UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Transformações microbianas da lactona sesquiterpênica tagitinina C

Bruno Alves Rocha

Ribeirão Preto
2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Transformações microbianas da lactona sesquiterpênica tagitinina C

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

Área de Concentração: Produtos
Naturais e Sintéticos

Orientado: Bruno Alves Rocha

Orientador: Prof. Dr. Fernando Batista da
Costa

Ribeirão Preto

2009

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.

Rocha, Bruno Alves

Transformações microbianas da lactona sesquiterpênica tagitinina C.
Ribeirão Preto, 2009.

70 p. : il.; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de
Ribeirão Preto / USP – Área de Concentração: Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Batista da Costa.

1.Transformações microbianas. 2. Lactonas sesquiterpênicas. 3.Tagitinina
C.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autor: Bruno Alves Rocha

Título do trabalho: Transformações microbianas da lactona sesquiterpênica tagitinina
C

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

Área de Concentração: Produtos
Naturais e Sintéticos

Orientador: Prof. Dr. Fernando Batista da
Costa

Aprovado em:

Banca Examinadora:

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

“Um homem precisa viajar. Por sua conta, não por meio de histórias, imagens, livros ou televisão. Precisa viajar por si, com seus olhos e pés, para entender o que é seu. Para um dia plantar as suas árvores e dar-lhes valor. Conhecer o frio para desfrutar o calor. E o oposto. Sentir a distância e o desabrigo para estar bem sob o próprio teto. Um homem precisa viajar para lugares que não conhece para quebrar essa arrogância que nos faz ver o mundo como o imaginamos, e não simplesmente como é ou pode ser; que nos faz professores e doutores do que não vimos, quando deveríamos ser alunos, e simplesmente ir ver”.

Amir Klink

DEDICATÓRIA

À minha amada Mãe e à minha doce irmã, que souberam aceitar minha ausência e, sobretudo, por serem os melhores exemplos de força e vida para mim.

À sempre guerreira Família Rocha que fez-me sentir acolhido com palavras que tornaram-me mais forte diante das dificuldades.

Aos meus amigos, em especial Bruno e Jairo, que tornaram-se irmãos nesta caminhada sinuosa pelos caminhos da Califórnia Brasileira.

Paula: não existe palavras para descrever o quanto você é essencial na minha vida, pela sabedoria das palavras e por ser uma grande mulher ao meu lado e reerguendo-me nos momentos difíceis.

Febcosta, por ser exemplo de pesquisador e orientador durante toda a caminhada.

AGRADECIMENTOS

À minha Mãe pelo apoio e sacrifício, por aceitar minha ausência e ser a dona das maiores lições, sem falar no seu fomento;

Ao Prof. Dr. Fernando Batista da Costa, por me aceitar, pela orientação, confiança, amizade e por contribuir para minha formação, que significa muito para mim, além dos ensinamentos que só um grande mestre é capaz de dar e ao qual levarei sempre iluminando minha jornada. Tenha minha eterna gratidão por tantos ensinamentos;

À minha doce amiga, não teria aqui palavras para resumir sua importância neste trabalho; muito obrigado, ficaria pequeno perto do tamanho de seus atributos e valores;

À Profa. Dra. Mônica Tallarico Pupo e Profa. Dra. Suraia Said, pela colaboração neste trabalho.

Aos dinossauros da Gnosia e grandes amigos Jaburu, João Paulo e Niltinho pelo apoio e lições suprimindo quaisquer dúvidas apresentadas.

Aos meus “irmãos” Bruno e Jairo, incansáveis, foram às vezes os que me apoiaram e deram força para continuar em frente.

Aos amigos e técnicos, Waltin e Mário, por tornarem o ambiente de trabalho algo prazeroso e divertido.

À todos do grupo de pesquisa Química e Biologia de Asteraceae, em especial à Rejane e Daniela, amigas que enriqueceram minha vida com palavras e conselhos e ainda ao Gobbo, por tanto conhecimento transmitido e ajuda importante no encerramento deste.

Aos amigos do laboratório Flavinha, Vanessa, Aline, Clarissa, Ana, Eliane, Mariza, Ramon e Renata: muitos momentos de descontração e colaborações.

Em especial ao amigo *Sir* Willian Jonis, exemplo de pessoa, quantos artigos discutidos?

À FAPESP e ao CNPq pelo apoio financeiro.

À CAPES pelo financiamento deste projeto.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, local do desenvolvimento desta pesquisa.

À Coordenação da Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e às funcionárias Ana, Rosana e Rossana, pela atenção, paciência e carinho.

Aos Professores e Funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, pela dedicação ao trabalho e cuidado com cada aluno. Em especial à Dona Evanira, por me tornar dependente químico do seu café

RESUMO

ROCHA, B. A. **Transformações microbianas da lactona sesquiterpênica tagitinina C.** 2009. 70f.. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

A procura por moléculas de origem natural que ocupem um espaço químico diferente daquelas já existentes tornou-se uma necessidade no processo de descoberta de novas entidades químicas com interesse farmacológico que atendam a nova demanda da indústria farmacêutica. A pesquisa envolvendo transformações microbianas de metabólitos secundários de origem vegetal pode ser utilizada como uma alternativa racional para a biosíntese destas novas substâncias, favorecendo a criação de bibliotecas ricas em estruturas que possam ser triadas frente a diversos alvos biológicos. A tagitinina C é uma lactona sesquiterpênica isolada da *Tithonia diversifolia* (Asteraceae) e possui diversas atividades biológicas descritas na literatura. Contudo, há certa ressalva no uso oral destas lactonas sesquiterpênicas para fins terapêuticos devido à sua toxicidade. A biotransformação de substâncias naturais de interesse farmacológico pode ser utilizada com o intuito de diminuir seus efeitos tóxicos ou ampliar sua capacidade terapêutica. Assim, esse trabalho teve como objetivo a utilização de fungos para realizarem a biotransformação da tagitinina C. Os resultados obtidos mostraram que os fungos de solo *Aspergillus terreus* e *Mucor rouxii* possuem a capacidade de biotransformar a tagitinina C. O fungo *A. terreus* levou à formação de um produto biotransformado através de uma reação de epoxidação não usual entre C4-C5 e ainda uma metoxilação do C1, com a formação do derivado 1β-metóxi-3α-hidróxi-3,10β-4,5α-diepóxi-8β-isobutiroilóxi-germacra-11(13)-en-6α,12-olido. Os resultados obtidos nesse trabalho demonstram que é possível a utilização de fungos na biotransformação da tagitinina C, levando a alterações na estrutura química que podem influenciar no seu potencial tóxico ou terapêutico.

Palavras chave: Transformações microbianas, lactonas sesquiterpênicas, tagitinina C.

ABSTRACT

ROCHA, B. A. **Microbial transformation of sesquiterpene lactone tagitinin C.** 2009. 70f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

The search for molecules of natural origin that place a chemical space which is different from the already existing has become that a need in process of discovery new chemical entities with pharmacological interest that support the demand of the pharmaceutical industries. Research involving microbial transformations the secondary metabolites from plants can be used as an alternative for the biosynthesis of such new compounds, thus facilitating the creation of libraries which are rich in structures to be screened against diverse biological targets. Tagitin C is a sesquiterpene lactone isolated from *Tithonia diversifolia* (Asteraceae) that displays several biological activities already described in the literature. However, due to several reports describing toxic effects of sesquiterpenes lactones, there is a concern in its oral use. Thus, the biotransformation of pharmacologically interesting substances can be carried out with the aim to decrease their toxic effects or amplify their therapeutic properties. Therefore, this work aimed at using of fungi to perform biotransformations of tagitin C. The results showed that the soil fungi *Aspergillus terreus* and *Mucor rouxii* have the ability to carry out biological transformations of tagitin C. The fungus *A. terreus* led to the formation of a different product through an unusual reaction of epoxidation between C4-C5 and metoxilation of C1 of tagitin C, the derivative 1 β -methoxy-3 α -hydroxy-3,10 β -4,5 α -diepoxy-8 β -isobutyroxyloxy-germacr-11 (13)-en-6 α ,12-olide. The results of this work show that it is possible to use soil fungi in the biotransformation of tagitin C, leading to changes in the chemical structure that may influence its toxic or therapeutic potential.

Keywords: Microbial transformations, sesquiterpene lactone, tagitin C.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	v
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	ix
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Diversidade química dos produtos naturais	1
1.2. Biotransformação microbiana	3
1.3. “Tricomas glandulares” e o substrato tagitinina C.....	6
1.4. Família Asteraceae e a espécie <i>T. diversifolia</i> fornecedora do substrato	7
1.5. Transformações microbianas de lactonas sesquiterpênicas.....	9
1.6. As ferramentas da biotransformação	9
1.6.1. Fungos de solo.....	9
1.6.2. Fungos endofíticos	14
2. OBJETIVOS.....	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1. Coleta do vegetal	17
3.2. Estabilização das folhas	17
3.3. Obtenção do extrato bruto de lavagem foliar	17
3.4. Partição e fracionamento do extrato bruto de lavagem foliar	18
3.5. Isolamento do metabólito secundário de interesse tagitinina C	18
3.6. Identificação estrutural das substâncias isoladas	23
3.7. Transformações microbianas da tagitinina C	24
3.7.1. <i>Screening</i>	24
3.7.2. Escala preparativa.....	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
4.1. Isolamento da tagitinina C	26
4.2. Processo de biotransformação: “ <i>screening</i> ”	31
4.2.1. Análises por CCDC	31
4.2.2. Análise por CLAE	34
4.2.3. Análise por espectroscopia no infravermelho.....	35
4.3. Processo de biotransformação: escala preparativa	38
4.4. Avaliação dos perfis cromatográficos dos extratos em escala preparativa	39
4.4.1. ATDC	40
4.4.2. ATAC.....	42

4.4.3. MRDC	43
4.4.4. MRAC.....	45
4.5. Isolamento dos constituintes dos extratos de biotransformação.....	46
4.5.1. Extrato ATDC	46
4.5.2. Extrato ATAC	48
4.5.3. Extrato MRDC	50
4.5.4. Extrato MRAC	52
4.6. Elucidação das substâncias isoladas.....	53
4.6.1. ATDC 04	53
4.7. Proposta de biotransfromação enzimática do composto ATDC 04.....	57
5. CONCLUSÕES	59
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AcOEt	Acetato de Etila
AcOH	Acido acético
AT	<i>Aspergillus terreus</i>
CCDC	Cromatografia em camada delgada comparativa
CCDP	Cromatografia em camada delgada preparativa
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLV	Cromatografia líquida a vácuo
COSY	<i>Correlated spectroscopy</i>
DCM	Diclorometano
<i>d</i>	Dubleto
<i>Dd</i>	Duplo dubleto
<i>ddd</i>	Duplo duplo dubleto
DMSO	Dimetilsulfóxido
Hex	<i>n</i> -hexano
HMBC	<i>Heteronuclear multiple bond coherence</i>
HMQC	<i>Heteronuclear multiple quantum coherence</i>
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento
LSTs	Lactonas sesquiterpênicas
<i>m</i>	Multiplete
MeCN	Acetonitrila
MR	<i>Mucor rouxii</i>
RMN ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de ¹³ C

RMN ^1H	Ressonância magnética nuclear de ^1H
<i>s</i>	Singleto
<i>sept</i>	Septupletto
<i>t</i>	Tripletto
tagC	Tagitinina C
Tr	Tempo de retenção
UV	Ultravioleta

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Biblioteca de dados contendo os diversos componentes obtidos através de (a) compostos da química combinatória (<i>n</i>) 13 506), b) produtos naturais (<i>n</i>) 3287), e c) drogas (<i>n</i>) 10 968).	2
Figura 2	Estrutura da tagitinina C.	6
Figura 3	Esquema da biotransformação da budleína A por fungos do gênero <i>Aspergillus</i> .	10
Figura 4	Espectro no UV da substância tagC.	27
Figura 5	Cromatograma obtido da fração D6 (mAu x min), MeCN:H ₂ O 45:55, fluxo 1mL/min, UV λ =254 nm.	27
Figura 6	Espectro de RMN ¹ H da fração T4 (500 MHz, CDCl ₃).	28
Figura 7	Espectro de RMN ¹ H da fração V5 (500 MHz, CDCl ₃).	29
Figura 8	Espectro de RMN ¹ H da TagC (400 MHz, CDCl ₃).	29
Figura 9	CCDC dos dias de cultivo do fungo MR.	32
Figura 10	CCDC dos dias de cultivo do fungo AT.	33
Figura 11	CCDC dos dias de cultivo do fungo DP.	33
Figura 12	Cromatograma obtido do 9º dia de cultivo, fungo com substrato, (mAu x min), MeCN:H ₂ O 45:55 0,1% de ACOH, fluxo 1mL/min, UV λ =254 nm.	34
Figura 13	Cromatograma obtido do 9º dia de cultivo, fungo com substrato, (mAu x min), ACN:H ₂ O 45:55 0,1% de ACOH acetico, fluxo 1mL/min, UV λ =254 nm.	35
Figura 14	Espectro no IV, 9º dia do fungo AT sem substrato.	36
Figura 15	Espectro no IV, 9º dia do fungo AT com substrato.	36
Figura 16	Espectro no IV, 9º dia do fungo MR sem substrato.	37
Figura 17	Espectro no IV, 9º dia do fungo MR com substrato.	37
Figura 18	Espectro no IV, do substrato com alta concentração de tagC.	38
Figura 19	Cromatograma obtido para análise e obtenção do perfil cromatográfico da tagC e obtenção do tempo de retenção.	40
Figura 20	Cromatograma obtido para análise e obtenção do perfil cromatográfico do extrato particionado com DCM do fungo AT em 210nm.	40
Figura 21	Cromatograma obtido para análise e obtenção do perfil cromatográfico do extrato particionado com DCM do controle do fungo AT em 210nm.	41
Figura 22	Cromatograma obtido para análise e obtenção do perfil cromatográfico do extrato particionado com AcOET do fungo AT em 210nm.	42
Figura 23	Cromatograma obtido para análise e obtenção do perfil cromatográfico do extrato particionado com AcOET do controle do fungo AT em 210nm.	42
Figura 24	Cromatograma obtido para análise e obtenção do perfil cromatográfico do extrato particionado com DCM do	43

	fungo <i>MR</i> em 220nm.	
Figura 25	Cromatograma obtido para análise e obtenção do perfil cromatográfico do extrato particionado com DCM do controle do fungo <i>MR</i> em 220nm.	44
Figura 26	Cromatograma obtido para análise e obtenção do perfil cromatográfico do extrato particionado com acetato de etila do fungo <i>MR</i> em 210nm.	45
Figura 27	Cromatograma obtido para análise e obtenção do perfil cromatográfico do extrato particionado com acetato de etila do controle do fungo <i>MR</i> em 210nm.	45
Figura 28	Esquema ilustrativo do isolamento das substâncias presentes no extrato ATDC e seus respectivos espectros no UV.	47
Figura 29	Esquema ilustrativo do isolamento das substâncias presentes no extrato ATAC e seus respectivos espectros no UV.	49
Figura 30	Esquema ilustrativo do isolamento das substâncias presentes no extrato MRDC e seus respectivos espectros no UV.	51
Figura 31	Esquema ilustrativo do isolamento das substâncias presentes no extrato MRAC e seus respectivos espectros no UV.	53
Figura 32	Estrutura Tridimensional de ATDC 04, destacando-se o não acoplamento do hidrogênios H5 e H6 e o ângulo de 90° entre eles.	55
Figura 33	Estrutura Tridimensional ATDC 04, destacando a desblindagem sofrida pelo H7 e a proximidade no espaço com o átomo de oxigênio do anel furano.	55
Figura 34	Equação de Karplus correlacionando o ângulo diedro e a constante de acoplamento entre hidrogênios	55
Figura 35	Estrutura da substância ATDC04, 1β-metóxi-3α-hidróxi-3,10β-4,5α-diepóxi-8β-isobutiroilóxi-germacr-11(13)-en-6α,12-olido.	57
Figura 36	Proposta de biotransformação da tag C	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Lactonas sesquiterpênicas e espécies de microrganismos utilizados em processos de biotransformação.	11
Tabela 2	Esquema de eluição utilizado no fracionamento da FDCM (40 g) e as massas obtidas.	19
Tabela 3	Atribuição de códigos e agrupamento das frações obtidas na primeira CLV.	19
Tabela 4	Esquema de eluição utilizado no fracionamento da fração D e as massas obtidas.	20
Tabela 5	Esquema de eluição utilizado no fracionamento da fração X e as massas obtidas.	21
Tabela 6	Esquema de eluição utilizado no fracionamento da fração T e as massas obtidas.	22
Tabela 7	Esquema de eluição utilizado no fracionamento da fração V e as massas obtidas.	22
Tabela 8	Extratos obtidos da partição com diferentes solventes do filtrado dos cultivos fúngicos.	39
Tabela 9	Gradiente de fase móvel utilizada para avaliar o perfil dos extratos.	39
Tabela 10	Esquema do gradiente de eluição da fase móvel MeCN:H ₂ O para o extrato ATDC.	46
Tabela 11	Tabela com códigos, tempos de retenção e massas das respectivas substâncias isoladas do extrato ATDC.	47
Tabela 12	Esquema do gradiente de eluição da fase móvel MeCN:H ₂ O para o extrato ATAC.	48
Tabela 13	Tabela com códigos, tempo de retenção e massas das respectivas substâncias isoladas do extrato ATAC.	48
Tabela 14	Esquema do gradiente de eluição da fase móvel MeCN:H ₂ O para o extrato MRDC.	50
Tabela 15	Tabela com códigos, tempo de retenção e massas das respectivas substâncias isoladas do extrato MRDC.	50
Tabela 16	Esquema do gradiente de eluição da fase móvel MeCN:H ₂ O para o extrato MRAC.	52
Tabela 17	Tabela com códigos, tempo de retenção e massas das respectivas substâncias isoladas do extrato MRAC.	52
Tabela 18	Dados de espectrometria RMN para substância ATDC 004.	56

1. INTRODUÇÃO

1.1. Diversidade química dos produtos naturais

Os produtos naturais foram por um longo período de tempo a fonte mais atrativa para a busca de protótipos para a obtenção de novas drogas. Contudo, devido à grande dificuldade no processo de isolamento e identificação de substâncias oriundas de fontes naturais, dentre outros problemas, o interesse das indústrias farmacêuticas na utilização destes produtos tem diminuído. Novas abordagens na procura de moléculas promissoras devem aliar então a biodiversidade pouco explorada com novas e avançadas técnicas analíticas, removendo assim algumas das dificuldades na busca de novos produtos de origem natural (HARVEY, 2007).

Nos trabalhos mais recentes que relatam modernas abordagens na busca de novas moléculas têm sido introduzidos alguns termos diferentes, os quais serão brevemente descritos a seguir. Segundo DOBSON (2004), *chemical space* (espaço químico) refere-se ao espaço ocupado por todas pequenas moléculas orgânicas possíveis, incluindo aquelas sintetizadas e as de sistemas biológicos, sendo um termo utilizado para descrever a substância em um espaço multidimensional. *Combinatorial chemistry* (química combinatória) trata-se de uma ferramenta na síntese de moléculas para construção de grandes coleções ou bibliotecas de compostos pela combinação de um conjunto de pequenas estruturas químicas, com partes estruturais conhecidas. *Drug-Like* (análogo) refere-se às moléculas que partilham certas características com compostos protótipos. Estas características envolvem tamanho, forma e solubilidade em água e em solventes orgânicos. *Natural product-like* (análogos a produtos naturais) refere-se a moléculas de origem natural que compartilham das características acima citadas referentes aos “análogos”.

Considerando estas abordagens, métodos sintéticos e biossintéticos estão sendo desenvolvidos para produção de bibliotecas de compostos denominadas *natural product-like*, visto que o espaço químico ocupado pelos produtos naturais é mais variado do que quaisquer coleções químicas (Figura 1), além de muitas vezes tais substâncias apresentarem propriedades semelhantes às dos “análogos” (FEHLER, SCHMIDT, 2003).

Figura 1. Biblioteca de dados contendo os diversos componentes obtidos através de (a) compostos da química combinatória ($n= 13\ 506$), b) produtos naturais ($n= 3287$), e (c) drogas ($n= 10\ 968$) onde n representa números de moléculas (FEHLER, SCHMIDT, 2003).

Henke *et al.* (1999) e Fehler, Schmidt (2003) relatam características que explicam o sucesso dos produtos naturais na descoberta de novas drogas, tais como sua alta diversidade química, afinidade e seletividade para receptores específicos em sistemas biológicos e ainda seletivos para estes. Considerando a análise da diversidade química-estrutural dos produtos naturais, as coleções de substâncias de origem natural apresentam grande variedade em comparação com aquelas produzidas pela química combinatória, o que demonstra o potencial dos estudos realizados com metabólitos secundários, como os de origem vegetal. Além disso, análises estruturais avançadas de componentes naturais resultaram em modelos matemáticos, os quais descrevem as regiões do espaço químico que eles ocupam (LARSON *et al.*, 2007). A partir destas abordagens, obteve-se novas bibliotecas de substâncias que ocuparão porções do espaço químico destinadas a serem associadas com a atividade biológica de protótipos, análogos e drogas.

Os produtos naturais podem contribuir não somente fornecendo ingredientes ativos de medicamentos, mas também podem inspirar o *design* e a síntese de análogos que podem ter propriedades melhoradas. Isto pode ser feito aplicando técnicas de desenvolvimento para química combinatória ou pela variedade de técnicas que envolvem combinações de enzimas biosintéticas (HARVEY, 2007).

Vários são os exemplos do uso de produtos naturais como modelo para criação de bibliotecas sintéticas de componentes compatíveis com os *screenings* modernos na abordagem de novas biomoléculas. Aliado a este, a biotransformação tornou-se um método estabelecido na síntese orgânica e biocatálise, que certamente

contribuirá de forma efetiva para o desenvolvimento de novas pesquisas, ampliando o conhecimento nesta área (LERESCHE, MEYER, 2006).

1.2. Biotransformação microbiana

Biotransformações são conversões químicas catalisadas por enzimas sobre substratos não naturais (SHAW *et al.*, 2003). Constituem uma ferramenta importante na síntese orgânica, especialmente na obtenção de moléculas quirais por sínteses assimétricas ou por resolução de racematos. O procedimento mais comumente utilizado é realizado com células totais de microrganismos cultivados em meios apropriados, onde toda a maquinaria enzimática está disponível, o que pode gerar uma mistura de produtos biotransformados. As preparações incluem extratos enzimáticos de microrganismos, plantas, protozoários e insetos, entre outros. Pode-se ainda utilizar enzimas puras isoladas de diferentes fontes, muitas delas disponíveis comercialmente. No entanto, essas últimas são bastante onerosas, uma vez que além da enzima, é necessário o uso de um ou mais cofatores para que a mesma seja ativa (FABER, 1997).

As biotransformações têm sido investigadas desde os tempos de Pasteur e foram impulsionadas por grandes químicos e bioquímicos do século XIX. É interessante observar que, naquela época, era comum um mesmo cientista pesquisar temas inerentes à química e à bioquímica sem nenhuma distinção. Um exemplo dessa afirmação é a lista de processos catalíticos feita por Berzelius em 1838 (ROBERTS *et al.*, 1995). Essas duas áreas da ciência percorreram juntas um longo caminho e, em algum momento no início do século XX, elas se tornaram independentes. Hoje, após quase um século, os cientistas tomaram consciência de que existe, na interface destas ciências, um mundo a ser ainda descoberto (BEATRIZ *et al.*, 2005). O progresso no uso de enzimas e células integrais na Química Orgânica Sintética foi relativamente lento até os anos 50, quando o uso de microrganismos para modificar núcleos esteroidais foi estudado em laboratórios industriais e acadêmicos (HOLLAND, 1992).

As reações catalisadas por enzimas podem ser divididas em seis principais grupos, de acordo com a união internacional de bioquímica. Estes grupos são (1) oxidoreduases, que realizam reações de oxidação e redução; oxigenação das

ligações C-H, C-C e C=C e remoção de átomos de hidrogênio equivalentes. (2) transferases, que realizam transferência de grupos tais como acila, fosforila, aldeído, cetônico e açúcares. (3) hidrolases, que realizam hidrólise de glicosídeos, anidridos, ésteres, amidas, peptídeos e outras funções contendo C-N. (4) liases, que realizam reações tais como adição de HX em ligações duplas como em C=C, C=N e C=O e também o processo reverso. (5) isomerases, que efetuam migração de ligação C=C, isomerização e racemização *cis-trans*. (6) ligases, responsáveis pela formação de ligação C-O, C-S, C-N, C-C e formação de ligação éster de fosfato (LOGHLIN, 2000).

Segundo LOGHLIN (2000), as principais vantagens do uso de enzimas na síntese orgânica são: (A) catálises eficientes, sendo o processo da reação mais rápido quando comparado com a catálise química e as enzimas podem ser efetivas mesmo em baixas concentrações molares; (B) reações sob condições suaves, numa faixa de temperatura moderada (20-40 °C) e pH neutro (em torno de 7,0) minimizando reações indesejadas, tais como rearranjos e reações laterais; (C) ação catalítica sobre um grande número de substratos em locais de difícil acesso por meio sintético; (D) seletividades tais como:

- quimiosseletividade: algumas enzimas podem reagir com um único grupo funcional, mesmo na presença de outros grupos reativos. Isto leva a produtos reacionais mais “limpos”, facilitando o processo de purificação;
- regiosseletividade: devido à sua estrutura tridimensional complexa, podem distinguir entre grupos funcionais que estão situados em diferentes regiões da mesma molécula do substrato;
- enantiosseletividade: quase todas as enzimas são formadas a partir de *L*-amino ácidos, portanto são catalisadores quirais. Como consequência, qualquer tipo de quiralidade presente na molécula do substrato é “reconhecida” na formação do complexo enzima-substrato. Sendo assim, um substrato pró-quiral pode ser transformado em um produto opticamente ativo e ambos enantiômeros de um substrato racêmico podem reagir com velocidades diferentes;

(E) preocupado com as questões ambientais, uma importante ferramenta na química verde; (F) podem também ser utilizados na determinação dos padrões de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME), observando-se deste modo estudos

do metabolismo de drogas através de mono-oxigenases, das quais a enzima chave é o citocromo P450 (CANELL, 1998).

A principal desvantagem dos sistemas de transformações microbianas é a imprevisibilidade do processo (exceto algumas vezes, no caso de enzimas purificadas). A fim de maximizar as chances de se obter um produto particular ou de obtenção de grande variação de produtos, é frequentemente necessário utilizar uma ampla variedade de espécies de microrganismos na triagem inicial (ARAKAWA, 2007).

Um aspecto importante que não pode ser esquecido é o tipo de microrganismo a ser utilizado no processo. Frequentemente são usados fungos ou bactérias isoladas de vegetais, da água e do solo, os quais, em geral, não são patogênicos para os humanos (ARRUDA, 2002). Para a realização de transformação microbiana são necessárias algumas etapas, tais como: 1) triagem inicial para identificar os microrganismos que realizam as biotransformações do composto em estudo; 2) selecionados os microrganismos que atendem ao esperado, é necessário usá-los como controle, ou seja, inoculá-los no meio de cultivo sem a presença do composto a ser transformado com adição do solvente utilizado para dissolver a amostra; 3) analisar ambos extratos, tanto o do grupo controle como o do grupo que continha o composto a ser transformado, para descartar a possibilidade de compostos produzidos pelo fungo ou ainda do próprio meio de cultura serem confundidos com o biotransformado; 4) obter micro-extratos para a realização de testes de atividades biológicas; 5) promover ampliação de escalas de culturas; 6) realizar o isolamento de metabólitos (ARAKAWA, 2007).

Após a obtenção dos micro-extratos, uma alternativa interessante para o direcionamento dos estudos de transformações microbianas é a realização de triagem dos extratos através de bioensaios monitorados em alta demanda, os chamados *High-Throughput Screening* ou (HTS), para a obtenção de informações sobre quais extratos são promissores ou não para as atividades biológicas pretendidas.

1.3. “Tricomas glandulares” e o substrato tagitinina c

Os tricomas glandulares presentes nas partes aéreas de espécies da tribo Heliantheae são estruturas morfológicas responsáveis por armazenar metabólitos secundários, principalmente as LSTs (SPRING, 2001). Tais substâncias são os marcadores quimiotaxonômicos de diversas espécies como, por exemplo, as do gênero *Tithonia* (AMBRÓSIO *et al*, 2008; PEREIRA *et al.*, 1997). Essas substâncias, além de serem utilizadas como marcadores quimiotaxonômicos, apresentam inúmeras atividades biológicas e tóxicas (PICMAN, 1986; SCHMIDT, 1999).

Trabalhos recentes com o extrato de lavagem foliar de *T. diversifolia* (AMBRÓSIO *et al*, 2008) revelaram a presença de um flavonóide, um diterpenóide e 15 LSTs, destacando-se o isolamento de grande quantidade das tagitininas A, C e F. A tag C (Figura 2) é o metabólito secundário de maior relevância e quantidade nos tricomas, sendo o objeto primordial desta pesquisa.

Figura 2: Estrutura da tagitinina C.

Estudos anteriormente realizados por outros grupos de pesquisa relatam diferentes componentes químicos em *T. diversifolia*, sendo a grande maioria terpenoídicos e muitos deles com atividades biológicas. A tagC mostrou atividade anti-proliferativa frente a células tumorais (GU *et al.*, 2002) e atividade citotóxica frente à linhagens celulares HL-60 (leucêmicas) (KURODA *et al.*, 2007), além de sua atividade alelopática relatada por BARUAH (1994).

SCHMIDT (1999) atribui toxicidade às plantas que contém LSTs, pois estas produzem efeitos tóxicos *in vitro* e *in vivo* sobre células de mamíferos. *In vivo*, o efeito tóxico estende-se sobre os sistemas nervoso, cardiovascular, gastrintestinal e órgãos internos,

sendo também irritante para pele, desenvolvendo processo alérgico através de contato. Somando-se a isso, as LSTs ainda apresentam ações nos sistemas imune e reprodutivo, genotoxicidade e mutagenicidade, além de efeitos tóxicos sobre microrganismos, invertebrados e plantas. Diante da toxicidade apresentadas das LSTs, constata-se a necessidade de modificações de suas estruturas para amenizar tais efeitos, uma vez que as ações farmacológicas destas LSTs são importantes para sua ação terapêutica. Entretanto, as alterações nas estruturas químicas de LSTs através de métodos convencionais de síntese orgânica são muito complexas. Isto mostra que o tipo de investigação proposto neste trabalho é promissor, uma vez que a transformação microbiana pode gerar derivados menos tóxicos ou ainda mais potentes.

1.4. Família Asteraceae e a espécie *T. diversifolia*: “fornecedora do substrato”

A respeito de plantas medicinais e daquelas que biossintetizam substâncias com potencial biológico promissor, destacam-se as espécies da família Asteraceae, uma das maiores entre as angiospermas, com aproximadamente 23.000 representantes (BREMER, 1994). Das 17 tribos desta família merece destaque a tribo Heliantheae, com aproximadamente 3.000 espécies, distribuídas em 10 subtribos e composta de aproximadamente 200 gêneros, entre eles *Helianthus annuus* (girassol), *Smallanthus sonchifolius* (yacón), espécies de *Viguiera* e a *Tithonia diversifolia* (margaridão). Tais espécies são predominantes em regiões de cerrado, área de elevada biodiversidade vegetal podendo também ocorrer em outros ecossistemas (GOTTLIEB; KAPLAN; BORIN, 1996). Estas têm importância econômica, medicinal e são fontes importantes de moléculas bioativas.

O gênero *Tithonia* compreende 10 espécies, todas originárias do México. *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray é um arbusto anteriormente identificado como *T. rotundifolia* ou *T. tagitiflora*. Foi introduzida no Sri Lanka e em regiões da Índia como planta ornamental. Na Nigéria, ocorre às margens das estradas e em terras não cultivadas, e também como uma invasora de campos de cultivo na zona de transição entre a floresta e a savana, de maneira similar ao Brasil. Atualmente está distribuída nos trópicos, em especial na América Central e do Sul, Ásia e África (KATTO *et al.*, 1995; AKINOLA *et al.*, 2000; JAMA *et al.*, 2000). Os seguintes nomes populares são relatados para a espécie: margaridão amarelo,

unha-de-gavião, girassol silvestre, girassol mexicano, *botón-de-oro*, *rayo-de-sol*, mirasol, botão-de-ouro, arnica-da-terra e quil amargo.

Em relação aos extratos brutos de *T. diversifolia*, comprovaram-se a atividade hipotensora, o decréscimo da amplitude e frequência da contração cardíaca, a queda do fluxo coronariano, contração estimulada em intestino e útero, citotoxicidade, propriedades hipoglicêmicas, antitumoral, hepatoprotetora e antiinflamatória em modelos animais (LAMATY, 1993; HAMOWIA e SAFAF, 1994). As atividades antibacteriana e analgésica foram confirmadas em estudo realizado por OWOYELE *et al.* (2004), além da corroboração da ação antiinflamatória.

As atividades espasmolítica, anti-helmíntica e contra *Entamoeba histolytica* também foram atribuídas a *T. diversifolia* (TONA *et al.*, 2000). O estudo do efeito antidiabético em ratos mostrou melhora no metabolismo da glicose e foi comprovada a ação antidiarréica da espécie (TONA *et al.*, 1999; MIURA *et al.*, 2002). *T. diversifolia* apresentou significativo efeito citotóxico e moderada atividade antibacteriana contra *Bacillus subtilis*, além de inibição contra o vírus tipo-1 da imunodeficiência adquirida (HIV- 1) (MUNGARULIRE, 1990) e de potencial efeito antimalárico (ELUFIOYE, AGBEDAHUNSI 2004). As LSTs como a diversifolina reduzem o grau de inflamação devido a inibição da ativação do fator NF-kB, pois possuem dois sítios eletrofílicos capazes de reagir efetivamente com a cisteína da subunidade p65, impedindo sua ligação ao DNA e desencadeando a resposta inflamatória (RUNGELER, 1998).

Alguns estudos revelaram que o grupo responsável pela maioria das atividades biológicas envolvendo LSTs é o grupo α -metileno- γ -lactona, sendo saturação ou adição ao grupo metileno os responsáveis pela perda dessas atividades biológicas. Por outro lado, outras substituições na cadeia carbocíclica podem potencializar tais atividades ou inibi-las. Mudanças tais como a presença de um grupo epóxido ou um éster adicional conjugado podem aumentar a citotoxicidade das LSTs (PICMAN, 1986).

As LSTs são metabólitos secundários provenientes da via do mevalonato. São incolores, amargas, relativamente estáveis, constituintes lipofílicos derivados biogeneticamente do *trans-trans*-farnesil-pirofosfato e sofrem ciclização e subseqüentes modificações oxidativas, possuindo uma grande variedade de esqueletos carbocíclicos conhecidos, tais como: germacrolídeo, eudesmanolídeo, heliangolídeo, furanoeliangolídeo e guaianolídeo, dentre outros menos comuns (SEAMAN, 1982).

As LSTs têm papel na defesa da planta, atuando contra diversos herbívoros e inibindo o crescimento de larvas de diversas espécies; uma atividade atribuída a esta classe é a alelopatia. Segundo BARUAH e colaboradores (1994), algumas LSTs que atuam desta forma sobre arroz, sorgo e rabanete são as tagitininas A e C.

Estudos realizados em nosso laboratório demonstraram a atividade de LSTs de *T. diversifolia* contra formas promastigotas de *Leishmania brasiliensis*, *L. donovani* e *L. major* espécies responsáveis por causar leishmanioses além de possuir ação fagoinibidora contra as larvas de lepidóptero *Chlosyne lacinia* (AMBRÓSIO *et al.*, 2008).

1.5. TRANSFORMAÇÕES MICROBIANAS DE LACTONAS SESQUITERPÊNICAS

A utilização de fungos filamentosos em processos de biotransformação é ainda um segmento muito pouco explorado. Tais processos são realizados geralmente com o intuito de se obter novos derivados, realizar modificações régio e estéreo seletivas, aumentar sua atividade biológica, diminuir a sua toxicidade, além de também tentar desenvolver modelos para a realização dos estudos entre estrutura química e atividade, ou somente para busca de novas moléculas (ARAKAWA, 2007). Na tabela 1, página 11, pode-se observar os empregos de diversos gêneros de fungos nos processos de biotransformação.

1.6. AS FERRAMENTAS DA BIOTRANSFORMAÇÃO

1.6.1. Fungos de solo

1.6.1.1. O gênero *Aspergillus* e *Mucor*.

O gênero *Aspergillus* é um grupo diverso cujas espécies são capazes de crescer numa grande gama de substratos orgânicos. Eles são essencialmente saprofíticos e estão associados com os mofo de vários produtos. São metabolicamente versáteis e várias espécies têm sido descritas como produtoras de metabólitos tóxicos (GEISER, *et al.*, 1996, PELCZAR, *et al.*, 1997, MAGNOLI, *et al.* 1998). Muitas das espécies de *Aspergillus* são úteis nos processos industriais, tais como na produção de antibióticos e de outros metabólitos secundários, em fermentações industriais, na biotecnologia e na produção de enzimas comerciais (YOKOYAMA *et al.* 2001, ABARCA *et al.*, 2004).

Ao longo dos anos, algumas transformações microbianas de LSTs foram realizadas por fungos do gênero *Aspergillus* como exemplificadas na tabela 1.

Ainda, pode-se ressaltar um dos recentes trabalhos do grupo de pesquisa envolvendo a lactona budleína A (Figura 3).

Figura 3: Esquema da biotransformação da budleína A por fungos do gênero *Aspergillus*.

Tabela 1: Lactonas sesquiterpênicas e espécies de microrganismos utilizados em processos de biotransformação (ARAKAWA 2007).

Substrato	Microrganismo	Produto	Estrutura	Referência Bibliográfica
costunolido	<i>Aspergillus niger</i> <i>Cunninghamella echinulata</i> <i>Fusarium oxysporum</i>	1 β -hidróxi-arbusculina A		LAMARE & FURTOSS, 1990
		colartina
		11,13-diidro-santamarina
desoxivulgarina	<i>Aspergillus ochraceous</i> <i>Rhizopus nigricans</i>	diidro-douglanina
	<i>Aspergillus ochraceous</i> <i>Rhizopus nigricans</i>	vulgarina

Continuação da Tabela 1

Substrato	Microrganismo	Produto	Estrutura	Referência Bibliográfica
esclareolido	<i>Curvularia lunata</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Gibberella fujikuroii</i>	3-ceto-esclareolido		RAHMAN, FAROOQ & CHOUDHARY, 1997
	<i>Curvularia lunata</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Gibberella fujikuroii</i>	1 β -hidróxi-esclareolido
	<i>Curvularia lunata</i> <i>Aspergillus Níger</i> <i>Gibberella fujikuroii</i> <i>Fusarium lini</i>	3 β -hidróxi-esclareolido
artemisiteno	<i>Aspergillus niger</i>	11-epi-artemisinina		ORABI <i>et al.</i> , 1999
lichnofolido	<i>Cunninghamella echinulata</i> <i>Rhizopus oryzae</i>	16-(1-metil-1-propenil)eremantolido

Continuação da Tabela 1

Substrato	Microrganismo	Produto	Estrutura	Referência Bibliográfica
partenolido	<i>Aspergillus alliaceous</i> <i>Aspergillus flaviceps</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus ochraceous</i> <i>Aspergillus ochraceous</i> <i>Candida albicans</i> <i>Cunninghamella</i>	11 β H-diidro-partenolido		GALAL <i>et al.</i> , 1999
Artemisinina	<i>Mucor polymorphosporus</i> <i>Aspergillus niger</i>	desóxi-artemisinina		ZHAN <i>et al.</i> , 2002
	<i>Mucor polymorphosporus</i> <i>Aspergillus niger</i>	3 β -hidróxi-desóxi-artemisinina
Zaluzanina D	<i>Botrytis cinerea</i> <i>Fusarium equiseti</i>	11,13-diidrozaluzanina D		KRISHINA KUMARI <i>et al.</i> , 2003

Com relação ao gênero *Mucor*, nos últimos 20 anos foram realizados interessantes estudos de transformação microbiológica de terpenos, visto que tais fungos possuem uma ampla especificidade por este tipo de substrato (FRAGA *et al.*, 2003). A funcionalização seletiva de átomos de carbono inativos é um desafio na síntese orgânica usando métodos químicos tradicionais, e como forma de contornar tal limitação, métodos microbiológicos tem sido utilizado frequentemente. Atualmente o gênero *Mucor* tem sido utilizado para funcionalização de sesquiterpenos e terpenos (FRAGA *et al.*, 2004).

1.6.2. Fungos endofíticos

1.6.2.1. O gênero *Diaporthe*

A cepa de fungo endofítico utilizada nos experimentos foi aquela pertencente à coleção de linhagens do Laboratório de Química Farmacêutica sob responsabilidade da Profa. Mônica T. Pupo, e que previamente demonstrou resultados satisfatórios na biotransformação de outro substrato: *Diaporthe phaseolorum* (VR4) isolado de *Viguiera robusta*.

Os fungos endofíticos são microorganismos que colonizam os tecidos vivos e internos das plantas, a princípio sem causar doenças (BACON, WHITE, 2000). SCHULZ e BOYLE (2005) descrevem o termo endofítico como sendo fungos que podem ser detectados em um momento particular em tecidos de plantas aparentemente saudáveis, descartando o futuro *status* da relação.

Alguns destes se mostraram eficientes em biotransformar estereosseletivamente o neuroléptico a tioridazina, produzindo os mesmos metabólitos que o sistema hepático humano produz, alguns deles em altos rendimentos (BORGES *et al.*, 2007; BORGES *et al.*, 2008). Outros resultados também apontam para a obtenção de novos produtos pela introdução não usual de grupamentos metílicos, através da formação de ligação carbono-carbono em naftoquinonas realizada pela cepa de *D. phaseolorum*.

2. OBJETIVOS

Os objetivos gerais do presente trabalho são:

- Isolar a tagC do extrato de lavagem foliar de *T. diversifolia*;
- Efetuar sua biotransformação com diferentes fungos de solo e endofíticos;
- Obter novas moléculas a fim de incrementar a biblioteca de substâncias pertencente ao grupo de pesquisa que está inserido neste trabalho;

Os objetivos específicos são:

- (i) coleta das folhas *T. diversifolia* em campo;
- (ii) preparo do material vegetal e obtenção do extrato bruto de lavagem foliar;
- (iii) partição e fracionamento cromatográfico do extrato bruto de lavagem foliar;
- (iv) isolamento, purificação e identificação de LSTs, em especial a tagC;
- (v) realização de *screening* das transformações microbianas com a tagC utilizando-se fungos de solo e endofítico;
- (vi) realização dos processos de biotransformação;
- (vii) isolamento, purificação e identificação dos produtos biotransformados.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Para os processos microbiológicos foram utilizados os seguinte aparelhos:

- Autoclave vertical Phoenix AV75;
- Capela de fluxo laminar VECO VC FS-09M;
- Estufa de incubação FANEN Ltda – 347 C;
- Mesa agitadora INNOVA TM 4300 – New Brunswick Scientific.

Em relação aos estudos fitoquímicos, os materiais utilizados para a CLV foram colunas de vidro de dimensões compatíveis com a massa das amostras e quantidade de sílica. Como fase estacionária, utilizou-se sílica gel 60 H (Merck, código 7736) e sílica gel 60 (Merck, 0,040-0,063 mm, código 9385), respectivamente. As placas utilizadas em CCDC eram de vidro (5x20, 10x20 e 20x20 cm). Como fase estacionária, utilizou-se sílica gel GF₂₅₄ (Merck, código 7730). A espessura da camada de sílica utilizada para essa técnica cromatográfica foi de 0,25 mm. Como revelador para CCDC, utilizou-se luz UV (Mineralight LAMP, modelo UVGL-25) e vanilina sulfúrica seguido de aquecimento em chapa a 100 °C até o desenvolvimento da reação cromogênica. Os espectros de RMN uni e bidimensionais foram registrados em espectômetro *Bruker* DPX 300 e 500. Os os espectros no IV foram obtidos no espectrofotômetro Perkin-Elmer 502, este pertencentes ao departamento de química da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto.

Os solventes utilizados nas técnicas cromatográficas eram comerciais de diversas marcas (Merck, Synth e Bioclin) ou destilados previamente. As amostras submetidas à RMN foram preparadas através da diluição em CDCl₃ e CD₃OD da marca Aldrich.

Para as análises em CLAE, utilizou-se um cromatógrafo da marca Shimadzu, modelo SLC-10 Avp com detector de arranjo de diodos Shimadzu (UV-DAD) modelo SPD-M10Avp e sistema controlador computadorizado com software Class VP, versão 5.02.

Todas as análises e procedimentos de isolamento através de CLAE foram realizados utilizando-se uma coluna analítica C-18 (Shimadzu, 5µm, 4,6 x 250 mm) e solventes orgânicos grau HPLC das marcas Malinkrodt e J. T. Baker. Para a realização da cromatografia preparativa circular utilizou-se o aparelho *Chromatotron* da marca Harrison Research, Inc. modelo 8924.

Os espectros de massa foram obtidos em um espectrômetro de massas, modelo ultrOTOF_Q - ESI-TOF Mass Spectrometer, Bruker Daltonics, Billerica, MA, EUA.

Os evaporadores rotativos utilizados foram da marca Fisatom, modelo 802.

3.1. Coleta do vegetal

As folhas foram coletadas no mês de maio de 2007 pelo técnico Walter Lopes, do Laboratório de Farmacognosia da FCFRP-USP, e pelo próprio aluno, em Ribeirão Preto, próximo à região do aeroporto Leite Lopes e margens de rodovias adjacentes. Os vegetais possuíam cerca de dois à três metros de altura e não estavam floridos. O peso total das folhas frescas coletadas foi de cerca de 16 kg.

Exsicatas foram anteriormente depositadas no herbário do Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP, sob o código FBC#126.

3.2. Estabilização das folhas

As folhas coletadas foram secas em estufa de ar circulante sob temperatura de 40 °C por uma semana, com a finalidade de promover a completa estabilização das folhas, obtendo-se com esse procedimento um peso seco em torno de 4 kg.

3.3. Obtenção do extrato bruto de lavagem foliar

Com a finalidade de promover inicialmente apenas a extração dos metabólitos armazenados nos tricomas glandulares, realizou-se separadamente a lavagem das folhas utilizando-se diclorometano (DCM) como solvente extrator. As folhas foram mergulhadas repetidas vezes, por alguns segundos, dentro de um béquer contendo DCM, tempo suficiente para promover a dissolução dos tricomas glandulares da superfície das folhas e dos metabólitos de interesse. O extrato obtido com esse procedimento foi então concentrado em rotaevaporador sob pressão reduzida, obtendo-se cerca de 50 g de extrato seco.

3.4. Partição e fracionamento do extrato bruto de lavagem foliar

Inicialmente dissolveu-se os 50 g de extrato seco em uma solução de MeOH-água 7:3 (v/v). Após a solubilização, este foi submetido a partição com *n*-hexano e DCM. As fases originadas foram concentradas em evaporador rotativo sob pressão reduzida, dando origem às fases hexânica e em DCM, que foram denominadas respectivamente de fases FHEX (1,0 g) e FDCM (40 g) além de um resíduo hidroalcoólico com cerca de 9 g. Esse procedimento permitiu separar os componentes em grau diferenciado de polaridade, a fim de se realizar o processo de purificação dos metabólitos secundários de interesse.

3.5. Isolamento do metabólito secundário de interesse, tagitinina C

O monitoramento e agrupamento das frações resultantes de cada CLV foi efetuado através de CCDC do uso de técnica previamente estabelecida (AMBROSIO *et al*, 2008) e uso de padrão, selecionando-se assim as frações de interesse para o prosseguimento deste estudo. Estudos anteriores, realizados no laboratório de Farmacognosia da FCFRP, já haviam demonstrado a presença da LST na fase FDCM, sendo esta escolhida para realizar o isolamento e purificação da substância.

A fase DCM foi submetida a CLV em coluna de vidro de 25 cm de altura por 13,5 cm de diâmetro, utilizando-se uma proporção de 1:15 de amostra: sílica gel (60 H), empacotada sob pressão reduzida, tendo como solvente o *n*-hexano. Foram coletadas no total 36 frações, sendo 4 frações de 250 ml no mesmo sistema de eluição. O esquema de eluição (gradiente crescente de polaridade) utilizado está descrito na Tabela 2.

Tabela 2. Esquema de eluição utilizado no fracionamento da FDCM (40 g) e as massas obtidas.

Solvente	Volume Utilizado	Fração	Massa obtida (g)			
Hex/AcOEt 10%	1000	1 à 4	0,06	0,03	0,02	0,03
Hex/Ac OEt 30%	1000	5 à 8	0,06	0,05	0,19	2,56
Hex/AcOEt 40%	1000	9 à 12	2,54	2,66	9,31	0,93
Hex/AcOEt 50%	1000	13 à 16	1,89	1,92	1,56	0,17
Hex/AcOEt 60%	1000	17 à 20	1,47	0,83	0,72	0,40
Hex/AcOEt 80%	1000	21 à 24	0,20	0,20	0,32	0,29
AcOEt	1000	25 à 28	0,22	0,23	0,29	0,15
Etanol	1000	29 à 32	0,10	0,31	0,16	0,16
Metanol	1000	33 à 36	0,10	0,34	0,06	0,03

As 36 frações obtidas foram concentradas em rotaevaporador rotativo sob pressão reduzida e analisadas por CCDC utilizando-se Hex/AcOEt 2:3 como fase móvel e reveladas com vanilina sulfúrica, sob aquecimento. Após revelação, foram obtidos diversos perfis cromatográficos e as frações agrupadas de acordo com suas semelhanças cromatográficas e codificadas de acordo com a Tabela 3.

Tabela 3. Atribuição de código e agrupamento das frações obtidas com as respectivas massas.

Número das frações	Código (g)
1 e 2	A (0,09)
3 e 4	B (0,05)
5 – 7	C (0,03)
8 – 12	D (18,00)
13 – 16	E (5,45)
17 – 21	F (3,61)
22 – 25	G (1,03)
26 – 30	H (0,762)
31 – 36	I (0,85)

Observando as manchas da CCD da fração D, verificou-se a presença de uma substância majoritária, iniciando-se o processo de isolamento e purificação a partir desta fração. A fração D foi submetida a uma nova CLV, utilizando-se uma

coluna de vidro de 12 cm de diâmetro por 30 cm de altura. Foram utilizados 720 g de sílica gel 60 H na proporção de 40:1. Foram coletadas 14 frações de 250 ml de cada gradiente utilizado. O esquema de eluição utilizado (gradiente crescente de polaridade) está descrito na Tabela 4.

Tabela 4. Esquema de eluição utilizado no fracionamento da fração D e as massas obtidas.

Solvente	Volume Utilizado (mL)/2	Frações de 250mL	Massa obtida (g)	
Hex/AcOEt 20%	500	D1 e D2	0,05	0,28
Hex/AcOEt 30%	500	D3 e D4	0,39	2,77
Hex/AcOEt 35%	500	D5 e D6	2,44	5,66
Hex/AcOEt 40%	500	D7 e D8	2,12	1,11
Hex/AcOEt 45%	500	D9 e D10	0,23	0,18
Hex/AcOEt 50%	500	D11 e D12	0,06	0,02
Metanol	500	D13 e D14	0,02	0,02

Após a eluição em CCDC com fase móvel Hex:AcOEt 2:3 e revelação com vanilina sulfúrica, observou-se que as frações D4 a D7 apresentaram perfis cromatográficos semelhantes e com maior quantidade da substância de interesse. Assim, as frações D4 a D7 foram reunidas em uma nova fração denominada fração X, cujo peso total ficou em torno de 14 g.

A fração denominada X (D4 a D7) foi submetida a CLV, utilizando-se uma coluna de vidro de 12 cm de diâmetro por 30 cm de altura, com 720 g de sílica gel 60 H (proporção 50:1) empacotada sob pressão reduzida, utilizando-se como solvente o Hex:AcOEt 75:25. Foram coletadas 40 frações de 500 ml de cada tipo de gradiente escolhido. O esquema de eluição utilizado (gradiente crescente de polaridade) está descrito na Tabela 5.

Tabela 5. Esquema de eluição utilizado no fracionamento da fração X e as massas obtidas.

Solvente	Volume Utilizado (mL)/4	Fração X	Massa obtida (g)			
Hex/AcOEt 25%	2000	1 à 4	-	-	-	-
Hex/Ac OEt 30%	2000	5 à 8	-	-	-	-
Hex/AcOEt 35%	2000	9 à 12	-	-	-	-
Hex/AcOEt 40%	2000	13 à 16	0,74	0,40	0,30	0,95
Hex/AcOEt 45%	2000	17 à 20	0,78	0,78	0,75	1,12
Hex/AcOEt 60%	2000	21 à 24	1,45	1,17	1,27	0,52
Hex/AcOEt 70%	2000	25 à 28	-	-	-	-
Hex/AcOEt 90%	2000	29 à 32	-	-	-	-
Acetato de etila	2000	33 à 36	-	-	-	-
Metanol	2000	37 à 40	-	-	-	-

As frações obtidas foram concentradas em rotaevaporador rotativo sob pressão reduzida e analisadas por CCDC utilizando-se Hex/AcOEt 2:3 como fase móvel e reveladas com vanilina sulfúrica, seguido de aquecimento. Após revelação, foram obtidos diversos perfis cromatográficos e as frações foram novamente agrupadas de acordo com seus perfis semelhantes e recodificadas. Assim sendo, a fim de direcionar e facilitar o estudo, dividiu-se a frações X em dois grupos: as frações X13 à X24, tendo como agrupamento de X13 a X18 denominada fração T, e o restante(X19 a X24) denominadas como fração V, sendo realizada mais duas CLVs com as frações T e V para separação e purificação da tagC.

Para a realização da CLV da fração T, foi utilizada uma massa de amostra de 4 g e uma proporção de sílica de 50:1. Foram coletadas 12 frações de 250 ml de cada tipo de gradiente escolhido. O esquema de eluição utilizado (gradiente crescente de polaridade) está descrito na Tabela 6.

Tabela 6. Esquema de eluição utilizado no fracionamento da fração T e as massas obtidas.

Solvente	Volume Utilizado (mL)/2	Frações de 250 mL	Massa obtida (g)	
Hex/AcOEt 38%	500	T1 e T2	1,12	0,39
Hex/AcOEt 41%	500	T3 e T4	0,15	0,11
Hex/AcOEt 45%	500	T5 e T6	0,27	0,10
Hex/AcOEt 48%	500	T7 e T8	0,12	0,11
Hex/AcOEt 51%	500	T9 e T10	0,05	0,01
Hex/AcOEt 55%	500	T11 e T12	0,01	0,01

Para a realização da CLV da fração V, foi utilizada uma massa de 5 g e uma proporção de sílica gel 50:1. Foram coletadas 12 frações de 250 ml de cada gradiente escolhido, e o esquema de eluição (gradiente crescente de polaridade) utilizado está descrito na Tabela 7.

Tabela 7. Esquema de eluição utilizado no fracionamento da fração V e as massas obtidas.

Solvente	Volume Utilizado (mL)/2	Frações de 250 mL	Massa obtida (g)	
Hex/AcOEt 35%	500	V1 e V2	0,17	0,46
Hex/AcOEt 38%	500	V3 e V4	0,73	1,86
Hex/AcOEt 41%	500	V5 e V6	0,18	0,84
Hex/AcOEt 45%	500	V7 e V8	0,15	0,10
Hex/AcOEt 48%	500	V9 e V10	0,07	0,07
Hex/AcOEt 52%	500	V11 e V12	0,02	0,02
Hex/AcOEt 56%	500	V13 e V14	0,02	0,000
Hex/AcOEt 60%	500	V15 e V16	0,000	0,000

Com as frações T e V, após serem rotaevaporadas, foram realizadas CCDC com fase móvel Hex:AcOEt:CHCl₃ 5:3:2 e 2% de ácido acético. Algumas destas frações, por apresentarem perfil cromatográfico mais simples e certo grau de pureza,

foram levadas a processos de isolamento diferentes como Cromatografia preparativa circular radial e CCDP (Hex:AcOEt:CHCl₃ 5:3:2 e 2% de ácido acético). Em seguida foram analisadas em CLAE e espectrometria de RMN, a fim de determinar a percentagem de pureza e submissão ao processo de *screening* de biotransformação.

Para a cromatografia preparativa circular radial foi utilizada uma camada de 4 mm de espessura de sílica gel PF₂₅₄ e a fase móvel utilizada foi Hex:éter dietílico : AcOEt 6:3:1, com um fluxo de 2 mL/min. O monitoramento e a revelação do metabólito de interesse tagC durante esse procedimento foi realizado utilizando-se um revelador físico (luz UVλ = 254 nm).

3.6. Identificação estrutural das substâncias isoladas

A identificação estrutural dos metabólitos secundários isolados e purificados foi realizada através de métodos espectrométricos, tais como espectroscopia no IV, UV, RMN ¹H e de ¹³C, espectrometria de massas e CLAE-UV/Vis-DAD, identificando-se assim a tagC, seus produtos de biotransformação e os metabólitos dos fungos.

Efetuuou-se a comparação dos dados obtidos das substâncias isoladas com dados de substâncias autênticas previamente conhecidas, as quais fazem parte da biblioteca de substâncias do Laboratório de Farmacognosia da FCFRP-USP.

3.7. Transformações microbianas da tagitinina C

3.7.1. Screening

O ensaio de transformação microbiana foi realizado no Laboratório de Farmacognosia da FCFRP-USP, sob supervisão da Profa. Dra. Suraia Said e Dra. Mônica Tallarico Pupo, sendo conduzido de acordo com a metodologia descrita a seguir.

Inicialmente foram testados os fungos de solo AT e MR e o fungo endofítico *Diaporthe phaseolorum*. Ambos os fungos foram mantidos em estoque em meio ágar-batata-dextrose inclinado e armazenados a 4 °C.

Inicialmente foi realizada uma triagem em pequena escala (30 mL de meio fermentativo, em Erlenmeyers de 125 mL) para a seleção da(s) cepa(s) mais eficiente(s) no processo de biotransformação da tagC. Os experimentos de *screening* foram realizados conforme procedimentos previamente descritos para processos de biotransformação (DAOUBI *et al.*, 2005; BUSTILLO *et al.*, 2001; DURAN *et al.*, 1999).

Os fungos de solo foram repicados em meio extrato de malte e incubados a 30 °C por sete dias para a obtenção de esporos. Em seguida, os esporos foram coletados em suspensão e, após contagem em câmara de Neubauer, foram inoculados de maneira a se obter cerca de 1×10^7 esporos/mL no meio pré-fermentativo para produção de biomassa. Em seguida, foram incubados com agitação constante a 150 rpm e 30 °C por 48 horas. Após este período, a massa produzida foi filtrada e transferida para o meio líquido de Czapeck ou meio fermentativo (ALVIANO *et al.* 1992) com pH inicial em 6,0. As culturas foram incubadas a 30 °C com agitação a 150 rpm por 10 dias. Após 24 horas, o meio de cultivo foi suplementado com a tagC (0,1 mg/mL) e dissolvido em DMSO (300 µL), solvente que não interferiu no meio de cultura. A cada 24 horas foi retirado um Erlenmeyer contendo o meio suplementado com tagC e outro contendo somente DMSO como controle, estes submetidos à filtração em papel de filtro Brigitta®, com auxílio de funil de Büchner.

Para o microrganismo endofítico, a metodologia apresenta algumas diferenças. Este fungo foi cultivado por aproximadamente 10 dias em placas de Petri contendo o meio constituído de ágar-malte-peptona. Em seguida, os micélios foram

inoculados em frascos (125 mL) contendo 30 mL do meio Czapek. Estes frascos foram então incubados por dois dias, a 25 °C, sob agitação a 150 rpm. Então, o substrato, solubilizado em DMSO, foi distribuído nos frascos. Frascos sem adição do substrato e somente adição de DMSO foram utilizados como controle.

Os filtrados foram então submetidos à partição com solvente orgânico, sendo retirado o excesso de água com Na_2SO_4 anidro e concentrado a vácuo. Após a retirada de todos frascos correspondentes a todos os dias foi realizado o monitoramento dos metabolitos nos filtrados através de metodologias analíticas como CLAE, CCDC ou ainda IV, para verificar o eventual aparecimento dos produtos biotransformados.

3.7.2. Escala preparativa

Após determinar as melhores condições de tempo em microescala/*screening* para transformação microbiana da LST, os processos foram ampliados em 10x (10 Erlenmeyers com 30 mL de cultivo, para o dia selecionado) para obtenção de maiores rendimentos dos produtos formados.

O processo de filtração e partição com solventes orgânicos foram mantidos.

4. RESULTADOS e DISCUSSÃO

4.1. Isolamento da tagitinina C

Na etapa fitoquímica deste trabalho o objetivo foi o isolamento de uma grande quantidade da molécula de interesse. Para isso, o isolamento foi realizado através de CCDP e cromatografia preparativa circular radial e a presença da tagC foi detectada através de RMN e auxílio do CLAE.

Com alguns dos extratos obtidos, realizou-se análise em CLAE, para verificar a presença e porcentagem de pureza, como observado nas figuras seguintes. O tempo de retenção da tagC, nas condições especificadas abaixo, gira em torno de 7,6 minutos, confirmado pelo seu espectro no UV (Figura 4).

Essas análises foram realizadas em uma coluna analítica C18 utilizando-se a seguinte condição cromatográfica previamente determinada: MeCN:H₂O 45:55; fluxo 1,0 mL/min. A condição cromatográfica desenvolvida demonstrou uma boa resolução cromatográfica, simplicidade (fase isocrática) e rapidez nas análises. A detecção desse metabólito no UV foi realizada em 210 nm, pois as LSTs α,β -insaturadas possuem um máximo de absorção em torno desse comprimento de onda. No caso da tagC, observa-se absorção adicional em 254 nm. Nessa condição a tagC é facilmente detectada (GOFFIN *et al.*, 2003) devido à presença de um grupamento cetona presente no C3 conjugado com duas ligações duplas entre os carbonos C1-C2 e C4-C5 (dienona conjugada), conforme observado na estrutura química presente na Figura 4.

Figura 4: Espectro no UV da tagC.

Figura 5: Cromatograma obtido da fração D6 (mAu x min), MeCN:H₂O 45:55, fluxo 1mL/min, UV λ =254 nm.

O cromatograma da fração D6 (Figura 5) revela a presença de elevada quantidade de tagC e, a partir delas realizou-se a separação das frações de interesse, ricas em tagC.

Após a obtenção das diversas frações T e V, estas foram submetidas a CCDP com fase móvel Hex/AcOEt/ CHCl_3 5:3:2 e 2% de AcOH e ainda a cromatografia preparativa circular radial com fase móvel Hex/Éter/AcOEt 6:3:1 e 2% de AcOH a 2ml/min, para purificar a tagC. Algumas destas frações, por apresentarem perfil cromatográfico mais simples e grau de pureza elevado, foram submetidas a análises espectrométricas de RMN (Figuras 6, 7 e 8), a fim de avaliar sua pureza e ainda confirmar a presença da substância de interesse. (As frações V1 à V7 e T1 à T5/6, apresentam perfil cromatográficos bastante semelhantes.)

Figura 6: Espectro de RMN ^1H da fração T4 (500 MHz, CDCl_3).

Figura 7: Espectro de RMN ^1H da fração V5 (500 MHz, CDCl_3).

Figura 8: Espectro de RMN ^1H da TagC (400 MHz, CDCl_3).

As frações T e V demonstram grau de pureza elevada (cerca de 90%) quando comparados com a substância pura, sendo essa fração utilizada para se iniciar a etapa de biotransformação.

Comparando-se os espectros de RMN ^1H das duas frações com o espectro da tagC, confirmou-se que se tratava da própria substância, sendo possível dar continuidade ao trabalho.

A discussão dos dados de RMN ^1H da tagC foi realizada segundo AMBROSIO (2008), a qual é descrita a seguir:

No espectro de RMN ^1H , pode-se observar a presença de dois dubletos em δ 6,36 e δ 5,81, integrados para 1H cada, atribuídos respectivamente aos hidrogênios H13a e H13b, característicos da dupla exocíclica presente no anel lactônico. Esses dois hidrogênios, que apresentam acoplamento alílico com o H7 ($J_{7,13a}=1,7$ Hz; $J_{7,13b}=1,8$ Hz) devido ao favorável alinhamento dos seus orbitais, possuem também uma diferença significativa de deslocamento químico ($\Delta = 0,5$ ppm), que é atribuído ao efeito anisotrópico provocado pelos elétrons do grupamento carbonila presente no C12.

Pode-se observar também a presença de dois dubletos em δ 6,93 e 6,26 integrados para 1H cada, acoplados entre si ($J_{1,2} = 16,9$ Hz – acoplamento *trans*), que foram atribuídos ao H1 e H2 e um dubleto em δ 5,88, também integrado para 1H, atribuído ao H5 ($J_{5,6} = 9,0$ Hz). Os deslocamentos químicos de H1, H2 e H5 podem ser justificados devido à presença de um grupamento cetona presente no C3 conjugado com duas ligações duplas entre C1-C2 e C4-C5 (dienona conjugada), o que pode ser observado no espectro no UV dessa substância. No espectro de RMN ^1H , ainda observa-se a presença de um multipeto em δ 3,55 e de um duploduplodubleto em δ 5,33 ($J_{8/9a} = 6,0$ Hz; $J_{8/9b} = 10,0$ Hz; $J_{7/8} = 3,2$ Hz), integrados para 1H cada, que foram atribuídos ao H7 e H8, respectivamente. Verifica-se também a presença de dois grupos metilas em δ 1,53 (s – H14) e em δ 1,95 (s – H15) e de um dubleto em δ 5,41, atribuído ao H6 ($J_{5,6} = 9$ Hz). É interessante observar que o H6 acopla apenas com o hidrogênio H5 e não com o H7, devido ao ângulo formado entre os orbitais das ligações H6-C6 e H7-C7, que deve ser aproximadamente 90° (SILVERSTEIN *et al.*, 1979). O H9a e H9b apresentam-se como dois duploduplodubleto em δ 2,44 e 2,00 ($J_{8/9a} = 6,0$ Hz; $J_{8/9b} = 10,0$ Hz; $J_{9a/9b} = 13,8$ Hz), respectivamente, integrados para 1H cada. Os sinais no espectro de RMN ^1H que permitiram concluir a presença do éster isobutirato foram a presença de dois dubletos ($J_{3'/2'}$ e $J_{4'/2'} = 7,1$ Hz) em δ 1,06 e 1,03, integrados para 3H cada, que foram atribuídos ao H3' e H4' do grupamento metila. O hidrogênio H2' foi atribuído a um multipeto em δ 2,44 (acoplamento com H3' e H4').

A reunião destes dados de RMN ^1H e análise do tempo de retenção juntamente com UV via CLAE/DAD, permitiu propor para esta substância a estrutura referente a 3-oxo-8 β -isobutiroilóxi,10 α -hidróxi-germacra-1(*E*),4(*Z*),11(13)-trien-6 α ,12-olido (tagC), anteriormente descrita para esta espécie (BARUAH *et al.*, 1979).

4.2. Processo de biotransformação: “Screening”

4.2.1. Análises por CCDC

Para avaliar as possíveis biotransformações e o consumo da tagC, a cada 24 h dois Erlenmeyers, um contendo fungo mais substância, e outro contendo somente o fungo adicionado de DMSO (solvente utilizado para solubilização da tagC), eram submetidos a filtração a vácuo e estes filtrados particionados com DCM, sendo rotaevaporados e secados em ar comprimido.

As CCDC foram realizadas em placas de 0,25 mm de espessura de sílica GF₂₅₄, com 20x20cm, sendo a fase móvel Hex:AcOEt:CHCl₃:AcOH 5:3:2 2%.

Mucor rouxii

Como observado na placa de CCDC (Figura 9), a partir das raia do 3º dia (raia 5) foi possível observar o início do surgimento de uma nova mancha com fator de retenção (*R_f*) menor, ou seja, maior polaridade. Para comprovar que esta não seria um produto do metabolismo do fungo, foi realizada uma CCDC do seu controle (branco), na qual não observou-se a presença desta mancha, sugerindo-se o início do processo de biotransformação. Juntamente com o aparecimento desta mancha, houve o consumo ou desaparecimento da mancha correspondente à tagC. Esse fato revela uma grande possibilidade de haver um único produto de biotransformação do fungo considerando este método de análise, o que tornaria o processo rentável. Esse processo prevalece até o 10º dia, no qual ainda é possível observar essa mancha de polaridade maior que a tagC.

Figura 9: CCDC dos dias de cultivo do fungo MR; (1) 1º dia, fungo com substrato; (2) 1º dia, fungo sem substrato; (3) 2º dia, fungo com substrato; (4) 2º dia, fungo sem substrato; (5) 3º dia, fungo com substrato; (6) 3º dia, fungo sem substrato; (7) 4º dia, fungo com substrato; (8) 4º dia, fungo sem substrato; (9) 5º dia, fungo com substrato; (10) 5º dia, fungo sem substrato; (11) 6º dia, fungo com substrato; (12) 6º dia, fungo sem substrato; (13) 7º dia, fungo com substrato; (14) 7º dia, fungo sem substrato; (15) 8º dia, fungo com substrato; (16) 8º dia, fungo sem substrato; (17) 9º dia, fungo com substrato; (18) substrato.

Aspergillus terreus

Observando-se a cromatoplaça para este fungo (Figura 10), visualizou-se a partir do 6º dia o surgimento de uma mancha semelhante à mancha do fungo *MR*, mancha esta de Rf menor ou polaridade ainda maior. No 7º dia surgem duas manchas de polaridades menores que a da tagC (Rf maiores). Estas novas manchas não apareceram nas raias do fungo com DMSO, sugerindo novamente possíveis produtos de biotransformação.

Figura 10: CCDC dos dias de cultivo do fungo AT; (1) 1º dia, fungo com substrato; (2) 1º dia, fungo sem substrato; (3) 2º dia, fungo com substrato; (4) 2º dia, fungo sem substrato; (5) 3º dia, fungo com substrato; (6) 3º dia, fungo sem substrato; (7) 4º dia, fungo com substrato; (8) 4º dia, fungo sem substrato; (9) 5º dia, fungo com substrato; (10) 5º dia, fungo sem substrato; (11) 6º dia, fungo com substrato; (12) 6º dia, fungo sem substrato; (13) 7º dia, fungo com substrato; (14) 7º dia, fungo sem substrato; (15) 8º dia, fungo com substrato; (16) 8º dia, fungo sem substrato; (17) 9º dia, fungo com substrato; (18) substrato.

Diaporthe phaseolorum

Como observado na CCD para este fungo (Figura 11), ao longo dos dias a tagC parece não ter sido metabolizada ou biotransformada nas condições utilizadas. Sendo assim, decidiu-se não trabalhar com este fungo.

Figura 11: CCDC dos dias de cultivo do fungo DP; (1) 1º dia, fungo com substrato; (2) 1º dia, fungo sem substrato; (3) 2º dia, fungo com substrato; (4) 2º dia, fungo sem substrato; (5) 3º dia, fungo com substrato; (6) 3º dia, fungo sem substrato; (7) 4º dia, fungo com substrato; (8) 4º dia, fungo sem substrato; (9) 5º dia, fungo com substrato; (10) 5º dia, fungo sem substrato; (11) 6º dia, fungo com substrato; (12) 6º dia, fungo sem substrato; (13) 7º dia, fungo com substrato; (14) 7º dia, fungo sem substrato; (15) 8º dia, fungo com substrato; (16) 8º dia, fungo sem substrato; (17) 9º dia, fungo com substrato.

4.2.2. Análise por CLAE

Mucor rouxii

Comparando-se os perfis cromatográficos ao longo dos dias, verifica-se o desaparecimento do pico de absorção correspondente à tagC. A partir do 5º dia, a área desse pico torna-se quase desprezível, lembrando que neste sistema de eluição o TR da tagC é em torno de 7,6 minutos, como pode se observar no cromatograma abaixo (Figura 12).

Figura 12: Cromatograma obtido do 5º dia de cultivo, fungo com substrato, (mAu x min), MeCN:H₂O 45:55 0,1% de ácido acético, fluxo 1mL/min, UV λ =254 nm.

Aspergillus terreus

Da mesma forma que ocorre com o *Mucor*, o pico da lactona ao longo dos dias vai diminuindo sua área até o completo desaparecimento (Figura 13), devido à sua biotransformação ou biocatálise.

Figura 13: Cromatograma obtido do 9º dia de cultivo, fungo com substrato, (mAu x min), ACN:H₂O 45:55 0,1% de ácido acético, fluxo 1mL/min, UV λ =254 nm.

4.2.3. Análise por infravermelho

Aspergillus terreus

Através da análise por IV do 9º dia de biotransformação (Figuras 14 e 15), podemos confirmar a abordagem da análise através de CLAE/UV. A tagitinina sofreu mudanças significativas, tais como ataque ao grupamento cetônico do C3 quando comparados ao espectro do substrato (Figura 18). Este fato é representado pelo desaparecimento do pico na região de estiramento em 1735 cm^{-1} . Neste caso, poderíamos também confirmar ainda presença e/ou substituição da hidroxila no C10 cuja região de estiramento é em 3450 cm^{-1} .

Figura 14: Espectro no IV, 9º dia do fungo *AT* sem substrato.

Figura 15: Espectro no IV, 9º dia do fungo *AT* com substrato.

Mucor rouxii

Através da análise por IV do 9º dia de biotransformação (Figuras 16 e 17), foi possível confirmar o que foi dito na análise com CLAE/UV, ou seja, que a molécula em questão sofreu mudanças na região próxima ao grupamento cetônico do C3 quando comparados ao espectro do substrato (Figura 18). Este fato está

representado pelo desaparecimento da banda região de estiramento de carbonila em 1735 cm^{-1} e ainda mudanças no C10 com possível eliminação da hidroxila, fato confirmado com a diminuição da intensidade na região de estiramento (banda larga) em torno de 3450 cm^{-1} .

Figura 16: Espectro no IV, 9º dia do fungo *MR* sem substrato.

Figura 17: Espectro no IV, 9º dia do fungo *MR* com substrato.

Figura 18: Espectro no IV, do substrato com alta concentração de tagC.

4.3. Processo de biotransformação: escala preparativa

Tendo como base os resultados apresentados no item 6.2., os parâmetros foram padronizados conforme descrito a seguir.

Os fungos foram repicados em meio extrato de malte e incubados a 30 °C por sete dias para a obtenção de esporos. Em seguida, os esporos foram coletados em suspensão e, após contagem em câmara de Neubauer, foram inoculados de maneira a se obter cerca de 1×10^7 esporos/mL no meio pré-fermentativo para produção de biomassa. Em seguida, os esporos foram incubados com agitação constante de 150 rpm e 30 °C por 48 horas. Após este período, a massa produzida foi filtrada e sua massa transferida para o meio líquido de Czapeck ou meio fermentativo (ALVIANO *et al.* 1992) com pH inicial em 6,0. As culturas foram incubadas a 30 °C com agitação de 150 rpm por 10 dias. Após 24 horas, o meio de cultivo foi suplementado com a tagC (0,1 mg/mL), dissolvido em DMSO (300μL), solvente que não interferiu no meio de cultura. Após cinco dias foram retirados dez Erlemeyers contendo o meio suplementado com tagC e um único contendo somente DMSO como controle. Estes foram submetidos a filtração papel de filtro Brigitta® e auxílio de um funil de Büchner, sendo seu filtrado particionado com DCM e em

seguida com AcOEt, obtendo os extratos descrito na Tabela 8. Além disto, para cada extrato ainda foram cultivados os seus respectivos controles .

Tabela 8: Extratos obtidos da partição com diferentes solventes do filtrado dos cultivos fúngicos.

Fungo	Solvente	Código	Massa (mg)
<i>A. terreus</i>	DCM	ATDC	45
<i>A. terreus</i>	Acetato	ATAC	48
<i>M. rouxii</i>	DCM	MRDC	33
<i>M. rouxii</i>	Acetato	MRAC	35

4.4. Avaliação dos perfis cromatográficos dos extratos em escala preparativa

Para todos os extratos foram utilizadas as seguintes condições cromatográficas: coluna analítica C18 (fluxo de 1 ml/min com concentração padronizada em 2mg/ml, *loop* de 20µL e o seguinte gradiente de fase móvel) como na Tabela 9.

Tabela 9: Gradiente de fase móvel utilizada para avaliar o perfil dos extratos.

<i>Tempo (min)</i>	<i>% MeCN</i>
0,01	5
60	100
65	50
70	5
75	5

Sendo assim, foram feitas a análise e a comparação dos perfis de cada extrato em relação ao seu controle e ainda extrato enriquecido de tagC (Figura 19), cujo TR está em torno de 30 minutos.

Figura 19: Cromatograma obtido para análise e obtenção do perfil cromatográfico da tagC e obtenção do tempo de retenção, condições da fase móvel descritas na Tabela 8.

4.4.1. ATDC

Figura 20: Cromatograma obtido para análise e obtenção do perfil cromatográfico do extrato particionado com DCM do fungo *AT* em 210 nm, condições da fase móvel descritas na Tabela 8.

Figura 21: Cromatograma obtido para análise e obtenção do perfil cromatográfico do extrato particionado com DCM do controle do fungo *AT* em 210 nm, condições da fase móvel descritas na Tabela 8.

Comparando o perfil cromatográfico do fungo (Figuras 19, 20 e 21) com o do padrão de tagC, verificou-se o aparecimento de picos diferentes e ainda os existentes no controle, mostrando a formação de possíveis produtos biotransformados e/ou ainda produtos de origem do metabolismo do fungo que podem ter tido sua origem a partir de iliciação causada pela substância. Descartou-se a possibilidade do pico em torno de 30 minutos ser a própria tagitina devido às diferenças no espectro no UV e ainda no TR que são ligeiramente diferentes.

4.4.2. ATAC

Figura 22: Cromatograma obtido para análise e obtenção do perfil cromatográfico do extrato particionado com AcOEt do fungo *AT* em 210 nm, condições da fase móvel descritas na Tabela 8.

Figura 23: Cromatograma obtido para análise e obtenção do perfil cromatográfico do extrato particionado com AcOEt do controle do fungo *AT* em 210 nm, condições da fase móvel descritas na Tabela 8.

Da mesma forma que observado no extrato em DCM, este extrato apresentou produtos diferentes entre controle e substrato, mostrando a existência de produtos interessantes a serem isolados, que poderão novamente ser de origem fúngica ou produtos da transformação da tagC.

4.4.3. MRDC

Figura 24: Cromatograma obtido para análise e obtenção do perfil cromatográfico do extrato particionado com DCM do fungo *MR* em 220 nm, condições da fase móvel descritas na Tabela 8.

Figura 25: Cromatograma obtido para análise e obtenção do perfil cromatográfico do extrato particionado com DCM do controle do fungo *MR* em 220 nm, condições da fase móvel descritas na Tabela 8.

Ao analisar-se as Figuras 24 e 25, observa-se que o fungo *MR* mostrou-se também passível de ser usado na biocatalise da tagC. O cromatograma do controle aparenta estar bastante simplificado quando comparado ao fungo *AT*, o que sugere uma maior facilidade em isolar produtos de origem biotransformada, evitando assim o isolamento de produtos de origem do metabolismo do fungo.

4.4.4. MRAC

Figura 26: Cromatograma obtido para análise e obtenção do perfil cromatográfico do extrato particionado com AcOEt do fungo *MR* em 210 nm, condições da fase móvel descritas na Tabela 8.

Figura 27: Cromatograma obtido para análise e obtenção do perfil cromatográfico do extrato particionado com AcOEt do controle do fungo *MR* em 210 nm.

A partir do extrato em AcOEt deste fungo conseguiu-se visualizar o aparecimento de um pico de área elevada que não esta presente no controle, mas

ainda não passível de definir sua origem, seja ela fúngica ou biotransformada, uma vez que somente após seu isolamento e elucidação será possível definir sua estrutura.

4.5. Isolamento dos constituintes dos extratos de biotransformação

Para isolamento dos metabólitos presentes nos extratos foi utilizada CLAE, sendo todas análises e procedimentos de isolamento em coluna analítica C-18.

Para cada extrato foi utilizado um determinado gradiente de eluição MeCN:H₂O a fim de separar os constituintes.

Devido à pouca massa dos extratos e à complexidade do mesmo, o isolamento foi efetuado em escala analítica, injetando-se 0,4mg/20µl.

4.5.1. Extrato ATDC

Para o isolamento dos compostos que constituíam o extrato ATDC proveniente do fungo *AT*, utilizou-se esquema de eluição mostrado na Tabela 10.

Tabela 10: Esquema do gradiente de eluição da fase móvel MeCN:H₂O para o extrato ATDC.

Tempo (min)	% MeCN
0,01	20
35,00	60
38,00	100
43,00	100
48,00	20
53,00	20

Analisando a Figura 28, pode-se constatar a presença o isolamento de quatro constituintes (Tabela 11). A partir da análise dos espectros no UV destes constituintes pode-se inferir que estes possivelmente resultam do processo de biotransformação da tagC, mas que somente poderão ser confirmados após análises dos espectros de RMN de suas respectivas estruturas.

Tabela 11: Tabela com códigos, Tempos de retenção e massas das respectivas substâncias isoladas do extrato ATDC.

Código	Tr(min)	Massa (mg)
ATDC 01	19,5	2,0
ATDC 02	24,1	1,0
ATDC 03	25,7	1,0
ATDC 04	29,2	1,0

Figura 28: Esquema ilustrativo do isolamento das substâncias presentes no extrato ATDC, e seus respectivos espectros no UV.

4.5.2. Extrato ATAC

Para o isolamento dos compostos que constituíam o extrato ATDC proveniente do fungo *AT*, utilizou-se esquema de eluição mostrada na Tabela 11.

Tabela 12: Esquema do gradiente de eluição da fase móvel MeCN:H₂O para o extrato ATAC.

Tempo (min)	% MeCN
0,01	5
60	100
65	50
70	5
75	5

A partir deste fungo foi possível o isolamento de três substâncias (Tabela 12) (Figura 29). Após a análise dos espectros no UV de ATAC01 e ATAC02, pode-se inferir que suas origens são possivelmente fúngicas, uma vez que estes apresentam o espectro no UV característico de substâncias aromáticas e ainda que ATAC3 possui seu espectro no UV bastante diferente do espectro da tagC.

Tabela 13: Tabela com códigos, tempo de retenção e massas das respectivas substâncias isoladas do extrato ATAC.

Código	Tr(min)	Massa (mg)
ATAC 01	11,1	0,9
ATAC 02	19,7	1,0
ATAC 03	28,2	0,6

Figura 29: Esquema ilustrativo do isolamento das substâncias presentes no extrato ATAC, e seus respectivos espectros no UV.

4.5.3. Extrato MRDC

Para o isolamento dos compostos que constituíam o extrato MRDC proveniente do fungo *MR*, utilizou se esquema de eluição mostrado na Tabela 13.

Tabela 14: Esquema do gradiente de eluição da fase móvel MeCN:H₂O para o extrato MRDC.

Tempo (min)	% MeCN
0,01	5
35,00	50
39,00	100
42,00	100
47,00	5
50,00	5

O isolamento dos constituintes do extrato MRDC forneceu três substâncias (Figura 30) cujos TR podem ser observados na Tabela 14.

Tabela 15: Tabela com códigos, tempo de retenção e massas das respectivas substâncias isoladas do extrato MRDC.

Código	Tr(min)	Massa (mg)
MRDC 01	14,8	0,4
MRDC 02	24,6	0,3
MRDC 03	26,1	0,6

Figura 30: Esquema ilustrativo do isolamento das substâncias presentes no extrato MRDC, e seus respectivos espectros no UV.

4.5.4. Extrato MRAC

Enfim, para o isolamento dos constituintes deste último extrato foi utilizada a seguinte condição de fase móvel, como segue na Tabela 16.

Tabela 16: Esquema do gradiente de eluição da fase móvel MeCN:H₂O para o extrato MRAC.

Tempo (min)	% MeCN
0,01	5
20,00	30
25,00	100
28,00	100
32,00	5
35,00	5

A partir deste, foram isolados dois constituintes (Tabela 16): um de origem fúngica, que também foi encontrado no seu respectivo controle, e ainda mais um composto cuja origem foi supostamente induzida pela tagC (Figura 31).

Tabela 17: Tabela com códigos, tempo de retenção e massas das respectivas substâncias isoladas do extrato MRAC.

Código	Tr(min)	Massa (mg)
MRAC 01	11,1	1,0
MRAC 02	14,7	0,5

Figura 31: Esquema ilustrativo do isolamento das substâncias presentes no extrato MRAC, e seus respectivos espectros no UV.

4.6. Elucidação estrutural das substâncias isoladas

4.6.1. ATDC 04

Analisando o espectro de RMN ^1H (Apêndice 1) para esta substância pode-se visualizar a presença de dois *dubletos*, integrados para um hidrogênio cada em δ 6,29 e δ 5,62, atribuídos respectivamente ao H13_a ($J_{7/13a} = 2,8$ Hz) e H13_b ($J_{7/13b} = 2,3$ Hz), sendo que estes dados confirmam a presença da dupla exocíclica conjugada a carbonila pertencente ao anel γ -lactônico. Partindo desta informação, foi possível inferir que o metabólito em questão era proveniente da biotransformação da tagitinina C.

A partir da identificação do H13_a e H13_b foram sendo identificados os demais H presentes na molécula, através do auxílio do espectro de COSY ¹H-¹H (Apêndice 2). A atribuição de sinais, todos eles integrados para 1 H foi realizada da seguinte forma: um *multipeto* em δ 4,33 referente ao H7 este apresenta-se mais desblindado que H7 da tagC pois ocupa uma posição no espaço próximo ao átomo de oxigênio do grupo furano, conforme mostra figura 32; um *duploduplodubeto* em δ 5,53 foi atribuído ao H8 ($J_{7/8} = 4,2$, $J_{8/9b} = 11,0$ e $J_{8/9b} = 4,9$ Hz), um *duplodubeto* em δ 1,74 ao H9_a ($J_{9a/9b} = 14,7$ Hz) e outro *duplodubeto* em δ 1,66 ($J_{9b/9a} = 14,7$) ainda pode-se observar mais dois *duplodubetos* referentes ao H2_a (δ 2,57, $J_{2a/2b} = 12,5$ Hz) e ao H2_b δ 1,93 (δ 2,57, $J_{2a/2b} = 12,5$ Hz) e, por fim um duplodubeto em δ 3,99 característico de H ligado ao grupamento -COCH₃ (Ambrósio, 2008) tendo sido atribuído ao H1 ($J_{H1/H2a} = 6,7$ e $J_{H1/H2b} = 12,5$).

Do mesmo modo que foi observado no espectro de RMN ¹H para tagC, foi observada a presença de um *septupeto* em δ 2,42 e dois *dubetos* em δ 1,04 e δ 1,05, referentes aos hidrogênios do éster isobutirato, bem como os sinais dos hidrogênios das metilas H14 e H15, que apresentam-se como dois *singletos*, integrados para três hidrogênios cada, em δ 1,50 e δ 1,44.

Ainda neste espectro observa-se a presença de um *singeto* integrado para 3 H referentes ao grupo -OCH₃. Com auxílio do espectro de HMBC (Apêndice 3) e Ambrósio (2008), foi possível concluir que este grupo está ligado no C1 e com orientação β .

Observou-se ainda a presença de um *singeto* em δ 3,33, o que permitiu propor a presença de um grupamento epóxido orientado em α ligado entre os carbonos C4-C5, pois na posição de ângulo de 90° entre ambos não há acoplamento entre H5 e H6 (Ambrósio, 2008), conforme mostra a Figura 33. E esta relação entre o ângulo diedro e a constante de acoplamento pode ser justificada pela equação de Karplus (Figura 34).

Figura 32: Estrutura Tridimensional ATDC 04, destacando a desblindagem sofrida pelo H7 e a proximidade no espaço com o átomo de oxigênio do anel furano.

Figura 33: Estrutura Tridimensional de ATDC 04, destacando-se o não acoplamento do hidrogênios H5 e H6 e o ângulo de 90° entre eles.

Figura 34: Equação de Karplus correlacionando o ângulo diedro e a constante de acoplamento entre hidrogênios.

Na tabela 18 podem ser observados todos os dados de RMN ^1H , COSY ^1H - ^1H , HMBC e HMQC (apêndice 4).

Tabela 18: Dados de RMN para substância ATDC 04.

Posição	δH (J em Hz)	COSY ^1H - ^1H	δC^*	$^1\text{J}_{\text{CH}}$	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$
1	3,99 <i>dd</i> (6,7; 10,35)	H-2a, H-2b	86,7	H-1	H-2a, H-2b	H-14, - OCH ₃
2a	2,57 <i>dd</i> (6,7, 12,5)	H-1, H-2b	40,5	H-2a		-OCH ₃
2b	1,93 <i>dd</i> (10,7, 12,6)	H-1, H-2a	40,5	H-2b		
3			101,5		H-2a, H-2b	H-5, H-15
4			67,2		H-5, H-15	
5	3,33 <i>s</i>		66,2	H-5	H-6	H-15
6	5,13 <i>dd</i> (4,65)	H-7	75,0	H-6	H-5	
7	4,33 <i>dddd</i>	H-6, H-8, H-13a, H-13b	42,0	H-7	H-6	H-13 ^a , H- 13b
8	5,53 <i>ddd</i> (4,2; 7,1 e 11,0)	H-7, H-9a, H-9b	71,2	H-8	H-9a, H9b	H-6
9a	1,74 <i>dd</i> (11,1; 14,7)	H-8, H-9b	35,0	H-9a		
9b	1,66 <i>dd</i> (4,8; 14,7)	H-8, H-9a	35,0	H-9b		
10			82,8		H-9a, H9b, H-14	H-2 ^a
11			136,3		H-13a	
12			169,6			H-6, H-13a, H-13b
13a	6,29 <i>dd</i> (2,8)	H-7	123,5	H-13a		
13b	5,62 <i>dd</i> (2,3)	H-7	123,5	H-13b		
14	1,50 <i>s</i>		26,7	H-14		H-1, H-9a, H-9b
15	1,44 <i>s</i>		21,0	H-15		H-5
1'			176,4		H-2'	H-3', H-4'
2'	2,41 <i>sept</i>	H-3', H-4'	34,5	H-2'	H-3', H-4'	
3'	1,05 <i>d</i>	H-2'	19,5	H-3'	H-2'	H-4'
4'	1,04 <i>d</i>	H-2'	19,0	H-4'	H-2'	H-3'
-OCH ₃	3,35 <i>s</i>		59,1	-OCH ₃	H-1	

*Dados obtidos de AMBRÓSIO 2008.

Tendo em vista estes dados de espectrometria de RMN juntamente com análises de espectrometria de massas, confirma-se então a peso molecular de 396 desta substância, indicando esta ser como 1 β -metóxi-3 α -hidróxi-3,10 β -4,5 α -diepóxi-8 β -isobutirolóxi-germacr-11(13)-en-6 α ,12-olido, sendo sua estrutura visualizada na Figura 32. As condições do experimento foram Bomba de Infusão, Fluxo 150 $\mu\text{l/h}$, fase móvel para solubilização MeOH:H₂O 90:10, sendo que o modo de detecção foi positivo,

Figura 32: 1 β -metóxi-3 α -hidróxi-3,10 β -4,5 α -diepóxi-8 β -isobutiroilóxi-germacra-11(13)-en-6 α ,12-olido

4.7. PROPOSTA DE BIOTRANSFORMAÇÃO ENZIMÁTICA DO COMPOSTO ATDC 04

Figura 33: Proposta de biotransformação da tagC.

SPRING *et al.*, 2001, em trabalho referente ao isolamento de lactonas sesquiterpênicas de *Viguiera quinqueremis*, sugere a interconversão das formas A e B da tagC, conforme mostra a figura 33. O autor cita a possibilidade de adição de uma metoxila no C1 quando a substância está na presença de MeOH, geralmente durante o processo de análise em CLAE. Este fato não ocorreu neste trabalho, uma vez que em nenhum momento trabalhou-se com MeOH, seja para o isolamento ou para elucidação das substâncias tagC ou ATDC 04.

De acordo com BARRERO *et al.* (2009), reações de epoxidação e hidrogenação por fungos filamentosos em LSTs ocorreria em C11 e C13, indicando que este seria um mecanismo de defesa dos fungos frente à atividade citotóxica do grupamento α -metileno- γ -lactona. Assim, para explicar a formação de epóxido entre C4-C5 na molécula isolada, e ainda a metoxilação de C1, seguimos a conclusão proposta por ONKEN e BERGER 1999, onde os autores citam que terpenóides são preferencialmente dissolvidos nos sistemas de membranas de células de fungos, induzindo mudanças das propriedades da membrana e causando efeitos tóxicos. Estes fungos reagem a esses efeitos co-metabolizando esses compostos a compostos mais solúveis em água, mostrando que os sistemas enzimáticos que estariam envolvidos nesse processo de detoxificação são comparáveis àqueles de outras células eucarióticas, nas quais, em um primeiro passo, monoxigenases do citocromo P450 catalisam a oxifuncionalização da molécula (exemplificados por MA *et al.* (2006) e GŁADKOWSKI *et al.* 2007) e, no segundo passo, produtos mais solúveis em água são formados por hidrólise (epóxi-hidrolases) ou conjugação (por ação da glutathione S-transferase).

Pode-se citar também ainda que esta mesma molécula foi isolada das inflorescências de *T. diversifolia* (AMBRÓSIO 2008). Logo, sugere-se que esta, na verdade, pode não somente ser resultante do metabolismo secundário da planta, mas também do processo de biotransformação da tagC por fungos endofíticos. Alguns destes fungos, como o *Phoma sorgina*, isolado da *T. diversifolia*, mostraram-se eficientes em biotransformar estereosseletivamente a tioridazina, produzindo os mesmos metabólitos que o sistema hepático humano produz (Borges *et al.*, 2007; BORGES *et al.*, 2008).

5. CONCLUSÕES

A partir das informações obtidas até o momento, pode-se concluir que os fungos *A. terreus* e *M. rouxii* foram capazes de biotransformar a lactona sesquiterpênica tagC. No futuro, sugere-se que seja possível comparar a biotransformação deste no organismo humano, uma vez que a tagC é ingerida pela população devido aos usos medicinais da *T. diversifolia*.

O produto de biotransformação, ATDC04, mostra que as reações ocorridas são diferentes daquelas já citadas na literatura onde as reações de epoxidação no anel lactônico são mais comuns a fim de eliminar a sua toxicidade. Pode-se também concluir que fungo não somente modifica a a estrutura química da molécula da molécula por este mecanismo usual mas também por reações em outras partes das moléculas como epoxidação entre C4-C5.

Os resultados deste trabalho fornecem informações importantes para pesquisas futuras que envolvam a ação biológica e/ou citotóxica de LSTs. Por exemplo, pode-se avaliar quais são os mecanismos envolvidos na detoxificação deste tipo de substância por outros organismos através de processos de metabolização. Além disto, pode-se estabelecer novos critérios para a obtenção de LSTs com menor toxicidade ou maior ação biológica frente ao diversos alvos biológicos, seja eles *in vitro* ou *in vivo*. Portanto, existem diferentes e promissoras perspectivas no estudo de biotransformação da tagC.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akinola, J.O.; Larbi, A.; Farinu G.O; Odunsi, A. Seed treatment methods and duration effects on germination of wild sunflower. **Experimental Agriculture**, v. 36, p. 63-69, 2000.
- Alviano, C.S.; Farbiarz, S.R.; Travassos, L.R.; Angluster, J.; Souza, W. Effect of environmental factors on *Fonsecaea pedrosoi* morphogenesis with emphasis on sclerotic cells induced by propranolol. **Mycopathologia**, v. 119, p. 17-23, 1992.
- Ambrósio S.R.; Oki, Y; Heleno, V.C.; Chaves, J.S; Barboni, P.G; Lichston, J.E.; Constantino M.G.;Varanda, E.M; Da Costa, F.B. Constituents of glandular trichomes of *Tithonia diversifolia*: Relationships to herbivory and antifeedant activity. **Phytochemistry**. V. 69, p2052–2060, 2008.
- Arakawa, N.S. ; Ambrosio, S.R.; Nomizo, A; Da Costa, F.B.; Avaliação da atividade citotóxica e de apoptose da budleína A isolada de *Viguiera robusta* Gardn. (Asteraceae). In: **XIX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, Salvador-BA, 2006.
- Arakawa, N.S.; Transformações Microbinas e avaliação da citotoxicidade de lactonas sesquiterpênicas de *Viguiera robusta*. Tese de doutorado:Ribeirão Preto:Faculdade de Ciências Farmacêutias de Ribeirão Preto.Departamento de Ciências Farmacêuticas/USP 2007. 141p.
- Bacon, C. W.; White, J. F. **Microbial Endophytes**. New York: Marcel Dekker Inc., 2000.
- Barrero, A.F.; Oltra, J.E.; Raslan, D.S.; Saude, D.A. Microbial transformation of lactones by the fungi *Cunninghamella echinulata* and *Rhizopus oryzae*. **Journal of Natural Product**, v. 62, p. 726-729, 1999.
- Bastos, 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**, 2007. DOI: 10.1016/j.jpba.2007.05.018.).
- Borges, W.S., Pupo, M.T. Novel anthraquinone derivatives produced by *Phoma sorghina*, an endophyte found in association with the medicinal plant *Tithonia diversifolia* (Asteraceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.17, p. 929-934, 2006.

- Bremer, K. **Asteraceae: cladistics and classification**. Portland, Timber Press, 1994.
- Dobson M.C. Chemical space and biology. **Nature**. V. 432, p. 824-828, 2004.
- Dutta, P.; Chaudhury, R.P.; Sharma, R.P. Insect feeding deterrents from *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) Gray. **Journal of Environmental Biology**, v. 14, p. 27-33, 1993(a).
- Dutta, P.; Chaudhury, R.P.; Sharma, R.P. Persistent efficacy of the feeding deterrents of *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) Gray against *Diacrisia oblique* Walker (Lepidoptera: Arctiidae). **Journal of Environmental Biology**, v. 14, p. 107-112, 1993(b).
- Elufioye, T. O.; Agbedahunsi, J. M. Antimalarial activities of *Tithonia diversifolia* (Asteraceae) and *Crossopteryx febrifuga* (Rubiaceae) on mice in vivo. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 93, p. 167–171, 2004.
- Faber, K. **Biotransformations in Organic Chemistry**. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1997.
- Fehler, M.; Schmidt, J.M.; Property Distributions: Differences between Drugs, Natural Products, and Molecules from Combinatorial Chemistry. **Journal Chemical Information Computer Science**. V. 43, p. 218-227, 2003.
- Fraga, B.M.; The microbiological transformation of the diterpenes dehydroabietanol and teideadiol by *Mucor plumbeus*. **Phytochemistry**. V.63, p. 663-668, 2003.
- Fraga, B.M.; Biotransformation of two stemodane diterpenes by *Mucor plumbeus*. **Tetrahedron**. V 60, p.7921–7932, 2004.
- Franks, L.M.; Teich, N.M. **Introduction to the cellular and molecular biology of cancer**. 3rd ed., New York, Oxford University Press, 2001.
- Freitas, T.P.S.; Furtado, N.A.J.C.; Bastos, J.K.; Said, S. Active substances against trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi* and Tagitinina C are produced in sequence by *Talaromyces flavus*. **Microbiological Research**, v. 157, p. 201-206, 2002.
- Galal, A.M.; Ibrahim, A.R.S.; Mossa, J.S.; El-Feraly, F.S.: Microbial transformation of parthenolide. **Phytochemistry**, v. 51, p. 761-765, 1999.
- Gładkowski, W.; Grabarczyk, M.; Wińska, K.; Ratuś, B.; Białońska, A.; Ciunik, Z.; Stereoselective microbial epoxidation of unsaturated bicyclic γ -lactones with the

alkylsubstituted cyclohexane system. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 49, p. 79–87, 2007.

Goffin, E.; Cunha, A.P. Da; Ziémons, E.; Tits, M.; Angenot, L.; Frederich, M. Quantification of Tagitinina C in *Tithonia diversifolia* by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Phytochemical Analysis**, v. 14, p. 378-380, 2003.

Goffin, E.; Ziémons, E.; Mol, P. De; Madureira, M.Do C.; Martins, A.P.; Cunha, A.P.Da.; Philippe, G.; Tits, M.; Angenot, L.; Frederich, M. *In vitro* antiplasmodial activity of *Tithonia diversifolia* and identification of its main active constituent: tagitinina C. **Planta Medica**, v. 68, p. 543-545, 2002.

Goodman, L.S.; Gilman, A.(Ed.) **As bases farmacológicas da terapêutica**. 9^a ed., Rio de Janeiro McGraw-Hill, 1996.

Gu, J.Q.; Gills, J.J.; Park, E.J.; Mata, G.E.; Hawthorne, M.E.; Axelrod, F.; agiti, P. I.; Fong, H. H.S.; Mehta, R.G.; Pezzuto, J.M.; Kinghorn, A.D. Sesquiterpenoids from *Tithonia diversifolia* with potential chemopreventive activity. **Journal of Natural Products**, v. 65, p. 532-536, 2002.

Hamowia, A.M.; Saffaf, A.M. Pharmacological studies on *Vernonia amygdalina* (Del.) and *Tithonia diversifolia* (Gray). **Veterinary Medical Journal**, v. 42, n. 2, p. 91-97, 1994.

Harvey, A.L.; Natural products as a screening resource. **Current Opinion in Chemical Biology**. V. 11, p. 480-484, 2007.

Jackson, M.; Karwowski, 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**, Tokyo, v.46, p.34-38. 1993.

Jama, B.; Palm, C.A.; Buresh, R.J.; Niang, A.; Gashengo, C.; Nziguheba, G.; Amadalo, B. *Tithonia diversifolia* as a green manure for soil fertility improvement in western Kenya: a review. **Agroforestry Systems**, v.49, p. 201-210, 2000.

Katto, C.I.R.; Salazar, A. Botón de oro (*Tithonia divesifolia*) uma fonte proteica alternativa para el trópico. **Liver Stock Research for Rural Development**, v. 6, p. 1-15, 1995.

Krishna Kumari, G.N.; Masilamani, S.; Ganesh, M.R.; Aravind, S.: Microbial transformation of zaluzalin-D. **Phytochemistry**, v. 62, p. 1101-1104, 2003.

Kuo, Y.H.; Chen, C.H. Diversifolol, a novel rearranged eudesmane α -agitinina α -no from the leaves of *Tithonia diversifolia*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 45, n.7, p. 1223-1224, 1997.

Kuroda, M.; Yokosuka, A.; Kobayashi, R.; Jitsuno, M.; Kando, H.; Nosaka, K.; Ishii, H.; Yamori, T.; Mimaki Y. Sesquiterpenoids and Flavonoids from the Aerial Parts of *Tithonia diversifolia* and Their Cytotoxic Activity. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 55, p. 1240-1244, 2007.

Lamare, V.; Furstoss, R. Bioconversion of sesquiterpenes. **Tetrahedron**, v. 46, p. 4109-4132, 1990.

Lamaty, G.; Menut, C.; Zollo, P.H.A.; Kuilate, J. R.; Bessiere, J. M.; Lin, C. C.; Lin, M. L.; Lin, J. M. The anti-inflammatory and liver protective effect of *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray and *Dicliptera chinensis* Juss. Extracts in rats. **Phytotherapy Research**, v. 7, p. 305-309, 1993.

Larsson J, Gottfries J, Muresan S, Backlund A: ChemGPS-NP: tuned for navigation in Biologically relevant chemical space. **Journal Natural Products**. V.70, p.789-794, 2007.

Leresche, J.E.; Meyer H. Chemocatalysis and Biocatalysis (Biotransformation): Some Thoughts of a Chemist and of a Biotechnologist. **Organic Process Research & Development**. V. 10, p 572-580, 2006.

López-Antón, N.; Hermann, C.; Murillo, R.; Merfort I.; Wanner G.; Volmar A.M.; Dirsch V. Sesquiterpene lactones induce distinct forms of cell death that modulate human monocyte-derived macrophage responses. **Apoptosis**, v. 12, p. 141-153, 2007.

Loughlin, W. A. Biotransformation in Organic Synthesis. **Bioresource Tecnology**. V. 74, p. 49-63, 2000 .

Ma, X.; Ye, M.;Wu, L. ; Guo, D. Microbial transformation of curdione by *Mucor spinosus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, p. 367–371, 2006.

Miura, T.; Furuta, K.; Yasuda, A.; Iwamoto, N.; Kato, M.; Ishihara, E.; Ishida, T.; Tanigawa, K. Antidiabetic effect of nitobegiku in KK-Ay diabetic mice. **American Journal of Chinese Medicine**, v. 30, p. 81-86, 2002.

Mungarulire, J. A phytochemical investigation of medicinal plants of the Compositae from Rwanda. **Herba Hungarica**, v. 29, p. 73-78, 1990.

Newman, D.J.; Cragg, G.M.; Snader, K.M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 1002-1037, 2003.

Onken, J.; Berger, R.G. Biotransformation of citronellol by the basidiomycete *Cystoderma carcharias* in a aerated-membrane bioreactor. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 51, p. 158-163.

Owoyele, V.B.; Wuraola, C.O.; Soladoye, A.O.; Olayele, S.B. Studies on the anti-inflammatory and analgesic properties of *Tithonia diversifolia* leaf extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 90, p. 317-321, 2004.

Pereira, P.S.; Dias, D.A.; Vichnewski, W.; Nasi, A.M.T.T.; Herz, W. Sesquiterpene lactones from Brazilian *Tithonia diversifolia*. **Phytochemistry**, 1997, v. 45, p. 1445-1448.

Philipson, J. D. Phytochemistry and medical plants. **Phytochemistry**, V. 56, p. 237-243, 2001.

Picman, A.K. Biological activities of sesquiterpenes lactones. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 14, p. 225-281, 1986.

Rajeshkumar, N.V.; Joy, K.L.; Kuttan, G.; Ramsewak, R.S.; Nair, M.G.; Kuttan, R. Antitumour and anticarcinogenic activity of *Phyllanthus amarus* extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, p.17-22, 2002.

Rang, H.P.; Dale, M.M.; Ritter, J.M. **Farmacologia**. 3^a ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1997.

Roberts, S. M., Turner, N. J., Willets, A. J., Turner, M. K. **Introduction to Biocatalysis Using Enzymes and Microorganisms**. New York: Cambridge University Press, 1995.

Rogério, A.P.; Fontanari C.; Melo, M.C.C.; Ambrosio S.R.; Souza G.E.P., Pereira, P.S.; França S.C.; Da Costa F.B.; Faccioli, L.H. Anti-inflammatory, analgesic and anti-oedematous effects of *Lafoensia pacari* extract and ellagic acid. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 58, p. 1265-1273, 2006.

Shaw, N. M.; Karen, T. R.; Kiener, A. Lonza: 20 Years of Biotransformation. **Advanced Synthesis Catalysis**, v. 345, n. 4, p. 425-435, 2003.

Schulz, B.; Boyle, C.; Draeger, S.; Rommert, A. K. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. **Mycological Research**, 106: 996-1004, 2002.

Schmidt, T.J. Toxic activities of sesquiterpenes lactones: structural and biochemical aspects. **Current Organic Chemistry**, v. 3, p. 577-608, 1999.

Spring, O.; Zipper, R.; Reeb, S.; Vogler B.; Da Costa, F.B. Sesquiterpene lactones and a myoinositol from glandular trichomes of *Viguiera quinqueremis* (Heliantheae; Asteraceae). **Phytochemistry**, v. 57, p. 267-272, 2001.

Spring, O. Microsampling: na alternative approach using sesquiterpenes lactones for systematics. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 17, p. 509-517, 1989.

Tona, L.; Kambu, K.; Mesia, K.; Cimanga, K.; Apers, S.; Bruyne, T. de; Pieters, L.; Totte, J.; Vlietinck, A. J. Biological screening of traditional preparations from some medicinal plants used as antidiarrhoeal in Kinshasa, Congo. **Phytomedicine**, v. 6, p. 59-66, 1999.

Villarreal, M.L.; Alvarez, L.; Alonso, D.; Navarro, V.; Garcia, P.; Delgado, G. Cytotoxic and antimicrobial screening of selected terpenoids from Asteraceae species. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 42, p. 25-29, 1994.

Xiong, Z.; Wei, Q.; Chen, H.; Chen, S.; Xu, W.; Qiu, G.; Liang, C.; Hu, C. Microbial transformation of androst-4-ene-3,17-dione by *Beauveria bassiana*. **Steroids**, v. 71, p. 979-983, 2006.

Wall, M.E.; Wani, M.C. Camptothecin and Taxol: Discovery to clinic – Thirteenth Bruce F. Cain Memorial Award Lecture, **Cancer research**, v. 55, p. 753-760, 1995.

Wu, T. S.; Shi, L. S.; Kuo, P. C.; Leu, Y. L.; Liou, M. J.; Wu, P. L.; Wu, Y. C.; Lou, S.C.; Chen, Y. P.; Chang, H. C. Cytotoxic principles from the leaves of *Tithonia diversifolia*. **Chinese Pharmaceutical Journal**, v. 53, p. 217-223, 2001.

Ziémons, E.; Goffin, E.; Lejeune, R.; Angenot, L.; Thunus, L. FT-IR measurement of tagitinina C after solvent extraction from *Tithonia diversifolia*. **Talanta**, v. 62, p. 383-387, 2004.

Ziémons, E.; Goffin, E.; Lejeune, R.; Cunha, A. P. Da; Angenot, L.; Thunus, L. Supercritical carbon dioxide extraction of tagitinina C from *Tithonia diversifolia*. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 33, p. 53-59, 2005.

Apêndice 1: Espectro de RMN ^1H do composto ATDC04 (500 MHz, CDCl_3).

Apêndice 2: Espectro de COSY ^1H - ^1H do composto ATDC 04 (500MHz, CDCl_3).

Apêndice 3: Mapa de contorno HMBC da substância ATDC 04 (500MHz, CDCl₃)

Apêndice 4: Mapa de contorno HMQC da substância ATDC 04 (500MHz, CDCl_3).