UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Estudos de metabolismo *in vitro* de produtos naturais:
biotransformação microbiana da piplartina

Eduardo Afonso da Silva Junior

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Estudos de metabolismo *in vitro* de produtos naturais:
biotransformação microbiana da piplartina**

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

Área de Concentração: Produtos Naturais e
Sintéticos

Orientado: Eduardo Afonso da Silva Junior

Orientadora: Profa. Dra. Mônica Tallarico Pupo

Ribeirão Preto
2013

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

Silva Junior, Eduardo Afonso

Estudos de metabolismo *in vitro* de produtos naturais: biotransformação microbiana da piplartina. Ribeirão Preto, 2013. 141 p.; 30cm.

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

Orientadora: Pupo, Mônica Tallarico

1. Biotransformação. 2. Produtos naturais. 3. Piplartina.

*Imagem da capa: autoria do Eduardo Afonso da Silva Junior.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Eduardo Afonso da Silva Junior

Estudos de metabolismo *in vitro* de produtos naturais: biotransformação microbiana da piplartina

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

Área de Concentração: Produtos Naturais e
Sintéticos.

Orientadora: Profa. Dra. Mônica Tallarico Pupo

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico esse trabalho à minha família que sempre acreditou em mim e me incentivou a realizar meus sonhos, e a todas as pessoas que acreditam na ciência.

AGRADECIMENTOS

À minha família que me apoiou durante o mestrado.

À professora Mônica pelos ensinamentos, amizade e orientação.

Aos amigos do LQMo pela amizade e por me ajudarem sempre que precisei.

À técnica Claudia Castania de Macedo pela amizade, ensinamentos e paciência.

À Camila Raquel Paludo pela ajuda, amor e companheirismo.

Ao Dr. Ricardo Vessecchi pela amizade, ensinamentos e por ter me auxiliado com a espectrometria de massas e cálculos teóricos.

Ao Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes pela amizade, ensinamentos, disponibilidade de equipamentos e pela ajuda na interpretação dos espectros de massas.

Ao Prof. Dr. Massuo Jorge Kato pelo fornecimento da pipartina.

À Dayana Rubio Gouvea pela disposição em me ajudar no UPLC.

Ao Lucas Maciel Mauriz Marques pela amizade e colaboração para trabalhar com a querida pipartina.

À Profa. Dra. Nieve Furtado pela amizade, ensinamentos e imensa disposição em ajudar.

À técnica Maria Angelica Chellegatti pela amizade, conselhos e auxílio.

Aos técnicos Luis Otavio B. Zamoner, José Carlos Tomaz, Jacqueline Nakau Mendonça e Vinicius Palaretti pelos ensinamentos e por sempre estarem disponíveis para me ajudar.

Aos amigos do laboratório de Farmacognosia pelos momentos felizes que passamos juntos.

A todos os professores que me deram aulas e a todas as pessoas que colaboraram com minha formação acadêmica.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da FCFRP-USP pela oportunidade de realizar o mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa concedida (nº 2011/01404-2) e pelo financiamento do projeto temático (nº 2009/51812-0).

"Black holes are not really black after all: they glow like a hot body, and the smaller they are, the more they glow."

Stephen Hawking

RESUMO

SILVA JUNIOR, E. A. **Estudos de metabolismo *in vitro* de produtos naturais: biotransformação microbiana da piplartina**. 2013. 141 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

A piplartina é um alcaloide natural conhecido por apresentar diversas atividades biológicas, onde se destaca a ação anticancerígena. Esse produto natural apresentou atividade seletiva frente a vários tipos de células cancerígenas, sendo assim considerado promissor para o desenvolvimento de fármacos. O conhecimento do metabolismo de produtos naturais bioativos é uma importante e necessária etapa para avaliar a eficácia e segurança dessas substâncias. Os micro-organismos são amplamente utilizados em estudos de metabolismo, uma vez que catalisam reações quimio-, régio-, e estereoespecíficas, que muitas vezes são semelhantes às catalisadas pelos seres humanos. Nesse contexto, esse trabalho teve o objetivo de estudar o metabolismo microbiano da piplartina pelos fungos endofíticos *Papulaspora immersa* SS13 e *Penicillium crustosum* VR4, de solo *Mucor rouxii* NRRL 1894, e de coleção comercial *Cunninghamella echinulata* ATCC 8688a e *Beauveria bassiana* ATCC 7159. Os experimentos de biotransformação foram monitorados por UPLC-DAD-MS e UPLC-DAD-MS/MS. Todos os fungos utilizados biotransformaram a piplartina, sendo que 14 substâncias majoritárias foram identificadas como produtos de biotransformação nos experimentos em pequena escala. A piplartina e seus derivados apresentaram fragmentações características em IES-EM/EM que foram explicadas utilizando cálculos computacionais. O estudo dessas fragmentações permitiu a identificação e proposição das alterações estruturais que ocorreram nos metabólitos formados. Os fungos *P. crustosum* VR4 e *B. bassiana* ATCC 7159 foram selecionados para realizar os experimentos de biotransformação em escala ampliada, pois foram capazes de formar a maior diversidade de derivados da piplartina. Cinco substâncias foram isoladas e identificadas por RMN de ^1H , RMN de ^{13}C , HMQC, HMBC, COSY e HRESIMS. Essas substâncias não tinham sido obtidas por biotransformação microbiana anteriormente, sendo que uma ainda não foi descrita na literatura. Foram identificados principalmente produtos formados a partir de reações semelhantes às do metabolismo humano de fase I, como reduções, hidroxilações e hidrólises. Dessa forma, podemos concluir que as culturas microbianas são uma ferramenta útil para estudos preliminares de metabolismo, e para obter padrões de metabólitos que podem ser formados pelo metabolismo humano.

Palavras-chave: biotransformação; metabolismo humano; produtos naturais bioativos; atividade anticancerígena; piplartina.

ABSTRACT

SILVA JUNIOR, E. A. **In vitro metabolism studies of natural products: microbial biotransformation of piplartine.** 2013. 141 p. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Piplartine is a natural alkaloid recognized by its biological properties, especially the anticancer activity. This natural product showed selective activity against several cancer cells lines, thus being considered a promising hit for drug development. Studies of bioactive natural products metabolism are an important and necessary step for the evaluation of their efficacy and safety. Microorganisms have been widely employed in metabolism studies, since they may catalyze chemo-, regio- and stereospecific reactions that are similar to human metabolism. This work aimed to study the microbial metabolism of piplartine by different fungal strains: the endophytes *Penicillium crustosum* VR4 and *Papulaspora immersa* SS13, the soil strain *Mucor rouxii* NRRL 1894, and the commercial collection strains *Cunninghamella echinulata* ATCC 8688a and *Beauveria bassiana* ATCC 7159. Biotransformation experiments were monitored by UPLC-DAD-MS and UPLC-DAD-MS/MS. All the screened fungi were able to biotransform piplartine, and 14 compounds were identified as major biotransformation products in the small scale experiments. Piplartine and its derivatives showed characteristics fragmentations on ESI-MS/MS, which were explained using computer calculations. These fragmentation studies allowed the identification and structural proposition of piplartine metabolites. The fungi *P. crustosum* VR4 and *B. bassiana* ATCC 7159 were selected to perform the large scale biotransformation experiments, since they were capable to produce a large diversity of piplartine derivatives. Five compounds were isolated and identified by ^1H NMR, ^{13}C NMR, HMQC, HMBC, COSY and HRESIMS data. The isolated products had never been previously identified by microbial biotransformation, and one of them was found to be novel in the literature. All the identified and isolated compounds have been produced by reactions similar to those that occur in phase I of human metabolism, such as reduction, hydroxylation and hydrolysis reactions. Thus, we can conclude that the microbial cultures are useful tools for preliminary metabolism studies, and to obtain chemical standards similar to those produced by human metabolism.

Keywords: biotransformation; human metabolism; bioactive natural products; anticancer activity; piplartine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estruturas químicas do produto natural salicina e do fármaco ácido acetilsalicílico.....	1
Figura 2. Estruturas químicas dos produtos naturais vimblastina, vincristina, taxol, e camptotecina, que são utilizados como fármacos na terapia anticâncer..	2
Figura 3. Estrutura química da piplartina.....	3
Figura 4. Produtos naturais semelhantes à piplartina isolados de plantas do gênero <i>Piper</i>	5
Figura 5. Obtenção do fármaco cortisona a partir de um intermediário hidroxilado produzido pela biotransformação da progesterona.....	6
Figura 6. Exemplos de biotransformações que formam produtos com elevado excesso enantiomérico	6
Figura 7. Estruturas químicas do ácido nigranóico e seus produtos de biotransformação juntamente com suas atividades anti-HIV	7
Figura 8. Estruturas químicas da substância AC04 e seu metabólito 1-oxo-AC04	10
Figura 9. Obtenção das substâncias 5 , 8 e 9 a partir do fracionamento do extrato em acetato de etila da biotransformação da piplartina pelo fungo <i>P. crustosum</i> VR4.....	21
Figura 10. Obtenção das substâncias 4 e 12 a partir do fracionamento do extrato em acetato de etila da biotransformação da piplartina pelo fungo <i>B. bassiana</i> ATCC 7159	22
Figura 11. Fragmentação da piplartina protonada em IES-EM/EM.....	24
Figura 12. Perfil cromatográfico da piplartina após exposição à luz UV. Coluna C ₁₈ ACQUITY 1,7µm BEH de 2,1x50 mm e fase móvel gradiente de acetonitrila (ACN) e água ambos com 1% de ácido acético (v/v) (10% a 100% de ACN, em 5 min.), e uma vazão de 0,3 mL.min ⁻¹ em UPLC-DAD	25
Figura 13. Perfil cromatográfico do sétimo dia de biotransformação da piplartina pelo fungo <i>P. crustosum</i> VR4 e estruturas das substâncias identificadas. Coluna C ₁₈ ACQUITY 1,7µm BEH de 2,1x50 mm e fase móvel gradiente de acetonitrila (ACN) e água ambos com 1% de ácido acético (v/v) (10% a 100% de ACN, em 5 min.), e uma vazão de 0,3 mL.min ⁻¹ em UPLC-DAD	27
Figura 14. Perfis cromatográficos das biotransformações do ácido 3,4,5-trimetoxicinâmico nas concentrações de 0,05 e 0,1 mg.mL ⁻¹ pelo fungo <i>P. crustosum</i> VR4 em UPLC utilizando detector de massas seletivo para o íon de <i>m/z</i> 211 e detector de DAD. Coluna C ₁₈ ACQUITY 1,7µm BEH de 2,1x50 mm e fase móvel gradiente de acetonitrila (ACN) e água ambos com 1% de ácido acético (v/v), (10% a 100% de ACN, em 5 min.), e uma vazão de 0,3 mL.min ⁻¹ ...	28

Figura 15. Perfil cromatográfico do sétimo dia de biotransformação da piplartina pelo fungo <i>B. bassiana</i> ATCC 7159 e estruturas químicas dos produtos obtidos. Coluna C ₁₈ ACQUITY 1,7µm BEH de 2,1x50 mm e fase móvel gradiente de acetonitrila (ACN) e água ambos com 1% de ácido acético (v/v) (10% a 100% de ACN, em 5 min.), e uma vazão de 0,3 mL.min ⁻¹ em UPLC-DAD.	31
Figura 16. Perfil cromatográfico do terceiro dia de biotransformação da piplartina pelo fungo <i>M. rouxii</i> NRRL 1894 e estruturas químicas dos produtos formados. Coluna C ₁₈ ACQUITY 1,7µm BEH de 2,1x50 mm e fase móvel gradiente de acetonitrila (ACN) e água ambos com 1% de ácido acético (v/v) (10% a 100% de ACN, em 5 min.), e uma vazão de 0,3 mL.min ⁻¹ em UPLC-DAD	33
Figura 17. Perfil cromatográfico do terceiro dia de biotransformação da piplartina pelo fungo <i>P. immersa</i> SS13 e estruturas químicas dos produtos formados. Coluna C ₁₈ ACQUITY 1,7µm BEH de 2,1x50 mm e fase móvel gradiente de acetonitrila (ACN) e água ambos com 1% de ácido acético (v/v) (10% a 100% de ACN, em 5 min.), e uma vazão de 0,3 mL.min ⁻¹ em UPLC-DAD	35
Figura 18. Perfil cromatográfico do décimo dia de biotransformação pelo fungo <i>C. echinulata</i> ATCC 8688a e estruturas químicas dos produtos obtidos. Coluna C ₁₈ ACQUITY 1,7µm BEH de 2,1x50 mm e fase móvel gradiente de acetonitrila (ACN) e água ambos com 1% de ácido acético (v/v) (10% a 100% de ACN, em 5 min.), e uma vazão de 0,3 mL.min ⁻¹ em UPLC-DAD	36
Figura 19. Perfil cromatográfico do décimo dia de biotransformação da piplartina pelos fungos <i>C. echinulata</i> ATCC 8688a e <i>C. elegans</i> ATCC 10028b em meios Czapek com glicose e com sacarose. Coluna C ₁₈ ACQUITY 1,7µm BEH de 2,1x50 mm e fase móvel gradiente de acetonitrila (ACN) e água ambos com 1% de ácido acético (v/v) (10% a 100% de ACN, em 5 min.), e uma vazão de 0,3 mL.min ⁻¹ em UPLC-DAD.....	37
Figura 20. Atribuição dos dados de RMN de ¹ H em vermelho e de RMN de ¹³ C em azul da piplartina, e numeração da estrutura em preto.....	38
Figura 21. Espectro de RMN de ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) da substância 1	40
Figura 22. Ampliação do espectro de RMN de ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) da substância 1	41
Figura 23. Ampliação do espectro de RMN de ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) da substância 1	42
Figura 24. Espectro de RMN de ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) da substância 1	43
Figura 25. Mapa de contorno de HMQC (400 MHz, CDCl ₃) da substância 1	44
Figura 26. Mapa de contorno de HMBC (400 MHz, CDCl ₃) da substância 1	45
Figura 27. Espectro de massas de alta resolução da substância 1 no modo positivo em A e ampliação desse espectro em B.....	46

Figura 28. Atribuição dos dados de RMN de ^1H em vermelho e de RMN de ^{13}C em azul da <i>cis</i> -piplartina (2), e numeração da estrutura em preto	48
Figura 29. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância 2	50
Figura 30. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância 2	51
Figura 31. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância 2	52
Figura 32. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) da substância 2	53
Figura 33. Mapa de contorno de HMQC (500 MHz, CDCl_3) da substância 2	54
Figura 34. Mapa de contorno de HMBC (500 MHz, CDCl_3) da substância 2	55
Figura 35. Cromatograma obtido no momento da separação dos compostos presentes na fração de SPE em 40% de acetonitrila do extrato de acetato de etila da biotransformação em grande escala da piplartina pelo fungo <i>P. crustosum</i> VR4. Coluna semi-preparativa C_{18} 5 μm VP250/10 nucleosil 120-5 Macherey-Nagel 250 x 10 mm, fase móvel gradiente de ACN em H_2O (30% a 43% de ACN em 40 min) em CLAE, vazão 3 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e detecção no UV 224 nm	56
Figura 36. Atribuição dos dados de RMN de ^1H em vermelho e de RMN de ^{13}C em azul da substância 5 , e numeração da estrutura em preto	57
Figura 37. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) da substância 5	59
Figura 38. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) da substância 5	60
Figura 39. Mapa de contorno de HMQC (500 MHz, CD_3OD) da substância 5	61
Figura 40. Mapa de contorno de HMBC (500 MHz, CD_3OD) da substância 5	62
Figura 41. Espectro de massas de alta resolução da substância 5 no modo positivo em A e ampliação desse espectro em B	63
Figura 42. Atribuição dos dados de RMN de ^1H em vermelho e de RMN de ^{13}C em azul da substância 8 , e numeração da estrutura em preto	64
Figura 43. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) da substância 8	67
Figura 44. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) da substância 8	68
Figura 45. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) da substância 8	69
Figura 46. Mapa de contorno de HMQC (500 MHz, CD_3OD) da substância 8	70
Figura 47. Mapa de contorno de HMBC (500 MHz, CD_3OD) da substância 8	71

Figura 48. Espectro de massas de alta resolução da substância 8 no modo positivo em A, e ampliação desse espectro em B.....	72
Figura 49. Atribuição dos dados de RMN de ^1H em vermelho e de RMN de ^{13}C em azul da substância 9 , e numeração da estrutura em preto	73
Figura 50. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância 9	76
Figura 51. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância 9	77
Figura 52. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância 9	78
Figura 53. Mapa de contorno de HMQC (500 MHz, CDCl_3) da substância 9	79
Figura 54. Mapa de contorno de HMBC (500 MHz, CDCl_3) da substância 9	80
Figura 55. Espectro de massas de alta resolução da substância 9 no modo positivo em A e ampliação desse espectro em B.....	81
Figura 56. Cromatograma obtido em coluna semi-preparativa C_{18} no momento da separação dos compostos presentes na fração de SPE em 40% de acetonitrila do extrato de acetato de etila da biotransformação em grande escala da piplartina pelo fungo <i>B. bassiana</i> ATCC 7159. Coluna semi-preparativa C_{18} 5 μm VP250/10 nucleosil 120-5 Macherey-Nagel 250 x 10 mm, fase móvel isocrática 25% ACN em CLAE, vazão 3 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e detecção no RID.....	82
Figura 57. Dados de RMN de ^1H em vermelho e de RMN de ^{13}C em azul da substância 12 , e numeração da estrutura em preto	83
Figura 58. Dados de RMN de ^1H em vermelho e de RMN de ^{13}C em azul da 5,6-diidro-5-hidroxi-1H-piridin-2-ona obtidos em CDCl_3	84
Figura 59. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância 12	86
Figura 60. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância 12	87
Figura 61. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância 12	88
Figura 62. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) da substância 12	89
Figura 63. Espectro de RMN de ^{13}C DEPT 135 (125 MHz, CDCl_3) da substância 12 ...	90
Figura 64. Mapa de contorno de HMQC (500 MHz, CDCl_3) da substância 12	91
Figura 65. Mapa de contorno de HMBC (500 MHz, CDCl_3) da substância 12	92
Figura 66. Mapa de contorno de COSY (500 MHz, CDCl_3) da substância 12	93
Figura 67. Espectro de massas de alta resolução da substância 12 no modo positivo em A e ampliação desse espectro em B.....	94

Figura 68. Atribuição dos dados de RMN da substância 4	95
Figura 69. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da substância 4	96
Figura 70. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da substância 4	97
Figura 71. Espectro de massas de alta resolução da substância 4 no modo negativo em A, e ampliação desse espectro em B	98
Figura 72. Metabólitos identificados nos experimentos de biotransformação da piplartina por fungos.....	99
Figura 73. Mapas dos potenciais eletrostáticos moleculares da piplartina, 3,4-diidropiplartina e 8,9-diidropiplartina	100
Figura 74. Energias de Gibbs relativas em parênteses e afinidade protônica em <i>itálico</i> para as possíveis formas protonadas da piplartina e seus metabólitos, valores em kcal.mol^{-1} obtidos pelo modelo B3LYP/6-31+G(d).....	102
Figura 75. Estruturas de equilíbrio da piplartina e seus metabólitos protonados no oxigênio carbonílico C-7 obtidas pelo modelo B3LYP/6-31+G(d)	103
Figura 76. Mecanismos de fragmentação para piplartina protonada. Valores em <i>itálico</i> são entalpias relativa a 298 K. Valores entre parênteses são energias de Gibbs relativas a 298 K. Todos os valores estão em kcal.mol^{-1} e foram obtidos através do modelo B3LYP/6-31+G(d)	104
Figura 77. Mecanismos de fragmentação para 3,4-diidropiplartina protonada. Valores em <i>itálico</i> são entalpias relativa a 298 K. Valores entre parênteses são energias de Gibbs relativas a 298 K. Todos os valores estão em kcal.mol^{-1} e foram obtidos através do modelo B3LYP/6-31+G(d)	105
Figura 78. Mecanismos de fragmentação para 8,9-diidropiplartina protonada. Valores em <i>itálico</i> são entalpias relativa a 298 K. Valores entre parênteses são energias de Gibbs relativas a 298 K. Todos os valores estão em kcal.mol^{-1} e foram obtidos através do modelo B3LYP/6-31+G(d)	106
Figura 79. Gráficos das variações das intensidades dos íons fragmentos da piplartina, 3,4-diidropiplartina e 8,9-diidropiplartina protonadas com a E_{lab} . As energias de colisão com N_2 variaram de 0 a 40 eV.....	107

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais íons observados nos espectros de HRESIMS do extrato do sétimo dia de biotransformação pelo fungo <i>P. crustosum</i> VR4	29
Tabela 2 Principais íons observados nos espectros de HRESIMS do extrato do sétimo dia de biotransformação pelo fungo <i>B. bassiana</i> ATCC 7159	31
Tabela 3. Principais íons observados nos espectros de HRESIMS do extrato do terceiro dia de biotransformação pelo fungo <i>M. rouxii</i> NRRL 1894	33
Tabela 4. Principais íons observados nos espectros de HRESIMS do extrato do terceiro dia de biotransformação pelo fungo <i>P. immersa</i> SS13	35
Tabela 5. Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e de ^{13}C (100 MHz) da substância 1 obtidos em CDCl_3 e os dados de RMN de ^1H (200 MHz) e de ^{13}C (50 MHz) descritos na literatura (CDCl_3).....	39
Tabela 6. Dados de RMN de ^1H (500 MHz), HMBC e de RMN de ^{13}C (125 MHz) da substância 2 em CDCl_3	48
Tabela 7. Dados de RMN de ^1H (200 MHz) e de RMN de ^{13}C (50 MHz) da substância 2 em CDCl_3 , obtidos por Navickiene et al. (2000).....	49
Tabela 8. Dados de RMN da substância 5 (CD_3OD , 500 MHz).....	58
Tabela 9. Dados de RMN da substância 8 (CD_3OD , 500 MHz).....	65
Tabela 10. Dados de RMN de ^1H (MAXWELL e RAMPERSAD, 1991) e de RMN de ^{13}C (NAVICKIENE et al., 2000) da substância 8 em CDCl_3	66
Tabela 11. Dados de RMN de ^1H (500 MHz), ^{13}C (125 MHz) e HMBC da substância 9 (CDCl_3 , 500 MHz)	74
Tabela 12. Dados de RMN de ^1H em 60 MHz (JOSHI et al., 1968) e de RMN de ^{13}C em 75 MHz (RAO et al., 2012) da substância 9 em CDCl_3	75
Tabela 13. Dados de RMN de ^1H (500 MHz), HMBC e de RMN de ^{13}C (125 MHz) da substância 12 em CDCl_3	85

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ACN	Acetonitrila
ATCC	<i>American type culture collection</i>
CL	cromatografia líquida
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
COSY	<i>correlation spectroscopy</i>
<i>d</i>	Dubleto
DEPT	<i>distortionless enhancement by polarization transfer</i>
DMSO	dimetilsulfóxido
<i>dt</i>	duplo tripleto
EM	espectrometria de massas
EM/EM	espectrometria de massas/ espectrometria de massas
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
HMBC	<i>heteronuclear multiple bond coherence</i>
HMQC	heteronuclear multiple quantum coherence
HRESIMS	<i>high resolution electrospray ionization mass spectrometry</i>
IES	ionização por eletrospray
J	constante de acoplamento (em Hz)
μL	microlitro
m	miligrama
mL	mililitro
<i>m</i>	Multiplete
s	Singleto
RMN de ^1H	ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN de ^{13}C	ressonância magnética nuclear de carbono
rpm	rotações por minuto
UV	Ultravioleta
α_{D}	rotação óptica específica
δ	deslocamento químico (em ppm)
®	Marca Registrada
™	Trademark

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract.....	ii
Lista de figuras.....	iii
Lista de tabelas	viii
Lista de abreviaturas e símbolos.....	ix
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Importância dos produtos naturais na descoberta e planejamento de fármacos	1
1.2 Piplartina: um produto natural promissor para o desenvolvimento de fármacos	3
1.3 Biotransformações microbianas: uma ferramenta importante para estudos de metabolismo e para obtenção de novas substâncias	5
1.4 Utilização da espectrometria de massas em estudos de metabolismo de produtos naturais.....	8
2. OBJETIVOS.....	11
3. MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1 Material	12
3.1.1 Meios de cultura e Solventes	12
3.1.2 Vidrarias e equipamentos.....	12
3.2 Obtenção da piplartina	13
3.3 Biotransformação microbiana da piplartina	13
3.3.1 Micro-organismos utilizados	13
3.3.2 Determinação das concentrações inibitórias mínimas	14
3.3.3 Padronização do crescimento	14
3.3.4 Procedimento geral de biotransformação em pequena escala	15
3.3.4.1 Biotransformação da piplartina pelo fungo <i>P. immersa</i> SS13	16

3.3.4.2 Biotransformação da piplartina pelo fungo <i>P. crustosum</i> VR4	16
3.3.4.3 Biotransformação da piplartina pelo fungo <i>M. rouxii</i> NRRL 1894	17
3.3.4.4 Biotransformação da piplartina pelo fungo <i>C. echinulata</i> ATCC 8688a	17
3.3.4.5 Biotransformação da piplartina pelo fungo <i>B. bassiana</i> ATCC 7159	18
3.4 Análises cromatográficas das biotransformações	18
3.5 Análises de massas de alta resolução	19
3.6 Modelos computacionais utilizados para os estudos de fragmentação	19
3.7 Biotransformação em escala ampliada	20
3.8 Isolamento dos produtos de biotransformação da piplartina	21
3.9 Obtenção e isolamento da <i>cis</i> -piplartina	22
3.10 Determinação estrutural dos compostos isolados	23
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
4.1 Fragmentação da piplartina e de seus derivados em IES-EM/EM	24
4.2 Análises das biotransformações em pequena escala	25
4.2.1 Análises das biotransformações em pequena escala pelo fungo <i>P. crustosum</i> VR4	26
4.2.2 Análises das biotransformações em pequena escala pelo fungo <i>B. bassiana</i> ATCC 7159	30
4.2.3 Análises das biotransformações em pequena escala pelo fungo <i>M. rouxii</i> NRRL 1894	32
4.2.4 Análises das biotransformações em pequena escala pelo fungo <i>P. immersa</i> SS13	34
4.2.5 Análises das biotransformações em pequena escala pelo fungo <i>C. echinulata</i> ATCC 8688a	36
4.3 Determinação estrutural das substâncias isoladas	38
4.3.1 Determinação estrutural dos produtos de biotransformação da piplartina pelo fungo <i>P. crustosum</i> VR4	56
4.3.2 Determinação estrutural dos produtos de biotransformação da piplartina pelo fungo <i>B. bassiana</i> ATCC 8688a	82
4.4 Estudos computacionais da fragmentação da piplartina e de seus derivados em IES-EM/EM	99

5. CONCLUSÕES	109
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	111
ANEXOS	121

1. INTRODUÇÃO

1.1 Importância dos produtos naturais na descoberta e planejamento de fármacos

Grande parte dos fármacos utilizados atualmente são produtos naturais, ou foram planejados a partir deles (NEWMAN e CRAGG, 2012). Essas substâncias naturais são importantes, pois apresentam elevada diversidade estrutural, e foram biologicamente selecionadas para garantir vantagens para seus organismos produtores. Dessa forma, os produtos naturais possuem um importante papel para a descoberta e planejamento de novos candidatos a fármacos (MISHRA e TIWARI, 2011).

Os produtos naturais podem apresentar mais de uma atividade biológica (BEZERRA et al., 2013), o que pode ser interessante, pois podem ser utilizados para o tratamento de várias doenças. Mas, por outro lado, essa característica pode resultar em efeitos indesejados. Nesses casos, podem ser realizados estudos de relação estrutura atividade para identificar os grupamentos moleculares que são responsáveis pelos efeitos desejáveis e indesejáveis e planejar uma nova estrutura contendo apenas os grupamentos importantes para a atividade farmacológica. O ácido acetilsalicílico (figura 1), por exemplo, é um fármaco analgésico centenário que foi planejado a partir da salicina, um glicosídeo natural de plantas do gênero *Salix* (BARREIRO e FRAGA, 2008a).

Figura 1. Estruturas químicas do produto natural salicina e do fármaco ácido acetilsalicílico.

Os produtos naturais normalmente apresentam estruturas moleculares complexas que são difíceis de serem sintetizadas, uma vez que podem possuir vários centros estereogênicos. Várias outras metodologias foram e estão sendo utilizadas para o desenvolvimento de novos fármacos, como a síntese combinatória,

que fornece uma grande quantidade de substâncias. Essa importante ferramenta pode ser somada à diversidade estrutural dos produtos naturais, e, dessa forma, fornecer grande variedade de derivados em curto intervalo de tempo (ORTHOLAND e GANESAN, 2004; DIAS e CORRÊA, 2001). Dessa forma, os produtos naturais continuam sendo uma fonte promissora para a obtenção e planejamento de fármacos.

Como exemplos de produtos naturais que se tornaram fármacos (figura 2), podemos citar os fármacos anticancerígenos vimblastina e vincristina, isolados de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don (Apocynaceae), paclitaxel, isolado de *Taxus brevifolia* Nutt. (Taxaceae), e camptotecina, isolado de *Camptotheca acuminata* Decne. (Nyssaceae) (BALUNAS e KINGHORN, 2005). Vale ressaltar que mesmo com esses fármacos e vários outros disponíveis no mercado, a terapia anticâncer ainda necessita de novas substâncias que sejam menos tóxicas e mais seletivas para as células cancerígenas.

Figura 2. Estruturas químicas dos produtos naturais vimblastina, vincristina, taxol, e camptotecina, que são utilizados como fármacos na terapia anticâncer.

O Brasil é conhecido por ser um dos países mais ricos em biodiversidade, sendo, dessa forma, promissor para a descoberta de novas substâncias que apresentam estruturas e mecanismos de ação inovadores. Mesmo com todo esse

potencial biológico, ainda são necessários aumentar a exploração científica desses recursos naturais (GOTTLIEB et al., 1998). Infelizmente nossas florestas estão sendo destruídas, e por isso se torna cada vez mais necessário e importante explorarmos de forma sustentável nossa riqueza química e biológica.

Após um produto natural ser selecionado como promissor, para que ele seja transformado em fármaco são necessários outros estudos para garantir a segurança terapêutica (BALUNAS e KINGHORN, 2005). Para isso, se torna de grande importância conhecer os metabólitos que são formados a partir do metabolismo humano, e avaliar as atividades tóxicas e farmacológicas dos mesmos.

1.2 Piplartina: um produto natural promissor para o desenvolvimento de fármacos

A piplartina (figura 3) é um alcaloide natural que apresenta diversas atividades biológicas, como antifúngica (SILVA et al., 2002), antinociceptiva (RODRIGUES et al., 2009), ansiolítica, antidepressiva (FELIPE et al., 2007), e inibidora de agregação plaquetária em coelhos (PARK et al, 2007). Esse alcaloide também foi ativo contra parasitas causadores de várias doenças negligenciadas, como *Schistosoma mansoni*, causador da esquistossomose (MORAES et al, 2011), *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas (COTINGUIBA et al., 2009) e *Leishmania donovani*, causador da leishmaniose visceral (BODIWALA et al., 2007). Neste último exemplo, a piplartina foi ativa em testes realizados *in vitro* e *in vivo*.

Figura 3. Estrutura química da piplartina.

Esse produto natural também foi ativo frente a vários tipos de células cancerígenas em concentrações micromolares, e foi pouco citotóxico para células normais. A piplartina apresentou atividade frente a uma grande variedade de células

cancerígenas, como as de cólon, pulmão, mama, sistema nervoso central, rins, pâncreas, bexiga, ósseas, da nasofaringe, e melanócitos (BEZERRA et al., 2013).

Essa substância possui vários mecanismos de ação, como a indução de apoptose em células tumorais (BEZERRA et al., 2008a), interrupção do ciclo celular e redução da taxa de proliferação celular (JYOTHI et al., 2009; BEZERRA et al., 2008a; BEZERRA et al., 2006), e aumento de espécies reativas de oxigênio em células tumorais (RAJ et al., 2011). Além disso, provocou necrose e/ou apoptose em células leucêmicas de acordo com as doses utilizadas (BEZERRA et al., 2007), e alguns resultados indicam que esse alcaloide pode melhorar a eficácia terapêutica de outros quimioterápicos utilizados na terapia anticancerígena (BEZERRA et al., 2008b).

Em outro trabalho realizado *in vivo* em camundongos, a piplartina apresentou excelente biodisponibilidade oral, e maior atividade anticancerígena e menor toxicidade que o fármaco paclitaxel. Além disso, ao contrário de outros fármacos, a piplartina foi seletiva para células cancerígenas, e foi capaz de aumentar seletivamente os níveis de espécies reativas de oxigênio em células cancerígenas (RAJ et al., 2011). Bezerra e colaboradores (2013) consideram que essas atividades podem estar relacionadas com a presença de duas carbonilas α,β -insaturadas presentes na estrutura molecular desse produto natural, mas são necessários estudos de relação estrutura atividade para confirmar essa hipótese.

Diante dessas atividades, a piplartina é considerada promissora para o desenvolvimento de novos fármacos anticancerígenos (BEZERRA et al., 2013). Apesar do grande potencial terapêutico desse produto natural, é importante identificar e avaliar as atividades biológicas dos metabólitos que podem ser formados a partir do metabolismo humano e, dessa forma, garantir a segurança terapêutica desse produto natural.

A piplartina pode ser isolada de várias plantas, como *Piper tuberculatum* L., *Piper longum* L., *Piper arborescens* Roxb., *Piper sylvaticum* Roxb., *Piper puberulum* Benth, *Piper alatabaccum* Trel & Yuncker, *Piper chaba* Hunter, e *Piper cenocladum* C.DC (BEZERRA et al., 2013). Essas plantas são utilizadas para diversos fins medicinais, como, por exemplo, para o tratamento de tumores, bronquite, infecção respiratória, cólera, hepatite viral, malária, e gonorreia (BEZERRA et al., 2013). Outros produtos naturais com estruturas moleculares semelhantes à piplartina também foram isoladas de plantas do gênero *Piper*, conforme podemos observar na

figura 4 (WU et al., 1997; DODSON et al., 2000; FACUNDO et al., 2005; DUH et al., 1990; DUH e WU, 1990; BRAZ-FILHO et al., 1981; KIJOA et al., 1982; NAVICKIENE et al., 2000).

Figura 4. Produtos naturais semelhantes à piplartina isolados de plantas do gênero *Piper*.

Essas substâncias também apresentam atividades biológicas, como citotoxicidade frente a células tumorais, leishmanicida e antifúngica. Devido ao potencial farmacêutico da piplartina, vários outros análogos estão sendo sintetizados na tentativa de obter substâncias com atividade mais promissora (RAO et al., 2012; ADAMS et al., 2012). Além desses métodos sintéticos, outras metodologias podem ser utilizadas para fornecer derivados bioativos desse produto natural, como as biotransformações microbianas.

1.3 Biotransformações microbianas: uma ferramenta importante para estudos de metabolismo e para obtenção de novas substâncias

Biotransformações são alterações químicas catalisadas por organismos em substâncias, essas reações são também conhecidas como metabolizações (FABER, 2004; BARREIRO e FRAGA, 2008b). As biotransformações são de grande importância industrial, pois podem ser quimio-, regio-, e estereosseletivas (BORGES

et al., 2009a). Um bom exemplo dessas reações é a α -hidroxilação na posição 11 da progesterona por *Rhizopus arrhizus* (figura 5), formando um dos intermediários para obtenção do fármaco cortisona (AHMAD et al., 1992).

Figura 5. Obtenção do fármaco cortisona a partir de um intermediário hidroxilado produzido pela biotransformação da progesterona.

As biotransformações microbianas também são utilizadas por indústrias para a obtenção de produtos quirais que apresentam elevado grau de excesso enantiomérico (ee). Como exemplo, podemos citar a obtenção das substâncias presentes na figura 6, que são obtidas com mais de 99% de ee (LAUMEN et al, 2002).

Figura 6. Exemplos de biotransformações que formam produtos com elevado excesso enantiomérico.

Os micro-organismos também podem catalisar reações que mimetizam as realizadas no metabolismo humano, como, principalmente, as reações de fase I, e, também, as reações de fase II (BORGES et al., 2009b). Nesse contexto, os micro-organismos são de grande importância, pois podem ser empregados em estudos preliminares que avaliam a metabolização *in vitro* de produtos naturais.

Estudos sobre o metabolismo de produtos naturais constituem um passo importante e necessário para a avaliação da eficácia e segurança desses compostos

(SCHAAB et al., 2010). A avaliação do metabolismo *in vivo* possui desvantagens, como problemas de aprovação em comitês de ética, altos custos, disponibilização de cobaias, baixas quantidades obtidas dos metabólitos, etc. Portanto, existe uma grande necessidade de desenvolvimento de novas metodologias que avaliem o metabolismo de produtos naturais. Para isso, diversos sistemas biomiméticos estão sendo utilizados, como os microsossomas hepáticos (PIGATTO et al., 2011), as metaloporfirinas (SCHAAB et al., 2010), e os micro-organismos (BORGES 2009 et al., 2009b).

Estudos de biotransformação microbiana são atrativos pela redução de custos, por não usar mamíferos, pela rapidez e pela possível similaridade com o metabolismo de mamíferos, permitindo a avaliação inicial de metabolismo (ASHA e VIDYAVATHI, 2009; BORGES et al., 2009b). Porém, quando a metabolização realizada pelos micro-organismos promove reações similares ao sistema enzimático humano, os estudos em mamíferos são ainda importantes para a confirmação dos resultados.

Além disso, os micro-organismos podem ser utilizados para a obtenção de derivados em quantidade suficiente para a verificação de suas atividades biológicas (CAPEL et al., 2011). Nesse contexto, as reações catalisadas por culturas microbianas podem resultar na formação de produtos que são difíceis de serem obtidos por processos químicos convencionais, e que podem ser mais ativos que seus precursores. O ácido nigranóico (figura 7), por exemplo, apresenta elevada atividade anti-HIV e foi biotransformado em produtos que apresentam atividade superior a esse produto natural (YANG et al., 2012).

Figura 7. Estruturas químicas do ácido nigranóico e seus produtos de biotransformação juntamente com suas atividades anti-HIV.

Até o momento não existem estudos do metabolismo *in vivo* da piplartina, e *in vitro* existe apenas um estudo envolvendo metaloporfirinas (SCHAAB et al., 2010). Nesse trabalho foi detectado por espectrometria de massas de alta resolução um derivado diidroxilado no anel lactâmico da piplartina, mas as posições das hidroxilas não foram estabelecidas.

Na tentativa de prever o metabolismo *in vivo* de produtos naturais, os resultados obtidos nos estudos de biotransformação microbiana da piplartina poderão contribuir para a obtenção de informações sobre o possível metabolismo em mamíferos e para o desenvolvimento de novos sistemas para estudos de metabolismo biomimético de produtos naturais análogos.

Para aumentar a probabilidade de se obter grande diversidade de metabólitos, é importante utilizar micro-organismos isolados de ambientes diferentes, pois eles podem apresentar aparatos enzimáticos específicos para a sobrevivência em seus habitats. Como ocorre, por exemplo, com os micro-organismos endofíticos, que devem se proteger das substâncias produzidas pelas plantas (BORGES et al., 2009b).

1.4 Utilização da espectrometria de massas em estudos de metabolismo de produtos naturais

Em estudos de metabolismo normalmente são formados metabólitos em pequenas quantidades, e, para facilitar a detecção e caracterização, são utilizadas metodologias e equipamentos que sejam sensíveis o suficiente para separar e detectar essas substâncias. Para isso, são utilizadas técnicas hifenadas, em que se usam aparelhos acoplados em sequência que separam e analisam os componentes das amostras (WILKINS, 1983). A espectrometria de massas acoplada a cromatografia líquida se destaca, pois além de ser sensível ela fornece informações relacionadas à fórmula molecular e à estrutura das substâncias (HOLČAPEK et al., 2008; BANERJEE e MAZUMDAR, 2012).

Para que as substâncias componentes de uma amostra sejam analisadas em espectrômetro de massas, é necessário que elas sejam primeiramente ionizadas. Existem várias fontes de ionização, sendo que a fonte de eletrospray é amplamente utilizada, uma vez que ela permite a ionização de moléculas de pequeno e elevado

peso molecular, sendo elas de caráter polar ou apolar, e ioniza até mesmo moléculas termolábeis (HO et al., 2003).

Durante o processo de ionização por IES os íons podem ser formados por três diferentes processos: reações do tipo ácido-base, que produzem moléculas protonadas $[M+H]^+$ e desprotonadas $[M-H]^-$, coordenação com cátions e ânions, que resultam na formação de moléculas cationizadas e anionizadas, e reações redox, que formam íons moleculares ($M^{\cdot+}$) ou ($M^{\cdot-}$). Esses eventos vão depender da estrutura das substâncias a serem analisadas e de parâmetros experimentais no espectrômetro de massas (CROTTI et al., 2006).

A utilização da espectrometria de massas também possui desvantagens, como, por exemplo, ocorre com substâncias que não ionizam facilmente, e, conseqüentemente, não são facilmente detectadas nas análises. Durante a ionização, pode ocorrer supressão iônica, em que substâncias presentes na amostra dificultam a ionização do analito de interesse (VESSECCHI et al., 2011). Além disso, essa técnica possui dificuldade para diferenciar isômeros, e, normalmente, é necessário um conhecimento prévio das estruturas que estão sendo analisadas (KONISHI et al., 2007).

A utilização da química-quântica computacional vem sendo aplicada para facilitar a compreensão dos processos de ionização e fragmentação das substâncias de interesse (VESSECCHI et al., 2008). Além disso, o conhecimento mais detalhado das fragmentações permite a proposição de estruturas análogas a estruturas conhecidas, mas que não foram obtidas em quantidade suficiente para serem determinadas por RMN (FURTADO et al., 2007; PIVATTO et al., 2005).

A primeira etapa para a determinação estrutural de uma substância utilizando técnicas sequenciais de espectrometria de massas (EM/EM) é se conhecer o sítio onde ocorre a ionização (VESSECCHI et al., 2008; ALCAMI et al., 2001). Para isso, podem ser utilizados alguns descritores apropriados, como o mapa do potencial eletrostático (MEP), que indica o grau com que uma carga será atraída pela superfície eletrostática molecular, e afinidade protônica (AP), a qual reflete a estabilidade da espécie protonada (ALCAMI et al., 2001; VESSECCHI et al., 2012).

Pigatto e colaboradores (2011) utilizaram a espectrometria de massas juntamente cálculos químicos computacionais para estudar o metabolismo da substância AC04 (figura 8), que possui elevada atividade anticancerígena. Primeiramente os autores identificaram e estudaram a fragmentação do metabólito

oxidado formado *in vitro*, e, em seguida, isolaram esse metabólito e confirmaram sua estrutura utilizando RMN. Por fim, os autores constataram por CL-EM que esse mesmo metabólito também foi formado *in vivo* pelo metabolismo de ratos. Dessa forma, podemos notar que a utilização de técnicas hifenadas juntamente com cálculos químicos teóricos e RMN são ferramentas úteis para realização de estudos de metabolismo.

Figura 8. Estruturas químicas da substância AC04 e seu metabólito 1-oxo-AC04.

2. OBJETIVOS

Devido o potencial biológico da piplartina, é necessário o estudo de seu metabolismo *in vivo* para que este produto natural possa ser considerado um protótipo para o desenvolvimento de fármacos. Portanto, o principal objetivo desse trabalho foi estudar o metabolismo microbiano da piplartina usando fungos endofíticos, de solo e de coleção comercial na tentativa de obter informações que permitam uma possível correlação com o metabolismo humano.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Meios de cultura e Solventes

Meios de cultura: PDA (*potato dextrose agar*) e PDB (*potato dextrose broth*) da Fluka, extrato de malte (Fluka), glicose e sacarose (Reagen), peptona (Fluka), ágar (Himedia), extrato de levedura (Fluka), triptona (Acumedia), KH_2PO_4 , NaNO_3 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e KCl da Synth, pasta de tomate (Quero), farinha de aveia (Quaker), e pó de milho (Veranita).

Solventes: acetato de etila (Synth), 1-butanol (Vetec); etanol (Synth); acetonitrila, metanol, acetona, acetato de etila, clorofórmio, hexano e dimetilsulfóxido grau cromatográfico das marcas: Mallinckrodt, J.T. Baker, Burdick & Jackson e Tedia; metanol e clorofórmio deuterados Cambridge Isotope Laboratories, Inc.

3.1.2 Vidrarias e equipamentos

Vidrarias: Erlenmeyers de 250 mL e 500 mL (Pyrex[®]); kitassatos (Pyrex[®]); béqueres (Vidrolabor[®]); funis de separação (Vidrolabor[®]); Provetas (Vidrolabor[®]); tubos de RMN Norell Standard Series 5mm NMR tubes (Sigma-Aldrich[®]); tubos de RMN 8 mm Shigemi CDCl_3 código CMS-005TB; tubos de RMN 8 mm Shigemi CD_3OD código MMS-005TB.

Equipamentos: purificador de água Milli-Q Millipore; purificador de água por osmose reversa OS10LX Gehaka; pHmetro Corning pH meter 440; autoclave vertical Phoenix[®] AV-75; balanças analíticas Mettler Toledo Excellence, e Gehaka BG 400; incubadora BOD (*biochemical oxygen demand*) da Tecnal, bomba de vácuo Micronal BA525P; rotaevaporador Büchi R-114, rotaevaporador Büchi RII; sistema resfriador de água Büchi Recirculating Chiller B-740; capela de fluxo laminar Pachane[®] PA320; coluna semi-preparativa para CLAE VP250/10 nucleosil 120-5 C18 250 mm X 10 mm, 5 μm da Macherey-Nagel acoplada a pré-coluna 15 mm x 9,4 mm, 7 μm da Agilent Technologies; câmara de extração em fase sólida Supelco Visiprep[™] DL; cartuchos de extração em fase sólida Discovery[®] DSC-18 SPE; ACQUITY UPLC[®] Waters; coluna C₁₈ ACQUITY 1,7 μm BEH (*Ethylene Bridged Hybrid*) de 2,1x50 mm;

CLAE Shimadzu acoplado a bombas modelo LC-6 AD Shimadzu, sistema de controle SCL-10AVP Shimadzu, detector arranjo de diodos UV/VIS SPD-M10AVP Shimadzu, detector de índice de refração RID-10A Shimadzu, injetor automático SIL-10AF Shimadzu, forno CTO-10ASVP Shimadzu, coletor de fração FRC-10A Shimadzu, e *software* Class VP; CLAE reciclante Shimadzu acoplado a bomba modelo LC-6 AD Shimadzu, sistema de controle CBM-20A Shimadzu, detector de índice de refração RID-10A Shimadzu, detector arranjo de diodos UV/VIS SPD-20A Shimadzu, injetor manual, válvulas de reciclo e suporte de coluna Shimadzu, e *software* LCsolution; espectrômetros de RMN: Bruker® DRX-500 MHz e Bruker® DRX-400 MHz; espectrômetro de massas de alta resolução “microTOF Q II - ESI-TOF Mass Spectrometer” fabricado por Bruker Daltonics, Billerica, MA, EUA; mesa agitadora com controle de temperatura Innova® 44 - New Brunswick Scientific; polarímetro DIP-370 Digital Polarimeter Jasco, lâmpada 589 nm; sonicador Branson1200 - Branson Ultrasonics Corporation.

3.2 Obtenção da piplartina

A piplartina foi isolada de *Piper tuberculatum*, e cerca de 4 g foram fornecidos pelo Prof. Dr. Massuo Jorge Kato, do IQ-USP da cidade de São Paulo.

3.3 Biotransformação microbiana da piplartina

3.3.1 Micro-organismos utilizados

A piplartina foi submetida a experimentos de biotransformação pelos fungos endofíticos *Papulaspora immersa* SS13, isolado de *Smallanthus sonchifolius* (GALLO et al., 2010), e *Penicillium crustosum* VR4, isolado de *Viguiera robusta* (GUIMARÃES et al., 2010), ambos pertencentes à coleção de micro-organismos endofíticos do Laboratório de Química de Micro-organismos (LQMo) da FCFRP-USP, coordenado pela Profa. Dra. Mônica T. Pupo. Também foram utilizados os fungos *Cunninghamella echinulata* ATCC 8688a e *Beauveria bassiana* ATCC 7159, adquiridos da American Type Culture Collection (ATCC) e o fungo de solo *Mucor rouxii* NRRL 1894, que foi gentilmente cedido pelo Dr. C. W. Hesseltine (Northern Utilization Research and Development Division, ARS, USDA, Peoria, IL, USA),

pertencente à coleção mantida no Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

3.3.2 Determinação das concentrações inibitórias mínimas

As concentrações inibitórias mínimas (CIMs) foram determinadas para verificar a partir de qual concentração a piplartina é tóxica para cada micro-organismo e obter as concentrações ideais de trabalho. Para isso, os fungos foram primeiramente cultivados em placas de Petri contendo o meio PDA (Ágar Dextrose Batata), ou em tubos contendo o meio malte (2,0% de extrato de malte, 2,0% de glicose, 0,1% de peptona, 1,8% de ágar em água deionizada) no caso do fungo *M. rouxii*. Após sete dias de crescimento, foram adicionados os meios líquidos em que as biotransformações seriam realizadas, e o micélio foi raspado para obter uma suspensão rica de células dos fungos.

Em seguida, foram adicionados 100 µL de meio em uma fileira de poços de uma placa de 96 poços, e foram realizadas diluições seriadas de razão 2 de uma solução estoque de piplartina no meio de cultura na concentração de 1600 µg.mL⁻¹. Por fim, foram adicionados 80 µL de meio e 20 µL da suspensão de células dos fungos. Desse forma, foram avaliadas as concentrações de 400 µg.mL⁻¹ à 195,30 ng.mL⁻¹. Foram realizados os controles positivos de crescimento dos fungos nos meios, os controles negativos com o antifúngico actidione, os controles de esterilidade dos meios e das soluções de piplartina. As placas foram incubadas à 30 °C, e as CIMs foram determinadas visualmente pela comparação do crescimento fúngico com os dos controles. As CIMs foram consideradas as menores concentrações dos compostos capazes de inibir os crescimentos dos micro-organismos.

3.3.3 Padronização do crescimento

Os crescimentos dos fungos foram primeiramente padronizados em meios pré-fermentativos, que são ricos em nutrientes. Para isso, os fungos foram inoculados nos meios e incubados sob agitação à 120 rpm, 30 °C por 10 dias. Em intervalos de 24 horas, o micélio de um Erlenmeyer foi filtrado e seco em estufa à

aproximadamente 80 °C. Em seguida foram plotados gráficos de massa micelial X tempo.

Os crescimentos dos fungos comerciais *C. echinulata* ATCC 8688a e *B. bassiana* ATCC 7159 foram padronizados no meio PDB (Caldo Dextrose Batata). A padronização do crescimento do fungo *M. rouxii* foi previamente estabelecida pela professora Dra. Niede A. J. C. Furtado da FCFRP – USP, e foi realizada no meio pré-fermentativo (JACKSON et al., 1993), que é formado por 0,25% de pó de milho, 1% de glicose, 1% de farinha de aveia, 4% de pasta de tomate, 1% de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 10 mL/L da solução com traços de elementos (0,1% de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1% de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,0025% de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,01% de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,056% de H_3BO_3 , 0,0019% de $(\text{NH}_4)_6\text{MoO}_7 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ e 0,02% de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ em água deionizada).

O crescimento do fungo *P. immersa* SS13 foi padronizado no meio pré-fermentativo I (5 g de triptona, 10 g de dextrose, 3 g de extrato de levedura, 10 g de extrato de malte para 1 L de água destilada com pH = 6,2 a 6,4). A padronização de crescimento do *P. crustosum* VR4 foi realizada no meio pré-fermentativo II (Czapek modificado: 100 mL de uma solução de glicose 50 g/L em água destilada + 100 mL de solução contendo 1 g de extrato de levedura, 5 g de KH_2PO_4 , 2 g de NaNO_3 , 0,5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ para 1 L de água destilada, pH entre 6,5 - 7,0).

3.3.4 Procedimento geral de biotransformação em pequena escala

De uma forma geral, os fungos foram semeados em meio sólido, nas mesmas condições do item 3.3.2. Em seguida foram cultivados em um meio pré-fermentativo até obtenção de uma quantidade satisfatória de massa micelial, determinada a partir da curva de crescimento. Os fungos foram filtrados e transferidos em ambiente asséptico para Erlenmeyers contendo um meio fermentativo adequado e uma quantidade não tóxica da piplartina para os micro-organismos. A piplartina foi primeiramente diluída em dimetilsulfóxido (DMSO), e, em seguida, essa solução foi adicionada nos meios fermentativos, onde a quantidade final de DMSO foi 1%.

Primeiramente, as biotransformações foram realizadas em pequena escala durante 10 dias para identificar quais os fungos biotransformariam a piplartina, possibilitando a seleção do melhor dia para realizar a extração dos metabólitos em escala ampliada. Para isso, em intervalos de 24 horas, um Erlenmeyer contendo a

piplartina e o fungo, e outro com o fungo e 1% DMSO foram filtrados, os micélios foram extraídos com etanol, e os caldos das culturas foram extraídos por partição com acetato de etila. Para verificar a estabilidade da piplartina, foram retiradas alíquotas de 10 mL dos controles da piplartina diluída em 1% de DMSO nos meios fermentativos, e essas soluções foram submetidas à partição com acetato de etila. Por fim, os extratos de biotransformação foram obtidos a partir da evaporação dos solventes utilizados anteriormente. Todos os meios de cultivo foram previamente autoclavados por 20 min a 121 °C e as biotransformações foram realizadas em shaker sob agitação de 120 rpm, à 30 °C. Esse procedimento foi realizado conforme descrito nos itens 3.3.4.1 - 3.3.4.5

3.3.4.1 Biotransformação da piplartina pelo fungo *P. immersa* SS13

O fungo foi, primeiramente, cultivado em placas de Petri contendo o meio PDA, em estufa a 30 °C por 7 dias. Em seguida, três discos de aproximadamente 6 mm de meio contendo o micélio foram transferidos para cada um dos 20 Erlenmeyers (250 mL) contendo 100 mL do meio pré-fermentativo I descrito no item 3.3.3. Esses frascos foram incubados sob agitação a 120 rpm, 30 °C por 6 dias.

Após esse período as massas miceliais foram filtradas e transferidas em ambiente asséptico para outros 20 Erlenmeyers de 500 mL contendo 200 mL do meio fermentativo Koch's K1 (glicose 0,18%, peptona 0,06% e extrato de levedura 0,04% para 100 mL de água destilada). A piplartina foi adicionada na concentração final de 0,1 mg.mL⁻¹ em 10 Erlenmeyers, os outros 10 foram utilizados como controles, e, por fim, os Erlenmeyers foram mantidos em shaker sob agitação de 120 rpm, à 30 °C. Os extratos foram obtidos pela partição dos caldos das culturas com acetato de etila. Este método mostrou-se eficiente para a biotransformação da lactona sesquiterpênica enidrina por *P. immersa* SS13 em trabalho de mestrado realizado no LQMo-FCFRP-USP (ALMEIDA, 2010).

3.3.4.2 Biotransformação da piplartina pelo fungo *P. crustosum* VR4

O fungo foi primeiramente cultivado em placas de Petri contendo o meio PDA, em estufa a 30 °C por 7 dias. Em seguida, seis discos de 6 mm de meio contendo o micélio foram transferidos para cada Erlenmeyers de 500 mL contendo 200 mL do

meio pré-fermentativo II descrito no item 3.3.3, totalizando 20 Erlenmeyers. Esse mesmo meio sem a glicose foi utilizado no cultivo fermentativo. A piplartina foi adicionada na concentração final de $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ em 10 Erlenmeyers, os outros 10 foram utilizados como controles, e, por fim, os Erlenmeyers foram mantidos em shaker sob agitação de 120 rpm, à 30°C . Os extratos foram obtidos pela partição dos caldos das culturas com acetato de etila. As condições de biotransformação usando *P. crustosum* VR4 foram adaptadas de outros experimentos de biotransformação (ALMEIDA, 2010; BORGES, 2010).

3.3.4.3 Biotransformação da piplartina pelo fungo *M. rouxii* NRRL 1894

O fungo foi cultivado em tubos de ensaio contendo o meio extrato de malte e mantido em estufa a 30°C por 7 dias. Após esse período, foram adicionados 5 mL de água deionizada estéril, os esporos foram raspados, contados em câmara de Neubauer e transferidos para 20 Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL do meio pré-fermentativo descrito por JACKSON et al. (1993), obtendo a concentração final de 4×10^6 esporos/mL por Erlenmeyer. Após 48 horas de crescimento, a massa micelial foi filtrada e transferida em ambiente asséptico para outros 20 Erlenmeyers de 500 mL contendo 100 mL do meio fermentativo Koch's K1 (CAPEL et al., 2011). A piplartina foi adicionada na concentração final de $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ em 10 Erlenmeyers, os outros 10 foram utilizados como controles, e, por fim, os Erlenmeyers foram mantidos em shaker sob agitação de 120 rpm, à 30°C . Os extratos foram obtidos pela partição dos caldos das culturas com acetato de etila.

3.3.4.4 Biotransformação da piplartina pelo fungo *C. echinulata* ATCC 8688a

O fungo foi primeiramente cultivado em placas de Petri contendo o meio PDA em estufa a 30°C por 7 dias. Em seguida, três discos de aproximadamente 6 mm de meio contendo o micélio foram transferidos para cada um dos 20 Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL do meio PDB. Após 6 dias a massa micelial foi filtrada e transferida para outros 20 Erlenmeyers de 500 mL contendo 100 mL do meio Czapek com 1% de glicose (1% de glicose, 0,2% de NaNO_3 , 0,1% de K_2HPO_4 , 0,05% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,05% de KCl e 0,001% de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pH 7,0). A piplartina foi adicionada na concentração final de $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ em 10 Erlenmeyers,

os outros 10 foram utilizados como controles, e, por fim, os Erlenmeyers foram mantidos em shaker sob agitação de 120 rpm, à 30 °C. Os extratos foram obtidos pela partição dos caldos das culturas com acetato de etila.

3.3.4.5 Biotransformação da piplartina pelo fungo *B. bassiana* ATCC 7159

O fungo foi cultivado em placas de Petri contendo o meio PDA em estufa a 30°C por 7 dias. Após esse período, três discos de aproximadamente 6 mm de meio contendo o micélio foram transferidos para cada Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL do meio PDB, totalizando 20 Erlenmeyers. Após 6 dias os micélios foram filtrados e transferidos para outros 20 Erlenmeyers de 500 mL contendo 100 mL do meio Czapek com 1% de sacarose (1% de sacarose, 0,2% de NaNO₃, 0,1% de K₂HPO₄, 0,05% de MgSO₄ · 7H₂O, 0,05% de KCl e 0,001% de FeSO₄ · 7H₂O, pH 7,0). A piplartina foi adicionada na concentração final de 0,1 mg.mL⁻¹ em 10 Erlenmeyers, os outros 10 foram utilizados como controles, e, por fim, os Erlenmeyers foram mantidos em shaker sob agitação de 120 rpm, à 30 °C. Os extratos foram obtidos pela partição dos caldos das culturas com acetato de etila.

3.4 Análises cromatográficas das biotransformações

Os extratos das biotransformações, dos controles dos fungos e do controle de estabilidade da piplartina nos meios foram analisados em UPLC-DAD-EM. Foram obtidos os dados de EM/EM dos compostos que não apareciam nos controles, e que poderiam ser produtos de biotransformação. Essas análises foram realizadas à 35 °C em um equipamento ACQUITY UPLC-EM Waters, utilizando uma coluna C₁₈ ACQUITY 1,7µm BEH (*Ethylene Bridged Hybrid*) de 2,1x50 mm. Foi utilizado um gradiente de acetonitrila (ACN) e água ambos com 1% de ácido acético (v/v), que iniciava com 10% de ACN e atingia 100% em 5 min., e uma vazão de 0,3 mL.min⁻¹. As amostras foram diluídas na concentração de 0,1 mg.mL⁻¹ em ACN:H₂O (1:1), e o volume de injeção foi de 5 µL. As análises de massas foram realizadas no modo positivo utilizando ionização por *electrospray* e um detector triplo quadrupolo (TQ Detector, Waters). As voltagens do cone e capilar utilizadas foram, respectivamente, 15 V e 3 kV. A energia de colisão foi de 20 eV, e o argônio foi utilizado como gás de

colisão. As temperaturas de dessolvatação e da fonte foram de, respectivamente, 350 °C e 150 °C.

3.5 Análises de massas de alta resolução

Os extratos de biotransformação foram inicialmente preparados na concentração de 0,1 mg.mL⁻¹ em uma mistura contendo o mesmo volume de acetonitrila e água. Em seguida essas amostras foram filtradas em filtro de 0,2 µm e foram injetadas no espectrômetro de massas “micrOTOF Q II - ESI-TOF Mass Spectrometer” fabricado por Bruker Daltonics, Billerica, MA, EUA. As análises foram realizadas em alta resolução, e foi utilizada uma solução de NA-TFA a 10mg/ml (TOF) para calibração interna.

As infusões das amostras foram realizadas utilizando bomba de infusão Cole Parmer e um fluxo médio de 300 µL/h. As amostras foram ionizadas por uma fonte de ionização por *electrospray*, e foram analisadas no modo positivo e negativo, sendo adicionada uma pequena quantidade de ácido fórmico para favorecer a protonação, e, conseqüentemente, a detecção no modo positivo. A voltagem do capilar utilizada foi de 3,5 kV, e a temperatura de secagem foi de 180 °C. As massas de alta resolução das moléculas ionizadas foram analisadas pelo tempo de voo (TOF), e os espectros de EM/EM dos íons selecionados foram obtidos a partir da dissociação induzida por colisão (CID) com o gás N₂. As energias de colisão variaram de 5 a 40 eV, e foram construídos gráficos da energia resolvida (E_{lab}) para obter informações sobre a influência das energias internas dos íons observados e suas intensidades nos espectros de EM/EM (VESSECCHI et al., 2012).

3.6 Modelos computacionais utilizados para os estudos de fragmentação

Com o intuito de facilitar a proposição das estruturas químicas dos derivados obtidos através da metabolização da piplartina, estudos computacionais foram realizados em combinação com os resultados obtidos em IES-EM/EM. Os mecanismos de dissociação dos possíveis metabólitos foram propostos, assim como as principais vias de fragmentação com base em conceitos de reatividade química e descritores químico-quânticos de algumas propriedades intrínsecas aos estudos de espectrometria de massas (VESSECCHI et al., 2008).

Estes estudos foram realizados em colaboração com o Dr. Ricardo Vessecchi do Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos (NPPNS) da FCFRP-USP. Os modelos computacionais utilizados foram escolhidos considerando-se os menores erros em relação à geometria da pirplatina, a qual fora comparada aos dados obtidos em estudos de espectroscopia de Raios-X para os valores dos comprimentos de ligações (BOLL et al., 1984), sendo que o erro médio foi de aproximadamente 0,013 Å. Os menores erros em relação aos dados experimentais foram obtidos por se empregar o modelo B3LYP/6-31+G(d) (BECKE, 1993; LEE et al., 1988) utilizando o programa Gaussian 03 (FRISCH et al., 2004). Assim, tal modelo foi utilizado para a obtenção das grandezas termoquímicas e sítios de reatividade dos derivados, os quais são de grande importância para corroborar com os estudos de espectrometria de massas. Vessecchi e colaboradores (2008) fornecem um protocolo para os estudos de espectrometria de massas utilizando química computacional, onde os sítios de protonação são obtidos pela análise do mapa do potencial eletrostático molecular, orbitais de fronteira, cargas atômicas e afinidade protônica.

3.7 Biotransformação em escala ampliada

O fungo *P. crustosum* VR4 foi cultivado conforme o item 3.3.4.2, sendo que foram preparados 24 Erlenmeyers, cada um contendo 20 mg de piplartina. Os Erlenmeyers foram mantidos em shaker à 120 rpm e 30 °C por sete dias. Após esse período, o micélio foi filtrado e extraído com 4,8 L de etanol. O caldo da cultura foi extraído por partição com acetato de etila (3x1,6 L) e com *n*-butanol (3x1,6 L).

O fungo *B. bassiana* ATCC 8688a também foi utilizado para a biotransformação em escala ampliada. Para isso, foram utilizados 47 Erlenmeyers contendo 10 mg de piplartina cada um, conforme o item 3.3.4.5, e foram mantidos em shaker à 120 rpm e 30 °C por sete dias. Após esse período, o micélio foi filtrado e extraído com 4,7 L de etanol, e o caldo da cultura filtrado foi extraído por partição com acetato de etila (3x1,57 L) e, em seguida, com *n*-butanol (3x1,57 L).

3.8 Isolamento dos produtos de biotransformação da piplartina

Os extratos obtidos na biotransformação com *P. crustosum* VR4 em escala ampliada foram secos em rotaevaporador à temperaturas próximas de 40°C. Após a evaporação dos solventes, foram obtidos 3,2784 g de extrato etanólico, 0,7761 g de extrato de acetato de etila, e 5,8387 g de extrato butanólico. Esses extratos foram analisados em UPLC, e o extrato de acetato de etila foi selecionado para ser trabalhado inicialmente.

O extrato de acetato de etila foi fracionado em 11 frações utilizando cartuchos de SPE Supelco preenchidos com 1 g de sílica C₁₈, eluídos com 5 mL do gradiente de 100% H₂O até 100% acetonitrila (figura 9). A fração em 40% acetonitrila (29,63 mg) foi selecionada para ser purificada. Essa fração foi separada em CLAE semi-preparativo utilizando uma coluna C₁₈ eluída com um gradiente que iniciava com 30% de acetonitrila e atingia 43% de acetonitrila em 40 min. Este procedimento levou ao isolamento da substância **5** (1,35 mg; 0,28 % de rendimento), da substância **8** (1,27 mg; 0,26 % de rendimento) e da substância **9** (0,95 mg; 0,20 % de rendimento).

Figura 9. Obtenção das substâncias **5**, **8** e **9** a partir do fracionamento do extrato em acetato de etila da biotransformação da piplartina pelo fungo *P. crustosum* VR4.

Os extratos obtidos na biotransformação em escala ampliada com *B. bassiana* ATCC 7159 foram secos em rotaevaporador à temperaturas próximas de 40°C, sendo obtidos 0,9657 g de extrato etanólico, 1,7305 g de extrato de acetato de etila, e 11,0434 g de extrato butanólico. O extrato em acetato de etila foi fracionado em 11 frações utilizando cartuchos de SPE Supelco preenchidos com 10 g de sílica C₁₈, eluídos com 50 mL do gradiente que iniciava com 100% de H₂O, e atingia 100% de acetonitrila (figura 10). A fração em 30% acetonitrila (171,59 mg) foi selecionada para ser purificada. Essa fração foi separada em CLAE semi-preparativo utilizando uma coluna C₁₈ eluída com a fase isocrática composta por 25% de acetonitrila e 75 % de H₂O durante 40 min em uma vazão de 3 mL.min⁻¹. Este procedimento levou ao isolamento das substância **4** (25 mg; 5,32 % de rendimento), da substância **12** (47,68 mg; 10,14 % de rendimento) e da substância **11** (31,58 mg; 6,72 % de rendimento), que foi obtida em mistura.

Figura 10. Obtenção das substâncias **4** e **12** a partir do fracionamento do extrato em acetato de etila da biotransformação da piplartina pelo fungo *B. bassiana* ATCC 7159.

3.9 Obtenção e isolamento da *cis*-piplartina

A *cis*-piplartina foi obtida a partir da isomerização da piplartina em luz UV. Para isso, 20 mg de piplartina foram dissolvidos em 20 mL de CHCl₃, e, em seguida,

essa solução foi submetida a radiação de luz UV a 254 nm por 30 min. Por fim, a *cis*-piplartina foi isolada em CLAE semi-preparativo utilizando detector de índice de refração (RID). Para isso, foi utilizado a mesma coluna C₁₈ utilizada no item anterior, e a fase móvel isocrática de 40% de acetonitrila e 60% H₂O em uma vazão de 3 mL.min⁻¹ (anexo 4).

3.10 Determinação estrutural dos compostos isolados

As estruturas dos compostos isolados foram determinadas utilizando dados de RMN de ¹H, RMN de ¹³C, HMQC, HMBC e COSY, obtidos em espectrômetros Bruker® DRX 500 e Bruker® DRX 400, espectros de massas de baixa (UPLC-EM) e alta resolução (micrOTOF Q II), rotação óptica específica (α_D), e por comparação com dados da literatura.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Fragmentação da piplartina e de seus derivados em IES-EM/EM

A piplartina apresentou uma fragmentação característica em IES-EM/EM (figura 11). A ligação amida que une o anel lactâmico e a parte derivada do ácido 3,4,5-trimetoxicinâmico da piplartina protonada (m/z 318) é rompida, formando o íon acílio com m/z 221, que é o pico base no espectro de IES-EM/EM (anexos 1 e 15).

Figura 11. Fragmentação da piplartina protonada em IES-EM/EM.

Essa fragmentação foi importante para identificação dos produtos de biotransformação, além de permitir a proposição das posições onde as alterações estruturais ocorreram na molécula. Por exemplo, a presença do íon de m/z 221 no espectro de IES-EM/EM indica que a alteração aconteceu no anel lactâmico, enquanto que a não ocorrência do íon de m/z 221 indica que a alteração ocorreu na parte derivada do ácido 3,4,5-trimetoxicinâmico, ou nessas duas regiões da piplartina.

Outros íons também foram detectados nos espectros de IES-EM/EM da piplartina e seus metabólitos, conforme podemos observar nos anexos 1, 2, 3 e 15. Diante desse fato, foram realizados cálculos computacionais em parceria com o Dr. Ricardo Vessecchi para explicar e entender melhor a fragmentação dessas substâncias em IES-EM/EM, conforme podemos observar no item 4.4. O conhecimento detalhado das reações de fragmentação em fase gasosa de uma série de substâncias semelhantes à piplartina facilitou a identificação e a proposição da estrutura química dos produtos de biotransformação.

4.2 Análises das biotransformações em pequena escala

Os extratos de biotransformação, dos controles dos fungos e de estabilidade da piplartina foram analisados em UPLC-DAD-EM (anexos 5-15). As análises dos controles possibilitaram a diferenciação dos possíveis produtos de biotransformação, sendo que foram obtidos os espectros de EM/EM das substâncias que poderiam ser derivadas da piplartina.

Os cromatogramas dos controles de estabilidade da piplartina (**1**) nos meios de biotransformação apresentaram um pico com tempo de retenção menor, mesma massa no EM, e um perfil de fragmentação no EM muito semelhante ao da piplartina (figura 12 e anexo 15). Esse composto foi identificado como o isômero *cis*-piplartina (**2**), que pode ser formado pela exposição da piplartina a luz UV (JYOTHI et al., 2009). Para confirmar a formação desse composto, a piplartina (**1**) foi diluída em clorofórmio (1 mg.mL^{-1}) e essa solução foi submetida à luz UV (224 nm) por 20 min. A *cis*-piplartina (**2**) foi isolada em CLAE preparativo e sua estrutura foi determinada conforme o item 4.3.

Figura 12. Perfil cromatográfico da piplartina após exposição à luz UV. Coluna C₁₈ ACQUITY 1,7 μ m BEH de 2,1x50 mm e fase móvel gradiente de acetonitrila (ACN) e água ambos com 1% de ácido acético (v/v) (10% a 100% de ACN, em 5 min.), e uma vazão de 0,3 mL.min⁻¹ em UPLC-DAD.

A piplartina foi utilizada nos experimentos de biotransformação na concentração de $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$, pois não inibiu o crescimento dos fungos nessa concentração. Todos os fungos utilizados biotransformaram a piplartina. Como

resultado, 14 substâncias majoritárias foram identificadas como produtos de biotransformação, sendo que cinco substâncias foram isoladas em quantidade e pureza suficiente para serem identificadas por RMN.

Os extratos de biotransformação também foram injetados em um espectrômetro de massas de alta resolução (micrOTOF Q II) operado no modo positivo e negativo na tentativa de obter as massas de alta resolução dos produtos de biotransformação. Essas análises não forneceram os dados de alta resolução de todas as substâncias identificadas no UPLC-EM. Provavelmente, como todas as substâncias presentes nas amostras foram injetadas diretamente no aparelho, algumas substâncias se ionizaram mais facilmente, sendo, dessa forma, detectadas, enquanto outras não se ionizaram suficientemente para serem detectadas. Além disso, também pode ter ocorrido supressão iônica no momento da ionização (VESSECCHI et al., 2011).

Conforme veremos a seguir, os fungos catalisaram principalmente reações de oxidação, redução e hidrólise. Essas reações são características do metabolismo de fase I de humanos, o que comprova a importância da utilização de fungos em estudos preliminares de metabolismo de substâncias bioativas.

4.2.1 Análises das biotransformações em pequena escala pelo fungo *P. crustosum* VR4

O fungo endofítico *P. crustosum* VR4 biotransformou a pilartina em sete derivados majoritários, conforme ilustrado na figura 13. No sétimo dia de biotransformação foram detectados oito produtos em maiores quantidades, e as intensidades dos picos referentes a essas substâncias foram diminuindo com o passar dos dias, conforme podemos observar nos anexos 5 e 6.

A substância **9** foi detectada já no primeiro dia de biotransformação, e apresentou a introdução de duas unidades de massa no anel lactâmico, pois apresentou m/z 320 e o íon de m/z 221 no seu espectro de EM/EM (anexo 15). Esses dados sugeriram a redução da ligação dupla $\Delta^{3,4}$. Essa substância foi identificada como a 3,4-diidropilartina de acordo com o item 4.3.1.

A substância **6** foi detectada no segundo dia de biotransformação, apresenta m/z de 334 e o íon de m/z 221 em seu espectro de EM/EM (anexo 15). De acordo com esses dados, foi proposto que o fungo oxidou a piplartina no anel lactâmico,

podendo ter ocorrido uma epoxidação ou hidroxilação. Inicialmente sugere-se que houve uma hidroxilação, pois esse fungo também hidroxilou outras substâncias (BORGES, 2010). O íon referente a esse derivado foi detectado no espectro de massas de alta resolução no modo negativo, o que confirma essa suposição, visto que essa substância perde o hidrogênio da hidroxila para se ionizar (tabela 1).

No terceiro dia de biotransformação foram detectados os compostos **4**, **7** e **8**. O composto **4** apresentou m/z 239, e o íon de m/z 221 em seu espectro de EM/EM (anexo 15). Essa substância foi identificada como o ácido 3,4,5-trimetoxicinâmico de acordo com o item 4.3.2. A substância **7** apresentou m/z 336, e o íon de m/z 237 em seu espectro de EM/EM (anexo 15). De acordo com esses dados, provavelmente ocorreu uma hidroxilação ou epoxidação na parte derivada do ácido 3,4,5-trimetoxicinâmico e uma redução no anel lactâmico. Essa substância pode ter sido formada a partir de uma oxidação na estrutura da substância **9**. A substância **8** possui m/z 320 e o íon de m/z 223 em seu espectro de EM/EM (anexo 15), e foi identificada como a 8,9-diidropiartina de acordo com o item 4.3.1.

Aldrich, e submetido ao experimento de biotransformação pelo fungo *P. crustosum* VR4 de acordo com o item 3.3.4.2. A substância **5** com m/z 211 e tempo de retenção de 2,29 min não foi detectada neste experimento, conforme podemos observar na figura 14. O que indica que esse composto pode ter sido formado a partir da piplartina ou de outro de seus derivados.

Figura 14. Perfis cromatográficos das biotransformações do ácido 3,4,5-trimetoxicinâmico nas concentrações de 0,05 e 0,1 mg.mL⁻¹ pelo fungo *P. crustosum* VR4 em UPLC utilizando detector de massas seletivo para o íon de m/z 211 e detector de DAD. Coluna C₁₈ ACQUITY 1,7µm BEH de 2,1x50 mm e fase móvel gradiente de acetonitrila (ACN) e água ambos com 1% de ácido acético (v/v), (10% a 100% de ACN, em 5 min.), e uma vazão de 0,3 mL.min⁻¹.

A substância **3** foi detectada no quinto dia de biotransformação, possui m/z de 368, fragmenta formando os íons de m/z 221, m/z 193, e m/z 190 em seu espectro de EM/EM (anexo 15). A substância **16** também foi detectada nesse dia, possui m/z de 384 e também apresenta os íons de m/z 221, m/z 193, e m/z 190 em seu espectro de EM/EM (anexo 15). De acordo com esses dados, podemos propor que essas substâncias se tratam de produtos de biotransformação que sofreram alterações no anel lactâmico da piplartina, sendo necessário o isolamento de maior quantidade dessas substâncias para a identificação por RMN.

Para confirmar as fórmulas moleculares dos produtos descritos acima, o extrato de biotransformação do sétimo dia foi injetado diretamente em espectrômetro de massas de alta resolução operado nos modos positivos e negativos (anexo 16). Esses dados juntamente com a massa teórica e o erro em ppm estão descritos na tabela 1.

Tabela 1. Principais íons observados nos espectros de HRESIMS do extrato do sétimo dia de biotransformação pelo fungo *P. crustosum* VR4.

Substância	Fórmula molecular	Massa observada	Massa teórica	Erro (ppm)
1	$C_{17}H_{19}NO_5Na^+$	340,1158	340,1155	0,88
16	-	384,1476	-	-
3	-	368,1524	-	-
4	$C_{12}H_{13}O_5^-$	237,0757	237,0757	0,00
6	$C_{17}H_{20}NO_6^+$	334,1286	334,1285	0,30
8 e 9	$C_{17}H_{22}NO_5^+$	320,1491	320,1492	0,31
8 e 9	$C_{17}H_{21}NO_5Na^+$	342,1318	342,1312	1,75

A biotransformação da piplartina pelo fungo endofítico *P. crustosum* VR4 formou a maior quantidade e diversidade de derivados. Isso pode ter ocorrido, pois esse micro-organismo pode possuir defesas para se proteger das substâncias produzidas pelas plantas (BORGES et al., 2009b), uma vez que ele habitava o interior de folhas de *V. robusta* (GUIMARÃES et al., 2010). Uma de suas adaptações pode ser a capacidade de biotransformar substâncias que sejam prejudiciais para esse fungo, tornando-as menos tóxicas. Provavelmente essa adaptação favoreceu a biotransformação da piplartina por esse micro-organismo, uma vez que essa substância também é produzida por plantas, e possui atividade antifúngica (NAVICKIENE et al., 2000).

O fungo *P. crustosum* VR4 também já biotransformou outras substâncias de forma similar ao metabolismo humano, como os fármacos propranolol, tioridazina, e albendazol, produzindo principalmente derivados hidroxilados e sulfoxidados (BORGES et al., 2009c; BORGES et al., 2008; CARRÃO et al., 2011). Dessa forma, esse micro-organismo endofítico se destaca, e, por isso, vem sendo amplamente utilizado por nosso grupo de pesquisa e por colaboradores em estudos de metabolismo de produtos naturais e fármacos (BARTH, 2012; BORGES, 2010; BORGES, 2008).

4.2.2 Análises das biotransformações em pequena escala pelo fungo *B. bassiana* ATCC 7159

O fungo *B. bassiana* ATCC 7159 biotransformou a piplartina em três derivados principais (figura 15 e anexo 7). O melhor tempo para a biotransformação com *B. bassiana* foi o sétimo dia, pois aparentemente esses três derivados foram formados em maiores quantidades, conforme ilustrado no anexo 4.

A substância **12** foi detectada a partir do segundo dia de biotransformação. Esse composto apresentou m/z 334 e o íon de m/z 221 em seu espectro de EM/EM (anexo 15), o que indica que sofreu uma oxidação no anel lactâmico. Essa substância apresenta a mesma massa e fragmentação no EM/EM muito semelhante à da substância **6**, descrita no item anterior, mas **6** e **12** apresentam tempos de retenção diferentes, o que sugere que ambas sofreram oxidação no anel lactâmico, porém em posições diferentes. A elucidação estrutural da substância **12** está descrita no item 4.3.2.

A substância **11** foi detectada a partir do quarto dia de biotransformação, e assim como a **12**, apresenta m/z 334 e o íon de m/z 221 em seu espectro de EM/EM (anexo 15), mas possui tempo de retenção diferente. A substância **10** foi formada a partir do sétimo dia de biotransformação e apresentou m/z 352 e o íon de m/z 221 em seu espectro de EM/EM (anexo 15), o que indica que sofreu alterações no anel lactâmico. Dessa forma, essa substância possui 34 u a mais que a piplartina, e podemos sugerir que o fungo *B. bassiana* ATCC 7159 adicionou dois átomos de oxigênio e dois de hidrogênio no anel lactâmico. Dessa forma, essa substância possui fórmula molecular $C_{17}H_{21}NO_7$, essa proposta está condizente com os dados de espectrometria de massas de alta resolução, conforme podemos observar na tabela 2.

Figura 15. Perfil cromatográfico do sétimo dia de biotransformação da piplartina pelo fungo *B. bassiana* ATCC 7159 e estruturas químicas dos produtos obtidos. Coluna C₁₈ ACQUITY 1,7µm BEH de 2,1x50 mm e fase móvel gradiente de acetonitrila (ACN) e água ambos com 1% de ácido acético (v/v) (10% a 100% de ACN, em 5 min.), e uma vazão de 0,3 mL.min⁻¹ em UPLC-DAD.

Esse extrato também foi injetado em espectrômetro de massas de alta resolução (anexo 17), e os principais dados dessas análises estão descritos na tabela 2. A substância com duas hidroxilas foi detectada apenas no modo negativo, provavelmente esse fato pode ser devido à supressão iônica, que pode ter ocorrido no momento da ionização no espectrômetro de massas.

Tabela 2. Principais íons observados nos espectros de HRESIMS do extrato do sétimo dia de biotransformação pelo fungo *B. bassiana* ATCC 7159.

Substância	Fórmula molecular	Massa observada	Massa teórica	Erro (ppm)
1	C ₁₇ H ₂₀ NO ₅ ⁺	318,1341	318,1336	1,57
1	C ₁₇ H ₁₉ NO ₅ Na ⁺	340,1170	340,1155	4,41
10	C ₁₇ H ₂₀ NO ₇ ⁻	350,1236	350,1234	0,57
4	C ₁₂ H ₁₃ O ₅ ⁻	237,0761	237,0757	1,69
11 e 12	C ₁₇ H ₂₀ NO ₆ ⁺	334,1292	334,1285	2,09
11 e 12	C ₁₇ H ₁₉ NO ₆ Na ⁺	356,1071	356,1105	9,55
11 e 12	C ₁₇ H ₁₈ NO ₆ ⁻	332,1129	332,1129	0,00
11 e 12	C ₁₇ H ₁₉ NO ₆ Cl ⁻	368,0902	368,0895	1,90

O fungo *B. bassiana* ATCC 7159 já é conhecido por catalisar várias reações, como, por exemplo, hidroxilação, hidrólise, acetilação, glicosilação, desmetoxilação, e redução de carbonila α,β-insaturada (BUCHANAN et al., 2000; OSORIO-LOZADA

et al., 2008; BARTH et al., 2012). Nas biotransformações realizadas com a piplartina não foram encontrados derivados desmetoxilados, glicosilados, acetilados ou com as duplas ligações α às carbonilas reduzidas. Provavelmente as enzimas que catalisam essas reações não foram expressas nas condições experimentais utilizadas, ou essas enzimas encontraram impedimentos químicos e/ou estéricos para biotransformar a piplartina.

4.2.3 Análises das biotransformações em pequena escala pelo fungo *M. rouxii* NRRL 1894

O fungo *M. rouxii* NRRL 1894 também biotransformou a piplartina, e formou quatro produtos (figura 16). Esses quatro produtos foram aparentemente formados em maiores quantidades no terceiro dia de biotransformação, e foram diminuindo suas intensidades com o passar dos dias (anexos 9 e 10).

As substâncias **8** e **13** foram detectadas no primeiro dia de biotransformação. A substância **13** possui m/z 241 e o íon de m/z 195 em seu espectro de EM/EM (anexo 15), o que sugere que sofreu a perda do anel lactâmico e uma redução em sua estrutura. Essa substância pode ter sido formada a partir da hidrólise da ligação amida da substância **8**.

As substâncias **9** e **4** foram formadas pelo *M. rouxii* e detectadas no segundo dia de biotransformação. Dessa forma, esse fungo catalisou reações de redução de ligações duplas e hidrólise de amida. Ambas as substâncias **4** e **9** foram previamente identificadas como produtos de biotransformação da piplartina por *P. crustosum* VR4, sendo que a substância **4** também foi identificada no experimento de biotransformação da piplartina por *B. bassiana* ATCC 7159.

Figura 16. Perfil cromatográfico do terceiro dia de biotransformação da piplartina pelo fungo *M. rouxii* NRRL 1894 e estruturas químicas dos produtos formados. Coluna C₁₈ ACQUITY 1,7µm BEH de 2,1x50 mm e fase móvel gradiente de acetonitrila (ACN) e água ambos com 1% de ácido acético (v/v) (10% a 100% de ACN, em 5 min.), e uma vazão de 0,3 mL.min⁻¹ em UPLC-DAD.

O extrato do terceiro dia de biotransformação também foi analisado em espectrômetro de massas de alta resolução (anexo 18) para confirmar as fórmulas moleculares dos metabólitos identificados, e os dados de suas massas estão descritos na tabela 3.

Tabela 3. Principais íons observados nos espectros de HRESIMS do extrato do terceiro dia de biotransformação pelo fungo *M. rouxii* NRRL 1894.

Substância	Fórmula molecular	Massa observada	Massa teórica	Erro (ppm)
1	C ₁₇ H ₂₀ NO ₅ ⁺	318,1350	318,1336	4,40
1	C ₁₇ H ₁₉ NO ₅ Na ⁺	340,1180	340,1155	7,35
4	C ₁₂ H ₁₃ O ₅ ⁻	237,0762	237,0757	2,11
13	C ₁₂ H ₁₆ O ₅ Na ⁺	263,0905	263,0890	5,70
13	C ₁₂ H ₁₅ O ₅ ⁻	239,0925	239,0914	4,60
8 e 9	C ₁₇ H ₂₂ NO ₅ ⁺	320,1502	320,1492	3,12
8 e 9	C ₁₇ H ₂₁ NO ₅ Na ⁺	342,1332	342,1312	5,85

O fungo *M. rouxii* NRRL 1894 já foi utilizado em estudos de biotransformação de produtos naturais bioativos, como terpenos, onde catalisou principalmente hidroxilação, e oxidação de álcool para cetona. Esse micro-organismo biotransformou o ácido oleanóico, e formou um derivado que apresenta elavada

atividade frente à bactéria *Porphyromonas gingivalis*, que é um dos principais causadores de doenças periodontais (CAPEL et al., 2011). Esse fungo também biotransformou o diterpeno ácido *ent*-pimara-8(14),15-dien-19-oico, que apresenta atividade antimicrobiana frente aos principais micro-organismos causadores de caries dentais, e formou um produto mais ativo que seu precursor (SEVERIANO et al., 2010). Além disso, foi capaz de metabolizar os fármacos risperidona e albendazol, formando metabólitos produzidos pelo metabolismo humano (JESUS et al., 2011; HILÁRIO et al., 2012). Como podemos perceber, o fungo *M. rouxii* NRRL 1894 também se destaca em estudos de biotransformação.

4.2.4 Análises das biotransformações em pequena escala pelo fungo *P. immersa* SS13

O fungo endofítico *P. immersa* SS13 também biotransformou a piplartina, formando três derivados majoritários (figura 17). Provavelmente esse fungo catalisou outras reações na estrutura química da piplartina, pois outras substâncias também foram detectadas, mas não foi possível propor suas estruturas apenas com os dados dos espectros de massas. O melhor tempo de biotransformação foi o terceiro dia (anexos 11 e 12).

Esse micro-organismo reduziu a dupla ligação do anel lactâmico já no primeiro dia de biotransformação, sendo detectada a substância **9**, já identificada nos experimentos de biotransformação utilizando *P. crustosum* VR4, e *M. rouxii* NRRL 1894. Além disso, nesse mesmo dia também foi detectada a presença da substância **14**, que também apresentou m/z 320 e o íon de m/z 221 em seu espectro do EM/EM (anexo 15). Essa substância pode ter sido formada a partir da isomerização da substância **9**.

Esse micro-organismo também hidrolisou a ligação amida que une o anel lactâmico à parte derivada do ácido 3,4,5-trimetoxicinâmico formando a substância **4**, que apresentou m/z 239. Essa substância foi detectada no primeiro dia de biotransformação, e também já foi previamente identificada nas biotransformações catalisadas por *P. crustosum* VR4, *B. bassiana* ATCC 7159 e *M. rouxii* NRRL 1894.

Figura 17. Perfil cromatográfico do terceiro dia de biotransformação da piplartina pelo fungo *P. immersa* SS13 e estruturas químicas dos produtos formados. Coluna C₁₈ ACQUITY 1,7µm BEH de 2,1x50 mm e fase móvel gradiente de acetonitrila (ACN) e água ambos com 1% de ácido acético (v/v) (10% a 100% de ACN, em 5 min.), e uma vazão de 0,3 mL.min⁻¹ em UPLC-DAD.

As fórmulas moleculares desses produtos de biotransformação foram confirmadas pelos espectros de massas em alta resolução presentes no anexo 19, e os dados de suas massas estão descritos na tabela a seguir:

Tabela 4. Principais íons observados nos espectros de HRESIMS do extrato do terceiro dia de biotransformação pelo fungo *P. immersa* SS13.

Substância	Fórmula molecular	Massa observada	Massa teórica	Erro (ppm)
1	C ₁₇ H ₂₀ NO ₅ ⁺	318,1332	318,1336	1,26
1	C ₁₇ H ₁₉ NO ₅ Na ⁺	340,1160	340,1155	1,47
4	C ₁₂ H ₁₃ O ₅ ⁻	237,0755	237,0757	0,84
9 e 14	C ₁₇ H ₂₂ NO ₅ ⁺	320,1476	320,1492	5,00
9 e 14	C ₁₇ H ₂₁ NO ₅ Na ⁺	342,1307	342,1312	1,46

Apesar desse micro-organismo ser endofítico, ele não produziu uma grande variedade de metabólitos assim como o fungo *P. crustosum* VR4. Provavelmente o fungo *P. immersa* SS13 possui outras maneiras de se proteger das substâncias produzidas pelas plantas. Esse fungo também já foi utilizado em outros trabalhos, como, por exemplo, na biotransformação do albendazol, onde o mesmo foi capaz de produzir o mesmo metabólito humano, o sulfóxido de albendazol (HILÁRIO et al., 2012), um produto de reação de S-oxidação.

4.2.5 Análises das biotransformações em pequena escala pelo fungo *C. echinulata* ATCC 8688a

O fungo *C. echinulata* ATCC 8688a biotransformou a piplartina em quatro derivados, porém, foi o fungo menos efetivo no processo de biotransformação, devido à menor intensidade dos picos cromatográficos dos produtos formados (figura 18 e anexos 13 e 14). Também foi utilizado outro meio, Czapek com 1% de sacarose, para verificar se o rendimento de biotransformação seria aumentado, mas essa alteração não foi produtiva. Diante disso, a linhagem *C. elegans* ATCC 10028b também foi utilizada, mas também não foi eficiente para a biotransformação da piplartina (figura 19).

Os compostos **4**, **9**, **12** e **15** foram formados no segundo dia de biotransformação pelo fungo *C. echinulata* ATCC 8688a. As substâncias **4**, **9** e **12** já foram previamente identificadas nos experimentos de biotransformação da piplartina por *P. crustosum* VR4 (**4** e **9**), *B. bassiana* ATCC 7159 (**4** e **12**), *M. rouxii* NRRL 1894 (**4** e **9**) e *P. immersa* SS13 (**4** e **9**). A substância **15** apresentou m/z 336 e o íon de m/z de 221 em seu espectro de EM/EM (anexo 15). Dessa forma, pode ter ocorrido uma redução e uma oxidação no anel lactâmico da piplartina, podendo, por exemplo, ter sido formado a partir de uma hidroxilação da substância **9**, ou essa substância pode ter sido formada a partir de uma adição de água na dupla ligação desse anel.

Figura 18. Perfil cromatográfico do décimo dia de biotransformação pelo fungo *C. echinulata* ATCC 8688a e estruturas químicas dos produtos obtidos. Coluna C_{18} ACQUITY $1,7\mu m$ BEH de $2,1 \times 50$ mm e fase móvel gradiente de acetonitrila (ACN) e água ambos com 1% de ácido acético (v/v) (10% a 100% de ACN, em 5 min.), e uma vazão de $0,3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ em UPLC-DAD.

Figura 19. Perfil cromatográfico do décimo dia de biotransformação da piplartina pelos fungos *C.echinulata* ATCC 8688a e *C. elegans* ATCC 10028b em meios Czapek com glicose e com sacarose. Coluna C₁₈ ACQUITY 1,7µm BEH de 2,1x50 mm e fase móvel gradiente de acetonitrila (ACN) e água ambos com 1% de ácido acético (v/v) (10% a 100% de ACN, em 5 min.), e uma vazão de 0,3 mL.min⁻¹ em UPLC-DAD.

O extrato do décimo dia de biotransformação foi analisado nos modos positivo e negativo em espectrômetro de massas de alta resolução na tentativa de obter as massas de alta resolução dos derivados citados anteriormente (anexo 20), mas apenas um pequeno sinal referente à substância **4** foi detectado no modo negativo. Esses metabólitos provavelmente não ionizaram de forma eficaz e, conseqüentemente, não foram detectados nas análises realizadas no espectrômetro de massas de alta resolução.

Os fungos do gênero *Cunninghamella* são amplamente utilizados em estudos de biotransformação, sendo conhecidos por catalisarem reações semelhantes às do metabolismo humano tanto de fase I, quanto de fase II. Esses micro-organismos já foram utilizados para biotransformar os mais variados tipos de substâncias, como produtos naturais e fármacos (ASHA e VIDYAVATHI, 2009; ZHANG et al., 1996). Provavelmente o fungo *C. echinulata* ATCC 8688a apresenta outros mecanismos de defesa para se proteger da piplartina, uma vez que não foi necessário alterar a estrutura dessa substância para manter se vivo.

4.3 Determinação estrutural das substâncias isoladas

Após analisar os resultados das biotransformações em pequena escala, os fungos *P. crustosum* VR4 e *B. bassiana* ATCC 7159 foram selecionados para a ampliação da escala dos experimentos de biotransformação, com o objetivo de isolar e determinar as estruturas químicas dos metabólitos formados. Foram isolados e identificados três produtos de biotransformação da piplartina por *P. crustosum* VR4 e dois produtos formados por *B. bassiana* ATCC 7159. Também foram isoladas outras substâncias, mas, infelizmente, não estavam puras e/ou em quantidade suficiente para a identificação estrutural.

Para facilitar a identificação das substâncias isoladas, serão atribuídos primeiramente os dados de RMN de ^1H e de RMN de ^{13}C da piplartina (figura 20). O espectro de RMN de ^1H da piplartina (**1**) apresentou 19 hidrogênios correspondentes a hidrogênios metilênicos, metoxílicos, aromáticos e vinílicos (tabela 5 e figura 21). Os singletos em δ 6,79 (2H aromáticos), δ 3,88 (6H metoxílicos) e em δ 3,86 (3H metoxílicos) correspondem aos sinais dos hidrogênios que formam o anel 12,13,14-trimetoxifenílico. Os hidrogênios em δ 7,41 (*d*, 1H) e δ 7,66 (*d*, 1H) correspondem, respectivamente, aos hidrogênios vinílicos das posições 8 e 9, e estão acoplados com uma constante de 15,6 Hz característica de duplas ligações em *trans*.

Figura 20. Atribuição dos dados de RMN de ^1H em vermelho e de RMN de ^{13}C em azul da piplartina, e numeração da estrutura em preto.

O hidrogênio em δ 6,03 (*dt*, H-3) acopla com H-4 em δ 6,94 com uma constante de 9,7 Hz, que é característica de duplas ligações em *cis*, e com os hidrogênios em δ 2,47 (H-5), com uma constante de acoplamento alílica de 1,6 Hz. O H-4 acopla com o H-3 (*dt*, $J=9,7$ Hz) e com os H-5 com uma constante de 4,1 Hz.

O sinal dos H-5 se desdobra em um multipeto. O sinal dos H-6 em δ 4,03 é desblindado pelo átomo de nitrogênio vicinal, e é desdobrado em um tripleto devido ao acoplamento com H-5 ($J=6,4$ Hz).

O espectro de RMN de ^{13}C da piplartina apresentou apenas 14 sinais (figura 24), pois existe um plano de simetria no anel aromático, e, por isso, os sinais em δ 153,5; δ 105,7 e δ 56,3; correspondem, cada um, a dois carbonos magneticamente equivalentes. As correlações presentes nos espectros de HMQC e HMBC podem ser observadas nas figuras 25 e 26. Essa substância possui fórmula molecular $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{NO}_5$, conforme podemos confirmar no espectro de massas de alta resolução da figura 27 (m/z experimental $[\text{M}+\text{H}]^+$: 318,1340 e m/z calculado $[\text{M}+\text{H}]^+$: 318,1336, erro 1,26 ppm, e m/z experimental $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 340,1179 e m/z calculado $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 340,1155, erro 7,06 ppm).

Tabela 5. Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e de ^{13}C (100 MHz) da substância **1** obtidos em CDCl_3 e os dados de RMN de ^1H (200 MHz) e de ^{13}C (50 MHz) descritos na literatura (CDCl_3).

1 (CDCl_3 ; 500 MHz)			piplartina (DUH et al., 1990)	
Posição	δ_{C}	^1H δ (m; J em Hz)	δ_{C}	^1H δ (m; J em Hz)
2	165,9	-	166,7	-
3	126,0	6,03 (1H; dt , 9,7; 1,6)	126,5	6,02 (1H; dt , 9,7; 1,8)
4	145,6	6,94 (1H; dt , 9,7; 4,1)	146,4	6,95 (1H; dt , 9,7; 4,2)
5	24,9	2,47 (2H; m)	25,2	2,45 (2H; m)
6	41,8	4,03 (2H; t , 6,4)	42,1	4,04 (2H; t , 6,3)
7	169,0	-	169,7	-
8	121,2	7,41 (1H; d , 15,6)	121,7	7,41 (1H; d , 15,6)
9	143,9	7,66 (1H; d , 15,6)	144,5	7,68 (1H; d , 15,6)
10	130,8	-	131,3	-
11	105,7	6,79 (1H; s)	106,0	6,80 (1H; s)
12	153,5	-	154,1	-
13	140,2	-	141,5	-
14	153,5	-	154,1	-
15	105,7	6,79 (1H; s)	106,0	6,80 (1H; s)
OCH_3	56,3	3,88 (6H, s)	56,6	3,88 s
OCH_3	61,1	3,86 (3H, s)	61,5	3,87 s

Figura 21. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância **1**.

Figura 22. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância **1**.

Figura 23. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância **1**.

Figura 24. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) da substância **1**.

Figura 25. Mapa de contorno de HMQC (400 MHz, CDCl_3) da substância **1**.

Figura 26. Mapa de contorno de HMBC (400 MHz, CDCl_3) da substância **1**.

Figura 27. Espectro de massas de alta resolução da substância **1** no modo positivo em A e ampliação desse espectro em B.

A substância **2** foi obtida pela isomerização da piplartina de acordo com o item 3.9, e foi isolada na forma de cristais brancos. Essa substância apresentou a mesma massa molecular e padrão de fragmentação no UPLC-EM/EM muito semelhante à piplartina (anexo 15). Além disso, possui espectros de RMN de ^{13}C e de ^1H (figuras 29-34) semelhantes aos da piplartina, que foram descritos anteriormente.

A substância **2** possui 19 hidrogênios em seu espectro de RMN que correspondem a hidrogênios metilênicos, metoxílicos, aromáticos e vinílicos (tabela 6 e figura 29). O singleto dos hidrogênios aromáticos em δ 6,75, que correlaciona no HMBC (fig. 34) com os carbonos aromáticos δ 152,9, δ 138,5, δ 131,2 e δ 106,5, juntamente com os singletos dos hidrogênios metoxílicos em δ 3,84, que correlaciona no HMBC com o carbono aromático δ 138,5, e em δ 3,83, que correlaciona no HMBC com o carbono aromático δ 152,9 indicam a presença do anel 12,13,14-trimetoxifenílico (figura 28).

Os hidrogênios vinílicos em δ 6,48 (1H, *d*) e δ 6,71 (1H, *d*) estão ligados, respectivamente, aos carbonos δ 124,6 e δ 136,9, conforme podemos observar no espectro de HMQC na figura 33. Esses hidrogênios acoplam entre si com uma constante de 12,4 Hz, que é característica de duplas ligações em *cis*. O hidrogênio em δ 6,71 está ligado na posição C-9, pois correlaciona no HMBC com o carbono aromático em δ 106,5, e, além disso, os hidrogênios aromáticos em δ 6,75 correlacionam com o carbono em δ 136,9, onde esse hidrogênio está ligado. O outro hidrogênio vinílico em δ 6,48 correlaciona no HMBC com a carbonila em δ 169,2, e não apresenta correlação com o carbono aromático em δ 106,5, o que indica que está na posição C-8.

Os hidrogênios em δ 3,97 (2H, *t*, $J = 6,5$) estão na posição C-6 do anel lactâmico, uma vez que correlacionam no HMBC com as carbonilas em δ 169,2 e δ 165,3 e estão desblindados por estarem ligados ao carbono α ao átomo de nitrogênio. Os hidrogênios em δ 2,40 estão na posição C-5, pois correlacionam com os carbonos C-6 e C-4 no espectro de HMBC. Os hidrogênios em δ 5,98 e δ 6,89 acoplam entre si com um constante de acoplamento de 9,7 Hz, que é característica de duplas ligações em *cis*, e estão desblindados por pertencerem a um sistema carbonílico α,β -insaturado. O hidrogênio em δ 6,89 está mais desblindado que o hidrogênio em δ 5,98, pois está na posição β à carbonila, enquanto o outro está α à carbonila. Essa proposta está de acordo com o espectro de HMQC, em que o

hidrogênio em δ 6,89 está ligado ao carbono C-4, que possui deslocamento químico em δ 145,6, enquanto o hidrogênio em δ 5,98 está diretamente ligado ao carbono C-3 em δ 125,6, que é menos desblindado.

Conforme podemos perceber, os espectros de RMN dessa substância são muito semelhantes aos da piplartina. Essas substâncias possuem as constantes de acoplamento entre os hidrogênios vinílicos H-8 e H-9 diferentes, sendo que a constante observada para a substância **2** é característica de duplas ligações em *cis* (12,4 Hz), e a da piplartina é característica de duplas ligações em *trans* (15,6 Hz). Dessa forma, a substância **2** foi identificada como a *cis*-piplatina ou (*Z*)-1-(3-(3,4,5-trimetoxifenil)acrilil)-5,6-diidropiridin-2(1*H*)-ona (NAVICKIENE et al., 2000). Os dados de RMN obtidos estão de acordo com os descritos na literatura, conforme podemos observar na tabela 7.

Figura 28. Atribuição dos dados de RMN de ^1H em vermelho e de RMN de ^{13}C em azul da *cis*-piplartina (**2**), e numeração da estrutura em preto.

Tabela 6. Dados de RMN de ^1H (500 MHz), HMBC e de RMN de ^{13}C (125 MHz) da substância **2** em CDCl_3 .

Posição	δ $^{13}\text{C}^*$	^1H δ (m; <i>J</i> em Hz)	H $\rightarrow$ C HMBC
2	165,3	-	-
3	125,6	5,98 (1H; <i>dt</i> , 9,7; 1,5)	24,7
4	145,6	6,89 (1H; <i>dt</i> , 9,7; 4,1)	165,3; 41,2; 24,7
5	24,7	2,40 (2H; <i>m</i>)	145,6; 125,6; 41,2
6	41,2	3,97 (2H; <i>t</i> , 6,5)	169,2; 165,3; 145,6; 24,7

continua

continuação da tabela 6

7	169,2	-	-
8	124,6	6,48 (1H; <i>d</i> ; 12,4)	169,2; 131,2
9	136,9	6,71 (1H; <i>d</i> ; 12,4)	169,2; 106,5
10	131,2	-	-
11	106,6	6,75 (1H; <i>s</i>)	152,9; 138,5; 136,9; 131,2; 106,5
12	152,9	-	-
13	138,5	-	-
14	152,9	-	-
15	106,6	6,75 (1H; <i>s</i>)	152,9; 138,5; 136,9; 131,2; 106,5
OCH ₃	56,2	3,83 (6H; <i>s</i>)	152,9
OCH ₃	61,0	3,84 (3H; <i>s</i>)	138,5

* Valores obtidos através dos espectros de RMN de ¹³C e HMQC.**Tabela 7.** Dados de RMN de ¹H (200 MHz) e de RMN de ¹³C (50 MHz) da substância **2** em CDCl₃, obtidos por Navickiene et al. (2000).

Posição	δ ¹³ C	¹ H δ (m; <i>J</i> em Hz)
2	165,7	-
3	125,5	5,98 (1H; <i>dt</i> ; 9,7; 1,9)
4	145,4	6,89 (1H; <i>dt</i> ; 9,7; 4,3)
5	24,8	2,39-2,42 (2H; <i>m</i>)
6	41,1	3,97 (2H; <i>t</i> ; 7,0)
7	168,1	-
8	124,5	6,48 (1H; <i>d</i> ; 12,4)
9	136,7	6,71 (1H; <i>d</i> ; 12,4)
10	131,1	-
11	106,6	6,76 (1H; <i>s</i>)
12	152,8	-
13	145,5	-
14	152,8	-
15	106,6	6,76 (1H; <i>s</i>)
OCH ₃	56,1	3,84 (6H; <i>s</i>)
OCH ₃	60,7	3,85 (3H; <i>s</i>)

Figura 29. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância **2**.

Figura 30. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância **2**.

Figura 31. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância **2**.

Figura 32. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) da substância **2**.

Figura 33. Mapa de contorno de HMQC (500 MHz, CDCl_3) da substância **2**.

Figura 34. Mapa de contorno de HMBC (500 MHz, CDCl_3) da substância **2**.

4.3.1 Determinação estrutural dos produtos de biotransformação da piplartina pelo fungo *P. crustosum* VR4.

Os compostos **5**, **8** e **9** foram isolados a partir da biotransformação em escala ampliada da piplartina pelo fungo *P. crustosum* VR4, conforme o item 3.8, e suas estruturas foram determinadas utilizando técnicas de RMN 1D e 2D, espectrometria de massas e por comparação com os dados da piplartina e da literatura. No cromatograma da figura 35 são apresentados os picos referentes às substâncias que já foram isoladas e identificadas.

Figura 35. Cromatograma obtido no momento da separação dos compostos presentes na fração de SPE em 40% de acetonitrila do extrato de acetato de etila da biotransformação em grande escala da piplartina pelo fungo *P. crustosum* VR4. Coluna semi-preparativa C₁₈ 5 µm VP250/10 nucleosil 120-5 Macherey-Nagel 250 x 10 mm, fase móvel gradiente de ACN em H₂O (30% a 43% de ACN em 40 min) em CLAE, vazão 3 mL.min⁻¹ e detecção no UV 224 nm.

A substância **5** apresenta 14 hidrogênios em seu espectro de RMN de ¹H sendo eles aromáticos, metoxílicos, e metílicos, mas não apresenta os sinais dos hidrogênios vinílicos e do anel lactâmico (figura 37), em comparação ao espectro de RMN de ¹H da piplartina. Os hidrogênios aromáticos em δ 7,30 (2H, s), que correlacionam no HMBC com os carbonos do anel aromático em δ 154,6, δ 144,0, δ 134,0, e δ 107,2, juntamente com os hidrogênios metoxílicos em 3,89 (6H, s), que correlacionam com no HMBC (figura 40) com o carbono do anel aromático em δ 154,6, e em 3,83 (3H, s), que correlacionam no HMBC com o carbono do

anel aromático em δ 144,0 indicam a presença do anel 3,4,5-trimetoxifenílico (tabela 8).

Figura 36. Atribuição dos dados de RMN de ^1H em vermelho e de RMN de ^{13}C em azul da substância **5**, e numeração da estrutura em preto.

As correlações no HMBC dos hidrogênios do singlete em δ 2,59 (3H) com o carbono carbonílico em δ 199,6, e com os carbonos aromáticos C-1, C-2 e C-6 indicam que a metila está ligada à carbonila, que está ligada no anel aromático na posição 1. Além disso, a correlação dos hidrogênios aromáticos em δ 7,30 com a carbonila confirma que a etanona está ligada ao anel aromático na posição 1. De acordo com o espectro de HMQC (figura 39), os hidrogênios em δ 2,59 estão ligados no carbono em δ 26,3, os hidrogênios aromáticos em δ 7,30 estão ligados no carbono em δ 107,2, e os hidrogênios metoxílicos em δ 3,89 e δ 3,83 estão, respectivamente, ligados aos carbonos em δ 154,6 e δ 144,0. Dessa forma, essa substância foi identificada como a 1-(3,4,5-trimetoxifenil)-etanona. O espectro de massas também confirma que essa substância possui a fórmula molecular $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{O}_4$ (m/z experimental $[\text{M}+\text{H}]^+$: 233,0780 e m/z calculado $[\text{M}+\text{H}]^+$: 233,0784, erro 1,72 ppm). Essa substância ainda não tinha sido relatada na literatura como produto de biotransformação.

Tabela 8. Dados de RMN da substância **5** (CD₃OD, 500 MHz).

Posição	δ ¹³ C*	¹ H δ (m; <i>J</i> em Hz)	H→C HMBC
1	134,0	-	-
2	107,2	7,30 (1H; s)	199,6; 154,6; 144,0; 134,0; 107,2
3	154,6	-	-
4	144,0	-	-
5	154,6	-	-
6	107,2	7,30 (1H; s)	199,6; 154,6; 144,0; 134,0; 107,2
7	199,6	-	-
8	26,3	2,59 (3H; s)	199,6; 134,0; 107,2
OCH ₃	56,6	3,89 (6H; s)	154,6
OCH ₃	61,0	3,83 (3H; s)	144,0

* Valores obtidos indiretamente através de espectros de RMN de HMBC e HMQC.

Figura 37. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) da substância **5**.

Figura 38. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) da substância **5**.

Figura 39. Mapa de contorno de HMQC (500 MHz, CD_3OD) da substância **5**.

Figura 40. Mapa de contorno de HMBC (500 MHz, CD₃OD) da substância **5**.

Figura 41. Espectro de massas de alta resolução da substância **5** no modo positivo em A e ampliação desse espectro em B.

A substância **8** apresenta hidrogênios metilênicos, metoxílicos, aromáticos e vinílicos em seu espectro de RMN de ^1H , totalizando 21 hidrogênios (figura 43). Os sinais dos hidrogênios aromáticos em δ 6,53 (2H, s), que correlacionam no HMBC (figura 47) com os carbonos do anel aromático em δ 154,3, δ 138,7, δ 137,2, δ 106,6, juntamente com os sinais dos hidrogênios metoxílicos em δ 3,80 (6H, s) e em δ 3,71 (3H, s), que correlacionam, respectivamente, no HMBC com os carbonos aromáticos em 154,3 e 137,2, indicam a presença do anel 12,13,14-trimetoxifenílico (tabela 9).

A presença do hidrogênio em δ 5,93 (1H; *dt*), do hidrogênio em δ 6,99 (1H; *dt*), que correlaciona no HMBC com os carbonos em δ 167,1, δ 42,0 e δ 25,1, dos hidrogênios em δ 2,37 (2H; *m*), que correlacionam no HMBC com os carbonos em δ 148,0, δ 125,7 e δ 42,0, e dos hidrogênios em δ 3,91 (2H; *t*), que correlacionam no HMBC com os carbonos em δ 177,0, δ 167,1, δ 148,0 e δ 25,1, sugerem a presença do anel lactâmico, conforme figura 42.

O espectro de RMN de ^1H dessa substância não apresenta os sinais dos hidrogênios vinílicos H-8 e H-9 como os da piplartina, mas apresenta outros dois tripletos em δ 3,19 (2H; *t*, 7,7) e δ 2,88 (2H; *t*, 7,7), o que indica a dupla ligação entre os carbonos C-8 e C-9 foi reduzida. O espectro de HMQC mostra que os hidrogênios metilênicos em δ 3,19 e δ 2,88 estão, respectivamente, ligados nos carbonos em δ 41,4 e δ 32,3 (figura 46). Os espectros de EM/EM (anexos 3 e 15) confirmam a redução dessa dupla ligação, uma vez que podemos observar o íon de m/z 223 ao invés de m/z 221.

Figura 42. Atribuição dos dados de RMN de ^1H em vermelho e de RMN de ^{13}C em azul da substância **8**, e numeração da estrutura em preto.

No espectro de HMBC, os hidrogênios em δ 3,19 correlacionam com o carbono metilênico em δ 32,3; com o carbono carbonílico em δ 177,0 e com o carbono aromático em δ 138,7, essas duas últimas correlações indicam que esses hidrogênios estão próximos a carbonila da amida e ao anel aromático. Os hidrogênios em δ 2,88 correlacionam com os mesmos carbonos que os hidrogênios em δ 3,19, e com o carbono em δ 106,6, o que indica que esses hidrogênios estão na posição 9. Os hidrogênios aromáticos em δ 6,53 correlacionam apenas com o carbono δ 32,3, comprovando que os hidrogênios em δ 2,88 estão na posição 9, enquanto os em δ 3,19 estão na posição 8. Essa substância possui fórmula molecular $C_{17}H_{21}NO_5$, que é condizente com seu espectro de massas de alta resolução presente na figura 48 (m/z experimental $[M+H]^+$: 320,1477 e m/z calculado $[M+H]^+$: 320,1492, erro 4,68 ppm, e m/z experimental $[M+Na]^+$: 342,1327 e m/z calculado $[M+Na]^+$: 342,1312, erro 4,38 ppm). De acordo com esses dados, a substância **8** foi identificada como a 8,9-diidropiplartina (MAXWELL e RAMPERSAD, 1991). Os valores de deslocamentos químicos dos hidrogênios e carbonos dessa substância estão de acordo com os dados de RMN descritos na literatura, conforme podemos observar na tabela 10.

A assim como a piplartina, a 8,9-diidropiplartina também foi isolada de plantas do gênero *Piper* (MAXWELL e RAMPERSAD, 1991; NAVICKIENE et al., 2000; FACUNDO et al., 2005), mas ainda não tinha sido obtida a partir de biotransformações.

Tabela 9. Dados de RMN da substância **8** (CD_3OD , 500 MHz).

Posição	δ ^{13}C	1H δ (m; J em Hz)	H $\rightarrow$ C HMBC
2	167,1	-	-
3	125,7	5,93 (1H; dt , 9,7; 1,7)	-
4	148,0	6,99 (1H; dt , 9,7; 4,1)	167,1; 42,0; 25,1
5	25,1	2,37 (2H; m)	148,0; 125,7; 42,0
6	42,0	3,91 (2H; t , 6,4)	177,0; 167,1; 148,0; 25,1
7	177,0	-	-
8	41,4	3,19 (2H; t , 7,7)	177,0; 138,7; 32,3

continua

continuação da tabela 9

9	32,3	2,88 (2H; <i>t</i> , 7,7)	177,0; 138,7; 106,6; 41,4
10	138,7	-	-
11	106,6	6,53 (1H; <i>s</i>)	154,3; 138,7; 137,2; 106,6; 32,3
12	154,3	-	-
13	137,2	-	-
14	154,3	-	-
15	106,6	6,53 (1H; <i>s</i>)	154,3; 138,7; 137,2; 106,6; 32,3
OCH ₃	56,3	3,80 (6H; <i>s</i>)	154,3
OCH ₃	60,8	3,71 (3H; <i>s</i>)	137,2

* Valores obtidos indiretamente através de espectros de HMBC e HMQC.

Tabela 10. Dados de RMN de ¹H (MAXWELL e RAMPERSAD, 1991) e de RMN de ¹³C (NAVICKIENE et al., 2000) da substância **8** em CDCl₃.

Posição	δ ¹³ C* (50 MHz)	¹ H δ (m; <i>J</i> em Hz; 80 MHz)
2	165,4	-
3	125,8	6,02 (1H; <i>dt</i> , 9,0; 2,0)
4	145,2	6,92 (1H; <i>m</i>)
5	24,6	2,40 (2H; <i>m</i>)
6	41,0	3,99 (2H; <i>t</i> , 6,0)
7	175,5	-
8	41,0	3,26 (2H; <i>m</i>)
9	31,5	2,95 (2H; <i>m</i>)
10	136,9	-
11	105,4	6,50 (1H; <i>s</i>)
12	153,1	-
13	142,1	-
14	153,1	-
15	105,4	6,50 (1H; <i>s</i>)
OCH ₃	56,0	3,88 (6H; <i>s</i>)
OCH ₃	60,8	3,85 (3H; <i>s</i>)

Figura 43. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD₃OD) da substância **8**.

Figura 44. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) da substância **8**.

Figura 45. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) da substância **8**.

Figura 46. Mapa de contorno de HMQC (500 MHz, CD₃OD) da substância **8**.

Figura 47. Mapa de contorno de HMBC (500 MHz, CD₃OD) da substância **8**.

Figura 48. Espectro de massas de alta resolução da substância **8** no modo positivo em A, e ampliação desse espectro em B.

O espectro de RMN de ^1H do composto **9** indica a presença de 21 hidrogênios, sendo eles metilênicos, metoxílicos, aromáticos e vinílicos (figura 50). Esse composto apresenta o anel 12,13,14-trimetoxifenílico intacto, devido a presença dos hidrogênios aromáticos em δ 6,79 (2H, s), que correlacionam no HMBC com os carbonos aromáticos em δ 153,5, δ 140,0, δ 130,8 e δ 105,5, e dos hidrogênios metoxílicos em δ 3,89 (6H, s), que correlacionam no HMBC com o carbono aromático em δ 153,5, e em δ 3,87 (3H, s), que correlacionam no HMBC com o carbono aromático em δ 140,0 (tabela 11 e figura 54). Os hidrogênios que aparecem como dubletos em δ 7,36 (1H) e δ 7,64 (1H) indicam a presença da dupla ligação entre os carbonos C-8 e C-9, e a constante de acoplamento entre H-8 e H-9 de 15,6 Hz indica que eles estão em relação *trans* (figura 50). A presença da subunidade estrutural derivada do ácido 3,4,5-trimetoxicinâmico nessa estrutura foi confirmada pela presença dos íons de m/z 190, m/z 193, m/z 206 e m/z 221 nos espectros de EM/EM (anexos 2 e 15).

Figura 49. Atribuição dos dados de RMN de ^1H em vermelho e de RMN de ^{13}C em azul da substância **9**, e numeração da estrutura em preto.

A substância **9** não apresenta os sinais dos hidrogênios vinílicos H-3 e H-4 em seu espectro de RMN de ^1H , mas apresenta outros dois sinais de hidrogênios metilênicos (4H). O multipeto em δ 3,80 (2H) é o sinal mais desblindado dos hidrogênios do anel lactâmico, e, por isso, estes hidrogênios estão próximos do átomo de nitrogênio. No espectro de HMBC esses hidrogênios correlacionam com os carbonos em δ 20,5 e δ 22,5 que foram atribuídos a C-4 e C-5 do anel lactâmico.

Os hidrogênios do multipeto em δ 2,62 (2H) correlacionam com a carbonila em δ 174,1 no espectro de HMBC e, também, correlacionam com os

carbonos em δ 20,5 e δ 22,5. A correlação com a carbonila e o deslocamento químico indicam que esses hidrogênios estão na posição 3 do anel lactâmico. O multiplete em δ 1,89 possui 4 hidrogênios, e esses correlacionam no HMBC com os carbonos em δ 44,6; δ 22,5; δ 20,5; δ 34,9 e δ 174,1, e também correlacionam com os carbonos em δ 22,5 e δ 20,5 no HMQC (figura 53). Os hidrogênios ligados ao carbono em δ 22,5 no espectro de HMQC provavelmente estão na posição 5, pois esse carbono está ligado ao carbono metilênico mais eletronegativo (C6), enquanto os hidrogênios ligados ao carbono em δ 20,5 estão na posição 4. No espectro de massas de alta resolução dessa substância (figura 55) podemos observar os íons $[M+H]^+$ m/z 320,1493 e $[M+Na]^+$ m/z 342,1333, que estão de acordo com a fórmula molecular $C_{17}H_{21}NO_5$ (m/z teórico $[M+H]^+$: 320,1492, erro 0,31 ppm, e m/z teórico $[M+Na]^+$: 342,1312, erro 6,14 ppm). Dessa forma, essa substância foi identificada como a 3,4-diidropiartina (JOSHI et al., 1968). Os dados de RMN de 1H e de RMN de ^{13}C obtidos estão de acordo com os disponíveis na literatura (tabela 12).

A 3,4-diidropiartina ainda não tinha sido obtida a partir de experimentos de biotransformação, essa substância já foi obtida por métodos sintéticos (JOSHI et al., 1968) e também foi isolada de *Piper bartlingianum* (KIJJOA et al., 1982).

Tabela 11. Dados de RMN da substância **9** ($CDCl_3$, 500 MHz).

Posição	δ ^{13}C	1H δ (m; J em Hz)	H $\rightarrow$ C HMBC
2	174,1	-	-
3	34,9	2,62 (2H; m)	174,1; 22,5; 20,5
4	20,5	1,89 (2H; m)	174,1; 22,5; 20,5
5	22,5	1,89 (2H; m)	174,1; 22,5; 20,5
6	44,6	3,80 (2H; m)	22,5; 20,5
7	169,8	-	-
8	121,2	7,36 (1H; d ; 15,6)	169,8; 130,8
9	143,5	7,64 (1H; d ; 15,6)	169,8; 130,8; 105,5
10	130,8	-	-
11	105,5	6,79 (1H; s)	153,5; 143,5; 140,0; 130,8; 105,5
12	153,5	-	-
13	140,0	-	-

continua

continuação da tabela 11

14	153,5	-	-
15	105,5	6,79 (1H; s)	153,5; 143,5; 140,0; 130,8; 105,5
OCH ₃	56,1	3,89 (6H; s)	153,5
OCH ₃	60,9	3,87 (3H; s)	140,0

* Valores obtidos indiretamente através de espectros de HMBC e HMQC.

Tabela 12. Dados de RMN de ¹H em 60 MHz (JOSHI et al., 1968) e de RMN de ¹³C em 75 MHz (RAO et al., 2012) da substância **9** em CDCl₃.

Posição	δ ¹³ C*	¹ H δ (m; J em Hz)
2	165,7	-
3	32,7	2,65
4	24,7	1,90
5	26,1	1,90
6	49,9	3,90
7	165,7	-
8	118,5	7,40
9	139,7	7,70
10	130,1	-
11	105,0	6,85
12	154,0	-
13	143,0	-
14	153,3	-
15	105,0	6,85
OCH ₃	60,8	3,95
OCH ₃	55,9	3,95

*Os autores não atribuíram os valores dos deslocamentos químicos de ¹³C.

Figura 50. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância **9**.

Figura 51. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância **9**.

Figura 52. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância **9**.

Figura 53. Mapa de contorno de HMQC (500 MHz, CDCl_3) da substância **9**.

Figura 54. Mapa de contorno de HMBC (500 MHz, CDCl_3) da substância **9**.

Figura 55. Espectro de massas de alta resolução da substância **9** no modo positivo em A e ampliação desse espectro em B.

4.3.2 Determinação estrutural dos produtos de biotransformação da piplartina pelo fungo *B. bassiana* ATCC 8688a

As substâncias **4** e **12** foram isoladas a partir da biotransformação da piplartina em escala ampliada pelo fungo *B. bassiana* ATCC 8688a (figura 56), de acordo com o item 3.8. Suas estruturas foram determinadas utilizando dados de RMN, espectrometria de massas de alta resolução e dados presentes na literatura. A substância **11** foi isolada em mistura com outra substância e, por isso, não foi possível determinar sua estrutura por RMN. Essa amostra foi analisada em HRESIMS e sua fórmula molecular foi determinada como $C_{17}H_{19}NO_6$ (m/z experimental $[M+H]^+$: 334,1289 e m/z calculado $[M+H]^+$: 334,1285, erro 1,20 ppm). Essa substância possui os íons de m/z 190, m/z 193, m/z 206 e o de m/z 221 como pico base em seu espectro de EM/EM (anexos 15 e 21), e, dessa forma, podemos concluir que sofreu uma adição de um átomo de oxigênio no anel lactâmico.

Figura 56. Cromatograma obtido em coluna semi-preparativa C_{18} no momento da separação dos compostos presentes na fração de SPE em 40% de acetonitrila do extrato de acetato de etila da biotransformação em grande escala da piplartina pelo fungo *B. bassiana* ATCC 7159. Coluna semi-preparativa C_{18} 5 μm VP250/10 nucleosil 120-5 Macherey-Nagel 250 x 10 mm, fase móvel isocrática 25% ACN em CLAE, vazão 3 mL.min⁻¹ e detecção no RID.

A substância **12** foi isolada na forma de sólido amorfo levemente amarelado, e seu espectro de RMN de 1H apresenta 18 hidrogênios correspondentes a hidrogênios metilênicos, metínicos, metoxílicos, aromáticos e vinílicos, conforme podemos observar na tabela 13 e figura 59. A presença dos hidrogênios aromáticos em δ 6,80 (2H, s), que correlacionam no HMBC (figura 65) com os carbonos aromáticos em δ 153,5, δ 140,2, δ 130,6 e δ 105,7, e dos hidrogênios metoxílicos

em δ 3,89 (6H; s), que correlacionam no HMBC com o carbono aromático em δ 153,5, e em δ 3,88 (6H; s), que correlacionam no HMBC com o carbono aromático em δ 140,2, confirmam a presença do anel 12,13,14-trimetoxifenílico (tabela 13).

Os sinais dos hidrogênios vinílicos em δ 7,69 (1H; d; $J = 15,6$ Hz) e δ 7,42 (1H; d; $J = 15,6$ Hz) e suas correlações no HMBC com o carbono aromático em δ 130,6 e o carbonílico em δ 169,1 indicam a existência da dupla ligação entre os carbonos C-8 e C-9 (figura 57). A constante de acoplamento de 15,6 Hz entre esses hidrogênios comprova a presença da dupla ligação, que está em relação *trans*. Apenas o hidrogênio em δ 7,69 correlaciona no espectro de HMBC com o carbono aromático em δ 105,7, pois está ligado ao carbono C-9, enquanto o hidrogênio em δ 7,42 está na posição C-8, e possui correlação com a carbonila δ 169,1 em C-7. Analisando o espectro de HMQC podemos notar que o hidrogênio em δ 7,69 está diretamente ligado ao carbono em δ 144,7, enquanto o hidrogênio em δ 7,42 está ligado ao carbono em δ 120,6 (figura 64). Essa subunidade estrutural pode ser comprovada pela presença do íon acílio m/z 221 no espectro de EM/EM (anexo 15).

O hidrogênio vinílico em δ 6,08 (*dd*, H-3) acopla com outro hidrogênio vinílico com uma constante de acoplamento de 9,8 Hz que é característica de duplas ligações em *cis*, e também apresenta uma pequena constante de acoplamento de 0,8 Hz, que é característica de acoplamentos alílicos. O hidrogênio em δ 6,93 (*dd*, H-4) acopla com H-3 com a constante de 9,8 Hz e com H-5 com uma constante de 3,9 Hz. O espectro de HMQC indica que os hidrogênios em δ 6,08 e δ 6,93 estão, respectivamente, ligados aos carbonos δ 126,7 e δ 145,5. O hidrogênio em δ 6,08 está ligado na posição α à carbonila α,β -insaturada, pois apresenta correlação no HMBC com a carbonila δ 165,0 em C-2 e está mais blindado que o H-4 que está na posição β desse sistema insaturado (fig. 57).

Figura 57. Dados de RMN de ^1H em vermelho e de RMN de ^{13}C em azul da substância 12, e numeração da estrutura em preto.

Os dois hidrogênios em δ 4,09 (*m*, H-6) apresentam correlação no espectro de HMQC com a carbonila em δ 165,0 (C-2) e, também, correlacionam com a carbonila em δ 169,1 (C-7), e com o carbono em δ 62,9. Essas correlações indicam que esses hidrogênios estão ligados ao carbono da posição C-6 do anel lactâmico, que apresenta um deslocamento de δ 48,7, conforme podemos observar no HMQC (figura 64). A piplartina e os outros derivados de biotransformação também possuem os sinais dos hidrogênios e carbonos na posição C-6 próximos a esses valores da substância **12**.

O hidrogênio metínico em δ 4,57 (*m*, H-5) se desdobra em um multipeto e correlaciona com os carbonos vinílicos δ 145,5 em C-4 e δ 126,7 em C-3. Esse hidrogênio correlaciona no espectro de COSY (figura 66) com os hidrogênios H-6 e H-4, o que indica que está ligado na posição 5 do anel lactâmico (figura 57). No espectro de HMQC podemos notar que esse hidrogênio está diretamente ligado ao carbono δ 62,9, que está ligado a apenas um hidrogênio, conforme podemos confirmar no espectro de DEPT 135 presente na figura 63. Esse carbono em δ 62,9 está desblindado devido a presença de uma hidroxila diretamente ligada a ele. Os dados de RMN de ^1H e de RMN de ^{13}C relativos ao anel lactâmico da substância **12** estão de acordo com a substância 5,6-diidro-5-hidroxi-1H-piridin-2-ona (CHEN et al., 2003), que foi isolada de *Piper sintenense* (figura 58).

Figura 58. Dados de RMN de ^1H em vermelho e de RMN de ^{13}C em azul da 5,6-diidro-5-hidroxi-1H-piridin-2-ona obtidos em CDCl_3 .

A fórmula molecular da substância **12** foi determinada como $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{NO}_6$ utilizando dados de RMN e de massas de alta resolução, figura 67 (m/z experimental $[\text{M}+\text{H}]^+$: 334,1275 e m/z calculado $[\text{M}+\text{H}]^+$: 334,1285, erro 2,99 ppm). Essa substância apresentou atividade óptica desviando a direção da luz plano-polarizada com $[\alpha]_{\text{D}}^{25} + 48,9$, sendo portanto, dextrorrotatória. Dessa forma, essa substância foi

identificada como (E)-5-hidrox-1-(3-(3,4,5-trimetoxifenil)acrilóil)-5,6-diidropiridin-2(1*H*)-ona, que ainda não foi descrita na literatura.

Tabela 13. Dados de RMN de ^1H (500 MHz), HMBC e de RMN de ^{13}C (125 MHz) da substância **12** em CDCl_3 .

Posição	δ $^{13}\text{C}^*$	^1H δ (m; <i>J</i> em Hz)	H $\rightarrow$ C HMBC
2	165,0	-	-
3	126,7	6,08 (1H; dd; 9,8; 0,8)	165,0; 62,9
4	145,5	6,93 (1H; dd; 9,8; 3,9)	165,0; 48,7
5	62,9	4,57 (1H; m)	145,5; 126,7
6	48,7	4,09 (2H; m)	169,1; 165,0; 145,5; 62,9
7	169,1	-	-
8	120,6	7,42 (1H; d; 15,6)	169,1; 130,6
9	144,7	7,69 (1H; d; 15,6)	169,1; 130,6; 120,6; 105,7
10	130,6	-	-
11	105,7	6,80 (1H; s)	153,5; 144,7; 140,2; 130,6; 105,7
12	153,5	-	-
13	140,2	-	-
14	153,5	-	-
15	105,7	6,80 (1H, s)	153,5; 144,7; 140,2; 130,6; 105,7
OCH ₃	56,3	3,89 (6H; s)	153,5
OCH ₃	61,2	3,88 (3H; s)	140,2

* Valores obtidos através dos espectros de RMN de ^{13}C e HMQC.

Figura 59. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância **12**.

Figura 60. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância **12**.

Figura 61. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância **12**.

Figura 62. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) da substância **12**.

Figura 63. Espectro de RMN de ^{13}C DEPT 135 (125 MHz, CDCl_3) da substância **12**.

Figura 64. Mapa de contorno de HMQC (500 MHz, CDCl_3) da substância **12**.

Figura 65. Mapa de contorno de HMBC (500 MHz, CDCl_3) da substância **12**.

Figura 66. Mapa de contorno de COSY (500 MHz, CDCl₃) da substância **12**.

Figura 67. Espectro de massas de alta resolução da substância **12** no modo positivo em A e ampliação desse espectro em B.

A substância **4** foi isolada como um sólido branco, e, a partir das análises dos espectros de RMN de ^1H e de massas de alta resolução, foi proposto inicialmente que se tratava do ácido 3,4,5-trimetoxicinâmico que apresenta a fórmula molecular $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_5$. Essa substância possui 13 hidrogênios em seu espectro de RMN de ^1H , referentes a hidrogênios vinílicos, aromáticos e metoxílicos, figura 69. Os singletos dos dois hidrogênios aromáticos em δ 6,78 e dos hidrogênios metoxílicos em δ 3,89, juntamente com os sinais dos hidrogênios vinílicos em δ 7,1 (d, $J=15,8$ Hz) e em 6,36 (d, $J=15,8$ Hz), e os dados de massas de alta resolução (figura 71) confirmam a estrutura do ácido 3,4,5-trimetoxicinâmico (m/z experimental $[\text{M-H}]^-$: 237,0761 e m/z calculado $[\text{M-H}]^-$: 237,0757, erro 1,67 ppm). Essa substância também já foi isolada de planta do gênero *Piper* (BRAZ-FILHO et al., 1981).

O ácido 3,4,5-trimetoxicinâmico foi detectado nos extratos de biotransformação de todos os fungos e também foi detectado um pequeno pico referente essa substância nos cromatogramas dos controles de estabilidade da piplartina. Diante disso, provavelmente, essa substância pode ter sido formada por biotransformação e também pela hidrólise química da amida que une essa substância ao anel lactâmico, que pode ter ocorrido nas condições experimentais empregadas.

Figura 68. Atribuição dos dados de RMN da substância **4**.

Figura 69. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da substância **4**.

Figura 70. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da substância **4**.

Figura 71. Espectro de massas de alta resolução da substância **4** no modo negativo em A, e ampliação desse espectro em B.

Dessa forma, foram identificados ao todo 14 produtos de biotransformação, conforme podemos observar na figura 72. Apenas as substâncias **4**, **5**, **8**, **9** e **12** foram obtidas em quantidade e pureza necessária para a identificação estrutural por RMN. A utilização da espectrometria de massas juntamente com os cálculos computacionais foram importantes para a identificação e proposição das estruturas dos outros 9 metabólitos.

Figura 72. Metabólitos identificados nos experimentos de biotransformação da piplartina por fungos.

4.4 Estudos computacionais da fragmentação da piplartina e de seus derivados em IES-EM/EM

Após o isolamento e identificação dos produtos de biotransformação, foram realizados cálculos computacionais para explicar as principais rotas de fragmentação e identificar os possíveis sítios de protonação da piplartina e seus metabólitos. Para isso, as fragmentações em IES-EM/EM da piplartina, 3,4-diidropiplartina, e 8,9-diidropiplartina foram estudadas. Esses estudos foram realizados, pois o conhecimento das principais vias de fragmentação da piplartina e análogos foram importantes para a confirmação das estruturas propostas, e, além

disso, podem ser úteis para a identificação dessas e outras substâncias com estruturas químicas semelhantes.

Inicialmente, foram obtidos os mapas dos potenciais eletrostáticos moleculares (MEPs) dessas substâncias, pois esse descritor pode servir como indicativo para os sítios mais prováveis de protonação, onde as regiões em vermelho indicam regiões nucleofílicas, as quais podem acomodar o próton (figura 73). Os resultados obtidos dessas análises nos sugerem que as carbonilas são os possíveis sítios de protonação.

Figura 73. Mapas dos potenciais eletrostáticos moleculares da piplartina, 3,4-diidropiplartina e 8,9-diidropiplartina.

Embora a análise dos MEPs seja indicativa para se conhecer os possíveis sítios de protonação, faz-se necessária a análise da reatividade frente a esse evento químico por descritores mais apropriados, como por exemplo, a afinidade protônica (AP) (ALCAMI et al., 2001; VESSECCHI et al., 2012), que é mais exato e fornece a estabilidade das espécies protonadas. Embora a análise do MEP tenha indicado apenas os átomos de oxigênio carbonílicos como sendo os possíveis sítios de

protonação, os cálculos para AP foram realizados para outros átomos, como por exemplo, para o nitrogênio.

Para a piplartina e seus derivados, o sítio de protonação mais favorável indicado pelos valores da AP é o átomo de oxigênio da carbonila da porção 3,4,5-trimetoxicinâmica, a qual pode ser atribuída a estabilidade do íon formado por ressonância, como pode ser observado na figura 74. A partir desses resultados o mecanismo de dissociação da piplartina protonada foi sugerido partindo-se da protonação nessa carbonila. Os mecanismos propostos foram sugeridos com base nas afinidades protônicas e energias de Gibbs relativas obtidas através dos modelos computacionais (figura 74), e tais resultados estão de acordo com os dados obtidos nas análises realizadas em IES-EM/EM (anexos 1-3).

Figura 74. Energias de Gibbs relativas em parênteses e afinidade protônica em *itálico* para as possíveis formas protonadas da piplartina e seus metabólitos, valores em kcal.mol^{-1} foram obtidos pelo modelo B3LYP/6-31+G(d).

Pelas energias relativas de Gibbs e afinidades protônicas para as reações de protonação da piplartina e análogos, podemos notar que as protonações ocorrem preferencialmente nas carbonilas em C-7, onde os prótons estariam em *anti* ao átomo de nitrogênio. As estruturas protonadas mais estáveis dessas substâncias podem ser observadas na figura 75.

Figura 75. Estruturas de equilíbrio da pirlartina e seus metabólitos protonados no oxigênio carbonílico C-7 obtidas pelo modelo B3LYP/6-31+G(d).

Após a protonação, podemos notar nos espectros de IES-EM/EM que inicialmente ocorre a formação do íon acílio na fragmentação dessas três substâncias (anexos 1-3). Para a formação desse íon, a ligação amida que une o anel lactâmico e a parte derivada do ácido 3,4,5-trimetoxicinâmico é rompida, o próton presente na carbonila em C-7 migra para o átomo de nitrogênio, e, um par de elétrons isolado do O migra para o átomo de C em C7. Dessa forma, o anel lactâmico é liberado na forma neutra, e é formado o íon acílio.

Outra via para a formação de um segundo íon acílio, também é possível, como podemos observar nas figuras 76B, 77B e 78B. Essa via necessita de maior energia para a formação destes íons acílios, e esses íons são menos estabilizados por ressonância, quando comparado ao íon acílio formado na parte derivada do ácido 3,4,5-trimetoxicinâmico. Devido a esses fatores, essa via não foi observada nos espectros de EM/EM.

Após a formação do íon acílio, três vias principais de fragmentação consecutivas a esse íon foram identificadas nas substâncias que possuem a ligação dupla entre os carbonos em C-8 e C-9, e estão representadas como “a”, “b” e “c” na figura 76A. Em “a” ocorre uma descarboxilação, em “b” desmetilação da metoxila, e em “c” desmetoxilação. As vias “b” e “c” não obedecem à regra do elétron-par (VESSECCI et al. 2010), e formam fragmentos que são cátions-radicais. Essas fragmentações ocorrem, pois as ligações entre C-O que estão presentes em um

sistema de ressonância estão susceptíveis à cisões homolíticas, devido ao seu enfraquecimento (CARDOZO et al., 2008).

Figura 76. Mecanismos de fragmentação para piplartina protonada. Valores em *itálico* são entalpias relativa a 298 K. Valores entre parênteses são energias de Gibbs relativas a 298 K. Todos os valores estão em kcal.mol^{-1} e foram obtidos através do modelo B3LYP/6-31+G(d).

A 3,4-diidropiplartina, que apresenta uma redução no anel lactâmico, também fragmenta de forma muito semelhante à piplartina em IES-EM/EM (figura 77A). Provavelmente essa semelhança ocorra devido à presença da dupla ligação entre os carbonos C8 e C9, que estabiliza o íon acílio, favorecendo sua formação.

Figura 77. Mecanismos de fragmentação para 3,4-diidropiartina protonada. Valores em *itálico* são entalpias relativa a 298 K. Valores entre parênteses são energias de Gibbs relativas a 298 K. Todos os valores estão em kcal.mol^{-1} e foram obtidos através do modelo B3LYP/6-31+G(d).

A 8,9-diidropiartina possui fragmentação diferente das outras duas substâncias discutidas anteriormente. Esse produto de biotransformação não possui a ligação dupla entre os carbonos C-8 e C-9, o que diminui a estabilização do íon acílio por ressonância. Dessa forma, primeiramente o íon acílio de m/z 223 é formado, e, ao contrário das outras substâncias, a carga desse íon não é estabilizada por ressonância. Devido a esse fato, esse íon fragmenta muito facilmente formando o íon benzílio de m/z 181. Apesar de ser necessária maior

energia para a formação do íon benzílio de m/z 181, quando comparado com os íons m/z 192, m/z 195 e m/z 208, esse íon é estabilizado por ressonância e pode ser formado de acordo com o esquema da figura 78.

Figura 78. Mecanismos de fragmentação para 8,9-diidropiartina protonada. Valores em *itálico* são entalpias relativa a 298 K. Valores entre parênteses são energias de Gibbs relativas a 298 K. Todos os valores estão em $\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ e foram obtidos através do modelo B3LYP/6-31+G(d).

Os espectros de IES-EM/EM da piplartina também foram semelhantes aos outros produtos de biotransformação que apresentam a ligação dupla entre os carbonos C-8 e C-9 (anexo 1 e 15). Todos os derivados da piplartina que sofreram apenas alterações no anel lactâmico apresentam o íon acílio de m/z 221 como pico base em seus espectros de EM/EM, que pode ser explicado pela estabilidade conferida a esse íon devido à deslocalização da carga positiva por ressonância. Em seguida, esse íon também fragmenta formando outros íons, como os de m/z 206, m/z 193, e m/z 190, conforme podemos observar nos espectros de EM/EM obtidos nas análises realizadas em UPLC. Dessa forma, essas fragmentações juntamente com as massas moleculares foram úteis para a identificação dos produtos de biotransformação da piplartina.

A seguir podemos observar os gráficos da energia resolvida (E_{lab}) da piplartina, 3,4-diidropiplartina, e 8,9-diidropiplartina, onde as energias de colisão com o gás N_2 variaram de 0 a 40 eV durante a aquisição dos espectros de EM/EM (figura 79). Conforme discutido anteriormente, as substâncias que apresentam a ligação dupla entre os carbonos C-8 e C-9 apresentam o mesmo perfil de fragmentação, enquanto que a 8,9-diidropiplartina, que não apresenta a ligação dupla nessa posição, apresenta um perfil diferente.

Figura 79. Gráficos das variações das intensidades dos íons fragmentos da piplartina, 3,4-diidropiartina e 8,9-diidropiartina protonadas com a E_{lab} . As energias de colisão com N_2 variaram de 0 a 40 eV.

5. CONCLUSÕES

A piplartina e seus derivados foram facilmente detectados nas análises realizadas em CLAE e UPLC utilizando detectores de DAD e massas. Essas substâncias apresentaram fragmentações características em IES-EM/EM, que foram importantes para a identificação dos produtos de biotransformação e a proposição das posições onde foram realizadas as alterações na estrutura da piplartina.

Os cálculos computacionais teóricos permitiram a identificação dos sítios mais suscetíveis à protonação e explicar as principais rotas das fragmentações da piplartina e seus produtos de biotransformação observadas nas análises realizadas em IES-EM/EM. Esses resultados contribuirão para estudos futuros de metabolismo, pois os dados de massas juntamente com os estudos de fragmentação apresentados poderão ser utilizados para a identificação de possíveis metabólitos obtidos a partir do metabolismo da piplartina em mamíferos, inclusive em humanos.

Esse produto natural pode sofrer alterações químicas formando outras substâncias. Ao analisarmos os controles de estabilidade da piplartina nos meios utilizados para as biotransformações, verificamos a presença da *cis*-piplartina, que pode ser formada a partir da isomerização da piplartina na presença de luz, e do ácido 3,4,5-trimetoxicinâmico, formado a partir da hidrólise da ligação amida entre o átomo de nitrogênio e a carbonila da posição C-7. Dessa forma, para garantir a segurança terapêutica da piplartina, se torna necessário avaliar se esses produtos de degradação também poderão ser formados em formulações farmacêuticas e no corpo humano, e verificar suas atividades tóxicas e farmacológicas.

A metodologia utilizada de cultivar os fungos em meio pré-fermentativo, rico em nutrientes, e, em seguida, filtração dos micélios e transferência para meio fermentativo, mais pobre em nutrientes, foi eficiente, uma vez que os fungos praticamente não produziram substâncias que interferiram na análise e no isolamento dos produtos de biotransformação. Todos os fungos utilizados biotransformaram a piplartina, provavelmente os ensaios de CIMs da piplartina ajudaram a obter esses resultados, uma vez que permitiram selecionar a concentração de 0,1 mg.mL⁻¹, que não foi capaz de inibir o crescimento dos micro-organismos.

Ao todo, foram identificados 14 produtos de biotransformação da piplartina. Desses, cinco derivados foram isolados e identificados por RMN, sendo que um

ainda não havia sido descrito na literatura anteriormente. Essas substâncias poderão ser utilizadas como padrões em futuros estudos de metabolismo da piplartina em mamíferos, e, dessa forma, juntamente com os dados de massas e fragmentação EM/EM, facilitarão a identificação dos metabólitos formados. Além disso, esses derivados também serão avaliados quanto à atividade citotóxica frente a células normais e cancerígenas no Departamento de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará.

Foram identificados principalmente produtos formados a partir de reações semelhantes às do metabolismo humano de fase I, como reduções, hidroxilações e hidrólises. Não foram detectados outros compostos formados a partir de reações de conjugação, que são características do metabolismo humano de fase II, importantes para a formação de produtos mais hidrofílicos, os quais são eliminados mais facilmente na urina. Portanto, nas condições experimentais utilizadas, os fungos foram capazes de catalisar apenas reações de fase I do metabolismo de mamíferos.

Dessa forma, podemos concluir que as biotransformações microbianas são uma ferramenta útil para estudos preliminares de metabolismo, e podem ser utilizadas para obter uma variedade de derivados de uma substância, que podem ser isolados em quantidade suficiente para a realização de ensaios biológicos e determinação estrutural.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, D. J.; DAI, M.; PELLEGRINO, G.; WAGNER, B. K.; STERN, A. M.; SHAMJI, A. F.; SCHREIBER, S. L. Synthesis, cellular evaluation, and mechanism of action of piperlongumine analogs. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, p. 15115-15120, 2012.

AHMAD, S.; GARG, S. K.; JOHRI, B. N. Biotransformation of sterols: selective cleavage of the side chain. **Biotechnology Advances**, v. 10, p. 1-67, 1992.

ALCAMÍ, M.; MÓ, O.; YÁÑEZ, M. Computational chemistry: a useful (sometimes mandatory) tool in mass spectrometry studies. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 20, p. 195-245, 2001.

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

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

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. Planejamento racional baseado no mecanismo de ação: fármacos inteligente. In _____. **Química medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008a. cap. 3, p. 137-190.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. Aspectos gerais da ação dos fármacos. In _____. **Química medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008b. cap. 1, p. 19-70.

BALUNAS, M. J.; KINGHORN, A. D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, v. 78, p. 431-441, 2005.

BANERJEE, S.; MAZUMDAR, S. Electrospray ionization mass spectrometry: a technique to access the information beyond the molecular weight of the analyte. **International Journal of Analytical Chemistry**, v. 2012, p. 1-40, 2012.

BARTH, T. **Análise estereosseletiva de bufuralol, donepezila, midodrina e seus metabólitos e aplicações em estudos de biotransformações com fungos**. 2012,

242 f. Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 2012.

BARTH, T.; CONTI, R.; PUPO, M. T.; OKANO, L. T.; BONATO, P. S. Chiral HPLC analysis of donepezil, 5-O-desmethyl donepezil and 6-O-desmethyl donepezil in culture medium: application to fungal biotransformation studies. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 404, p. 257-266, 2012.

BECKE, A. D. A new mixing of hartree-fock and local density-functional theories. **Journal of Chemical Physics**, v. 98, p. 1372-1377, 1993.

BEZERRA, D. P.; CASTRO, F. O.; ALVES, A. P. N. N.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; SILVEIRA, E. R.; LIMA, M. A. S.; ELMIRO, F. J. M.; ALENCAR, N. M. N.; MESQUITA, R. O.; LIMA, M. W.; COSTA-LOTUFO, L. V. *In vitro* and *in vivo* antitumor effect of 5-FU combined with piplartine and piperine. **Journal of Applied Toxicology**, v. 28, p. 156-163, 2008b.

BEZERRA, D. P.; CASTRO, F. O.; ALVES, A. P. N. N.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; SILVEIRA, E. R.; LIMA, M. A. S.; ELMIRO, F. J. M.; COSTA-LOTUFO, L. V. *In vivo* growth-inhibition of Sarcoma 180 by piplartine and piperine, two alkaloid amides from *Piper*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 39, p. 801-807, 2006.

BEZERRA, D. P.; MOURA, D. J.; ROSA, R. M.; VASCONCELLOS, M. C.; SILVA, A. C. R.; MORAES, M. O.; SILVEIRA, E. R.; LIMA, M. A. S.; HENRIQUES, J. A. P.; COSTA-LOTUFO, L. V.; SAFFI, J. Evaluation of the genotoxicity of piplartine, an alkamide of *Piper tuberculatum*, in yeast and mammalian V79 cells. **Mutation Research**, v. 652, p. 164-174, 2008a.

BEZERRA, D. P.; MILITÃO, G. C. G.; CASTRO, F. O.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; SILVEIRA, E. R.; LIMA, M. A. S.; ELMIRO, F. J. M.; COSTA-LOTUFO, L. V. Piplartine induces inhibition of leukemia cell proliferation triggering both apoptosis and necrosis pathways. **Toxicology in Vitro**, v. 21, p. 1 - 8, 2007.

BEZERRA, D. P.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; SAKER-NETO, N.; SILVEIRA, E. R.; COSTA-LOTUFO, L. V. Overview of the therapeutic potential of piplartine (piperlongumine). **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, p. 453-463, 2013.

BODIWALA, H. S.; SINGH, G.; SINGH, R.; DEY, C. S.; SHARMA, S. S.; BHUTANI, K. K.; SINGH, I. P. Antileishmanial amides and lignans from *Piper cubeba* and *Piper retrofractum*. **Journal of Natural Medicines**, v. 61, p. 418-421, 2007.

BOLL, P. M.; HANSEN, J.; SIMONSEN, O. Synthesis and molecular structure of pipartine (=piperlongumine). **Tetrahedron**, v. 40, p. 171-175, 1984.

BORGES, K. B. **Análise estereosseletiva de fármacos com aplicação em estudos de biotransformação empregando fungos**. 2010, 212f. Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 2010.

BORGES, W. S. **Estudo de fungos endofíticos associados a plantas da família Asteraceae como fontes de metabólitos secundários e em processos de biotransformações**. 2008, 350 f. Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 2008.

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

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

BORGES, K. B.; BORGES, W. S.; PUPO, M. T.; BONATO, P. S. Stereoselective analysis of thioridazine-2-sulfoxide and thioridazine-5-sulfoxide: an investigation of *rac*-thioridazine biotransformation by some endophytic fungi. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 46, p. 945-952, 2008.

BORGES, K. B.; PUPO, M. T.; BONATO, P. S. Enantioselective analysis of propranolol and 4-hydroxypropranolol by CE with application to biotransformation studies employing endophytic fungi. **Electrophoresis**, v. 30, p. 3910-3917, 2009c.

BRAZ-FILHO, R.; SOUZA, M. P.; MATTOS, M. E. O. Pipartine-dimer A, a new alkaloid from *Piper tuberculatum*. **Phytochemistry**, v. 20, p. 345-346, 1981.

BUCHANAN, G. O.; WILLIAMS, L. A. D.; REESE, P. B. Biotransformation of cadinane sesquiterpenes by *Beauveria bassiana* ATCC 7159. **Phytochemistry**, v. 54, p. 39-45, 2000.

CAPEL C. S.; SOUZA, A. C. D.; CARVALHO, T. C., SOUSA, J. P. B., AMBRÓSIO, S. R., MARTINS, C. H. G., CUNHA, W. R., GALÁN, R. H., FURTADO, N. A. J. C. Biotransformation using *Mucor rouxii* for the production of oleanolic acid derivatives

and their antimicrobial activity against oral pathogens. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 38, p. 1493-1498, 2011.

CARDOZO, K. H.M.; VESSECCHI, R.; CARVALHO, V. M.; PINTO, E.; GATES, P. J.; COLEPICOLO, P.; GALEMBECK, S. E.; LOPES, N. P. A theoretical and mass spectrometry study of the fragmentation of mycosporinelike amino acids. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 273, p. 11-19, 2008.

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

CHEN, J.-J.; DUH, C.-Y.; HUANG, H.-Y.; CHEN, I.-S. Cytotoxic constituents of *Piper sintonense*. **Helvetica Chimica Acta**, v. 86, p. 2058-2064, 2003.

COTINGUIBA, F.; REGASINI, L. O.; BOLZANI, V. S.; DEBONSI, H. M.; PASSERINI, G. D.; CICARELLI, R. M. B.; KATO, M. J.; FURLAN, M. Piperamides and their derivatives as potential anti-trypanosomal agents. **Medicinal Chemistry Research**, v. 18, p. 703-711, 2009.

CROTTI, A. E. M.; VESSECCHI, R.; LOPES, J. L. C.; LOPES, N. P. Espectrometria de massas com ionização por "electrospray": processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. **Química Nova**, v. 29, p. 287-292, 2006.

DIAS, R. L. A.; CORRÊA, A. G. Aplicações da química combinatória no desenvolvimento de fármacos. **Química Nova**, v. 24, p. 236-242, 2001.

DODSON, C. D.; DYER, L. L.; SEARCY, J.; WRIGHT, Z.; LETOURNEAU, D. K. Cenocladamide, a dihydropyridone alkaloid from *Piper cenocladum*. **Phytochemistry**, v. 53, p. 51-54, 2000.

DUH, C.-Y.; WU, Y.-C. Cytotoxic pyridone alkaloids from the leaves of *Piper aborescens*. **Journal of Natural Products**, v. 53, p. 1575-1577, 1990.

DUH, C.-Y.; WU, Y.-C.; WANG, S.-K. Cytotoxic pyridine alkaloids from *Piper aborescens*. **Phytochemistry**, v. 29, p. 2689-2691, 1990.

FABER, K. **Biotransformations in Organic Chemistry: a text book**. Springer. 5th, Germany: Berlin, 2004, 454p.

FACUNDO, V. A.; SILVEIRA, A. S. P.; MORAIS, S. M. Constituents of *Piper alatabaccum* Trel & Yuncker (Piperaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 33, p. 753-756, 2005.

FELIPE, F. C. B.; SOUSA FILHO, J. T.; SOUZA, L. E. O.; SILVEIRA, J. A.; UCHOA, D. E. A.; SILVEIRA, E. R.; PESSOA, O. D. L.; VIANA, G. S. B. Piplartine, an amide alkaloid from *Piper tuberculatum*, presents anxiolytic and antidepressant effects in mice. **Phytomedicine**, v. 14, p. 605-612, 2007.

FRISCH, M. J. **Gaussian 03**, Revision C.02, FRISCH, M. J.; TRUCKS, G. W.; SCHLEGEL, H. B.; SCUSERIA, G. E.; ROBB, M. A.; CHEESEMAN, J. R.; MONTGOMERY JR. J. A.; VREVEN, T.; KUDIN, K. N.; BURANT, J. C.; MILLAM, J. M.; IYENGAR, S. S.; TOMASI, J.; BARONE, V.; MENNUCCI, B.; COSSI, M.; SCALMANI, G.; REGA, N.; PETERSSON, G. A.; NAKATSUJI, H.; HADA, M.; EHARA, M.; TOYOTA, K.; FUKUDA, R.; HASEGAWA, J.; ISHIDA, M.; NAKAJIMA, T.; HONDA, Y.; KITAO, O.; NAKAI, H.; KLENE, M.; LI, X.; KNOX, J. E.; HRATCHIAN, H. P.; CROSS, J. B.; BAKKEN, V.; ADAMO, C.; JARAMILLO, J.; GOMPERTS, R.; STRATMANN, R. E.; YAZYEV, O.; AUSTIN, A. J.; CAMMI, R.; POMELLI, C.; OCHTERSKI, J. W.; AYALA, P. Y.; MOROKUMA, K.; VOTH, G. A.; SALVADOR, P.; DANNENBERG, J. J.; ZAKRZEWSKI, V. G.; DAPPRICH, S.; DANIELS, A. D.; STRAIN, M. C.; FARKAS, O.; MALICK, D. K.; RABUCK, A. D.; RAGHAVACHARI, K.; FORESMAN, J. B.; ORTIZ, J. V.; CUI, Q.; BABOUL, A. G.; CLIFFORD, S.; CIOŚLOWSKI, J.; STEFANOV, B. B.; LIU, G.; LIASHENKO, A.; PISKORZ, P.; KOMAROMI, I.; MARTIN, R. L.; FOX, D. J.; KEITH, T.; AL-LAHAM, M. A.; PENG, C. Y.; NANAYAKKARA, A.; CHALLACOMBE, M.; GILL, P. M. W.; JOHNSON, B.; CHEN, W.; WONG, M. W.; GONZALEZ, C.; POPLE, J. A. **Gaussian**, Inc., Wallingford CT, 2004.

FURTADO, N. A. J. C.; VESSECCHI, R.; TOMAZ, J. C.; GALEMBECK, S. E.; BASTOS, J. K.; LOPES, N. P.; CROTTI, A. E. M. Fragmentation of diketopiperazines from *Aspergillus fumigatus* by electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-EM/EM). **Journal of Mass Spectrometry**, v. 42, p. 1279-1286, 2007.

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

GOTTLIEB, O. R.; BORIN, M. R. M. B.; PAGOTTO, C. L. A. C.; ZOCHER, D. H. T. Biodiversidade: o enfoque interdisciplinar brasileiro. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 3, p. 97-102, 1998.

GUIMARÃES, D. O.; BORGES, W. S.; KAWANO, C. Y.; RIBEIRO, P. H.; GOLDMAN, G. H.; NOMIZO, A.; THIEMANN, O. H.; OLIVA, G.; LOPES, N. P.; PUPO, M. T. Biological activities from extracts of endophytic fungi isolated from *Viguiera arenaria* and *Tithonia diversifolia*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 52, p. 134-144, 2008.

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

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

HO, C. S.; LAM, C. W. K.; CHAN, M. H. M.; CHEUNG, R. C. K.; LAW, L. K.; LIT, L. C. W.; NG, K. F.; SUEN, M. W. M.; TAI, H. L. Electrospray ionization mass spectrometry: principles and clinical applications. **The Clinical Biochemist Reviews**, v. 24, p. 3-12, 2003.

HOLČAPEK, M.; KOLÁŘOVÁ, L.; NOBILIS, M. High-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry in the identification and determination of phase I and phase II drug metabolites. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 391, p. 59-78, 2008.

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.

JESUS, L. I.; ALBUQUERQUE, N. C. P.; BORGES, K. B.; SIMÕES, R. A.; CALIXTO, L. A.; FURTADO, N. A. J. C.; GAITANI, C. M.; PUPO, M. T.; OLIVEIRA, A. R. M. Enantioselective fungal biotransformation of risperidone in liquid culture medium by capillary electrophoresis and hollow fiber liquid-phase microextraction. **Electrophoresis**, v. 32, p. 2765-2775, 2011.

JOSHI, B. S.; KAMAT, V. N.; SAKSENA, A. K. On the structure of piplartine and synthesis of dihydropiplartine. **Tetrahedron Letters**, n. 20, p. 2395-2400, 1968.

JYOTHI, D.; VANATHI, P.; GOWRI, P. M.; RAO, V. R. S.; RAO, J. M.; SREEDHAR, A.S. Diferuloylmethane augments the cytotoxic effects of piplartine isolated from *Piper chaba*. **Toxicology in Vitro**, v. 23, p. 1085-1091, 2009.

KIJJOA, A.; GIESEBRECHT, A. M.; GOTTLIEB, O. R. Dihydropiplartine from *Piper bartlingianum*. **Planta Medica**, v. 44, p. 188, 1982.

KONISHI, Y.; KIYOTA, T.; DRAGHICI, C.; GAO, J.-M.; YEBOAH, F.; ACOCA, S.; JARUSSOPHON, S.; PURISIMA, E. Molecular formula analysis by an MS/MS/MS technique to expedite dereplication of natural products. **Analytical Chemistry**, v. 79, p. 1187-1197, 2007.

LAUMEN, K.; KITTELMANN, M.; GHISALBA, O. Chemo-enzymatic approaches for the creation of novel chiral building blocks and reagents for pharmaceutical applications. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 19-20, p. 55-66, 2002.

LEE, C. T.; YANG, W. T.; PARR, R. G. Development of the colle-salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron-density. **Physical Review B**, v. 37, p. 785-789, 1988.

MAXWELL, A.; RAMPERSAD, D. A new dihydropiplartine and piplartine dimer from *Piper rugosum*. **Journal of Natural Products**, v. 54, n. 4, p. 1150-1152, 1991.

MISHRA, B. B.; TIWARI, V. K. Natural products: an evolving role in future drug discovery. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, p. 4769-4807, 2011.

MORAES, J.; NASCIMENTO, C.; LOPES, P. O. M. V.; NAKANO, E.; YAMAGUCHI, L. F.; KATO, M. J.; KAWANO, T. *Schistosoma mansoni*: in vitro schistosomicidal activity of piplartine. **Experimental Parasitology**, v. 127, p. 357-364, 2011.

NAVICKIENE, H. M. D.; ALEÂCIO, A. C.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; YOUNG, M. C. M.; CAVALHEIRO, A. J.; FURLAN, M. Antifungal amides from *Piper hispidum* and *Piper tuberculatum*. **Phytochemistry**, v. 55, p. 621-626, 2000.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, p. 311-335, 2012.

ORTHOLAND, J. Y.; GANESAN, A. Natural products and combinatorial chemistry: back to the future. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 8, p. 271-280, 2004.

OSORIO-LOZADA, A.; TOVAR-MIRANDA, R.; OLIVO, H. F. Biotransformation of *N*-piperidinylaceto-phenone with *Beauveria bassiana* ATCC-7159. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 55, p. 30-36, 2008.

PARK, B.-S.; SON, D.-J.; PARK, Y.-H.; KIM, T.W.; LEE, S.-E. Antiplatelet effects of acidamides isolated from the fruits of *Piper longum* L. **Phytomedicine**, v. 14, p. 853-855, 2007.

PARMAR, V. S.; JAIN, S. C.; BISHT, K. S.; JAIN, R.; TANEJA, P.; JHA, A.; TYAGI, O. D.; PRASAD, A. K.; WENGEL, J.; OLSEN, C. E.; BOLL, P. M. Phytochemistry of the genus *Piper*. **Phytochemistry**, v. 46, p. 591-673, 1997.

PIGATTO, M. C.; LIMA, M. C. A.; GALDINO, S. L.; PITTA, I. R.; VESSECCHI, R.; ASSIS, M. D.; SANTOS, J. S.; COSTA, T. D.; LOPES, N. P. Metabolism evaluation of the anticancer candidate AC04 by biomimetic oxidative model and rat liver microsomes. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, p. 4245-4251, 2011.

PIVATTO, M.; CROTTI, A. E. M.; LOPES, N. P.; CASTRO-GAMBOA, I.; REZENDE, A.; VIEGAS-JUNIOR, C.; YOUNG, M. C. M.; FURLAN, M.; BOLZANI, V. S. Electrospray ionization mass spectrometry screening of piperidine alkaloids from *Senna spectabilis* (Fabaceae) Extracts: fast identification of new constituents and co-metabolites. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, p. 1431-1438, 2005.

RAJ, L.; IDE, T.; GURKAR, A.; FOLEY, M.; SCHENONE, M.; LI, X.; TOLLIDAY, N. J.; GOLUB, T. R.; CARR, S. A.; SHAMJI, A. F.; STERN, A. M.; MANDINOVA, A.; SCHREIBER, S. L.; LEE, S. W. Selective killing of cancer cells by a small molecule targeting the stress response to ROS. **Nature**, v. 475, p. 231-234, 2011.

RAO, V. R.; MUTHENNA, P.; SHANKARAIAH, G.; AKILESHWARI, C.; BABU, K. H.; SURESH, G.; BABU, K. S.; KUMAR, R. S. C.; PRASAD, K. R.; YADAV, P. A.; PETRASH, J. M.; REDDY, G. B.; RAO, J. M. Synthesis and biological evaluation of new piplartine analogues as potent aldose reductase inhibitors (ARIs). **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 57, p. 344-361, 2012.

RODRIGUES, R. V.; LANZMASTER, D.; BALBINOT, D. T. L.; GADOTTI, V. M.; FACUNDO, V. A.; SANTOS, A. R. S. Antinociceptive effect of crude extract, fractions and three alkaloids obtained from Fruits of *Piper tuberculatum*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 32, p. 1809-1812, 2009.

SCHAAB, E. H.; CROTTI, A. E. M.; IAMAMOTO, Y.; KATO, M. J.; LOTUFO, L. V. C.; LOPES, N. P. biomimetic oxidation of piperine and piplartine catalyzed by Iron(III)

and Manganese(III) porphyrins. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 33, p. 912-916, 2010.

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

SILVA, R. V.; NAVICKIENE, H. M. D.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; MÉDA, C. I.; YOUNG, M. C. M.; FURLAN, M. Antifungal amides from *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. **Phytochemistry**, v. 59, p. 521-527, 2002.

WILKINS, C. L. Hyphenated Techniques for Analysis of Complex Organic Mixtures. **Science**, v. 222, p. 291-296, 1983.

WU, Q.-L.; WANG, S.-P.; TU, G.-Z.; FENG, Y.-X.; YANG, J.-S. Alkaloids from *Piper puberulum*. **Phytochemistry**, v. 44, p. 727-730, 1997.

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

VESSECCHI, R.; EMERY, F. S.; GALEMBECK, S. E.; LOPES, N. P. Gas-phase reactivity of 2-hydroxy-1,4-naphthoquinones: a computational and mass spectrometry study of lapachol congeners. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 47, p. 1648-1659, 2012.

VESSECCHI, R.; GALEMBECK, S. E.; LOPES, N. P.; NASCIMENTO, P. G. B. D.; CROTTI, A. E. M. Aplicação da química quântica computacional no estudo de processos químicos envolvidos em espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 31, n. 4, p. 840-853, 2008.

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

YANG, Y.-H.; SUN, R.; SONG, H.-C.; XU, Y.-B.; YANG, P.; YANG, D.-Y.; SHEN, Z.-K.; WANG, A.-R.; CHEN, Y.-G.; DONG, J.-Y. Microbial transformation of the

triterpene nigroic acid in *Trichoderma* sp. **Phytochemistry Letters**, v. 5, p. 123-127, 2012.

ZHANG, D.; YANG, Y.; LEAKEY, J. E. A.; CERNIGLIA, C. E. Phase I and phase II enzymes produced by *Cunninghamella elegans* for the metabolism of xenobiotics. **FEMS Microbiology Letters**, v. 138, p. 221-226, 1996.

ANEXOS

Anexo 1. Espectros de EM/EM da piplartina obtidos em microTOF Q II. As energias de colisão com N_2 variaram de 5 a 40 eV.

Anexo 2. Espectros de EM/EM da 3,4-diidropiartina obtidos em microTOF Q II. As energias de colisão com N₂ variaram de 5 a 40 eV.

Anexo 3. Espectros de EM/EM da 8,9-diidropiartina obtidos em microTOF Q II. As energias de colisão com N₂ variaram de 5 a 40 eV.

Anexo 4. Cromatograma obtido no momento da separação da *cis*-piplartina em CLAE. Coluna semi-preparativa C₁₈ 5 µm VP250/10 nucleosil 120-5 Macherey-Nagel 250 x 10 mm, fase móvel isocrática 40% ACN e 60 % H₂O em CLAE, vazão de 3 mL.min⁻¹ e detecção no RID.

Anexo 5. Perfil cromatográfico da biotransformação da piplartina pelo fungo *P. crustosum* VR4 e dos controlos do fungo e de estabilidade da piplartina no sétimo dia. Coluna C₁₈ ACQUITY 1,7µm BEH de 2,1x50 mm e fase móvel gradiente de acetonitrila (ACN) e água ambos com 1% de ácido acético (v/v) (10% a 100% de ACN, em 5 min.), e uma vazão de 0,3 mL.min⁻¹ em UPLC-DAD.

Anexo 6. Perfil cromatográfico dos 10 dias de biotransformação da piplartina pelo fungo *P. crustosum* VR4. Coluna C₁₈ ACQUITY 1,7µm BEH de 2,1x50 mm e fase móvel gradiente de acetonitrila (ACN) e água ambos com 1% de ácido acético (v/v) (10% a 100% de ACN, em 5 min.), e uma vazão de 0,3 mL.min⁻¹ em UPLC-DAD.

Anexo 7. Perfil cromatográfico da biotransformação da piplartina pelo fungo *B. bassiana* ATCC 7159 e dos controles do fungo e de estabilidade da piplartina no sétimo dia. Coluna C₁₈ ACQUITY 1,7µm BEH de 2,1x50 mm e fase móvel gradiente de acetonitrila (ACN) e água ambos com 1% de ácido acético (v/v) (10% a 100% de ACN, em 5 min.), e uma vazão de 0,3 mL.min⁻¹ em UPLC-DAD.

Anexo 8. Perfil cromatográfico dos 10 dias de biotransformação da piplartina pelo fungo *B. bassiana* ATCC 7159. Coluna C₁₈ ACQUITY 1,7µm BEH de 2,1x50 mm e fase móvel gradiente de acetonitrila (ACN) e água ambos com 1% de ácido acético (v/v) (10% a 100% de ACN, em 5 min.), e uma vazão de 0,3 mL.min⁻¹ em UPLC-DAD.

Anexo 9. Perfil cromatográfico da biotransformação da piplartina pelo fungo *M. rouxii* NRRL1894 e dos controles do fungo e de estabilidade da piplartina no terceiro dia. Coluna C₁₈ ACQUITY 1,7µm BEH de 2,1x50 mm e fase móvel gradiente de acetonitrila (ACN) e água ambos com 1% de ácido acético (v/v) (10% a 100% de ACN, em 5 min.), e uma vazão de 0,3 mL.min⁻¹ em UPLC-DAD.

Anexo 10. Perfil cromatográfico dos 10 dias de biotransformação da piplartina pelo fungo *M. rouxii* NRRL1894. Coluna C₁₈ ACQUITY 1,7µm BEH de 2,1x50 mm e fase móvel gradiente de acetonitrila (ACN) e água ambos com 1% de ácido acético (v/v) (10% a 100% de ACN, em 5 min.), e uma vazão de 0,3 mL.min⁻¹ em UPLC-DAD.

Anexo 11. Perfil cromatográfico da biotransformação da piplartina pelo fungo *P. immersa* SS13 e dos controles do fungo e de estabilidade da piplartina no terceiro dia. Coluna C₁₈ ACQUITY 1,7µm BEH de 2,1x50 mm e fase móvel gradiente de acetonitrila (ACN) e água ambos com 1% de ácido acético (v/v) (10% a 100% de ACN, em 5 min.), e uma vazão de 0,3 mL.min⁻¹ em UPLC-DAD.

Anexo 12. Perfil cromatográfico dos 10 dias de biotransformação da piplartina pelo fungo *P. immersa* SS13. Coluna C₁₈ ACQUITY 1,7µm BEH de 2,1x50 mm e fase móvel gradiente de acetonitrila (ACN) e água ambos com 1% de ácido acético (v/v) (10% a 100% de ACN, em 5 min.), e uma vazão de 0,3 mL.min⁻¹ em UPLC-DAD.

Anexo 13. Perfil cromatográfico da biotransformação da piplartina pelo fungo *C. echinulata* ATCC 8688a e dos controles do fungo e de estabilidade da piplartina no décimo dia. Coluna C₁₈ ACQUITY 1,7µm BEH de 2,1x50 mm e fase móvel gradiente de acetonitrila (ACN) e água ambos com 1% de ácido acético (v/v) (10% a 100% de ACN, em 5 min.), e uma vazão de 0,3 mL.min⁻¹ em UPLC-DAD.

Anexo 14. Perfil cromatográfico dos 10 dias de biotransformação da piplartina pelo fungo *C. echinulata* ATCC 8688a. Coluna C₁₈ ACQUITY 1,7µm BEH de 2,1x50 mm e fase móvel gradiente de acetonitrila (ACN) e água ambos com 1% de ácido acético (v/v) (10% a 100% de ACN, em 5 min.), e uma vazão de 0,3 mL.min⁻¹ em UPLC-DAD.

Anexo 15. Espectro de EM/EM das substâncias 1-15, obtidos nas análises realizadas em UPLC.

Anexo 16. Espectros de HRESIMS no modo positivo e negativo do extrato do sétimo dia de biotransformação pelo fungo *P. crustosum* VR4.

Anexo 17. Espectros de HRESIMS no modo positivo e negativo do extrato do sétimo dia de biotransformação pelo fungo *B. bassiana* ATCC 7159 e suas ampliações.

Anexo 18. Espectros de HRESIMS no modo positivo e negativo do extrato do terceiro dia de biotransformação pelo fungo *M. rouxii* NRRL 1894 e suas ampliações.

Anexo 19. Espectros de HRESIMS no modo positivo e negativo do extrato do terceiro dia de biotransformação pelo fungo *P. immersa* SS13 e suas ampliações.

Anexo 20. Espectros de HRESIMS no modo positivo e negativo do extrato do décimo dia de biotransformação pelo fungo *C. echinulata* ATCC 8688a e suas ampliações.

Anexo 21. Espectros de HRESIMS da substância **11** no modo positivo em A, e espectros de EM/EM em B-H com a energia de colisão variando entre 5-30 eV, obtidos em microTOF Q II.