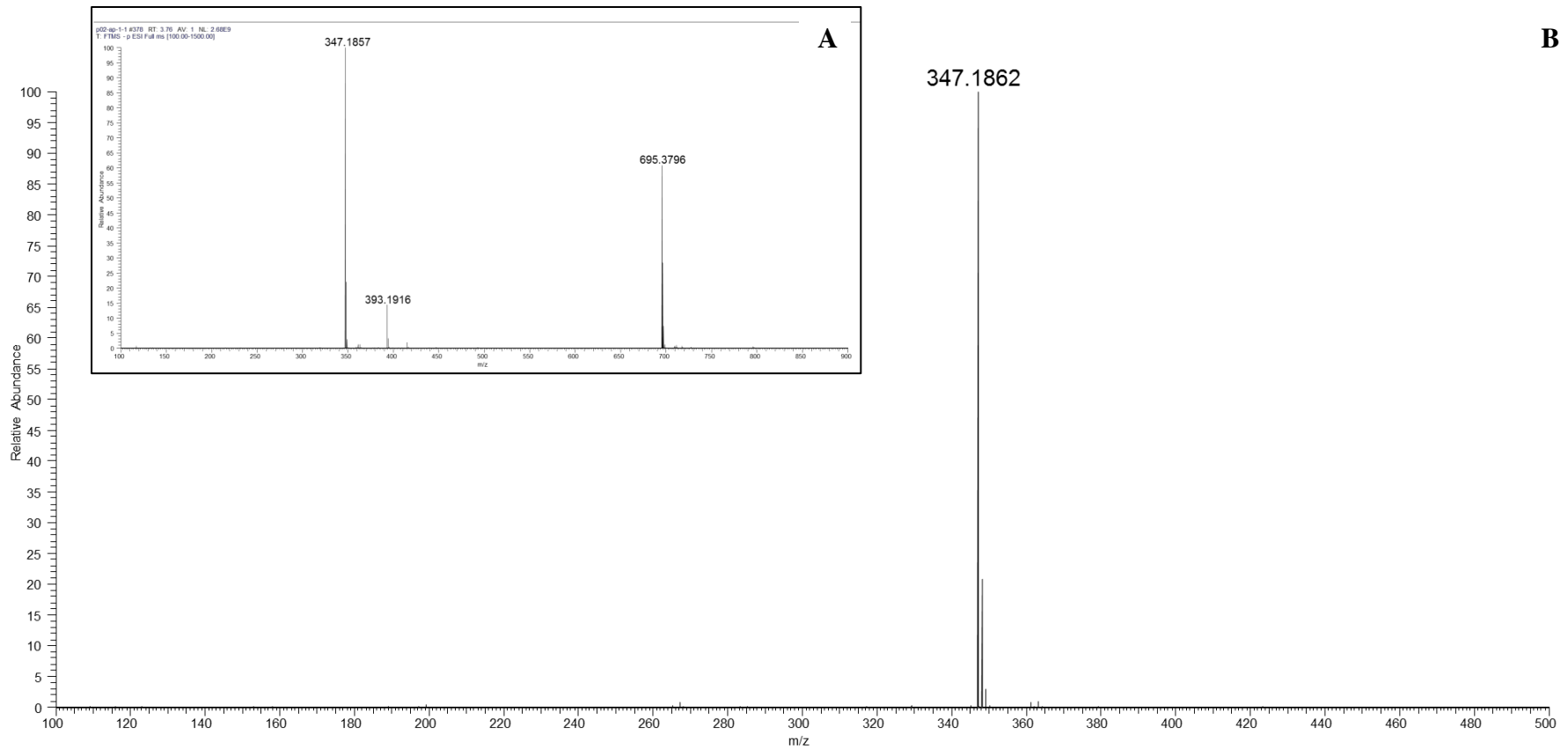
Apêndice 4.2. Espectro de RMN de ¹³C do metabólito P02(AP) (CD₃OD, 151 MHz).



Apêndice 4.3. Mapa de contornos de HMQC do metabólito P02(AP) (CD_3OD , 600 MHz).

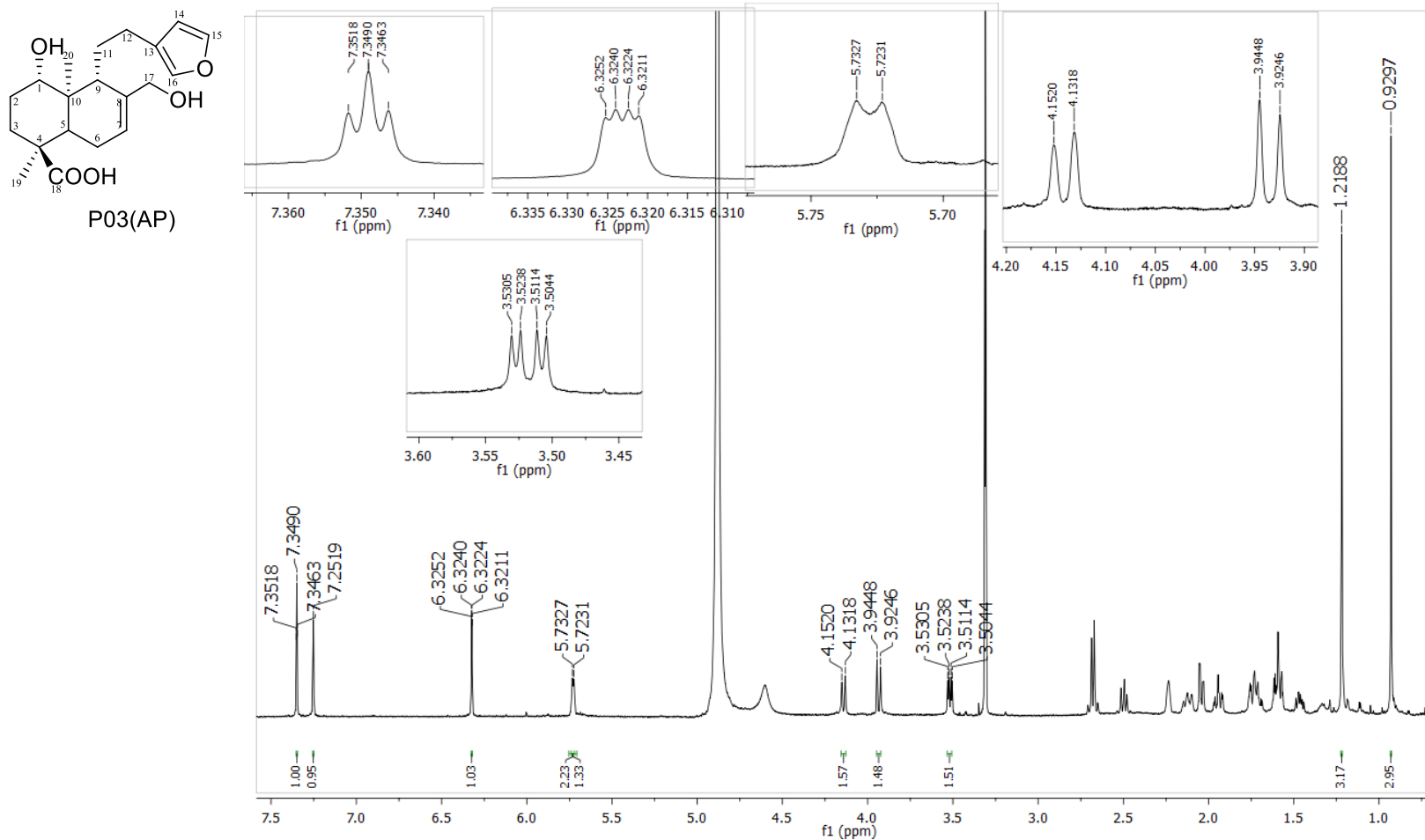


Apêndice 4.4. Mapa de contornos de HMBC do metabólito P02(AP) (CD₃OD, 600 MHz).

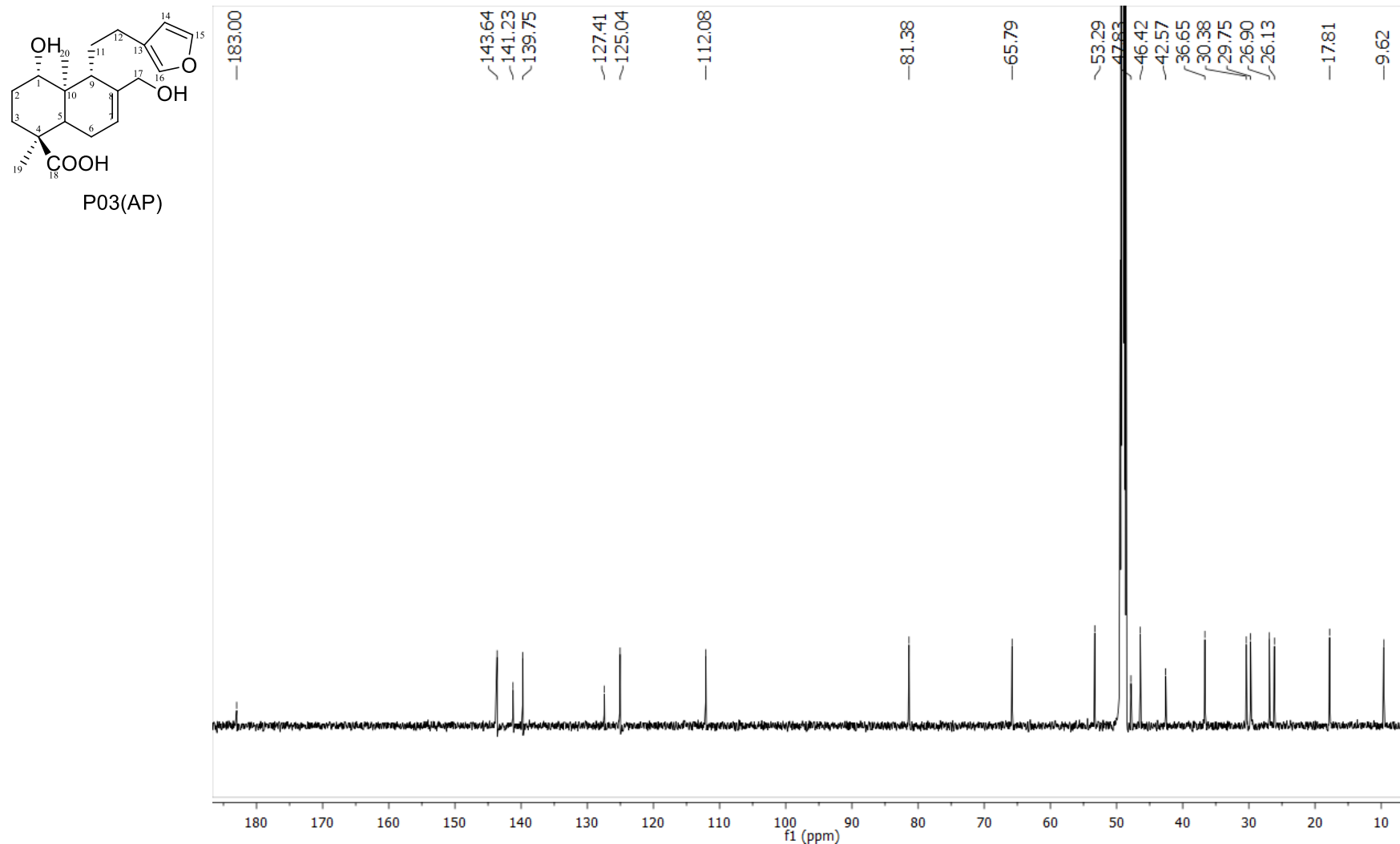


Apêndice 4.5. (A) Espectro de massas em alta resolução no modo negativo obtido por ionização por eletrospray do metabólito P02(AP) e (B) espectro de íons produtos gerado através da dissociação induzida por colisão do íon $[M-H]^-$ $m/z = 347,1857$ (35 kV) - analisador Orbitrap.

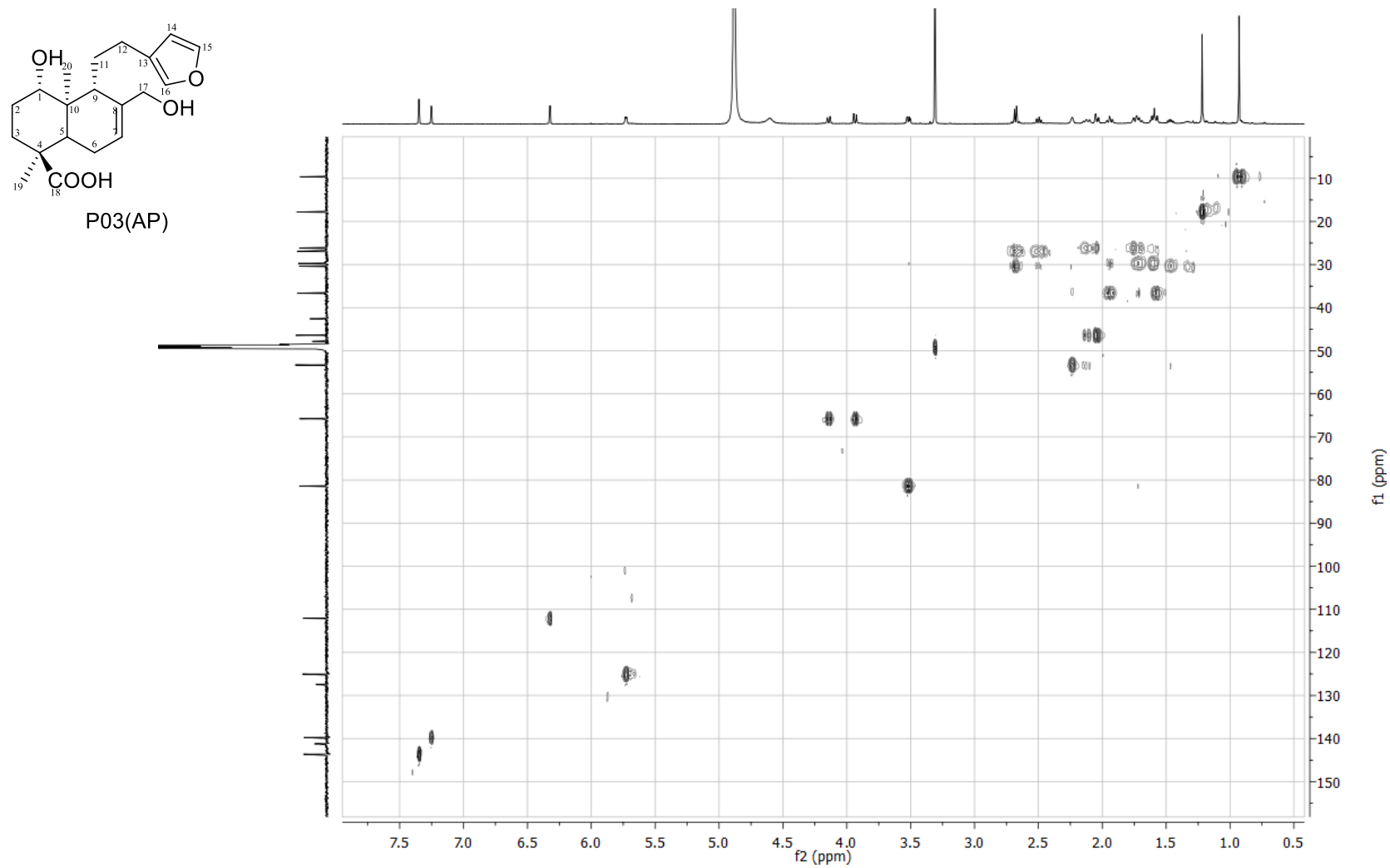
APÊNDICE 5. Espectros do metabólito P03(AP).



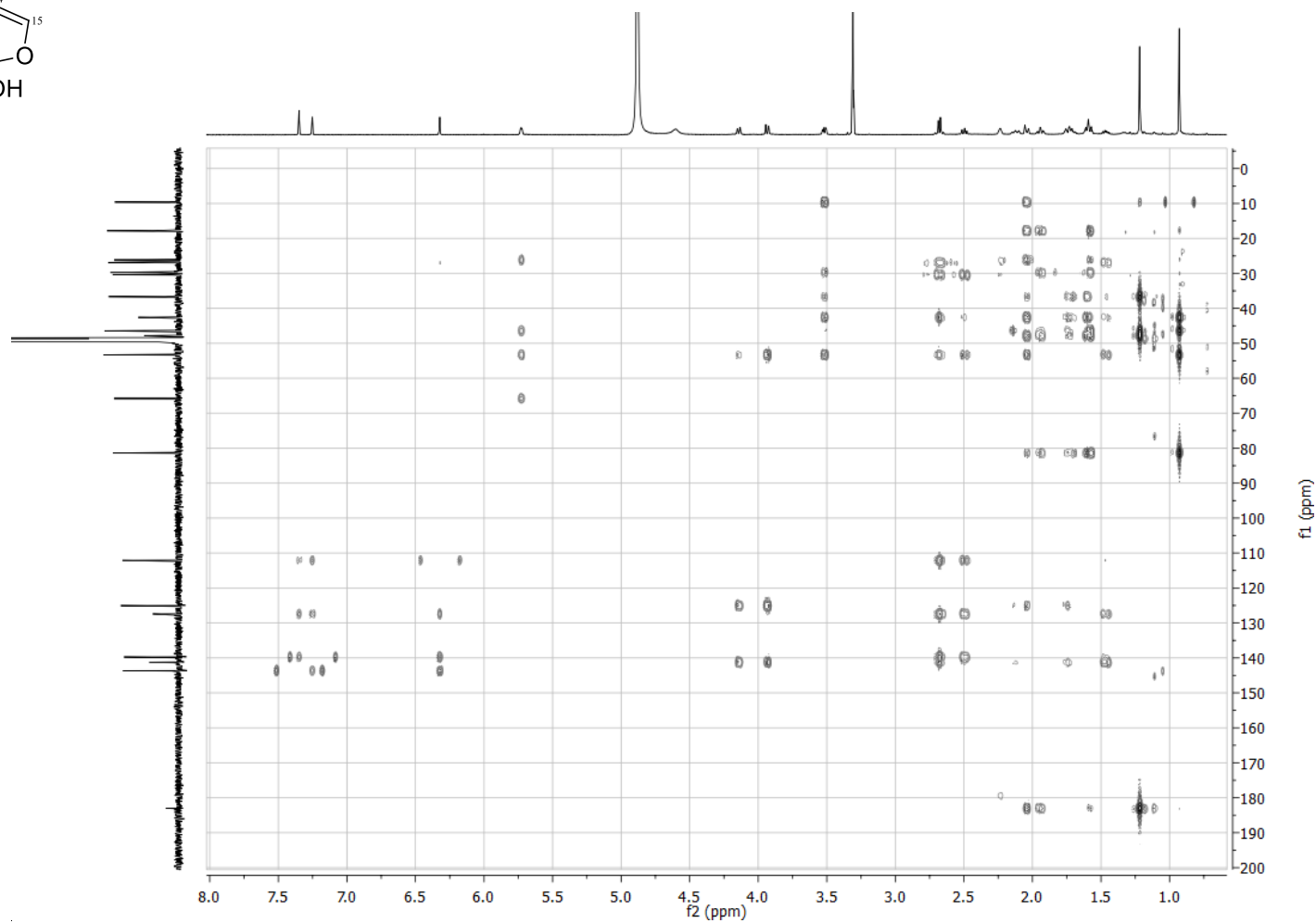
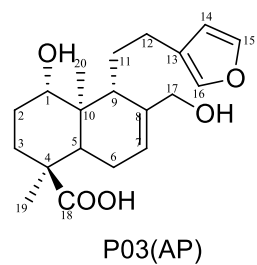
Apêndice 5.1. Espectro de RMN de ¹H do metabólito P03(AP) (CD₃OD, 600 MHz).



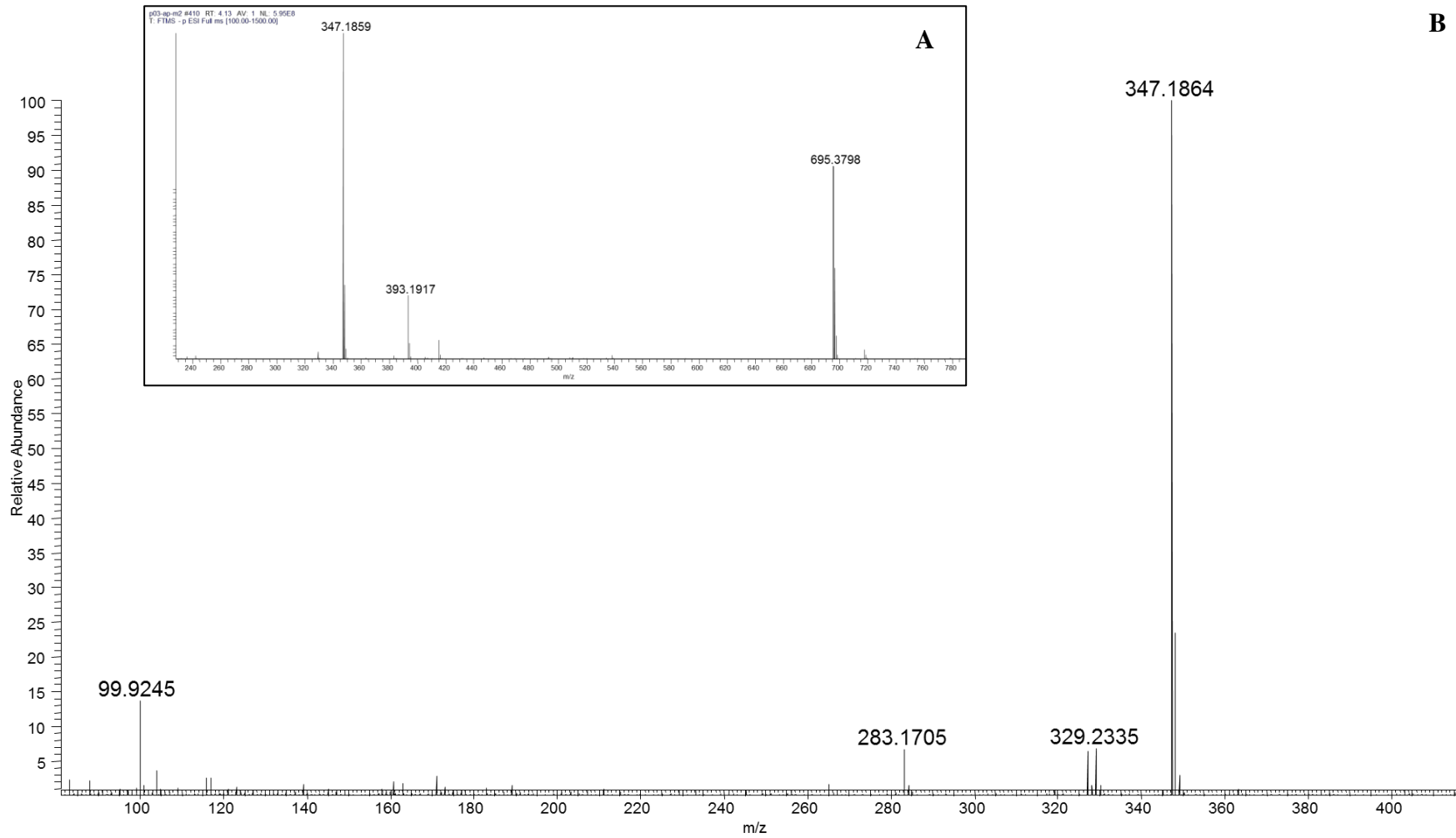
Apêndice 5.2. Espectro de RMN de ¹³C do metabólito P03(AP) (CD₃OD, 151 MHz).



Apêndice 5.3. Mapa de contornos de HMQC do metabólito P03(AP) (CD₃OD, 600 MHz).

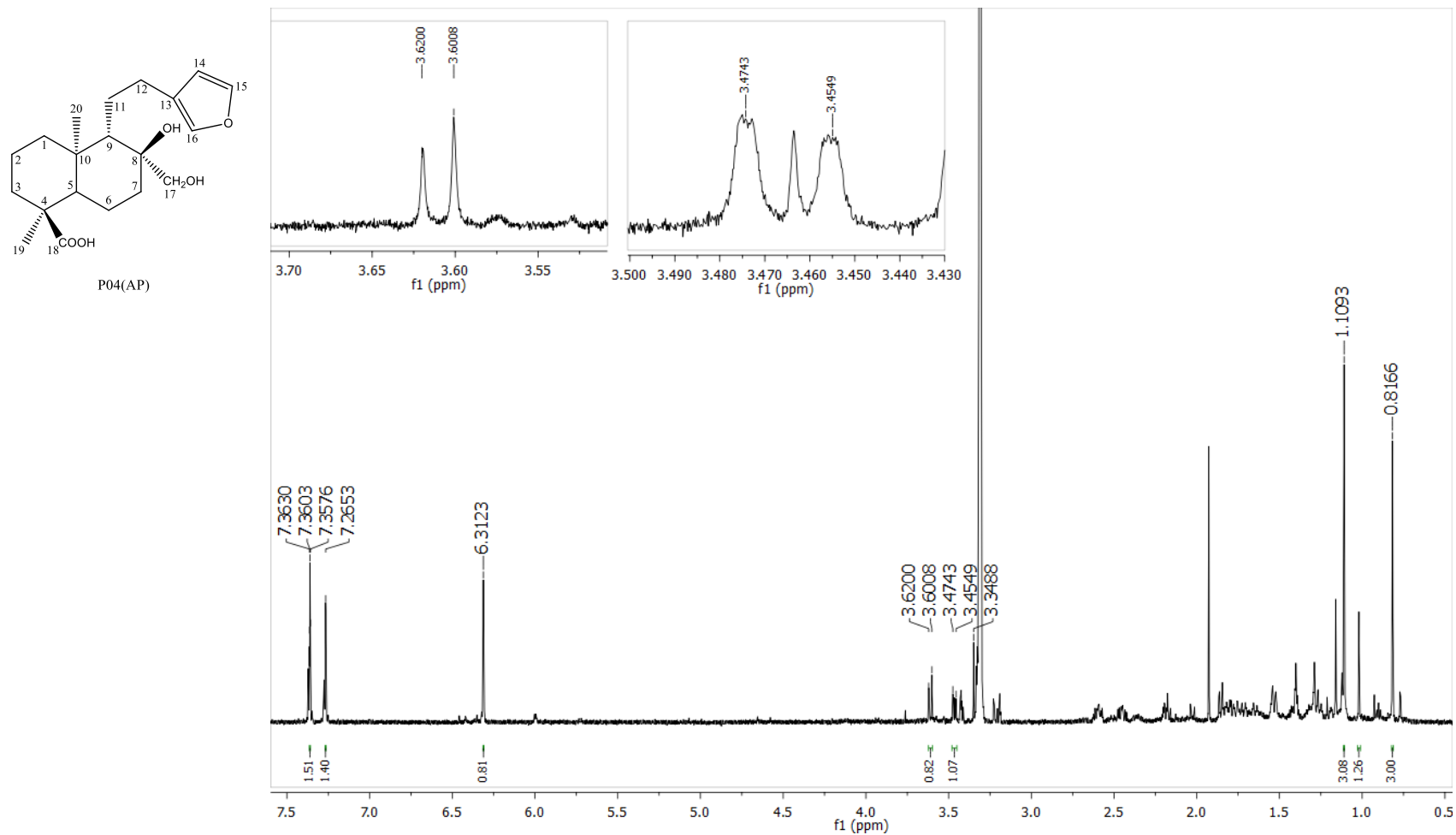


Apêndice 5.4. Mapa de contornos de HMBC do metabólito P03(AP) (CD₃OD, 600 MHz).

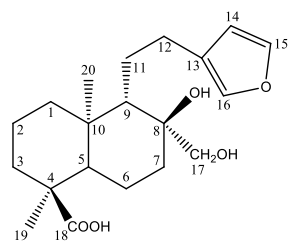


Apêndice 5.5. (A) Espectro de massas em alta resolução no modo negativo obtido por ionização por eletrospray do metabólito P03(AP) e (B) espectro de íons produtos gerado através da dissociação induzida por colisão do íon $[M-H]^-$ $m/z = 347,1859$ (45 kV) - analisador Orbitrap.

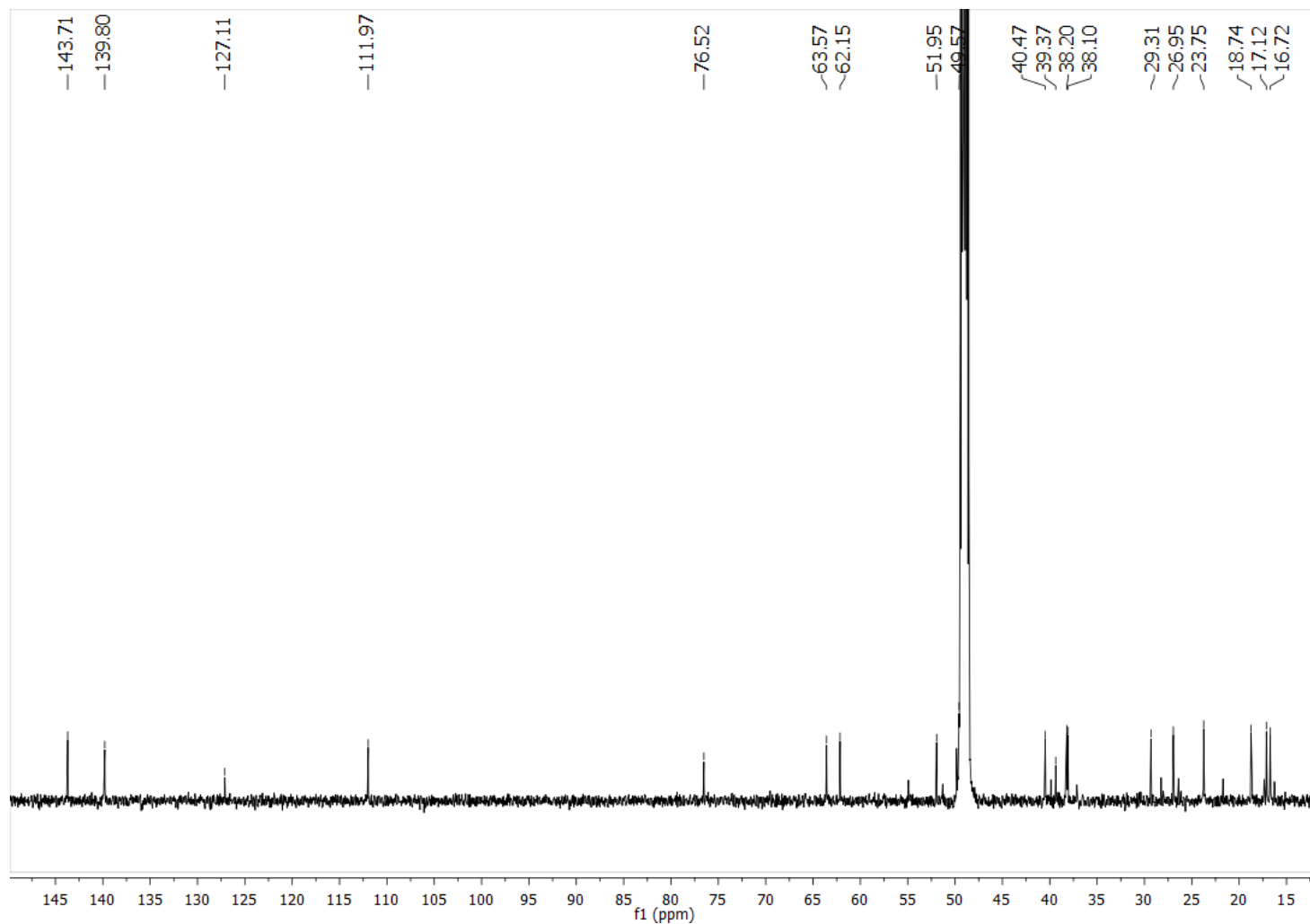
APÊNDICE 6. Espectros do metabólito P04(AP).



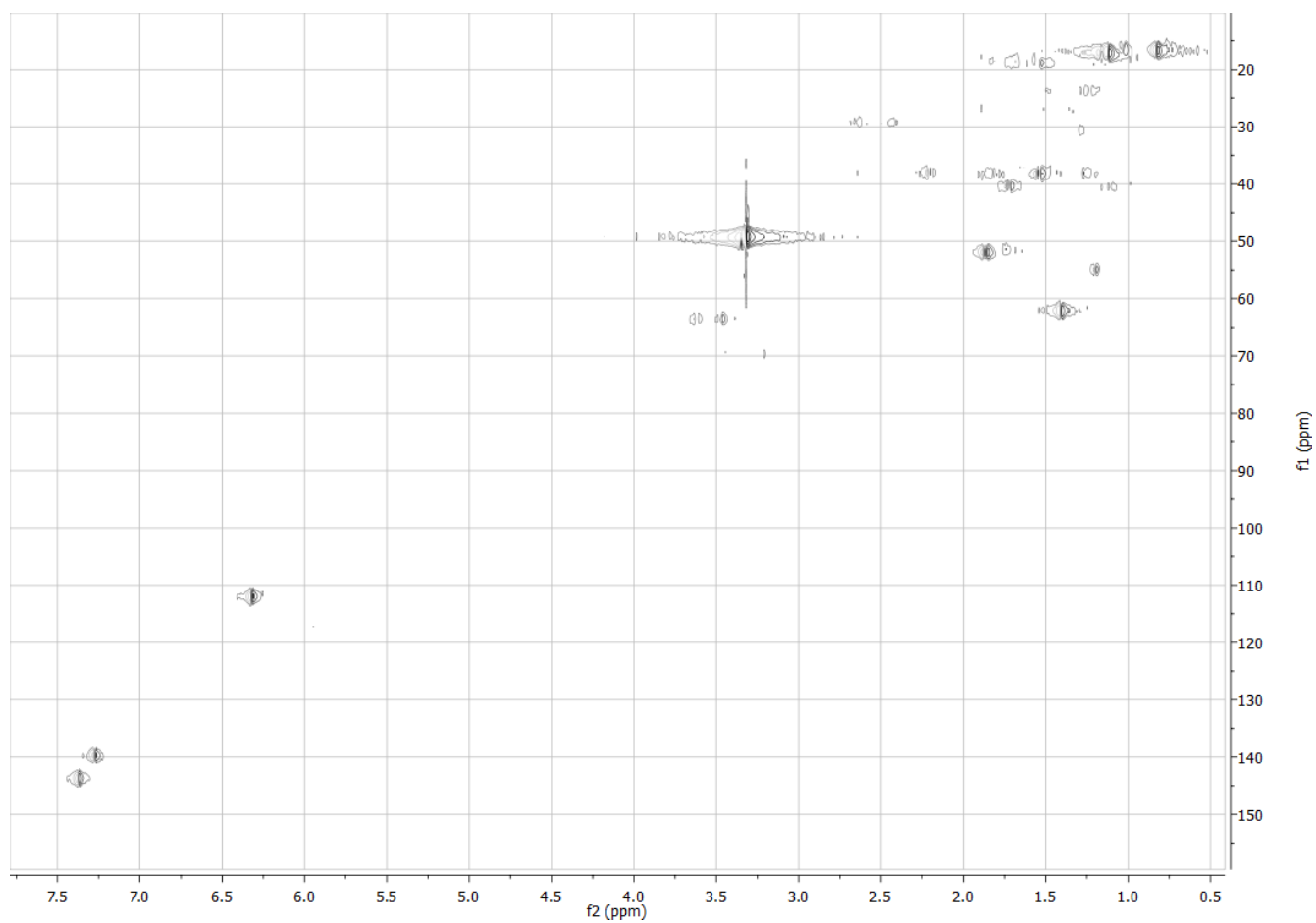
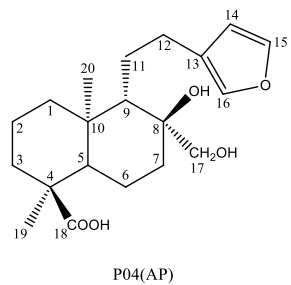
Apêndice 6.1. Espectro de RMN de ¹H do metabólito P04(AP) (CD₃OD, 600 MHz).



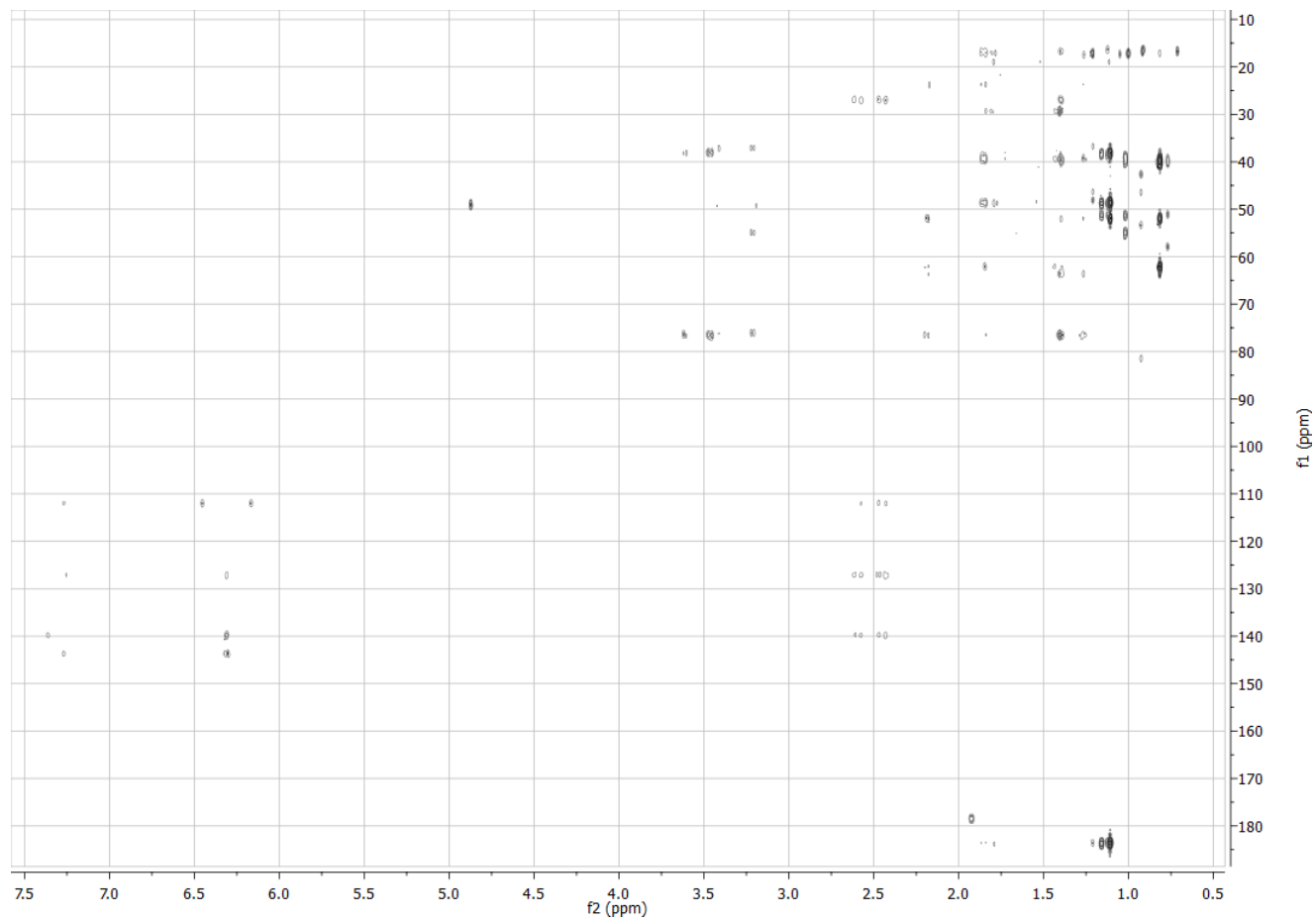
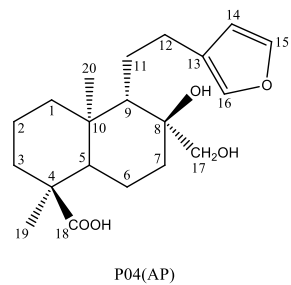
P04(AP)



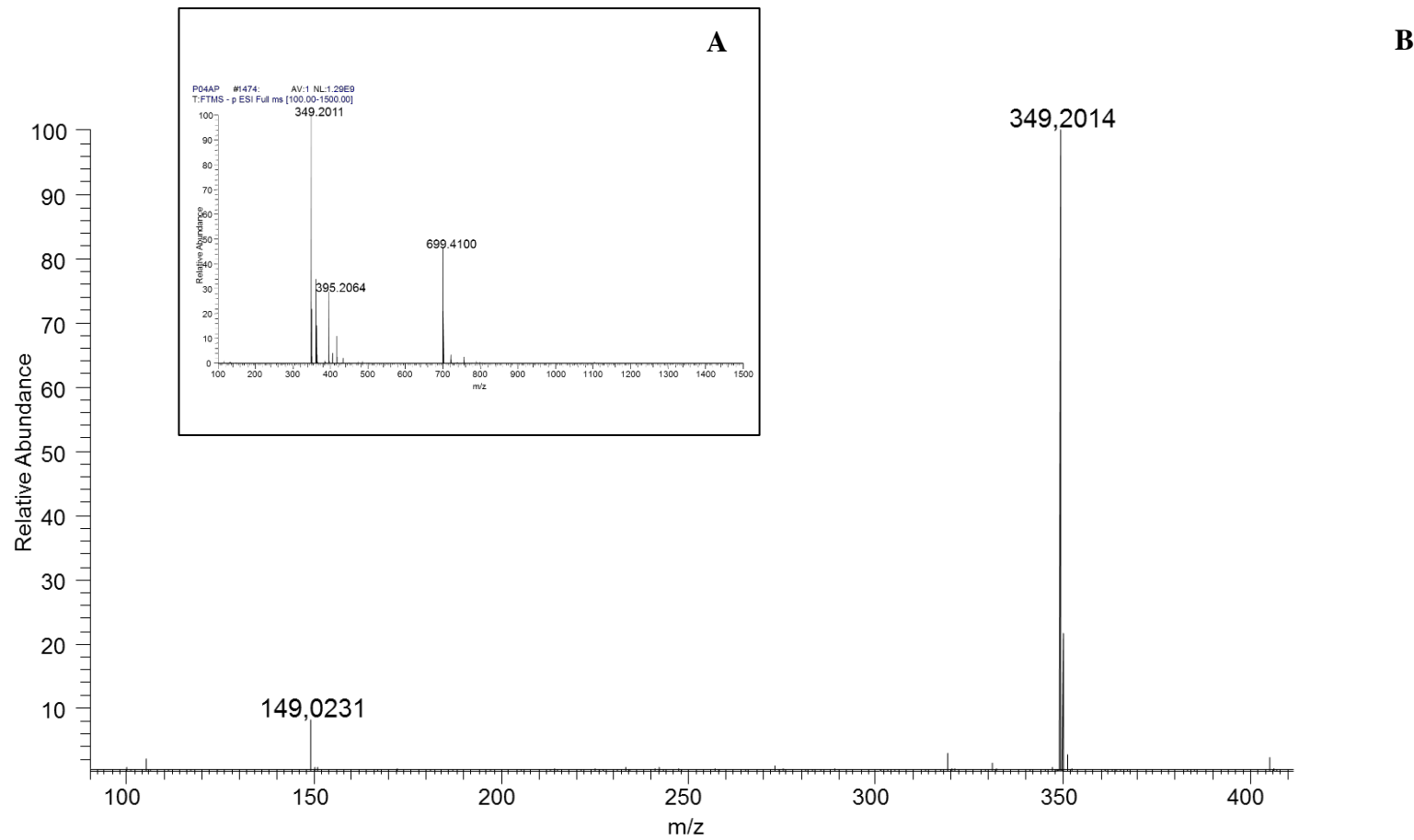
Apêndice 6.2. Espectro de RMN de ^{13}C do metabólito P04(AP) (CD_3OD , 151 MHz).



Apêndice 6.3. Mapa de contornos de HMBC do metabólito P04(AP) (CD₃OD, 600 MHz).

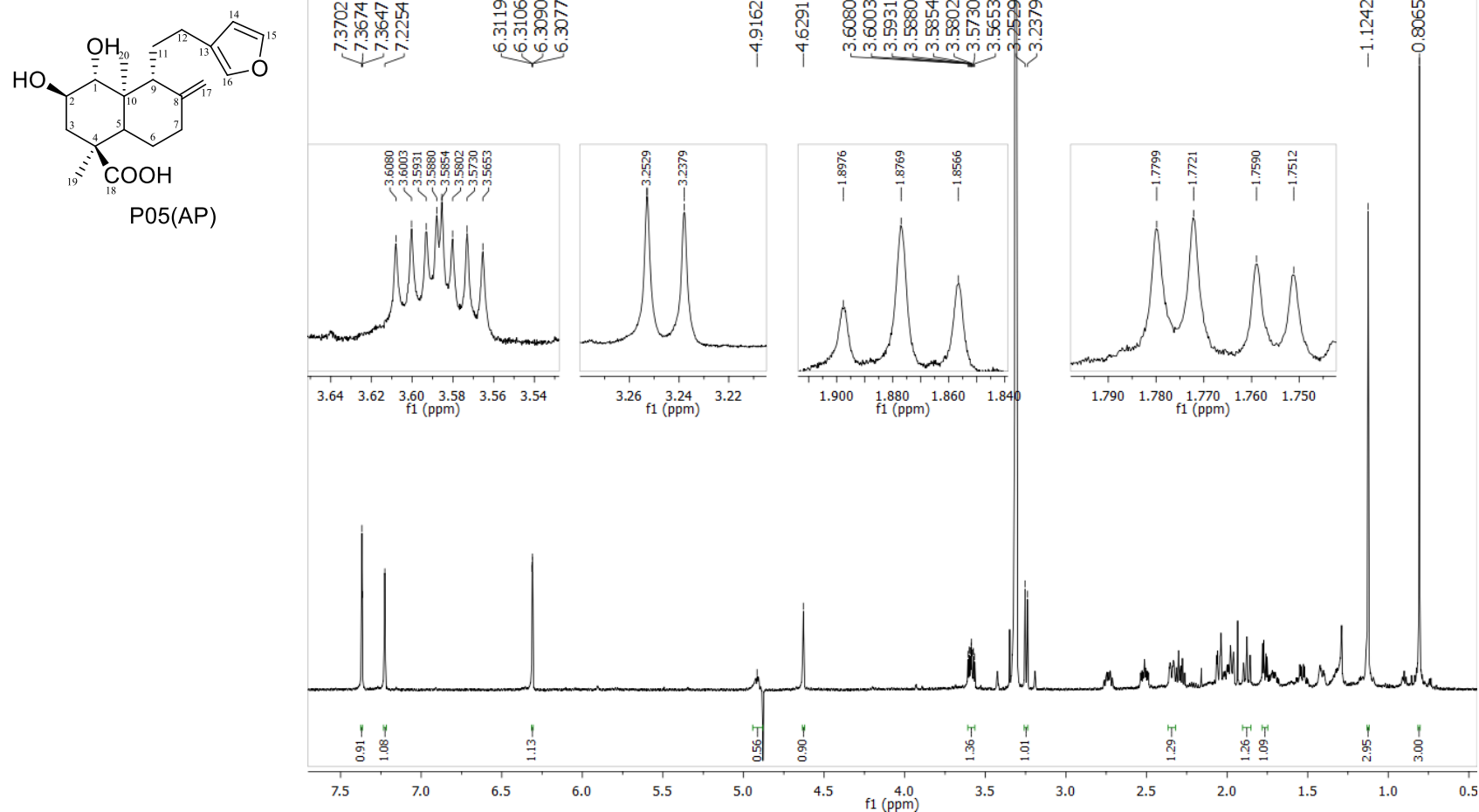


Apêndice 6.4. Mapa de contornos de HMBC do metabólito P04(AP) (CD_3OD , 600 MHz).

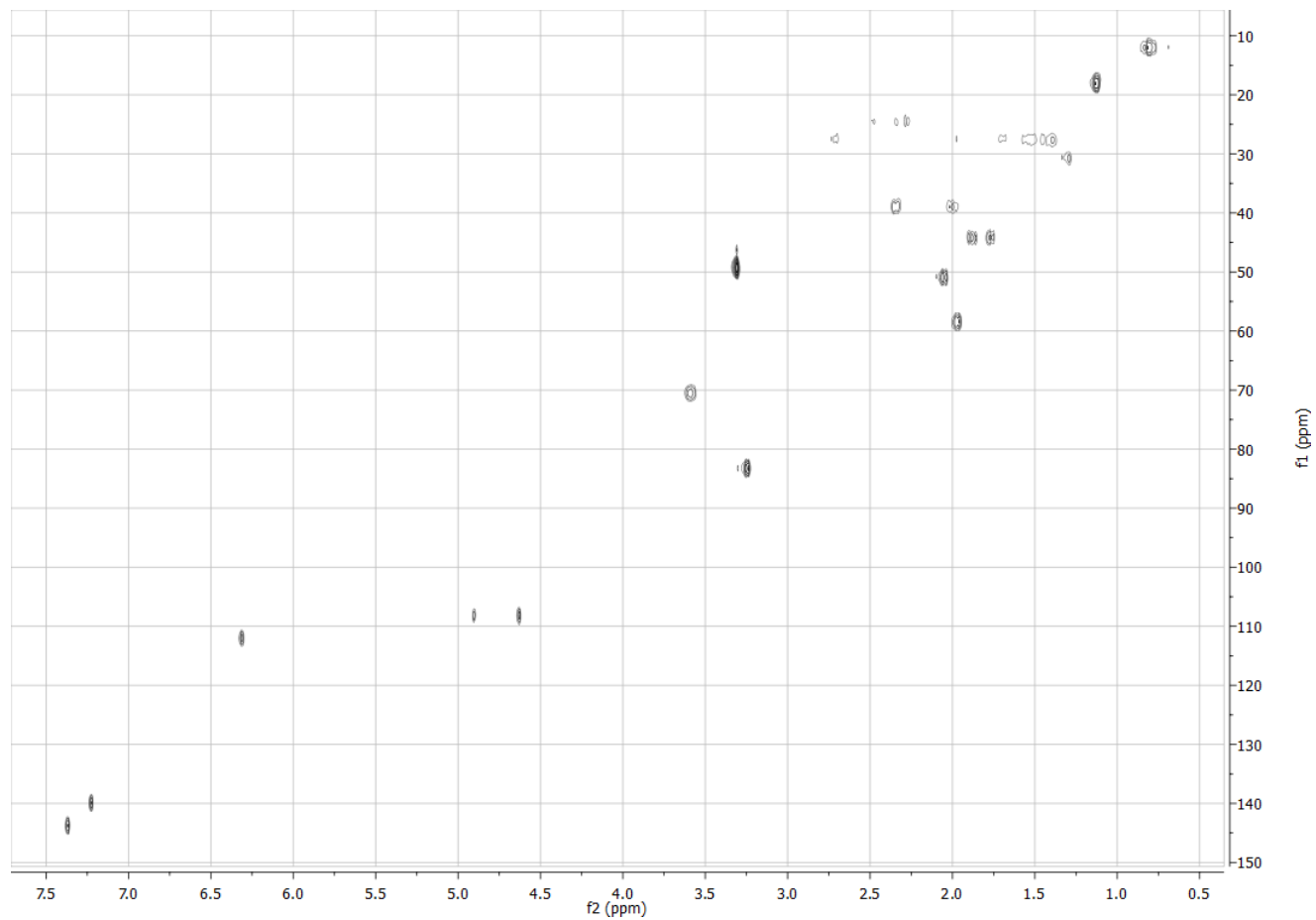
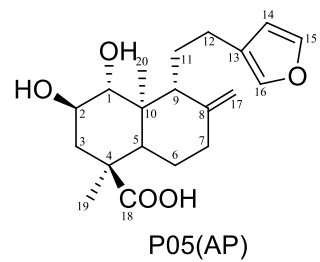


Apêndice 6.5. (A) Espectro de massas em alta resolução no modo negativo obtido por ionização por eletrospray do metabólito P04(AP) e (B) espectro de íons produtos gerado através da dissociação induzida por colisão do íon $[M-H]^-$ $m/z = 349,2011$ (35 kV) - analisador Orbitrap.

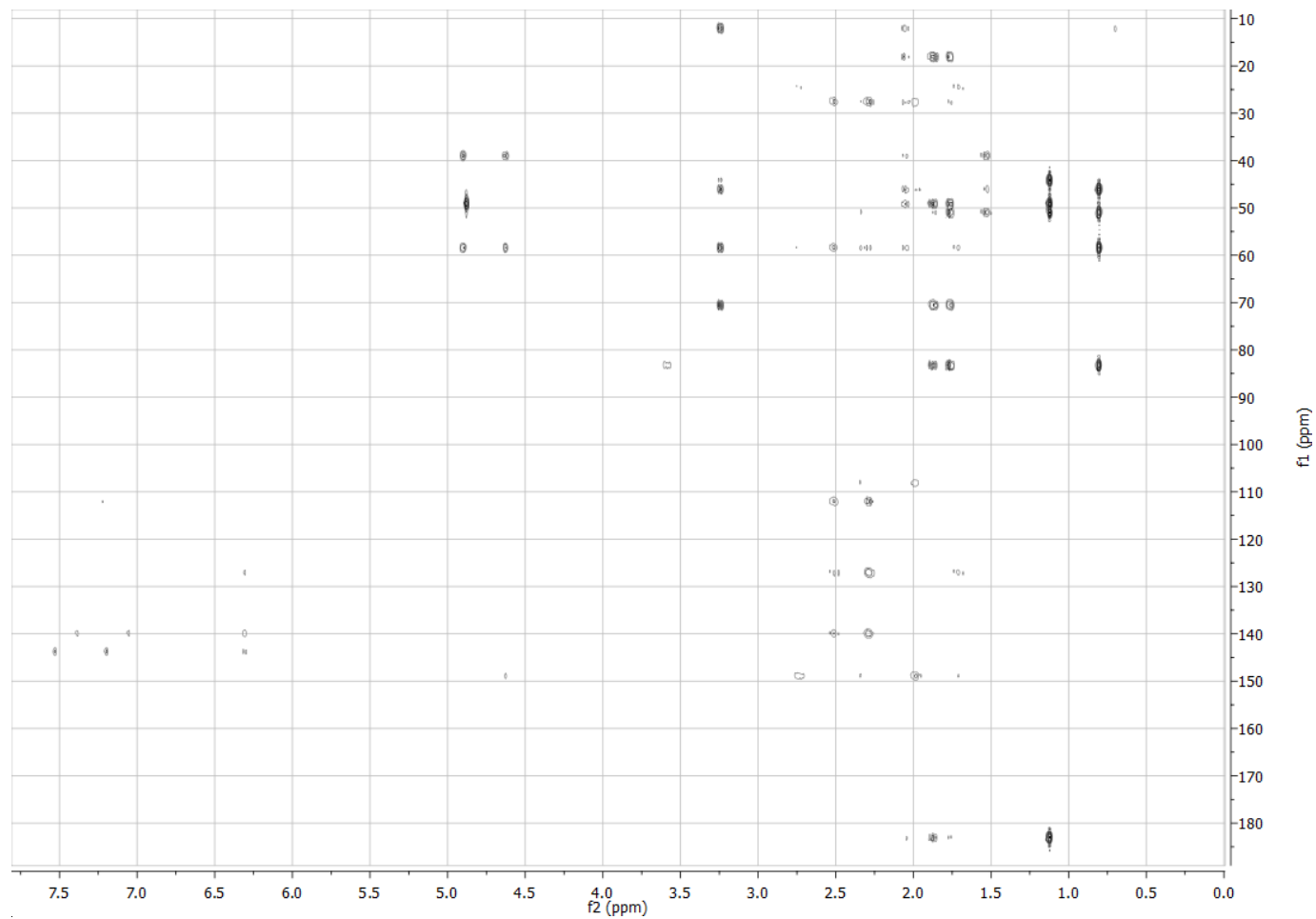
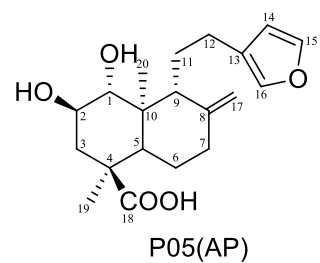
APÊNDICE 7. Espectros do metabólito P05(AP).



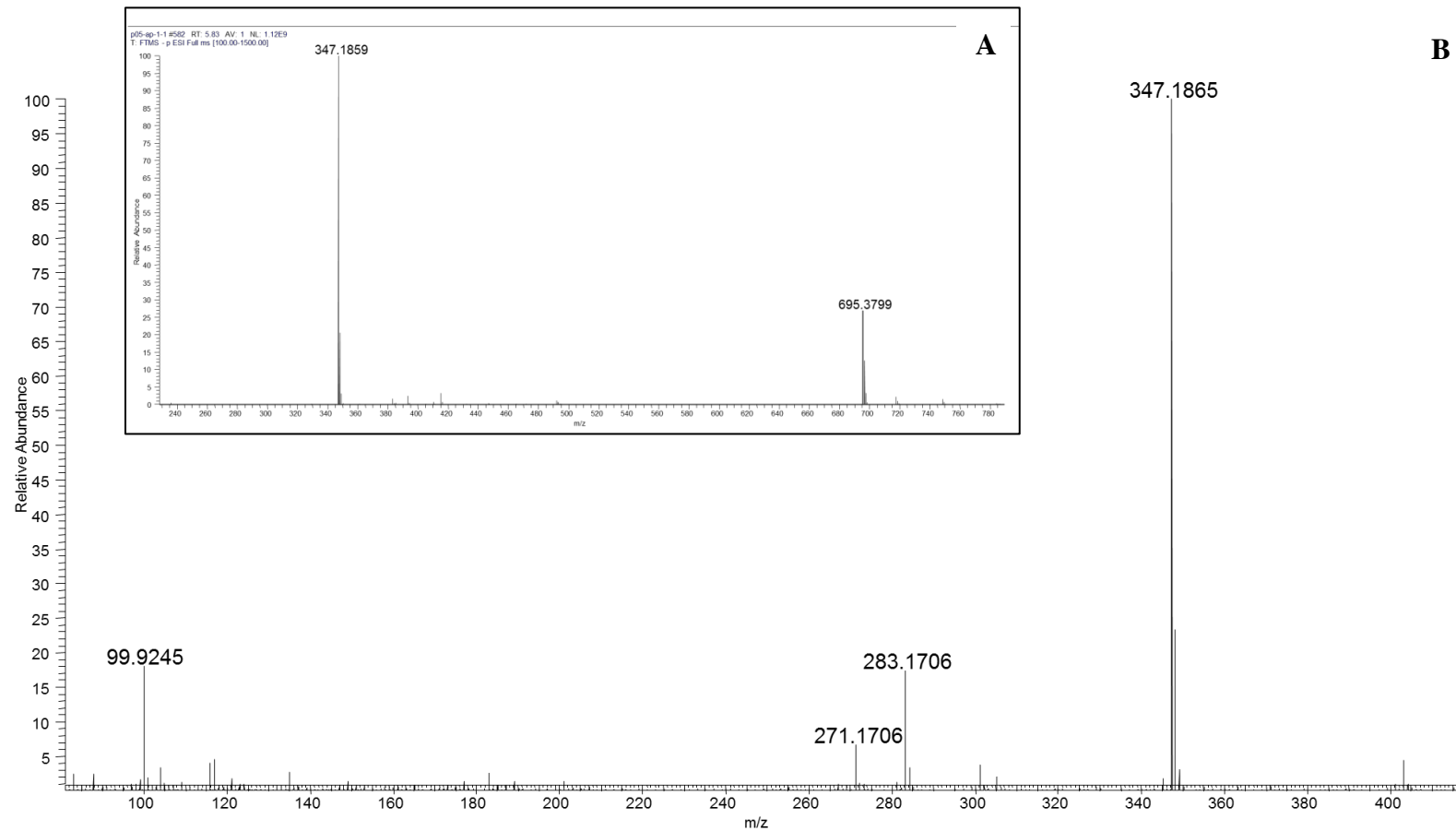
Apêndice 7.1. Espectro de RMN de ^1H do metabólito P05(AP) (CD_3OD , 600 MHz).



Apêndice 7.2. Mapa de contornos de HMQC do metabólito P05(AP) (CD_3OD , 600 MHz).

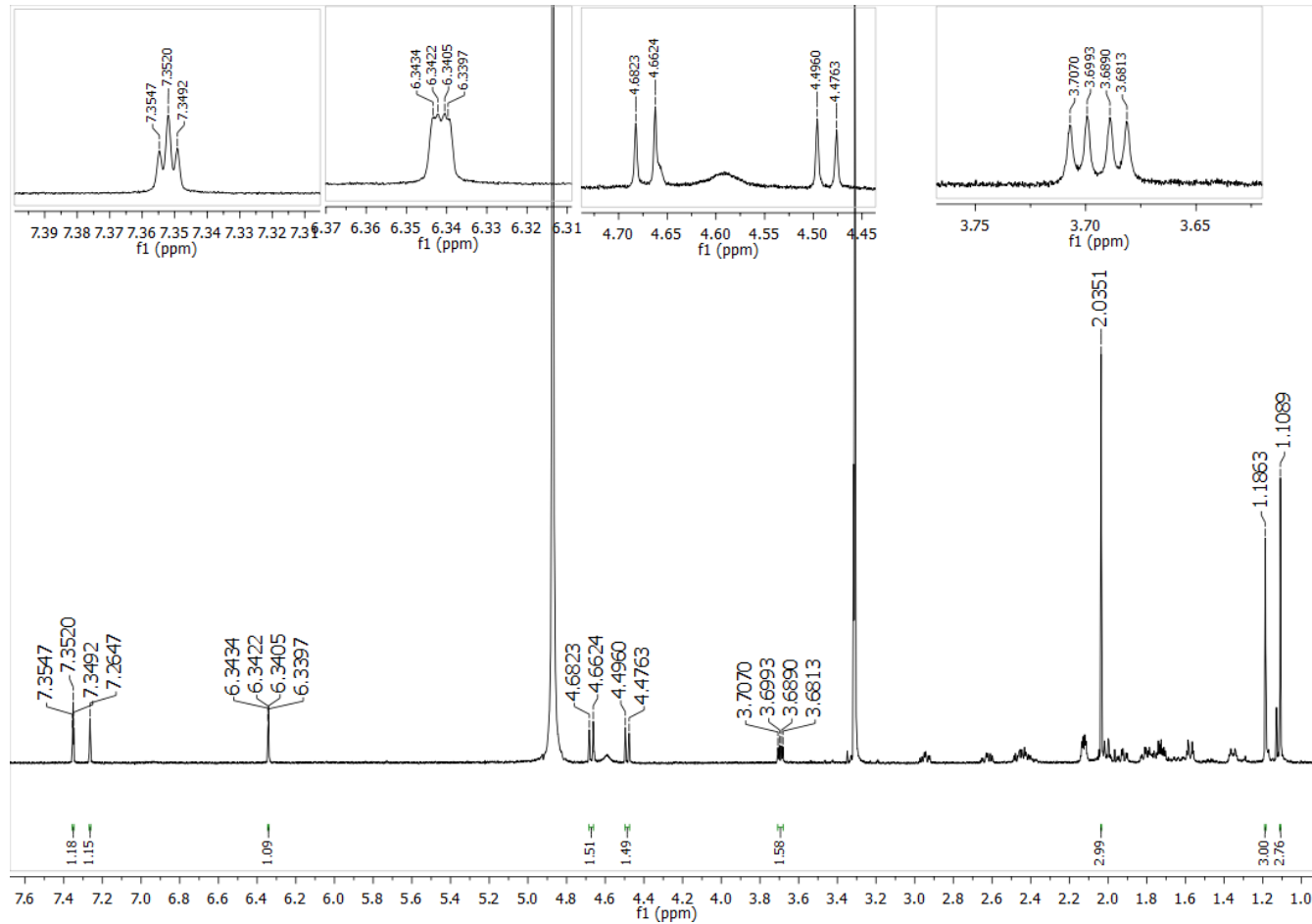
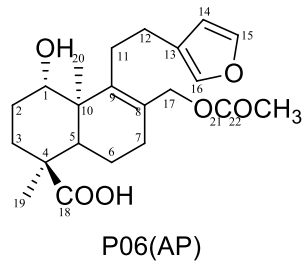


Apêndice 7.3. Mapa de contornos de HMBC do metabólito P05(AP) (CD_3OD , 600 MHz).

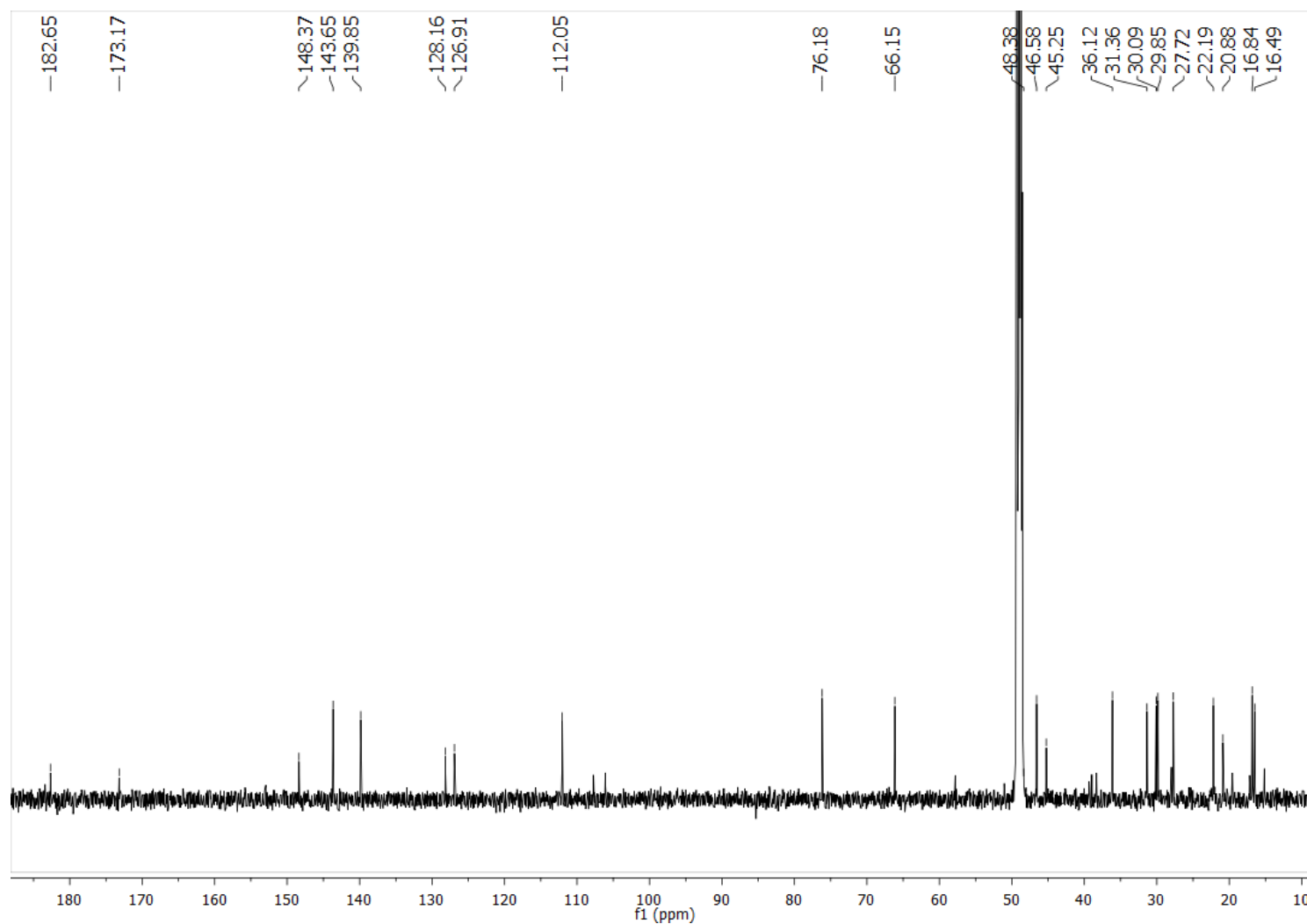
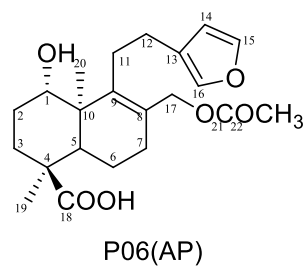


Apêndice 7.4. (A) Espectro de massas em alta resolução no modo negativo obtido por ionização por eletrospray do metabólito P05(AP) e (B) espectro de íons produtos gerado através da dissociação induzida por colisão do íon $[M-H]^-$ $m/z = 347,1859$ (45 kV) - analisador Orbitrap.

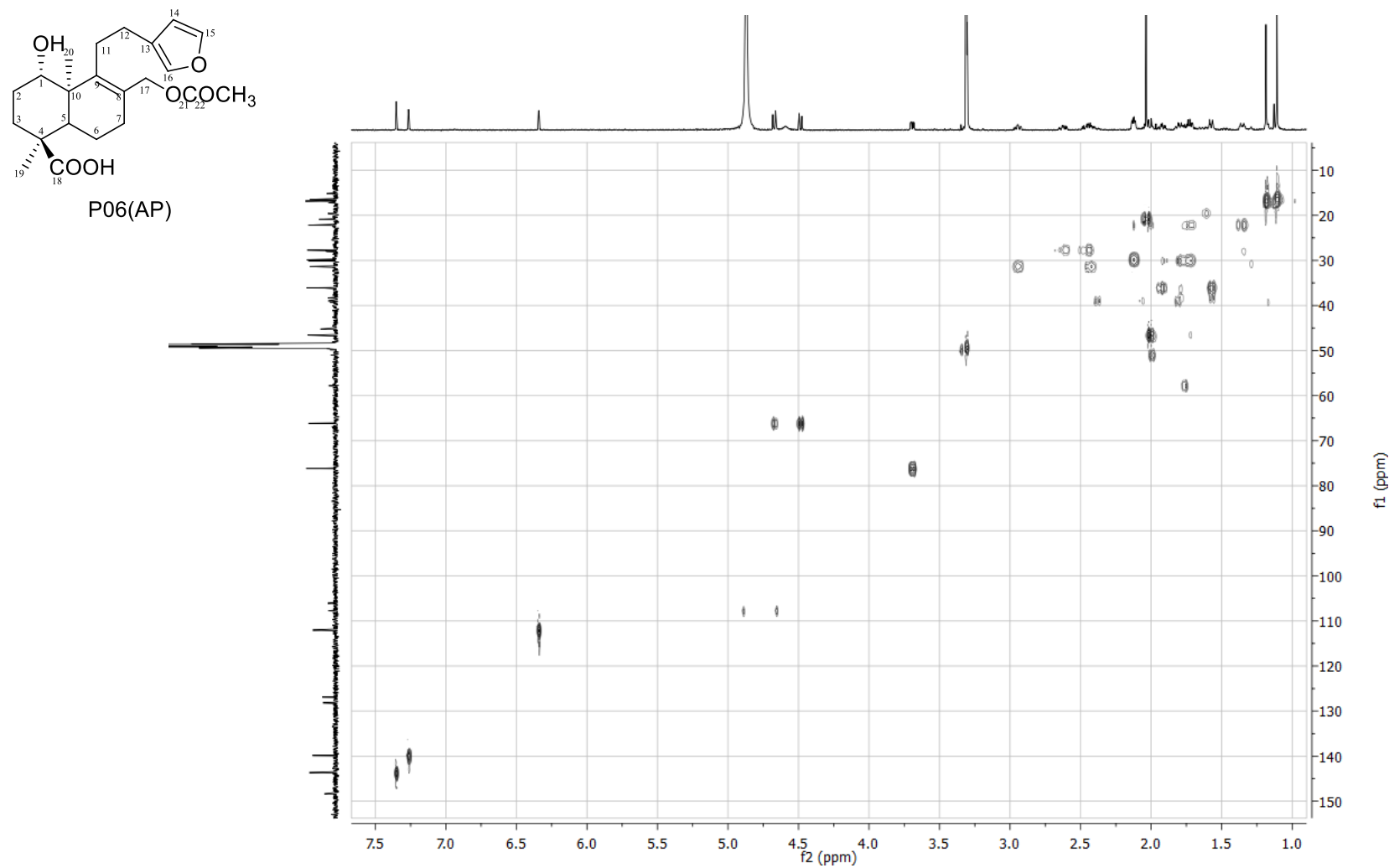
APÊNDICE 8. Espectros do metabólito P06(AP).



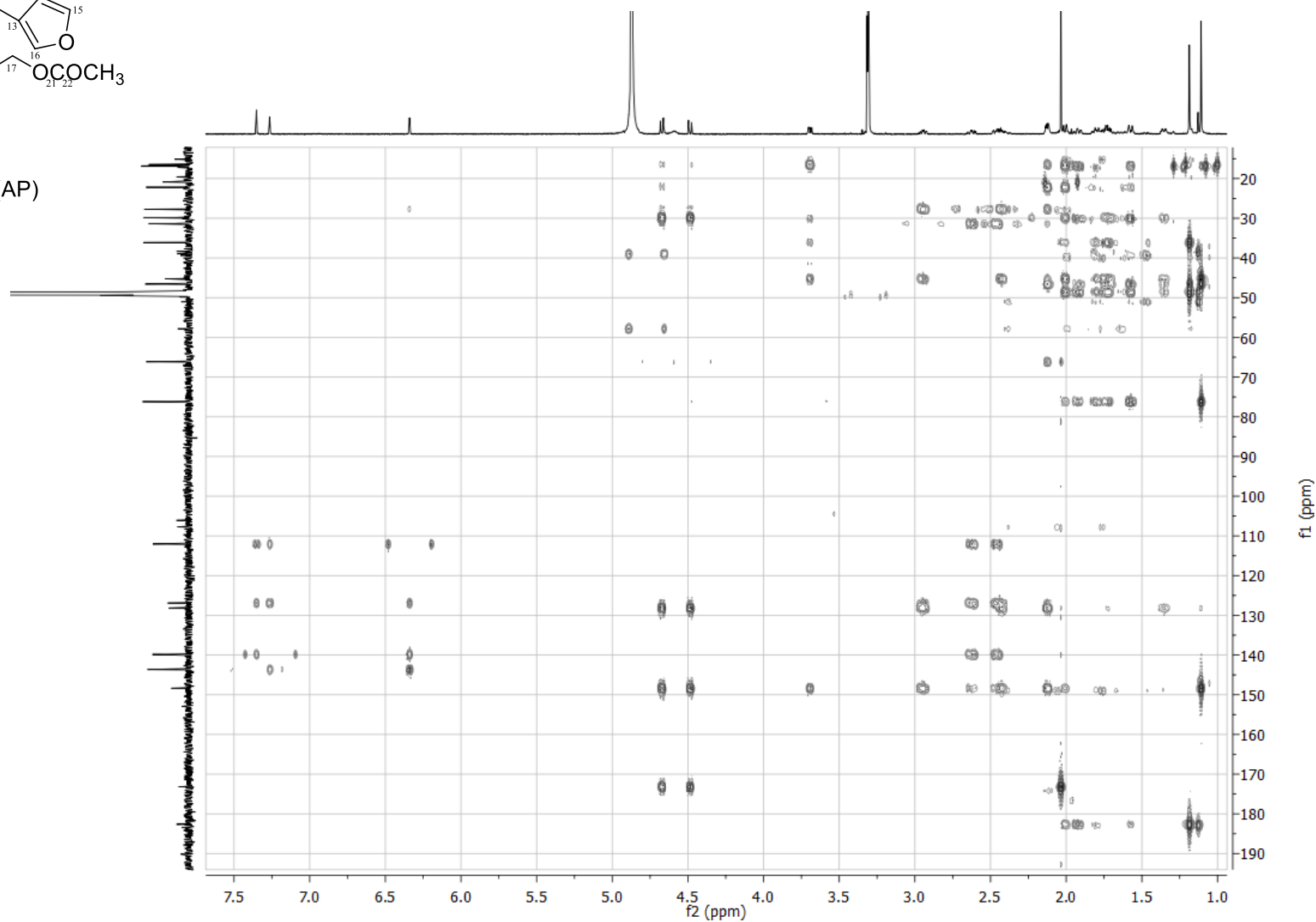
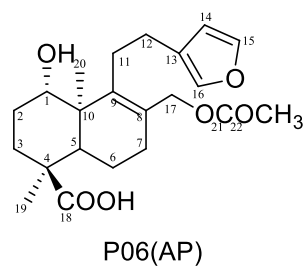
Apêndice 8.1. Espectro de RMN de ^1H do metabólito P06(AP) (CD_3OD , 600 MHz).



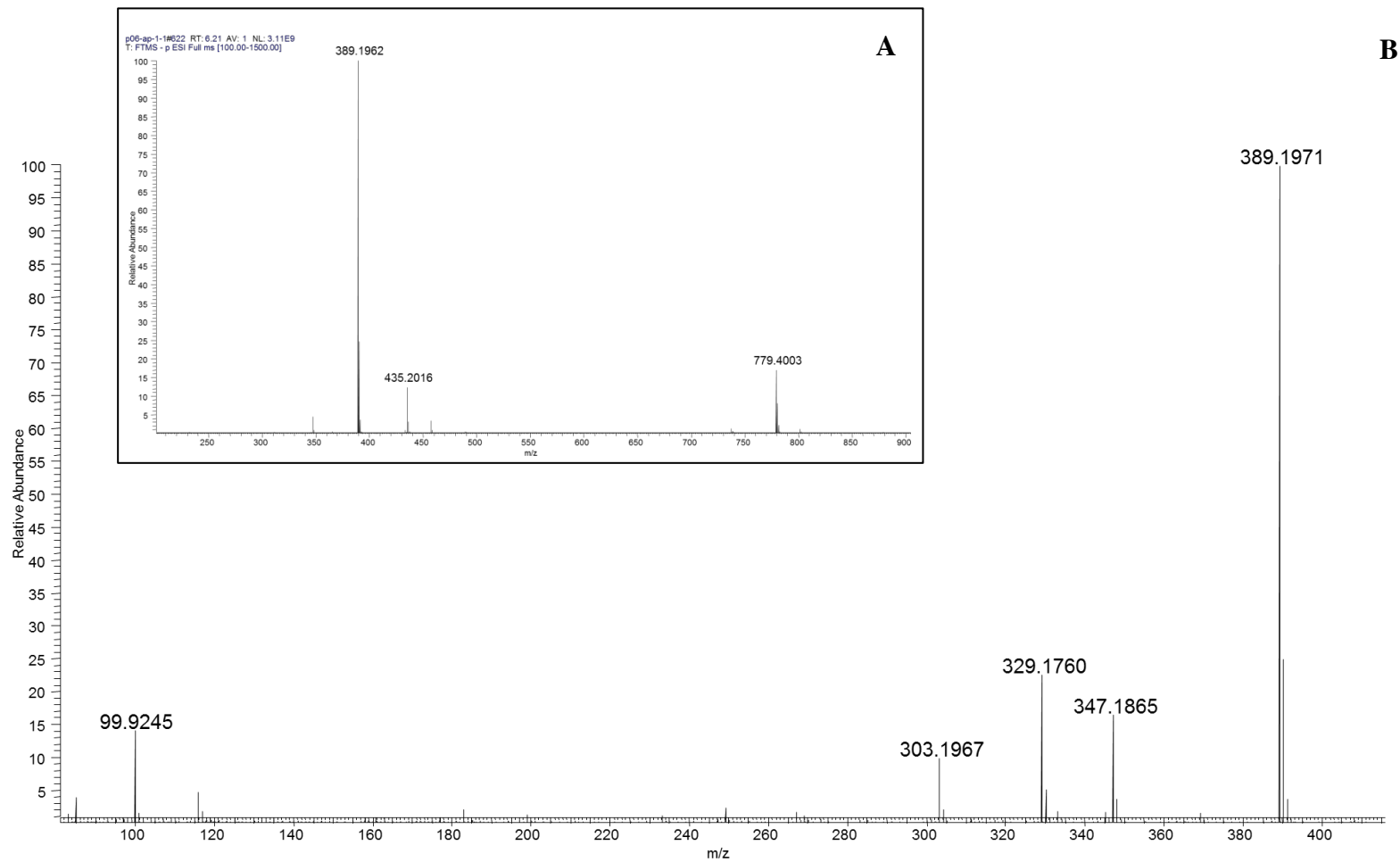
Apêndice 8.2. Espectro de RMN de ^{13}C do metabólito P06(AP) (CD_3OD , 151 MHz).



Apêndice 8.3. Mapa de contornos de HMQC do metabólito P06(AP) (CD₃OD, 600 MHz).

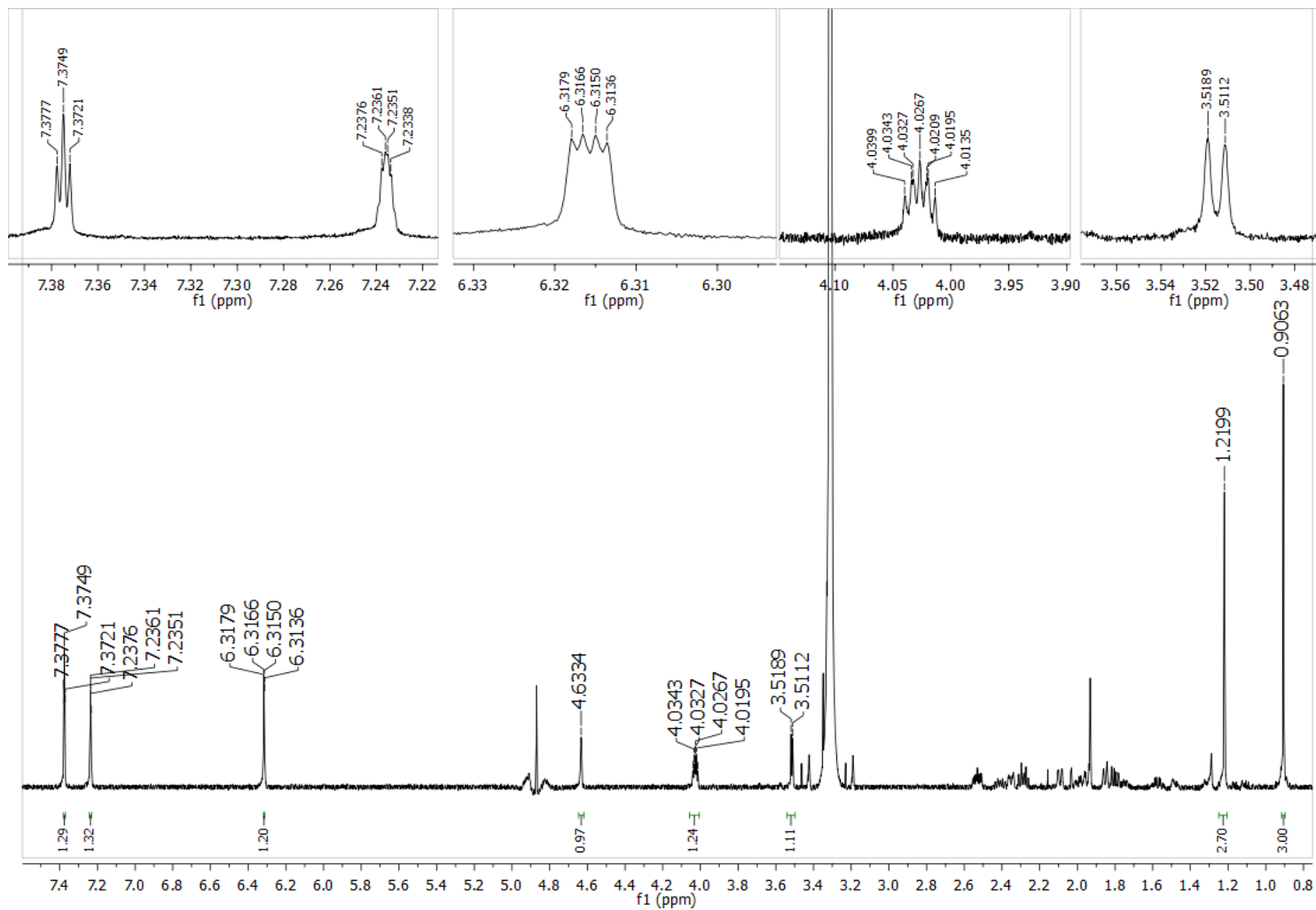
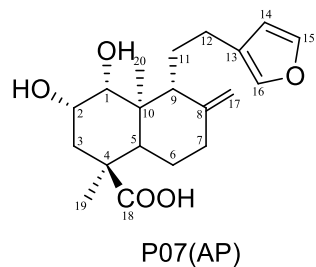


Apêndice 8.4. Mapa de contornos de HMBC do metabólito P06(AP) (CD₃OD, 600 MHz).

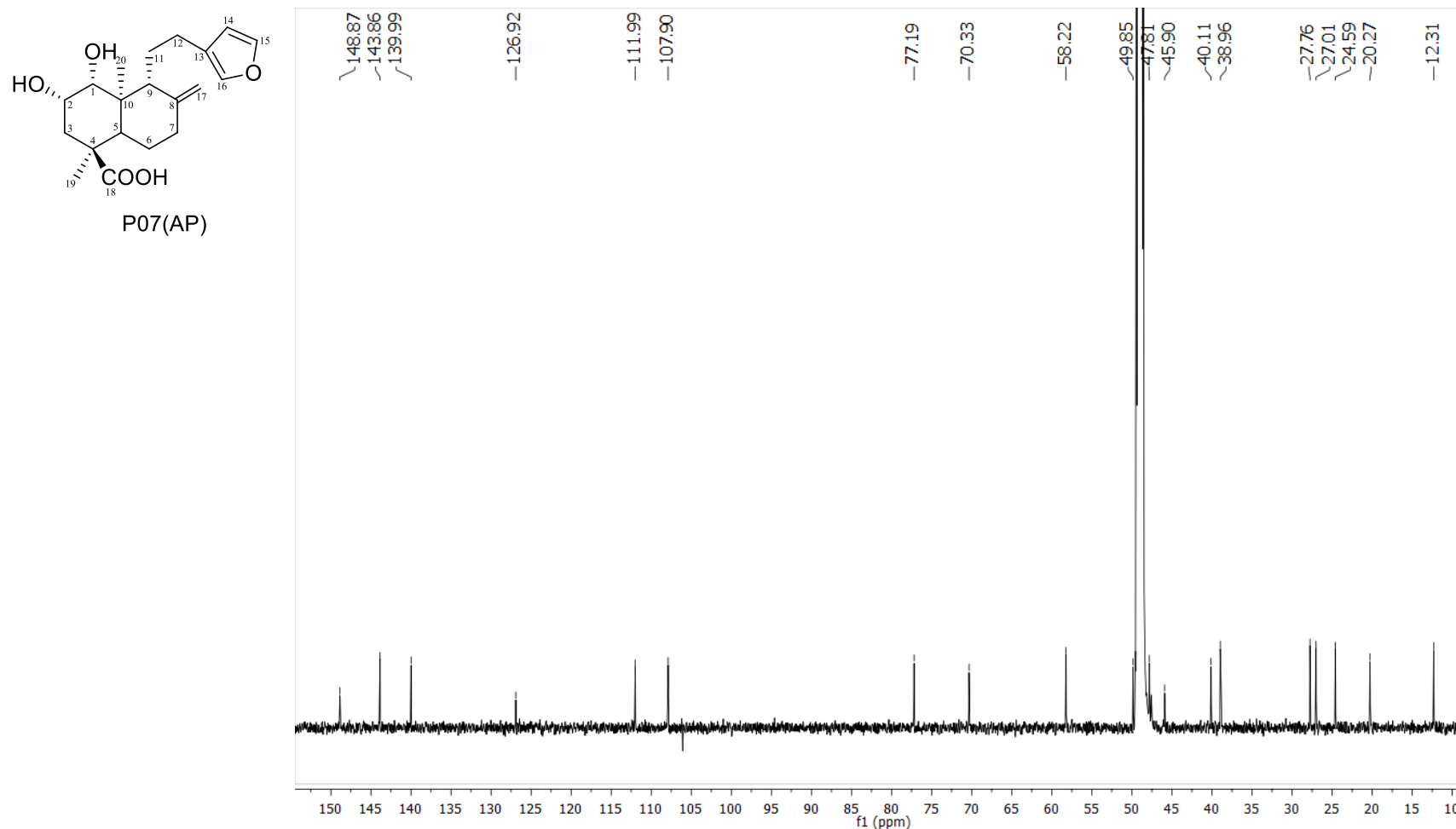


Apêndice 8.5. (A) Espectro de massas em alta resolução no modo negativo obtido por ionização por eletrospray do metabólito P06(AP) e (B) espectro de íons produtos gerado através da dissociação induzida por colisão do íon $[M-H]^-$ $m/z = 389,1962$ (45 kV) - analisador Orbitrap.

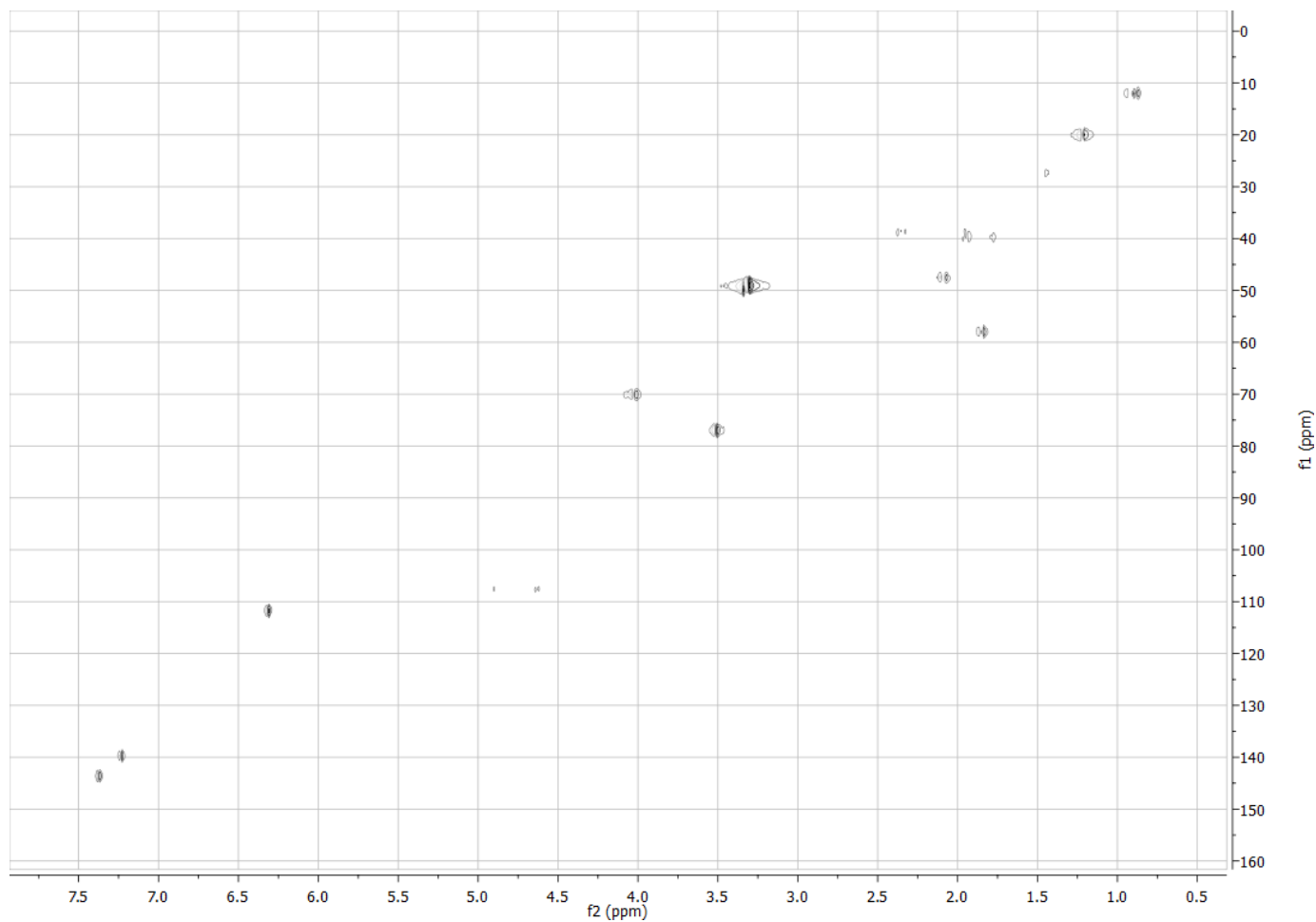
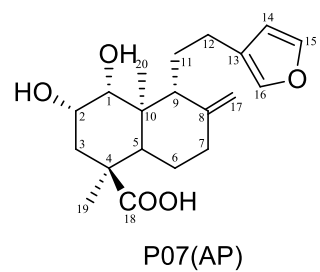
APÊNDICE 9. Espectros do metabólito P07(AP).



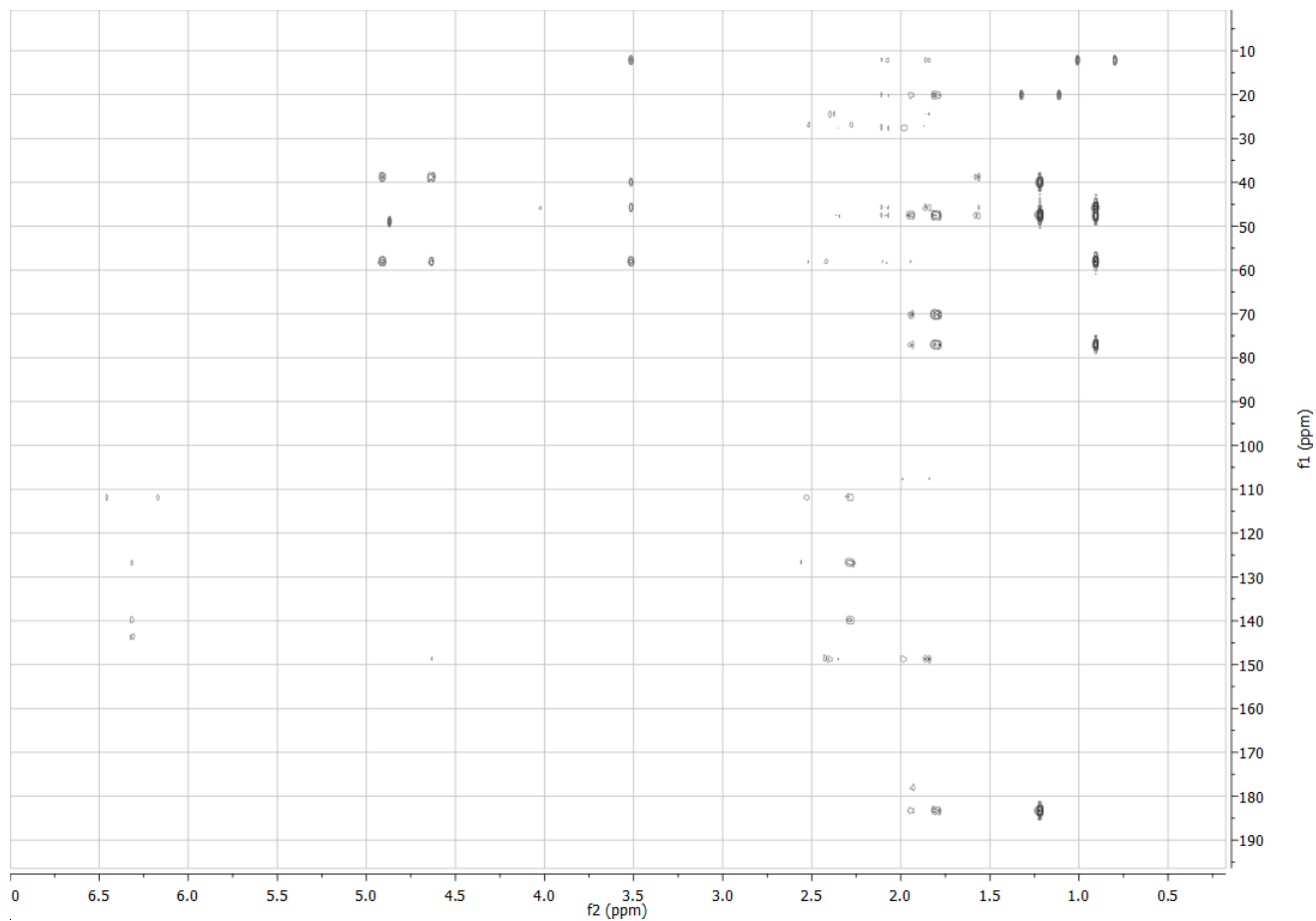
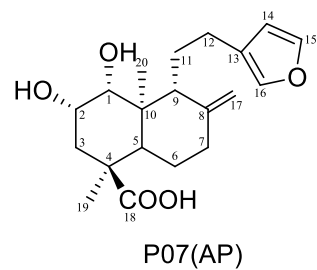
Apêndice 9.1. Espectro de RMN de ^1H do metabólito P07(AP) (CD_3OD , 600 MHz).



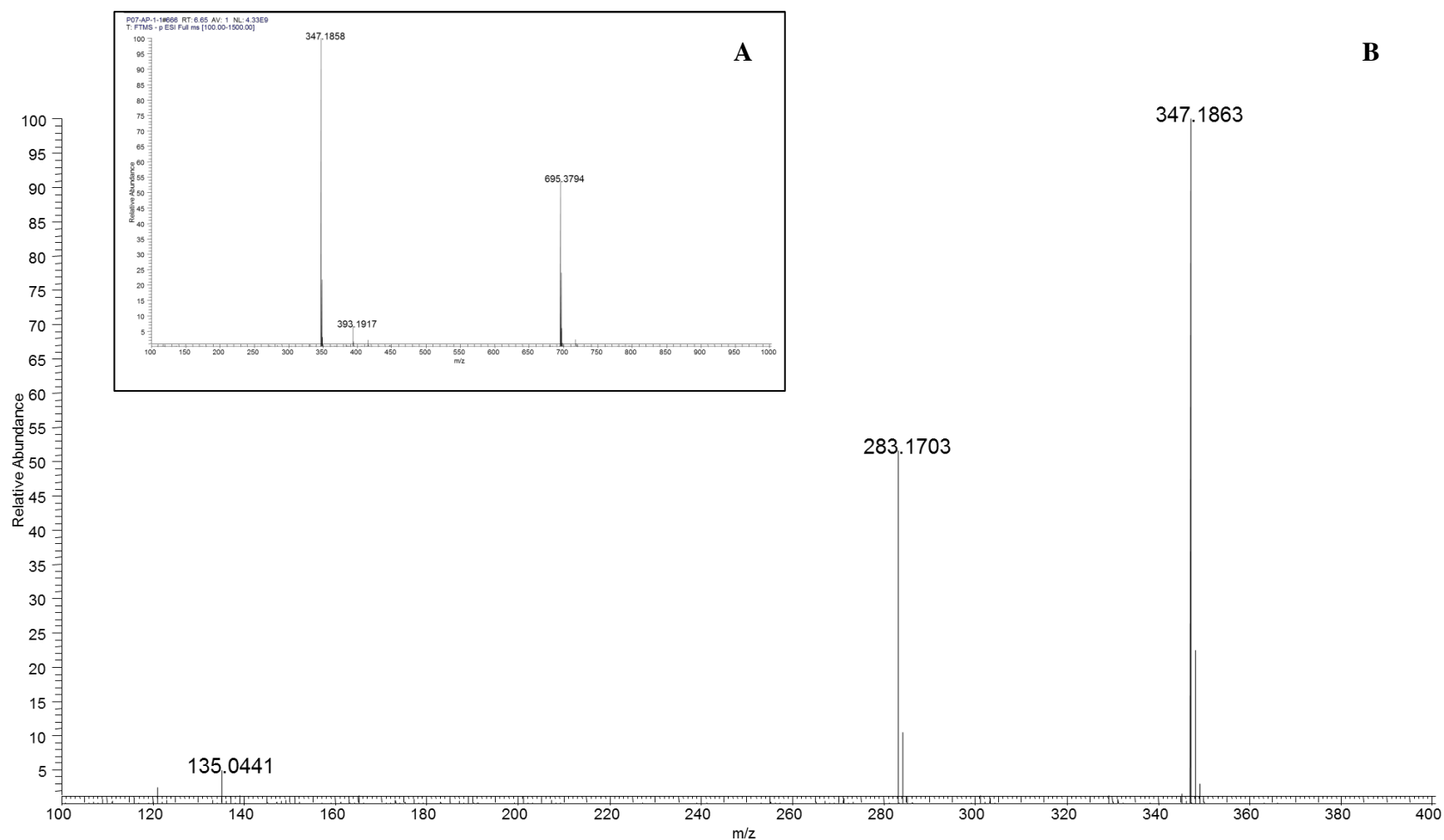
Apêndice 9.2. Espectro de RMN de ¹³C do metabólito P07(AP) (CD₃OD, 151 MHz).



Apêndice 9.3. Mapa de contornos de HMBC do metabólito P07(AP) (CD_3OD , 600 MHz).

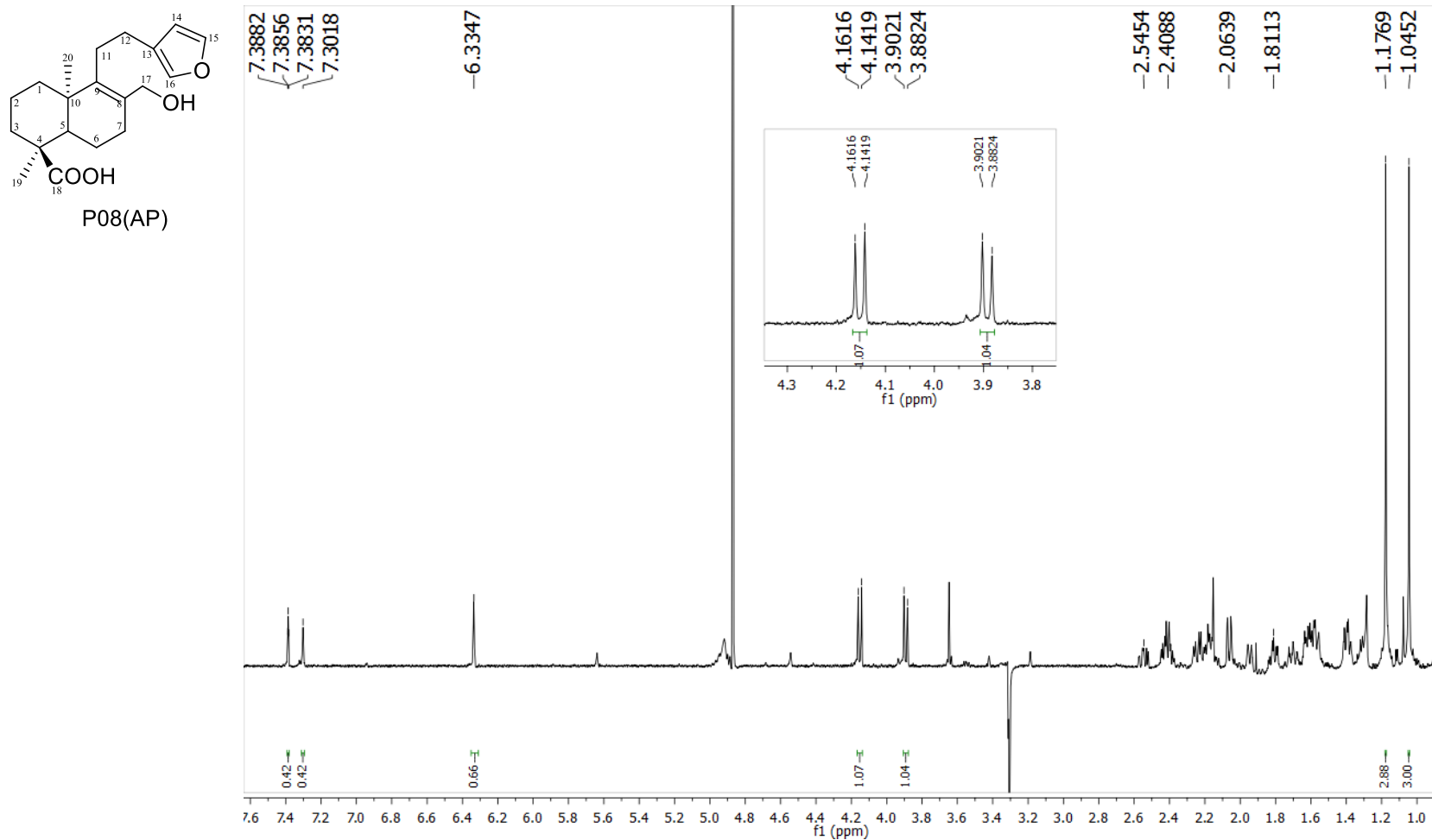


Apêndice 9.4. Mapa de contornos de HMBC do metabólito P07(AP) (CD₃OD, 600 MHz).

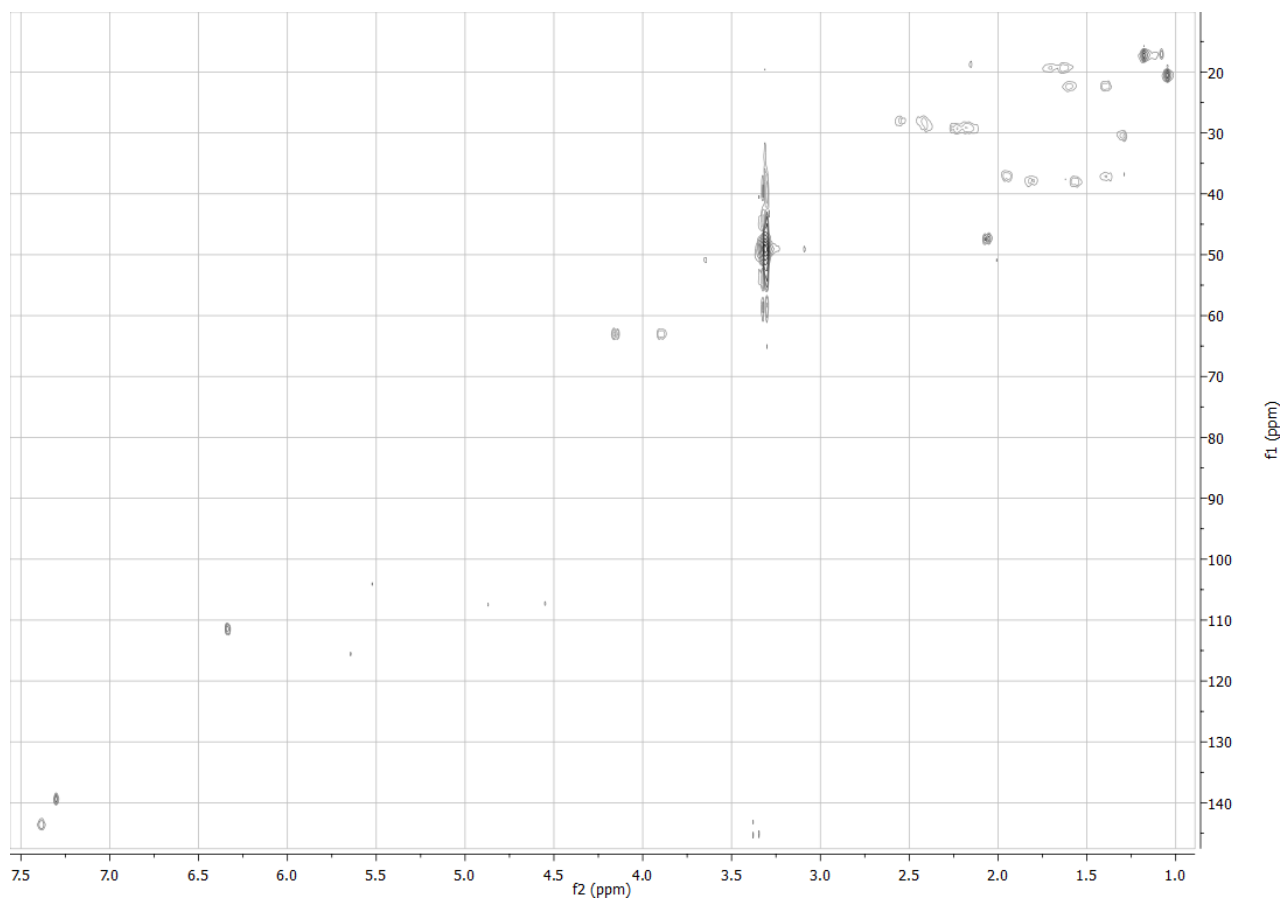
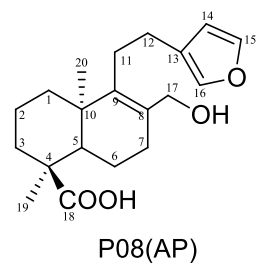


Apêndice 9.5. (A) Espectro de massas em alta resolução no modo negativo obtido por ionização por eletrospray do metabólito P07(AP) e (B) espectro de íons produtos gerado através da dissociação induzida por colisão do íon $[M-H]^-$ $m/z = 347,1858$ (45 kV) - analisador Orbitrap.

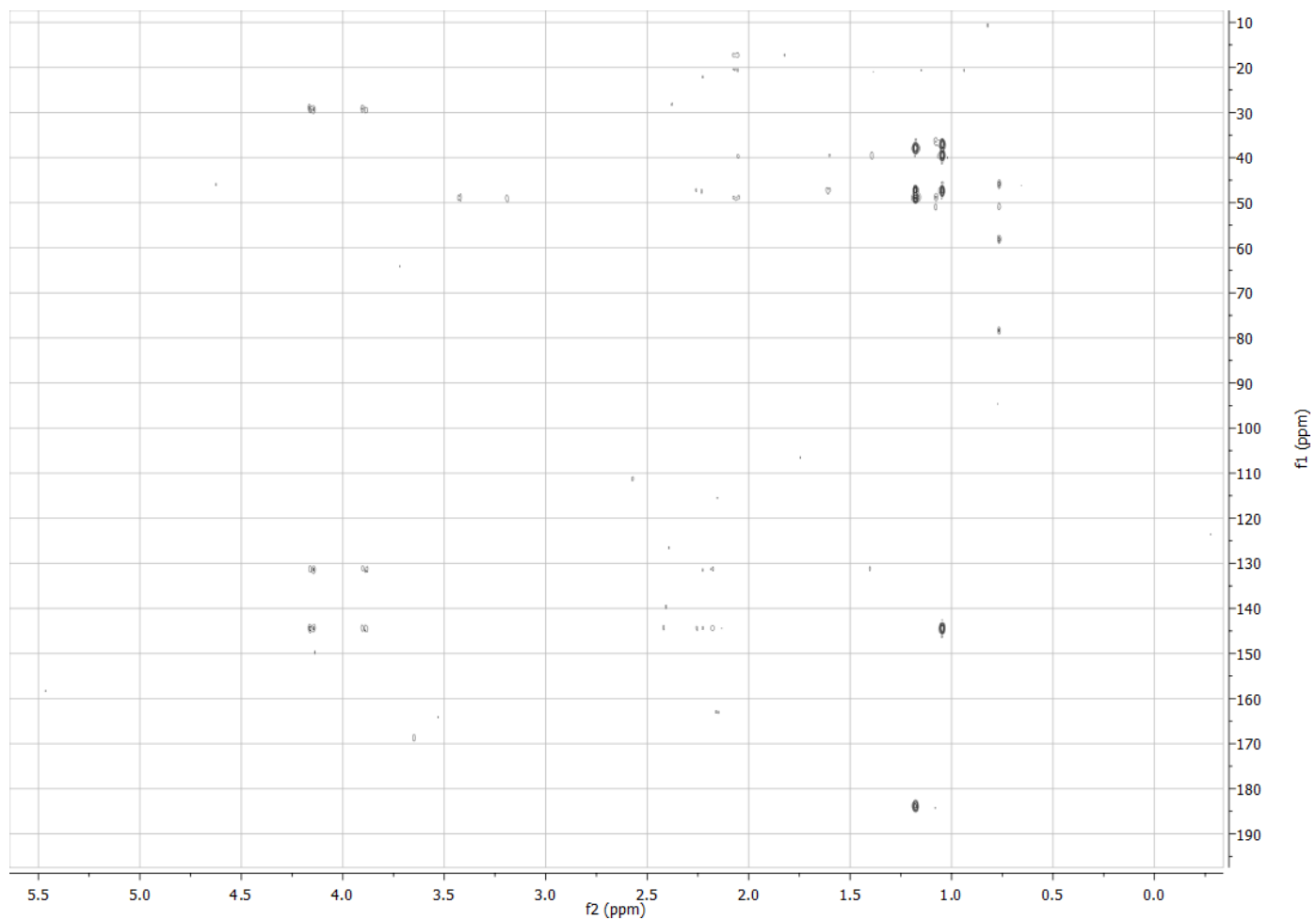
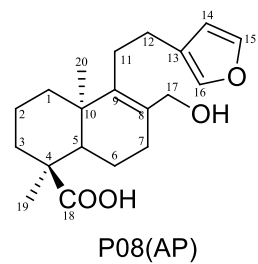
APÊNDICE 10. Espectros do metabólito P08(AP).



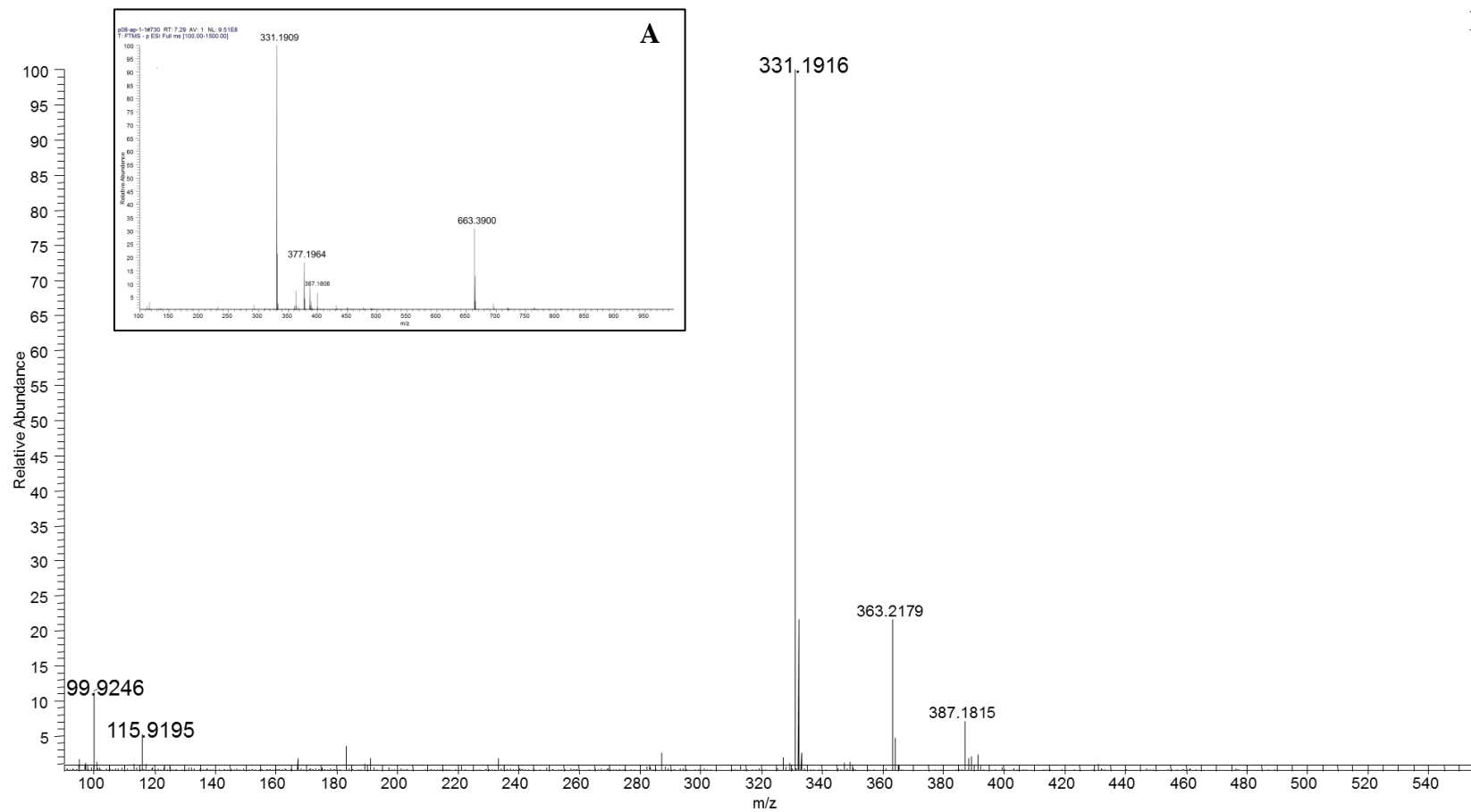
Apêndice 10.1. Espectro de RMN de ¹H do metabólito P08(AP) (CD₃OD, 600 MHz).



Apêndice 10.2. Mapa de contornos de HMQC do metabólito P08(AP) (CD₃OD, 600 MHz).

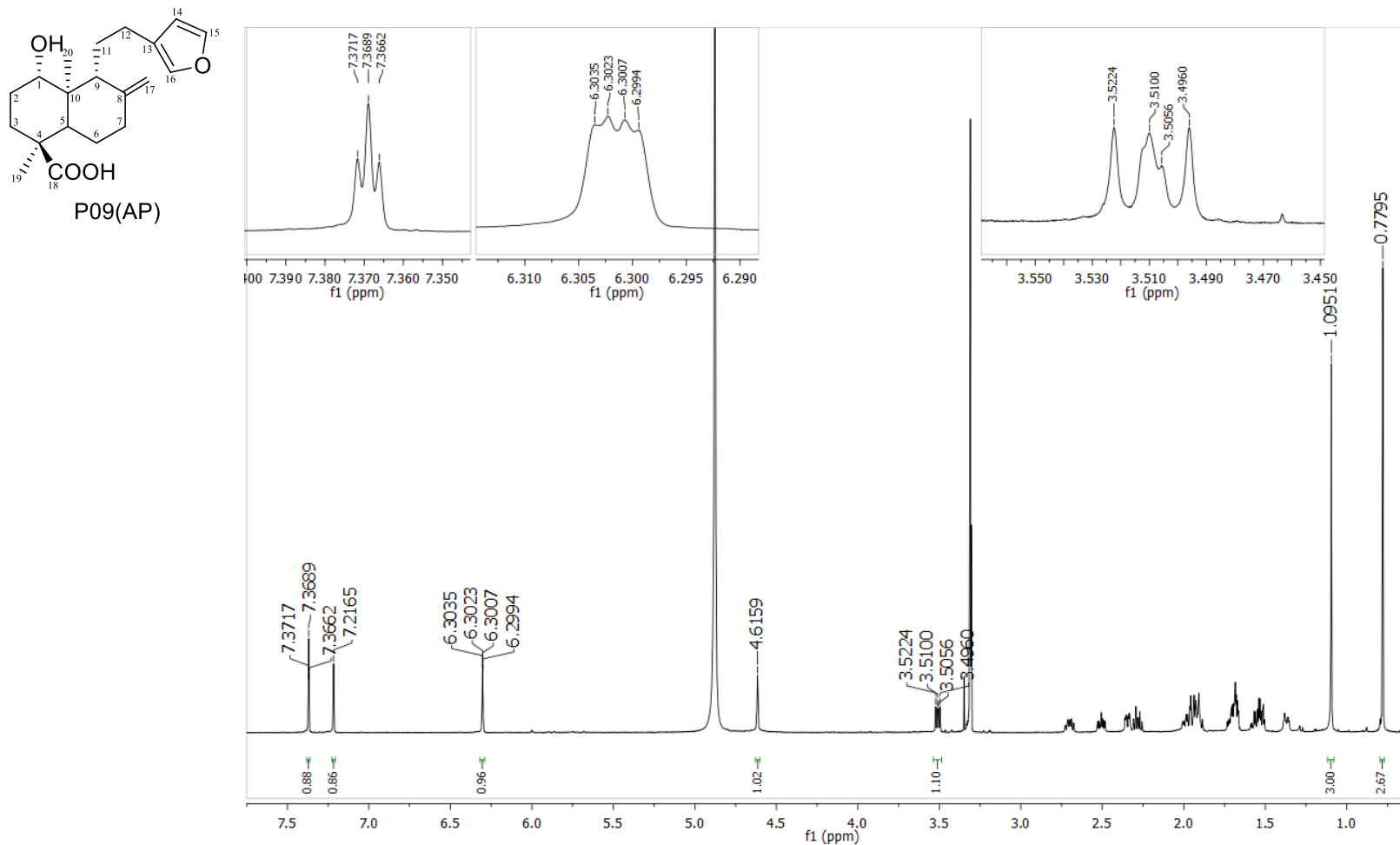


Apêndice 10.3. Mapa de contornos de HMBC do metabólito P08(AP) (CD₃OD, 600 MHz).

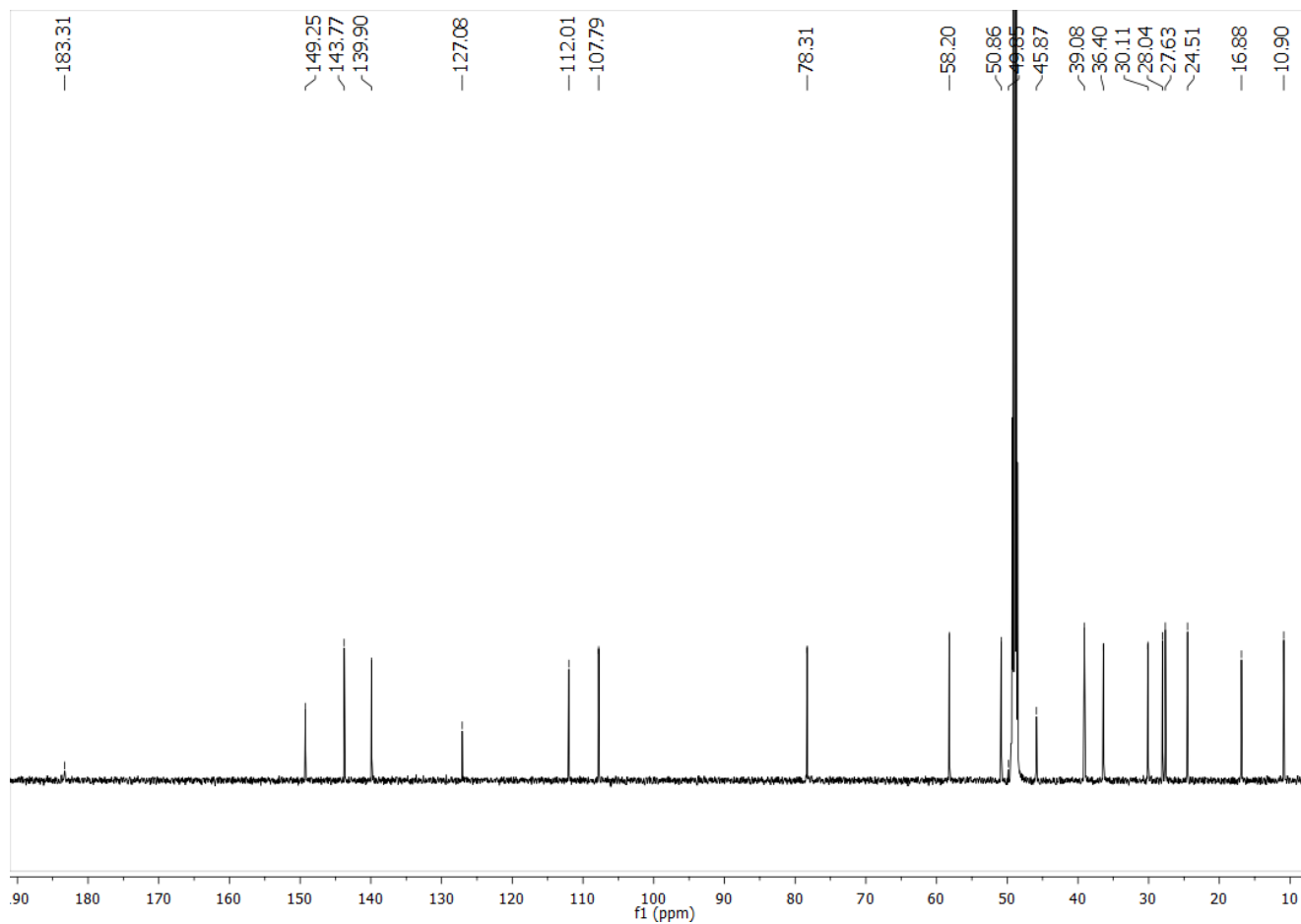
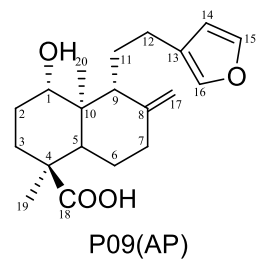


Apêndice 10.4. (A) Espectro de massas em alta resolução no modo negativo obtido por ionização por eletrospray do metabólito P08(AP) e (B) espectro de íons produtos gerado através da dissociação induzida por colisão do íon $[M-H]^-$ $m/z = 331,1909$ (45 kV) - analisador Orbitrap.

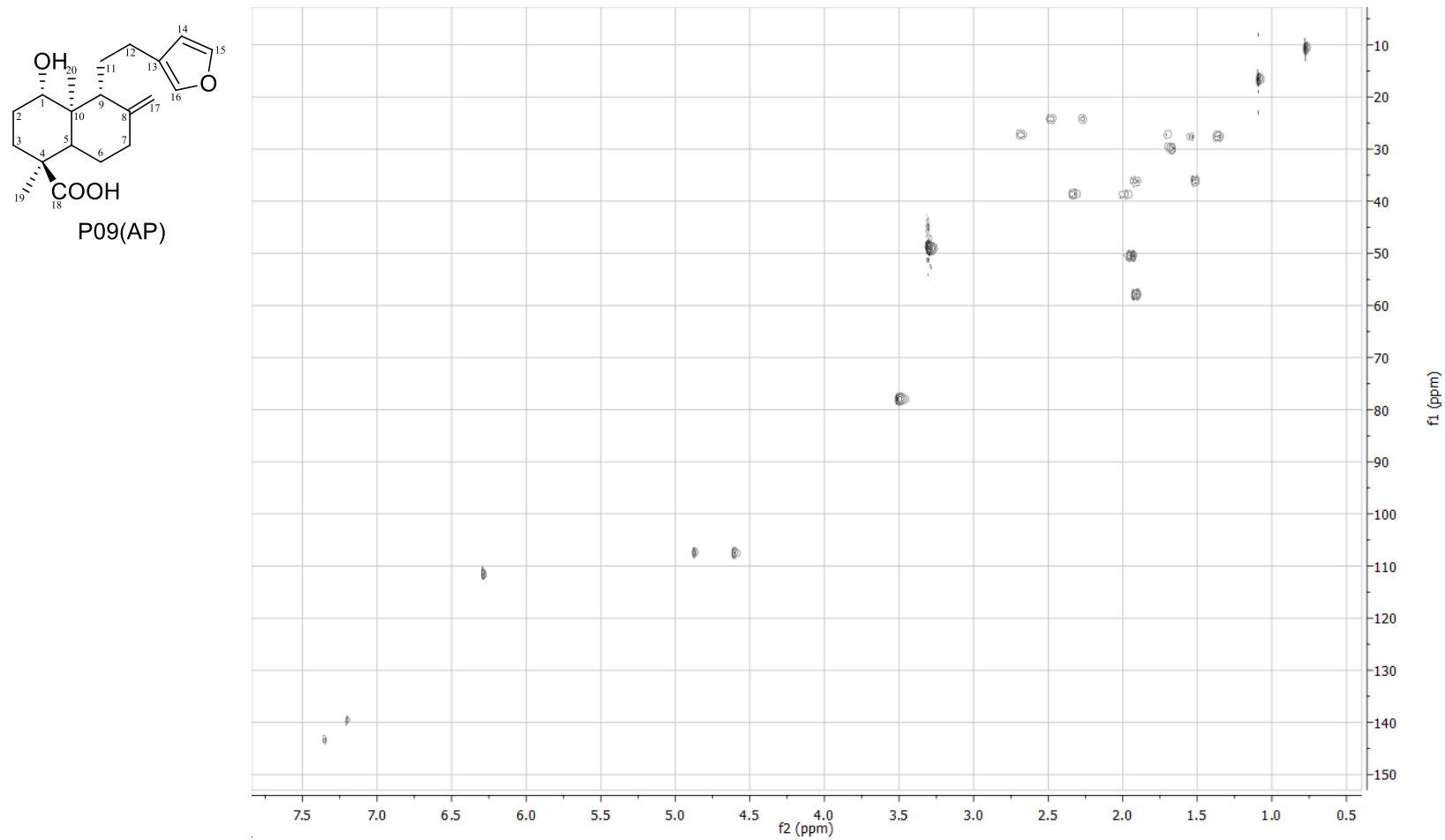
APÊNDICE 11. Espectros do metabólito P09(AP).



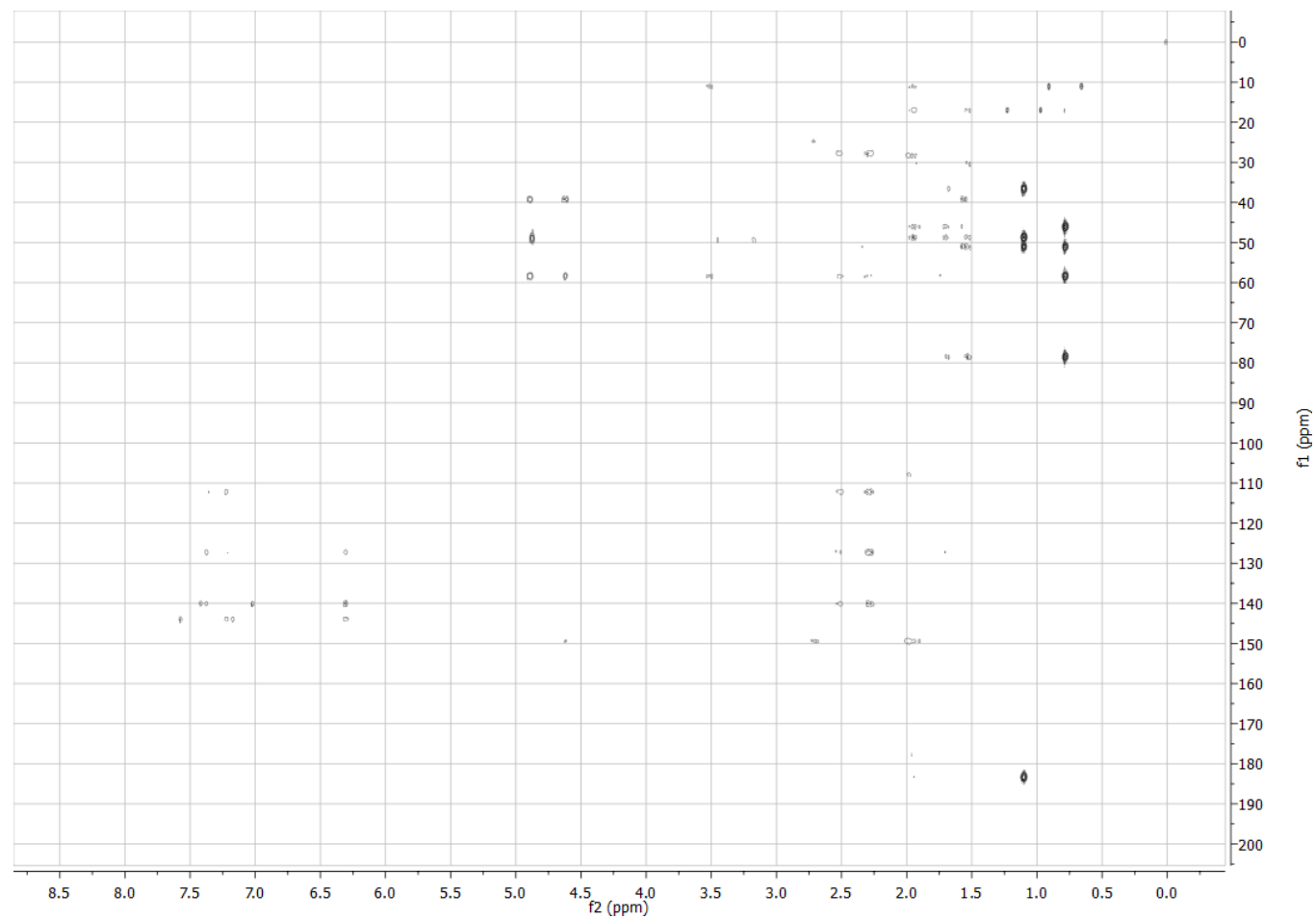
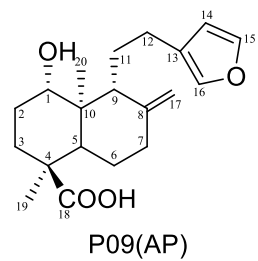
Apêndice 11.1. Espectro de RMN de ¹H do metabólito P09(AP) (CD₃OD, 600 MHz).



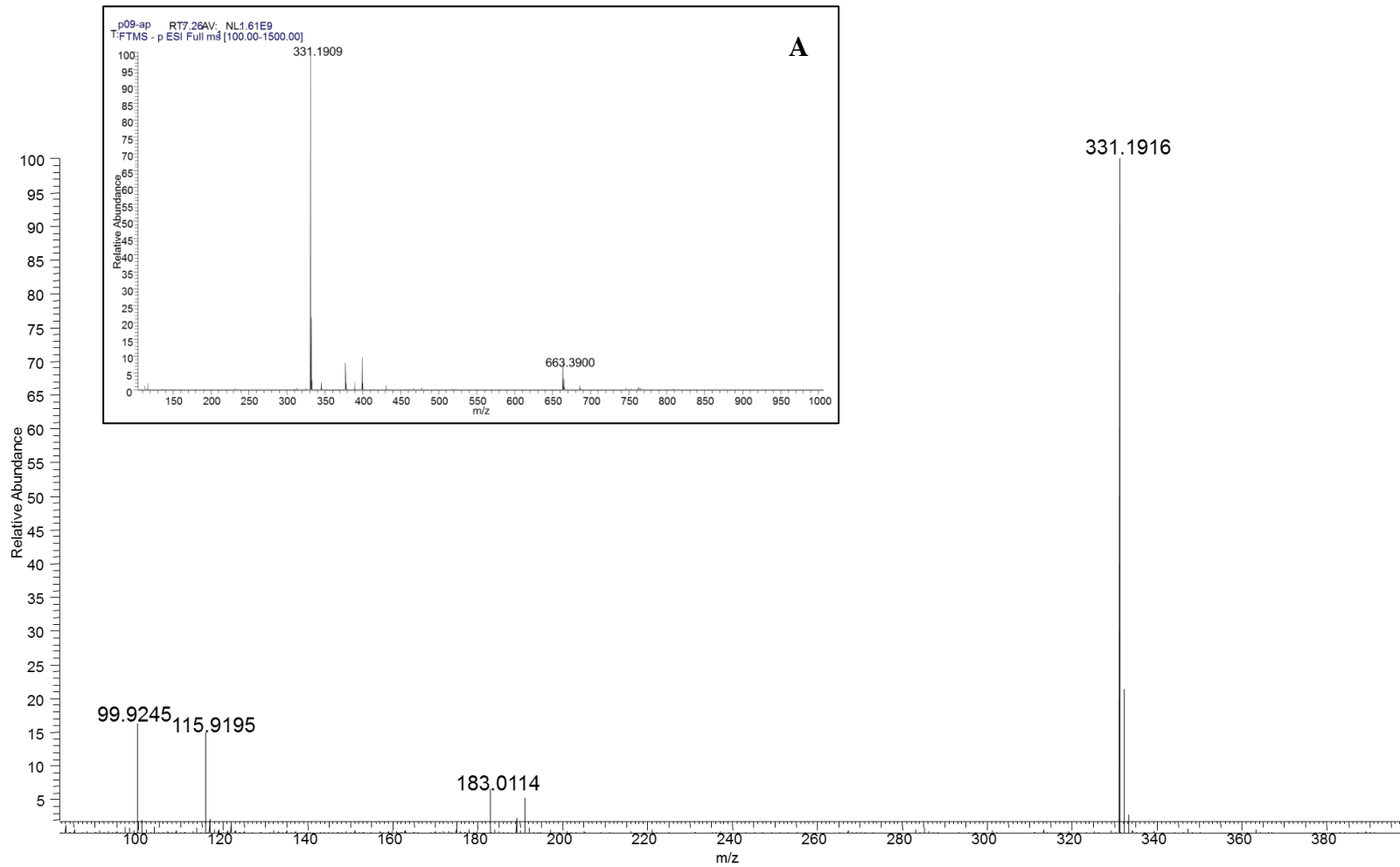
Apêndice 11.2. Espectro de RMN de ^{13}C do metabólito P09(AP) (CD_3OD , 151 MHz).



Apêndice 11.3. Mapa de contornos de HMQC do metabólito P09(AP) (CD₃OD, 600 MHz).

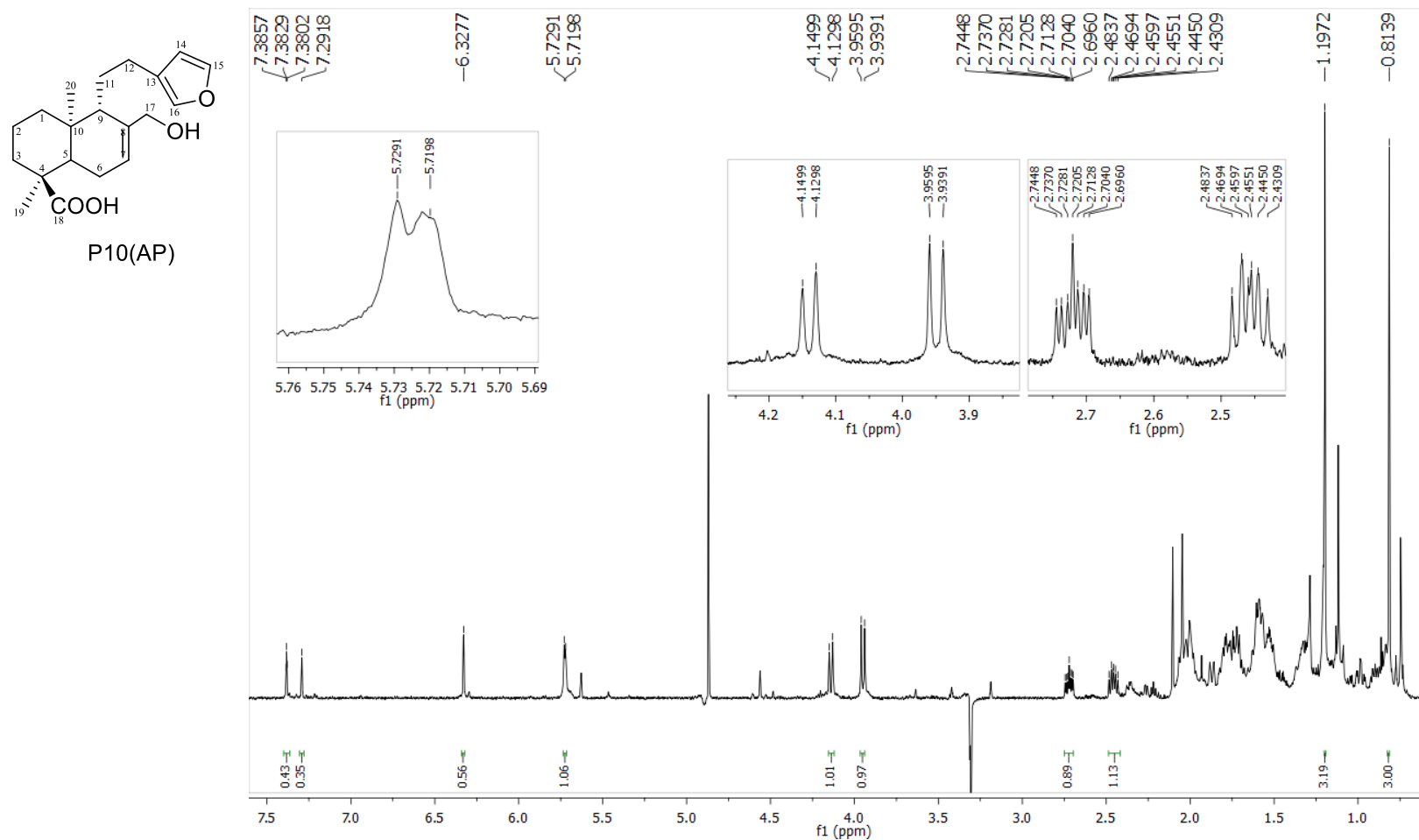


Apêndice 11.4. Mapa de contornos de HMBC do metabólito P09(AP) (CD_3OD , 600 MHz).

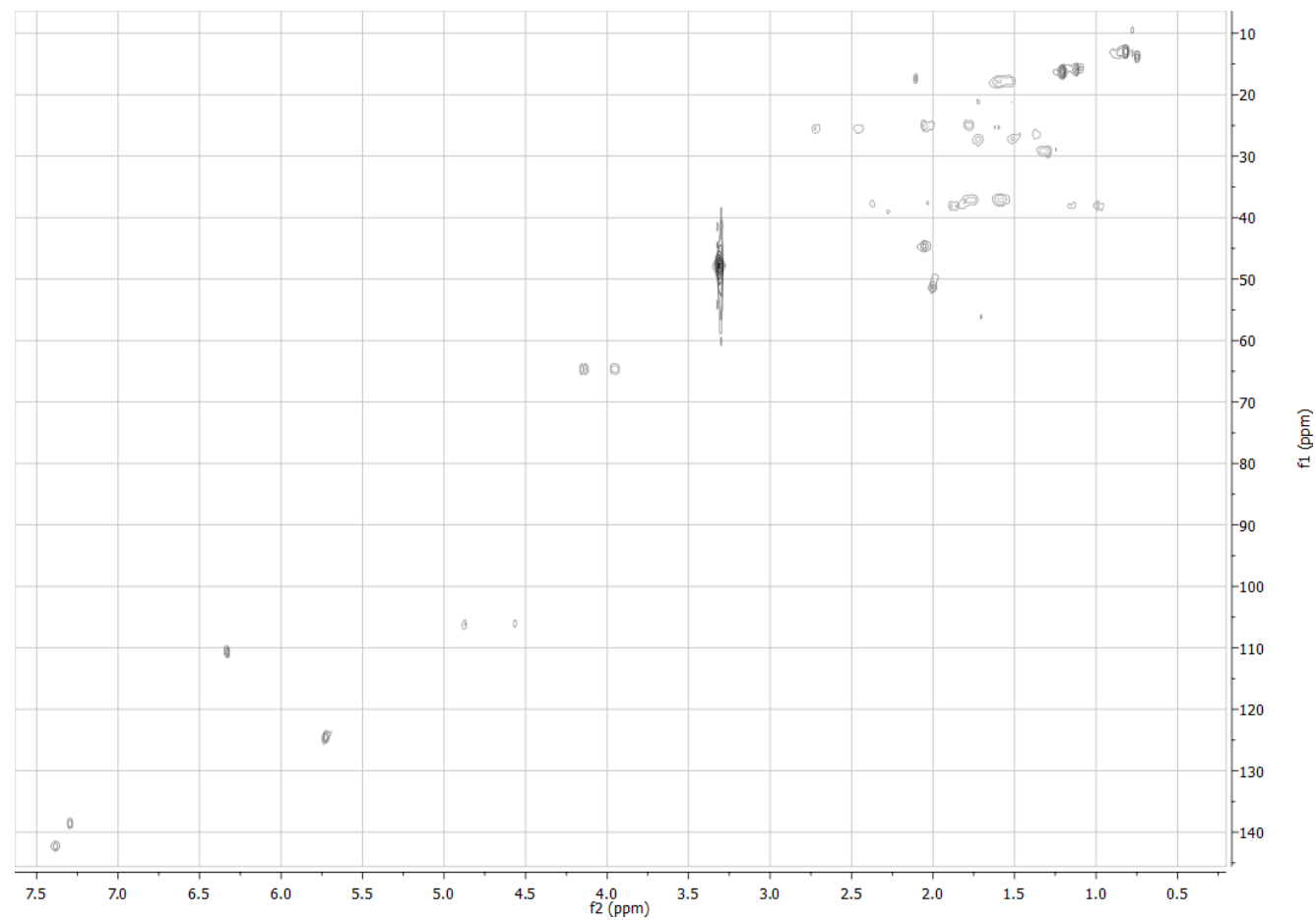
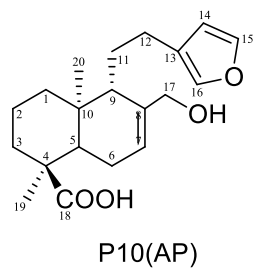


Apêndice 11.5. (A) Espectro de massas em alta resolução no modo negativo obtido por ionização por eletrospray do metabólito P09(AP) e (B) espectro de íons produtos gerado através da dissociação induzida por colisão do íon $[M-H]^-$ $m/z = 331,1909$ (45 kV) - analisador Orbitrap.

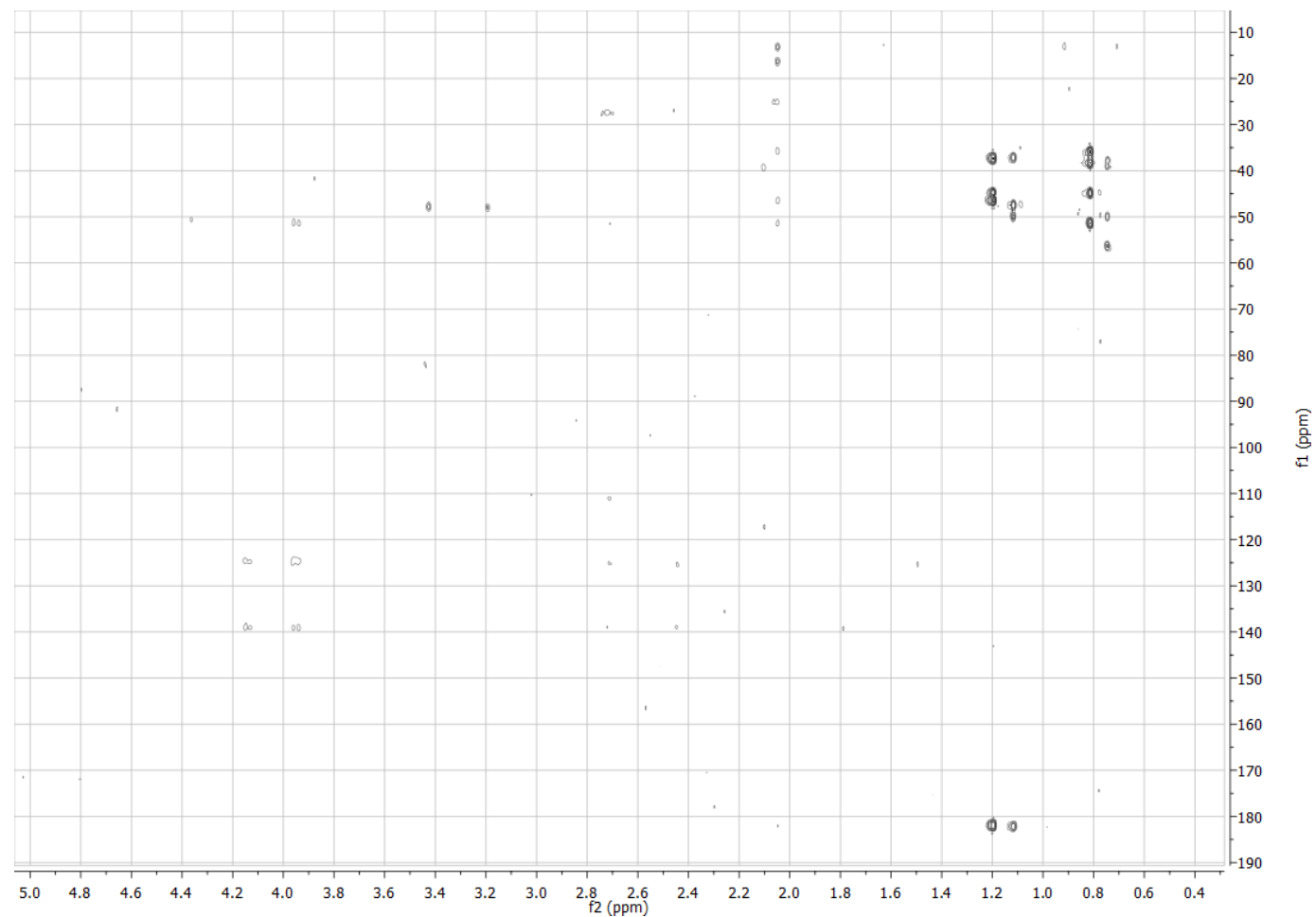
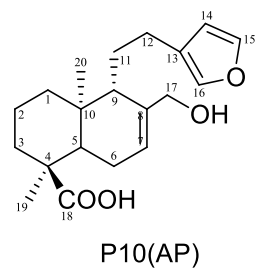
APÊNDICE 12. Espectros do metabólito P10(AP).



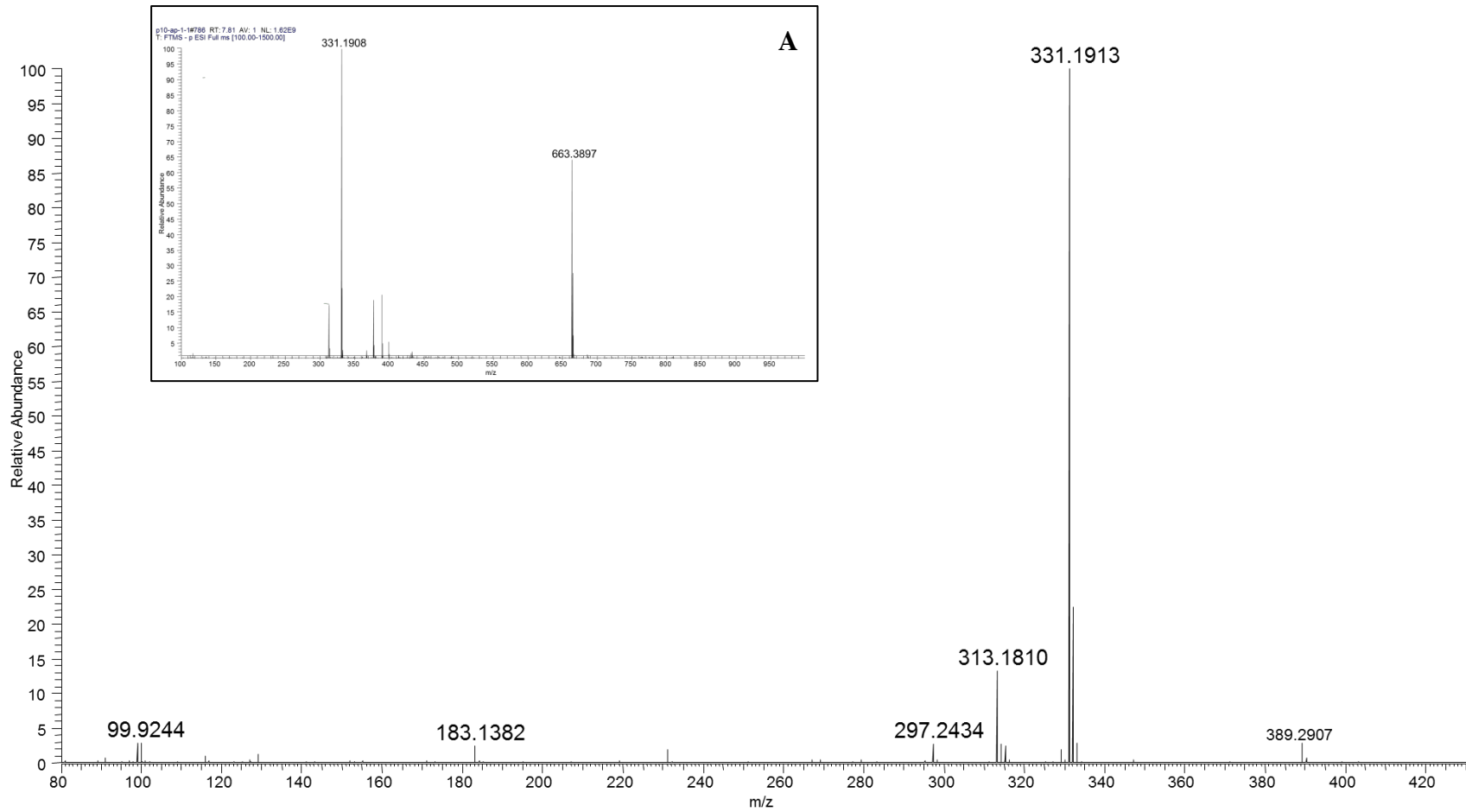
Apêndice 12.1. Espectro de RMN de ¹H do metabólito P10(AP) (CD₃OD, 600 MHz).



Apêndice 12.2. Mapa de contornos de HMQC do metabólito P10(AP) (CD₃OD, 600 MHz).

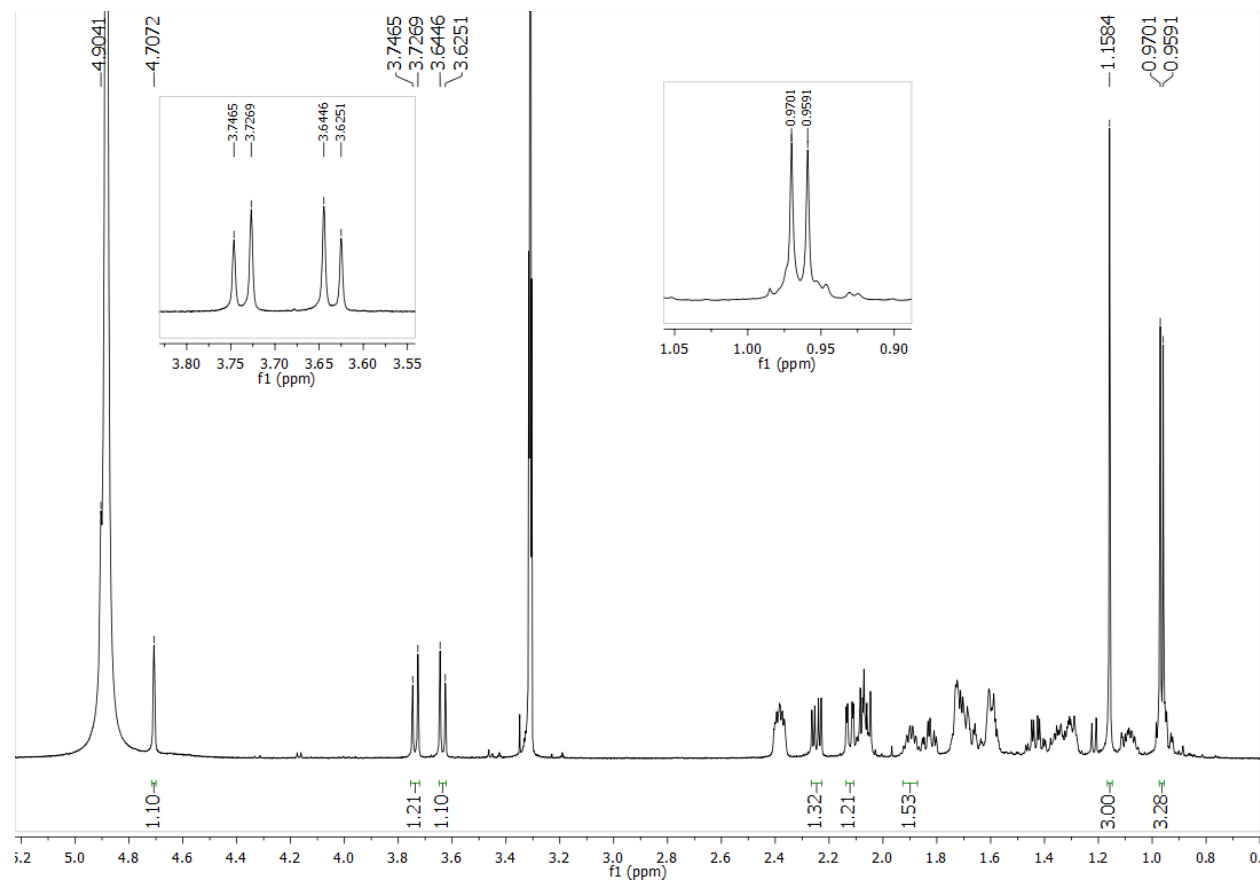
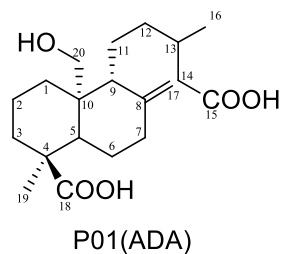


Apêndice 12.3. Mapa de contornos de HMBC do metabólito P10(AP) (CD_3OD , 600 MHz).

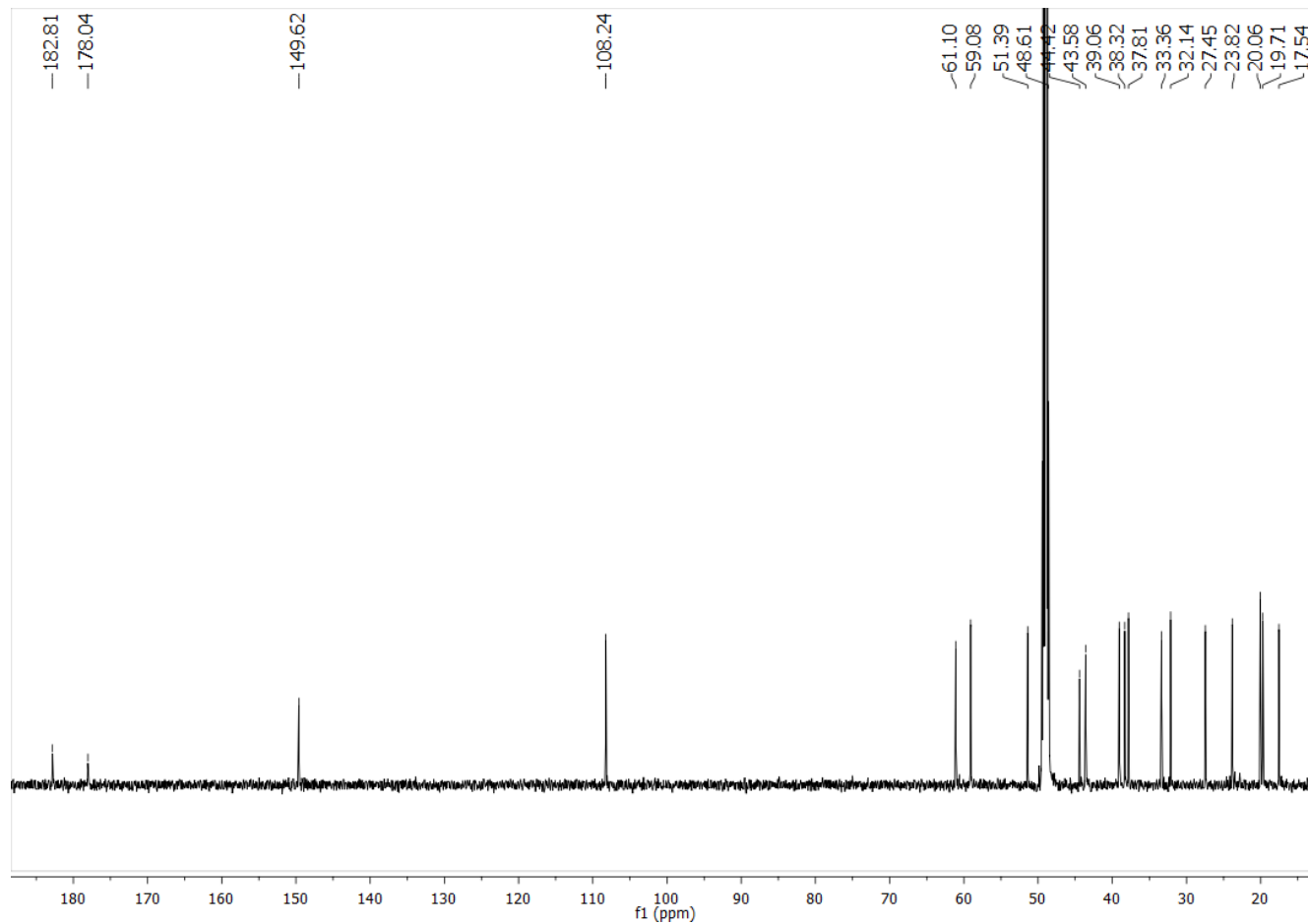
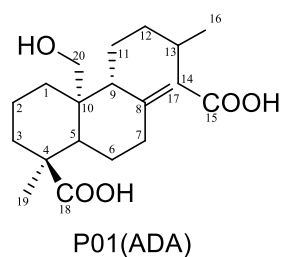


Apêndice 12.4. (A) Espectro de massas em alta resolução no modo negativo obtido por ionização por eletrospray do metabólito P10(AP) e (B) espectro de íons produtos gerado através da dissociação induzida por colisão do íon $[M-H]^-$ $m/z = 331,1908$ (35 kV) - analisador Orbitrap.

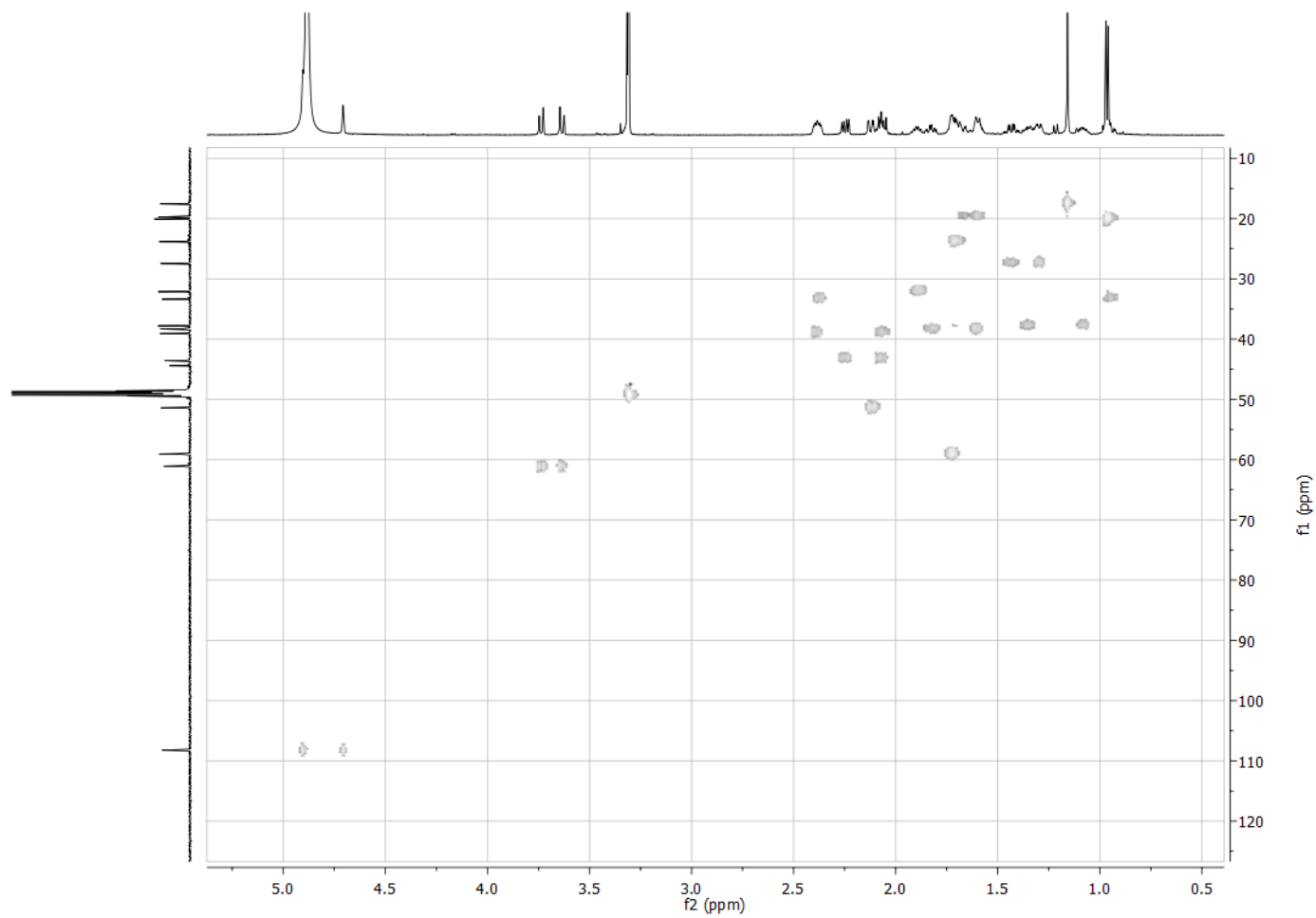
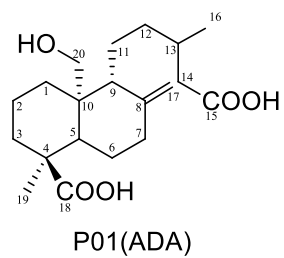
APÊNDICE 13. Espectros do metabólito P01(ADA).



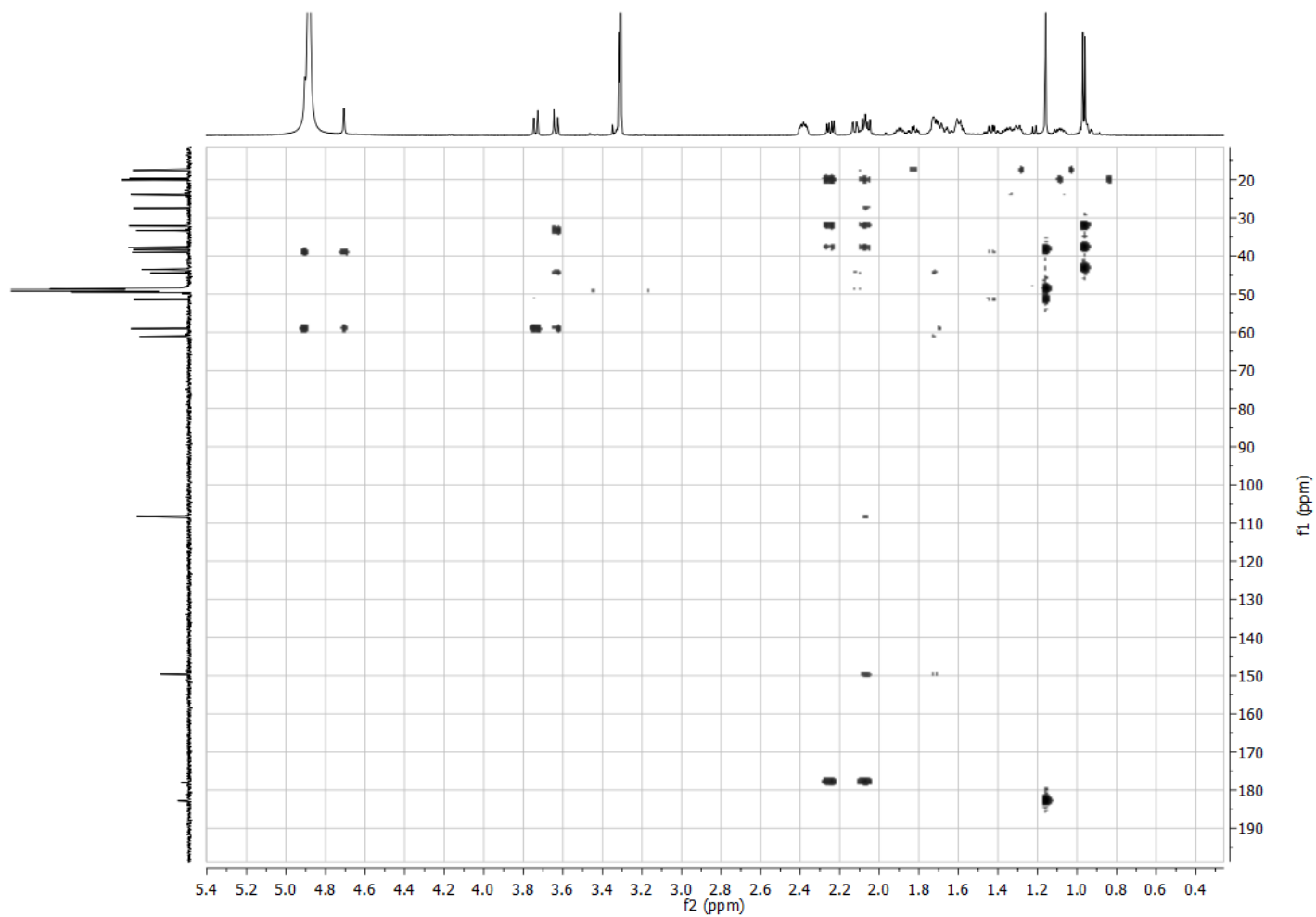
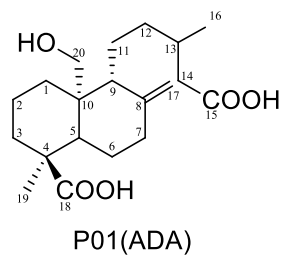
Apêndice 13.1. Espectro de RMN de ^1H do metabólito P01(ADA) (CD_3OD , 600 MHz).



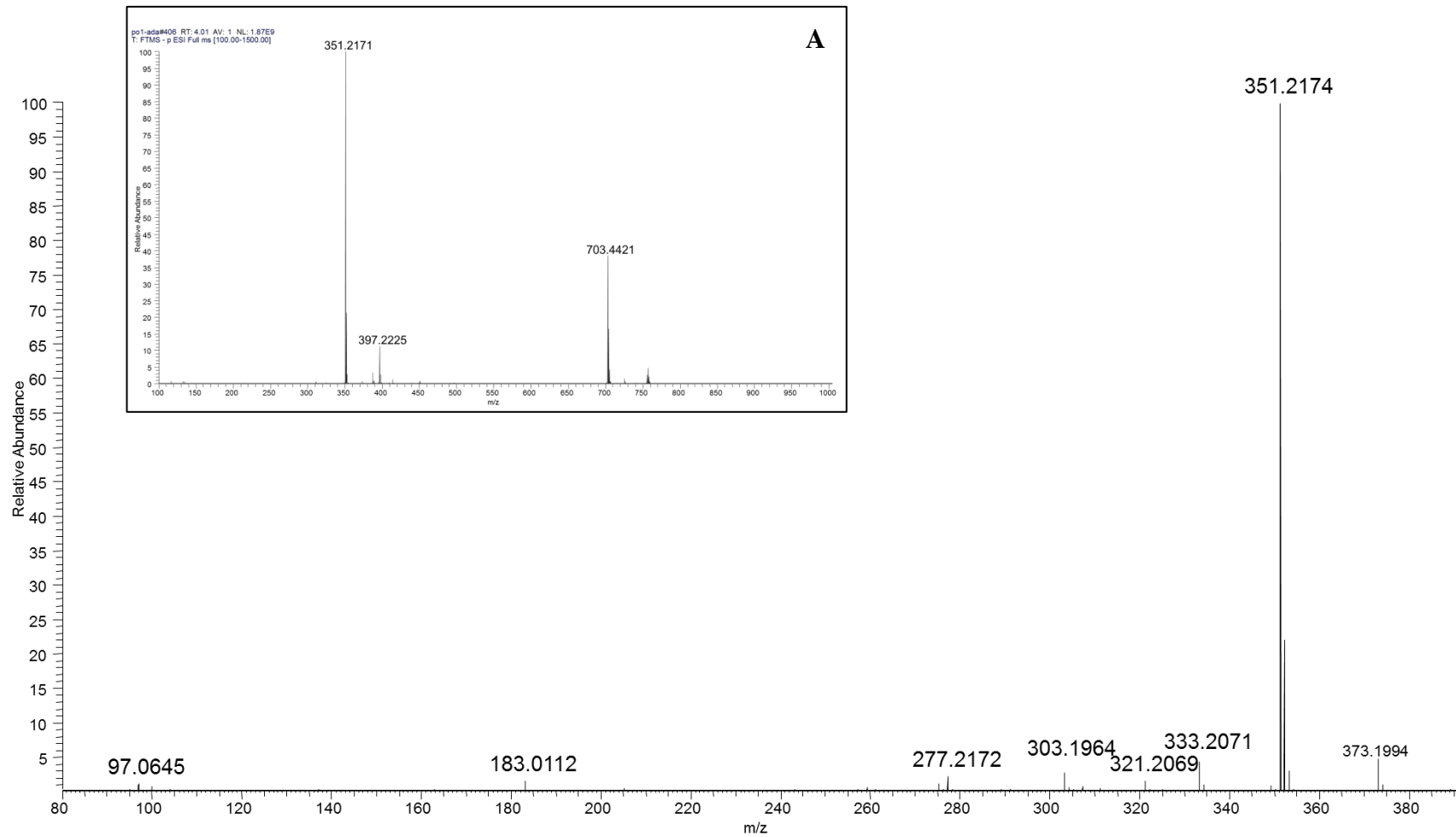
Apêndice 13.2. Espectro de RMN de ^{13}C do metabólito P01(ADA) (CD_3OD , 151 MHz).



Apêndice 13.3. Mapa de contornos de HMQC do metabólito P01(ADA) (CD₃OD, 600 MHz).

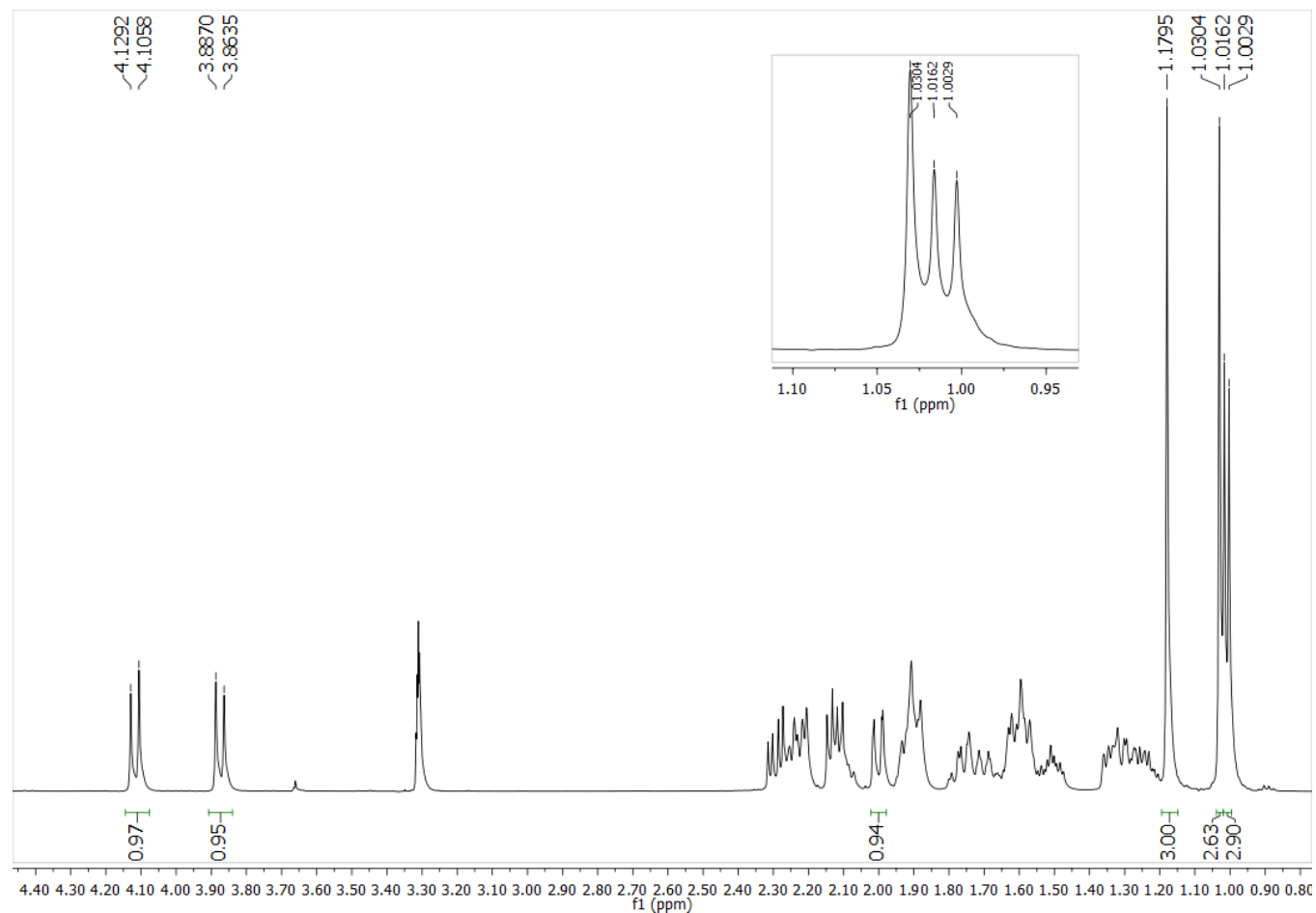
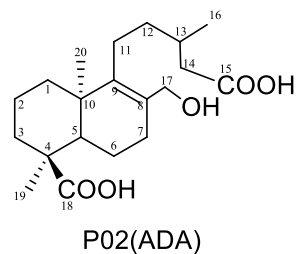


Apêndice 13.4. Mapa de contornos de HMBC do metabólito P01(ADA) (CD₃OD, 600 MHz).

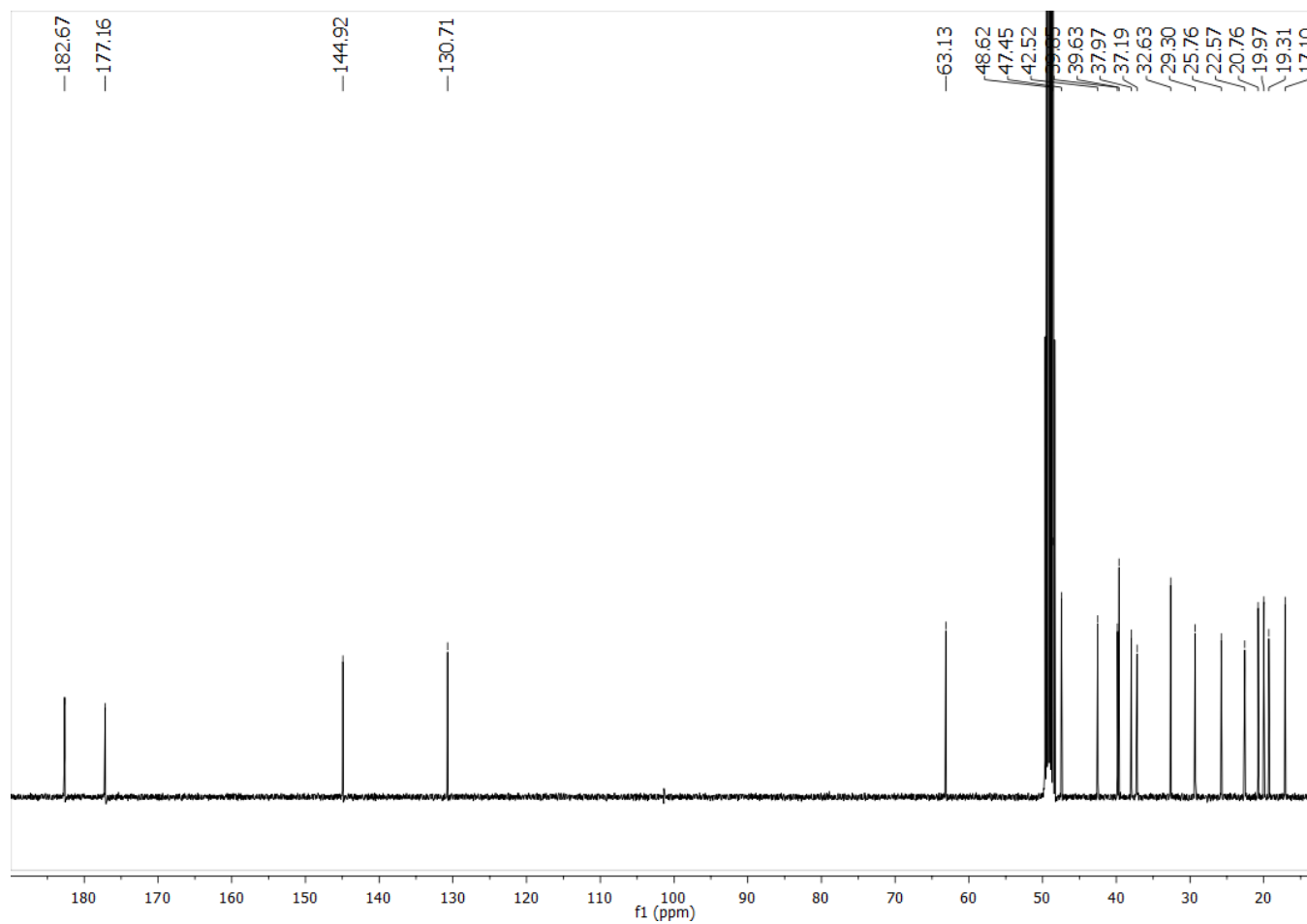
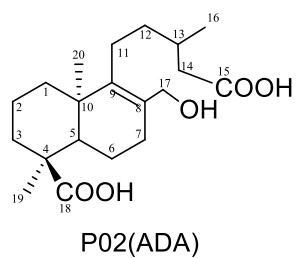


Apêndice 13.5. (A) Espectro de massas em alta resolução no modo negativo obtido por ionização por eletrospray do metabólito P01(ADA) e (B) espectro de íons produtos gerado através da dissociação induzida por colisão do íon $[M-H]^-$ $m/z = 351,2171$ (45 kV) - analisador Orbitrap.

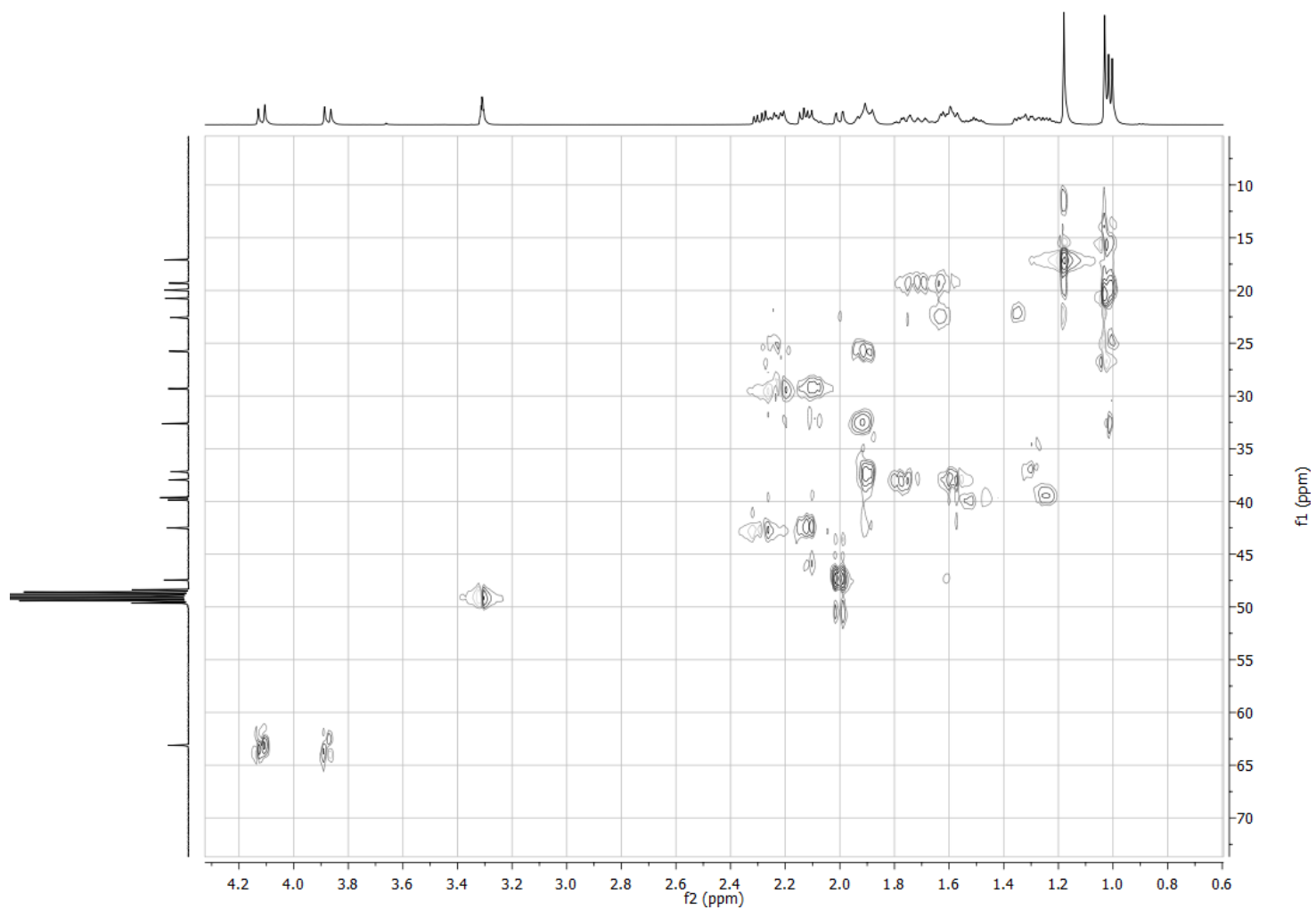
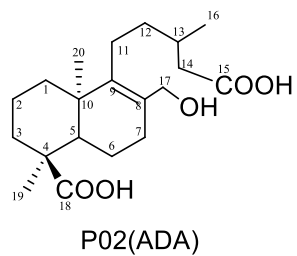
APÊNDICE 14. Espectros do metabólito P02(ADA).



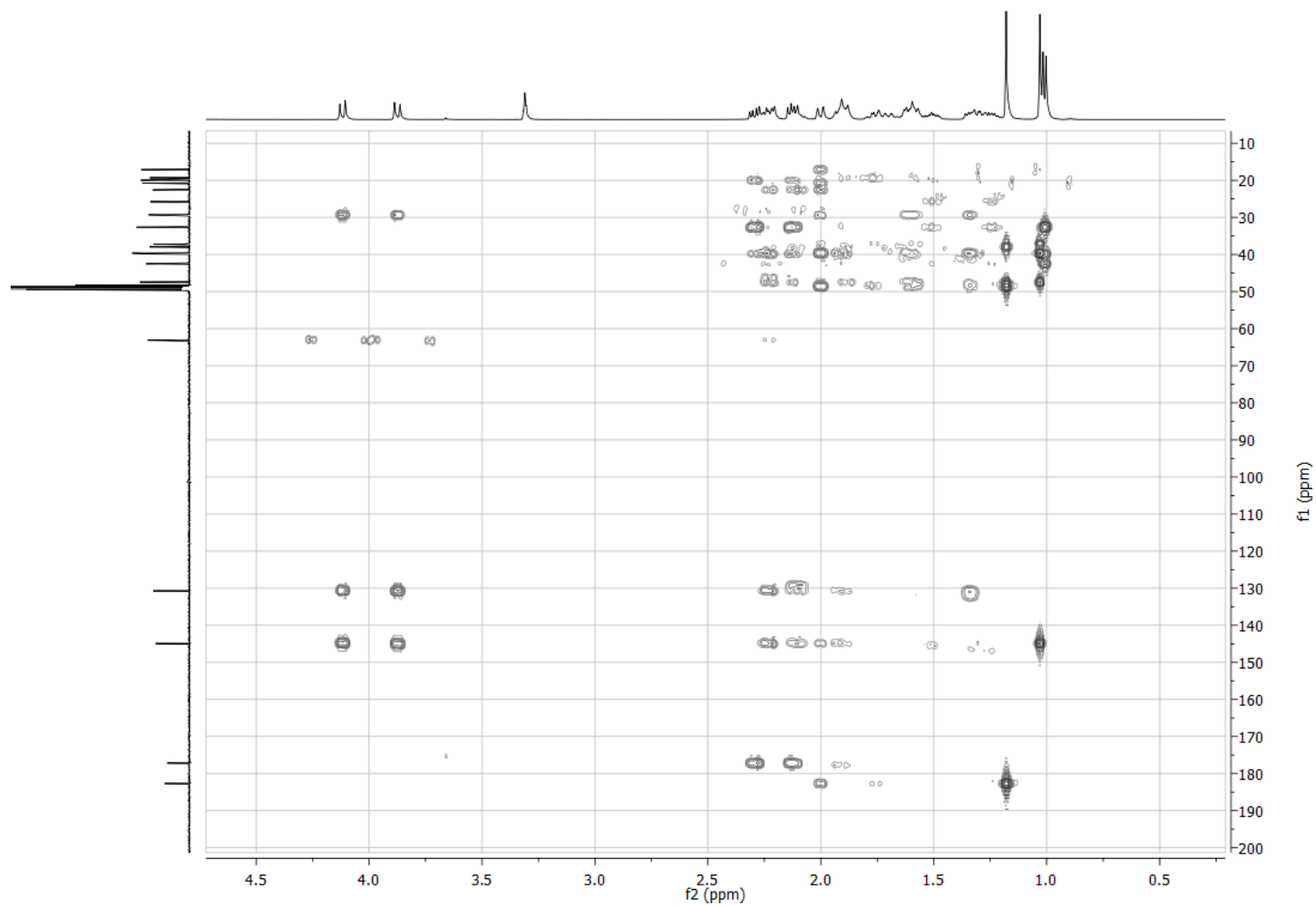
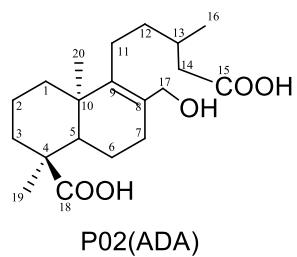
Apêndice 14.1. Espectro de RMN de ^1H do metabólito P02(ADA) (CD_3OD , 500 MHz).



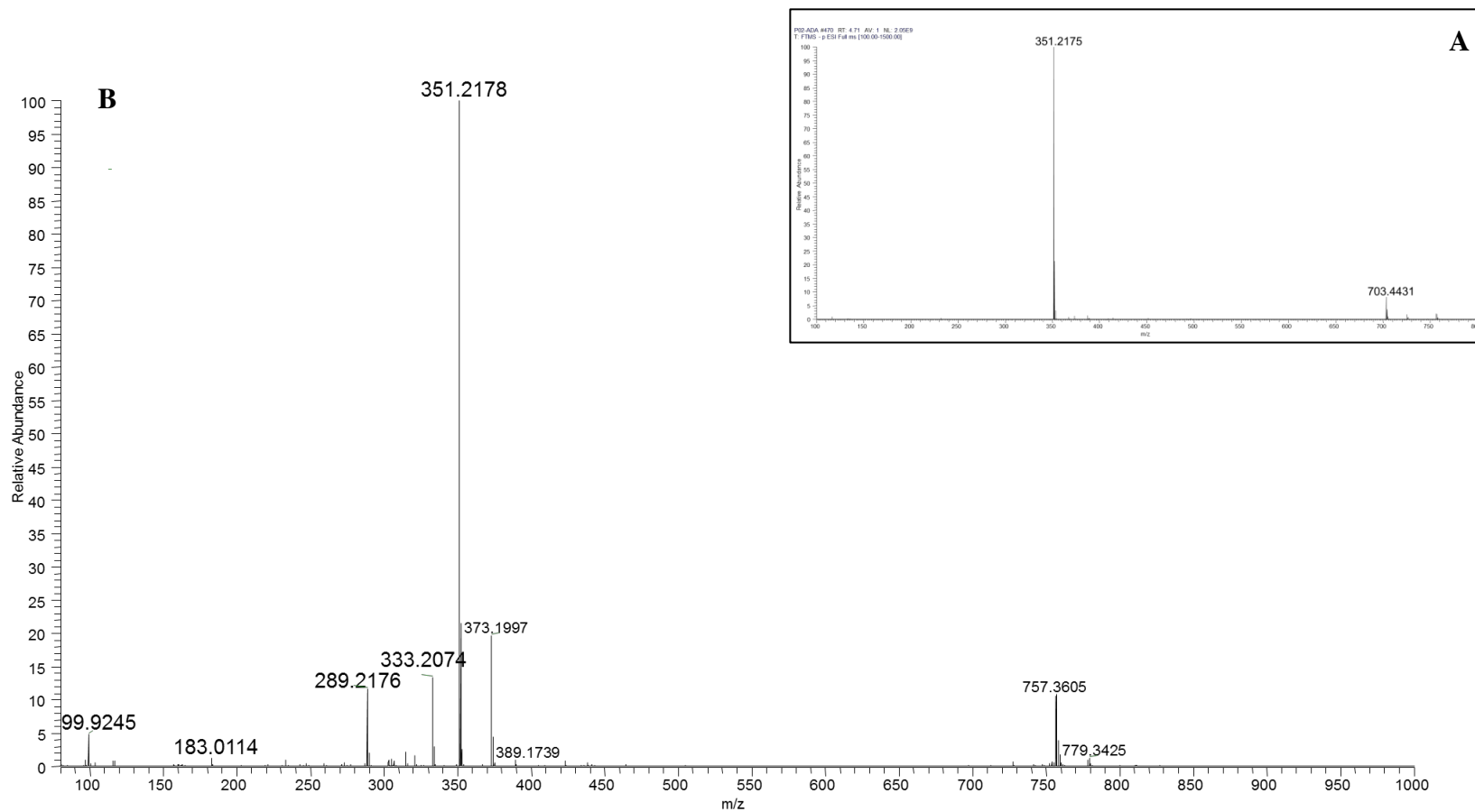
Apêndice 14.2. Espectro de RMN de ^{13}C do metabólito P02(ADA) (CD_3OD , 125 MHz).



Apêndice 14.3. Mapa de contornos de HMQC do metabólito P02(ADA) (CD₃OD, 500 MHz).

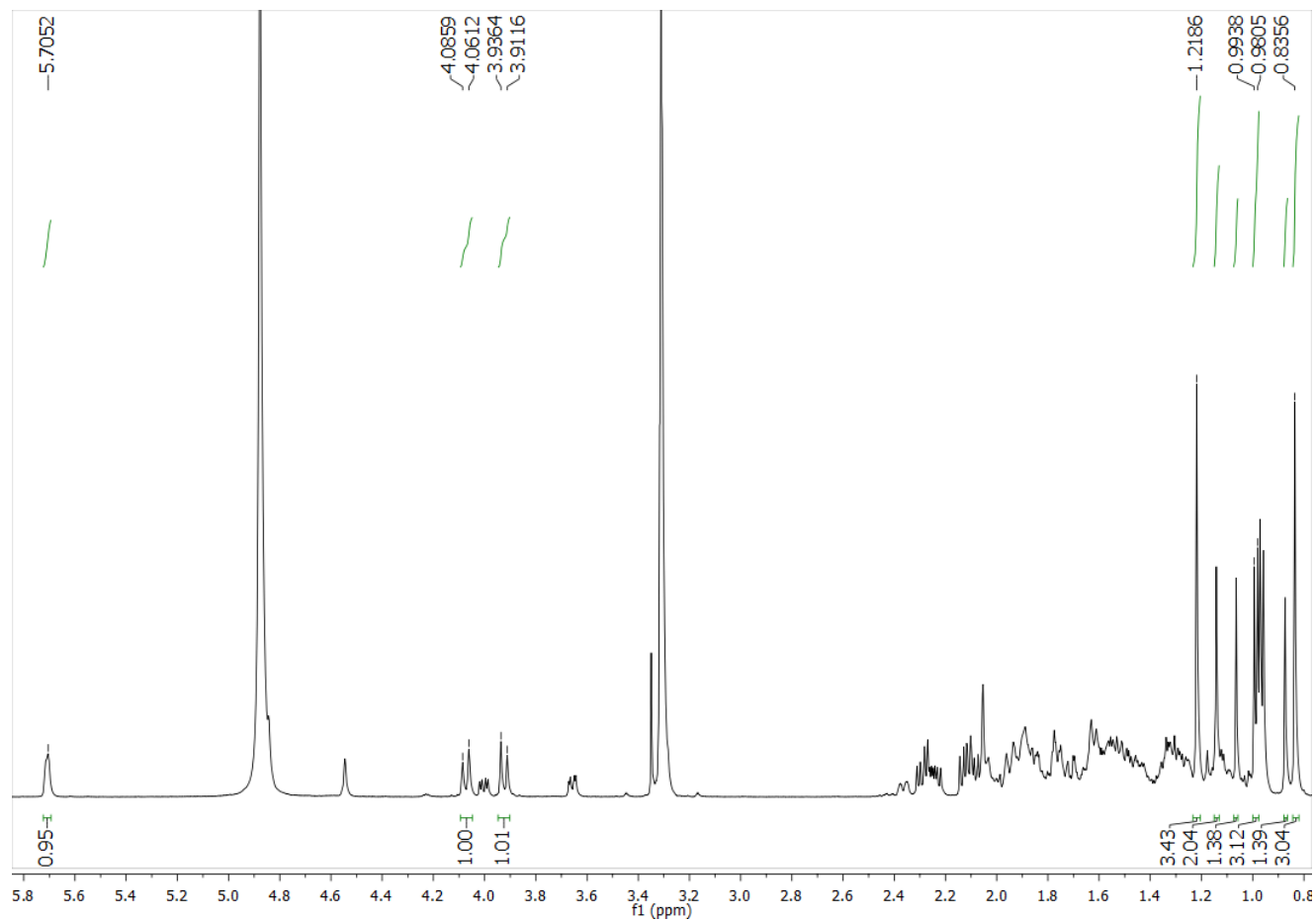
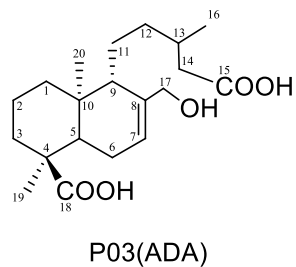


Apêndice 14.4. Mapa de contornos de HMBC do metabólito P02(ADA) (CD_3OD , 500 MHz).

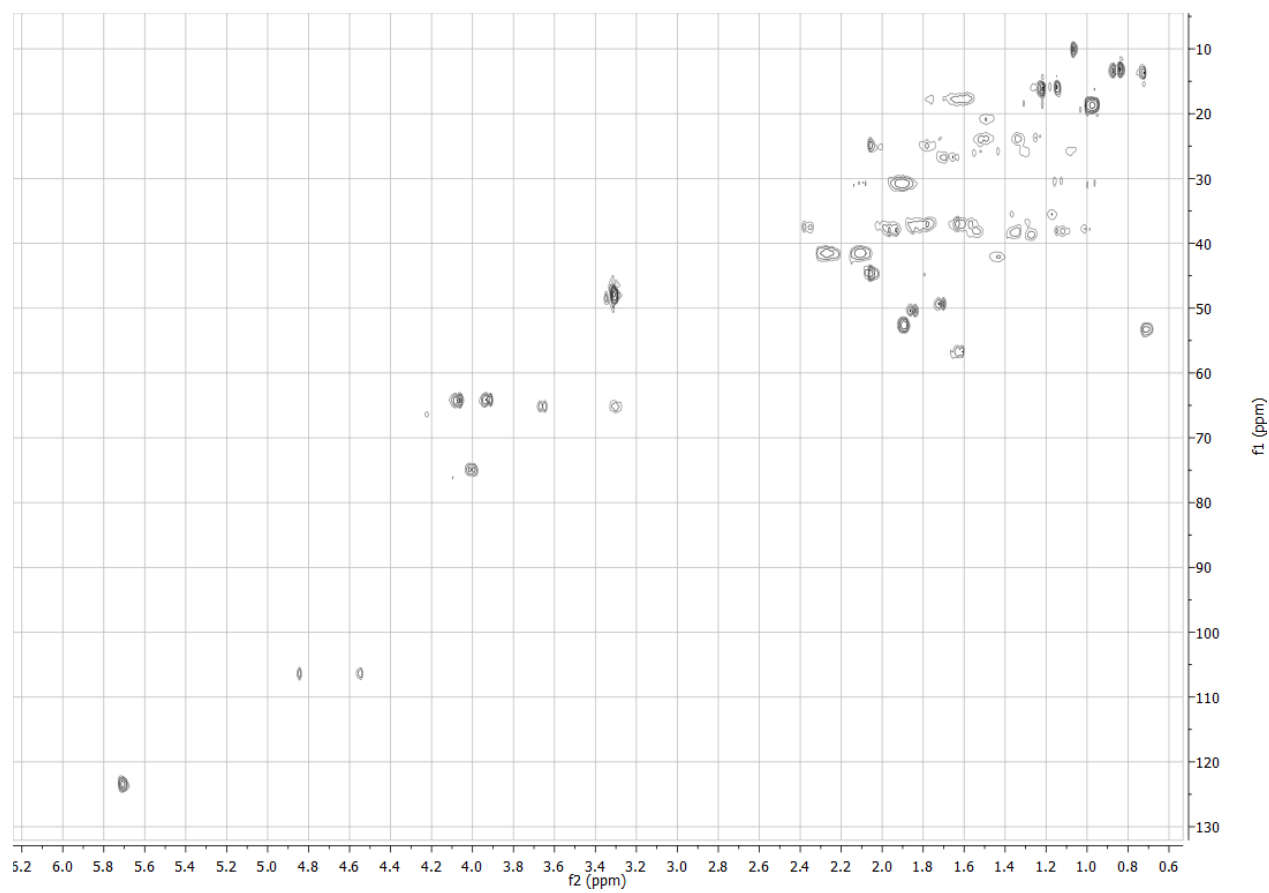
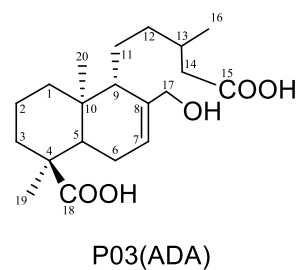


Apêndice 14.5. (A) Espectro de massas em alta resolução no modo negativo obtido por ionização por eletrospray do metabólito P02(ADA) e (B) espectro de íons produtos gerado através da dissociação induzida por colisão do íon $[M-H]^-$ $m/z = 351,2175$ (45 kV) - analisador Orbitrap.

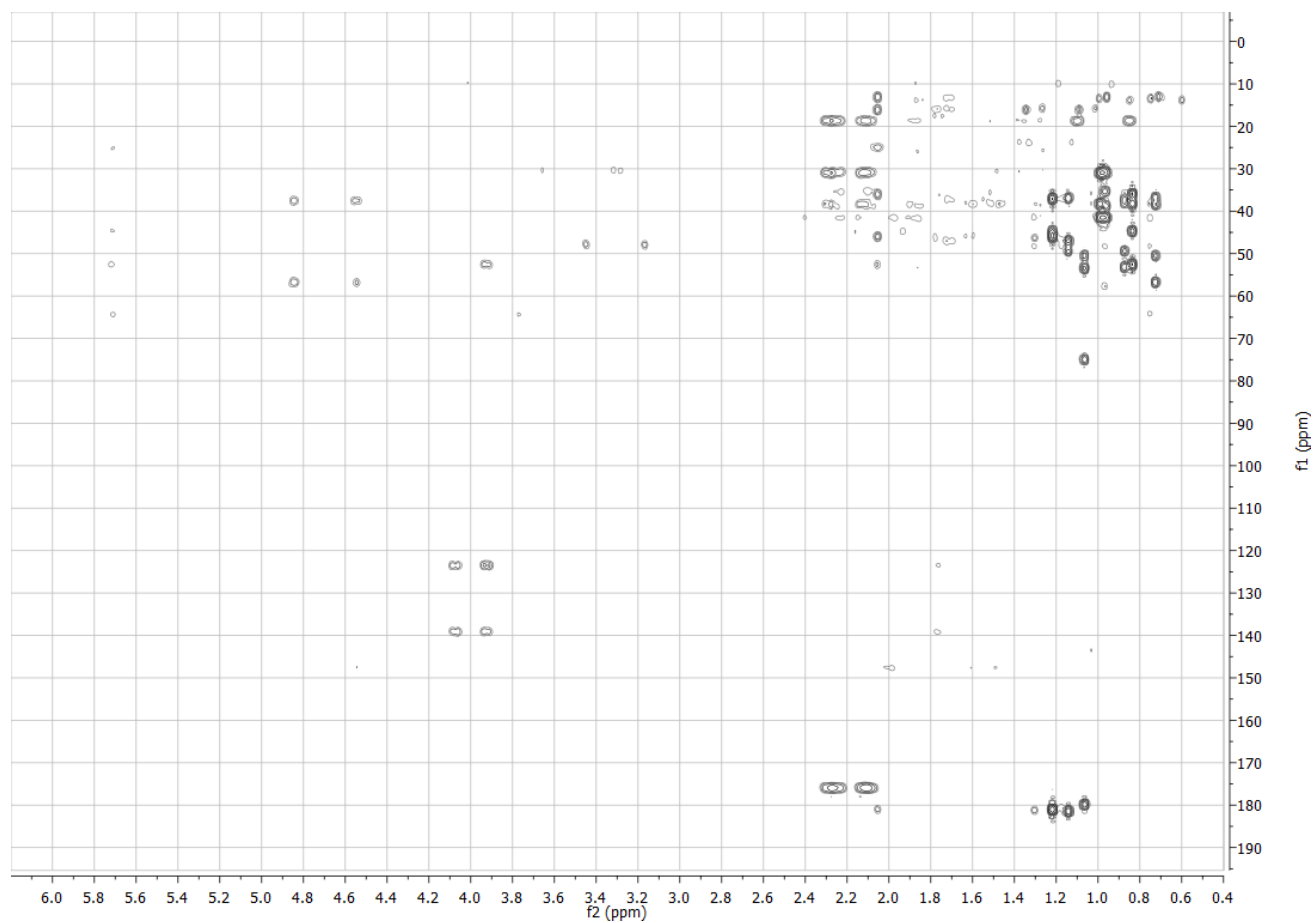
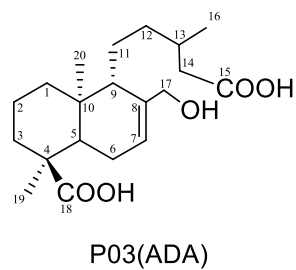
APÊNDICE 15. Espectros do metabólito P03(ADA).



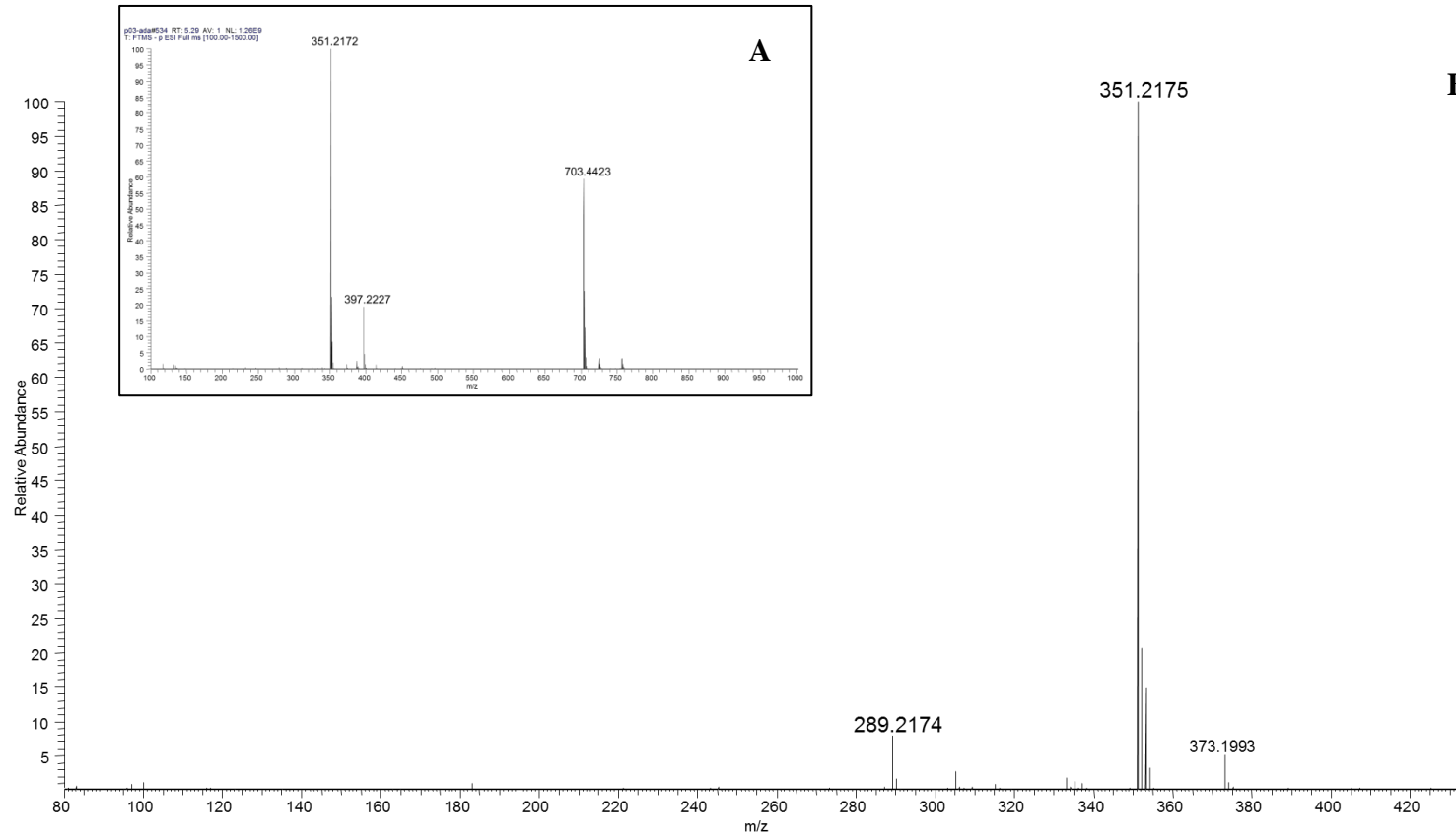
Apêndice 15.1. Espectro de RMN de ^1H do metabólito P03(ADA) (CD_3OD , 500 MHz).



Apêndice 15.2. Mapa de contornos de HMQC do metabólito P03(ADA) (CD₃OD, 500 MHz).

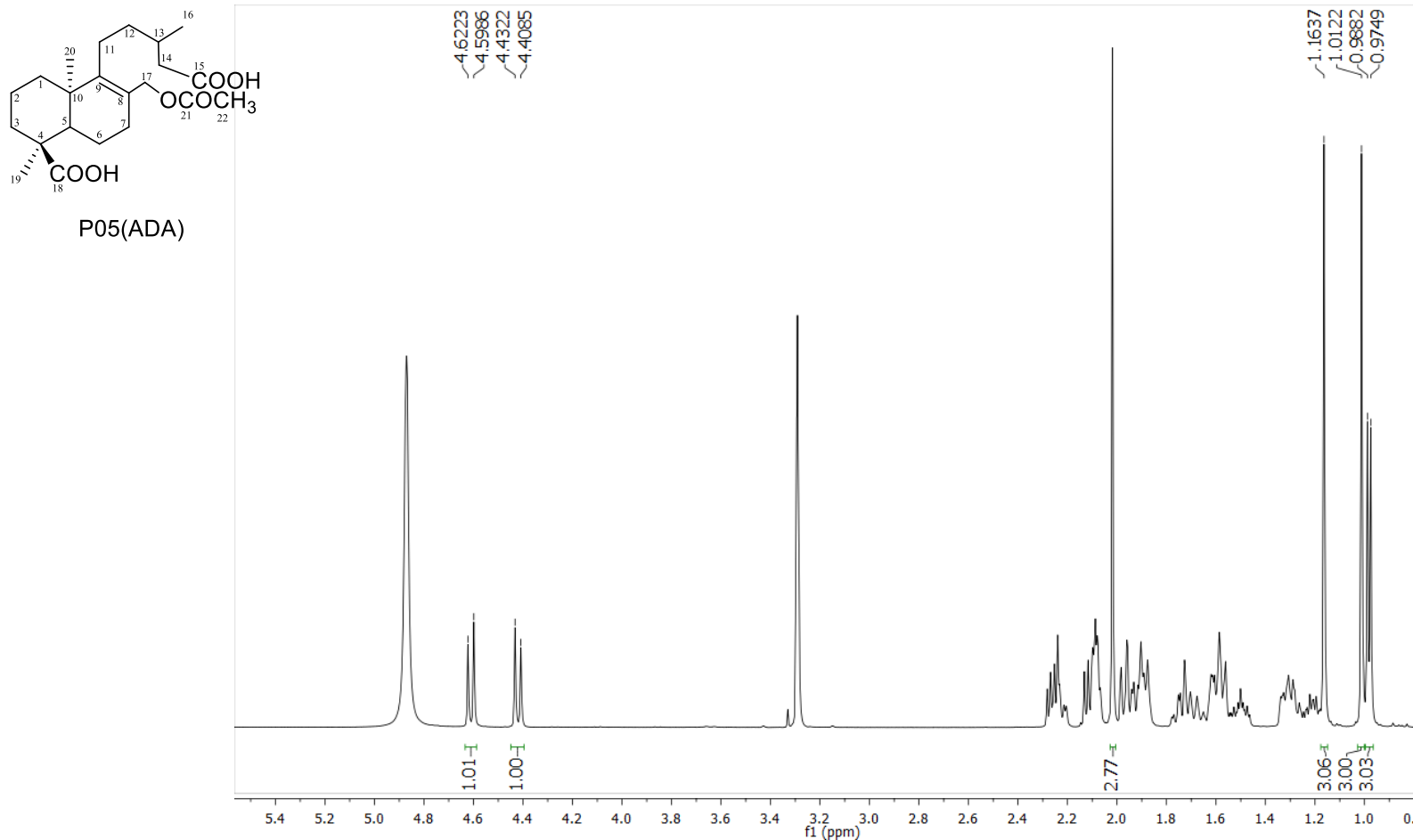


Apêndice 15.3. Mapa de contornos de HMBC do metabólito P03(ADA) (CD₃OD, 500 MHz).

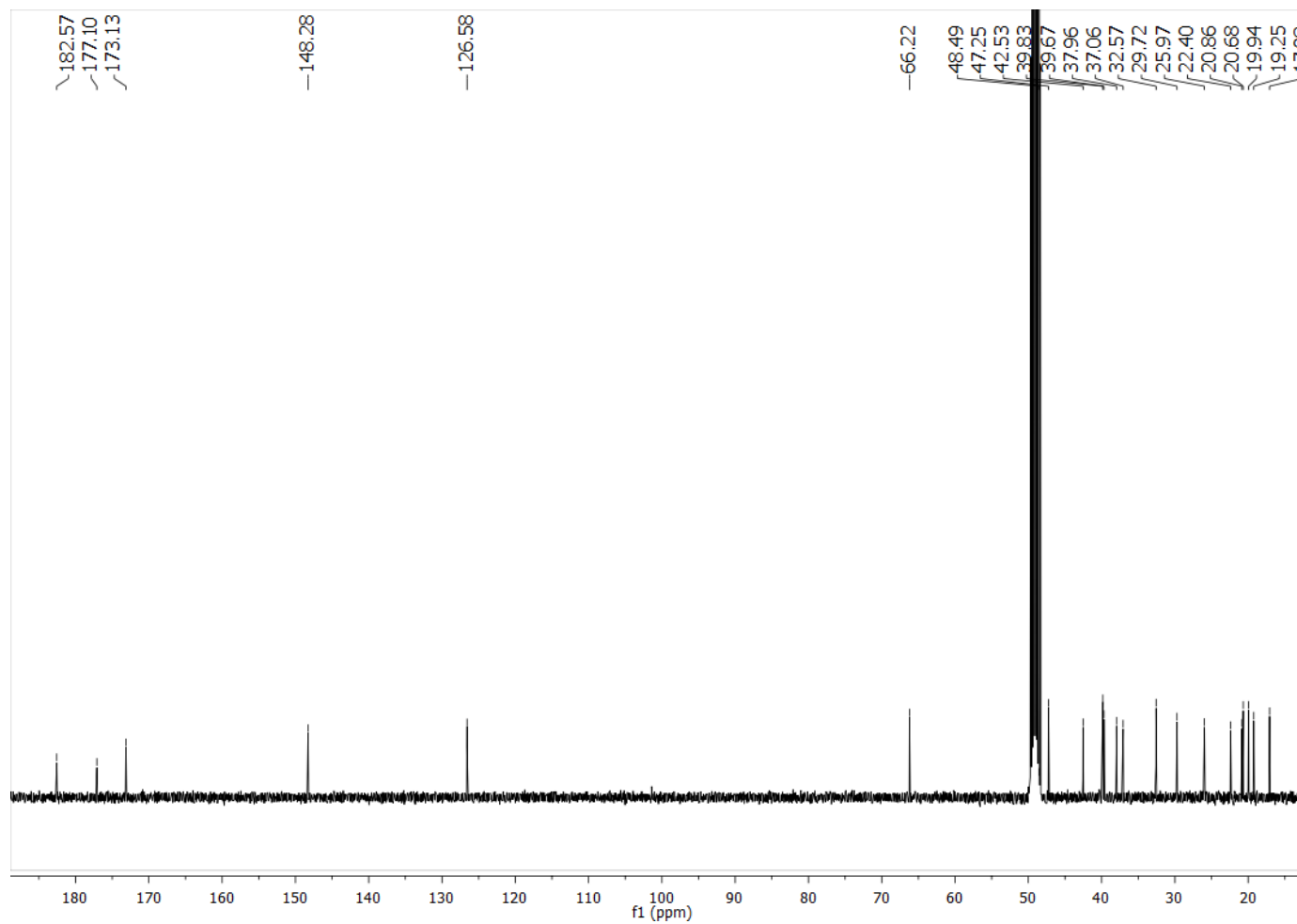
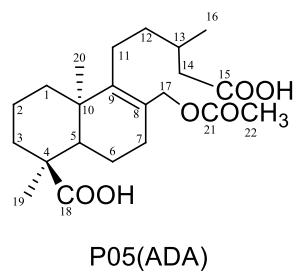


Apêndice 15.4. (A) Espectro de massas em alta resolução no modo negativo obtido por ionização por eletrospray do metabólito P03(ADA) e (B) espectro de íons produtos gerado através da dissociação induzida por colisão do íon $[M-H]^-$ $m/z = 351,2172$ (45 kV) - analisador Orbitrap.

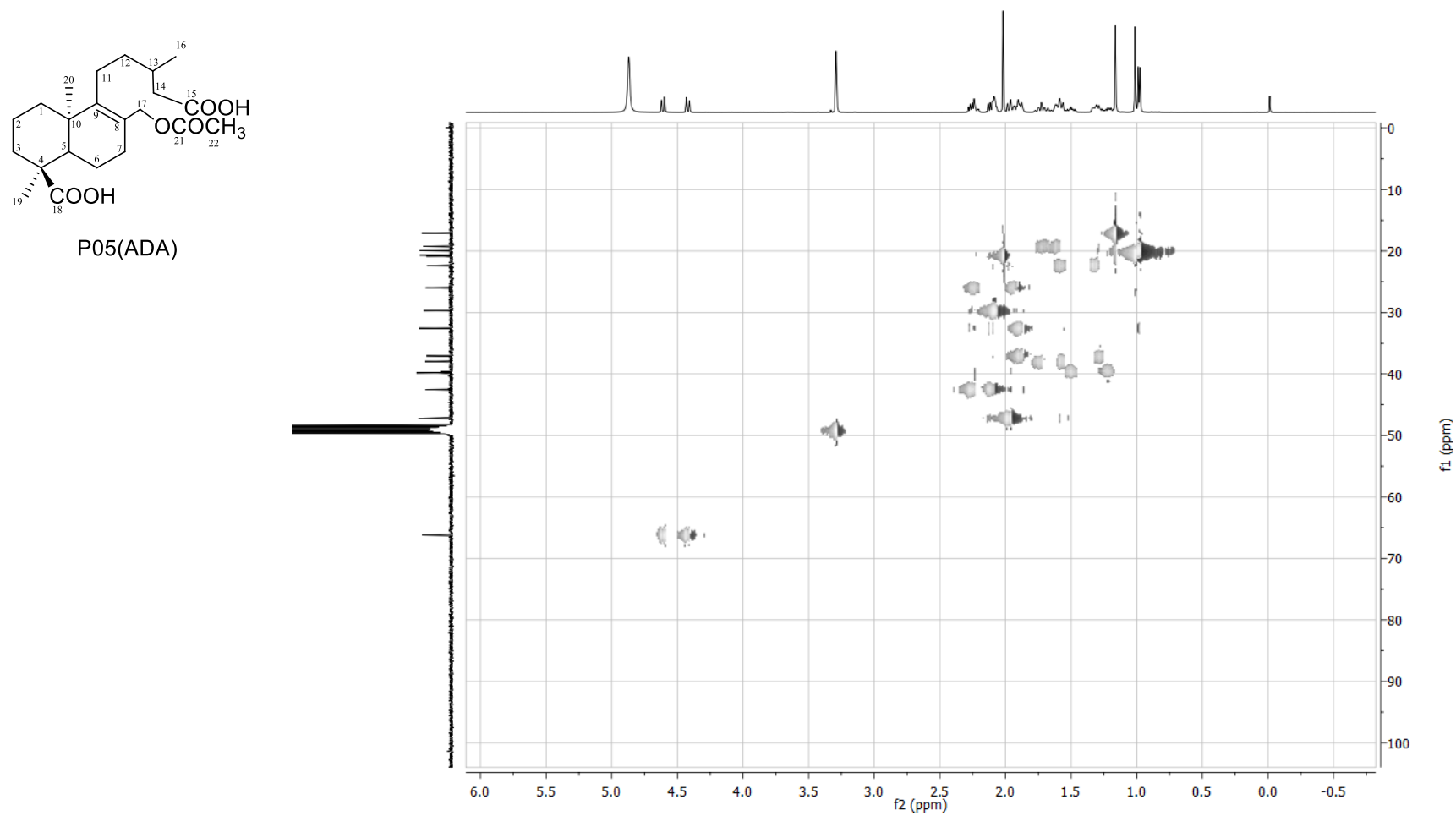
APÊNDICE 16. Espectros do metabólito P05(ADA).



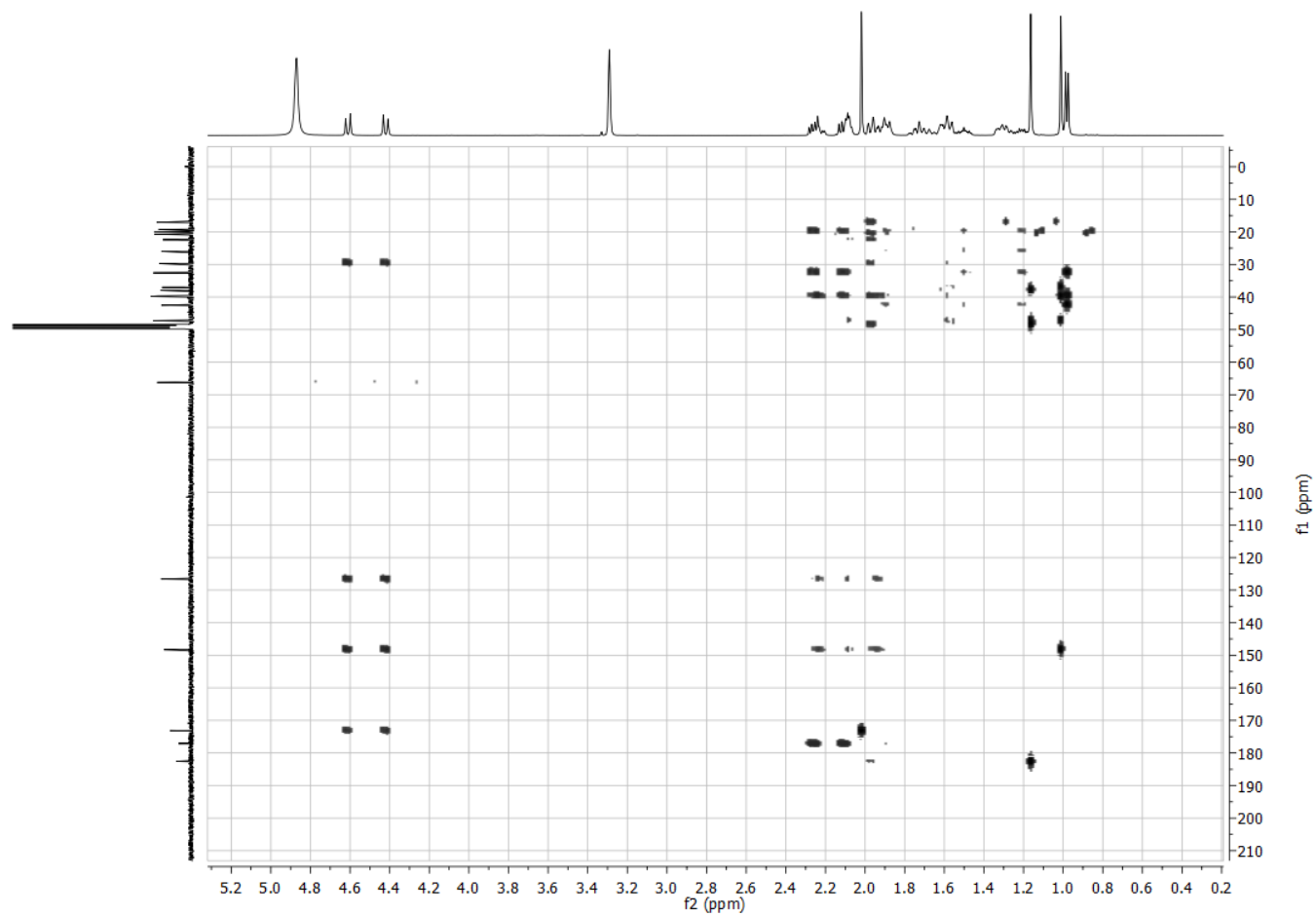
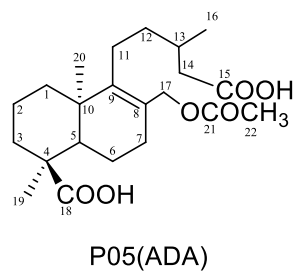
Apêndice 16.1. Espectro de RMN de ¹H do metabólito P05(ADA) (CD₃OD, 500 MHz).



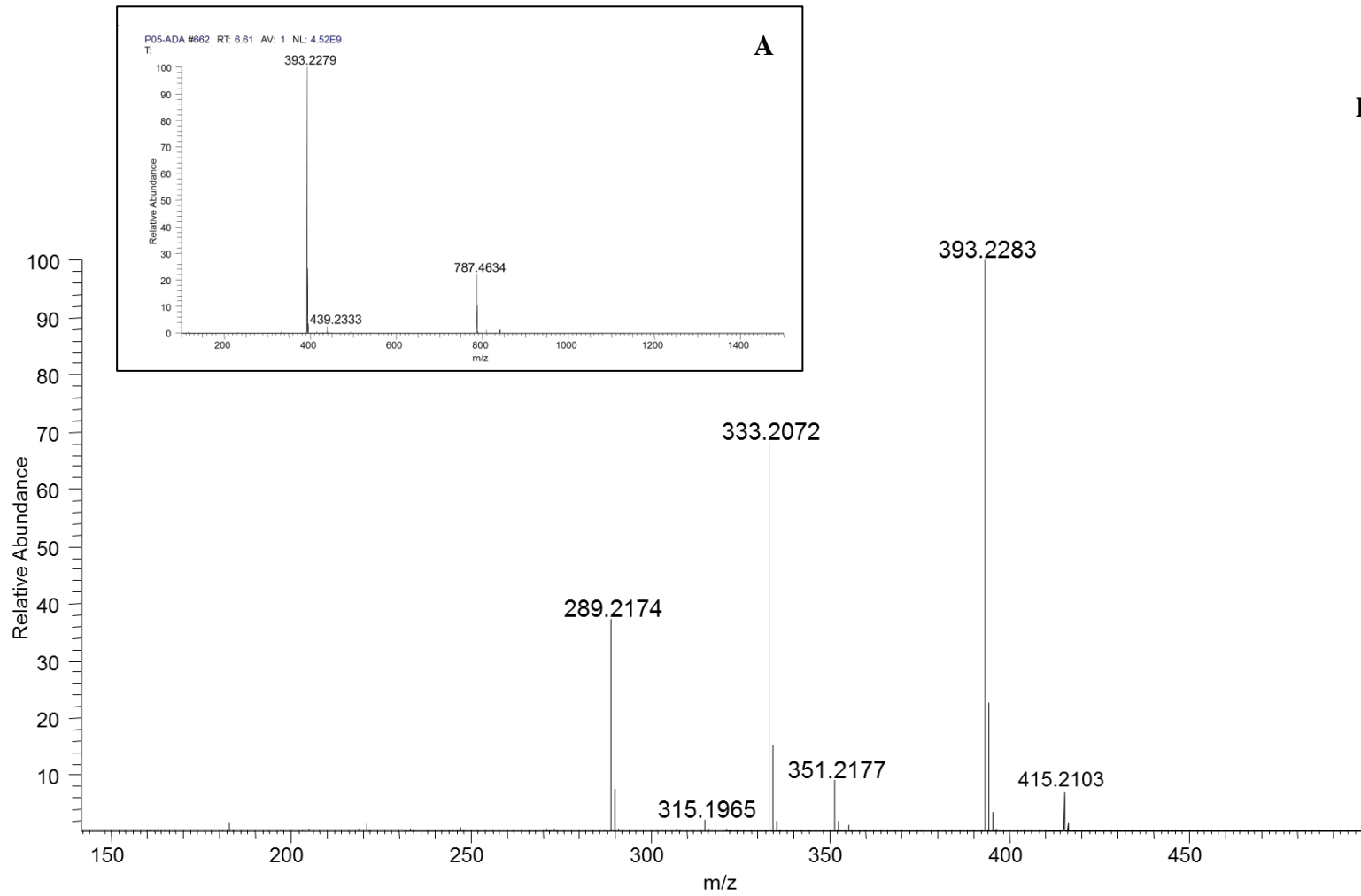
Apêndice 16.2. Espectro de RMN de ^{13}C do metabólito P05(ADA) (CD_3OD , 125 MHz).



Apêndice 16.3. Mapa de contornos de HMQC do metabólito P05(ADA) (CD₃OD, 500 MHz).

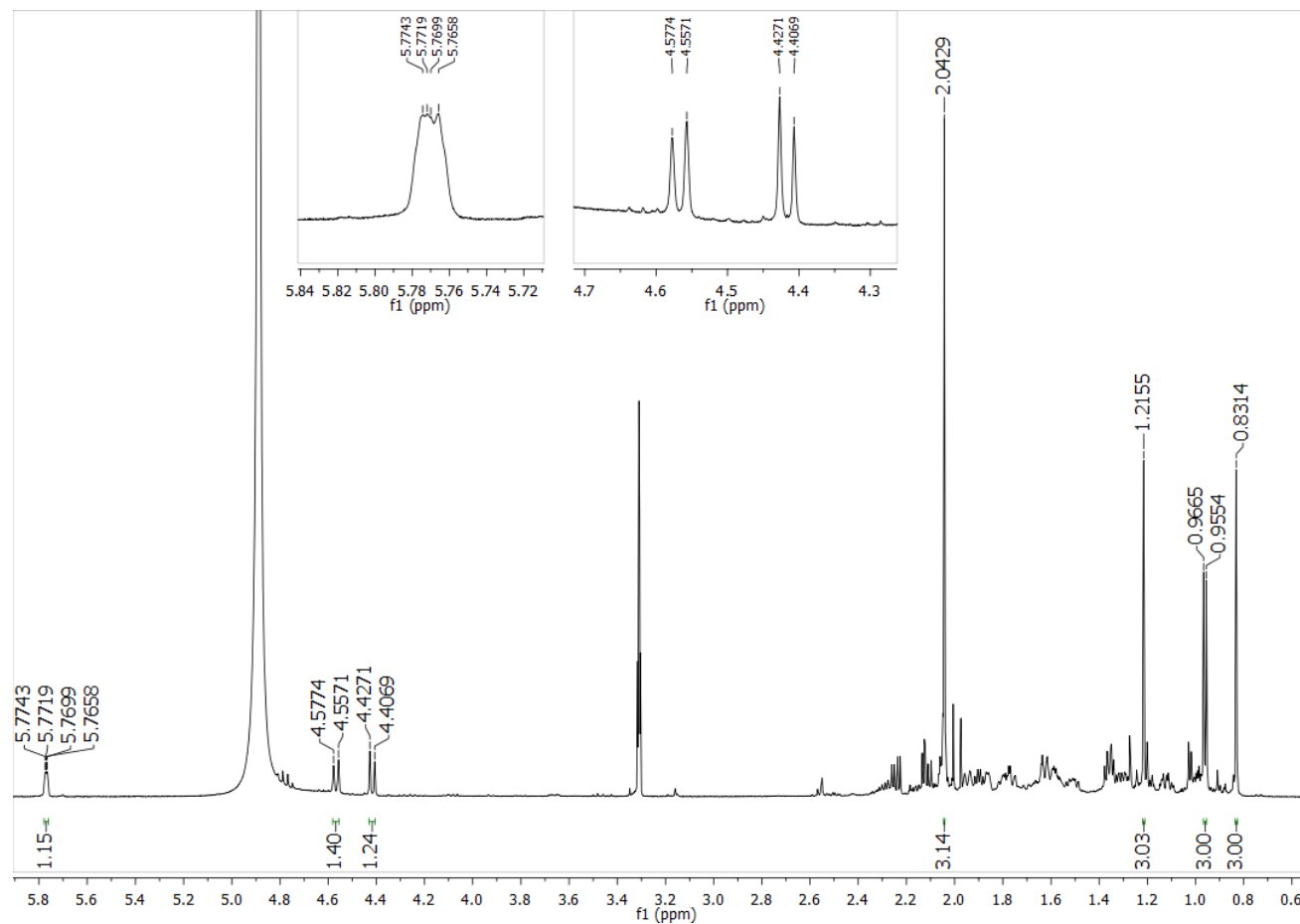
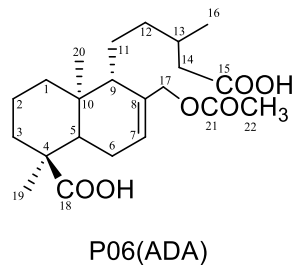


Apêndice 16.4. Mapa de contornos de HMBC do metabólito P05(ADA) (CD₃OD, 500 MHz).

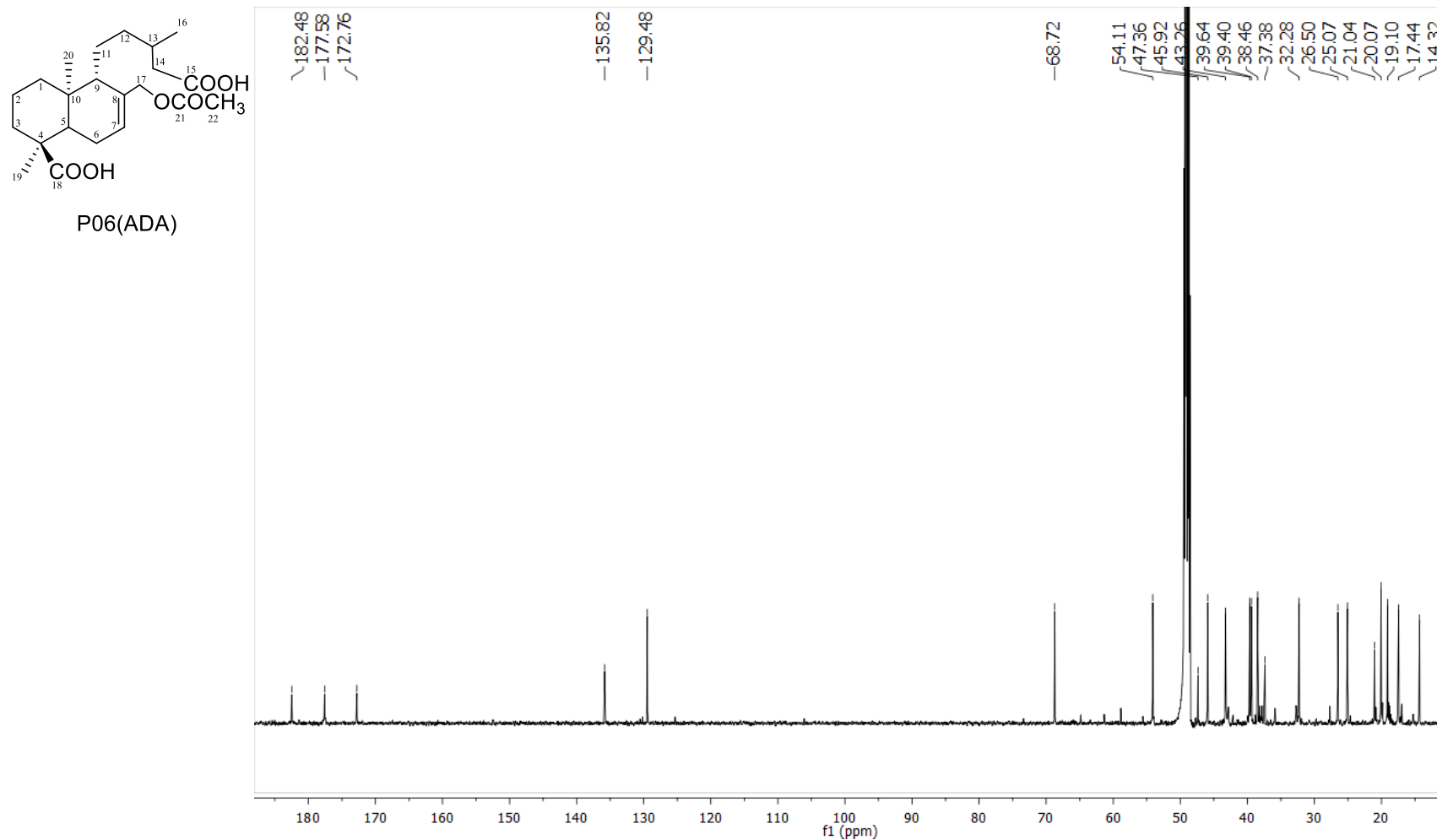


Apêndice 16.5. (A) Espectro de massas em alta resolução no modo negativo obtido por ionização por eletrospray do metabólito P05(ADA) e (B) espectro de íons produtos gerado através da dissociação induzida por colisão do íon $[M-H]^-$ $m/z = 393,2279$ (45 kV) - analisador Orbitrap.

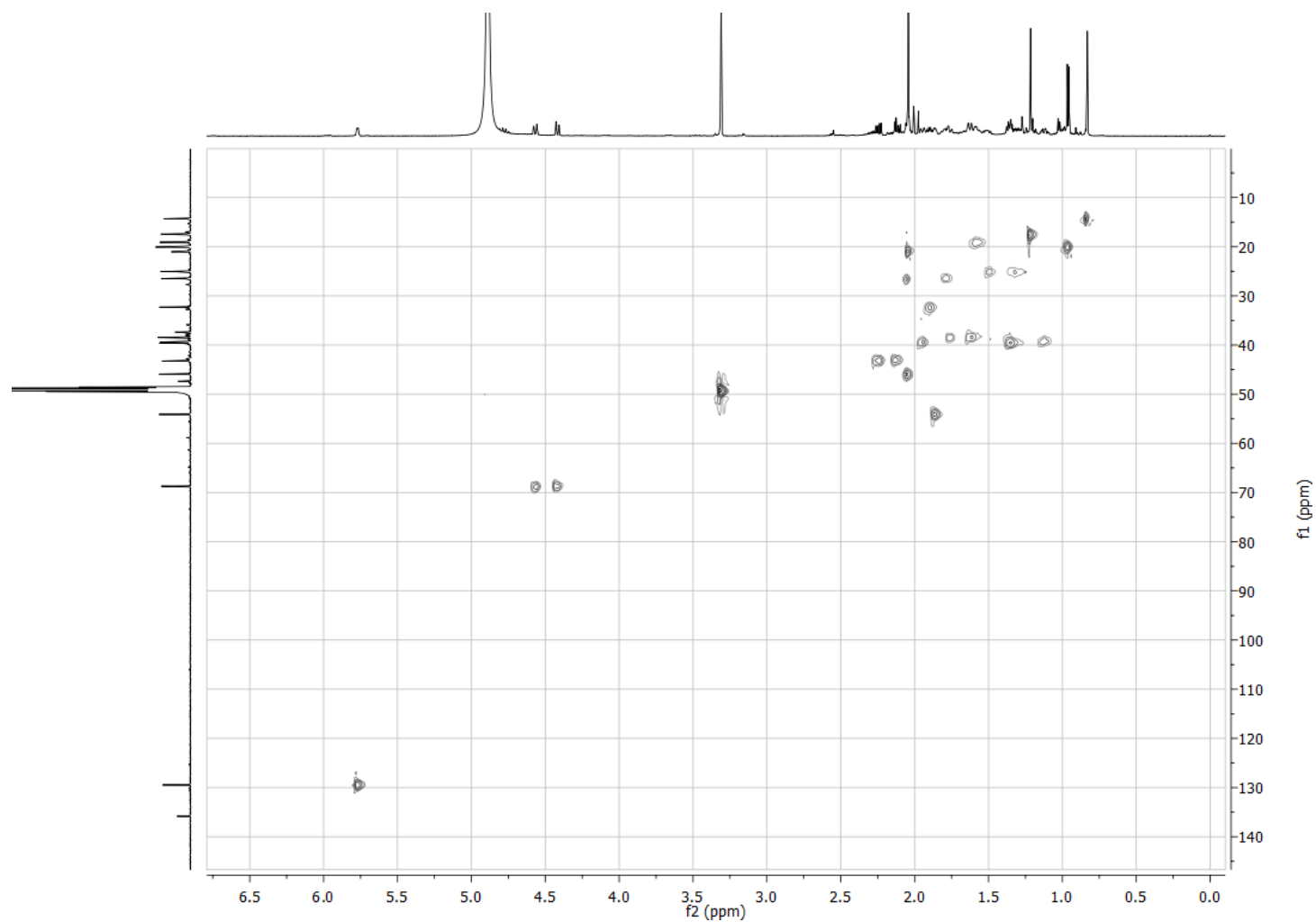
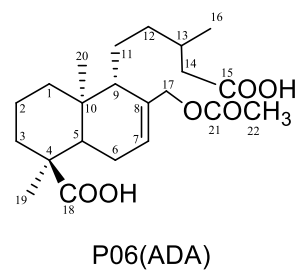
APÊNDICE 17. Espectros do metabólito P06(ADA).



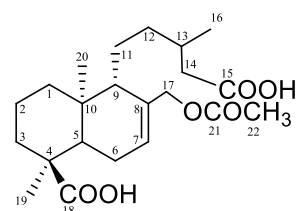
Apêndice 17.1. Espectro de RMN de ^1H do metabólito P06(ADA) (CD_3OD , 600 MHz).



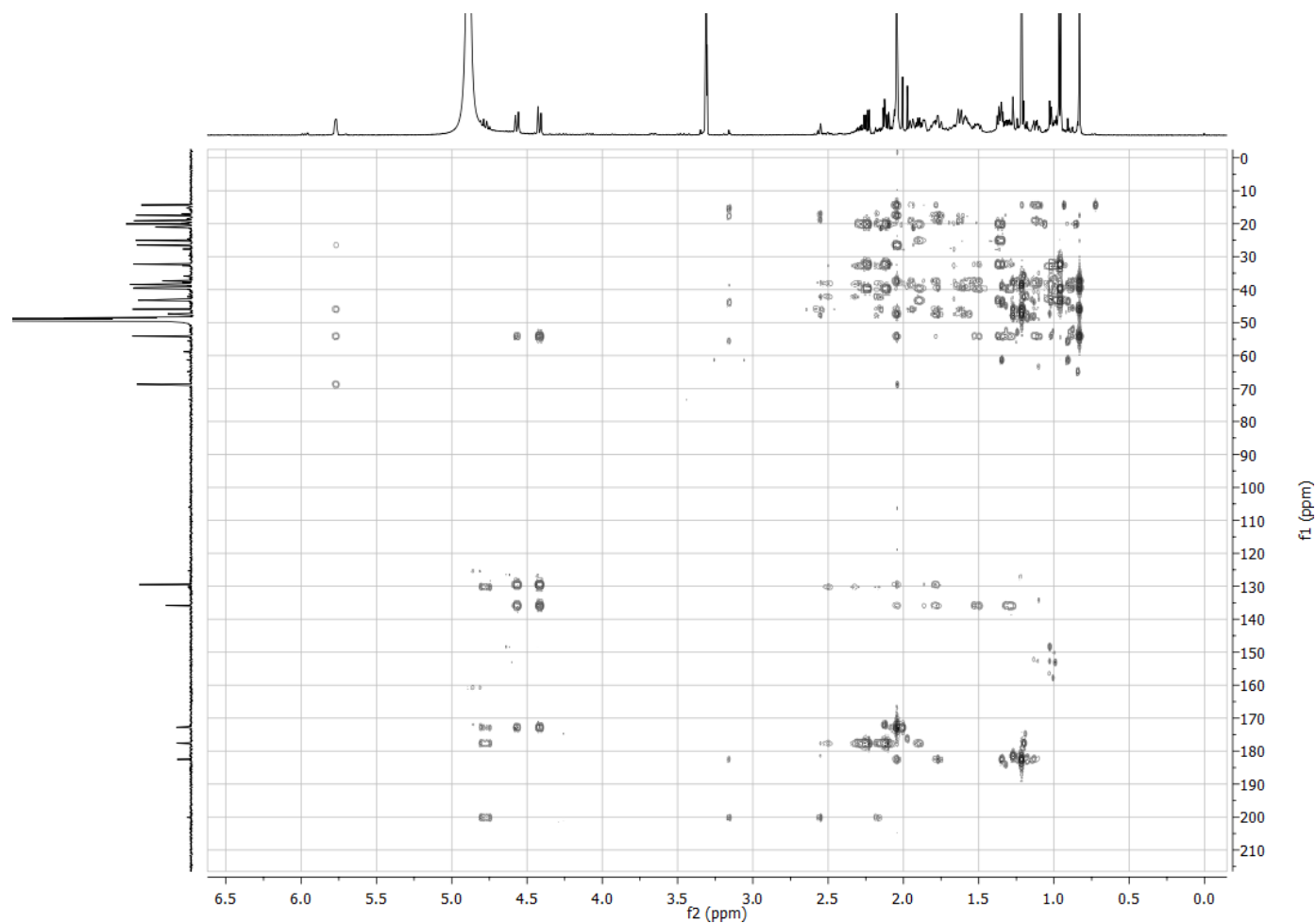
Apêndice 17.2. Espectro de RMN de ¹³C do metabólito P06(ADA) (CD₃OD, 151 MHz).



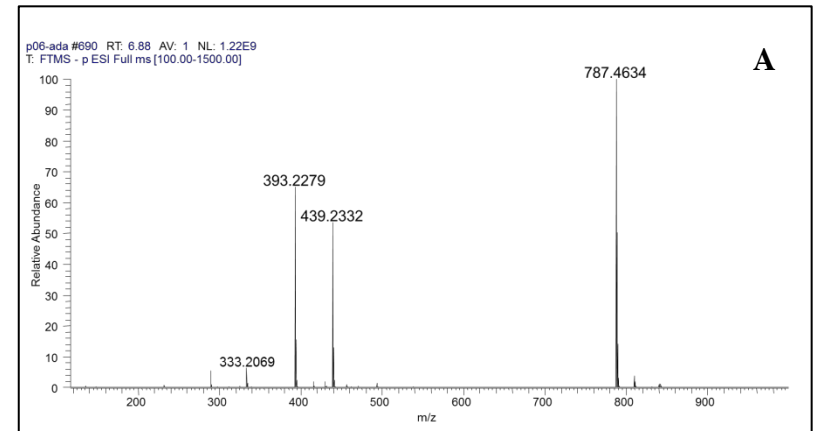
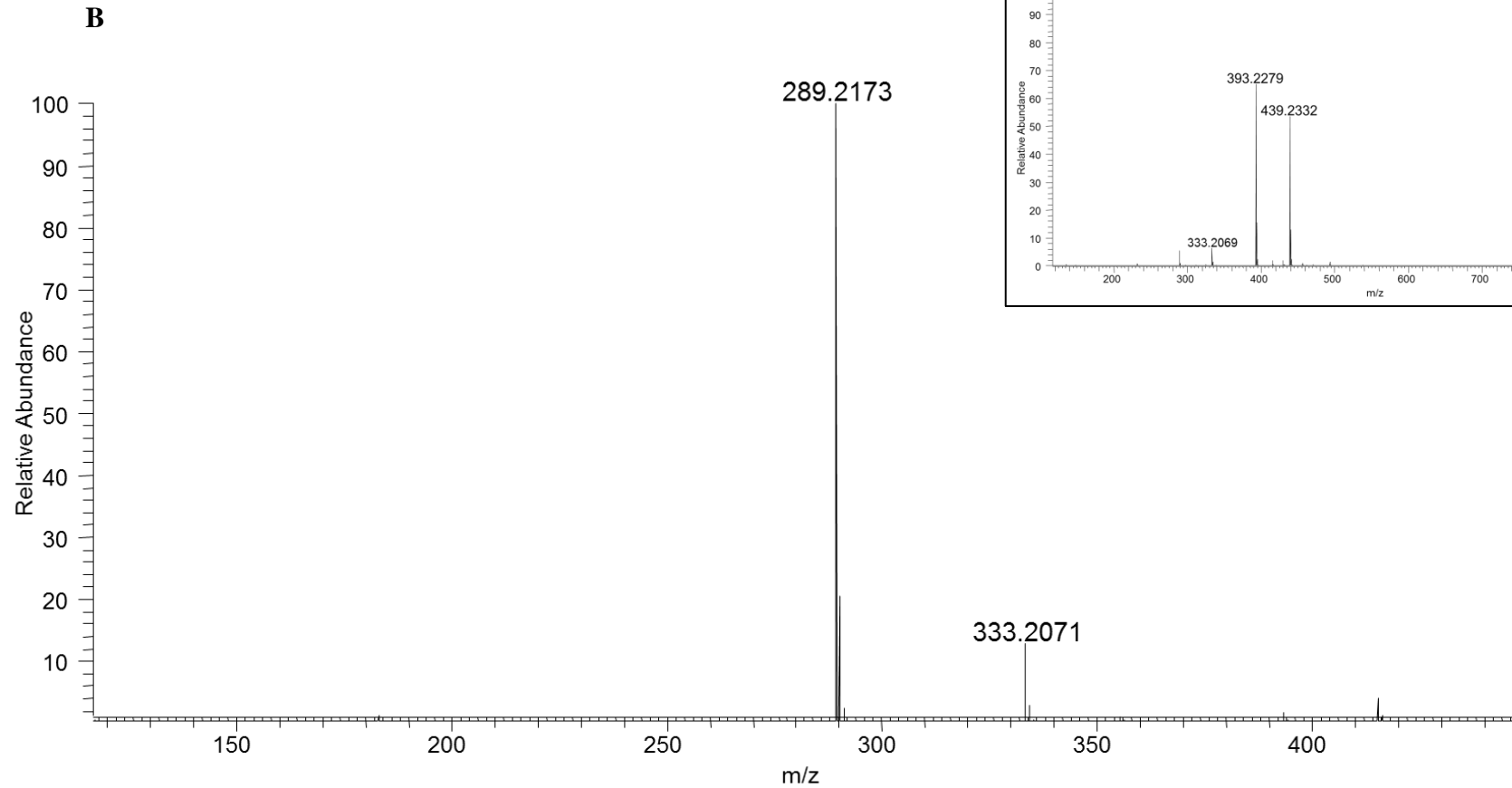
Apêndice 17.3. Mapa de contornos de HMQC do metabólito P06(ADA) (CD_3OD , 600 MHz).



P06(ADA)

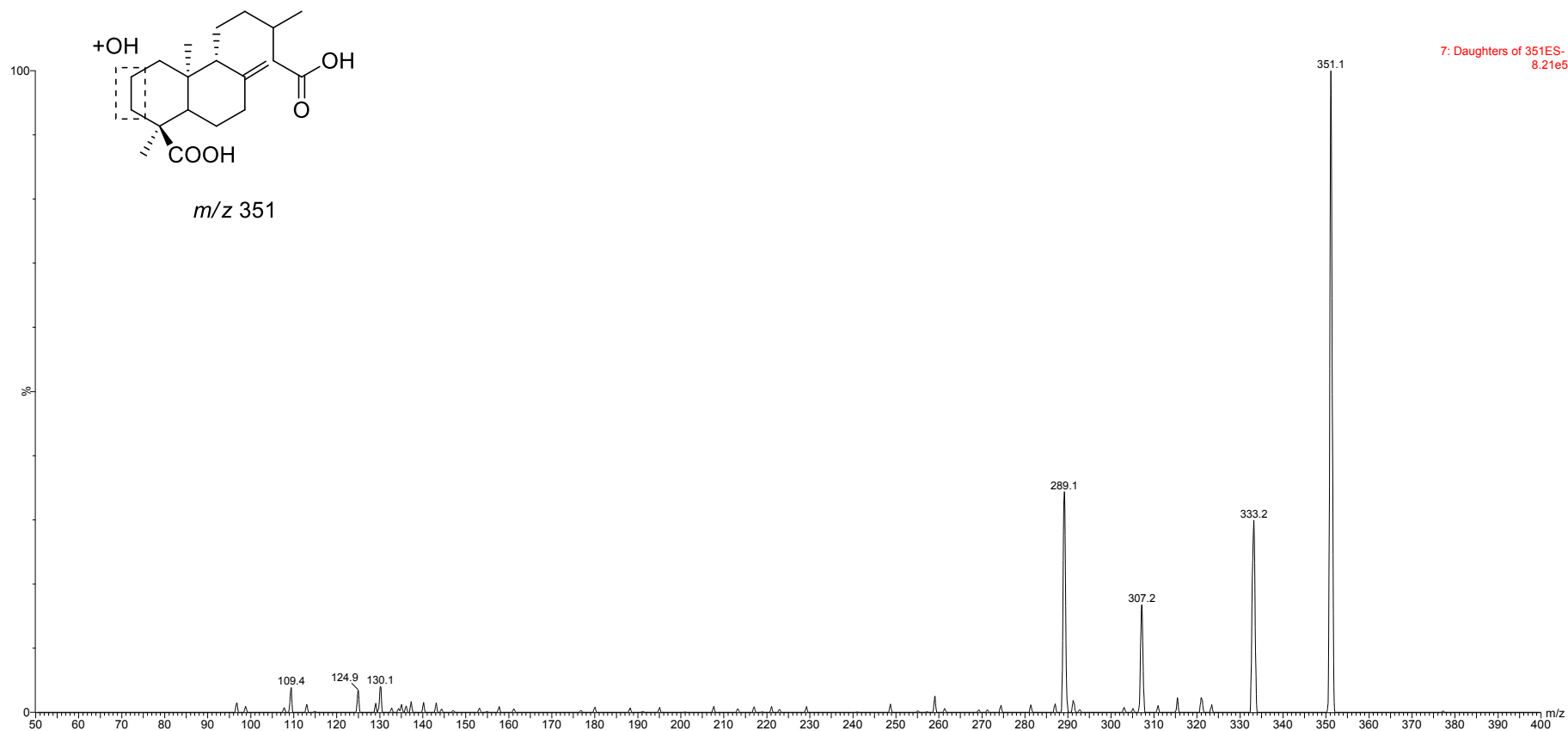


Apêndice 17.4. Mapa de contornos de HMBC do metabólito P06(ADA) (CD₃OD, 600 MHz).



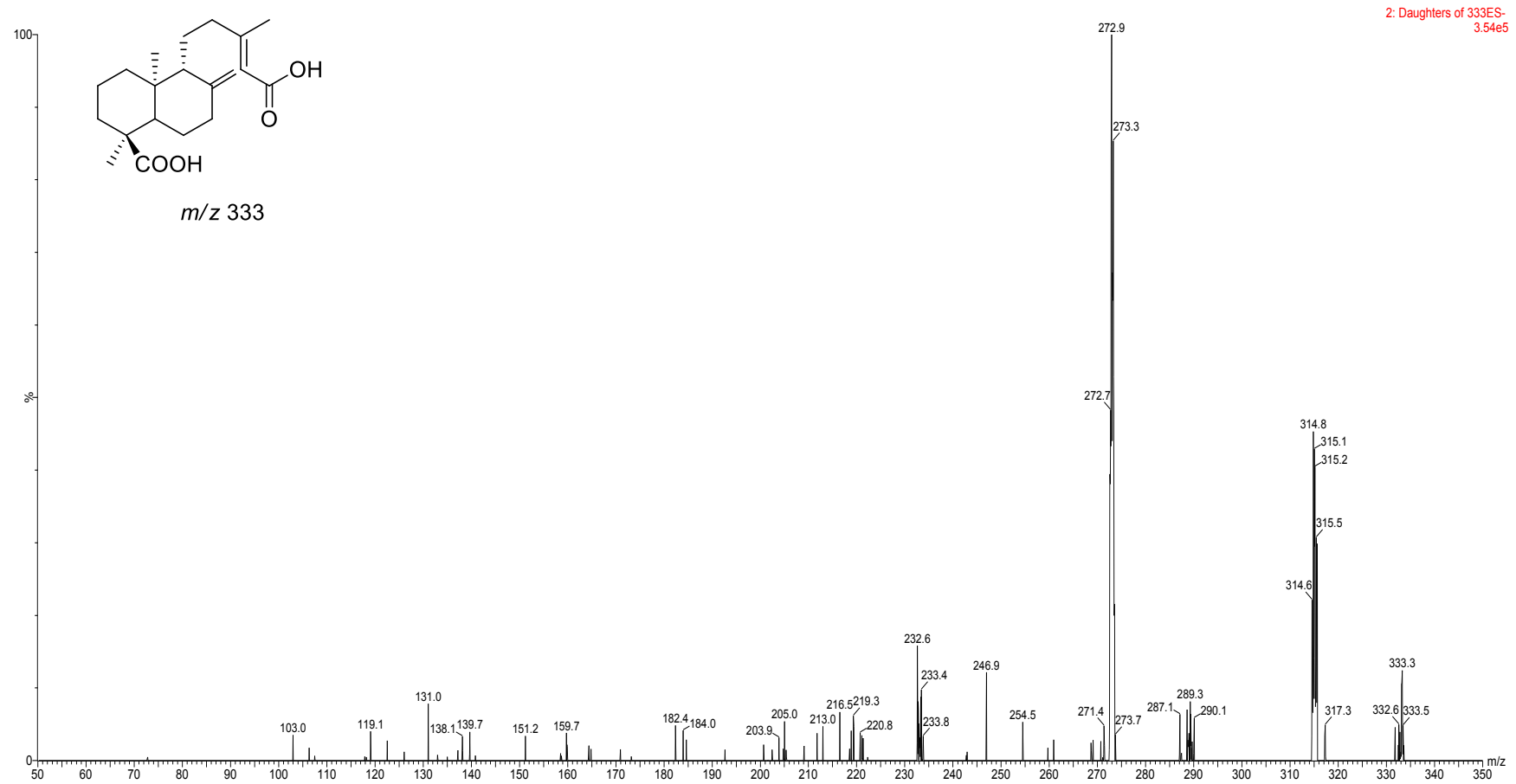
Apêndice 17.5. (A) Espectro de massas em alta resolução no modo negativo obtido por ionização por eletrospray do metabólito P06(ADA) e (B) espectro de íons produtos gerado através da dissociação induzida por colisão do íon $[M-H]^-$ $m/z = 393,2279$ (45 kV) - analisador Orbitrap.

APÊNDICE 18



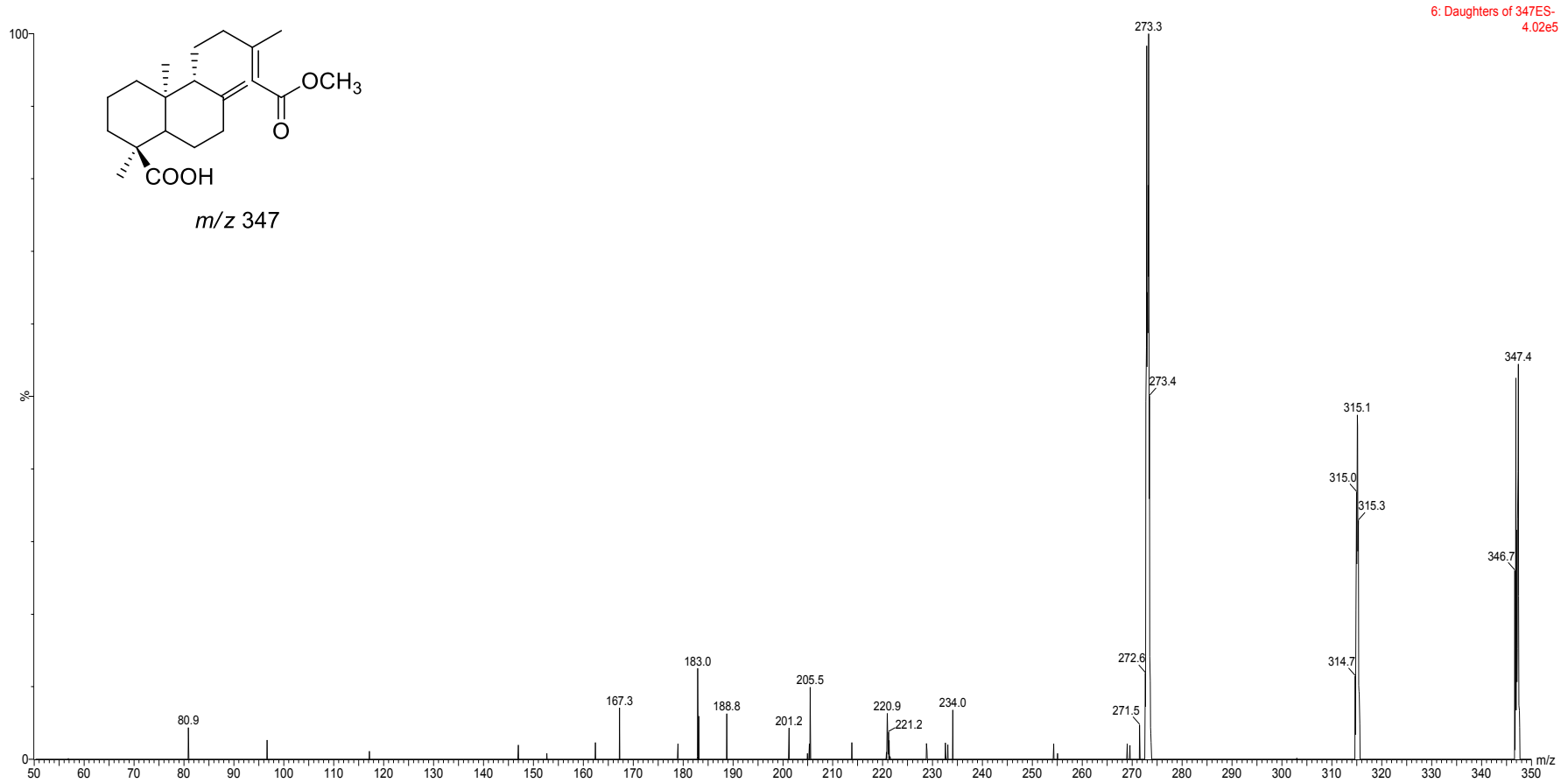
Apêndice 18. Espectro de íons produtos no modo negativo gerado através da dissociação induzida por colisão do íon de $m/z = 351$, detectado no extrato de biotransformação do ácido *ent*-dihidroagático com *S. boulardii* em meio sólido. Energia de colisão de 25 eV, analisador triplo quadrupolo.

APÊNDICE 19



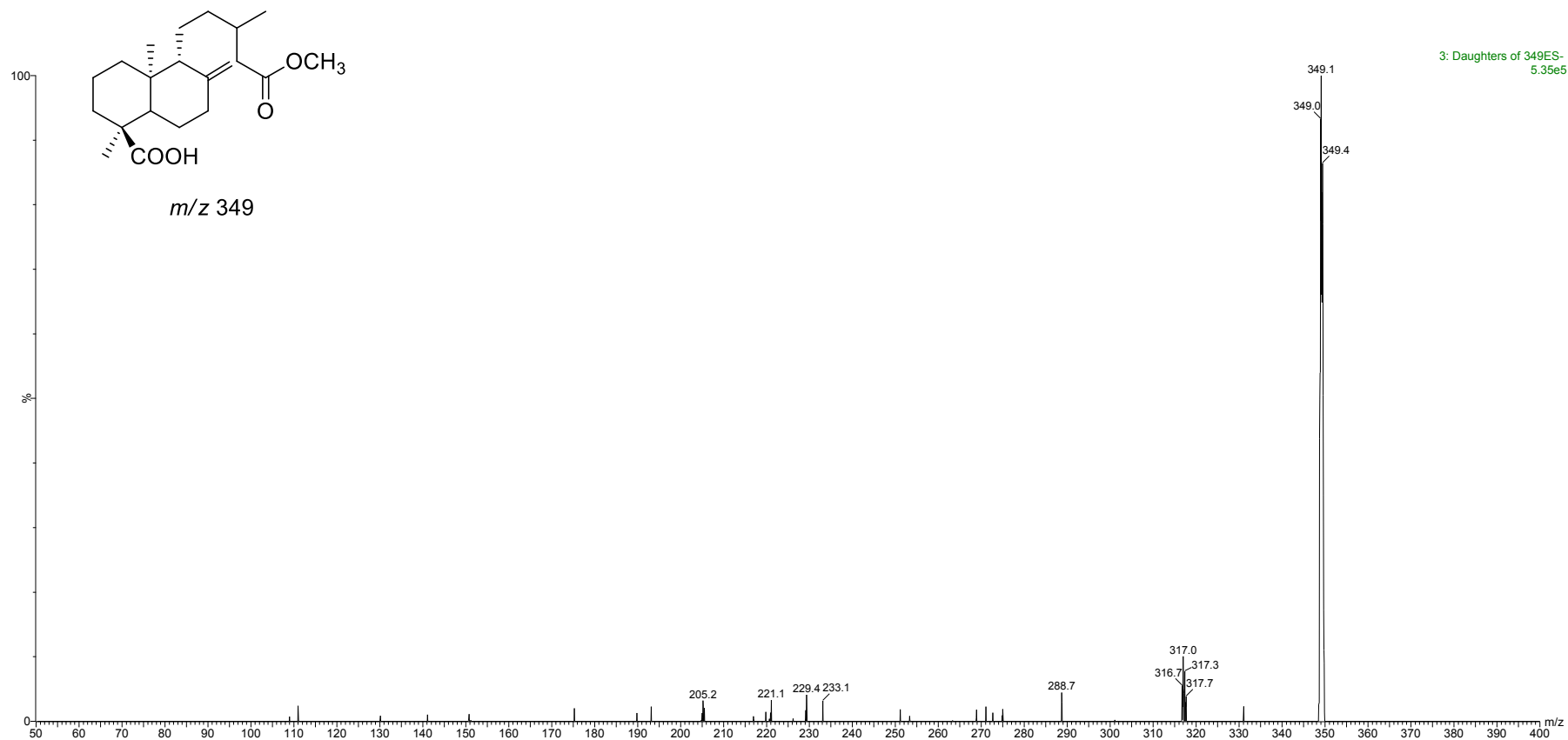
Apêndice 19. Espectro de íons produtos no modo negativo gerado através da dissociação induzida por colisão do íon de $m/z = 333$, detectado no extrato de biotransformação do ácido *ent*-diidroagáctico com *L. fermentum*. Energia de colisão de 35 eV, analisador triplo quadrupolo..

APÊNDICE 20



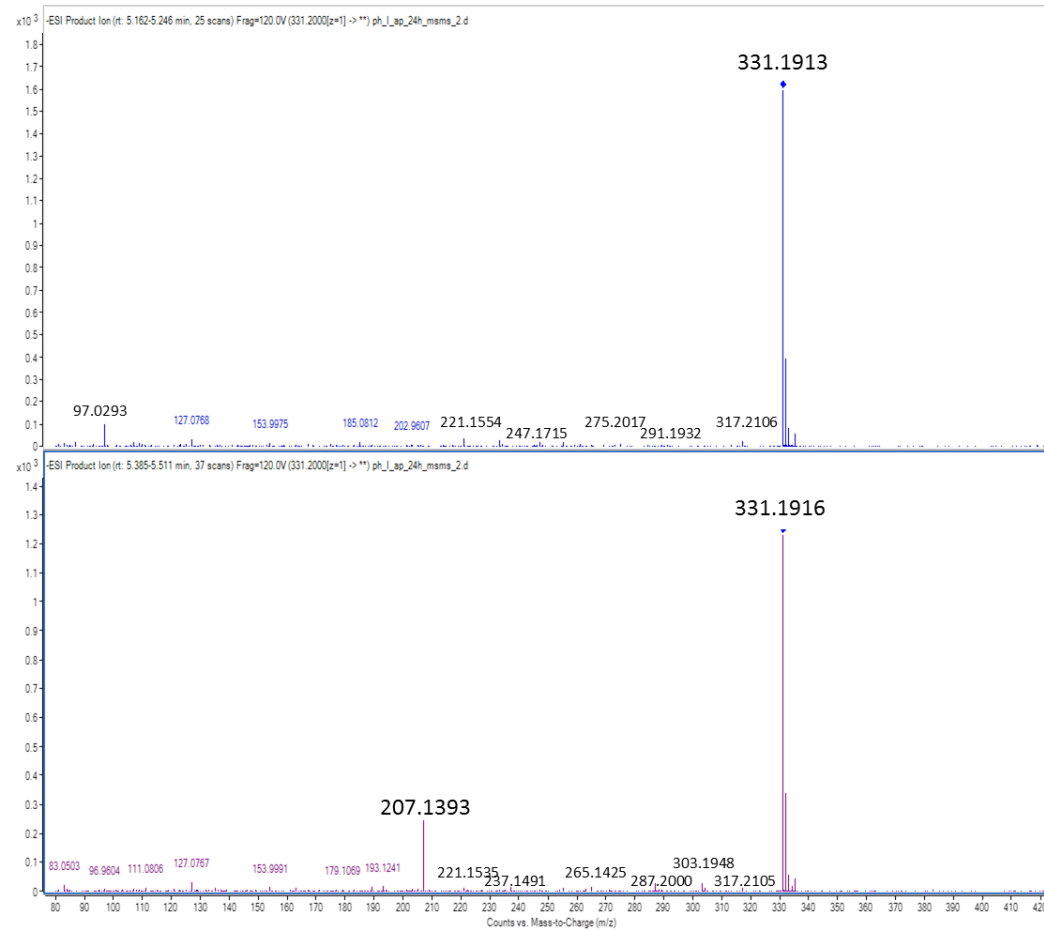
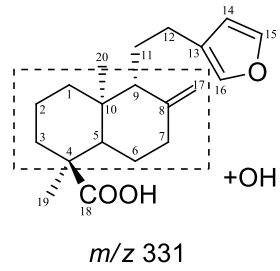
Apêndice 20. Espectro de íons produtos no modo negativo gerado através da dissociação induzida por colisão do íon de $m/z = 347$, detectado nos extratos de biotransformação do ácido *ent*-dihidroagático com *E. coli* em meio sólido, cultura mista de *Bifidobacterium* e cultura mista de *Lactobacillus*. Energia de colisão de 35 eV, analisador triplo quadrupolo.

APÊNDICE 21



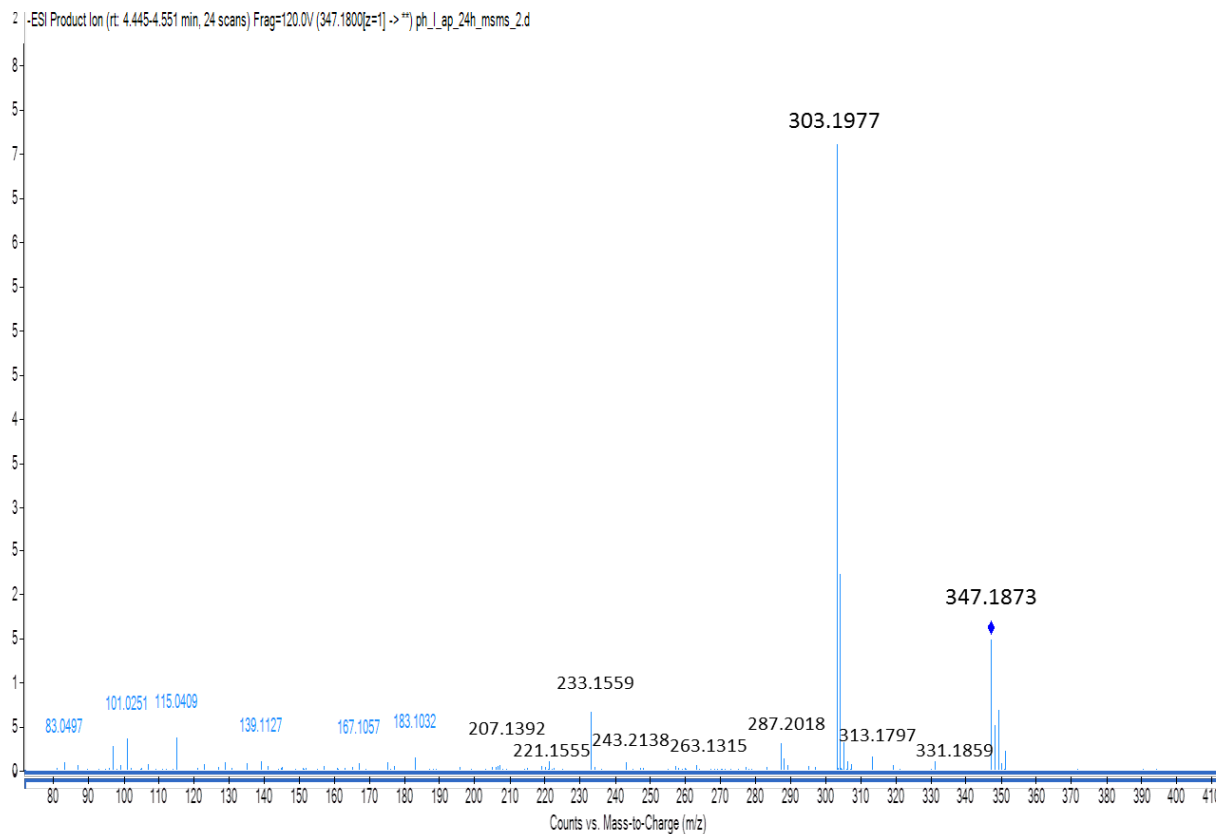
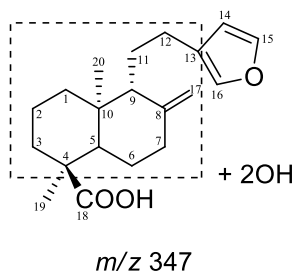
Apêndice 21. Espectro de íons produtos no modo negativo gerado através da dissociação induzida por colisão do íon de $m/z = 349$, detectado no extrato de biotransformação do ácido *ent*-diidroagático com cultura mista de *Lactobacillus sp.* Energia de colisão de 35 eV, analisador triplo quadrupolo.

APÊNDICE 22



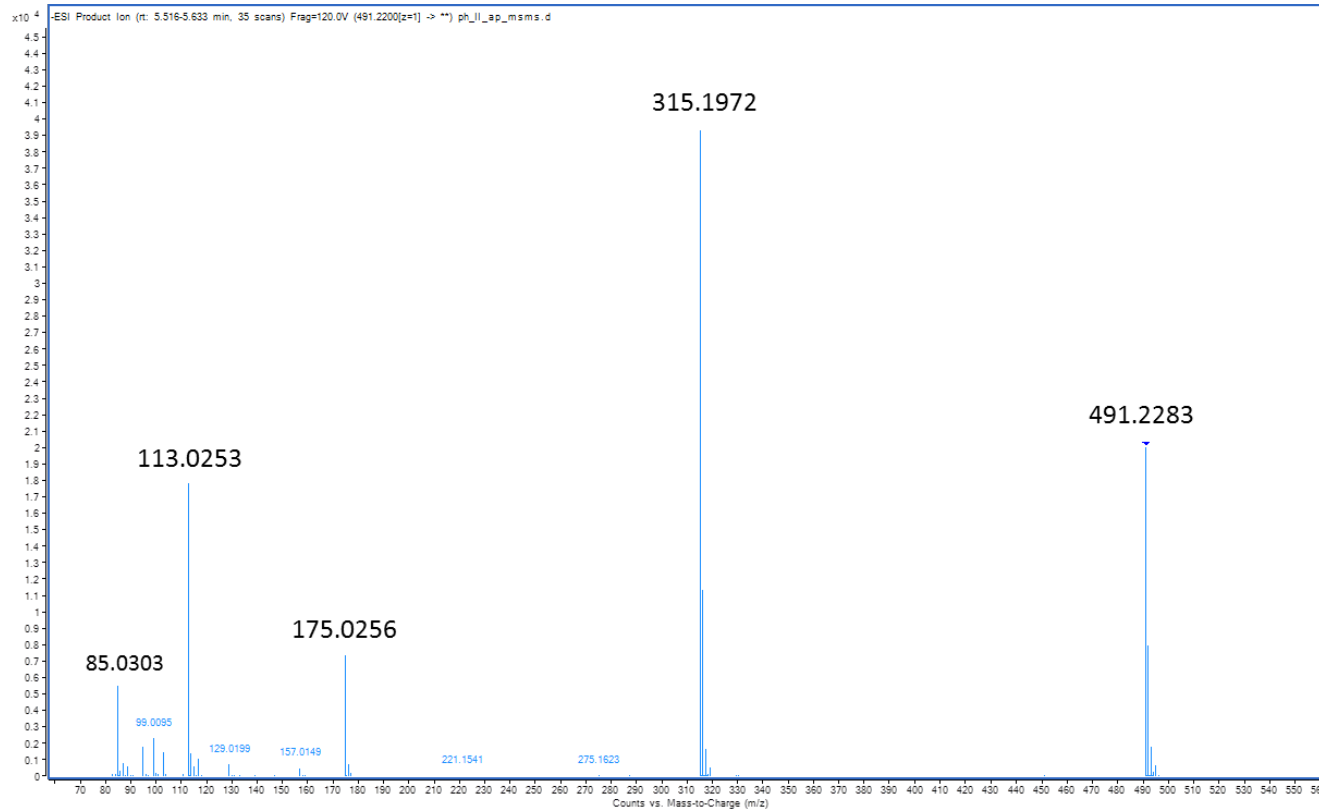
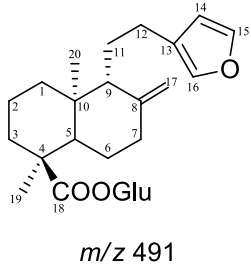
Apêndice 22. Espectro de íons produtos no modo negativo (analisador Q-TOF) gerado através da dissociação induzida por colisão dos íons isômeros de $m/z = 331$ detectados no extrato de biotransformação do ácido *ent*-poliáltico com microssomas hepáticos humanos (fase I).

APÊNDICE 23



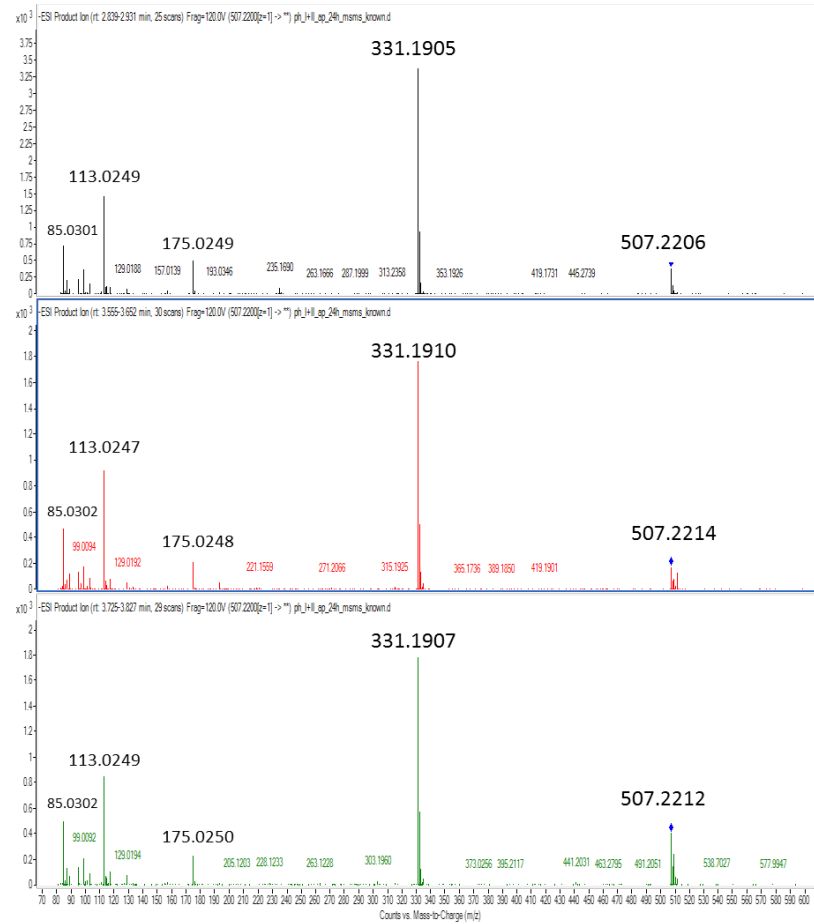
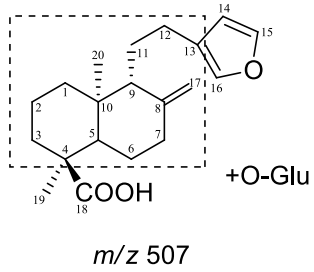
Apêndice 23. Espectro de íons produtos no modo negativo (analisador Q-TOF) gerado através da dissociação induzida por colisão do íon de *m/z* = 347 detectado no extrato de biotransformação do ácido *ent*-poliáltico com microsomas hepáticos humanos (fase I).

APÊNDICE 24



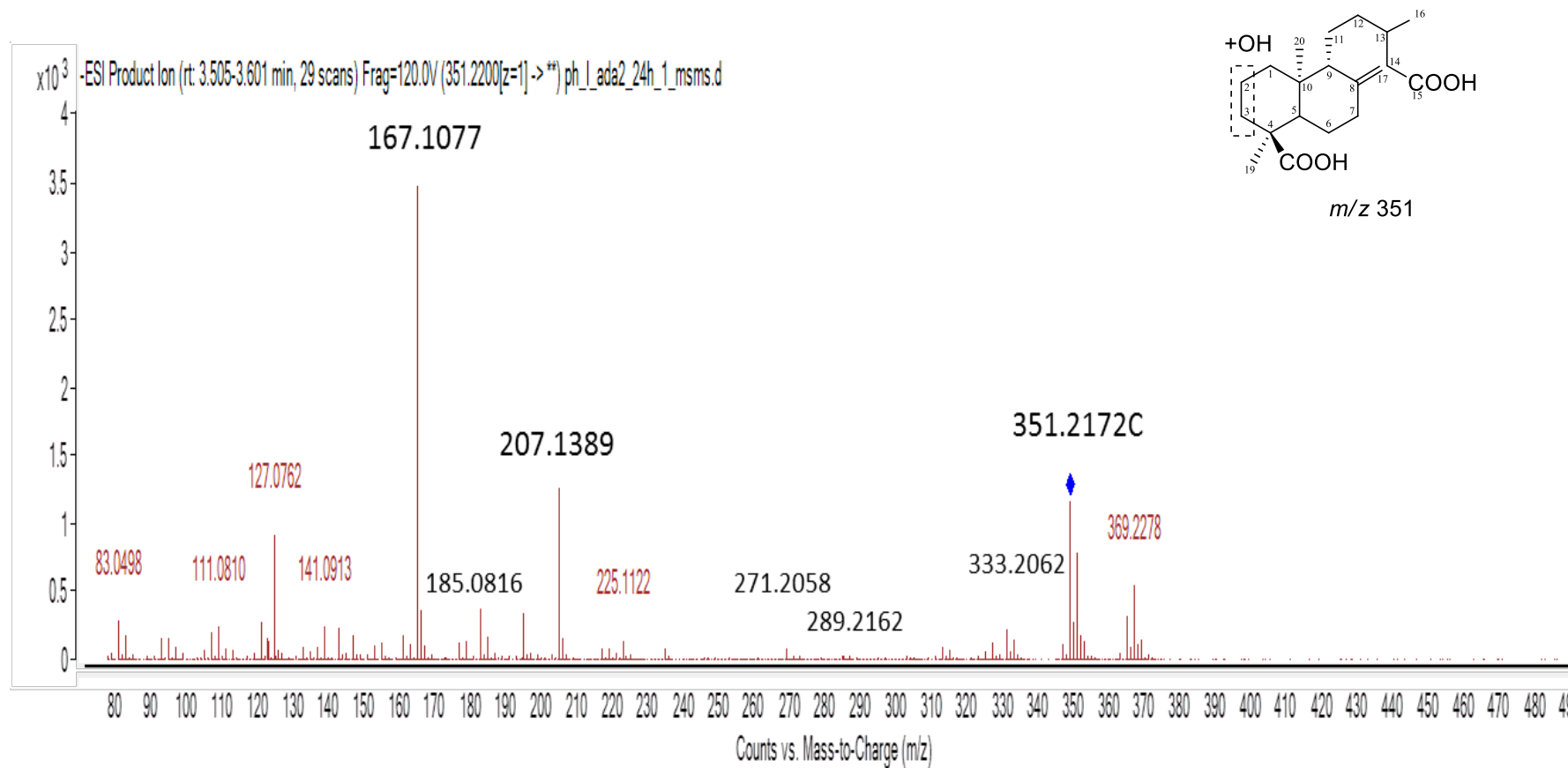
Apêndice 24. Espectro de íons produtos no modo negativo (analisador Q-TOF) gerado através da dissociação induzida por colisão do íon de m/z = 491 detectado no extrato de biotransformação do ácido *ent*-poliáltico com microsomas hepáticos humanos (fase II).

APÊNDICE 25



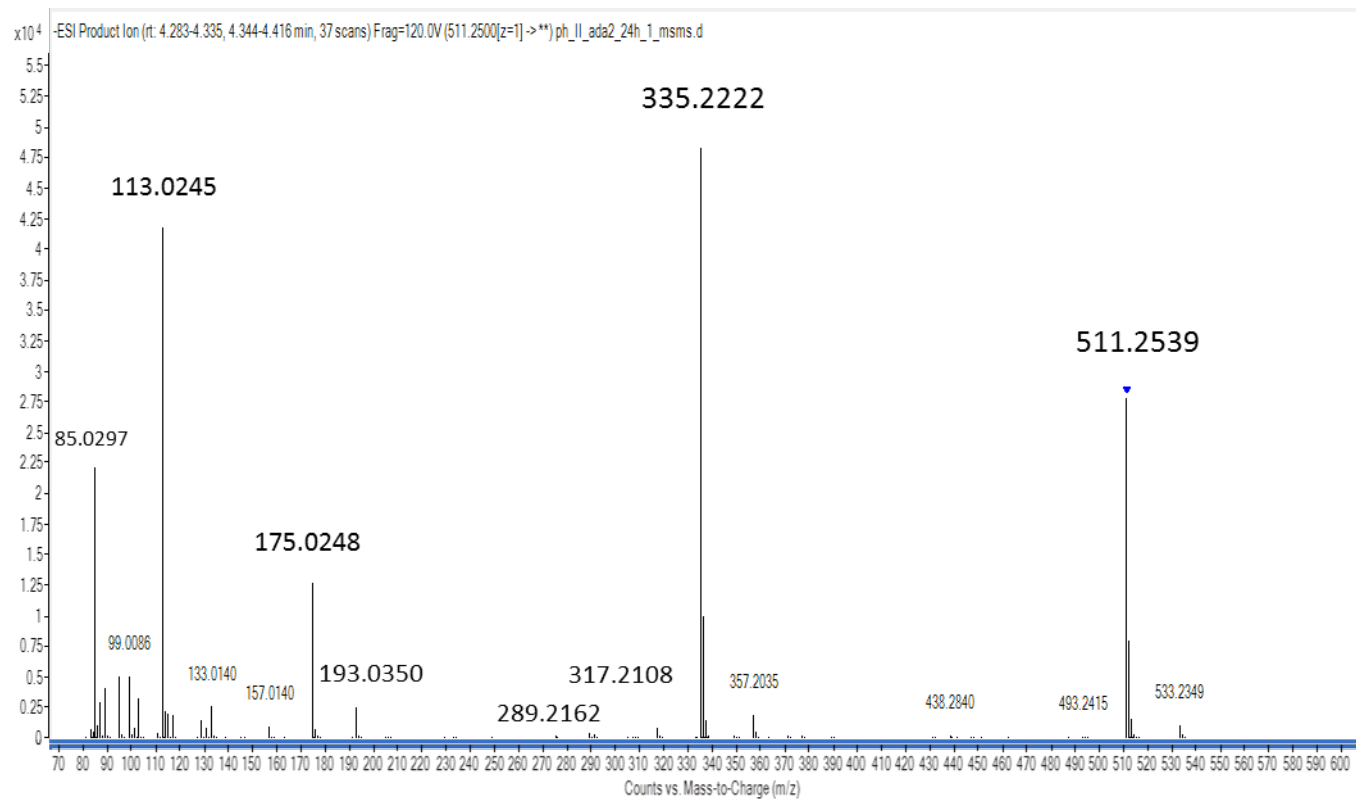
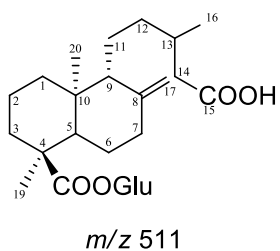
Apêndice 25. Espectro de íons produtos no modo negativo (analisador Q-TOF) gerado através da dissociação induzida por colisão dos íons isômeros de $m/z = 507$ detectados no extrato de biotransformação do ácido *ent*-poliáltico com microsomas hepáticos humanos (fase I+II).

APÊNDICE 26



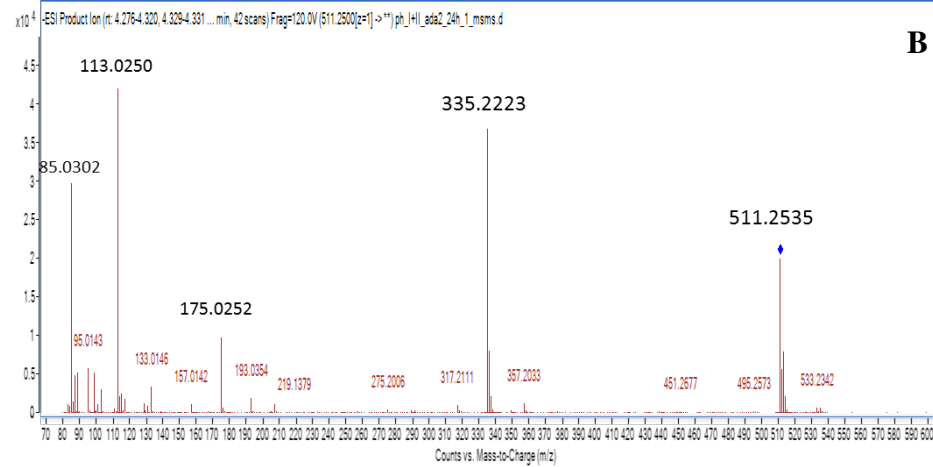
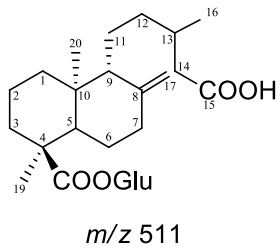
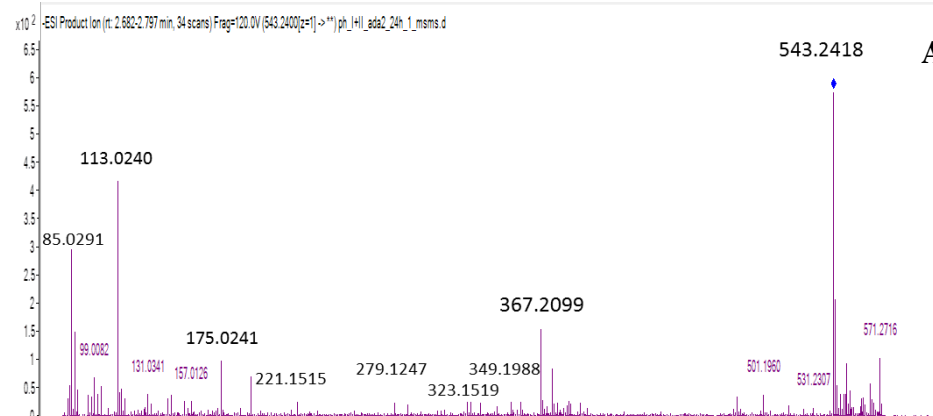
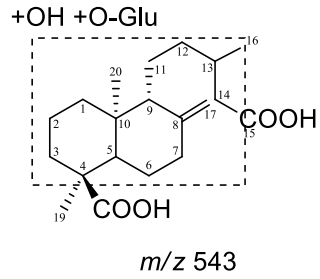
Apêndice 26. Espectro de íons produtos no modo negativo (analisador Q-TOF) gerado através da dissociação induzida por colisão do íon de $m/z = 351$ detectado no extrato de biotransformação do ácido *ent*-diidroagático com microsomas hepáticos humanos (fase I).

APÊNDICE 27



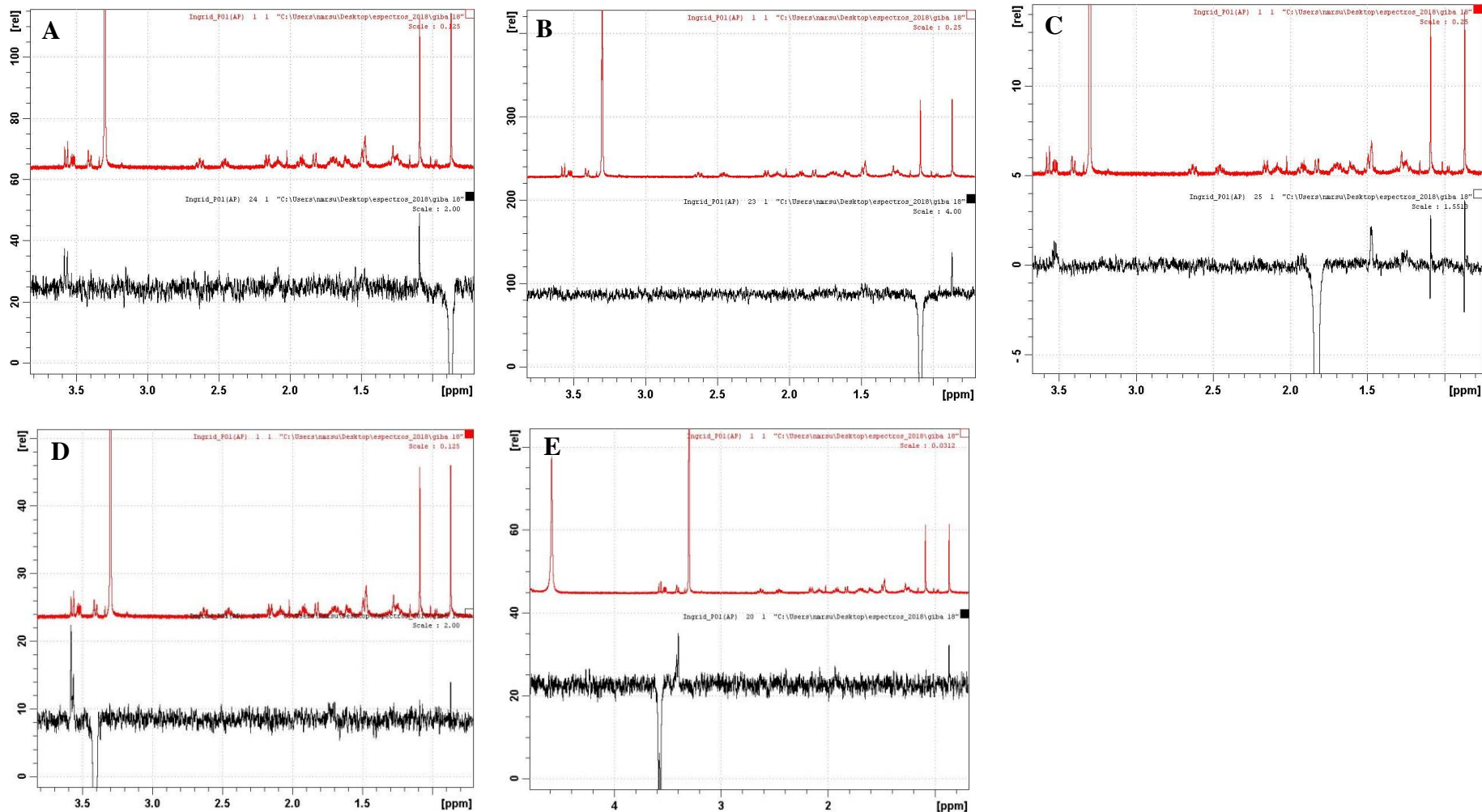
Apêndice 27. Espectro de íons produtos no modo negativo (analisador Q-TOF) gerado através da dissociação induzida por colisão do íon de m/z = 511 detectado no extrato de biotransformação do ácido *ent*-diidroagáctico com microsossomas hepáticos humanos (fase II).

APÊNDICE 28



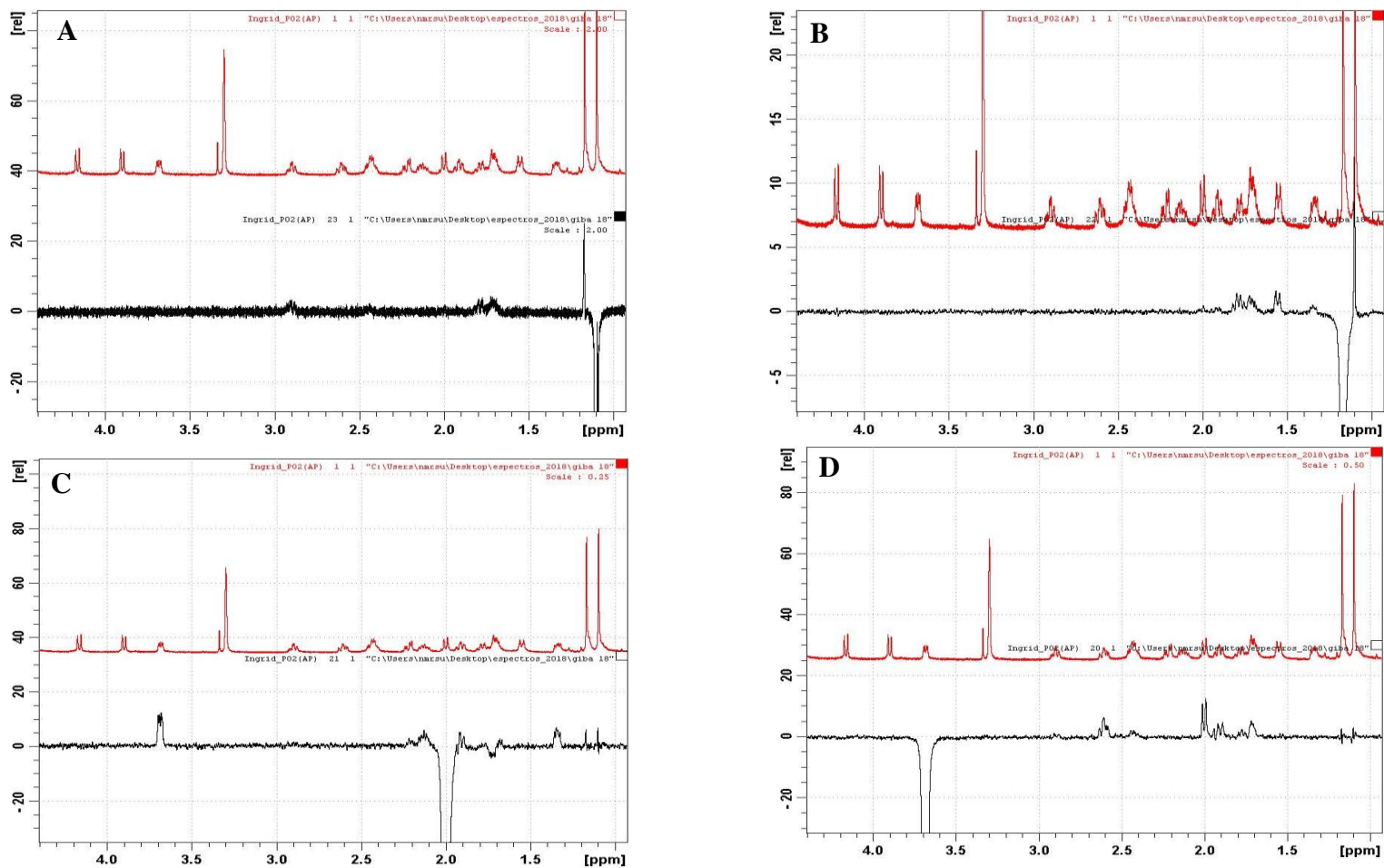
Apêndice 28. Espectro de íons produtos no modo negativo (analisador Q-TOF) gerado através da dissociação induzida por colisão do íon de **A)** $m/z = 543$ e **B)** 511, detectados no extrato de biotransformação do ácido *ent*-diidroagático com microsomas hepáticos humanos (fase I+II).

APÊNDICE 29



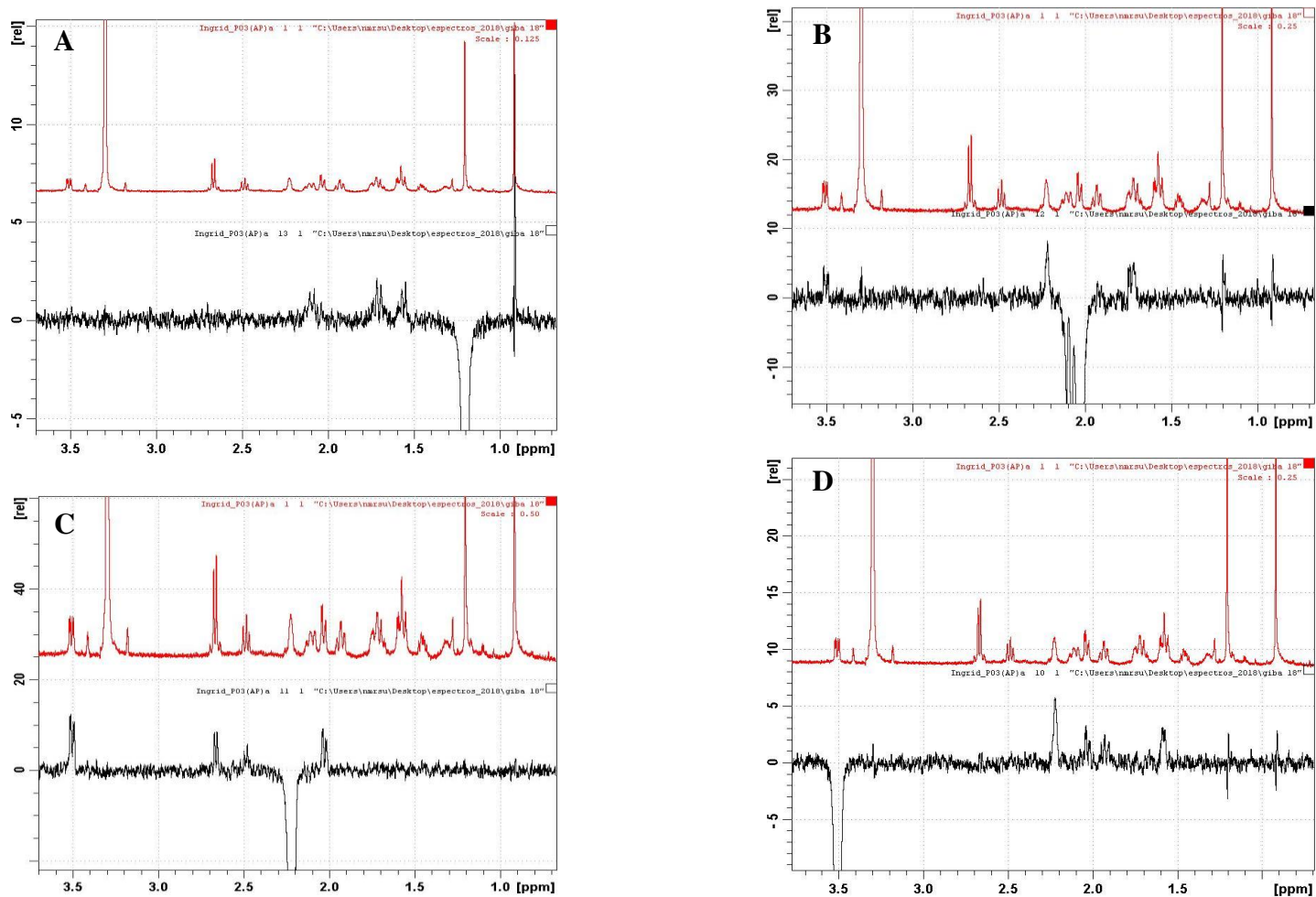
Apêndice 29. Espectros de NOESY 1D (CD₃OD, 600 MHz) do metabólito P01(AP) – irradiação no hidrogênio **A)** δ_H 0,88; **B)** δ_H 1,11; **C)** δ_H 1,83; **D)** δ_H 3,42 e **E)** δ_H 3,58.

APÊNDICE 30



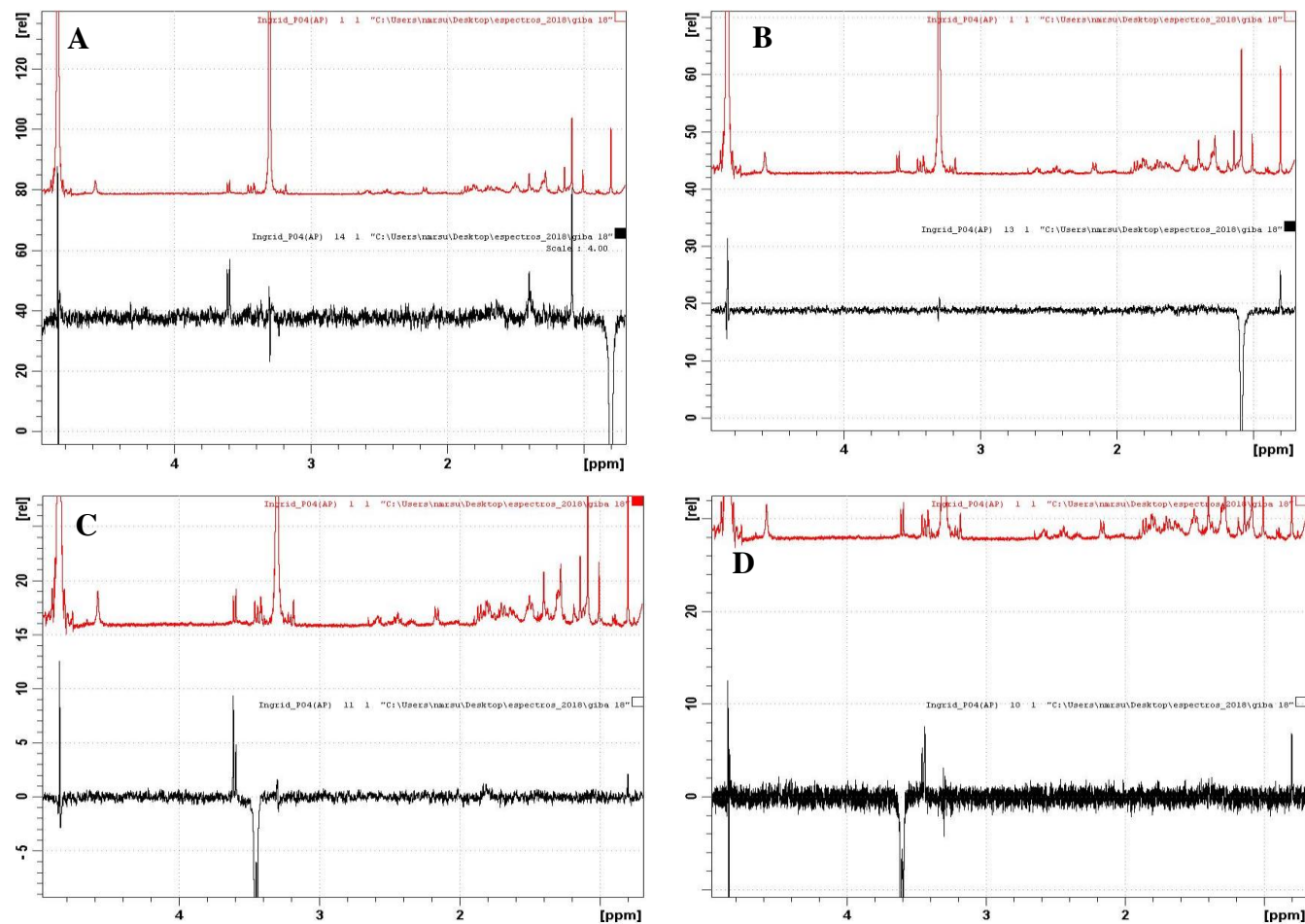
Apêndice 30. Espectros de NOESY 1D (CD₃OD, 600 MHz) do metabólito P02(AP) – irradiação no hidrogênio **A)** δ_H 1,10; **B)** δ_H 1,18; **C)** δ_H 2,01 e **D)** δ_H 3,69.

APÊNDICE 31



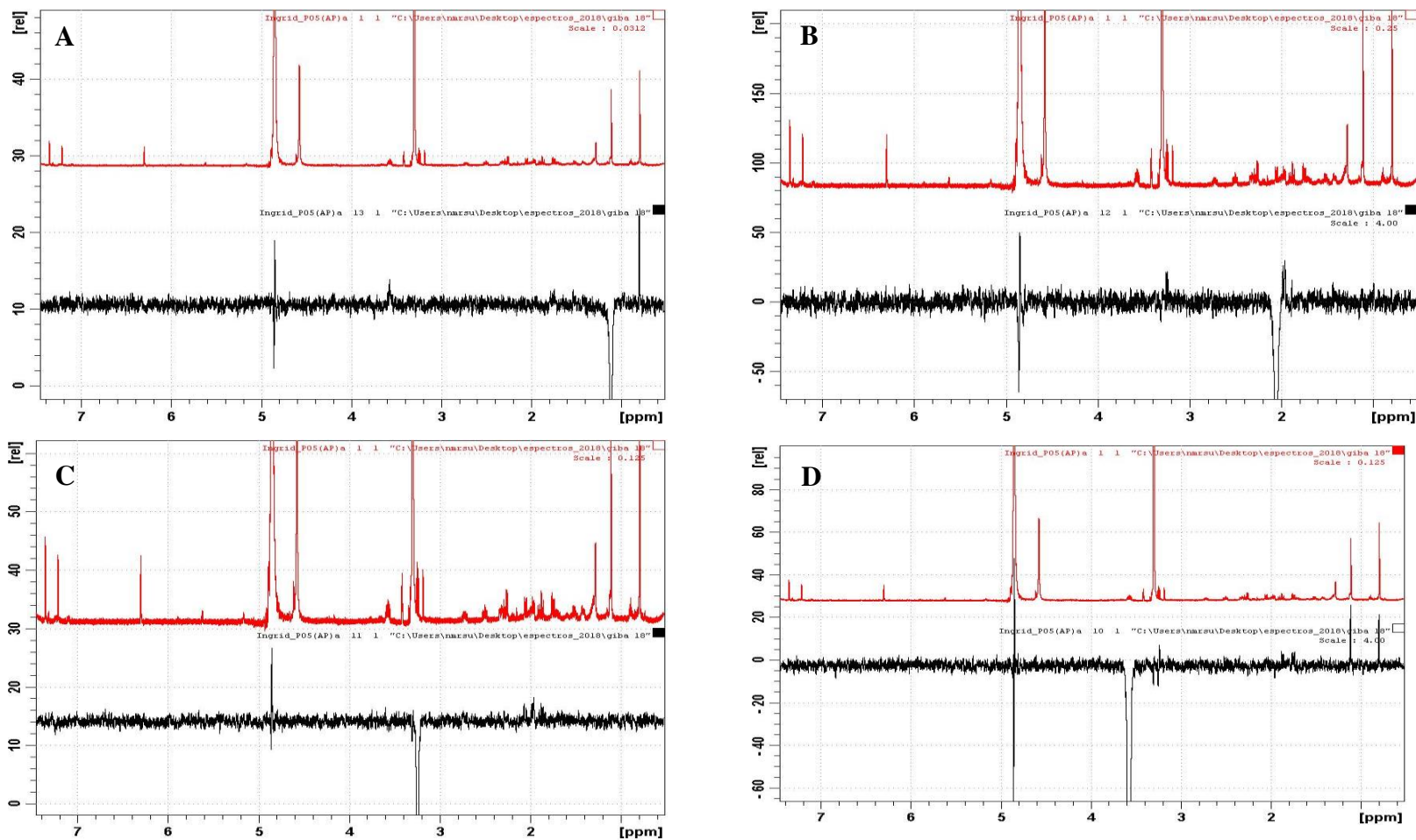
Apêndice 31. Espectros de NOESY 1D (CD₃OD, 600 MHz) do metabólito P03(AP) – irradiação no hidrogênio **A)** δ_H 1,22; **B)** δ_H 2,04; **C)** δ_H 2,24 e **D)** δ_H 3,52.

APÊNDICE 32



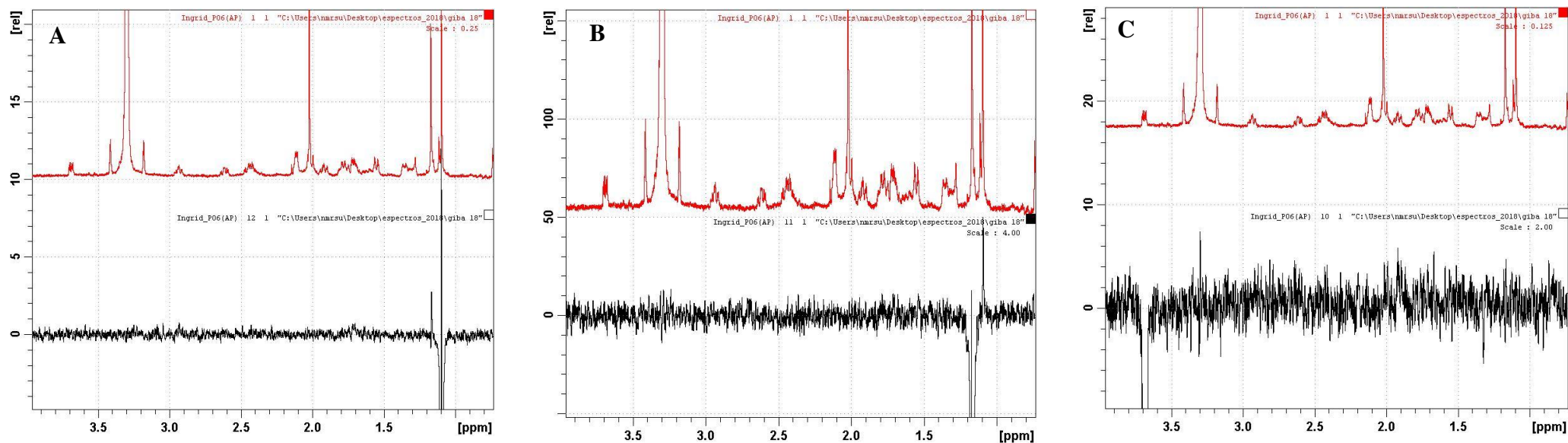
Apêndice 32. Espectros de NOESY 1D (CD₃OD, 600 MHz) do metabólito P04(AP) – irradiação no hidrogênio **A)** δ_H 0,82; **B)** δ_H 1,11; **C)** δ_H 3,46 e **D)** δ_H 3,61.

APÊNDICE 33



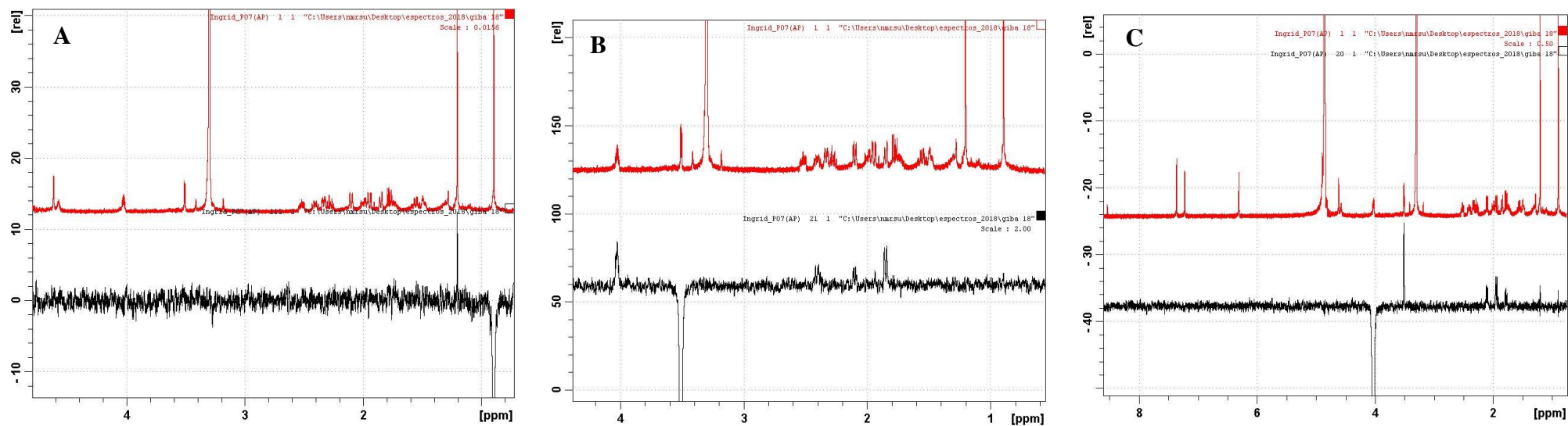
Apêndice 33. Espectros de NOESY 1D (CD₃OD, 600 MHz) do metabólito P05(AP) – irradiação no hidrogênio A) δ_H 1,12; B) δ_H 2,06; C) δ_H 3,25 e D) δ_H 3,59.

APÊNDICE 34



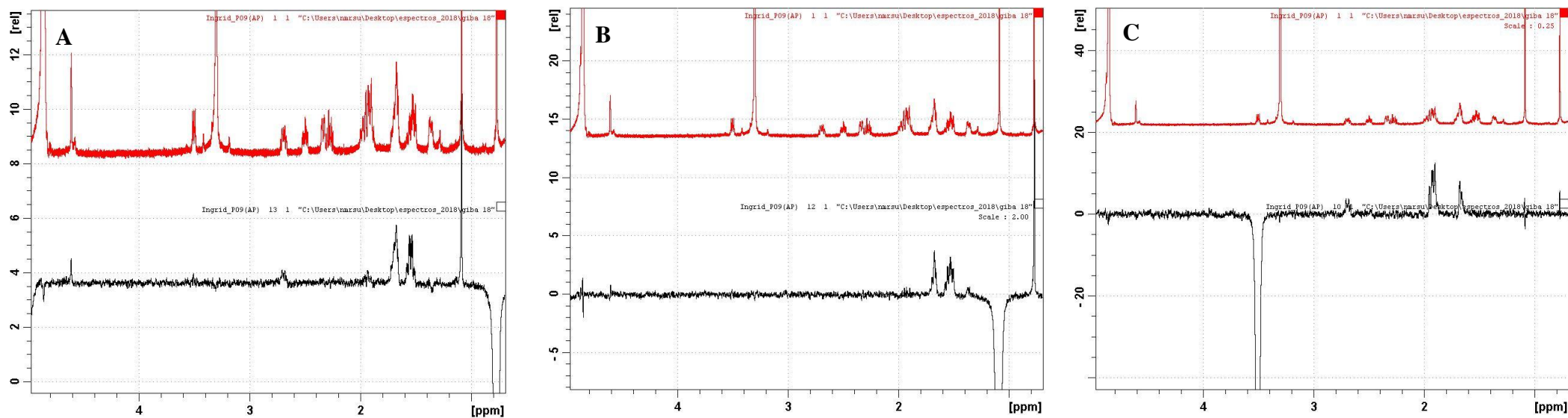
Apêndice 34. Espectros de NOESY 1D (CD₃OD, 600 MHz) do metabólito P06(AP) – irradiação no hidrogênio **A)** δ_H 1,11; **B)** δ_H 1,19 e **C)** δ_H 3,69.

APÊNDICE 35



Apêndice 35. Espectros de NOESY 1D (CD₃OD, 600 MHz) do metabólito P07(AP) – irradiação no hidrogênio **A)** δ_H 0,91; **B)** δ_H 3,51 e **C)** δ_H 4,03.

APÊNDICE 36



Apêndice 36. Espectros de NOESY 1D (CD₃OD, 600 MHz) do metabólito P09(AP) – irradiação no hidrogênio **A)** δ_H 0,78; **B)** δ_H 1,10e **C)** δ_H 3,51.